A vertical fluorescence microscopy image showing a cell migration track. The track is composed of numerous small, interconnected cells, appearing as a dense, branching structure. The cells are stained with two different dyes: one in green and one in red. The green staining is more prominent in the upper and lower portions of the track, while the red staining is more prominent in the middle. The background is black, making the green and red signals stand out. The overall appearance is that of a complex, interconnected network of cells, likely representing a cell migration track during embryogenesis.

**PAPEL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR  
EN LA MIGRACIÓN CELULAR  
DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS**

**Tesis Doctoral  
Besaiz J. Sánchez Sánchez**

Imagen de portada: imagen confocal de una visión ventral de un embrión de *Drosophila melanogaster* de estadio 12. En verde se observa la proteína Laminina y en rojo los Macrófagos.

Imagen de contraportada: imagen confocal de una visión ventral de un embrión de *Drosophila melanogaster* de estadio 15. En verde se observan los macrófagos y las líneas representan el seguimiento realizado a cada uno de ellos durante su migración.



Universidad Pablo de Olavide

**Papel de la matriz extracelular en la migración celular durante la embriogénesis.**

Memoria de Tesis presentada por Besaiz J. Sánchez Sánchez para optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide. Tesis inscrita en el Programa de Doctorado en Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química.

Directora:

María Dolores Martín Bermudo

Sevilla. 2016

Centro  
Andaluz  
de Biología  
del Desarrollo



Este trabajo ha sido realizado en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (Universidad Pablo de Olavide-Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Junta de Andalucía), y ha sido financiado por:

-Proyecto del Plan Nacional I+D de Investigación con título “Análisis genético, molecular y celular de los mecanismos que regulan la migración e invasión celular”. Código de referencia: BFU2010-166669. Ministerio de economía y competitividad. Gobierno de España.

-Proyecto del Plan Nacional I+D de Investigación con título “Aproximación genética, celular y molecular para identificar mecanismos que regulan la migración e invasión celular”. Código de referencia: BFU2013-48988. Ministerio de economía y competitividad. Gobierno de España.

La Dra. María Dolores Martín Bermudo, Científica titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en calidad de Directora certifica que:

El trabajo realizado por el doctorando Besaiz J. Sánchez Sánchez titulado “Papel de la matriz extracelular en la migración celular durante la embriogénesis”, ha sido realizado bajo su dirección y supervisión, y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y calidad necesarias para constituir una Tesis doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide.

**Directora:**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Dolores Martín Bermudo', written in a cursive style.

María Dolores Martín Bermudo

*A mi hermano Nestali,  
que me enseñó a luchar por mis sueños,  
y a seguirlos a donde hiciera falta,  
GRACIAS*

*Para Izertel, Pepe y Fideli.  
Por ellos soy quien soy.*

*Porque fueron, somos,  
Porque somos, serán.*

# Abreviaturas

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DNAc:** DNA complementario

**RNA:** ácido ribonucleico

**RNAi:** RNA interferente

**ATP:** adenosín trifosfato (del inglés “adenosine triphosphate”)

**βGal:** β-Galactosidasa

**CN:** Cuerda nerviosa.

**DTT:** ditionitrotol

**dNTP:** desoxinucleótidos trifosfato

**EDTA:** ácido etildiaminotetraacético (del inglés “ethylenediaminetetraacetic acid”)

**EGTA:** ácido etilenglicoltetraacético (del inglés “ethylenglycoltetraacetic acid”)

**EGF-R:** receptor de factores de crecimiento epidérmico (del inglés “epidermal growth factor receptor”)

**GFP:** proteína verde fluorescente (del inglés “Green fluorescent protein”)

**HRP:** peroxidasa de rábano (del inglés “horseradish peroxidase”)

**LanB1:** Laminina β1

**MEC:** matriz extracelular

**PBS:** tampón fosfato alcalino (del inglés “phosphate buffer saline”)

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “polymerase chain reaction”)

**TBE:** tampón Tris-Borato-EDTA

**Tris:** tris-hidroximetil-aminometano

**UAS:** secuencia de activación corriente arriba (del inglés “upstream activation sequence”)

**Vkg:** Viking (Colágeno tipo IV)

# Índice

Resumen: .....	11
Introducción.....	11
1. Migración Celular.....	13
<i>Moléculas implicadas en la migración celular sobre MEC.</i> .....	15
1.1. <i>Las integrinas.</i> .....	15
1.2. <i>Las Rho GTPasas.</i> .....	16
1.3. <i>Las Rab GTPasas.</i> .....	18
1.4. <i>Los receptores tirosina kinasas.</i> .....	20
1.5. <i>La matriz extracelular.</i> .....	21
1.5.1. <i>Colágeno.</i> .....	22
1.5.2. <i>Laminina.</i> .....	22
1.5.3. <i>Nidogen /Entactin.</i> .....	25
1.5.4. <i>Perlecan.</i> .....	27
2. Los macrófagos de <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema modelo para el estudio del papel de la MEC en la migración celular. ....	28
2.1. <i>Tipos de hemocitos.</i> .....	28
2.2. <i>Migración de macrófagos.</i> .....	29
2.3. <i>Moléculas implicadas en la regulación de la migración de macrófagos.</i> .....	33
2.3.1. <i>Integrinas.</i> .....	33
2.3.2. <i>Rho GTPasas.</i> .....	35
2.3.3. <i>Rab GTPasas.</i> .....	36
2.3.4. <i>Receptores tirosina kinasas.</i> .....	36
2.3.5. <i>Proteínas de la MEC.</i> .....	38
2.3.5.1. <i>Colágeno IV.</i> .....	39
2.3.5.2. <i>Lamininas.</i> .....	39
2.3.5.3. <i>Perlecan.</i> .....	40
2.4. <i>Regulación de la fagocitosis de macrófagos embrionarios.</i> .....	40
Objetivos .....	13
Resultados I.....	13
Análisis del papel de las Lamininas en la migración de macrófagos embrionarios. ....	46
1. Estudio del papel de lamininas en las diferentes etapas de la migración de macrófagos durante la embriogénesis:.....	47
1.1. <i>Entrada en la cola del embrión.</i> .....	49
1.2. <i>Migración a lo largo de la línea media de la cuerda nerviosa.</i> .....	52
1.3. <i>Migración lateral en la cuerda nerviosa.</i> .....	55
1.4. <i>Migración aleatoria.</i> .....	57
2. Análisis del requerimiento de las lamininas durante la migración de macrófagos. ....	59
2.1 <i>Estudio del patrón de expresión embrionario de las lamininas.</i> .....	60
2.1.1. <i>Expresión del RNAm de LanB1.</i> .....	60
2.1.2. <i>Expresión de la proteína LanB1.</i> .....	61
Análisis de la expresión de LanB1 en tejido fijado. ....	62
Análisis in vivo de la expresión de LanB1. ....	62
La migración de macrófagos se requiere para una correcta deposición de la ECM alrededor de la cuerda nerviosa. ....	64
2.2. <i>Estudio del requerimiento funcional de las lamininas.</i> .....	66
2.2.1. <i>Las lamininas se requieren de manera específica en los macrófagos para su migración.</i> ... 66	66
Expresión de RNAs frente a las lamininas de manera específica en los macrófagos. ....	66
Trasplante de macrófagos. ....	68
2.2.2. <i>Las lamininas se requieren en la cuerda nerviosa para una correcta migración de los macrófagos.</i> .....	70
Expresión en la cuerda nerviosa de RNAs frente a las lamininas. ....	70

Función de las lamininas en la formación de la cuerda nerviosa. ....	71
3. Estudio de los mecanismos moleculares que regulan la secreción de las lamininas durante la migración de macrófagos. ....	75
4. Mecanismos moleculares a través de los cuales las lamininas regulan la migración de los macrófagos. ....	79
5. Papel de las lamininas en la migración de los macrófagos hacia las heridas. ....	83
6. Interacción de las lamininas y otros componentes de la ECM en la migración de macrófagos. ....	85
7. Estudio de la actividad fagocítica de los macrófagos. ....	87
<b>Discusión I</b> .....	<b>46</b>
<b>Resultados II</b> .....	<b>46</b>
Análisis del papel de Nidogen en la migración de los macrófagos de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	100
1. Generación de mutantes. ....	101
1.1. Generación de deficiencias por salto impreciso de trasposón. ....	101
Mapeo molecular por PCR. ....	104
Secuenciación. ....	105
1.2. Generación por CRISPR. ....	106
2. Análisis del fenotipo del mutante Ndg15. ....	111
<b>Discusión II</b> .....	<b>46</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>46</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>46</b>
I. Genética de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	122
A. Cepas usadas. ....	122
B. Sistema UAS/GAL4 ....	123
C. Generación de moscas transgénicas. ....	124
II. Fijación de embriones. ....	127
III. Hibridación in situ. ....	128
IV. Inmunohistoquímica. ....	131
A. Tinción de embriones. ....	131
B. Técnica TUNEL. ....	132
C. Tinción de embriones con pERK o srp. ....	133
V. Anticuerpos y microscopía. ....	134
A. Anticuerpos. ....	134
B. Microscopía. ....	135
VI. Mapeo molecular de mutantes de Nidogen. ....	135
VII. Técnicas de filmación de imágenes in vivo. ....	137
A. Filmación de imágenes in vivo. ....	137
B. Realización de heridas en el ectodermo del embrión. ....	139
C. Trasplante de macrófagos. ....	141
VIII. Análisis estadístico. ....	143
IX. Recetas. ....	143
<b>Bibliografía</b> .....	<b>46</b>

# **Índice de figuras y tablas.**



## Resumen:

Posiblemente la migración celular sea la función más conocida que se le asigna a la matriz extracelular (MEC) durante la embriogénesis. Sin embargo, poco se sabe de cómo la MEC regula la migración celular **in vivo**, ya que su estudio en el ambiente tridimensional de un organismo en desarrollo es complicado. Por ello, la mayoría del conocimiento que se tiene sobre el papel de la MEC en embriogénesis deriva de experimentos realizados con células u órganos en cultivo. Esta función de la MEC en migración celular durante la embriogénesis ha sido clásicamente atribuida a la MEC expuesta en el sustrato, matriz exógena. Sin embargo, experimentos realizados recientemente en células en cultivo, han revelado que las células al migrar también pueden usar una MEC endógena, secretada de manera autocrina. Sin embargo, se desconoce si esta capacidad de las células de usar su propia matriz para migrar se utiliza durante la embriogénesis. Por ello, en esta tesis doctoral se han usado los macrófagos de *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para el estudio in vivo del papel de la MEC en migración celular durante la embriogénesis. En concreto, esta tesis se ha centrado en los siguientes aspectos. Por una parte, se ha estudiado el papel de las lamininas, principales componentes de la MEC, en la migración de los macrófagos in vivo. Por otra, se ha analizado la contribución de las lamininas endógenas y exógenas en este proceso de migración. Y finalmente, se han examinado los mecanismos moleculares y celulares por los cuales las lamininas regulan la migración de los macrófagos. Los resultados obtenidos demuestran que los macrófagos usan lamininas endógenas y exógenas para su migración a través del embrión. Si bien, se propone que estas dos fuentes de lamininas ejercen funciones distintas. Así, mientras que la Laminina endógena promovería la migración, la exógena tendría un papel más estructural, implicado en la correcta formación del espacio intersticial por el cual migran los macrófagos. También muestra que las lamininas regulan la direccionalidad y la estabilidad de las proyecciones de macrófagos al migrar. Además, se implica a las Rho GTPasas Rabs en la secreción de las lamininas. Así mismo, se plantea que uno de los mecanismos moleculares por el cual las lamininas regularían la migración de los macrófagos es mediante la modulación de la actividad de sus receptores las integrinas y el receptor de los factores guías, el PVR. Por último, se ha analizado el posible papel de otros componentes de la MEC, como Nidogen y Colágeno IV, en la migración de los macrófagos. Los resultados demuestran que si bien Colágeno IV se requiere, aunque en menor medida que las lamininas, Nidogen es prescindible.



# Introducción



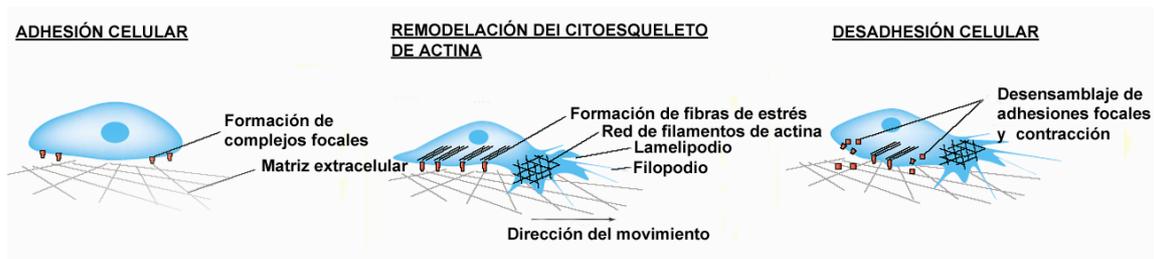
## 1. Migración Celular.

La migración celular tiene un papel clave en una amplia variedad de fenómenos biológicos que tienen lugar tanto durante la embriogénesis como en el individuo adulto. Durante el desarrollo embrionario son numerosos los casos donde el órgano o tejido que se está formando depende de la migración de sus células primordiales. En el adulto, la migración celular es esencial tanto en las células inmunes para su función de defensa, como en las células epiteliales para cicatrizar las heridas. Además, este comportamiento, que es un proceso fascinante ya que involucra numerosos procesos estrechamente coordinados y controlados, se vuelve destructivo y dañino cuando se adquiere por las células cancerosas. Por lo tanto, una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la migración celular no solo ayudaría a comprender mejor la embriogénesis, sino también a ayudar a entender, o incluso a tratar el cáncer.

La migración celular se puede dividir en migración colectiva y en migración individual. Se entiende por migración colectiva al movimiento de varias células, ya sea formando parte de un grupo, de una fila o de una capa. En este tipo de migración las células permanecen funcionales y físicamente conectadas entre ellas, manteniendo la integridad del grupo. Ejemplos de migración colectiva son las tres laminas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). Otro ejemplo puede ser las células del borde del ovario de *Drosophila melanogaster*. Es más, un comportamiento similar al de migración colectiva se ha visto en algunos tipos de cáncer. La migración individual es aquella que, como su propio nombre indica, llevan a cabo células de forma individual. De este tipo de migración se pueden encontrar multitud de ejemplos durante el desarrollo embrionario, como son las células del mesodermo visceral caudal de *Drosophila melanogaster*, así como en el individuo adulto, como pueden ser células del sistema inmune, como los hemocitos. La principal diferencia entre estas dos formas de migración es que en la migración colectiva no todas las células tienen las mismas características, ya que algunas mantienen características epiteliales y otras mesenquimales, mientras que en la migración individual todas las células son mesenquimales.

## Introducción

El proceso de migración celular es un proceso cíclico. Este ciclo comienza con la adquisición de una polaridad celular, de tal manera que se genera una asimetría espacial entre las partes frontal y trasera de la célula. Esta polarización es debida a la recepción de señales externas, estímulos quimiotácticos, como factores de decrecimiento o proteínas de la matriz extracelular, que determinan la dirección de la migración. Como consecuencia de la polarización se forman prolongaciones transitorias de la membrana celular en el frente de migración. Estas prolongaciones o extensiones, conocidas como filopodios y lamelipodios, son responsables del movimiento celular. Un componente principal de estas extensiones es la actina, componente del citoesqueleto celular. La polimerización de actina es necesaria para la formación de lamelipodios y filopodios y está regulada tanto por proteínas que controlan la disponibilidad de monómeros de actina, como por proteínas que despolimerizan la actina. Una vez formados los lamelipodios y filopodios, estos necesitan adherirse al sustrato sobre el que migra la célula. Los puntos de adhesión de los lamelipodios y filopodios se conocen como adhesiones focales. Estos deben ser dinámicos de tal modo que, si bien se establecen en el frente de migración, se deben desestabilizar en la parte lateral y trasera de la célula para así permitir el movimiento celular. La desestabilización en la parte trasera de la célula produce la retracción y contracción del cuerpo celular, lo que induce la migración (Fig. 1).



**Fig. 1.** Regulación de las adhesiones focales y del citoesqueleto de actina durante la migración celular (adaptado de (Carragher y Frame, 2004).

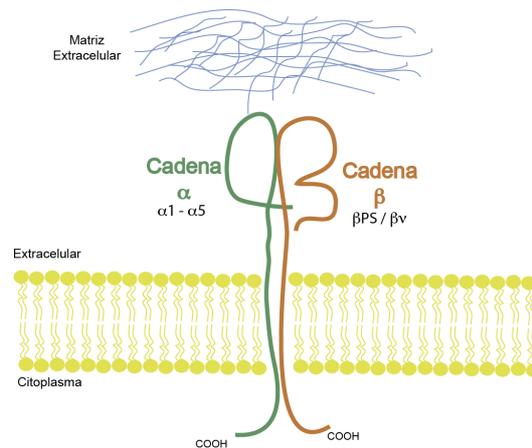
La migración celular es un movimiento coordinado de las células sobre un sustrato (Horwitz y Webb, 2003). Como hemos mencionado anteriormente, el sustrato, dependiendo del contexto celular, puede ser la superficie de otras células o la matriz extracelular (MEC). La MEC está formada por diferentes componentes como son Perlecan, Colágeno tipo IV, Nidogen y Lamininas. Estas últimas desempeñan un papel

fundamental en la migración de distintas poblaciones de células embrionarias en diferentes especies (Brown, 2011). En la mayoría de los casos, las células migran sobre una matriz presente en el sustrato por donde se mueven (exógena). Sin embargo, experimentos en cultivo sugieren que las células pueden usar una MEC depositada por ellas mismas mientras migran (endógena). Este es el caso de diferentes células tumorales, incluyendo melanomas y gliomas (Kawataki et al., 2007; Oikawa et al., 2011). Hasta hoy día, los estudios realizados sobre los procesos de migración celular durante la embriogénesis han demostrado que las células migran sobre una MEC depositada en los espacios intersticiales y/o sobre la membrana basal que rodea los diferentes tejidos.

## Moléculas implicadas en la migración celular sobre MEC.

### 1.1. Las integrinas.

Son proteínas heterodiméricas formadas por dos subunidades, una  $\beta$  y una  $\alpha$  (Hynes, 1992).



**Fig. 2.** Esquema de la estructura de las integrinas.

Las integrinas están conservadas evolutivamente, así en mamíferos se han descrito ocho subunidades  $\beta$  diferentes y dieciocho subunidades  $\alpha$ , mientras que en *C. elegans* se han aislado dos subunidades  $\beta$  y una subunidad  $\alpha$ , finalmente en *Drosophila melanogaster* se encuentran dos subunidades  $\beta$  diferentes ( $\beta$ PS y  $\beta$ V) y cinco subunidades  $\alpha$  diferentes ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 5) (Bökel y Brown, 2002). Las integrinas son receptores transmembrana cuya principal función es la de mediar la adhesión entre el citoesqueleto celular y la MEC (Brown, 2000; De Arcangelis y Georges-Labouesse, 2000; Gumbiner, 1996). Durante la migración celular, las integrinas a través de sus dominios extracelulares, establecen una conexión

## Introducción

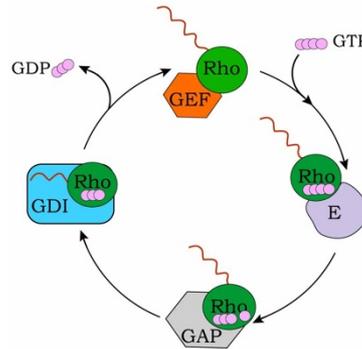
con la MEC en el frente de avance de la célula migratoria (Sheetz et al., 1998). Al mismo tiempo, los dominios intracelulares de las integrinas suministran un punto de anclaje para los filamentos de actina y, con la ayuda de sus efectores, estimulan el recambio rápido de actina para que la célula migre. Simultáneamente, en la cola de la célula, las integrinas se inactivan para permitir el avance de la migración. Diversos estudios de células en cultivo han demostrado que la migración celular depende de una activación/inactivación coordinada de la adhesión mediada por integrinas (Lauffenburger et al., 1996). Además, las integrinas pueden actuar como receptores de señalización para miembros de la familia Rho GTPasa, Erk y JNK (Hynes, 1992). De hecho, las integrinas regulan la migración celular en parte mediante la activación de las Rho GTPasas, moduladores del citoesqueleto de actina.

Existen multitud de trabajos que revelan un papel importante y conservado de las integrinas en la migración de diferentes tipos celulares durante la embriogénesis. Así en vertebrados, se ha vinculado su actividad con el correcto desarrollo del sistema nervioso, la correcta formación de los músculos, tanto esqueléticos como cardíacos, y finalmente la correcta vasculogénesis y angiogénesis (Anton et al., 1999; Bader et al., 1998; Gorski y Olsen, 1998; Hayashi et al., 1998). En el caso de *C. elegans*, también se requieren para la correcta migración de las células musculares y las neuronas (Baum y Garriga, 1997; Tucker y Han, 2008). En el caso de *Drosophila melanogaster*, las integrinas están implicadas en la regulación de poblaciones celulares tan diversas como las células del endodermo, la tráquea, los músculos embrionarios y de adulto y en la migración de los macrófagos embrionarios (Comber et al., 2013; Domínguez-Giménez et al., 2007; McKerracher et al., 1996; Roote y Zusman, 1995; Urbano et al., 2011; Xie y Auld, 2011).

### **1.2. Las Rho GTPasas.**

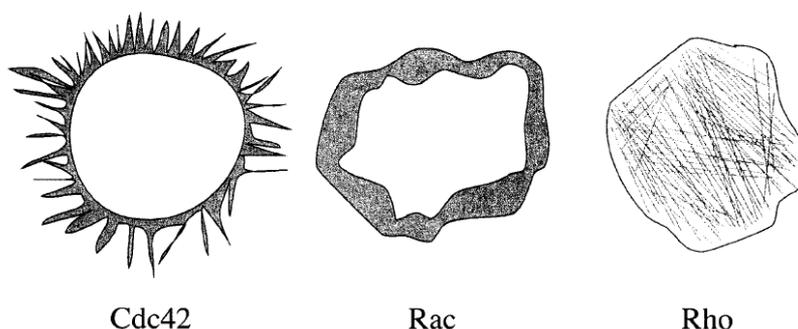
Las Rho GTPasas pertenecen a la familia Rho englobada dentro de la súper familia Ras. Las Rho GTPasas se activan por estímulos extracelulares, interacciones intercelulares y célula-matriz extracelular, así como por estrés mecánico. Una vez activadas, las proteínas Rho interactúan con diversos efectores y promueven la activación de señales intracelulares. Las Rho GTPasas existen en dos conformaciones estructurales, una forma activa, donde la proteína Rho está unida al guanosín trifosfato ([GTP](#)), llamada

Rho-GTP, y otra inactiva, donde la proteína Rho está unida al guanosín difosfato (GDP), llamada Rho-GDP. Las proteínas Rho se activan por diferentes factores de intercambio de nucleótidos de guanina, GEF (del inglés “Guanine-nucleotide Exchange Factor”) y se desactivan por proteínas activadoras de GTPasas, GAP (del inglés “GTPase Activating Protein”) (Kjoller y Hall, 1999).



**Fig. 3.** Esquema de la activación de las Rho GTPasas mediada por las moléculas GEFs, GAPs y GDIs (adaptada de Tesis C. Huertas).

Las Rho GTPasas más estudiadas por su relación con la migración celular son RhoA, Rac1 y Cdc42. Estas Rho GTPasas están principalmente involucradas en la organización del citoesqueleto, tanto de actina como de microtúbulos. Esta familia se haya muy conservada a lo largo de la evolución y mientras que en vertebrado se han descrito treinta proteínas diferentes, en *C. elegans* hay cuatro y en *Drosophila* se han descrito cinco. Experimentos realizados en fibroblastos en cultivo celular y mediante inhibición y expresión ectópica de estas Rho GTPasas han demostrado que Rac1, RhoA y Cdc42 desarrollan papeles distintos durante la migración celular (Sander et al., 1999). De esta forma, la expresión de Cdc42 activo produce la formación de filopodios (Kozma et al., 1995; Nobes y Hall, 1995), Rac activado sin embargo resulta en la formación de lamelipodios (Ridley y Hall, 1992a) y por último, Rho activado provoca la formación de fibras contráctiles compuestas de actina y miosina (Fig. 3) (Ridley y Hall, 1992b).



**Fig. 4.** Esquema que muestra el fenotipo celular debido a la expresión de formas activas de Cdc42, Rac y Rho. (Adaptada de Magie et al., 1999).

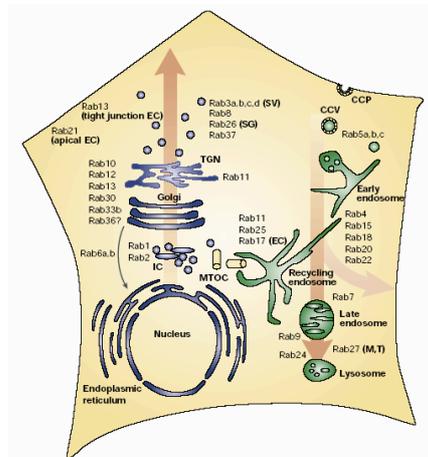
Por otra parte, Nobes y Hall mostraron en ensayos celulares de cicatrización o cierre de herida ("wound healing") que Cdc42 juega además un papel fundamental en la polaridad celular (Nobes y Hall, 1999).

El análisis de la dinámica de actividad de estas Rho GTPasas ha demostrado que cada una de estas proteínas se activa en distintas regiones y momentos durante el proceso de formación y desestabilización de las proyecciones. Así, mientras que Rac1 y Cdc42 están más activas en el frente de migración durante la formación de las protrusiones, la máxima activación de Rho se observa durante la estabilización de dichas protrusiones, mediante su adhesión al sustrato, y durante la retracción de la protrusión (Machacek et al., 2009; Nalbant, 2004; Pertz et al., 2006). La actividad de estas Rho GTPasas está regulada por señales que emanan de una gran variedad de receptores de membrana, como receptores con actividad tirosina quinasa o de otros tipos, como los acoplados a proteínas G (Hanna y El-Sibai, 2013).

Diversos estudios del papel de las RhoGTPasas en organismos vivos muestran que las RhoGTPasas regulan la migración de diversas poblaciones celulares en *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* y *Mus musculus* (Settleman, 1999). En particular en *Drosophila*, se ha visto que las RhoGTPasas se requieren para la migración de células del endodermo, la tráquea, células mesodermales y los macrófagos (Boube et al., 2001; Chihara et al., 2003; Martin-Bermudo et al., 1999).

### **1.3.Las Rab GTPasas.**

Otra familia de las Ras GTPasas que también está implicada en procesos de migración celular es la familia de las proteínas **Rabs**, vinculadas con la formación, transporte y fusión de vesículas celulares. Al igual que otras GTPasas, las proteínas de la familia Rab actúan como conmutadores moleculares que ciclan entre un estado activo (unido a GTP) y un estado inactivo (unido a GDP). Participan, entre otros, en procesos de secreción basolateral de proteínas, así como con el reciclaje de las proteínas de membrana (receptores) y en procesos de fagocitosis (endocitosis). En mamíferos podemos encontrar aproximadamente setenta tipos de proteínas Rab, mientras que en *C. elegans* hay treinta y un tipos diferentes, hasta el momento *Drosophila* solo se han reconocido veintisiete (Chan et al., 2011; Diekmann et al., 2011; Elias et al., 2012; Gallegos et al., 2012; Hutagalung y Novick, 2011; Klöpffer et al., 2012; Pereira-Leal y Seabra, 2001; Zhang et al., 2007). Cada Rab está asociada a un tipo de vesícula, ya sea en su formación, en su transporte o en la fusión con la membrana plasmática. Así, por ejemplo, se conoce que Rab8 y Rab10 están asociadas al tráfico de vesículas entre el aparato de Golgi, los endosomas y la membrana plasmática (Babbey et al., 2006; Chen y Wandinger-Ness, 2001; Chen et al., 1993; Hattula et al., 2006; Peränen et al., 1996; Schuck et al., 2007).



**Fig. 5.** Mapa de localización intracelular de las diferentes Rabs (adaptado de Zerial and McBride, 2001).

Bretscher fue el primero que en la década de los 70 propuso que la endocitosis de membranas en toda la célula, y la exocitosis en el frente celular, generarían un flujo de membranas que dirigirían el movimiento celular (Bretscher, 1976). Si bien esta hipótesis no se ha demostrado completamente, diferentes trabajos implican a la ruta exocítica en la migración celular. Así por ejemplo, distintas Rabs han sido descritas en el control de la

endocitosis de integrinas y de receptores de los factores de crecimiento durante la migración celular (Bridgewater et al., 2012; Porther y Barbieri, 2015). En particular, Rab8 ha sido implicado en la formación de protrusiones durante la migración celular mediante su función de internalizar dominios de membrana (Hattula et al., 2006).

### **1.4.Los receptores tirosina kinasas.**

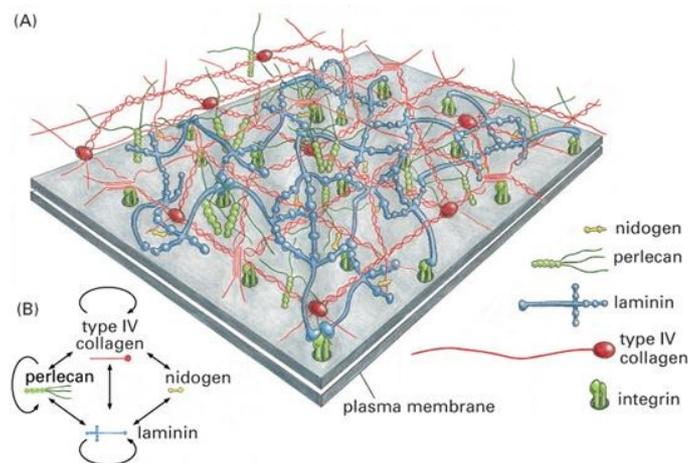
Crítico para que las células migratorias lleguen a su destino, es que la migración esté dirigida. Entre las moléculas implicadas en dirigir la migración caben destacar los receptores tirosina kinasas (RTKs), los cuales son activados a través de estímulos externos. Las proteínas tirosina kinasas pertenecen a una amplia familia con diversidad multigénica que se encuentra sólo en los Metazoos. En humanos, se han identificado 90 genes tirosina kinasas de los cuales 58 son receptores localizados en la superficie celular y se encuentran agrupados en 20 subfamilias (Robinson et al., 2000). Dentro de los receptores tirosina kinasas caben destacar por su papel en migración celular el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), receptor de crecimiento vascular del endotelio (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) entre otros. Estos receptores se caracterizan por poseer dos dominios: uno extracelular que contiene regiones de unión a sus ligandos y otro intracelular que contiene una región implicada en la regulación de la actividad catalítica kinasa. Los receptores se encuentran en forma de monómeros que se dimerizan cuando son activados por sus ligandos, los cuales estimulan la actividad kinasa mediante la fosforilación del receptor. Una vez fosforilados, activan la migración celular mediante interacción con las RhoGTPasas. Las interacciones que tiene lugar entre los receptores tirosina kinasas y las Rho GTPasas pueden ser mediadas por proteínas adaptadoras, entre las que caben destacar las proteínas del tipo GEF, las cuales interaccionan con los RTKs a través de los dominios SH2 o SH3.

Se ha mostrado que los receptores tirosina kinasas pueden regular y promover la migración celular tanto en cultivo como *in vivo*. En cultivos primarios de oligodendrocitos y de células madre, se ha visto que PDGFR es capaz de dirigir la migración celular mediante quimiotaxis (Forsberg-Nilsson et al., 1998; Simpson y Armstrong, 1999). También se ha observado en experimentos *in vivo*, que receptores como PDGFR y VEGFR dirigen la migración de células mesenquimales hacia los lugares diana para la

formación de órganos. Esto se ha observado por ejemplo, en la formación de las gónadas de ratón y *Drosophila*, en la migración de hemocitos en el embrión de *Drosophila* y en la formación de la cresta neural en *Xenopus* (revisado en Hoch and Soriano, 2003) entre otros.

### 1.5.La matriz extracelular.

La matriz extracelular es un conjunto de proteínas secretadas que forman una malla, la cual rodea diferentes órganos y tejidos, proporcionando un soporte estructural y bioquímico (Hynes, 2009). La matriz extracelular está presente, desde el desarrollo embrionario hasta la edad adulta de los organismos. Sus principales componentes son: Colágeno IV, Laminina, Nidogen y Perlecan.



**Fig. 6.** Esquema organización distintas proteínas de la MEC. (A) Recreación de la forma estructural que presenta la MEC. (B) Interacciones que se producen entre los diferentes componentes de la MEC.

Los distintos componentes de la MEC se encuentran en diferentes organismos con un alto grado de conservación, indicio de su importancia biológica (Bradshaw, 2009; Martinek et al., 2008; Tremble et al., 1993). La malla formada por estas diferentes proteínas está implicada en un sin fin de mecanismos celulares, como son la diferenciación, la adhesión celular, la supervivencia celular, la forma celular y la migración celular (Daley y Yamada, 2013; De Arcangelis y Georges-Labouesse, 2000; Domínguez-Giménez et al., 2007; Meyer et al., 2014; Perris y Perissinotto, 2000; Suh y Han, 2010). La síntesis, mantenimiento y producción de estos componentes en el caso de vertebrados es llevada a cabo principalmente por los fibroblastos (Eckes et al., 1999; Fan

## Introducción

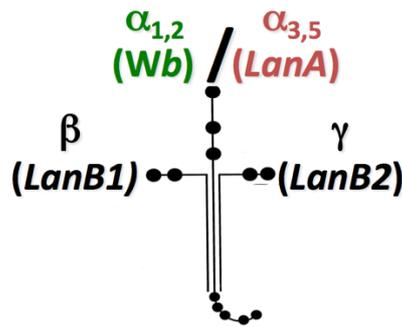
D et al., 2012), aunque se ha visto que también lo hacen los condrocitos (Guilak et al., 2006) y los osteoblastos (Robling et al., 2006). En el caso de *Drosophila*, son los macrófagos los principales encargados de producir y repartir dichas proteínas durante su migración, aunque también la producen algunas células del sistema nervioso y el cuerpo graso (Meyer et al., 2014; Nelson et al., 1994). A continuación se analizarán más en detalle los principales componentes de la MEC.

### 1.5.1. Colágeno.

Los Colágenos pertenecen a una superfamilia de polipéptidos formados por un trímero de cadenas  $\alpha$ , conteniendo al menos un dominio compuesto por repeticiones Gly-X-Y en cada una de las cadenas. Algunos Colágenos están formados por tres cadenas  $\alpha$  idénticas, en otros casos son solo dos  $\alpha$  idénticas y en otros son las tres cadenas  $\alpha$  diferentes. La presencia de Gly-X-Y es indispensable para darle estabilidad al trímero (Myllyharju y Kivirikko, 2004). Los Colágenos son las proteínas más abundantes en el cuerpo humano, representando un 30% del total. En vertebrados encontramos que se han descrito veintisiete tipos de Colágeno (Tipo I-XXVIII) (Myllyharju y Kivirikko, 2004; Veit et al., 2006), mientras que en invertebrados como *C. elegans* o *Drosophila*, solo encontramos Colágenos tipo IV, XV y XVIII. Cada tipo de Colágeno se encuentra en una determinada estructura celular donde realiza una función única. Por ejemplo, los **Colágenos tipo I** están presentes en la dermis, mientras los **Colágenos tipo XV y XVIII** están vinculados a la membrana basal (tipo de matriz extracelular especialidad) (Hynes y Zhao, 2000; Myllyharju y Kivirikko, 2004). Entre los Colágenos implicados en migración celular caben destacar los **Colágenos tipo IV**. Así, se ha visto que en *Mus musculus* estos Colágenos se requieren para la migración de las células neurales (Pöschl et al., 2004). De la misma manera, en *C. elegans* se ha visto que su ausencia durante la embriogénesis afecta a la migración de los primordios de la musculatura (Gupta et al., 1997). Finalmente, en *Drosophila* se ha visto que los Colágenos tipo IV se requieren durante la embriogénesis para la correcta migración de las células que van a formar el corazón y la migración de las células que forman los túbulos de Malphigian (Bunt et al., 2010; Hollfelder et al., 2014).

### 1.5.2. Laminina.

Las lamininas son una familia de glicoproteínas triméricas formadas por tres subunidades distintas,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La estructura del trímero de Laminina es en forma de cruz, presentando tres brazos cortos, cada uno formado por una subunidad diferente ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), y un brazo largo, formado por el ensamblaje de las colas de las mismas (Fig. 7) (Timpl et al., 1979). Son el principal componente de la matriz extracelular (Fessler y Fessler, 1989; Fessler et al., 1994).



**Fig. 7.** Esquema de la estructura de las lamininas.

La familia de las lamininas está muy conservada a lo largo de la evolución. De esta forma podemos encontrar que, en vertebrados existen cinco subunidades  $\alpha$ , cuatro subunidades  $\beta$  y tres subunidades  $\gamma$ , las cuales forman quince trímeros diferentes de Laminina. Mientras que en *Drosophila* y *C. elegans* encontramos dos subunidades  $\alpha$ , una subunidad  $\beta$  y una subunidad  $\gamma$ , los cuales forman dos trímeros diferentes de Laminina, que se diferencian solo por la subunidad  $\alpha$  (Aumailley et al., 2005; Huang, 2003; Kao et al., 2006). Se ha descrito que, tanto en vertebrados como en *Drosophila*, las lamininas son la base sobre la que se anclan el resto de componentes de la matriz extracelular, es decir, sin su presencia, el resto de componentes no pueden depositarse ni ensamblarse entre sí de forma correcta (Li et al., 2003; Urbano et al., 2009; Yurchenco et al., 2004). Otro papel fundamental de las lamininas es el de mediar la migración celular, particularmente durante la embriogénesis. Así se ha visto que, por ejemplo, en *Mus musculus*, la subunidad  $\alpha 5$  es necesaria para la correcta migración de las células de la cresta neural (Coles et al., 2006). Otro ejemplo es el conocido en *C. elegans*, donde la subunidad *lam-1* es imprescindible para la correcta migración de las células musculares (Viveiros

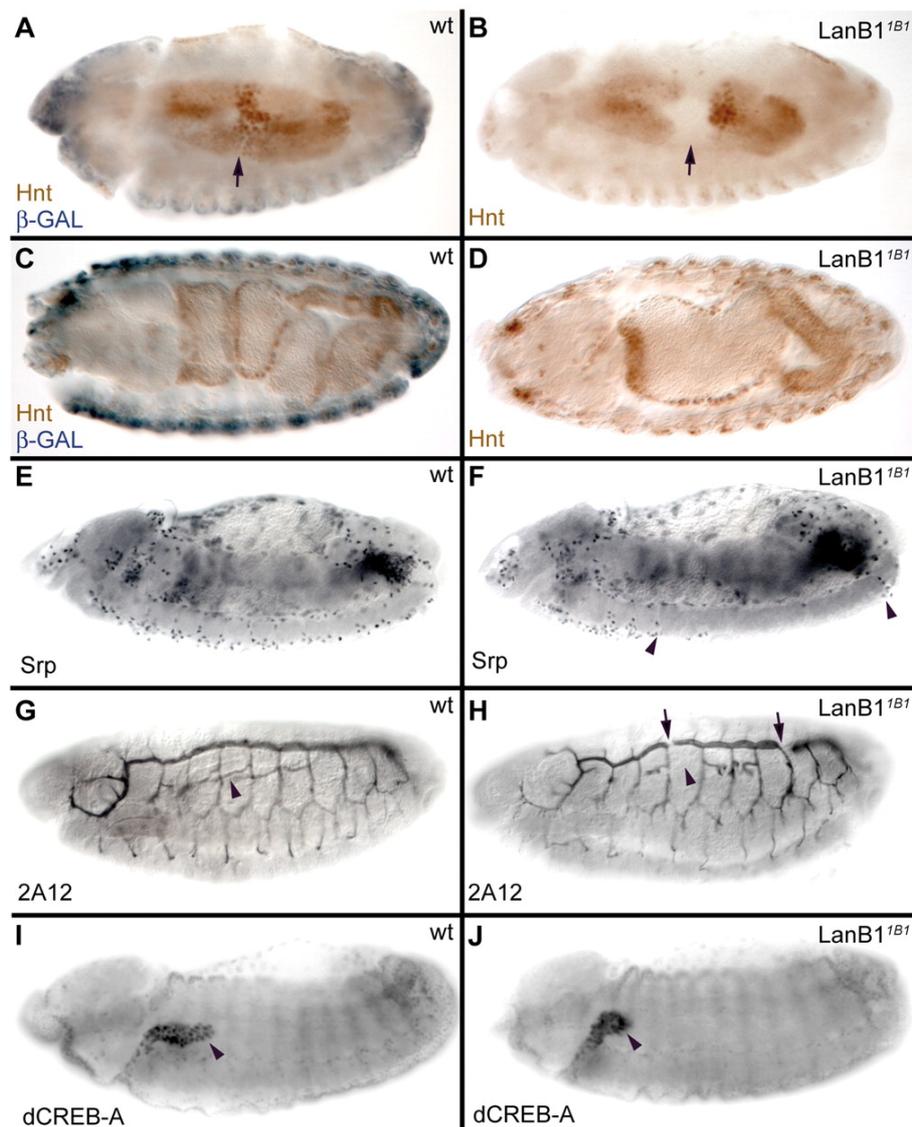
## Introducción

et al., 2011). Como hemos mencionado anteriormente, en *Drosophila* existen dos trímeros que comparten las mismas subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , codificadas por los genes *LanB1* y *LanB2*, respectivamente, y dos subunidades  $\alpha$ , codificada por los genes *wing blister* y *LanA* (Tabla 1, Fessler et al., 1987). Cada trímero reconoce un tipo de proteína de MEC diferente e interacciona con una integrina particular (Tabla 1) (Durbeej, 2010). Existen mutantes para cada una de estas subunidades.

<b>Subunidad</b>	<b>Gen que la codifica</b>	<b>Ortólogo en Vertebrados</b>	<b>Trímero en Drosophila</b>	<b>Proteína que reconoce</b>
$\alpha_{3,5}$	LanA	$\alpha_3$ y $\alpha_5$	Laminina A	Integrina PS1
$\alpha_{1,2}$	Wing blister	$\alpha_1$ y $\alpha_2$	Laminina Wb	Integrina PS2
$\beta$	LanB1	$\beta_2$	Laminina A y Wb	Colágeno
$\gamma$	LanB2	$\gamma_1$	Laminina Ay Wb	Nidogen

**Tabla 1.** Resumen de las cadenas de Laminina presentes en *Drosophila*.

Ya que las lamininas se secretan como trímeros, las mutaciones en los genes *LanB1* y *LanB2* ha permitido el análisis del efecto de la pérdida total de Laminina funcional en el desarrollo del embrión de *Drosophila*. Así, se ha descrito que las lamininas además de ser necesarias para la diferenciación del mesodermo y la correcta formación del musculo, tienen un papel fundamental en varios procesos de migración celular que suceden durante la embriogénesis. Algunos ejemplos de estos procesos de migración celular son las células caudales del mesodermo visceral, las células del intestino medio (Fig. 5 A-D), las células de la tráquea (Fig. 5 G-H), las células de las glándulas salivales (Fig. 5 I-J) y los macrófagos (Fig. 5 E-F). (Urbano et al., 2009; Urbano et al., 2011; Wolfstetter y Holz, 2012)



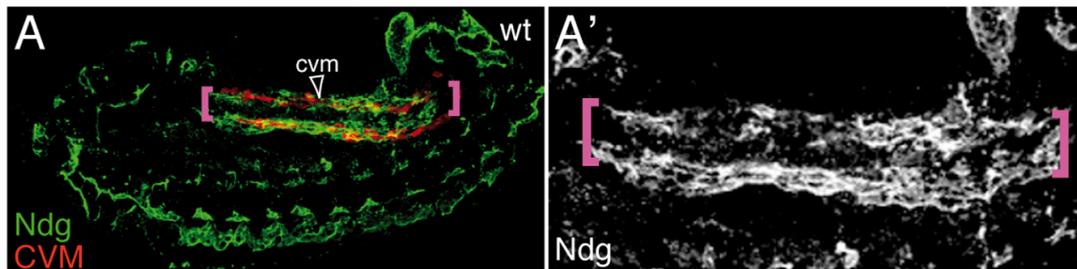
**Fig. 8.** Embriones control (A, C, E, G e I) y mutantes para LanB1 (B, D, F, H y J) teñidos con diversos anticuerpos para visualizar diferentes poblaciones celulares (A-D) anti-Hindsight (Hnt, marrón) para mostrar las células del intestino medio. (E-F) anti-Srp (negro) para visualizar los macrófagos. (G-H) anti-2A12 (negro) para visualizar las células de la tráquea. (I-J) anti cCREB-A (negro) para visualizar las glándulas salivares. (Urbano et al., 2009).

### 1.5.3. Nidogen /Entactin.

Nidogen es una pequeña glicoproteína formado por diferentes dominios globulares a través de los cuales interacciona con el resto de componentes de la MEC (Paulsson et al., 1987). Esta proteína está conservada evolutivamente y se han descrito dos isoformas en vertebrados, Nidogen 1 y Nidogen 2 (Fox et al., 1991; Kohfeldt et al., 1998), un gen en *C. elegans* con 3 isoformas diferentes (Kang y Kramer, 2000), y finalmente en *Drosophila*



2012). Así mismo, se ha observado que los mutantes de Nidogen en *C. elegans* presentan fallos en la migración de los axones del sistema nervioso periférico (Kim y Wadsworth, 2000). En el caso de *Drosophila* no se han aislado hasta el momento mutantes para este gen, por lo que aún no se sabe si se requiere para regular la migración celular. Lo que sí se ha observado es que se expresa en algunos tipos celulares durante su migración, como es el caso de las células del mesodermo caudal visceral que lo expresan durante su migración sobre el mesodermo visceral (Fig. 10) (Urbano et al., 2011).



**Fig. 10.** Embrión silvestre de estadio 13 teñido con un anticuerpo frente a Nidogen (verde) y Cough potatoe (rojo) que se expresa en las células del mesodermo caudal visceral (Urbano et al., 2011).

#### 1.5.4. Perlecan.

Perlecan es un proteoglicano que posee entre dos y quince cadenas de heparansulfato. Su estructura presenta 5 dominios globulares, a través de los cuales interacciona con otros componentes de la MEC, con factores de crecimiento y con receptores de membrana (Friedrich et al., 2000; Knox y Whitelock, 2006; Paulsson et al., 1987; Voigt et al., 2002). Es una proteína conservada evolutivamente, y hasta el momento sólo se ha descrito una en vertebrados, *C. elegans* y *Drosophila* (Datta y Kankel, 1992). Esta proteína ha sido foco de estudio durante la embriogénesis de *Mus musculus*, mostrando que juega un papel crucial en vasculogénesis, así como en angiogénesis (Arikawa-Hirasawa et al., 1999; Aviezer et al., 1994; Costell et al., 1999; Costell et al., 2002). En el caso de *C. elegans*, Perlecan juega un papel importante en la embriogénesis, ya que mutantes para esta proteína no superan el estadio dos debido a la incorrecta especificación del tejido muscular (Hresko et al., 1994; Rogalski et al., 1995). En *Drosophila* se ha visto que Perlecan regula la proliferación de neuroblastos (Voigt et al., 2002). Con respecto al papel de Perlecan en migración celular, se sabe muy poco. Aunque se ha descrito que su

inactivación en adultos en *C. elegans* afecta la migración de las células gonadales (Merz et al., 2003).

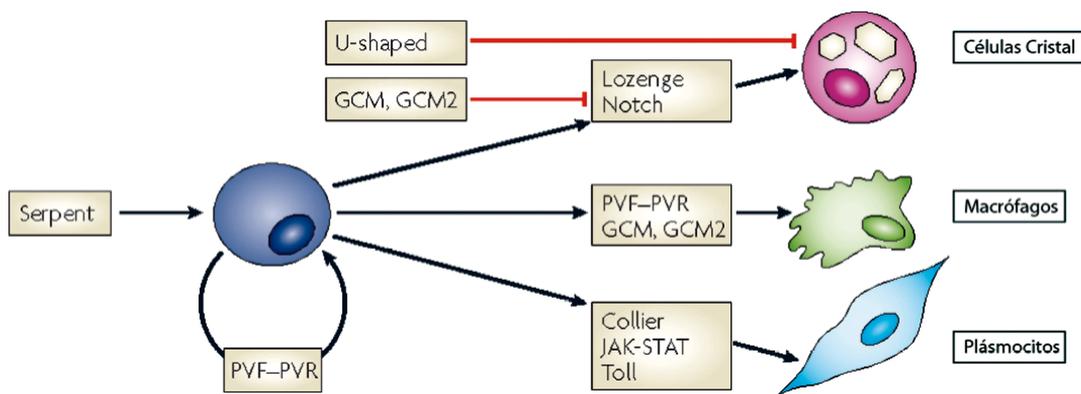
## **2. Los macrófagos de *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para el estudio del papel de la MEC en la migración celular.**

Los hemocitos embrionarios de *Drosophila melanogaster* constituyen un modelo ideal para el análisis del papel de la MEC en los procesos de migración que tienen lugar durante la embriogénesis por diversas razones. En primer lugar, son, junto al tejido graso, los principales productores de la MEC durante la embriogénesis de *Drosophila* (Fessler et al., 1994). En segundo lugar, siguen un patrón de migración muy estereotipado a lo largo del embrión. En tercer lugar, se pueden filmar in vivo, lo que permite analizar el comportamiento de los hemocitos en su entorno natural y la dinámica de migración celular. Y por último, se pueden manipular genéticamente usando las herramientas disponibles en *Drosophila*, lo que permite analizar su migración en situaciones controles y mutantes para distintos componentes de la MEC.

### **2.1. Tipos de hemocitos.**

En *Drosophila melanogaster*, los hemocitos son la primera línea de defensa frente a infecciones y daños. Además, durante la embriogénesis modelan órganos y tejidos, mediante la fagocitosis de células apoptóticas. El desarrollo de los hemocitos de *Drosophila* ocurre en dos fases. Una primera ola tiene lugar en el embrión, donde se diferencian desde el mesodermo proencefálico y dan lugar a los llamados hemocitos embrionarios (HE). Una segunda ola ocurre más tarde en la embriogénesis y derivan de los precursores de las glándulas linfáticas (HGL), que son oligopotentes y pueden dar lugar a cardioblastos o hemocitos. Tanto los HE como los HGL se especifican por el factor de transcripción de la familia GATA *serpent* (Rehorn et al., 1996). La posterior activación de distintos factores de transcripción, como *glia-cell missing* o *lozenge*, así como vías de señalización, entre las que cabe destacar Notch, JAK/STAT, PVF, especificarán los distintos tipos de hemocitos:

- **Células cristal**, cuya función descrita hasta ahora es la de producir radicales libres citotóxicos en respuesta a infecciones bacterianas (Roshana y Gateff, 1982).
- **Lamelocitos**, raramente presentes en organismos sanos y solo observados durante infecciones bacterianas (Rizki y Rizki, 1992).
- **Macrófagos**, también conocidos como plasmocitos, que migran a lo largo de todo el embrión y necesitan distribuirse regularmente para ejercer sus funciones (Tepass et al., 1994). Su principal función es la de fagocitar todos los restos celulares, apoptóticos, así como patógenos. También secretan péptidos antimicrobianos y están implicados en la respuesta inmune del cuerpo gordo a infecciones (Agaisse et al., 2003; Hoffmann y Reichhart, 2002; Lavine y Strand, 2002). Además son los principales productores de matriz extracelular, junto con el tejido gordo (Fessler et al., 1994).



**Fig. 11.** Cascada de regulación transcripcional que regula la especificación de los distintos tipos de hemocitos en *Drosophila melanogaster* (Wood y Jacinto, 2007).

Los hemocitos embrionarios, ejercen su función en el estadio embrionario, larvario y adulto. Mientras que los hemocitos derivados de las glándulas linfáticas, inician su función en el estadio larvario y en el adulto (Holz et al., 2003; Tepass et al., 1994).

## 2.2.Migración de macrófagos.

La migración de macrófagos a lo largo de la embriogénesis tiene lugar desde el **estadio 10 al 15** (Cho et al., 2002; Tepass y Hartenstein, 1994; Wood et al., 2006).

## Introducción

Durante los **estadios 8 y 9**, los macrófagos inician su diferenciación en la región de la cabeza llamada mesodermo proencefálico (Fig. 1 A).

En el **estadio 10**, los macrófagos inician su dispersión desde la cabeza al resto del embrión (Fig. 1 B).

En el **estadio 11**, inician su migración desde su localización en la cabeza tomando dos rutas diferentes:

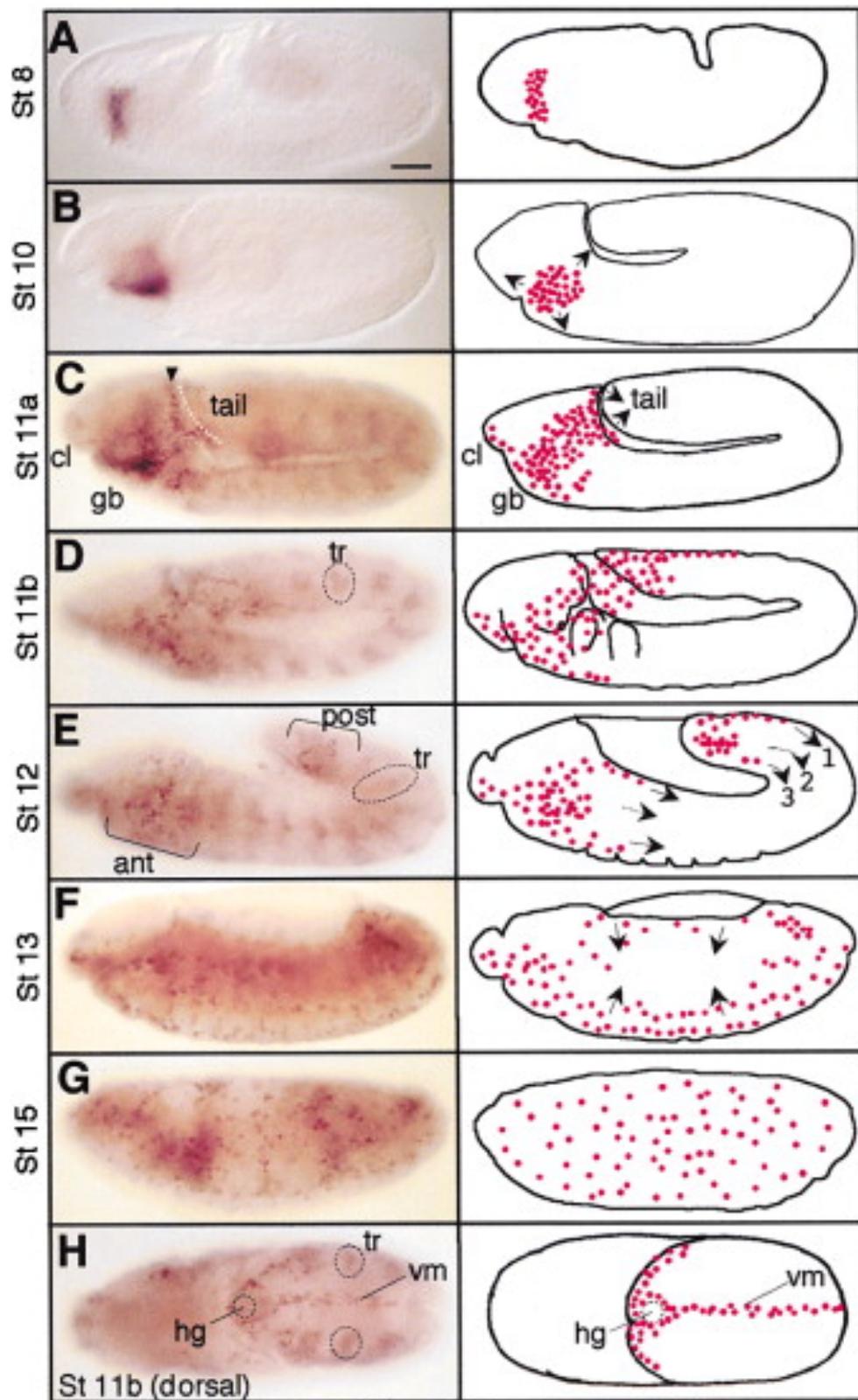
- a) Migración dorsal: migran de la cabeza hacia la cola del embrión a través del espacio intersticial. Una vez alcanzada la zona más dorsal de la cola, entran rodeando el intestino posterior. Una vez rodeado el intestino posterior, inician una migración sobre los lados dorsal y ventral de la línea media de la cuerda nerviosa, en sentido posterior-anterior (Fig1 C, H).
- b) Migración ventral: salen de la cabeza y toman dos direcciones diferentes. Unos se dirigen a la parte anterior de la línea media de la cuerda nerviosa y comienzan a migrar sobre la parte dorsal y ventral de la misma en sentido anterior-posterior. Otros inician una migración sobre el límite entre el ectodermo y la amnioserosa (Fig1 D).

Durante el **estadio 12**, la cola del embrión se retrae arrastrando a los macrófagos que se encontraban en ella, a la vez que los macrófagos ventrales y dorsales siguen migrando a lo largo de la línea media de la cuerda nerviosa. Ambos grupos migran en sentidos opuestos pero en la misma dirección. Migran tanto sobre la parte dorsal de la cuerda nerviosa, como por su parte ventral, pasando de una parte a otra a través de unos espacios naturales que existen entre los neurómeros (unidad mínima de organización de la cuerda nerviosa).

De esta forma para finales del **estadio 12** comienzos del **estadio 13**, los macrófagos cubren la línea media de la cuerda nerviosa. Los macrófagos que se dirigieron hacia el límite entre el ectodermo y la amnioserosa, continúan su migración sobre este límite llamado “vessel” (Fig1 E).

Durante los **estadios 13 y 14**, aquellos macrófagos que están sobre la línea media de la cuerda nerviosa inician una migración lateral, hacia ambos lados de la misma, para formar tres líneas paralelas sobre la cuerda nerviosa. Durante estos estadios también se da una migración sobre los intestinos y la epidermis (Fig1 F).

Finalmente en el **estadio 15**, los macrófagos se mantienen distribuidos equidistantes a lo largo de todo el embrión a través de un mecanismo de contacto y repulsión entre ellos (Fig1 G) (Cho et al., 2002; Tepass y Hartenstein, 1994; Wood et al., 2006).



**Fig. 12.** Embriones de diferentes estadios donde se muestra la migración de los macrófagos a lo largo de la embriogénesis de *Drosophila*. Junto a cada foto se puede ver un esquema de la misma (macrófagos en rojo) (Modificado de Cho et al., 2002)

Finalmente, cabe destacar que los macrófagos solo interrumpen esta migración si se produce alguna infección o herida, ya que parte de su función es la de defensa inmunitaria. En este caso, los macrófagos que se encuentran cerca de la herida dejan su ruta de migración y acuden hacia la herida para promover la renovación tisular a la par que fagocitan las células muertas (Babcock et al., 2008; Pastor-Pareja et al., 2008).

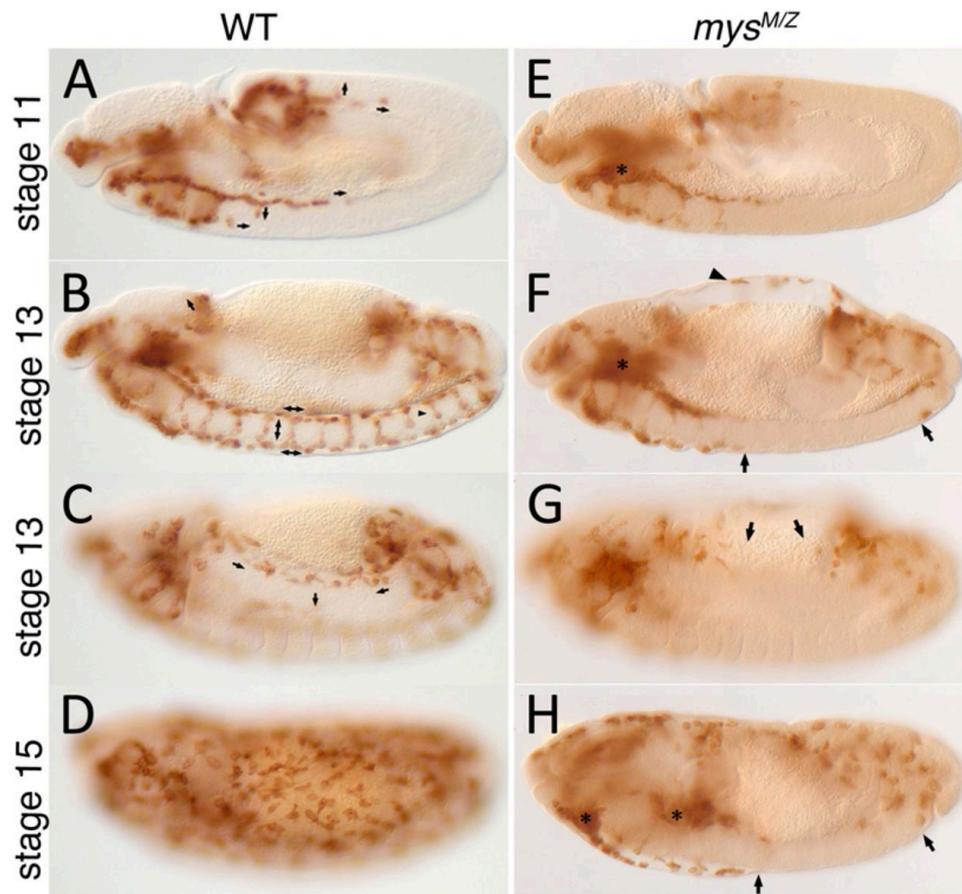
### **2.3. Moléculas implicadas en la regulación de la migración de macrófagos.**

La migración de macrófagos durante la embriogénesis de *Drosophila* ha sido foco de varios estudios en estos últimos años, quizás por ser uno de los mejores sistemas modelo para el estudio de la migración celular y por permitir llevar a cabo estudios in vivo. Ello ha permitido identificar parte de los mecanismos moleculares que regulan esta migración. Así entre las moléculas implicadas caben destacar:

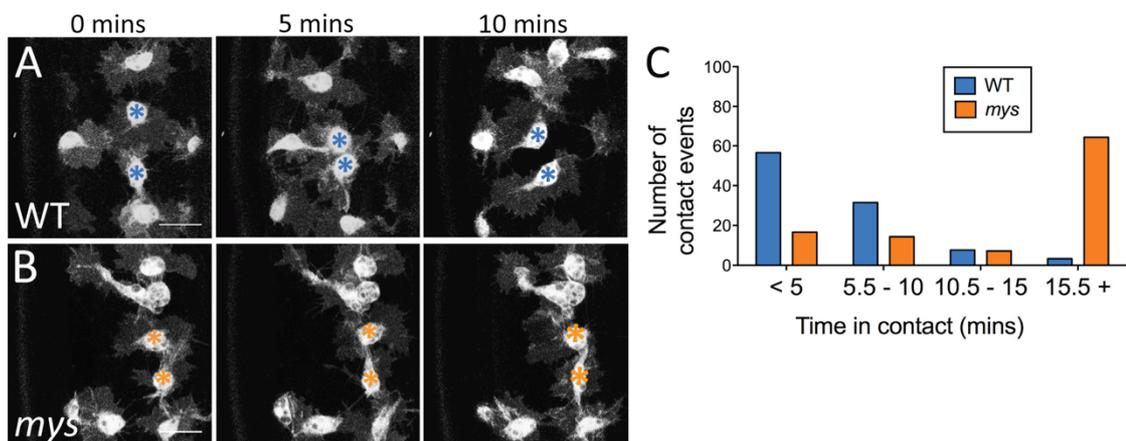
#### **2.3.1. Integrinas.**

Recientemente, en colaboración con el grupo del Profesor. W. Wood (Bath University, UK), hemos demostrado que las integrinas juegan un papel primordial durante la migración de los hemocitos. De hecho, embriones mutantes para *myospheroid (mys)*, gen que codifica la subunidad  $\beta$ PS de las integrinas, muestran defectos en todas las etapas de la migración de los macrófagos (Fig. 13).

Mediante experimentos de expresión de formas dominantes negativas de integrinas y experimentos de rescate, nuestros resultados han demostrado que en la etapa de migración a lo largo de la cuerda nerviosa, las integrinas juegan un doble papel. Por un lado, se requieren en los propios macrófagos para su correcta migración. Por otro lado, las integrinas son necesarias para una correcta formación del espacio intersticial entre la cuerda nerviosa y el ectodermo, el cual es usado por los macrófagos para migrar (Comber et al., 2013). Así mismo, mediante análisis in vivo de la migración de macrófagos en embriones silvestres y embriones mutantes *mys* se observó que una de las funciones principales de las integrinas era la coordinación entre la dinámica de los microtúbulos y la actina presente en los lamelipodios, lo cual era necesario para una correcta dispersión de los macrófagos a lo largo del embrión y procesos de contacto-repulsión (Fig. 14).

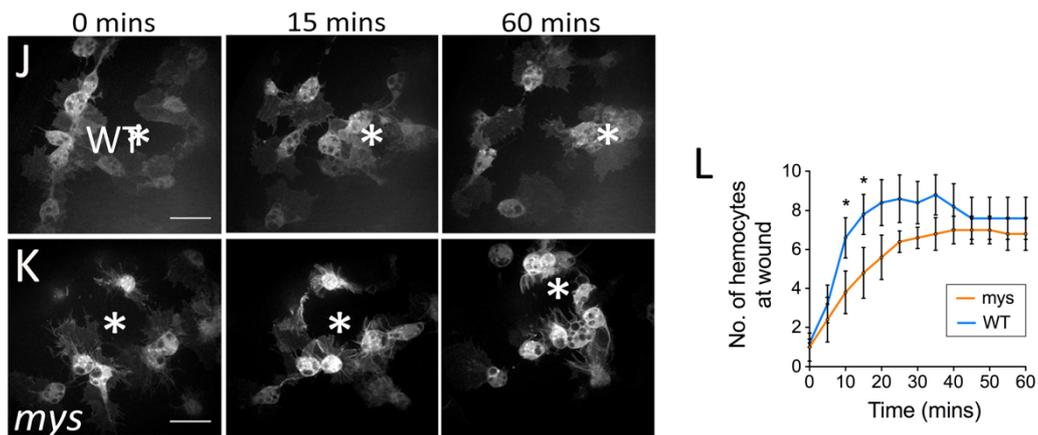


**Fig. 13.** Visión lateral de embriones silvestres (wt, A-D) y *mys* (E-H) en los que se aprecian los macrófagos embrionarios (marrón) durante diferentes etapas de su migración a lo largo del embrión (Comber et al., 2013).



**Fig. 14.** Imágenes de análisis in vivo de eventos de contacto-repulsión de macrófagos en embriones silvestres (A) y *mys* (B). (C) Cuantificación del tiempo en contacto de los macrófagos. Se observa que los macrófagos de embriones *mys* están más tiempo en contacto que los de embriones silvestres (Comber et al., 2013)

Así mismo, demostramos que las integrinas no sólo se requieren para la migración regulada a lo largo del desarrollo embrionario sino que también regulan el movimiento de macrófagos a una herida producida en el embrión (Comber et al., 2013) (Comber et al., 2013).



**Fig. 15.** Imágenes de análisis in vivo de la migración de macrófagos hacia una herida producida en embriones silvestres (J) y *mys* (K). (L) Cuantificación del número de macrófagos que acuden a la herida en función del tiempo. Se observa que los macrófagos de embriones *mys* tardan más en acudir a la herida que los de embriones silvestres (Comber et al., 2013).

Por último, se ha demostrado que las integrinas regulan la forma celular de los macrófagos durante su migración mediante interacción con la GTPasa Rap 1 y el GEF Dizzy (Huelsmann et al., 2006).

### 2.3.2. Rho GTPasas.

Respecto a la función de las RhoGTPasas en la migración de los macrófagos embrionarios de *Drosophila*, se ha demostrado un requerimiento para Rac, siendo su papel principal el de regular la formación de lamelipodios (Paladi y Tepass, 2004). A Rho se le atribuye un importante papel durante la trans migración, como se denomina a la migración de los macrófagos desde la cabeza hasta la entrada en la cola (Siekhaus et al., 2010b). Finalmente, aunque a Cdc42 no se le conoce ningún papel durante la migración estereotipada de los macrófagos embrionarios, se ha demostrado que es crucial para mantener la polarización celular de los mismos cuando estos acuden a una herida (Wood y Jacinto, 2007).

### **2.3.3. Rab GTPasas.**

En los últimos años, se ha acumulado evidencia experimental que liga la acción de las Rab GTPasas con la migración celular. Esto se ha estudiado principalmente en modelos de cáncer donde se ha visto que un descontrol del tráfico a través de endosomas está asociado a ciertos tipos de cáncer (Goldenring, 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que Rab5 y Rab21 regulan movimiento celular mediante el reciclaje y el tráfico de las subunidades alfas de las integrinas. Por otra parte, se ha demostrado que Rab8 es capaz de modular la capacidad invasiva de ciertos tumores regulando el tráfico exocítico de metaloproteinasas, enzimas que rompen proteínas de la MEC. Además, la expresión de Rab21 se ha ligado a un aumento de la capacidad metastática de algunos tipos de cáncer epiteliales (Tang y Ng, 2009). Así mismo, se ha visto que algunas Rab GTPasas regulan algunos procesos de migración dirigida que ocurren durante el desarrollo mediante su papel en modular el reciclaje y tráfico de receptores de moléculas guías. Así se ha visto que la expresión de formas dominantes negativas de Rab5 y Rab11 en las células del borde del ovario de *Drosophila* produce una pérdida de polarización de la actividad de los receptores PVR y EGFR en el frente de migración, lo que inhibe su movimiento dirigido hacia el oocito (Assaker et al., 2010). Sin embargo, aún no se ha descrito ningún papel para las Rab GTPasas en el proceso de migración de los macrófagos en *Drosophila*.

### **2.3.4. Receptores tirosina kinasas.**

Los receptores tirosina kinasas se han implicado en una gran variedad de procesos migratorios que tiene lugar durante el desarrollo. Por ejemplo, se sabe que juegan un papel fundamental en la migración de las células del mesodermo y el desarrollo del sistema vascular en vertebrados (Ruhrberg, 2003; Yang et al., 2008). Así mismo se ha demostrado que esta familia de kinasas regula la correcta diferenciación de las células del sistema inmune, así como su migración durante el desarrollo embrionario de vertebrados (Clauss, 2000; Keck et al., 1989; Leung et al., 1989).

En *Drosophila melanogaster*, se ha visto que el receptor Pvr tirosina kinasa regula la migración de distintas poblaciones celulares, como las células del borde del ovario (Duchek et al., 2001). Así mismo, se ha demostrado que Pvr se requiere para la correcta diferenciación y migración de macrófagos embrionarios, demostrando que la función de

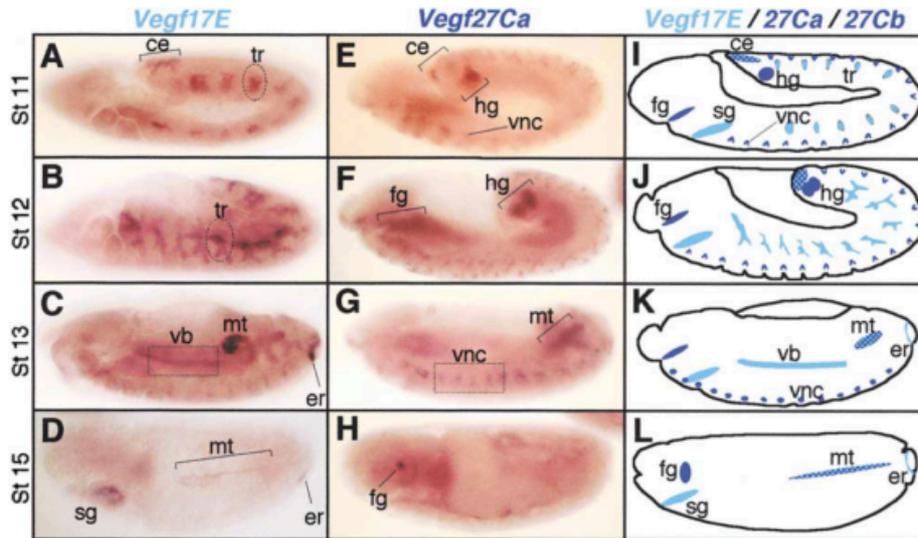
esta familia de proteínas en el sistema inmune está evolutivamente conservada. Mutaciones en el receptor Pvr provocan que los macrófagos no se diferencien bien, algunos mueran y también que no migren correctamente, indicando que su expresión es necesaria durante toda la vida del macrófago (Brückner et al., 2004; Cho et al., 2002; Parsons y Foley, 2013; Wood et al., 2006). Como se ha mencionado anteriormente, la principal función de los receptores Pvr es la de reconocer moléculas guías de la familia Pvf (Duchek et al., 2001). En *Drosophila* se han identificado tres miembros de la familia Pvf, siendo conocidos como Pvf1 (Vegf17E), Pvf2 (VegfCb) y Pvf3 (VegfCa) (Heino et al., 2001). Los embriones mutantes para estas proteínas guía también presentan fallos en la migración de los macrófagos (Parsons y Foley, 2013; Wood et al., 2006). Además, se ha demostrado que estas moléculas se expresan de forma concreta en un tejido y en un momento determinado de la embriogénesis, marcando a los macrófagos la ruta a seguir durante su migración a lo largo del embrión. De esta forma, del estadio 10 al estadio 12, Pvf1 se expresa en la parte posterior de la cola del embrión y del estadio 11 al estadio 15 en la tráquea, ectodermo caudal, tubos de Malpighian y células salivares (Tabla 2, Fig. 16).

Estadios	Pvf1		Pvf2		Pvf3	
Estadio 10		Parte posterior de la cola	Intestino posterior y anterior, tubos de Malpighian		Intestino posterior	Cuerda nerviosa
Estadio 11	Tráquea, ectodermo caudal, tubos de Malpighian,					
Estadio 12				Cuerda nerviosa		
Estadio 13						
Estadio 14						
Estadio 15	células salivares					

**Tabla 2.** Expresión de los distintos Pvf a lo largo de la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*.

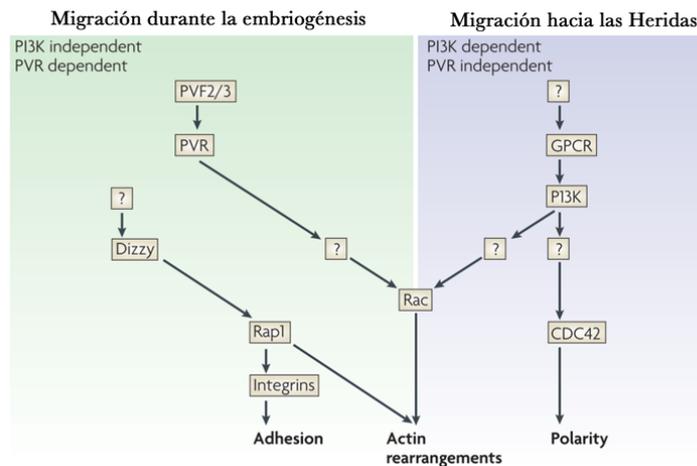
La molécula guía Pvf2 se observa desde estadios 10 a estadios 13 tanto en el intestino anterior como en el posterior, así como en los tubos de Malpighian. Además, Pvf2 se expresa en la cuerda nerviosa, iniciando su expresión en el estadio 12, llegando a ser máxima en el estadio 14, y reduciéndose en una oleada en sentido antero-posterior a lo largo de la cuerda nerviosa, quedando su expresión reducida a unas pocas células de la parte posterior de la cuerda nerviosa en el estadio 15 (Tabla 2, Fig. 16). Finalmente Pvf3 presenta un patrón de expresión similar a Pvf2, teniendo una expresión fuerte desde

estadios 10 a estadios 12 en el intestino anterior y desde estadios 10 a estadios 13 en la cuerda nerviosa (Tabla 2, Fig. 16, (Cho et al., 2002; Wood et al., 2006).



**Fig. 16.** Expresión de los distintos Pvf durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*. (Cho et al., 2002)

Finalmente, se conoce que la vía Pvf/Pvr regula la migración de macrófagos a través de las Rho GTPasas Rac y Cdc42 (Fig. 17), las cuales regulan la reorganización del citoesqueleto de actina, controlando así el movimiento celular.



**Fig. 17.** Esquema del papel de las Rho GTPasas y RTKs en la migración de macrófagos (adaptada de Wood and Jacinto, 2007).

**2.3.5. Proteínas de la MEC.**

Como se ha mencionado anteriormente, los macrófagos son, junto al tejido graso, los principales productores de proteínas de la MEC (Knibiehler y Mirre, 1987; Mirre et al., 1988; Yasothornsrikul et al., 1997). Si bien, el papel de los distintos componentes de la MEC en el desarrollo y migración de los macrófagos ha sido muy poco estudiado.

#### **2.3.5.1. Colágeno IV.**

A pesar de que el papel de los Colágenos en migración celular ha sido ampliamente estudiado en modelos celulares *in vitro* y en tejidos cultivados *ex vivo*, poco se sabe de su función en el contexto tridimensional de organismos en desarrollo. De estos estudios se ha concluido que los Colágenos se necesitan para una migración dirigida eficiente (revisado en Charras and Sahai, 2014). En *Drosophila* sólo encontramos Colágenos tipo IV, XV y XVIII. Los Colágenos XV y XVIII están vinculados a la membrana basal y sólo existe un ortólogo para los dos tipos, *multiplexin* (Hynes y Zhao, 2000; Myllyharju y Kivirikko, 2004). Mutantes en *multiplexin* son viables y no presentan defectos en migración celular (Momota et al., 2011). Sin embargo, existen dos tipos de Colágeno IV que son codificados por los genes, *viking (vkg)* y *Coll IV*, respectivamente (Le Parco et al., 1986). El análisis fenotípico de embriones mutantes para una deficiencia que elimina ambos genes de Colágeno IV, muestra que son letales y presentan agujeros en la cutícula y defectos en la tráquea y en la condensación de la cuerda nerviosa (Martinek et al., 2008). Con respecto al papel del Colágeno IV en migración celular, se ha demostrado que este Colágeno producido por los macrófagos se requiere para la correcta migración de los túbulos renales. En este contexto, se ha visto que el papel del Colágeno IV es sensibilizar a las células presentes en la punta de los túbulos a migrar en la dirección de un gradiente del ligando BMP, Decapentaplegic (Bunt et al., 2010). Si bien, y a pesar de que los macrófagos producen altos niveles de Colágeno IV, aún se desconoce el papel de este Colágeno en la migración de los macrófagos.

#### **2.3.5.2. Lamininas.**

Las lamininas son las glicoproteínas más abundantes de la matriz intersticial y de la membrana basal. Numerosos experimentos usando distintos animales modelos han demostrado la importancia de las lamininas en la migración de diversas poblaciones celulares durante la embriogénesis, como la migración de la cresta neural en vertebrados

## Introducción

(revisado en Perris and Perissinotto, 2000) o de las células endodermales, traqueales y mesodermales en el embrión de *Drosophila* (Urbano et al., 2009; Urbano et al., 2011). Dependiendo del contexto celular y del tipo de lamininas, estas pueden ejercer un actividad promotora o inhibidora del movimiento celular. Además, se ha visto que las lamininas funcionan no sólo como un substrato sobre el cual las células migran, sino que también pueden controlar el movimiento celular modulando la acción de factores guías embebidos en ellas (McKerracher et al., 1996). Sin embargo, y a pesar de que los macrófagos son los principales productores de lamininas poco se sabe del papel de estas en la diferenciación y migración de los mismos. Así, resultados preliminares obtenidos en el laboratorio mostraron que la migración de macrófagos a lo largo de la cuerda nerviosa está comprometida en embriones que carecen totalmente de lamininas (Urbano et al., 2009). Pero aún se desconocen los mecanismos moleculares y celulares por los cuales las lamininas regulan la migración de los macrófagos, lo que ha sido objeto de estudio en esta tesis doctoral.

### **2.3.5.3. Perlecan.**

El papel de Perlecan en migración celular ha sido muy poco estudiado. Ha sido recientemente que se ha demostrado mediante ensayos de células en cultivo que Perlecan se requiere para la migración de células endoteliales vasculares y células madres derivadas de la médula ósea (Nakamura et al., 2015). Su papel en la morfogénesis y migración de los macrófagos ha sido muy poco estudiado. Se conoce que la falta de Perlecan provoca un descenso en el número de hemocitos presentes en el estadio larvario 3, y se desconoce a través de que moléculas regula este fenómeno, se ha relacionado con alteración en los niveles de los factores de crecimiento VEGF/PDGF y con un factor de transcripción llamado *pointed* el cual regula la proliferación de los hemocitos en estadios larvarios (Lindner et al., 2007; Zettervall et al., 2004). Sin embargo, se desconoce si Perlecan se requiere para la correcta migración de macrófagos durante la embriogénesis.

### **2.4. Regulación de la fagocitosis de macrófagos embrionarios.**

Por último, ya que los macrófagos embrionarios migran y se distribuyen a lo largo del embrión para ejercitar una de sus principales funciones, la de fagocitar, se va a describir

brevemente el proceso de fagocitosis durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*. Si bien la capacidad de fagocitar está presente en muchos tipos celulares, existe una diferencia entre fagocitos profesionales, que son aquellos que presentan esta capacidad como parte de su función celular, y fagocitos no profesionales, que son aquellos que tienen la capacidad de fagocitar, pero no es su fin dentro del organismo. En *Drosophila* los fagocitos profesionales son los macrófagos embrionarios (Williams, 2007). El proceso de fagocitosis en el embrión de *Drosophila melanogaster* ha sido centro de estudio debido a que sus mecanismos celulares se encuentran conservados evolutivamente (Williams, 2007). La fagocitosis está regulada por receptores, conocidos como “carroñeros”, que se expresan en los macrófagos. Entre estos receptores caben destacar:

- **Croquemort:** es un receptor homólogo a los receptores CD36 presentes en vertebrados. Su presencia es exclusiva de macrófagos embrionarios, y su principal función es la de reconocer los cuerpos apoptóticos, no siendo esencial para la fagocitosis de bacterias (Franc, 1999; Franc et al., 1996).

- **Drapeer:** es un receptor de membrana que se encuentra tanto en macrófagos embrionarios como en células de la glía. Su principal función es la de reconocer cuerpos apoptóticos y ayudar en el proceso de fagocitosis (Manaka et al., 2004).

- **NimC4/Simu:** es otro receptor de membrana implicado en el reconocimiento y en el proceso de la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos. Este receptor también está presente en las células de la glía (Kurant et al., 2008).

Otras proteínas implicadas en la correcta fagocitosis y que han sido ya citadas en esta introducción son:

- **Integrinas:** se ha descrito que juegan un importante papel en la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos así como de bacterias en macrófagos embrionarios de *Drosophila melanogaster* en cultivo (Nonaka et al., 2013). Sin embargo, se desconoce si juega algún papel en la fagocitosis que tiene lugar durante la embriogénesis.

- **Rho y Rab GTPasas:** distintos miembros de esta super familia han sido implicados en fagocitosis. Por ejemplo, se ha visto que mutantes en Rab35 muestran defectos en la fagocitosis in vivo. El papel de Rab35 en este contexto es el de mediar el transporte de Cdc42 y Rac1 hacia la membrana durante el proceso de fagocitosis (Shim et al., 2010).

## Introducción

Así mismo, se ha demostrado que macrófagos mutantes para Rab14, Rab7 o Rab2 muestran defectos en la fagocitosis de *Staphylococcus aureus* (Garg y Wu, 2014).

- **Scar/WAVE**, esta proteína actúa sobre proteínas reguladoras de actina, a través de las cuales median la correcta fagocitación de los cuerpos apoptóticos y de las bacterias (Evans et al., 2013).

Finalmente, aunque en *Drosophila* no se ha estudiado, se sabe que la MEC puede incrementar la actividad fagocítica de leucocitos mononucleares y polimorfonucleares. Esto es así gracias a que facilita el contacto entre el receptor apoptótico y el cuerpo apoptótico, así como la acumulación de proteínas estimuladoras de la fagocitosis (Brown, 1986).

# Objetivos

## Objetivos

La migración celular es algo propio de ciertas células, inofensivo y necesario para la correcta embriogénesis, así como para el mantenimiento del organismo adulto. Pero si esa función la adquieren células malignas, se convierte en dañino y peligroso para la vida. Por ello, estudiar la migración celular y los mecanismos moleculares y celulares que la regulan, no sólo aporta un mayor conocimiento de los procesos embriológicos, sino que permite usar esos conocimientos en pro de comprender, e incluso tratar, procesos de migración celular implicados en enfermedades, como el cáncer.

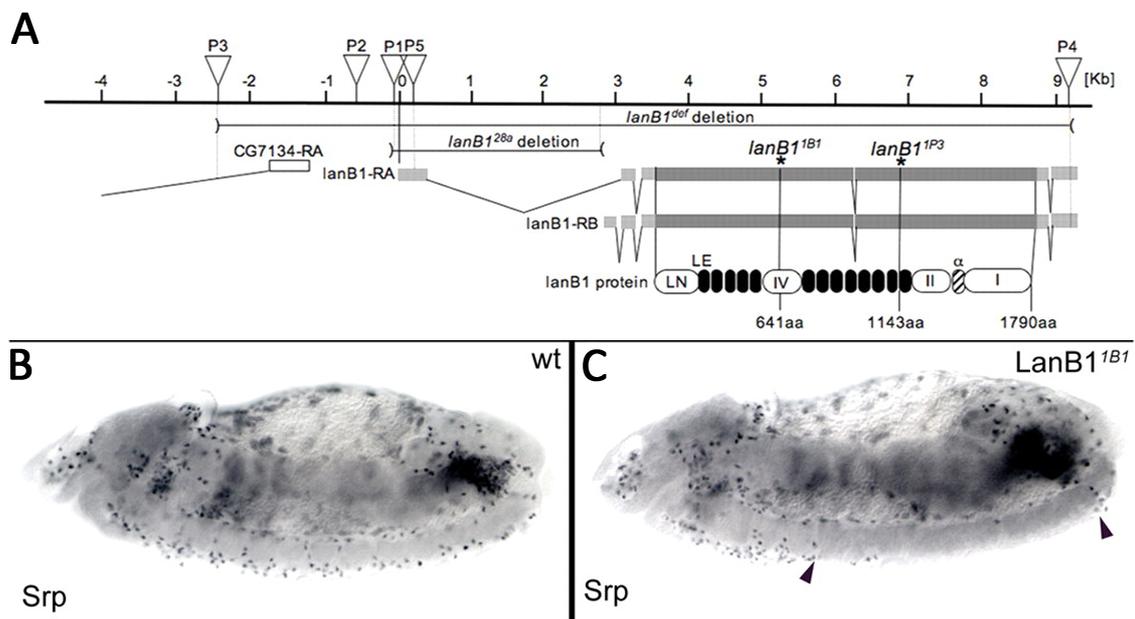
Trabajos previos han implicado a la matriz extracelular, y en particular a las lamininas, en procesos de migración celular. Sin embargo la mayoría de estos trabajos se han llevado a cabo en células en cultivos, por lo que su implicación en los procesos celulares que ocurren durante la embriogénesis queda aún por descubrir. Además poco se sabe de los mecanismos a través de los cuales la matriz extracelular regula la migración celular. En esta tesis se ha propuesto analizar in vivo el papel de la matriz extracelular en migración celular durante la embriogénesis, usando los macrófagos de *Drosophila melanogaster* como sistema modelo. En particular, los objetivos planteados en esta tesis son:

- ❖ Estudio in vivo de la función de la matriz extracelular en general, y de las lamininas en particular, en la migración de macrófagos durante la embriogénesis.
- ❖ Estudio de la localización de las lamininas en el embrión durante la migración de macrófagos.
- ❖ Análisis de los mecanismos celulares y moleculares a través de los cuales las lamininas regulan la migración de macrófagos.
- ❖ Análisis del papel de las lamininas en la actividad fagocítica de los macrófagos.
- ❖ Estudio de la función del Colágeno IV en la migración de macrófagos.
- ❖ Generación de un mutante para el gen *nidogen*.
- ❖ Estudio del papel de *nidogen* durante la migración de macrófagos a lo largo del desarrollo embrionario.

# Resultados I

## Análisis del papel de las Lamininas en la migración de macrófagos embrionarios.

Como se ha mencionado en la introducción, en *Drosophila melanogaster* sólo existen dos tipos de Lamininas (Laminina A y Laminina wb). Ambas comparten las mismas subunidades  $\beta$  (codificada por el gen *LanB1*) y  $\gamma$  (codificada por el gen *LanB2*), mientras que portan distintas  $\alpha$  (codificadas por los genes *LanA* y *LanWb*, respectivamente). Así, la eliminación de cualquiera de las subunidades  $\beta$  o  $\gamma$ , da lugar a la eliminación completa de todas las lamininas presentes en *Drosophila* (Urbano et al., 2009). Por ello, en este trabajo y con la intención de analizar el papel de las lamininas en la migración de los macrófagos se utilizaron mutantes en el gen *LanB1*. Dichos mutantes se aislaron en colaboración con el laboratorio del Dr. J. de Celis (Fig. 18 A, (Urbano et al., 2009)). De los diferentes mutantes que se generaron en aquel trabajo, se decidió utilizar en esta tesis doctoral la deficiencia llamada *LanB1<sup>Def</sup>*, la cual elimina el gen completo (Fig. 18 A).

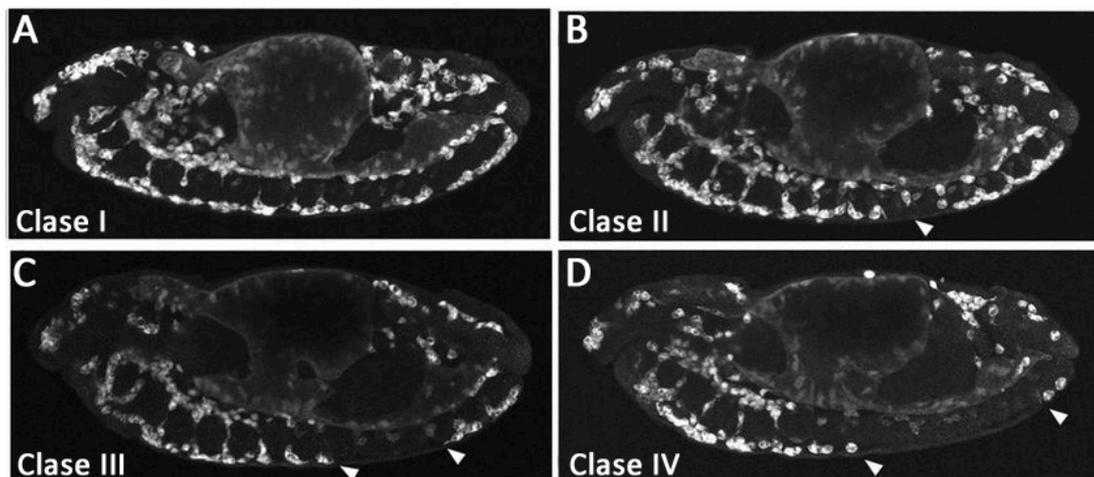


**Fig. 18.** (A) Esquema de la región génica del gen *LanB1*. (B y C) Embriones control (B) y mutante para la Laminina B1(C) teñidos con anti-Srp, lo cual permite visualizar los macrófagos. Modificado de Urbano et al 2009.

Análisis preliminares realizados en el laboratorio del fenotipo de embriones mutantes  $LanB1^{Def}$  determinaron que la falta total de lamininas afectaba a la migración de distintas poblaciones embrionarias, incluyendo, células endodermales, de la tráquea, de la glándula salivar y los macrófagos (Urbano et al., 2009). Más en concreto, se observó que la migración de los macrófagos a lo largo de la cuerda nerviosa estaba afectada en embriones mutantes  $LanB1^{Def}$  (Fig. 18 B y C) (Urbano et al., 2009).

### **1. Estudio del papel de lamininas en las diferentes etapas de la migración de macrófagos durante la embriogénesis:**

En este trabajo se procedió a caracterizar en más detalle el fenotipo previamente observado en macrófagos de embriones mutantes  $LanB1^{Def}$ . Para ello se cuantificaron los defectos en migración de macrófagos, usando los criterios de clasificación del fenotipo utilizados anteriormente en el laboratorio (Comber et al., 2013). Esta clasificación establece 4 clases diferentes de fenotipos, que se distinguen entre sí por el número de neurómeros de la cuerda nerviosa desprovistos de macrófagos en el estadio 13, que es cuando en el embrión silvestre los macrófagos cubren completamente la cuerda nerviosa en el eje antero-posterior.

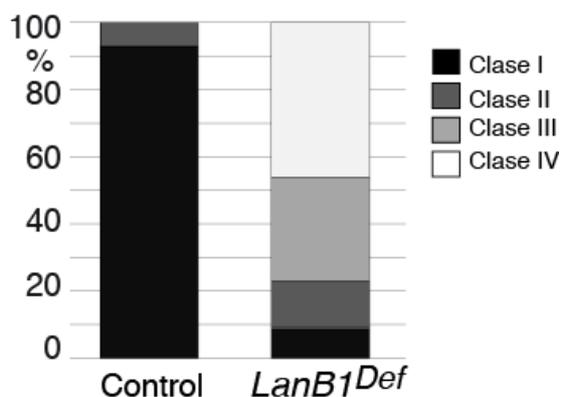


**Fig. 19.** Visión lateral de embriones de estadio 13 donde se pueden observar los diferentes fenotipos de migración de macrófagos a lo largo de la cuerda nerviosa. Modificada de Comber et al., 2013.

## Resultados I

De esta manera un embrión de **Clase I** es aquel en el que todos los neurómeros están recubiertos de macrófagos (Fig. 19 A), uno de **Clase II** es aquel que presenta entre 1 y 2 neurómeros sin macrófagos (Fig. 19 B), uno de **Clase III** es aquel en el que existen entre 3 y 4 neurómeros vacíos de macrófagos (Fig. 19 C), y finalmente, uno de **Clase IV**, es aquel que tiene más de 5 neurómeros vacíos (Fig. 19 D).

Utilizando esta clasificación, se observó que mientras la mayoría de los embriones eran de Clase I, en concreto un 93% , y el 7% restante pertenecían a la Clase II. En contra, en el caso de los mutantes  $LanB1^{Def}$ , la Clase IV era la mayoritaria, con un 46% de embriones, seguido por la Clase III con un 31% y las Clases II y I con un 14% y un 9%, respectivamente (Fig. 20).



**Fig. 20.** Clasificación de embriones control y mutantes de  $LanB1^{Def}$  de estadio 13, según el fenotipo de migración de macrófagos a lo largo de la cuerda nerviosa. Control (n=75) y  $LanB1^{Def}$  (n=96).

Con el objetivo de conocer los mecanismos por los cuales la falta de las lamininas afecta a la migración de los macrófagos, se decidió tratar de analizar por qué los macrófagos de los embriones mutantes  $LanB1^{Def}$  presentaban un retraso respecto a los de los embriones controles. El fenotipo de migración podría deberse a que las lamininas fuesen necesarias durante la primera etapa de la migración, entrada en la cola. Retrasos en esta primera etapa provocaría que en el estadio 13 los macrófagos no hubiesen cubierto completamente la cuerda nerviosa, que es el fenotipo que se observa en los mutantes  $LanB1^{Def}$ . Por otro lado, las lamininas podrán ser necesarias sólo para la migración de los macrófagos sobre la cuerda nerviosa, lo que produciría un fenotipo similar al observado. Y finalmente, las lamininas podrían ser requeridas para una correcta migración durante ambas etapas. Para poder testar estas diferentes posibilidades, y ya que la migración

celular es un proceso dinámico, en este estudio se propuso realizar un análisis in vivo de las distintas etapas de la migración de los macrófagos en embriones silvestres y mutantes para las lamininas. Para ello, se utilizó el sistema UAS/GAL4 (G4, ver materiales y Métodos) y más en concreto la línea Srph.G4, la cual contiene el promotor del gen *serpent* (*srp*) que se expresa específicamente en los macrófagos al inicio de su diferenciación y se mantiene a lo largo de la embriogénesis (Rehorn et al., 1996). Así mismo se crearon, por recombinación, moscas que portaban esa línea G4 y una construcción UAS-GFP, lo que permite expresar la proteína fluorescente “Green Fluorescent Protein” (U-GFP) en los macrófagos y así seguir su migración in vivo. En concreto, los genotipos de los embriones utilizados en este estudio fueron: “w;;Srph.G4-U-GFP” (embriones control) y “w;LanB1<sup>def</sup>;Srph.G4-U-GFP” (embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup>).

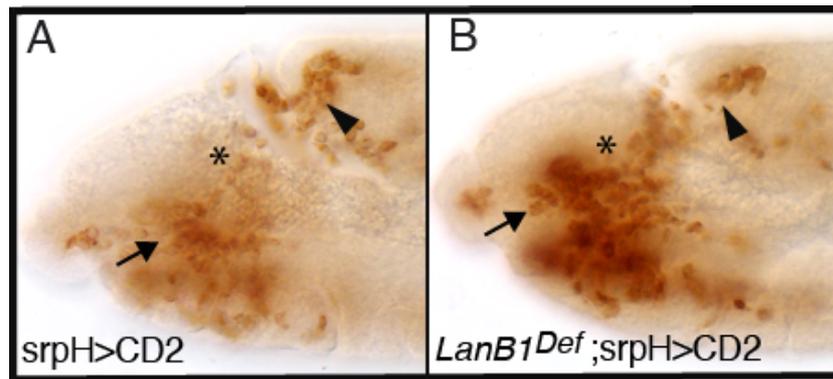
### 1.1. Entrada en la cola del embrión.

Como se ha mencionado en la Introducción, en esta etapa, que ocurre durante los estadios 10 y 11 de la embriogénesis, los macrófagos salen de la cabeza para llegar hasta la parte exterior de la cola, entran en ella rodeando al intestino posterior, e inician su migración sobre la cuerda nerviosa hacia el extremo anterior del embrión (Fig. 21). Esta etapa finaliza con el inicio de la retracción de la banda germinal (Siekhaus et al., 2010a).



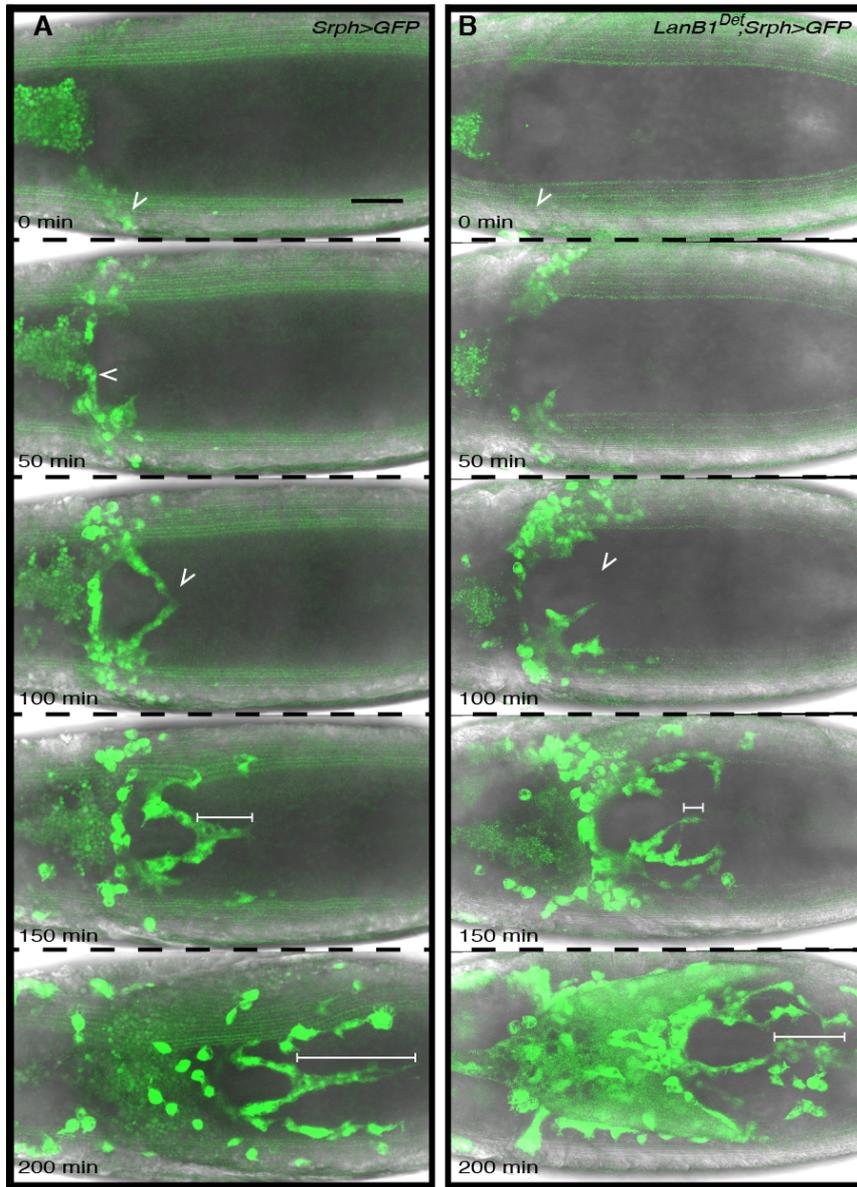
**Fig. 21.** Visión lateral de embriones controles de estadios 10 y 11.

En esta etapa se observó que los macrófagos de embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup> presentaban un retraso en la entrada de la cola cuando se comparaban con los de embriones control (Fig. 22 A y B, triángulo negro). Este retraso se podría deber a una demora en la primera fase de esta etapa, migración por el interior del embrión hacia la cola del embrión (Fig. 22 A y B, asterisco), o en la fase donde rodean el intestino posterior o en varias o en todas ellas.



**Fig. 22.** Visión lateral de embriones control y  $LanB1^{Def}$  de estadio 11. La flecha señala el punto de partida de los macrófagos, el asterisco, la travesía que tiene lugar dentro del embrión, y el triángulo señala la entrada en la cola del embrión.

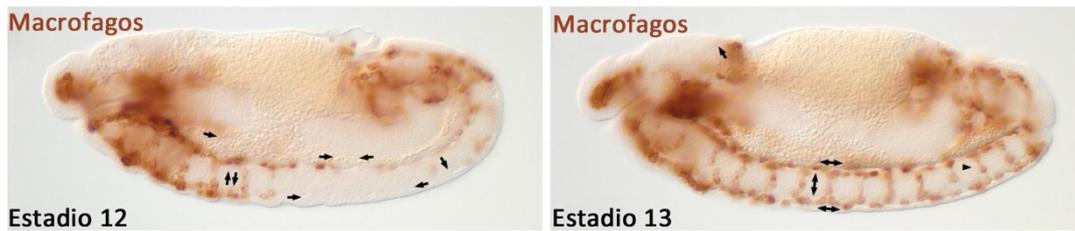
Para distinguir entre estas posibilidades, se cuantificó in vivo la velocidad de migración de los macrófagos en las distintas fases. Con respecto a la primera fase, se observó que si bien a finales del estadio 10, determinado por la diferenciación de los 3 segmentos de la cabeza (Hartenstein, 1993), los macrófagos de embriones control ya empezaban a aparecer alrededor del intestino posterior, no se observaron macrófagos en los embriones mutantes  $LanB1^{Def}$  (Fig. 23 A y B, flecha en 0 min.). Estos resultados sugieren que en ausencia de lamininas esta primera fase de migración de los macrófagos está afectada. Así mismo, se observó que, una vez que los macrófagos entraban por la cola, estos se movían más lentamente alrededor del intestino posterior (Fig. 23 A y B, flecha en 100 min.) y sobre la cuerda nerviosa en embriones mutantes  $LanB1^{Def}$  respecto al control (Fig. 23 A y B, barra en 150 min.). De este modo, mientras que los macrófagos en el embrión control presentaban una velocidad de  $1,27 \mu\text{m}/\text{min}$  cuando rodeaban al intestino posterior y de  $0,84 \mu\text{m}/\text{min}$  cuando migraban sobre la cuerda nerviosa, los macrófagos de embriones mutantes  $LanB1^{Def}$  presentaban una velocidad de  $0,74 \mu\text{m}/\text{min}$  y  $0,70 \mu\text{m}/\text{min}$ , respectivamente (Fig. 23 C). Estos resultados demuestran que las lamininas se requieren desde la primera etapa de migración de los macrófagos, siendo este requerimiento mayor cuando migran rodeando el intestino posterior que cuando comienzan a migrar sobre la cuerda nerviosa, ya que la reducción en la velocidad de migración en embriones mutantes  $LanB1^{Def}$  comparados con control es en torno al 41% cuando rodean al intestino posterior mientras que es sólo en torno al 17% cuando lo hacen sobre la cuerda nerviosa (Fig. 23 C).



**Fig. 23.** Visión dorsal de un embrión control (A) y un embrión LanB1<sup>Def</sup> (B). La figura muestra una secuencia de imágenes a diferentes tiempos de una filmación de la etapa de entrada a la cola del embrión. (C) Cuantificación de las velocidades de migración en embriones control y mutantes.

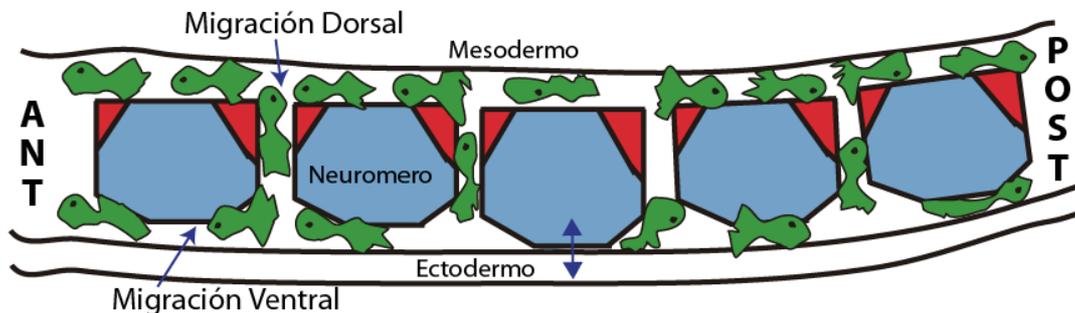
**1.2. Migración a lo largo de la línea media de la cuerda nerviosa.**

Durante esta etapa, los macrófagos migran sobre la parte ventral y dorsal de la línea media de la cuerda nerviosa. Así, mientras unos migran desde la cola hacia la cabeza, es decir en sentido posterior-anterior, como se ha descrito en la sección anterior, otros migran desde la cabeza hacia la cola, es decir en sentido anterior-posterior. O sea, ambas poblaciones migran en la misma dirección pero en sentidos opuestos, con el fin de cubrir por completo la cuerda nerviosa (Fig. 24) (Tepass et al., 1994).



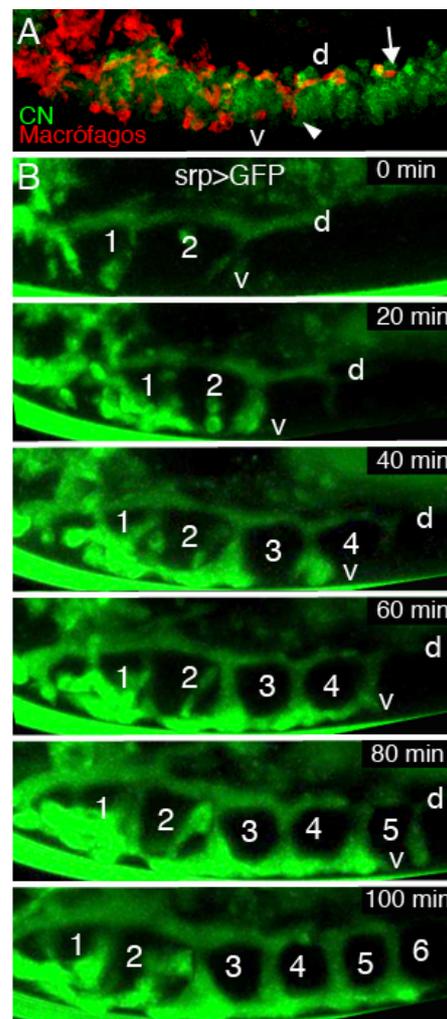
**Fig. 24.** Visión lateral de embriones controles de estadios 12 y 13.

Lo que se ha descrito hasta ahora es que los macrófagos migran por ambos lados, dorsal y ventral, de la cuerda nerviosa, desde el principio de esta migración y que cruzan de un lado a otro por los canales que existen en la cuerda nerviosa, los espacios entre neurómeros (Tepass et al., 1994). De esta manera, unos macrófagos migrarían entre la parte ventral de la cuerda nerviosa y el ectodermo (migración ventral) y otros lo harían entre la parte dorsal de la cuerda nerviosa y el mesodermo (migración dorsal) (Fig. 25). Además, estas dos poblaciones se entrecruzarían a través de los canales existentes en el sistema nervioso.



**Fig. 25.** Esquema de la migración de los macrófagos sobre la cuerda nerviosa.

El análisis *in vivo* nos ha permitido ver esta descripción de la migración de macrófagos a lo largo de la cuerda nerviosa no es totalmente correcta y, que en realidad, los macrófagos migran primero sobre la parte dorsal de la cuerda nerviosa y a medida que se van encontrando los canales cruzan hacia la parte ventral, e inician una migración local sobre esta parte. Con lo que se podría concluir que los macrófagos que decoran la parte ventral, entre la cuerda nerviosa y el ectodermo, en realidad provienen de la parte dorsal, contradiciendo lo hasta ahora publicado (Fig. 26 A y B).

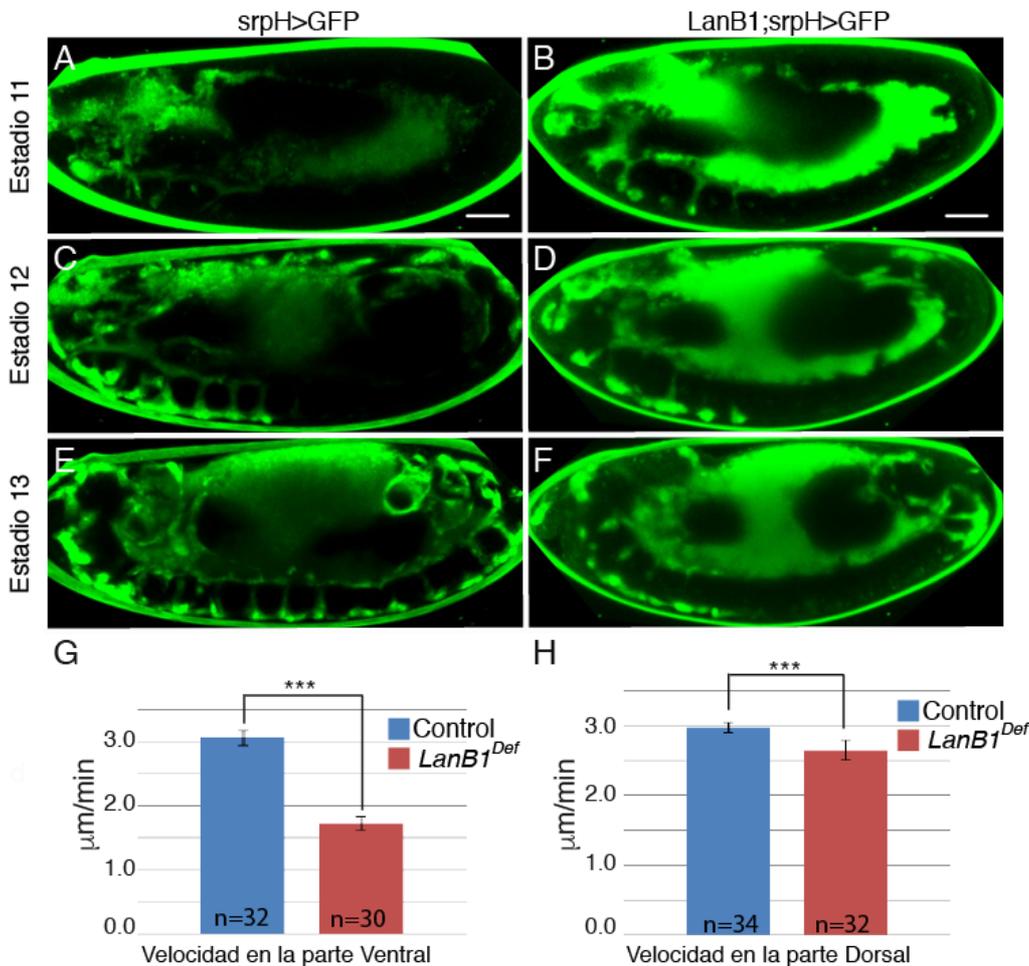


**Fig. 26.** Visión aumentada de la migración sobre la cuerda nerviosa en un embrión control (A) y una secuencia de imágenes de la misma (B). (d es dorsal, v es ventral y los números señalan los neurómeros por los que están migrando los macrófagos).

Por ello, y con el fin de analizar el papel de las lamininas en la migración de los macrófagos a lo largo de la cuerda nerviosa, se cuantificó la velocidad de migración de

## Resultados I

los mismo tanto en la parte dorsal como en la ventral de la cuerda nerviosa en embriones control y mutantes (Fig. 27 A-F). Así, se observó que los macrófagos control migraban a una velocidad de  $3,06 \mu\text{m}/\text{min}$  en la parte ventral y  $2,97 \mu\text{m}/\text{min}$  en la parte dorsal, pero que esta diferencia no era estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ), por lo que se podría decir que los macrófagos, en el caso control, migraban a la misma velocidad en ambos lados de la cuerda nerviosa. Sin embargo, los macrófagos en embriones mutantes  $\text{LanB1}^{\text{Def}}$  lo hacían a  $1,73 \mu\text{m}/\text{min}$  y  $2,65 \mu\text{m}/\text{min}$  respectivamente (Fig. 27 G y H). Así, la migración de los macrófagos en la parte ventral del embrión era un 44% más lenta en los mutantes de lamininas mientras que en la parte dorsal era sólo un 10.7% más lenta, siendo en ambos casos las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 27.** (A,B,C) Visión lateral de un embrión control y (B,D,H) de un embrión  $\text{LanB1}^{\text{Def}}$ . Las imágenes muestran la migración sobre la cuerda nerviosa en diferentes estadios del embrión. (G) Cuantificación de la velocidad de migración sobre la parte ventral de la cuerda nerviosa. (H) Cuantificación de la velocidad de migración sobre la parte dorsal de la cuerda nerviosa.

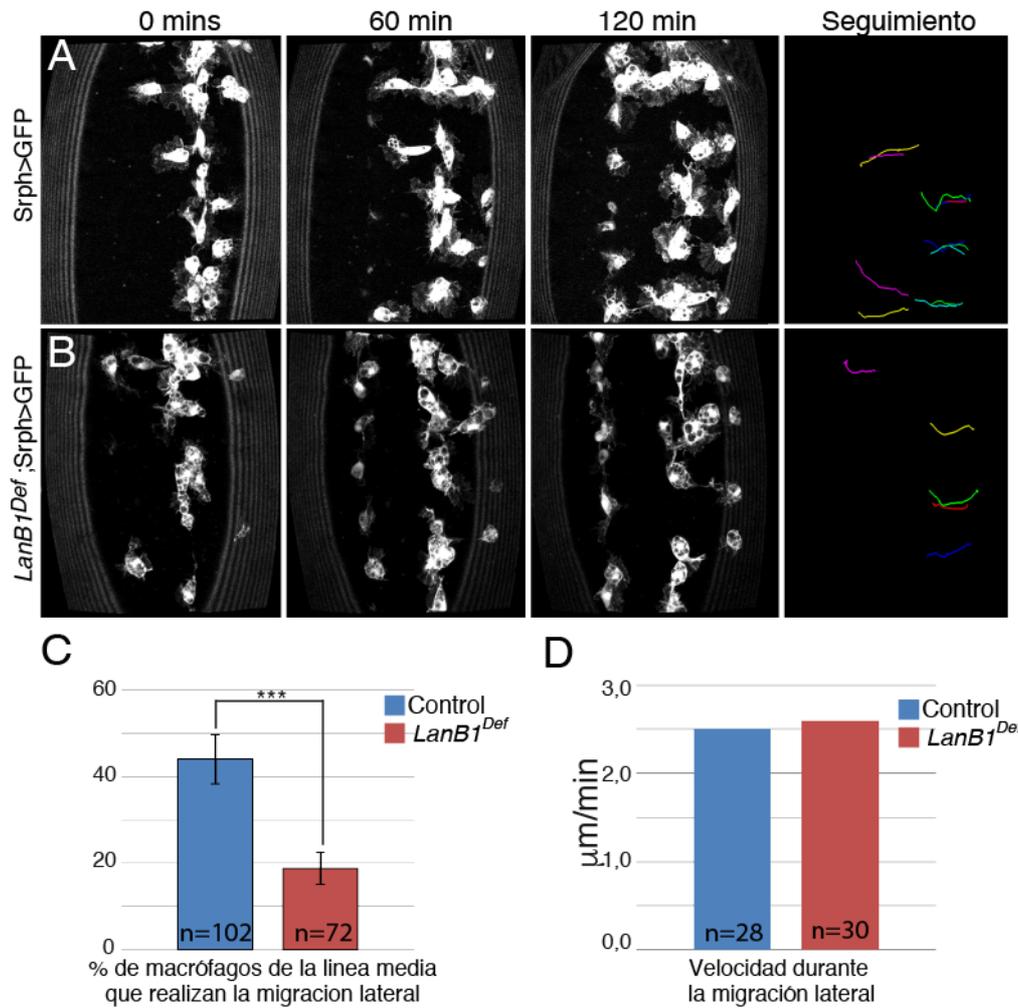
### 1.3. Migración lateral en la cuerda nerviosa.

Tras la migración sobre la línea media de la cuerda nerviosa tiene lugar la migración lateral. Esta migración consiste en que los macrófagos se desplazan desde la línea media hacia las zonas adyacentes, pasando de formar una sola línea a formar tres líneas paralelas sobre la cuerda nerviosa (Fig. 28).



**Fig. 28.** Visión lateral de embriones controles de estadios 13 y 14.

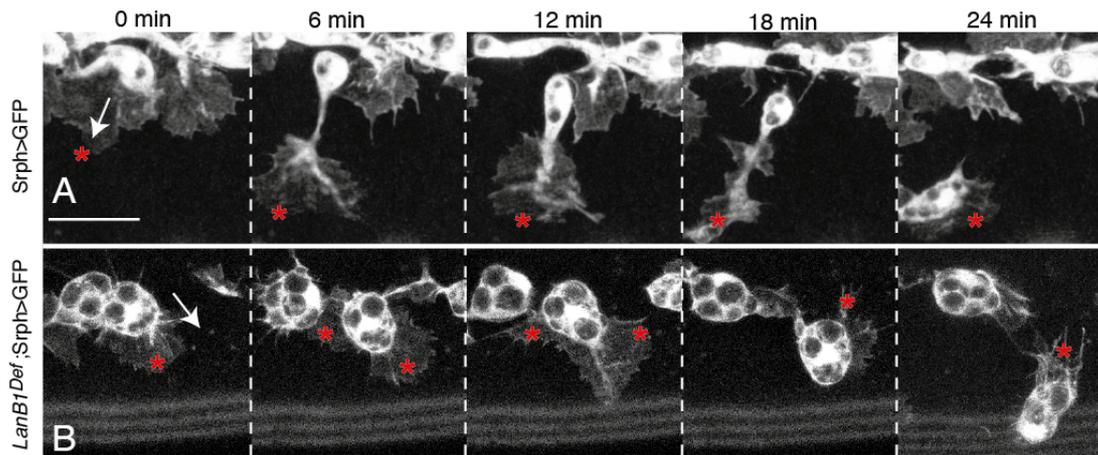
En esta etapa se cuantificó la velocidad a la que los macrófagos migraban lateralmente, y se observó que entre macrófagos de embriones control y mutantes  $\text{LanB1}^{\text{Def}}$  no existían diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) (Fig. 29 D). Sin embargo, se observó que el número de migraciones laterales era menor en los embriones mutantes  $\text{LanB1}^{\text{Def}}$  respecto a los control (Fig. 29 A y B). Así pues, se decidió cuantificar la proporción de macrófagos que realizaban la migración lateral respecto al total de macrófagos presentes en la línea media de la cuerda nerviosa. Se observó que mientras que en los embriones control un 45% de los macrófagos de la línea media se movían lateralmente, en los embriones mutantes  $\text{LanB1}^{\text{Def}}$ , los macrófagos que iniciaban dicha migración no llegaban al 20% (Fig. 29 C). Este resultado muestra que las lamininas, aunque no afectan la velocidad de migración de esta etapa, si regulan de alguna forma la migración lateral.



**Fig. 29.** Visión dorsal de un embrión control (A) y de un embrión *LanB1<sup>Def</sup>* (B). Las imágenes muestran la migración lateral sobre la cuerda nerviosa a través del tiempo (o a 120 min). La última imagen muestra el seguimiento realizado a los macrófagos que realizan la migración lateral. (C) Proporción de macrófagos que están en la línea media y realizan la migración lateral. (D) Cuantificación de la velocidad de migración lateral sobre la cuerda nerviosa.

Antes de moverse y durante la migración dirigida, como es el caso de los macrófagos, las células dirigen y estabilizan las proyecciones celulares en el sentido de la migración. Estas proyecciones se anclan al sustrato para así arrastrar el resto de la célula en la dirección del movimiento. Posteriormente, se desanclan y se vuelven a formar nuevas proyecciones, siendo algo cíclico. Por ello, y con el propósito de investigar por qué se observaban menos macrófagos moviéndose lateralmente en embriones mutantes respecto a controles, se decidió analizar la distribución de las proyecciones de los macrófagos que realizaban la migración lateral en embriones controles y mutantes *LanB1<sup>Def</sup>*. El resultado

de este análisis mostró que en los macrófagos de embriones control las proyecciones eran siempre en el sentido de la dirección de migración y persistían a lo largo del tiempo (Fig. 30 A, asteriscos). Sin embargo, la proyecciones de macrófagos de embriones mutantes  $LanB1^{Def}$  se distribuían de manera más aleatoria y además eran muy poco estables comparadas con las de macrófagos de embriones control (Fig. 30 B, asteriscos).



**Fig. 30.** (A y B) Seguimiento de las proyecciones realizadas por macrófagos durante su migración lateral. Visión aumentada de un evento de migración lateral de un macrófago en un embrión control (A) y un embrión  $LanB1^{Def}$  (B). Las flechas señalan la dirección de migración, los asteriscos muestran las proyecciones de los macrófagos.

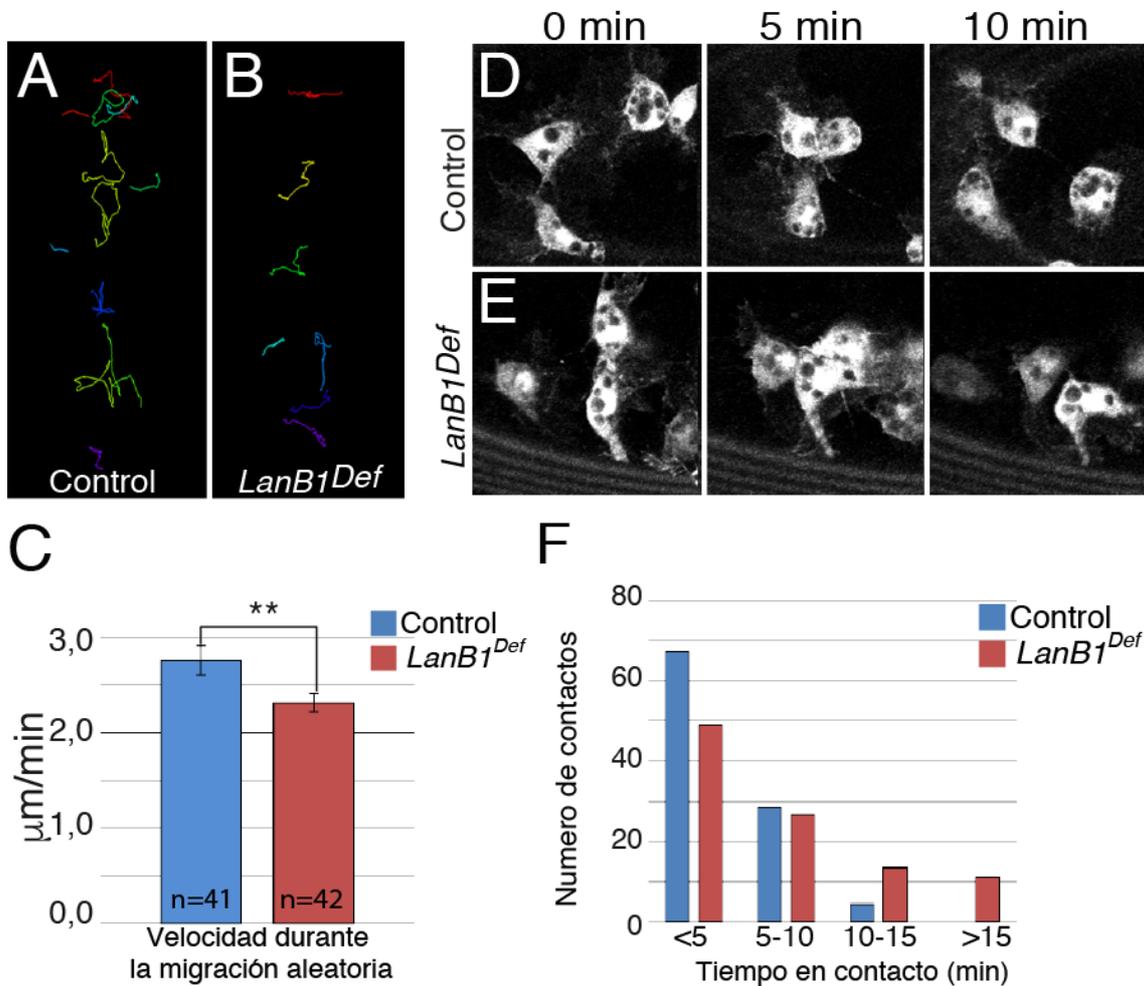
#### 1.4. Migración aleatoria.

En la última etapa los macrófagos presentan una migración aleatoria, sufriendo eventos de contacto y repulsión mientras se mueven, lo que redunda en una distribución homogénea a lo largo del embrión (Stramer et al., 2010).

Un análisis de seguimiento de los macrófagos que se movían aleatoriamente sobre la cuerda nerviosa reveló que, en un mismo espacio de tiempo, los macrófagos de embriones controles se movían distancias más largas que los de embriones mutantes (Fig. 31 A, B). Por ello, se cuantificó la velocidad de los macrófagos, revelando que la velocidad era de  $2,75 \mu\text{m}/\text{min}$  en embriones control y de  $2,3 \mu\text{m}/\text{min}$  en embriones mutantes  $LanB1^{Def}$  (Fig. 31 C), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Este resultado sugería que en esta última etapa las lamininas también eran necesarias, ya que la

## Resultados I

migración aleatoria de macrófagos de embriones  $LanB1^{Def}$  es un 17% más lenta que la observada en embriones control.



**Fig. 31.** (A y B) Seguimiento del movimiento de macrófagos durante la migración aleatoria. Visión aumentada de un evento de contacto y repulsión entre dos macrófagos en un embrión control (D) y un embrión  $LanB1^{Def}$  (E). (C) Cuantificación de la velocidad de los macrófagos durante la migración aleatoria. (F) Representación del número de contactos (eje y) y del tiempo en contacto (eje x) durante 60 minutos de migración aleatoria.

Otro aspecto analizado en esta última etapa ha sido la dinámica de los eventos de contacto y repulsión. Experimentos previos hechos en el laboratorio demostraron que existía un requerimiento de las integrinas, principales receptores de las lamininas, para los fenómenos de contacto y repulsión (Comber et al., 2013). Por ello, se decidió estudiar si este también era el caso para las lamininas. Para ello, se cuantificó el tiempo en que

permanecen en contacto los macrófagos, en embriones control y embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup> (Fig. 31 D y E). El resultado mostró que si bien el porcentaje de macrófagos que permanecían en contacto menos de 5 minutos era del 67% en embriones control, este porcentaje disminuía al 49% en embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup>. De manera similar, el 28% de los macrófagos permanecían en contacto entre 5 y 10 minutos en embriones control, frente al 27% en embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup>. Por último, mientras que sólo un 4% de los macrófagos permanecían en contacto entre 10 y 15 minutos en embriones control, en los mutantes este porcentaje se incrementaba al 13%. Aún más, mientras que los macrófagos de embriones control nunca permanecían en contacto más de 15 min, se encontró que un 11% de los macrófagos de embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup> si lo hacían (Fig. 31 F). De estos resultados se puede concluir que las lamininas tienen un papel fundamental en los eventos de contacto y repulsión.

## **2. Análisis del requerimiento de las lamininas durante la migración de macrófagos.**

Una vez se determinó que las lamininas se necesitaban para la correcta migración de los macrófagos, se decidió analizar qué células producían las lamininas necesarias para la migración de los macrófagos. En este contexto, existen al menos dos escenarios posibles. Por una parte, las lamininas se podrían secretar por el sustrato de migración, las células sobre las cuales migran los macrófagos, como las células de la cuerda nerviosa. Este se ha propuesto ser el caso de las células del mesodermo visceral caudal que migran sobre una matriz que deposita el mesodermo visceral (Urbano et al., 2011). En el otro escenario, los macrófagos, que en realidad son los principales productores de matriz extracelular, podrían secretar las lamininas requeridas para su migración. Este el caso de gliomas y melanomas, los cuales se ha visto que sintetizan sus propias lamininas para migrar (Kawataki et al., 2007; Oikawa et al., 2011). En un último escenario, las lamininas se podrían secretar por ambos, el sustrato y los mismo macrófagos. Para intentar distinguir entre estas posibilidades se llevaron a cabo 2 aproximaciones distintas: 1) se estudió el patrón de expresión de las lamininas durante la embriogénesis y 2) se analizó el requerimiento funcional de las lamininas en el sustrato y en los macrófagos por separado durante la migración de los mismos.

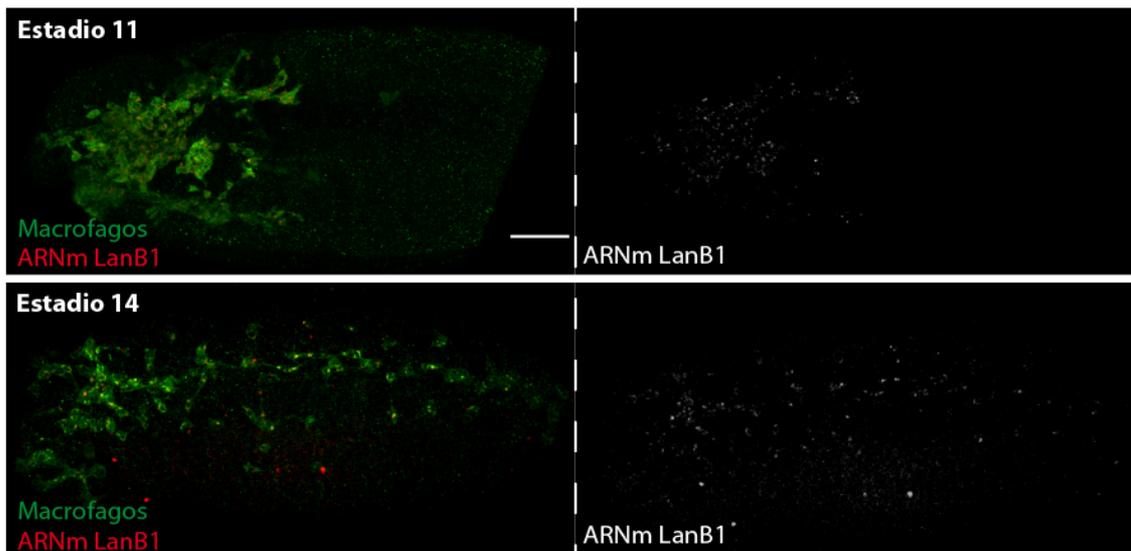
### **2.1 Estudio del patrón de expresión embrionario de las lamininas.**

Estudios anteriores demostraron que los principales productores de las lamininas y otros componentes de la matriz extracelular durante la embriogénesis de *Drosophila* eran los macrófagos y el cuerpo graso (Broadie et al., 2011). Si bien todos estos estudios se realizaron usando anticuerpos frente a determinados dominios de las distintas subunidades de las lamininas. Por lo tanto, es posible que esos dominios no se expongan bien en los distintos contextos celulares y por ello que aún no se disponga del patrón de expresión completo de las lamininas durante la embriogénesis. Así, por ejemplo, el uso del anticuerpo aislado y usado por Fessler et al., en 1987 revela principalmente la expresión de las lamininas una vez ensambladas en las membranas basales que rodean distintos órganos y tejidos. Otros anticuerpos detectaban las lamininas en los macrófagos durante su migración, en algunas células de la glía y en la membrana basal que rodea a la cuerda nerviosa en estadios tardíos, estadios 16-17 (Fessler et al., 1987; Kusche-Gullberg et al., 1992; Montell y Goodman, 1989; Wolfstetter y Holz, 2012). Además, como esos estudios se realizaron en tejido fijado se sabe muy poco sobre la dinámica de expresión de las lamininas in vivo. Por todo ello, en esta tesis se decidió analizar en mayor profundidad el patrón de expresión de las lamininas en el embrión mediante diferentes técnicas como la hibridación in situ, técnicas inmunohistoquímicas y análisis in vivo.

#### **2.1.1. Expresión del RNAm de *LanB1*.**

En esta sección analizamos el patrón de expresión del RNAm de *lanB1* mediante la técnica de hibridación in situ en embriones Srph.G4-U-GFP (ver Mat. y Met.).

El resultado de la hibridación in situ confirmó, por una parte que los macrófagos y el cuerpo graso transcribían el gen *LanB1*, y por otra, reveló que algunas células del sistema nervioso también eran capaces de transcribirlo (Fig. 32). Estudios anteriores han propuesto que estas células podrían ser células de la glía (Kusche-Gullberg et al., 1992; Montell y Goodman, 1989). En cualquier caso, este resultado no nos permite discernir cuál de los posibles escenarios previstos anteriormente es el correcto, ya que la lamininas se producen tanto por los macrófagos como por el substrato sobre el que migran, el sistema nervioso.



**Fig. 32.** Embriones silvestres de estadios 11 y 14. Arriba, visión lateral del estadio 11 y abajo, visión ventral del estadio 14. En verde se visualizan los macrófagos y en rojo el RNAm de *LanB1*

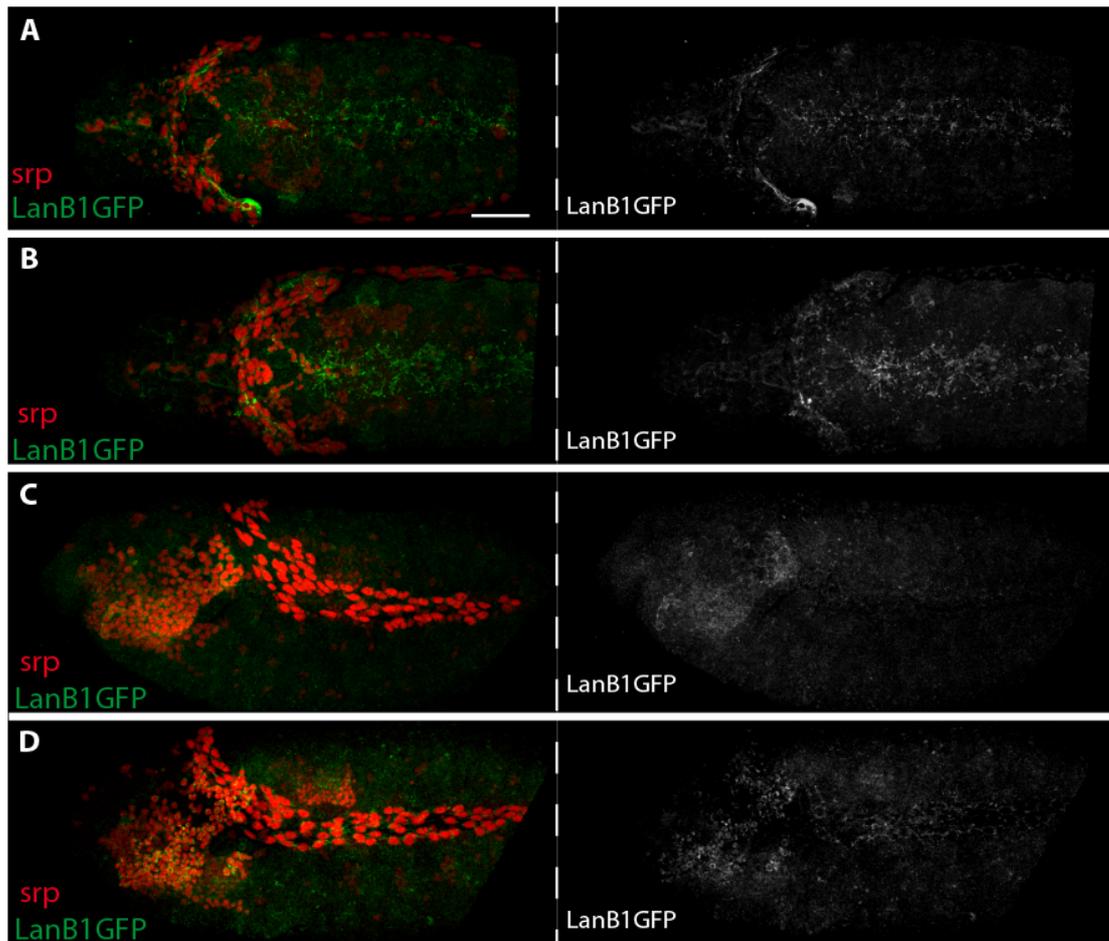
### 2.1.2. Expresión de la proteína LanB1.

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios del patrón de expresión de las lamininas usando anticuerpos frente a la subunidad LanB1 y LanB2 se han realizado en tejido fijado (Fessler et al., 1987; Kusche-Gullberg et al., 1992; Montell y Goodman, 1989; Wolfstetter y Holz, 2012).

Para analizar en más profundidad el patrón de expresión de las lamininas se decidió utilizar una nueva herramienta recientemente publicada, LanB1GFP. Esta herramienta son unas moscas transgénicas en las cuales se ha insertado un BAC (del inglés, bacterial artificial chromosome) que contiene el gen que codifica para la proteína “Green Fluorescence Protein” (GFP) y un fragmento grande del entorno genómico del gen *LanB1*, que muy probablemente contiene todas las secuencias reguladoras del mismo (Sarav et al., 2015). De hecho, se sabe que este BAC, insertado en el cromosoma III es capaz de rescatar el fenotipo y la viabilidad de moscas mutantes para *LanB1*. Esto apoya el hecho de que el patrón de expresión de la proteína quimérica LanB1GFP probablemente refleja el patrón endógeno de expresión de LanB1. Por último, estas moscas LanB1GFP portarían dos copias del gen *LanB1*, una con GFP y otra sin GFP pero no presentan ningún fenotipo.

### **Análisis de la expresión de LanB1 en tejido fijado.**

Este análisis se realizó en embriones “w;;LanB1GFP”, y usando anticuerpos anti-GFP, para visualizar la subunidad *LanB1*, y anti-srp para visualizar los macrófagos. Si bien este estudio confirmó el patrón descrito anteriormente, también nos permitió detectar expresión de lamininas en el sistema nervioso previa a la migración de los macrófagos (Fig. 33).

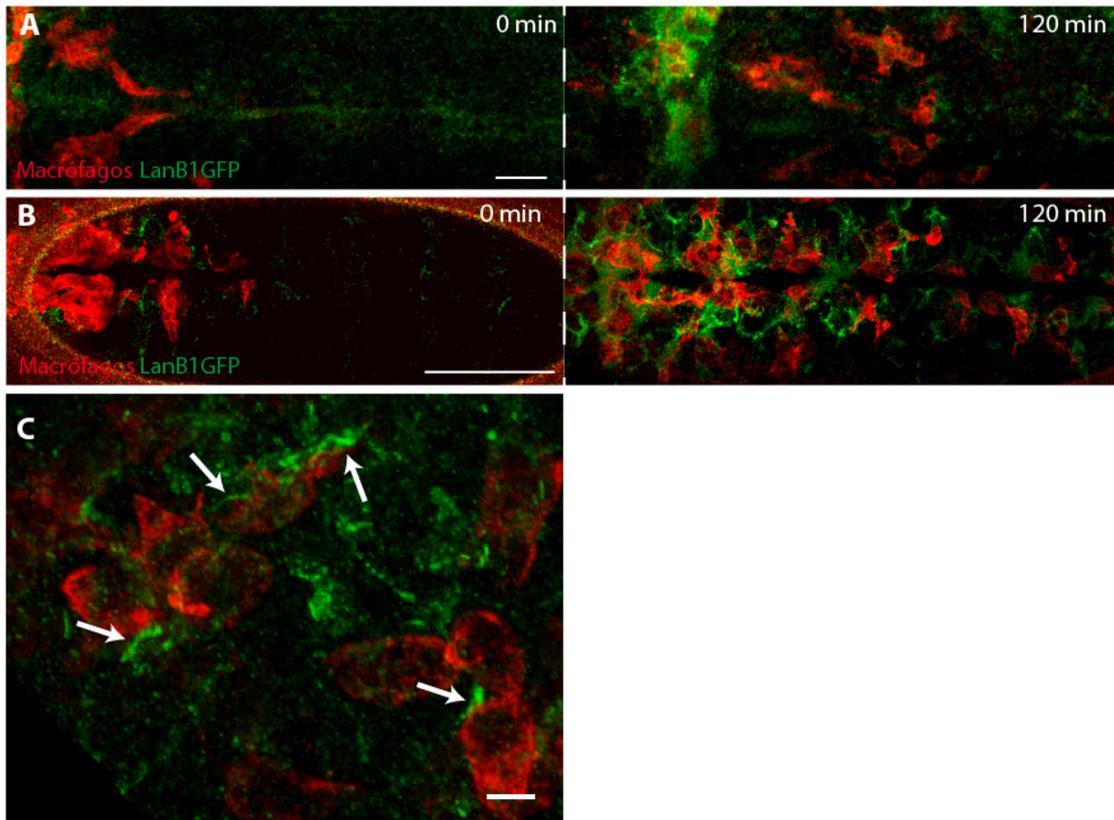


**Fig. 33.** Embriones LanB1GFP teñidos con anti-GFP (verde) y anti-srp (Rojo). (A,B) Visiones dorsal y (C, D) lateral de embriones de estadios 10 y 11.

### **Análisis in vivo de la expresión de LanB1.**

Tras el análisis sobre tejido fijado de la expresión de LanB1GFP, se decidió realizar un análisis in vivo para comprender la dinámica de expresión de las lamininas durante la migración de los macrófagos. Con el fin de poder visualizar los macrófagos al mismo tiempo que las lamininas, se generaron moscas transgénicas que expresaban la proteína

fluorescente roja eRFP en los macrófagos, Srp-pCasper eRFP::PH. Para ello, se diseñó una construcción que portaba una región del enhancer del gen *srp*, que dirige expresión en macrófagos embrionarios durante su migración, y la proteína roja fluorescente eRFP (ver Mat y Met.). Se generaron moscas transgénicas que portaban esta construcción y LanB1GFP, “w ; Srp-pCasper-eRFP::PH; LanB1GFP”, lo cual nos permitió visualizar in vivo al mismo tiempo la subunidad *LanB1* y los macrófagos. Para realizar el análisis in vivo de la expresión y dinámica de las lamininas durante la migración de los macrófagos se hicieron películas en dos estadios diferentes del desarrollo. Por una parte, se analizaron embriones tempranos con una orientación ventral para observar la entrada de los macrófagos a la cola del embrión y el inicio de la migración posterior sobre la cuerda nerviosa. Por otro lado, se filmaron embriones de estadio 13-14, con orientación ventral, para observar como migran los macrófagos sobre la cuerda nerviosa. Estas películas corroboraron una expresión temprana baja de las lamininas en el sistema nervioso previa a la migración de los macrófagos (Fig. 34 A). Por otra parte, el análisis in vivo reveló que esos niveles bajos de lamininas sobre la cuerda nerviosa se incrementaban una vez los macrófagos habían migrado sobre ella (Fig. 34 B). Esto sugiere que la migración de los macrófagos se podría requerir para la correcta deposición de las lamininas alrededor del sistema nervioso. Por último, se aprecia deposición de lamininas de forma local alrededor de los macrófagos mientras estos se mueven (Fig. 34 C).



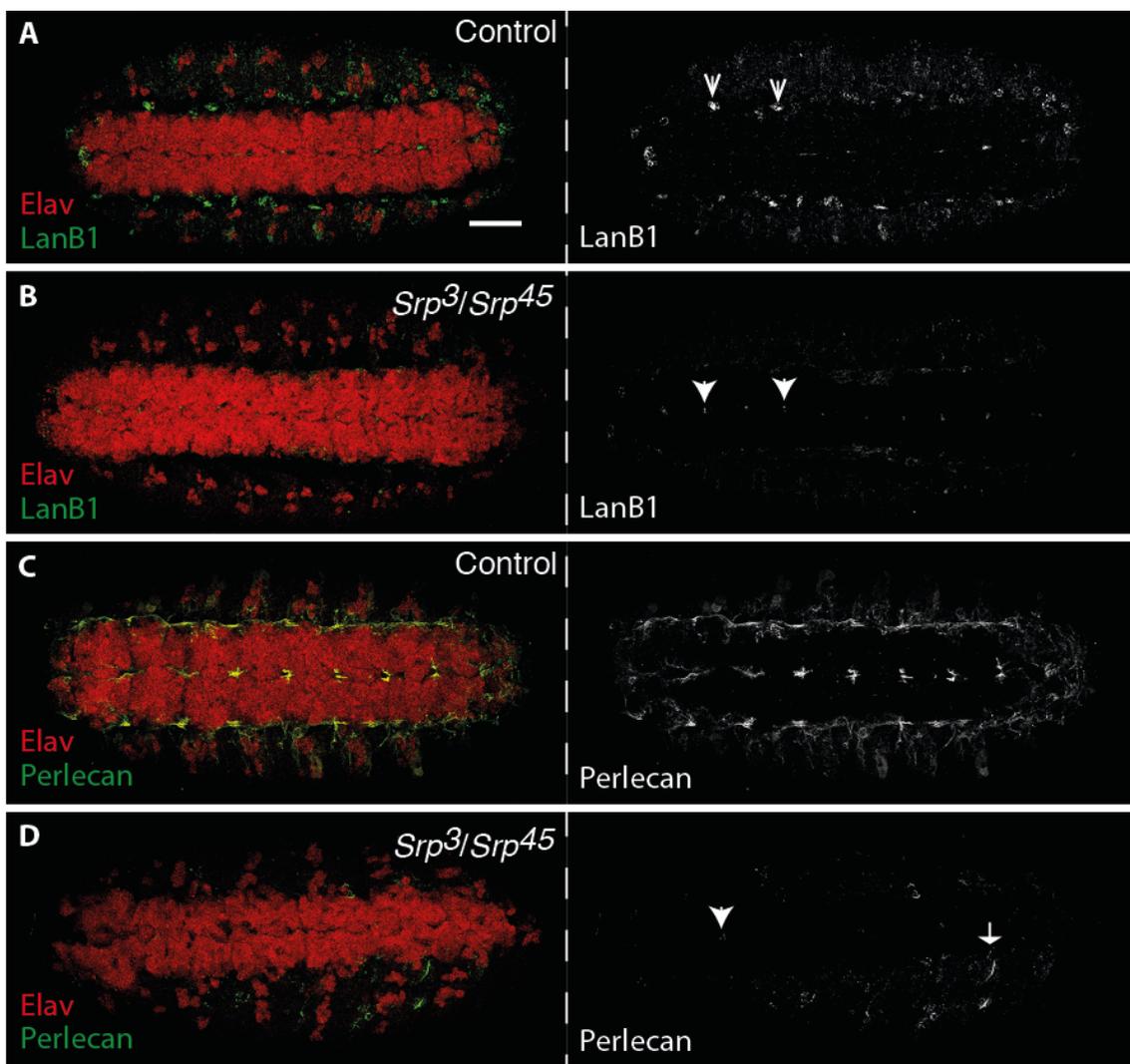
**Fig. 34.** (A) Visión dorsal de un embrión “w; Srp-pCasper-eRFP::PH;LanB1GFP” de estadio 11, seguimiento de la entrada en la cola rodeando el intestino posterior de los macrófagos. (B) visión ventral de un embrión “w; Srp-pCasper-eRFP::PH;LanB1GFP” de estadio 13, seguimiento de la migración a lo largo de la cuerda nerviosa. (C) Visión aumentada de la migración sobre la cuerda nerviosa donde se observa como la Laminina aparece depositada alrededor de los macrófagos (flechas). En rojo se visualizan los macrófagos y en verde la proteína LanB1GFP.

En resumen, las lamininas se expresan tanto en el sustrato, el sistema nervioso, de manera previa a la migración y durante la misma, así como localmente alrededor de los macrófagos durante su movimiento. En este contexto, para migrar los macrófagos podrían utilizar o bien las lamininas secretadas por ellos mismos, o aquellas dispuesta sobre el sustrato o ambas. En los siguientes apartados se decidió investigar cual era la fuente de las lamininas usadas por los macrófagos para migrar.

**La migración de macrófagos se requiere para una correcta deposición de la ECM alrededor de la cuerda nerviosa.**

Para testar si la migración de macrófagos se requiere para una deposición correcta de lamininas sobre la cuerda nerviosa, se analizaron los niveles de lamininas en embriones

que careciesen de macrófagos. Este es el caso de los mutantes para el gen *serpent*, el cual, como se ha mencionado anteriormente, se requiere para la correcta especificación y maduración de los macrófagos y del tejido graso. De forma que ciertos alelos mutantes para *serpent* presentan como fenotipo una ausencia total de macrófagos. Este es el caso de embriones mutantes homocigóticos para la mutación *srp<sup>3</sup>* y los heterocigóticos para los alelos *srp<sup>3</sup>/srp<sup>45</sup>* (Rehorn et al., 1996). El análisis de la expresión de lamininas en estos embriones mutantes, usando un anticuerpo anti-LanB1, reveló que si bien los niveles de lamininas en las células de la glía eran similares a los de embriones silvestres, los niveles en la membrana basal que rodea la cuerda nerviosa estaban disminuidos drásticamente (Fig. 35 A, B).



**Fig. 35.** (A,C) Embriones control y (B,D) embriones *Srp<sup>3</sup>/Srp<sup>45</sup>* de estadio 15. (A,B) Tinción con anti-ELAV (rojo) y con anti-LanB1 (Verde). (C,D) Tinción con anti-ELAV (rojo) y con anti-Perlecan (Verde).

El análisis de expresión de otros componentes de la MEC, como Perlecan, revelaron que, de manera similar a las lamininas, los niveles alrededor de la cuerda nerviosa disminuían fuertemente en embriones mutantes *syb* comparados a los controles, mientras que los de la glía no parecían alterarse significativamente (Fig. 35 C, D). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los macrófagos son la principal fuente de las lamininas, y otros componentes de la MEC, presentes sobre la cuerda nerviosa.

### **2.2. Estudio del requerimiento funcional de las lamininas.**

Como hemos mencionado anteriormente, las lamininas que requieren los macrófagos para migrar podría proceder de los mismo macrófagos, del sustrato por donde migran o de ambas poblaciones celulares. A continuación se exponen los experimentos que se realizaron para distinguir entre estas posibilidades.

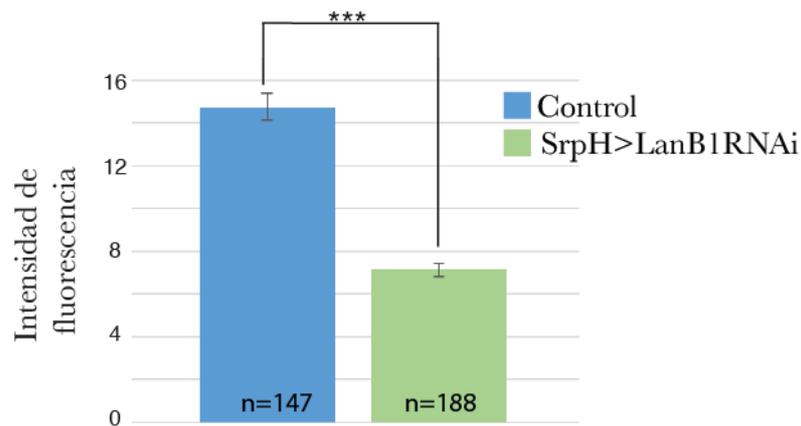
#### **2.2.1. Las lamininas se requieren de manera específica en los macrófagos para su migración.**

Para testar si los macrófagos producen su propia Laminina para migrar, se utilizaron diferentes aproximaciones experimentales: 1) reducir los niveles de lamininas específicamente en macrófagos; 2) reducir los niveles de lamininas de manera independiente en la cuerda nerviosa, y 3) realizar trasplante de macrófagos entre embriones control y mutantes para las lamininas y viceversa.

#### **Expresión de RNAis frente a las lamininas de manera específica en los macrófagos.**

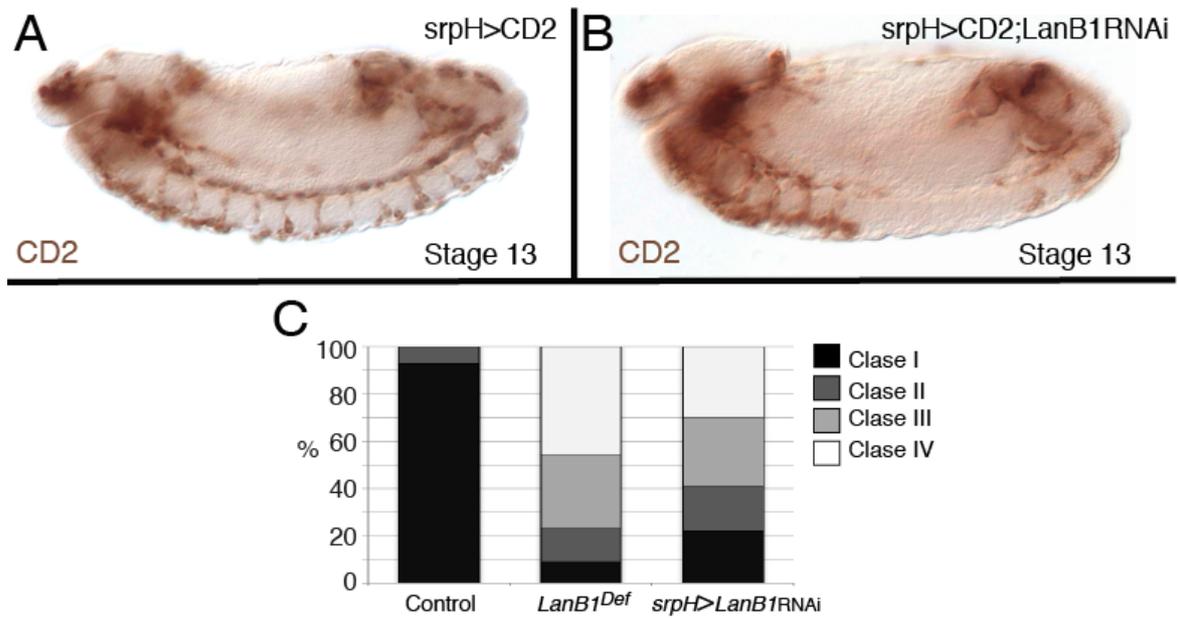
Con la idea de disminuir al máximo los niveles de las lamininas específicamente en los macrófagos, se expresaron en ellos de manera simultánea RNAis frente a los genes *LanB1* y *LanB2*, usando el sistema Gal4. Al mismo tiempo, se expresó la proteína Dicer, la cual es un componente de la maquinaria molecular de la interferencia de RNAm cuya expresión potencia la eficiencia de los RNAis (Dietzl et al., 2007). En primer lugar, se testó la eficacia del uso de los RNAis midiendo la cantidad de lamininas que quedaba en los macrófagos tras expresar los RNAis frente a las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , usando el software de tratamiento de imágenes IMARIS, el cual permite delimitar un objeto y medir la cantidad de fluorescencia dentro del mismo. Así, se cuantificaron los niveles de

fluorescencia en los macrófagos de embriones procedentes del cruce de moscas “UAS-Dicer; UAS-LanB1RNAi; UAS-LanB2RNAi” con moscas “UAS-Dicer;SrpG4-UAS-CherryMoe; LanB1GFP” y como control se usaron los embriones del cruce UAS-Dicer;” con “UAS-Dicer;;SrpG4-UAS-CherryMoe; LanB1GFP”. Los resultados muestran que hay una disminución del 50% en la cantidad de lamininas que hay en los macrófagos de embriones experimentales comparados con el control (Fig. 29).



**Fig. 36.** Cuantificación de los niveles de fluorescencia correspondiente a LanB1GFP en embriones control y embriones que expresan RNAs frente a las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  en los macrófagos.

Para analizar la migración de los macrófagos, las moscas “UAS-Dicer; UAS-LanB1RNAi; UAS-LanB2RNAi” se cruzaron con moscas “UAS-Dicer;;SrpG4-UAS-CD2”. La proteína CD2 es una proteína heteróloga de membrana que permite distinguir la morfología de los macrófagos. Se observó que la disminución de los niveles de lamininas en los macrófagos producía fallos en su migración a lo largo de la cuerda nerviosa en un 78% de los embriones analizados (Fig. 37 A y B). A continuación se cuantificó este fenotipo usando las 4 clases fenotípicas definidas anteriormente. El resultado mostró que si bien un 30% de los embriones pertenecían a la Clase IV, un 29% correspondía a la Clase III, mientras que el 19% y el 22%, pertenecían a las Clase II y I, respectivamente (Fig. 37 C). Cabe destacar que esta situación es bastante similar al caso de embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup>, los que apoya la hipótesis de que los macrófagos necesitan producir su propia Laminina para migrar.

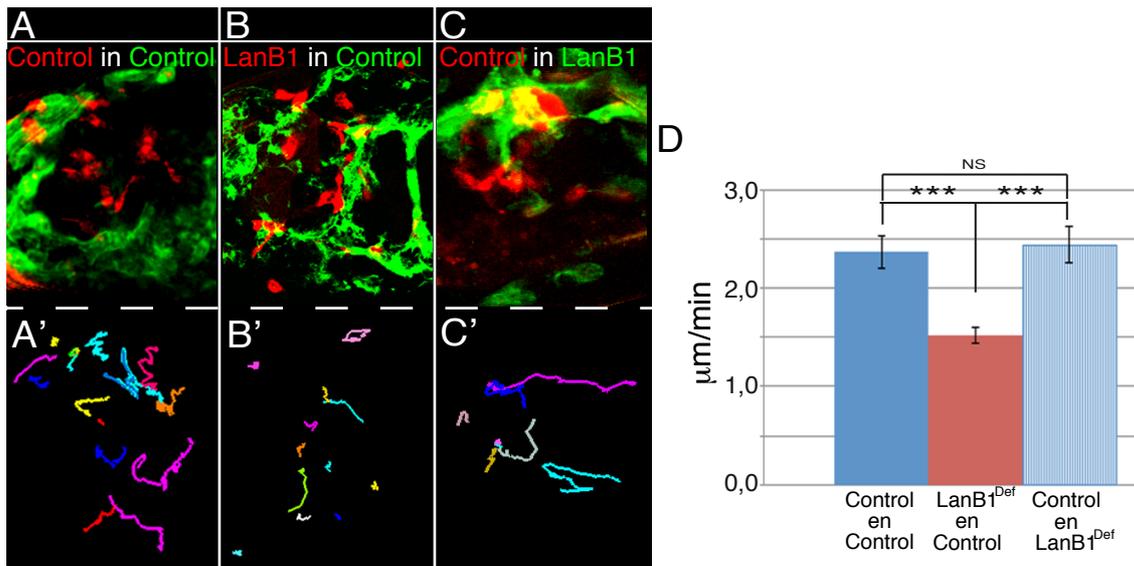


**Fig. 37.** Visión lateral de embriones de estadio 13, (A) control y (B) que expresan RNAs contra las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  en macrófagos. (C) Clasificación por clases de los fenotipos encontrados en embriones control, *LanB1<sup>Def</sup>* y con expresión en los macrófagos de RNAs contra las lamininas. Control (n=75), *LanB1<sup>Def</sup>* (n=96) y *SrpH>LanB1RNAi* (n=108).

### Trasplante de macrófagos.

La segunda estrategia para tratar de confirmar si la hipótesis de que los macrófagos necesitan producir su propia Laminina para migrar era cierta o no, fue trasplantar macrófagos de embriones control en embriones mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* y viceversa. Si la hipótesis era correcta cabría esperar que macrófagos de embriones mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* trasplantados en embriones control no migrasen adecuadamente, mientras que macrófagos de embriones silvestres trasplantados en embriones mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* migrasen de manera similar al silvestre. Este experimento se realizó con embriones, tanto donadores como receptores, de estadios 9-10. Se trasplantaron células de la zona del mesodermo pro-encefálico, zona rica en macrófagos donde comienzan su diferenciación. Las células a trasplantar se inyectaron en el extremo anterior del embrión receptor en la parte ventral y siempre bajo las mismas condiciones. Tras el trasplante, se tomaron imágenes in vivo del embrión. En un primer intento se observó que los macrófagos trasplantados se quedaban cerca de la herida producida en el trasplante y no se movían, lo que impedía analizar si los macrófagos necesitan producir su propia Laminina para migrar. De hecho, se ha descrito que los macrófagos cercanos a las heridas acuden a ellas

atraídos por radicales libres liberados al producirse la misma, parando su migración hasta que la herida está cerrada (Stramer et al., 2005), por lo que este comportamiento no era de extrañar. Así, en la zona de la herida se observaron tanto macrófagos trasplantados como los propios del embrión huésped. Se decidió entonces dejar que la herida se cerrase, lo que ocurrió aproximadamente en 3 horas. Tras este tiempo, se observó que los macrófagos trasplantados se movían hacia el interior del embrión y así se pudo analizar su comportamiento migratorio. Con este método, se trasplantaron macrófagos de embriones control “w;;srpG4-U-mCherry” en embriones mutantes “w;LanB1<sup>Def</sup>;Srph.G4-U-GFP” y viceversa. Como control del experimento se trasplantaron macrófagos de embriones control “w;;srpG4-U-mCherry” en embriones control “w;;srpG4-UAS-GFP” (Fig. 38 A, B, C). Se observó que los macrófagos control migraban con una velocidad muy parecida en embriones control y embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup>, mientras que los macrófagos mutantes LanB1<sup>Def</sup> se movían más lentamente en los embriones control. Así, la velocidad media de los macrófagos control era de 2,37  $\mu\text{m}/\text{min}$  en embriones control y de 2,44  $\mu\text{m}/\text{min}$  en embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup>, sin que estas diferencias fuesen estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ) (Fig. 31 E). Mientras que la velocidad de los macrófagos mutantes LanB1<sup>Def</sup> en embriones control era de 1,52  $\mu\text{m}/\text{min}$ , siendo las diferencias entre esta velocidad y las anteriores estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) (Fig. 38 D). En resumen, la velocidad de migración de los macrófagos mutantes en embriones control era un 35% más lenta que la velocidad de los macrófagos control, a pesar de existir niveles normales de Laminina depositada por células de la cuerda nerviosa y por los propios macrófagos del embrión control. Todos estos datos refuerzan la hipótesis de que los macrófagos producen, probablemente de manera local, la Laminina que necesitan para migrar.



**Fig. 38.** (A, B, C). imágenes de los diferentes trasplantes realizados. En verde se observan los macrófagos trasplantados y en rojo los macrófagos hospedadores. (D) Cuantificación de la velocidad de los macrófagos trasplantados.

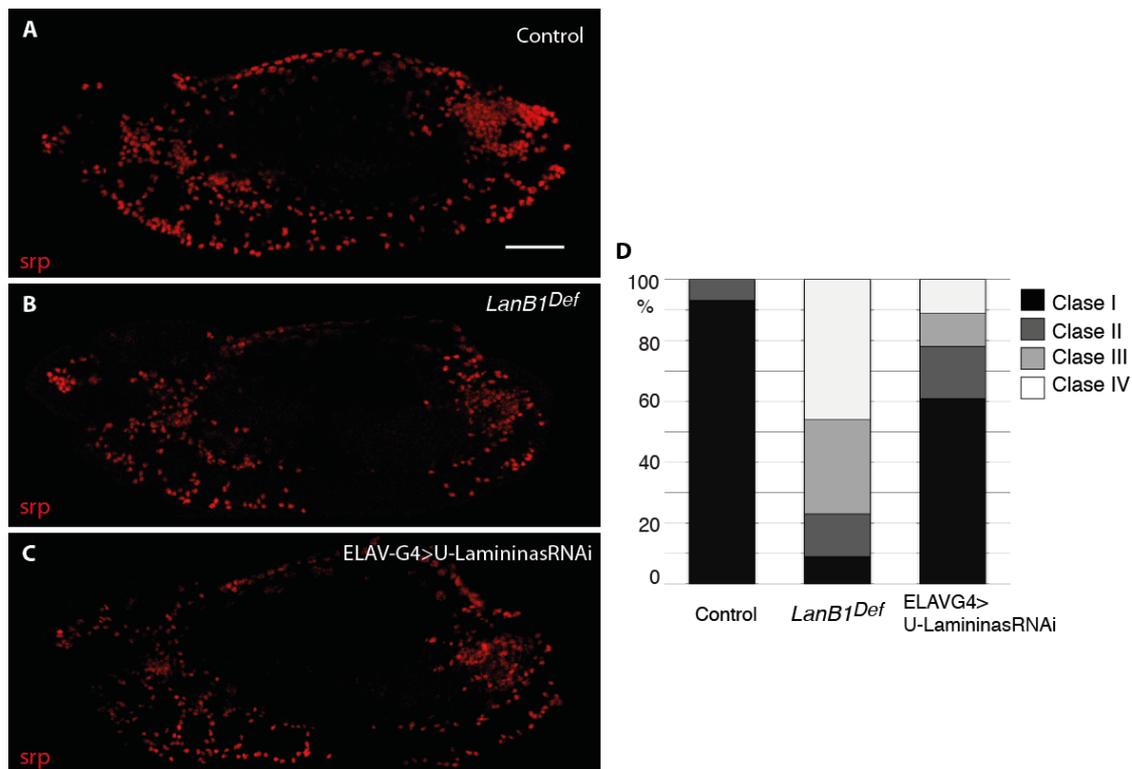
### 2.2.2. Las lamininas se requieren en la cuerda nerviosa para una correcta migración de los macrófagos.

A continuación decidimos testar si la Laminina producida por la cuerda nerviosa era necesaria para la migración de los macrófagos sobre ella. Para ello, analizamos si la reducción de lamininas de forma específica en la cuerda nerviosa, usando RNAis frente a las subunidades de las lamininas, afectaba a la migración de los macrófagos.

#### Expresión en la cuerda nerviosa de RNAis frente a las lamininas.

Para obtener embriones con expresión reducida de las lamininas de manera específica en la cuerda nerviosa, se cruzaron las moscas anteriores “UAS-Dicer; UAS-LanB1RNAi; UAS-LanB2RNAi” con moscas que llevaban la construcción ELAV-Gal4. *Elav* es un gen que se expresa en el sistema nervioso desde estadios tempranos de la embriogénesis y su expresión se mantiene a lo largo de la misma. Para visualizar los macrófagos se usó el anticuerpo *serpent*. Se encontró que si bien la reducción de lamininas en la cuerda nerviosa producía un retraso en la migración de los macrófagos (Fig. 39 C), este era bastante menor que el producido cuando se reducen las lamininas en los propios macrófagos. Así, usando las clases fenotípicas anteriormente descritas, se observó que sólo un 11% de los embriones mostraban fenotipos de las clases IV y III, siendo la Clase I la mayoritaria,

presentándose en un 61% de embriones seguida de la Clase II con un 17% de embriones (Fig. 39 D). Este resultado sugiere que para migrar los macrófagos también requieren de las lamininas producidas por la cuerda nerviosa, si bien el requerimiento de aquella producida por los propios macrófagos es mucho mayor.



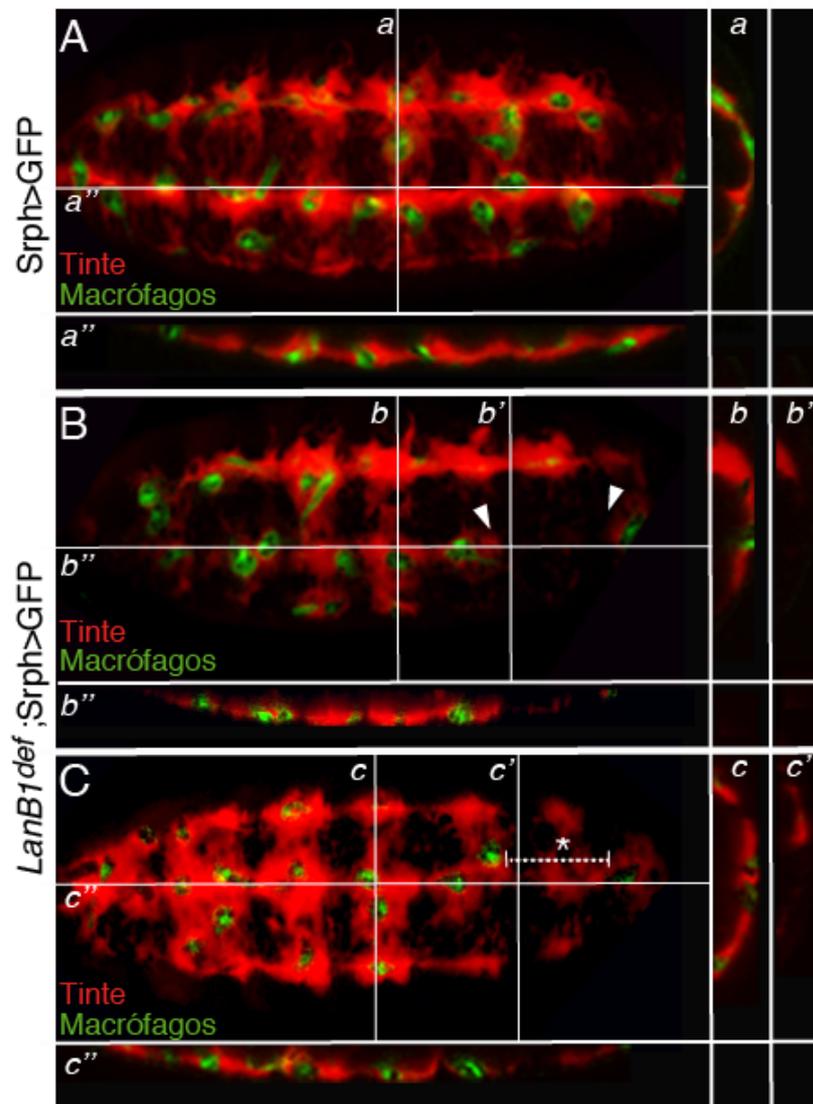
**Fig. 39.** (A,B,C) Visión lateral de (A) embrión control, (B) embrión mutante *LanB1<sup>Def</sup>* y (C) embrión ELAVG4>U-LamininasRNAi de estadios 13. (D) Clasificación de los embriones según su fenotipo de migración en macrófagos. Control (n=73), *LanB1<sup>Def</sup>* (n=96) y ELAVG4>U-LamininasRNAi (n=46).

### **Función de las lamininas en la formación de la cuerda nerviosa.**

Se conoce que existe una interdependencia entre la migración de los macrófagos y el correcto desarrollo de la cuerda nerviosa. Así se sabe que una incorrecta formación de la cuerda nerviosa provoca un fallo en la migración de macrófagos y viceversa (Evans et al., 2010; Olofsson y Page, 2005). Por ello, la función de las lamininas en la cuerda nerviosa podría ser la correcta formación de la misma. De hecho, en colaboración con el Prof. W. Wood, hemos mostrado recientemente que las integrinas, principales receptores de las lamininas, se necesitan en la cuerda nerviosa para la correcta formación del espacio intersticial que existe entre la cuerda nerviosa y el ectodermo, espacio usado por los

## Resultados I

macrófagos para migrar (Comber et al., 2013). Por ello se decidió estudiar si este espacio estaba bien formado en embriones mutantes  $LanB1^{Def}$ . Para ello, se inyectó un tinte rojo en los extremos anteriores y posteriores en embriones de estadio 15 control ( $w;Srph.G4-U-GFP$ ) y mutantes ( $w;LanB1^{Def};Srph.G4-U-GFP$ ). Si el espacio intersticial entre la cuerda nerviosa y el ectodermo está bien formado, el tinte difunde libremente por el embrión inundando dicho espacio, lo que ocurrió en embriones controles (Fig. 40 A) (Evans et al., 2010). Si por el contrario, la cuerda nerviosa no se separa bien del ectodermo, el tinte queda atrapado y no difunde bien a lo largo del eje antero-posterior del embrión. Este fue el caso de los embriones  $LanB1^{Def}$ , donde se pudieron observar zonas desprovistas de tinte (Fig. 40B). Aquí cabe destacar que si bien en los embriones controles tanto el tinte como los macrófagos se encontraron repartidos a todo lo largo de la cuerda nerviosa, en el caso de los mutantes se observaron embriones que presentan zonas sin tinte y sin macrófagos (Fig. 40 B). Estos resultados sugieren un nuevo papel para las lamininas durante la migración de los macrófagos, la correcta formación del espacio intersticial entre sistema nervioso y ectodermo. Interesantemente, también se observaron embriones mutantes en los que había zonas con tinte pero sin macrófagos (Fig. 40 C), lo que refuerza la hipótesis de que las lamininas son necesarias en los macrófagos para su correcta migración.

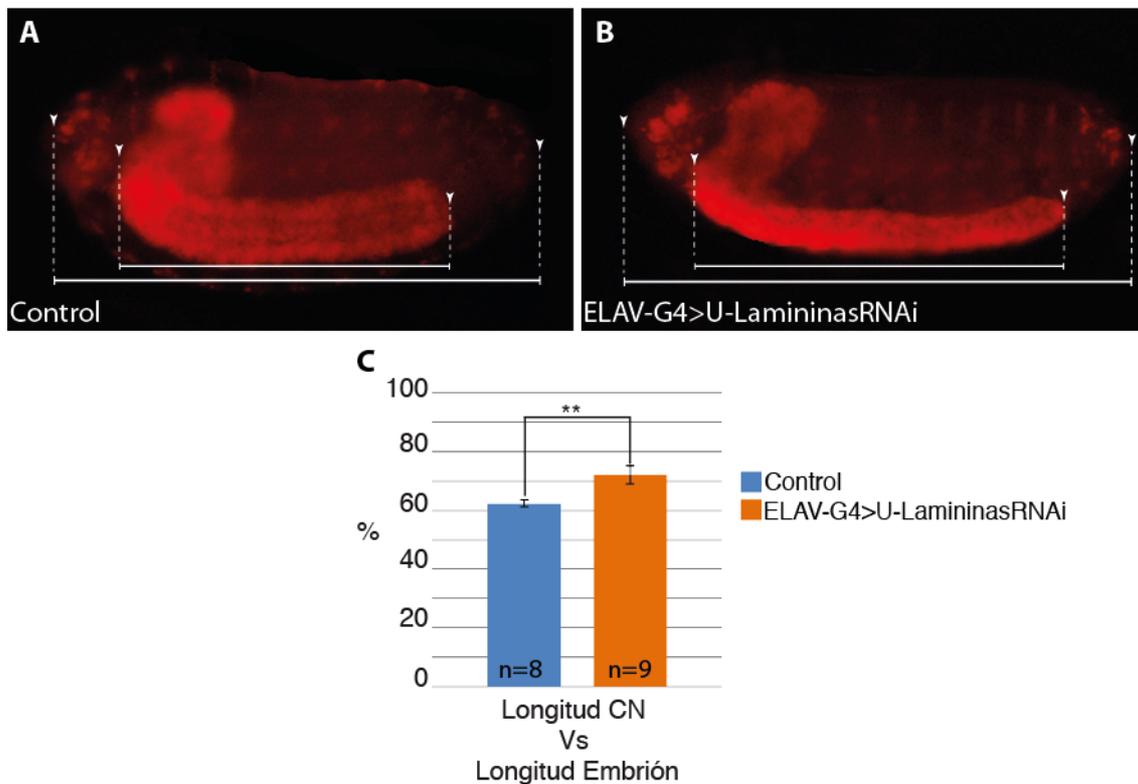


**Fig. 40.** Visión ventral de embriones control (A) y mutantes  $LanB1^{Def}$  (B,C) de estadio 15 mostrando los macrófagos en verde y el tinte inyectado en rojo.

Finalmente, se sabe que la MEC se requiere para la morfogénesis de la cuerda nerviosa, ya que en embriones mutantes para componentes de la MEC, la cuerda nerviosa no se condensa totalmente, como es el caso de mutantes de Colágeno tipo IV (Martinek et al., 2008) o en mutantes  $LanB1^{Def}$  (Urbano et al., 2009). Sin embargo, aún se desconoce que tejido produce las proteínas de la MEC necesarias para una correcta condensación de la cuerda nerviosa, si los macrófagos, las células del sistema nervioso o ambas poblaciones celulares. Por todo ello se decidió analizar si los embriones que expresan los RNAsi contra las lamininas en la cuerda nerviosa presentaban algún fallo de

## Resultados I

condensación de la cuerda nerviosa. Para ello se calculó el ratio entre la longitud del embrión y la de la cuerda nerviosa en embriones de estadio 16, controles y embriones con expresión reducida de lamininas bien en la cuerda nerviosa (Fig. 41). Se observó, que este ratio era de un 62% en embriones control y de un 72% en embriones con bajo niveles de lamininas en los macrófagos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Todo esto parece indicar que la cuerda nerviosa también necesita producir sus propias lamininas para su correcta formación, independientemente de las lamininas que le aportan los macrófagos durante su migración. En el futuro será interesante analizar si las lamininas producidas por los macrófagos también se requieren para una condensación correcta de la cuerda ventral.

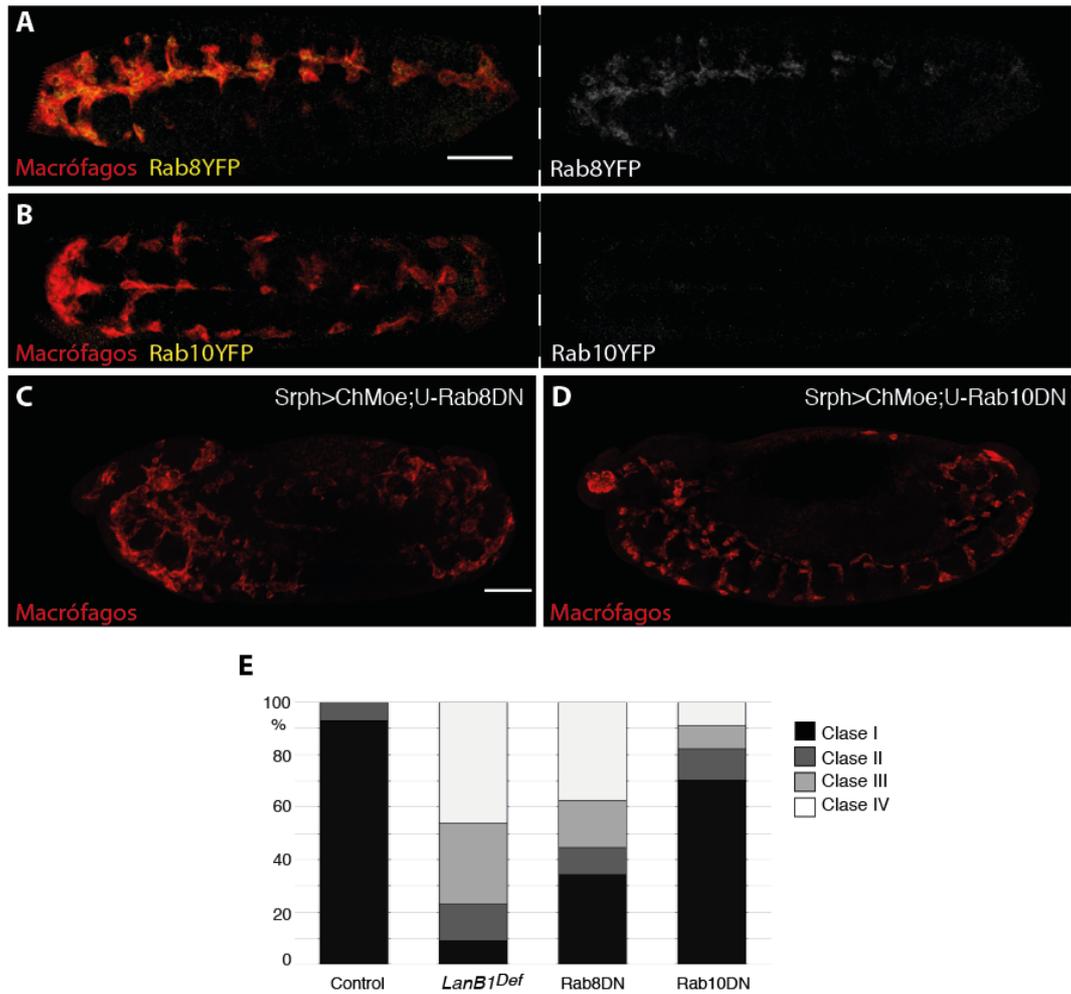


**Fig. 41.** Visión lateral de embriones control (A) y ELAVG4>LamininasRNAi (B) de estadio 16. Se visualiza la cuerda nerviosa con anti-Elav (rojo). (C) Ratio entre la longitud del embrión y la de la cuerda nerviosa.

En resumen, estos resultados refuerzan la hipótesis de que los macrófagos necesitan producir su propia Laminina para migrar, pero además sugieren que el sistema nervioso necesita también producir su propia Laminina para su correcto desarrollo.

### **3. Estudio de los mecanismos moleculares que regulan la secreción de las lamininas durante la migración de macrófagos.**

Tras confirmar el requerimiento que tienen los macrófagos de producir sus propias lamininas para migrar correctamente, se planteó investigar los mecanismos moleculares que regulasen dicha secreción. La secreción de proteínas, como se ha dicho en la introducción, se lleva a cabo mediante vesículas que las vierten al medio extracelular. Esas vesículas celulares, junto a todo el tráfico de vesículas entre diferentes orgánulos celulares, es regulado por diferentes proteínas Rab GTPasas. El transporte de proteínas y membranas se ha implicado en migración celular. De hecho, ya en la década de los 70 se propuso que la endocitosis de membranas en toda la célula, y la exocitosis en el frente celular, generarían un flujo de membranas que dirigirían el movimiento celular (Bretscher, 1976). Por otra parte, diversas RhoGTPasas se han implicado en la secreción de proteínas de la MEC. Así, por ejemplo, se sabe que Rab8 y Rab10, que participan en el tráfico vesicular entre el aparato de Golgi y la membrana celular, regulan la secreción basolateral de componentes de la MEC, como Colágeno IV y Perlecan, en células epiteliales foliculares del ovario de *Drosophila* (Denef et al., 2008; Lerner et al., 2013). Por todo esto, se decidió testar si Rab8 y Rab10 podrían tener algún papel en la secreción de las lamininas durante la migración de los macrófagos. Para ello, se decidió por una parte analizar el patrón de expresión de ambas Rabs en el embrión y por otra testar si la expresión de formas dominante negativas de Rab8 y Rab10 en macrófagos afectaba a su migración. Para analizar si estas proteínas se expresaban en los macrófagos durante su migración, se usaron moscas transgénicas en las cuales por recombinación homóloga se insertó la proteína fluorescente YFP en la región N terminal de los genes Rab8 y Rab10, Rab8<sup>EYFP</sup> y Rab10<sup>EYFP</sup>, respectivamente (Dunst et al., 2015). Para identificar los macrófagos al mismo tiempo que el patrón de expresión de Rab8 y Rab10, se analizaron embriones de los cruces entre moscas “w; Srph.G4-U-CherryMoesin” y moscas “w; TI{TI}Rab8<sup>EYFP</sup>” y “w; ; TI{TI}Rab10<sup>EYFP</sup>”, respectivamente. Se observó que si bien Rab8 se expresaba en los macrófagos durante su migración (Fig. 42, A), Rab10 parecía expresarse principalmente sólo en algunas células del sistema nervioso (Fig. 42, B).

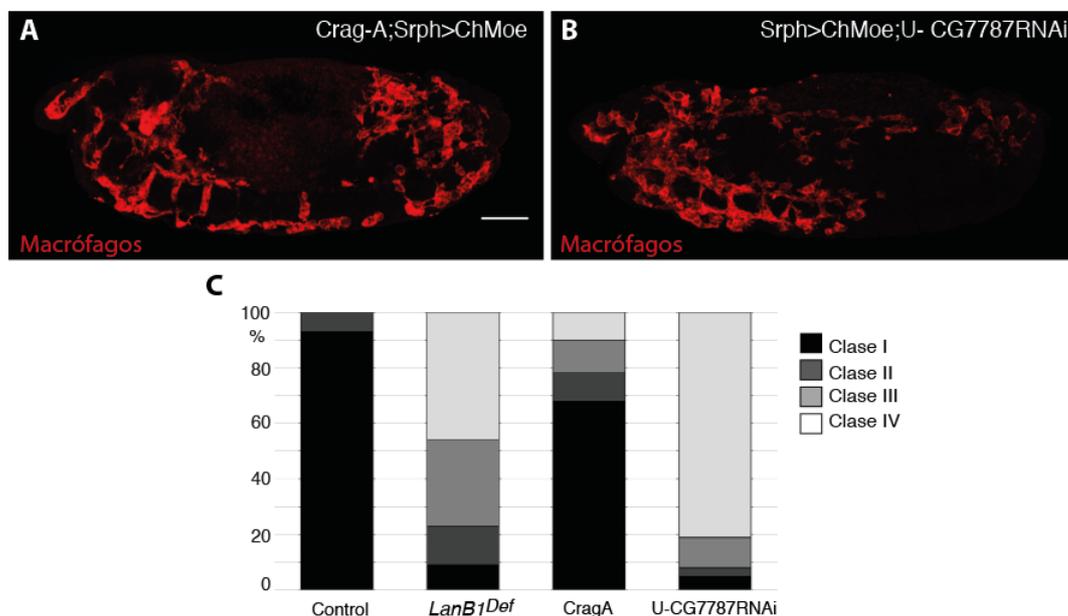


**Fig. 42.** Visión ventral de embriones “w; Srph.G4-U-CherryMoesin;Rab8YFP” (A) y “w; Srph.G4-U-CherryMoesin;Rab10YFP” (B) de estadio 14. Se visualizan los macrófagos en rojo y las proteínas Rab en amarillo. Visión lateral de embriones Srph>U-Rab8<sup>DN</sup> (C) y Srph>U-Rab10<sup>DN</sup> de estadio 13. En rojo se visualizan los macrófagos. (E) Clasificación de los embriones según su fenotipo de migración en macrófagos. Control (n=76), *LanB1<sup>Def</sup>* (n=96), *Rab8<sup>DN</sup>* (n=119) y *Rab10<sup>DN</sup>* (n=68).

Para testar si la expresión en macrófagos de las formas dominantes negativas producía algún fallo en su migración, se cruzaron los moscas “w; Srph.G4-U-CherryMoesin” con moscas y “w; UASp-Rab8<sup>DN</sup>” y “yw; UASp-Rab10<sup>DN</sup>”, respectivamente (Fig. 42 C y D). El fenotipo de migración de macrófagos se analizó usando la clasificación de las cuatro clases de fenotipos descrita anteriormente. El resultado mostró que en el caso de *Rab10<sup>DN</sup>* la mayoría de los embriones, un 71%, caían en la Clase I, es decir, sin fallo en la migración. La distribución de las otras clases era la siguiente: un 12% para la Clase II, un 9% para la Clase III y sólo un 8% para la Clase IV. En contra, un 37% de los embriones que expresaban *Rab8<sup>DN</sup>* en sus macrófagos presentaban un fenotipo de Clase IV,

mientras que el 19% y 10% mostraban un fenotipo de las clases III y II, respectivamente, y sólo un 34% no mostraban fenotipo (Fig. 42, E). Estos resultados que estas Rab GTPasas se necesitan para una correcta migración de los macrófagos, siendo Rab8 necesitado en mayor medida que Rab10.

Se sabe que la actividad de estas RhoGTPasas está regulada por GEFS. Es más trabajos preliminares han demostrado que Crag es un activador de Rab10 en el epitelio folicular del ovario de *Drosophila* (Lerner et al., 2013). Así pues se decidió testar si Crag se requería para la migración de los macrófagos. Se han identificado mutantes nulos en Crag, Crag<sup>A</sup> (Xiong et al., 2012). Para analizar la migración de los macrófagos en embriones mutantes Crag se observó que un 68% de embriones mutantes pertenecían a la Clase I, o sea no presentaban fallos en la migración (Fig. 43). Las clases II, III y IV estaban representadas más o menos por igual, con un 10% de embriones presentando fenotipos correspondientes a estas clases (Fig. 43).

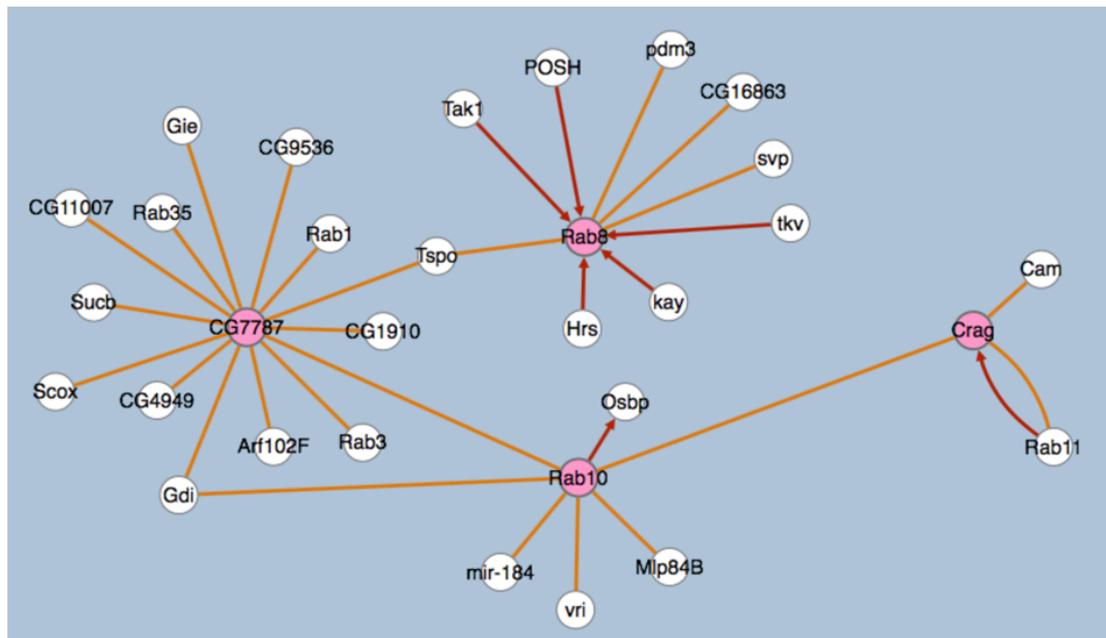


**Fig. 43.** Visión lateral de embriones “Crag-A; Srph.G4-U-CherryMoesin” (A) y “w; Srph.G4-U-CherryMoesin;U-CGrr87RNAi” (B) de estadio 13. Se visualizan los macrófagos en rojo. (C) Clasificación de los embriones según su fenotipo de migración en macrófagos. Control (n=76), LanB1<sup>Def</sup>(n=96), CragA (n=50) y U-CG7787RNAi (n=63).

## Resultados I

Cabe destacar que el fenotipo de migración de macrófagos de embriones mutantes *Crag* es muy similar al observado en embriones que expresan *Rab10<sup>DN</sup>* en los macrófagos, el cual presentaba un 71% de embriones Clase I. Estos resultados sugieren que en el caso de macrófagos *Crag* probablemente también actúe como el GEF que regula a *Rab10*.

Ya que el fenotipo debido a la expresión de *Rab8<sup>DN</sup>* en macrófagos es más fuerte que el de mutantes en *Crag*, se decidió buscar si existían otros posibles GEFs para *Rab8*. Para esta búsqueda se utilizó una web especializada en vincular genes a través de bases de datos, de este modo, la web [www.esyn.org](http://www.esyn.org), fruto del trabajo de Bean et al., 2014. Así, se encontró que un gen, *CG7787*, que interaccionaban simultáneamente con *Rab8* y *Rab10* (Fig. 44).



**Fig. 44.** Genes que interaccionan genética y/o bioquímicamente con *Rab8* y *Rab10* en *Drosophila*.

Interesantemente, se ha descrito que el gen *CG7787* transcribe un GEF y se le ha vinculado con *Rab8* (Le Bras et al., 2012). Así que aparecía como un candidato ideal a regular la actividad de *Rab8*. Aún no existen mutantes para *CG7787* en *Drosophila*, por lo que para testar su posible papel en la migración de los macrófagos, se decidió expresar un RNAi frente a este gen en los mismos. De este modo, se analizaron los embriones resultantes del siguiente cruce, moscas “y v ;;UAS-*CG7787*RNAi” por moscas “w;

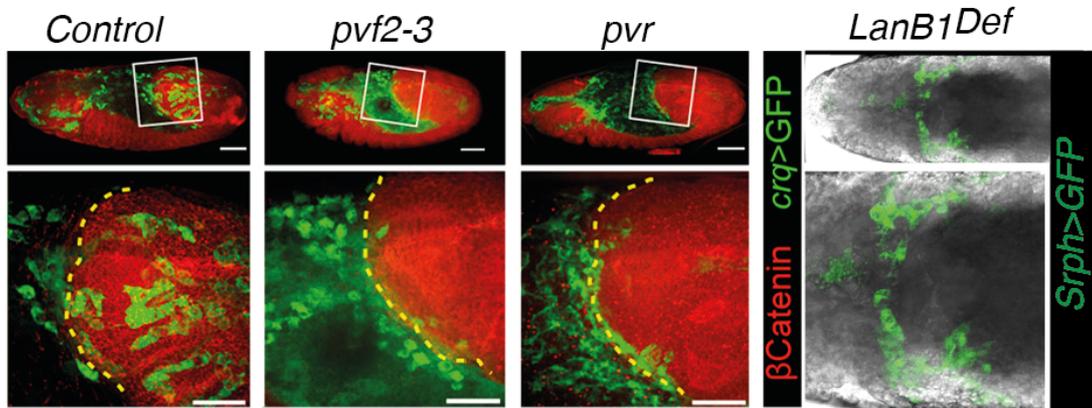
Srph.G4-U\_CherryMoesin” (Fig. 36). Se observó que los macrófagos no migraban correctamente y se cuantificaron los defectos en migración. El resultado fue que un 81% de los embriones pertenecían a la Clase IV, un 11% a la Clase III, un 3% a la Clase II y un 5% a la Clase I (Fig. 43 B, C). Este resultado sugiere que CG7787 juega un papel muy importante en la migración de macrófagos. El hecho de que el requerimiento del GEF CG7787 en la migración de los macrófagos sea mayor que el del GEF Crag se podría explicar por los datos de interacción genética y bioquímica que predicen una interacción de CG7787 con los ambos Rabs, 8 y 10.

#### **4. Mecanismos moleculares a través de los cuales las lamininas regulan la migración de los macrófagos.**

Tras el análisis del papel de las lamininas durante la migración de macrófagos se planteó identificar los mecanismos moleculares por los cuales las lamininas podrían ejercer su función. Como se ha mencionado en la introducción, se conoce que la migración de macrófagos está regulado por una vía llamada PVF/PVR. Las proteínas PVF actúan como señales de guía y de supervivencia y se expresan a lo largo del embrión, marcando la ruta de migración de los macrófagos (Cho et al., 2002; Wood et al., 2006). Los macrófagos a su vez expresan los PVR, receptores de los factores PVF, a través de los cuales leen las señales enviadas por los PVF (Heino et al., 2001). Esta vía de señalización PVF/PVR está conservada a lo largo de la evolución, correspondiendo en mamíferos a la familia de los factores de crecimiento PDGF y sus receptores PDGFR (Andrae et al., 2008; Traver y Zon, 2002). Los receptores PVR tienen actividad tirosina quinasa y se sabe que la activación del receptor PVR en macrófagos regula diferentes moléculas implicadas en la organización del citoesqueleto, como puede ser la molécula ERK, incremento los niveles de fosforilación de la misma (Cho et al., 2002). Esta vía se requiere entre otras para regular el citoesqueleto de actina, lo que a su vez controla el movimiento celular (Huang et al., 2004). Cabe destacar que también se conoce que los mutantes para estas proteínas, tanto PVF como PVR, producen fenotipos en la migración de macrófagos similares a los aquí descritos para mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* (Fig. 45) (Brückner et al., 2004; Parsons y Foley, 2013; Wood et al., 2006). Finalmente, se ha demostrado que las lamininas, y sus receptores las integrinas, controlan la migración de los axones en *Mus*

## Resultados I

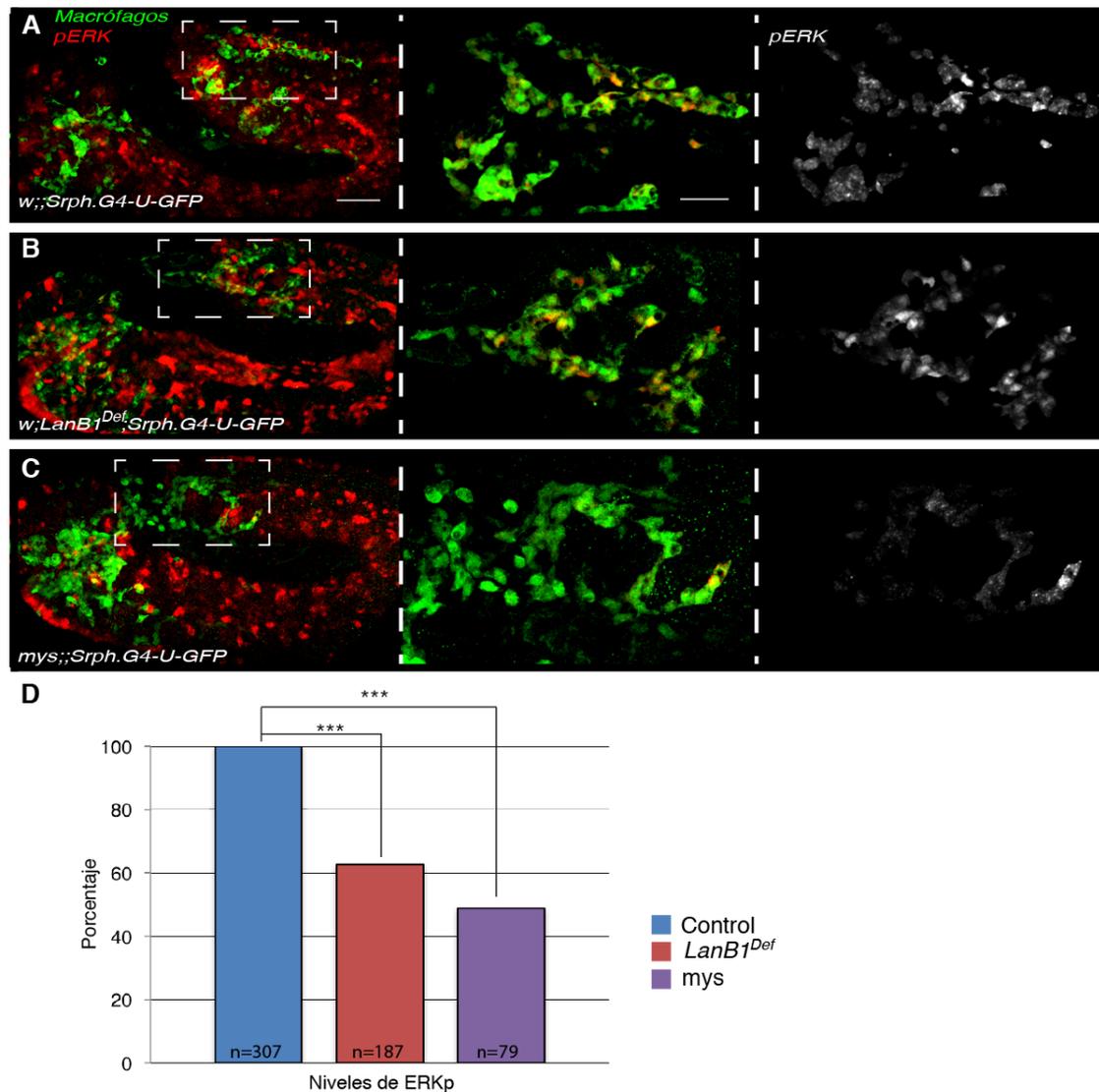
*musculus*, mediante la regulación de la actividad de los receptores tirosina quinasa implicados en la misma (McKerracher et al., 1996).



**Fig. 45.** Modificado de (Parsons y Foley, 2013).

Por estos motivos, se decidió estudiar si las lamininas podrían actuar regulando la vía de señalización PVF/PVR. Para ello, se decidió comparar los niveles de fosforilación de ERK en macrófagos de embriones mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* respecto a los de embriones control, utilizando un anticuerpo frente a la forma fosforilada de ERK. Se usaron embriones de estadio 11 y se analizaron los macrófagos que están entrando a la cola rodeando el intestino posterior (Fig. 46 A, B). El resultado mostró que los macrófagos mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* presentan una reducción del 40% en los niveles de ERK fosforilado respecto al control (Fig. 46 D). Este resultado sugiere que las lamininas se podrían requerir para una correcta señalización de la vía PVF/PVR.

La siguiente pregunta que se planteó fue, ¿A qué nivel podrían las lamininas regular la vía PVF/PVR?. Una posibilidad era que las lamininas regulasen la activación de la vía PVF/PVR a través de las integrinas, las cuales son sus principales receptores (Fessler y Fessler, 1989). Estudios en el laboratorio ya han mostrado que las integrinas tienen un papel fundamental en la migración de hemocitos (Comber et al., 2013). Además, existen evidencias que sugieren que las vías de señalización de factores de crecimiento y de supervivencia actúa conjuntamente con las integrinas para regular diversos procesos biológicos como diferenciación, proliferación y migración celular (Comoglio et al., 2003).

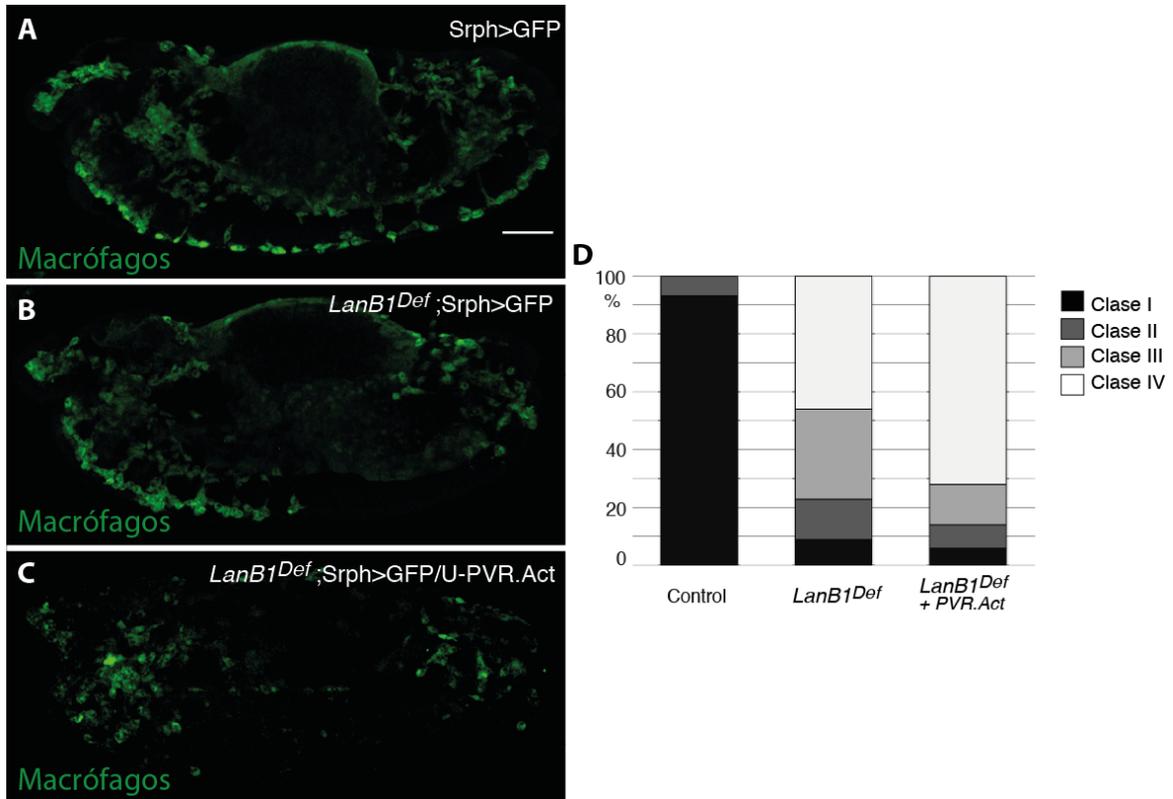


**Fig. 46.** Visión lateral de embriones control (A), mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* (B) y mutantes *mys* (C) de estadio 10. Se visualizan los macrófagos en verde y la proteína ERKp en rojo. (D) niveles de la proteína ERK activada en los diferentes genotipos.

Por estos motivos, se decidió analizar los niveles de ERK fosforilado en macrófagos de embriones mutantes para integrinas. Cabe recordar que, como se ha mencionado en la introducción, las integrinas son heterodímeros formados por una subunidad  $\beta$  y una  $\alpha$ , y que *Drosophila* codifica dos tipos diferentes de  $\beta$  ( $\beta$ PS y  $\beta$ v) y cinco tipos diferentes de  $\alpha$  ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 5) (Bökel y Brown, 2002). Para este estudio se usaron mutantes para el gen *mysospheroid* (*mys*), el cual codifica la subunidad  $\beta$ PS, y que presentan defectos en la migración de los macrófagos (Comber et al., 2013). Los resultados muestran que los niveles de ERK fosforilado son un 50% más bajos en los macrófagos de embriones

## Resultados I

mutantes *mys* respecto a macrófagos de embriones control (Fig. 46 C, D). Por lo tanto estos resultados sugieren que las lamininas podrían estar regulando la actividad de la vía PVF/PVR a través de las integrinas.



**Fig. 47.** Visión lateral de embriones control (A) y mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* (B) y mutantes *LanB1<sup>Def</sup>;Srp>GFP/U-PVR.Act* (C). Se visualizan los macrófagos en verde. (D) Clasificación de los embriones según su fenotipo de migración en macrófagos. Control (n=76), *LanB1<sup>Def</sup>* (n=96) y *LanB1<sup>Def</sup>+PVR.Act* (n=72).

Finalmente, para tratar de reforzar la hipótesis de que las lamininas regulan los niveles de ERK a través de Pvf/Pvr, se ideó un experimento de rescate. Este experimento consistía en expresar en macrófagos de embriones mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* una forma activa de PVR, tratando de incrementar los niveles de ERK activo y así tratar de rescatar la migración de macrófagos. El resultado fue negativo, es más, se observó que la expresión de la forma activada de PVR en los macrófagos de embriones mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* agravaba el fenotipo de migración (Fig. 47). El fenotipo se clasificó en función de las cuatro clases descritas en esta tesis doctoral y el resultado fue que la Clase mayoritaria era la Clase IV, con un 72% de embriones presentando este fenotipo. Así mismo, un 14% de

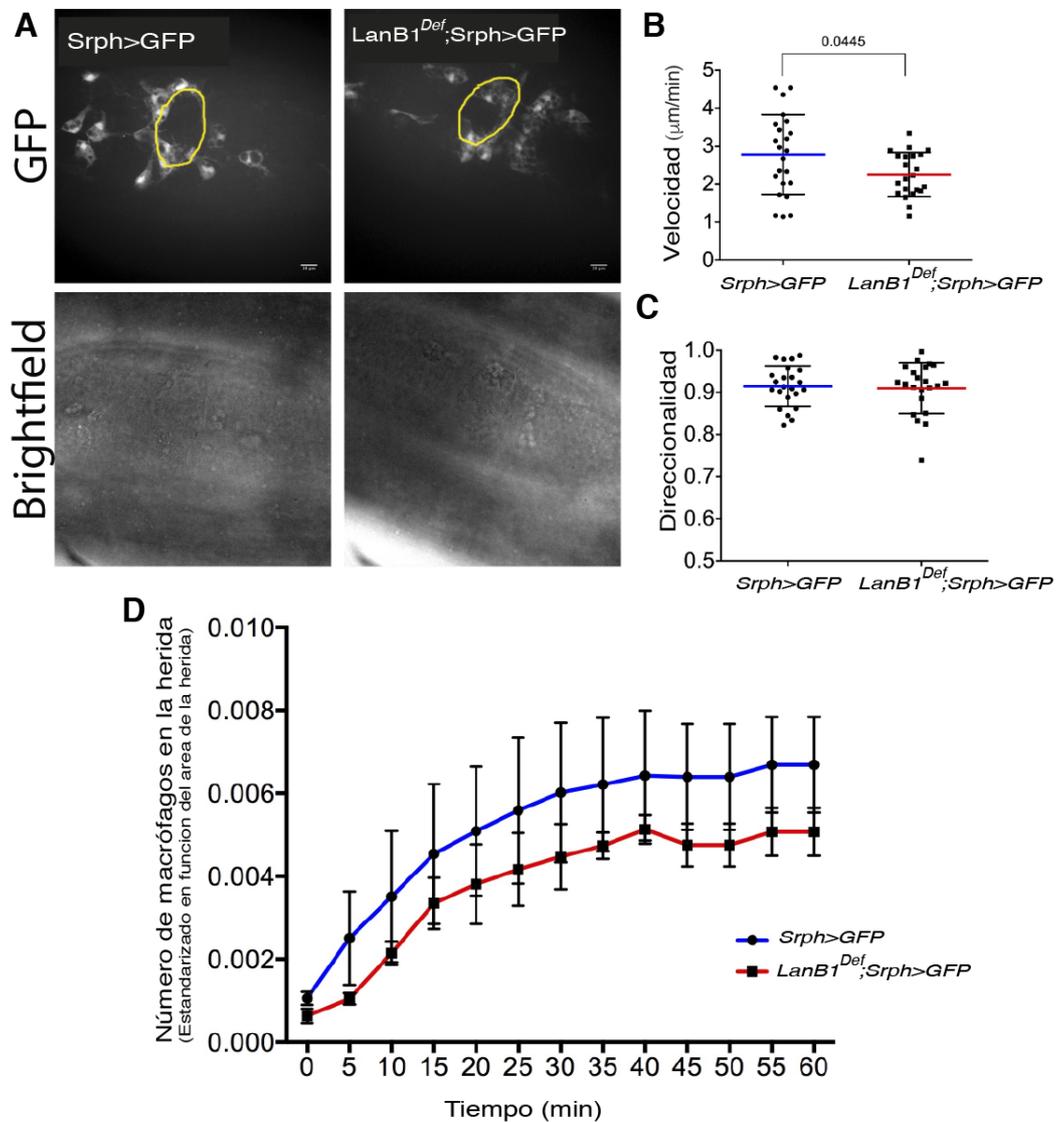
los embriones presentaban un fenotipo de Clase III, y un 6% y un 8% de Clases II y I, respectivamente (Fig. 47). Ya en otros casos se ha visto que la expresión de formas activadas de PVR bloquea la migración celular. Este es el caso de las células del borde del ovario de *Drosophila*, donde se vio que la expresión de una forma activa de PVR bloqueaba totalmente su migración y causaba un exceso de acumulación de filamentos de actina y cambios en la forma de las células (Duchek et al., 2001).

## **5. Papel de las lamininas en la migración de los macrófagos hacia las heridas.**

Como se ha mencionado anteriormente, los macrófagos son la primera línea de defensa de los embriones de *Drosophila*, y como tales, se conoce que cuando se produce una herida en el embrión, estos abandonan sus rutas de migración normales (dependiente de PVF/PVR), y acuden a la herida, permaneciendo en las cercanías de la misma hasta que esta está cerrada (Stramer et al., 2005). Esta vía de migración, como se ha mencionado en la introducción, es independiente de la vía de señalización PVF/PVR y está regulada por el receptor GPCR (G-protein coupled receptor), el cual actúa por medio de PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) (Stramer et al., 2005; Wood et al., 2006). Así mismo, estudios realizados recientemente en el laboratorio, en colaboración con el laboratorio del Profesor. W. Wood, demostraron que las integrinas se requerían para la migración de los macrófagos hacia las heridas (Comber et al., 2013). Por lo tanto, sabiendo que las integrinas son los principales receptores de las lamininas, se decidió analizar si las lamininas podrían tener un papel durante este tipo de migración. Este experimento se realizó en colaboración con Kate Comber, del laboratorio del Dr. W. Wood (Bristol). Se practicaron heridas de 40 micras de diámetro en la epidermis anterior de la parte ventral de embriones control “w;;Srph.G4-U-GFP” y embriones mutantes “w;LanB1<sup>Def</sup>;Srph.G4-U-GFP” con un láser (Ver materiales y métodos). Se analizó in vivo la respuesta migratoria a la inflamación. Se cuantificaron diferentes aspectos de esta respuesta, como la direccionalidad y velocidad de los macrófagos, así como el número de macrófagos que acudían a la herida. Se observó que si bien los macrófagos en embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup> acudían a la herida, su velocidad estaba afectada. Así, los macrófagos de embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup> migraban hacia la herida con una velocidad de 2,2

## Resultados I

$\mu\text{m}/\text{min}$  mientras que los de embriones control lo hacían con una velocidad de  $2,8 \mu\text{m}/\text{min}$ , siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (Fig. 48). En resumen, los macrófagos de embriones mutantes  $\text{LanB1}^{\text{Def}}$  son entorno a un 21% más lentos que los macrófagos de embriones control en acudir a una herida. Por último, el número de macrófagos que acuden a la herida también es menor en embriones mutantes  $\text{LanB1}^{\text{Def}}$  respecto a los control, siendo este dato estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Este experimento sugiere que las lamininas también son necesarias para la correcta migración de los macrófagos hacia las heridas.



**Fig. 48.** Estudio del papel de las lamininas en la migración de macrófagos hacia las heridas.

## **6. Interacción de las lamininas y otros componentes de la ECM en la migración de macrófagos.**

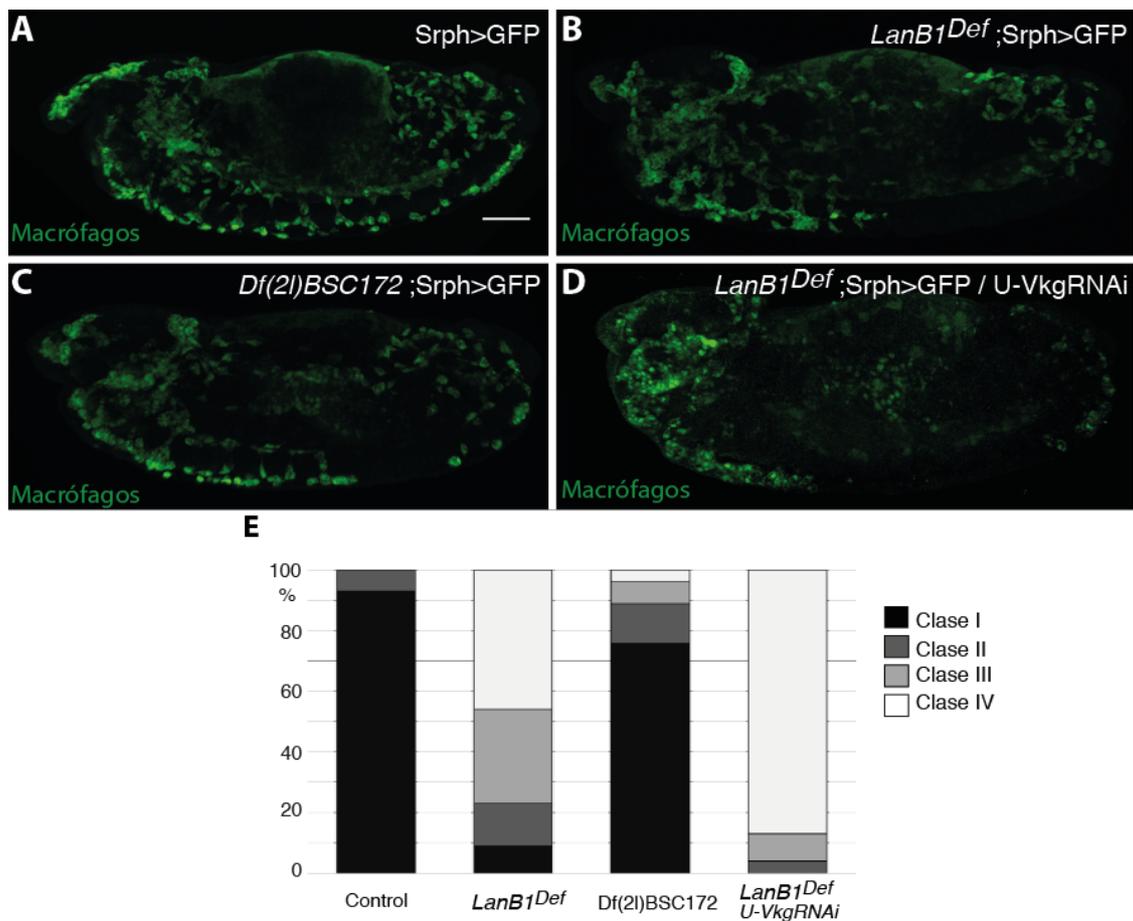
Tras comprobar que las lamininas son necesarias para una correcta migración de los macrófagos, se planteó la idea de que quizás otros componentes de la ECM pudieran también estar implicados en dicha migración. Como se ha mencionado en la introducción, los macrófagos son los principales productores de Colágenos, y lo expresan durante todas las etapas de su migración (Bunt et al., 2010). Por ello, se decidió analizar si los Colágenos se necesitaban para la migración de los macrófagos. Cabe recordar que *Drosophila* posee dos genes que codifican para Colágeno tipo IV, *Colágeno IV* y *viking*. De forma que para estudiar el posible papel del Colágeno IV en la migración de los macrófagos se usaron embriones que contienen una deficiencia que elimina los dos genes, la *Df(2L)BSC172/CyO*. Para poder visualizar los macrófagos en estos embriones mutantes se generaron las siguientes moscas, “w; *Df(2L)BSC172/CyO*; *Srph.G4-U-GFP*”. Se observó que estos embriones mutantes presentaban un fenotipo débil de migración de macrófagos. Así, el 75% de los embriones mutantes presentaban un fenotipo de Clase I, es decir migración normal, mientras que el 13% correspondía a la Clase II, y un 7% y 4% a las clases III y IV, respectivamente (Fig. 49).

Tras este resultado, se planteó la posibilidad de que quizás los macrófagos pudiesen utilizar ambos, lamininas y Colágenos, para migrar a través del embrión y que en cierta manera la falta de uno pudiese ser compensada por la presencia del otro. Para testar esta hipótesis, se decidió analizar la migración de macrófagos en embriones dobles mutantes para las lamininas y para los Colágenos. Para ello, y ya que el gen *LanB1* mapea en el segundo cromosoma al igual que la deficiencia para los Colágenos IV, se decidió utilizar una deficiencia para la subunidad *LanB2*, que se encuentra en el tercer cromosoma, y también se comporta como un nulo para todas las lamininas (Wolfstetter y Holz, 2012). Así, se intentó generar moscas “w; *Df(2L)BSC172/CyO*; *LanB2<sup>def</sup> / TTG*” pero esta combinación no era viable. Este resultado en sí ya refleja una fuerte interacción entre estos dos componentes de la MEC. Para circunvalar este problema, se decidió expresar un RNAi frente a *vkg* en embriones mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* y testar si esto incrementaba el fenotipo de migración observado en embriones mutantes *LanB1<sup>def</sup>*. Para este fin se

## Resultados I

utilizaron moscas del genotipo “w;LanB1<sup>def</sup>/ CTG ; Srph.G4-U-GFP” y se cruzaron con moscas “w;LanB1<sup>def</sup> / Cyo dfYFP ; U-VkgRNAi”. El análisis de la migración de macrófagos en embriones “w; LanB1<sup>Def</sup>; Srph.G4-U-GFP/U-VkgRNAi”, reveló que la reducción de los niveles de *vkg* en macrófagos de embriones que carecen de lamininas aumentaban el fenotipo de migración. Así, se encontró que un 87% de los embriones mostraban un fenotipo de Clase IV, un 9% de Clase III y un 4%, la Clase II, no encontrándose ningún embrión sin fenotipo (Fig. 42).

Este resultado muestra que efectivamente los macrófagos utilizan las lamininas y el Colágeno tipo IV para migrar, siendo el requerimiento de lamininas mayor que el del Colágeno.



**Fig. 49.** Visión lateral de embriones control (A), mutantes LanB1<sup>Def</sup> (B), mutantes Df(2l)BSC271 (C) y mutantes LanB1<sup>Def</sup>;Srp>GFP/U-VkgRNAi (D). Se visualizan los macrófagos en verde. (E) Clasificación de los embriones según su fenotipo de migración en macrófagos. Control (n=76), LanB1<sup>Def</sup> (n=96), Df(2l)BSC271 (n=67) y mutantes LanB1<sup>Def</sup>;Srp>GFP/U-VkgRNAi (n=54).

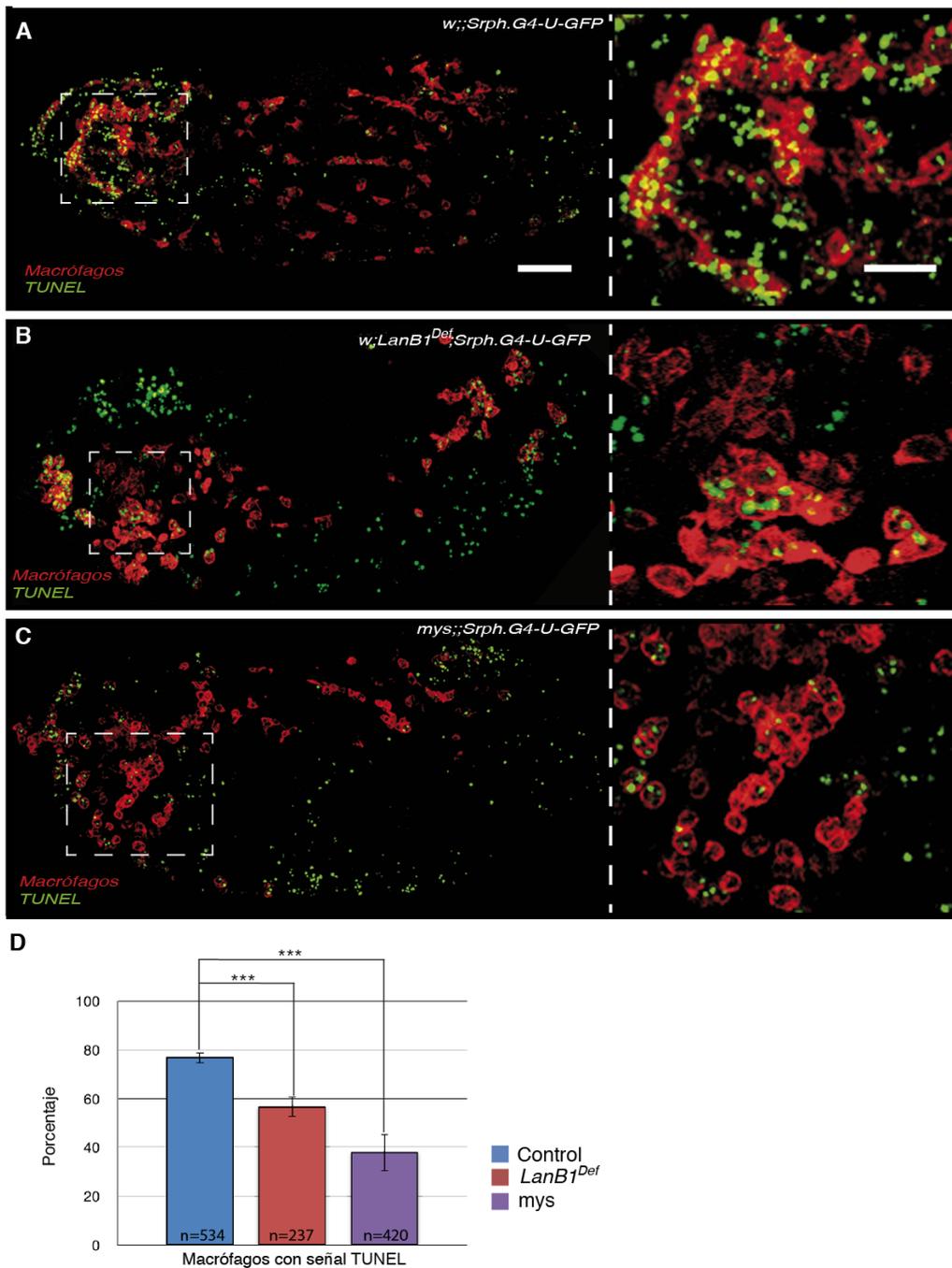
## 7. Estudio de la actividad fagocítica de los macrófagos.

Finalmente, como se ha hablado en la introducción, la fagocitosis es una de las funciones más importante que ejercen los macrófagos. Se conocen aspectos relevantes en cuanto a esta actividad, como que los principales receptores implicados son Croquemort y Draper (Franc, 1999; Franc et al., 1996; Manaka et al., 2004). También se sabe que a través de la fagocitosis ayudan en la correcta formación de órganos, como por ejemplo la cuerda nerviosa (Olofsson y Page, 2005; Page y Olofsson, 2008). Experimentos realizados en cultivo, han demostrado que células con actividad fagocítica, como los leucocitos, sí parecen necesitar de las lamininas para ejercer su actividad fagocítica (revisado en Brown, 1986). Sin embargo, poco se sabe sobre si las lamininas tienen o no un papel en la fagocitosis de macrófagos de *Drosophila*. Para testar esto se usaron embriones “w;;SrpG4-U-CD2” como control y embriones “w;LanB1<sup>Def</sup>;SrpG4-U-CD2” como mutantes de lamininas. Para visualizar los macrófagos se utilizó un anticuerpo frente a CD2 y para visualizar los cuerpos apoptóticos se usó la técnica TUNEL (ver Mat. y Mét.), la cual marca el DNA dañado presente en los cuerpos apoptóticos. Se analizaron embriones de estadio 13, y la actividad apoptótica se cuantificó en los macrófagos presentes en la región alrededor de la cabeza, ya que en este estadio existe una gran número de ellos acumulados en esta zona (Abrams et al., 1993). La capacidad fagocítica se cuantificó calculando el porcentaje de los macrófagos que presentan núcleos apoptóticos en su interior con respecto al total de macrófagos presentes en la zona estudiada. Esta proporción resultó ser en embriones mutantes LanB1<sup>Def</sup> un 26% menor que en embriones control. Este resultado sugiere que las lamininas se requieren para la actividad fagocítica de los macrófagos (Fig. 50).

Tras este análisis, y, como ya se ha dicho anteriormente, sabiendo que las integrinas son los principales receptores de lamininas, y aún más, conociendo que las integrinas tienen un papel en la actividad fagocítica de macrófagos de *Drosophila* cultivados in vitro (Nagaosa et al., 2011; Nonaka et al., 2013), se decidió estudiar el papel de integrinas en la capacidad fagocítica de macrófagos. En este caso, se usaron embriones “mys;;Srp-G4-U-CD2” como mutantes para integrinas y de nuevo embriones “w;;SrpG4-U-CD2” como control (Fig. 50). El resultado fue que los macrófagos mutantes para integrinas

## Resultados I

presentaban un 51% menos de capacidad fagocítica respecto a los control. Por lo tanto estos resultados nos sugieren que las lamininas junto a las integrinas podrían estar regulando la capacidad fagocítica de los macrófagos durante la embriogénesis, es más quizás las lamininas ejerzan esta función a través de integrinas.



**Fig. 50.** Visión lateral de embriones control (A), mutantes *LanB1<sup>Def</sup>* (B) y mutantes *mys* (C) de estadio 13. Se visualizan los macrófagos en rojo y las células apoptóticas en verde. (D) Porcentajes de actividad fagocítica de los macrófagos en los diferentes genotipos.



# Discusión I



**Papel de las lamininas durante la migración de los macrófagos.**

La migración celular es posiblemente la función más conocida que se le atribuye a la matriz extracelular durante el desarrollo. A menudo, la MEC presente alrededor de las células primordiales de órganos y tejidos funciona como sustrato para la migración. Además, alteraciones reguladas espacio-temporalmente en la composición de la MEC están implicadas en el inicio y direccionalidad de la migración de varias poblaciones celulares, como es el caso de las células de la cresta neural. De esta manera, en la regulación de la migración celular durante del desarrollo, la MEC ha sido clásicamente considerada como una matriz exógena, expuesta a la célula para su migración, sin prestar demasiada atención al posible papel de la matriz endógena, aquella depositada por la propia célula al migrar. Sin embargo, en los últimos años, experimentos realizados en células en cultivo han mostrado que las células pueden producir su propia matriz de manera autocrina para usarla durante su movimiento, como un mecanismo para mejorar la migración direccional. Hasta el momento, se desconoce si las células utilizan este mecanismo para migrar a través del complejo entorno tridimensional de los tejidos embrionarios. En este trabajo, se ha demostrado que los macrófagos de *Drosophila* requieren ambas matrices para migrar a lo largo del embrión, la endógena, producida por ellos de manera autocrina, y la exógena, presente en el medio por el que migran. También se ha demostrado que las lamininas regulan la velocidad y la direccionalidad de la migración de los macrófagos embrionarios. Además, se muestra que las lamininas se requieren para la correcta formación del espacio tridimensional usado por los macrófagos para migrar. Finalmente, los resultados aquí presentados sugieren que las lamininas son mucho más que un simple sustrato usado por los macrófagos al migrar, ya que también regulan la señalización corriente abajo de los factores guía, Pvf.

**Patrones de deposición y/o ensamblaje de las lamininas y migración celular.**

Experimentos en cultivos celulares han mostrado que, a pesar de su estructura relativamente uniforme, las lamininas se depositan en la MEC de células en cultivo siguiendo patrones diferentes en función del tipo celular (Kusuma et al., 2012). Asimismo, se ha propuesto que estas diferencias a la hora de depositarse podrían jugar un papel clave en la especificación de los distintos comportamientos celulares. Los queratinocitos son un

ejemplo interesante de cómo los patrones de deposición de las lamininas afectan a la función de la matriz. Así, se ha descrito en experimentos en cultivo celular, que mientras que los queratinocitos humanos que no migran depositan la Laminina-332 con un patrón en forma de roseta, los queratinocitos que migran activamente la depositan con un patrón en forma de caminos o vías por los cuales se mueven (Hamill et al., 2009; Sehgal et al., 2006). Por otra parte, las células epiteliales del pulmón secretan la Laminina-332 en forma de fibrillas, habiéndose demostrado que este patrón es el más apropiado para transmitir señales mecánicas en este tipo de organización celular (Choi y Jones, 2005).

El análisis *in vivo* de la expresión de las lamininas realizado en este trabajo revela que durante la migración de macrófagos, las lamininas se organizan al menos en dos patrones diferentes. Por un lado, las lamininas parecen estar depositadas en forma de “caminos o vías” alrededor de los macrófagos durante su migración, y por otro lado, en forma de fibrillas sobre la cuerda nerviosa. Aquí nos gustaría proponer que estos patrones distintos en los que las lamininas se ensamblan y/o depositan podrían desempeñar funciones diferentes. De este modo, mientras que la Laminina depositada por los macrófagos podría promover la migración, la Laminina depositada alrededor del sistema nervioso estaría implicada en la adhesión célula-matriz, la cual sería necesaria para la correcta separación entre la cuerda nerviosa y el ectodermo. Esta idea está apoyada por dos resultados. En primer lugar, por estudios previos indicando que son las lamininas producidas por la cuerda nerviosa las necesarias para la correcta separación entre la cuerda nerviosa y el ectodermo, ya que la ausencia de macrófagos no afecta a este proceso (Evans et al., 2010). Y en segundo lugar, por resultados descritos en este trabajo, que demuestran que la reducción de los niveles de Laminina específicamente en los macrófagos afecta a su migración. Sin embargo, en este trabajo también se ha demostrado que la reducción de los niveles de Laminina en la cuerda nerviosa afecta la migración de macrófagos, lo que sugeriría que las lamininas presentes en la cuerda nerviosa podrían desempeñar una doble función, de adhesión, para la separación de la cuerda nerviosa del ectodermo, y de migración. Sin embargo, ya que fallos en la separación entre cuerda nerviosa y el ectodermo afectan a la migración de macrófagos (Evans et al., 2010), es difícil saber qué papel desempeñan las lamininas presentes en la cuerda nerviosa en la migración de los macrófagos, el de crear un espacio tridimensional para que los macrófagos migren o el de

actuar como sustrato de migración o ambos.

Estudios previos realizados en el laboratorio mostraron que las lamininas eran necesarias para la correcta condensación de la cuerda nerviosa a lo largo del eje antero-posterior del embrión (Urbano et al., 2009). La condensación de la cuerda nerviosa se inicia al final de estadio 15 y es en este estadio donde las lamininas se encuentran en la membrana basal que la rodea. Por otro lado, el bloqueo de la migración de macrófagos provoca una reducción de los componentes de la MEC alrededor de la cuerda nerviosa y la inhibición de la condensación de la misma (Olofsson y Page, 2005). Aquí, se ha mostrado que la reducción de los niveles de lamininas específicamente en las células neuronales también provoca un fallo en la condensación de la cuerda nerviosa. Todos estos resultados sugieren que las lamininas producidas y/o depositadas sobre la cuerda nerviosa podrían participar en el proceso de condensación. Aunque el patrón en el cual las lamininas se incorporan en la membrana basal está por determinar, se podría especular con que este patrón podría realizar otra función de las lamininas, la de transmisión de fuerzas de compresión necesarias para la correcta condensación de la cuerda nerviosa. Este se ha visto ser el caso de las lamininas que forman parte de la membrana basal que cubre la cámara huevo de *Drosophila*. En este contexto, se ha mostrado que cámaras huevo que contienen células mutantes para las lamininas no se alargan adecuadamente, proponiéndose que las lamininas se requieren para la transmisión de fuerzas requerida para una correcta elongación de la cámara huevo (Haigo y Bilder, 2011). En el futuro, sería interesante analizar en profundidad en qué medida los diferentes patrones de deposición de las lamininas podrían regular distintos comportamientos celulares, así como estudiar los mecanismos por los cuales se regulan patrones de deposición diferentes.

### **Función de las lamininas endógenas y exógenas en la migración de los macrófagos.**

Ensayos en cultivo con queratinocitos individuales han mostrado que, en ausencia de un gradiente quimiotáctico, los queratinocitos depositan Laminina 5 para promover una migración persistente y lineal (Frank y Carter, 2004). Por otra parte, se ha visto que si bien las lamininas se expresan en los tejidos diana de células metastáticas, en algunos casos

también se expresan en las propias células tumorales, como por ejemplo en gliomas, células de cáncer de mama y melanomas malignos. Esto ha llevado a proponer que ambas lamininas, la exógena y la endógena, podría contribuir a la diseminación de las células tumorales (Chia et al., 2007; Ishikawa et al., 2014; Kawataki et al., 2007; Oikawa et al., 2011). De manera similar, los resultados aquí presentados demuestran que los macrófagos de *Drosophila* usan ambas lamininas, tanto la endógena como la exógena para su migración sobre la cuerda nerviosa. Los experimentos de trasplantes de macrófagos y los que demuestran que el descenso de los niveles de Laminina en macrófagos provoque un fenotipo mayor que cuando se reducen en la cuerda nerviosa, sugieren que las lamininas endógenas podrían jugar un papel más importante en la migración de macrófagos que las exógenas.

El hecho de que las lamininas regulan la velocidad de los macrófagos, así como la estabilidad y direccionalidad de los lamelipodios, sugieren que la producción de una matriz autocrina podría ser una forma a través de la cual las células podrían responder mejor a los estímulos quimiotácticos y migrar más rápidamente. De hecho, experimentos de células en cultivo han mostrado que células del fibrosarcoma HT1080 endocitan la proteína fibronectina del medio y la vuelven a secretar por medio de endosomas/lisosomas tardíos, con el fin de promover una matriz autocrina que mejora la migración direccional (Sung et al., 2011). Una concentración local elevada de moléculas de MEC, controlada por secreción vesicular, podría facilitar la agrupación de integrinas y por lo tanto su activación favoreciendo así la migración. Por otra parte, se sabe que algunos de los componentes de la MEC presentan sitios de unión a factores de crecimiento (Kim et al., 2011). Por esto, niveles elevados de moléculas de la MEC de manera local podrían también resultar en un incremento localizado de estos factores de crecimiento. Esto provocaría un aumento en la actividad de las vías de señalización agua abajo de los mismos y un aumento en la velocidad de migración. Esta hipótesis se ve sustentada por los resultados presentados en esta tesis que demuestran que la señalización agua abajo de los factores de crecimiento PVF, está comprometida en macrófagos mutantes para las lamininas.

**Papel del transporte vesicular en la migración de los macrófagos.**

Mientras que aún se sabe poco sobre los mecanismos de secreción de las lamininas, esto no es el caso para el Colágeno, habiéndose descubierto una proteína transmembrana ER, Tango 1, implicada en la secreción de algunos tipos de Colágeno en células en cultivo (Wilson et al., 2011). Si bien, experimentos recientes en *Drosophila* han mostrado que Tango1 también podría regular la secreción de las lamininas en la membrana basal de las células del epitelio folicular del ovario y de la glía (Lerner et al., 2013; Petley-Ragan et al., 2016). Estos estudios también han implicado a la Rab GTPasa Rab10, que está asociada con Tango1, y su GEF Crag en la deposición polarizada de lamininas, así como de Colágeno IV y de Perlecan, en las células foliculares, hecho que es imprescindible para el mantenimiento de la arquitectura del epitelio folicular (Denef et al., 2008; Lerner et al., 2013). Las proteínas Rabs fueron identificadas como proteínas evolutivamente conservadas implicadas en la regulación del tráfico de membrana, en la exocitosis y en la endocitosis (revisado en Schwartz et al., 2007). Hoy en día, se han descrito unas 70 Rabs humanas. Las distintas Rabs regulan el tráfico de diferentes cargos a destinos específicos. De esta manera, Rab10, el cual está localizado en el Golgi, regula el transporte desde éste a la membrana basolateral. Por otra parte, los Rabs pueden interactuar entre ellos. Así, por ejemplo, se ha probado que Rab10 interactúa con Rab8, el cual también regula el tráfico entre Golgi, los endosomas y la membrana basolateral. En esta tesis se ha demostrado que Rab8, pero no Rab10, se expresa a altos niveles en los macrófagos durante su migración. Además, se ha observado que la expresión de las formas dominantes negativas de Rab8 o de Rab10 en macrófagos afecta su migración, siendo los defectos mayores con Rab8 que con Rab10. Crag ha sido descrito como un GEF altamente específico para Rab10, tanto en estudios *in vitro* (Yoshimura et al., 2010) como en el caso del epitelio folicular de *Drosophila* (Lerner et al., 2013). Los resultados aquí presentados mostrando que los defectos de la migración de macrófagos en embriones mutantes Crag son similares a los obtenidos con la expresión de la forma dominante negativa de Rab10 apoyan este papel de Crag como regulador de Rab10. Durante esta tesis también se ha analizado el papel del GEF CG7787. CG7787 ha sido previamente descrito como regulador de la endocitosis basolateral y/o el reciclaje de Sanpodo y/o Delta, procesos necesarios para una correcta señalización de Notch (Le Bras et al., 2012). En este trabajo se ha demostrado que CG7787 se requiere para la correcta migración de

macrófagos. Es más, la reducción de niveles de CG7787 en macrófagos causa defectos en la migración mayores que los observados en embriones mutantes para Crag. Una posible explicación para este resultado es que CG7787 podría estar regulando a ambos Rab8 y a Rab10, lo que se apoya por la existencia de interacciones bioquímicas entre CG7787 y ambos Rabs ([www.esyn.org](http://www.esyn.org)). La generación de un mutante para CG7787 permitirá en un futuro analizar en más detalle su función en la deposición de MEC durante la migración de macrófagos y otros procesos morfogenéticos que requieren de la deposición de componentes de la MEC, como la organización de la arquitectura del epitelio folicular de *Drosophila*. En resumen, se podría proponer que los macrófagos de *Drosophila* usan Rab8 y Rab10 para secretar y/o depositar de forma autocrina las lamininas necesarias para su migración. Sin embargo, además de un papel en la regulación de la secreción de proteínas de la MEC, a la familia de Rab GTPasa se le ha atribuido un papel en el control de la endocitosis y del tráfico vesicular de los receptores de factores de crecimiento así como de las integrinas y del tráfico de membranas durante la migración celular (Bridgewater et al., 2012; Porther y Barbieri, 2015). Más específicamente, la expresión de Rab8 induce la formación de lamelipodios y filopodios, así como la capacidad invasiva de células tumorales, y una reducción en sus niveles provoca el efecto contrario (Hattula et al., 2006; Peränen et al., 1996). Además, el papel de Rab8 en la regulación del recambio de membranas durante la migración celular se ha relacionado con la internalización de los dominios de membrana que contienen receptores de adhesión y moléculas de señalización, como las Rho GTPasas, requeridas para la formación de protuberancias (Hattula et al., 2006). En el futuro, sería muy interesante analizar en más detalle la contribución de estas posibles funciones de Rab8, Rab10 y sus GEFs, Crag y CG7787, en la migración de macrófagos.

Por último, se ha observado que supresores de la dinámica de los microtúbulos bloquean la deposición de Laminina 5 y la migración de queratinocitos humanos (Frank y Carter, 2004). Aunque el papel de los microtúbulos en este proceso está aún por esclarecer, se ha propuesto que la alteración del citoesqueleto de microtúbulos podría interferir con el adecuado transporte al aparato de Golgi, el cual a su vez, se necesita para la correcta modificación post-translacional y el ensamblaje de los trímeros de lamininas. Trabajos previos realizados en el laboratorio muestran que la alteración de los

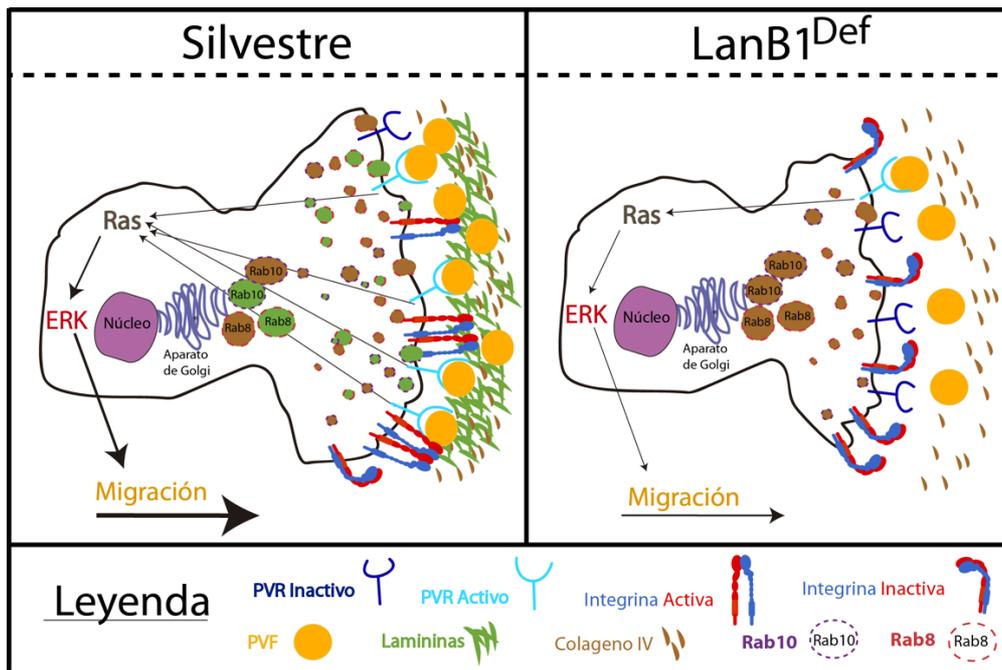
microtúbulos en macrófagos provoca un fallo en su migración (Comber et al., 2013). En el futuro sería interesante testar si los microtúbulos son necesarios para la deposición de las lamininas en los macrófagos.

### **Interacción entre laminas y Colágenos tipo IV durante la migración de macrófagos.**

De manera similar a las lamininas, los Colágenos, específicamente los tipos I, III y IV se expresan a lo largo del sustrato sobre el cual las células de la cresta neural migran, desempeñando un papel permisivo. Además, experimentos *in vitro* han descrito que las células de la cresta neural pueden acoplarse, extenderse y migrar sobre Colágeno, así como sobre fibronectina y lamininas. Sin embargo, los Colágenos han sido descritos ser un sustrato menos eficiente que las lamininas o la fibronectina en promover migración celular (revisado en Henderson y Copp, 1997). En esta tesis, se ha demostrado que los defectos de migración de macrófagos en embriones mutantes para los dos genes de Colágeno que existen en *Drosophila*, son más débiles si se comparan con los observados en embriones mutantes para las lamininas. Estos resultados apoyan la teoría sobre el papel conservado de las lamininas como componente predilecto de la matriz para la migración celular. Sin embargo, en esta tesis se ha mostrado que la reducción de Colágeno en los macrófagos de embriones mutantes para las lamininas incrementa su fenotipo, sugiriendo que los Colágenos podrían estar compensando parcialmente la falta de lamininas. Lamininas y Colágenos son también requeridos para la migración del epitelio folicular durante la orogénesis de *Drosophila*, un proceso conocido como rotación tisular global. Sin embargo, en este caso, lamininas y Colágenos, parecen funcionar de forma similar como sustratos, ya que la eliminación de cualquiera de ellos de forma individual bloquea por completo la migración del epitelio folicular (Haigo y Bilder, 2011). Estos diferentes requerimientos de Colágeno podrían deberse a que formas diferentes de migrar, las células del epitelio folicular migran de forma colectiva mientras que la de los macrófagos lo hacen de manera individual, podrían necesitar como sustrato diferentes patrones y/o composición de la MEC. De hecho, como se ha mencionado anteriormente, diferentes patrones de deposición y organización de la MEC regulan comportamientos celulares distintos. En el futuro sería interesante analizar la relación entre diferentes patrones de la MEC con distintas formas de migrar. Finalmente, experimentos realizados en esta tesis

muestran que la eliminación simultánea de ambos, lamininas y Colágenos, es muy perjudicial para el organismo, ya que las moscas portadoras de solo una copia de ambos alelos mutantes no sobreviven.

En resumen, en este trabajo se ha demostrado que las lamininas son necesarias en todas las etapas de la migración de macrófagos, salida de la cabeza, paso por la cola del embrión, migración a lo largo de la cuerda nerviosa, migración lateral sobre la cuerda nerviosa y migración aleatoria. Además, se ha observado que las lamininas regulan la direccionalidad y la estabilidad de las proyecciones de los macrófagos durante su migración. Asimismo, se ha demostrado que los macrófagos usan principalmente sus propias lamininas endógenas para migrar, matriz endógena, mientras que las producidas por la cuerda nerviosa, matriz exógena, podrían tener un papel más estructural, implicado en la correcta formación del espacio intersticial por el cual migran los macrófagos. Estudios previos realizados en el laboratorio demostraron que los principales receptores de las lamininas, las integrinas, también realizaban una doble función, migratoria y estructural, durante la migración de macrófagos (Comber et al., 2013). Por último, basándose en resultados previos y los obtenidos en este trabajo, se propone que la secreción local de lamininas por los macrófagos durante su migración podría estar regulada por las proteínas Rab GTPasas Rab8 y Rab10, así como por sus GEF, CG7787 y Crag. En resumen y apoyándose en los resultados aquí presentados, se propone el siguiente modelo para el papel de las lamininas en la migración de los macrófagos (Fig. 51). Las lamininas secretadas localmente, vía Rab8 y Rab10, regularían, la agrupación y activación de las integrinas. Esta activación de las integrinas de manera independiente o en combinación con una acumulación y/o exposición de las moléculas guía Pvf por las lamininas acumuladas localmente, induciría un incremento en la señalización corriente abajo de los receptores Pvr. La activación de ambas vías de señalización, la de las integrinas y la de Pvr, regularía la reorganización del citoesqueleto de actina promoviendo la formación de lamelipodios y filopodios y de este modo la migración celular. Finalmente, añadir que los Colágenos tipo IV también contribuyen, aunque en menor medida que las lamininas, a la migración de los macrófagos.



**Fig. 51.** Modelo para el papel de las lamininas en la migración de los macrófagos

Las lamininas han sido relacionadas con las formas más severas de algunos tipos de cáncer. Su expresión por células tumorales tras la diferenciación mesenquimal, hecho que se correlaciona con la malignidad; su relación con factores oncogénicos, como FOXM1, que regulan positivamente su expresión; su interacción con los receptores de membrana, como la integrina  $\alpha6\beta1$  y MCAM, implicados en la invasión celular, la metástasis y la progresión del tumor; y su fuerte actividad promotora de la migración, destacan el papel de las lamininas como promotoras de la migración de las células cancerosas así como de la progresión de los tumores. Por todo esto, recientemente las lamininas han sido denominadas como oncolamininas. De hecho, se ha visto que anticuerpos humanos contra dominios específicos de las lamininas inhiben el crecimiento tumoral y la metástasis en melanoma humanos (Mills et al., 2002). Futuros estudios con organismos modelo, como *Drosophila*, proporcionarán nuevos conocimientos sobre el mecanismo molecular y celular por el cual las lamininas regulan la migración celular que ocurre tanto durante el desarrollo como en situaciones patológicas, tales como la cicatrización de heridas. Dado que los procesos de migración y la maquinaria genética que los implementa están conservados en el reino animal, se espera que este análisis contribuya a descifrar los mecanismos moleculares y genéticos por los cuales las lamininas regulan la migración e invasión celular en eucariotas superiores, incluido el hombre.

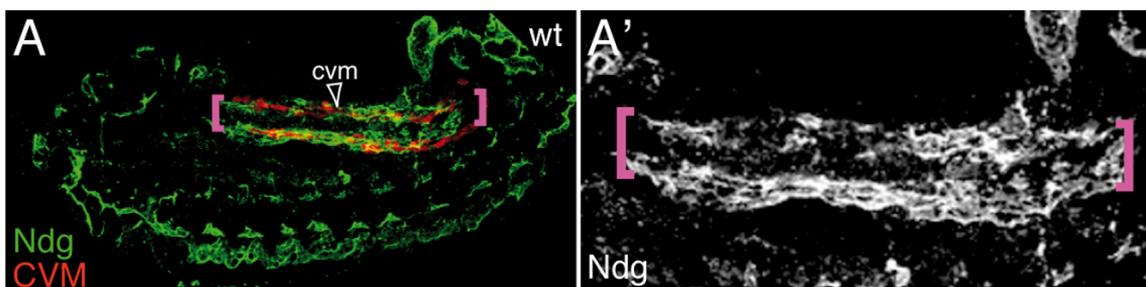


# Resultados II



## **Análisis del papel de Nidogen en la migración de los macrófagos de *Drosophila melanogaster*.**

Como se ha mencionado en la introducción, Nidogen es otro componente de la matriz extracelular, del que poco se sabe sobre su papel durante la embriogénesis de *Drosophila*. En *Drosophila* existe un único gen que codifica para esta proteína, el gen *nidogen* (*ndg*). Hasta el momento, se conoce que en otros organismos modelos, como *C. elegans* y ratón, Nidogen interacciona con otros componentes de la MEC, como Laminina, Perlecan y Colágeno (Aumailley et al., 1993; Hopf et al., 1999). Así mismo, se ha visto que en estos organismos Nidogen se requiere para la correcta formación de distintos órganos, como pulmones, sistema nervioso, riñones o corazón (Bader et al., 2005; Kim y Wadsworth, 2000; Tunggal et al., 2003; Willem et al., 2002). Sin embargo, a día de hoy poco se conoce del papel de *ndg* en *Drosophila*, principalmente debido al hecho de que aún no se han aislado mutantes en este gen. Respecto a su patrón de expresión durante la embriogénesis, se ha visto que Nidogen se expresa en distintos tipos de células mesodermales, incluyendo células precursoras de varios músculos, células cardíacas y células del mesodermo visceral (Zhu et al., 2012). Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que además Nidogen se expresa en las células caudales viscerales durante su migración sobre el mesodermo visceral (Fig. 44, (Urbano et al., 2011)).



**Fig. 44.** Vision lateral de embriones control. CVM en rojo y Ndg en verde.

En este trabajo, se decidió testar si Nidogen se expresaba en los macrófagos durante su migración. Para ello, se usaron las moscas *ndgGFP*, en las cuales se expresa la proteína GFP junto a Ndg. (Fig. 45).

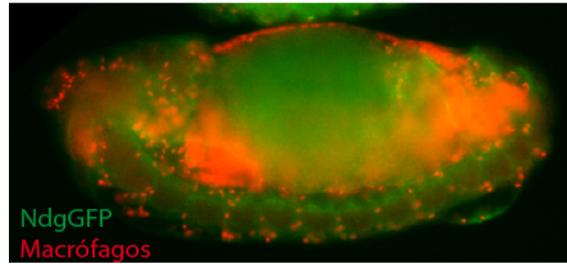


Fig. 45. Visión lateral de embrión Ndg-GFP de estadio 13. Se pueden observar los macrófagos (rojo) y la proteína ndg(verde).

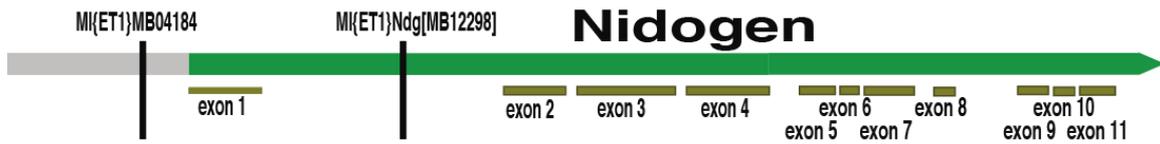
Una vez que se vio que se expresaba en células migratorias, incluidos los macrófagos, se decidió generar mutantes en *ndg* para poder así analizar su función en la migración de macrófagos.

## 1. Generación de mutantes.

Para conseguir aislar un mutante para *nidogen* se utilizaron diferentes estrategias genéticas que se detallan a continuación.

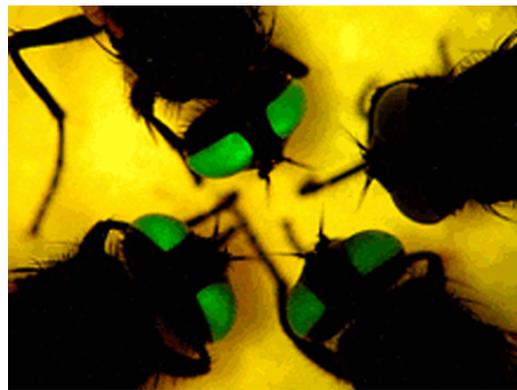
### 1.1. Generación de deficiencias por salto impreciso de trasposón.

Para generar deficiencias que elimina el gen *ndg* se eligió una técnica que permite aislar deficiencias mediante salto impreciso de un trasposón. Se sabe, que los trasposones en presencia del enzima trasposasa se movilizan y saltan del DNA, dejando el DNA con una rotura de doble hebra. Dicha rotura puede ser reparada por dos vías diferentes, o bien a través de las enzimas de reparación por cadena homologa (HR), la cual siempre lo hace de forma correcta y no genera ningún tipo de mutación, o a través de una reparación por no homología (NHEJ), la cual suele generar errores, produciendo deleciones, duplicaciones e inversiones en la zona dañada. Para generar deficiencias para *ndg* se seleccionaron dos trasposones diferentes,  $Mi\{ET1\}MB04184$  y  $Mi\{ET1\}Ndg[MB12298]$  (Fig. 52).



**Fig. 52.** Sitio de inserción de los dos trasposones usados en esta tesis doctoral.

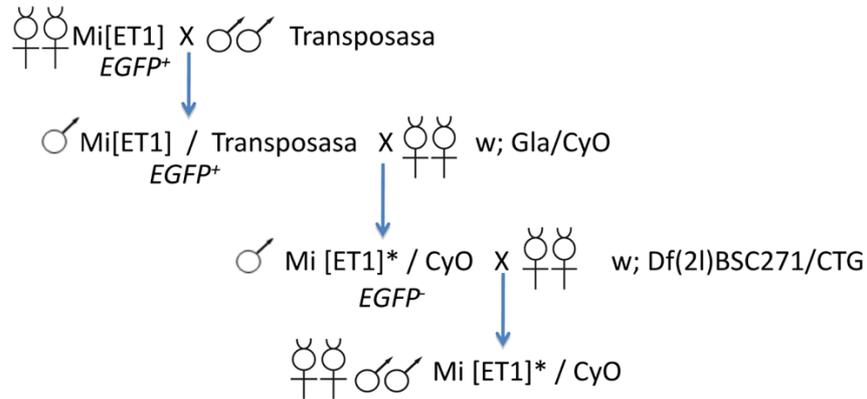
El trasposón  $Mi\{ET1\}MB04184$  está insertado aguas arriba del gen *nidogen*, a 343 nucleótidos del ATG y el trasposón  $Mi\{ET1\}Ndg[MB12298]$  se encuentra insertado a 1716 nucleótidos aguas abajo del ATG (Fig. 46) (Metaxakis et al., 2005). Los trasposones usados llevan un marcador llamado EGFP que confiere expresión la proteína verde fluorescente “GFP” en los ojos de los individuos adultos. Este marcador permite distinguir las líneas en las que el trasposón no ha saltado, ya que serán  $EGFP^+$ , de las que ha saltado, que serán  $EGFP^-$  (Fig. 52).



**Fig. 53.** Individuos adultos visualizados con lámpara de fluorescencia. La flecha señala a una mosca donde el trasposón ha saltado.

Así, para generar los saltos se cruzaron hembras que contenían los elementos P con machos que portaban una fuente de trasposasa. De este cruce se seleccionaron machos individuales que llevaban el trasposón y la fuente de trasposasa, 163 para el trasposón  $Mi\{ET1\}MB04184$  y 1259 machos del trasposón  $Mi\{ET1\}Ndg[MB12298]$ . Estos machos se cruzan con hembras  $w; Gla/CyO$  y de la progenie de estos cruces se seleccionaron aquellos machos que eran  $EGFP^-$ , 36 para el  $Mi\{ET1\}MB04184$  y 435 para  $Mi\{ET1\}Ndg[MB12298]$  (Fig., 54). Ya que la expresión de una RNAi para *ndg* en algunas células mesodermales producía letalidad (Neely et al., 2010a) se pensó que la falta total de *ndg* también lo sería. Basado en esto, la estrategia para aislar los posibles mutantes

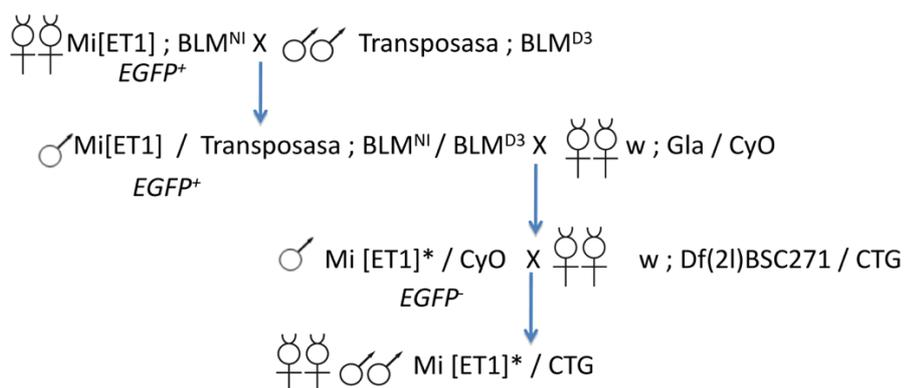
de *ndg* fue seleccionar de entre los machos EGFP<sup>-</sup> aquellos que cuando cruzados con la deficiencia Df(2R)BSC281, la cual elimina *ndg* entre otros muchos genes, no produjese progenie Df(2R)BSC281 sobre el cromosoma procedente del salto del trasposón.



**Fig. 54.** Cruces realizados para provocar el salto del elemento P.

Sin embargo, este caso no se dio y todos los posible saltos de ambos elementos P fueron viables sobre la deficiencia Df(2R)BSC281 (Fig. 48). Ante la posibilidad de que deleciones del gen *ndg* fueran viables se decidió testar por PCR si alguno de los saltos había generado una deficiencia. El resultado fue que todos los saltos se habían reparado correctamente, presumiblemente a través de la reparación por homología (HR). Entonces se decidió hacer saltar el trasposón Mi{ET1}Ndg[MB12298] en un fondo mutante BLM. En estos mutantes las enzimas encargadas de la correcta reparación del DNA (HR) no funcionan correctamente, incrementando la posibilidad de la reparación no homologa (NHEJ), la cual aumenta la posibilidad de obtener deleciones y que de producirse estas sean de mayor tamaño (Witsell et al., 2009). En este caso, se eligieron 132 machos mutantes BLM que portaban el trasposón Mi{ET1}Ndg[MB12298] y la fuente de trasposasa y se cruzaron con hembras w; Gla/CyO (Fig. 55).

## Resultados II



**Fig. 55.** Cruces realizados para provocar el salto del elemento P en fondo mutante BLM.

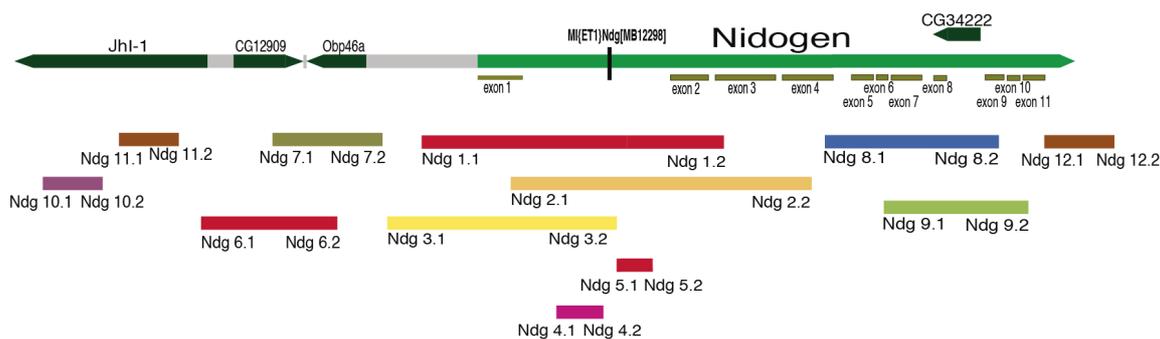
De este cruce se seleccionaron 110 machos  $EGFP^-$  de los cuales 6 no complementaban con la deficiencia  $Df(2R)BSC281$  (Tabla ). Se establecieron stocks de estos machos y se mapearon molecularmente mediante PCR y secuenciación.

Transposón	Cruzados	EGFP-	Viables sobre $Df(2R)BSC281$	
			SI	NO
<b>Mi{ET1}MB04184</b>	163	36	36	0
<b>Mi{ET1}Ndg[MB12298]</b>	1259	435	435	0
<b>Mi{ET1}Ndg[MB12298] en fondo BLM</b>	132	110	104	6

**Tabla 3.** Resumen del número de cruces realizados durante el salto de elemento P.

### Mapeo molecular por PCR.

Las 6 líneas aisladas eran letales en estadio larvario. Así, para conocer con exactitud el tamaño de la posible deleción generada con el salto impreciso en fondo mutante BLM, se extrajo DNA genómico a larvas homocigóticas para cada una de las líneas y se realizaron PCR con parejas de cebadores adyacentes al gen *ndg* (Fig. 45).



**Fig. 56.** Diferentes parejas de cebadores usados para mapear molecularmente las 6 líneas obtenidas por salto impreciso del elemento  $Mi\{ET1\}Ndg[MB12298]$ .

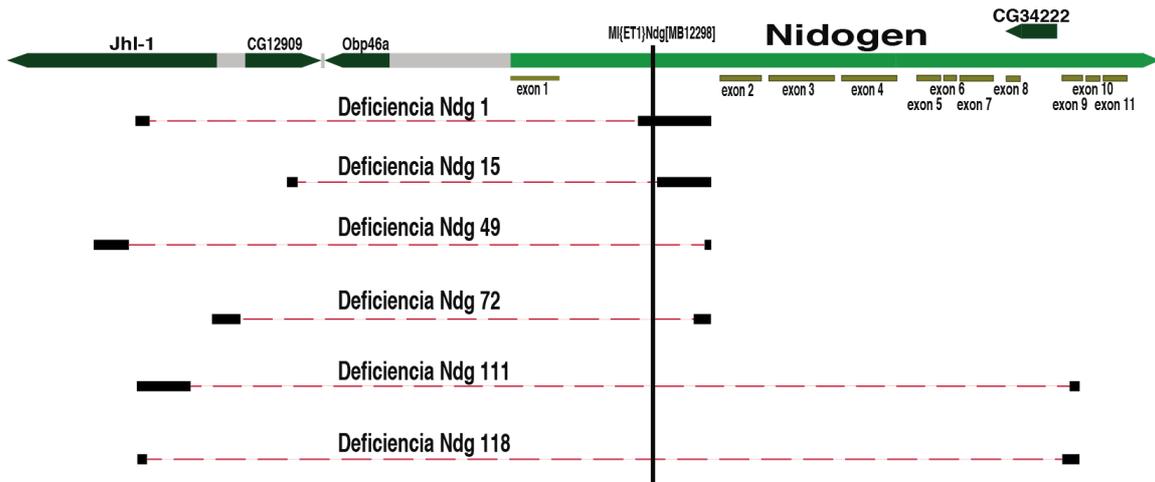
De los resultados obtenidos en la PCR (Tabla 4) se deduce que en todos los casos se eliminó el gen *ndg* y algunos genes colindantes, siendo el mutante 15 es el que presenta la delección más pequeña.

Oligos Mutantes	Ndg14	Ndg 10	Ndg 11	Ndg 6	Ndg 7	Ndg5.2REV-Ndg1.2	Ndg1.2REV-Ndg2.2	Ndg 8	Ndg 9.1-8.2	Ndg 9	Ndg 12	Ndg13
Mut 1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Mut 15	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Mut 49	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Mut 72	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Mut 111	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Mut 118	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

**Tabla 4.** Resumen del resultado de las diferentes PCR realizadas a los 6 posibles mutantes de *ndg*. Cada casilla azul representa una pareja de cebadores usados con cada genotipo de la casilla amarilla. Si la casilla que la intercepta es verde (+) significa un resultado positivo y si la casilla es roja (-) significa que esa pareja de cebadores no amplificó ningún fragmento para ese DNA.

### Secuenciación.

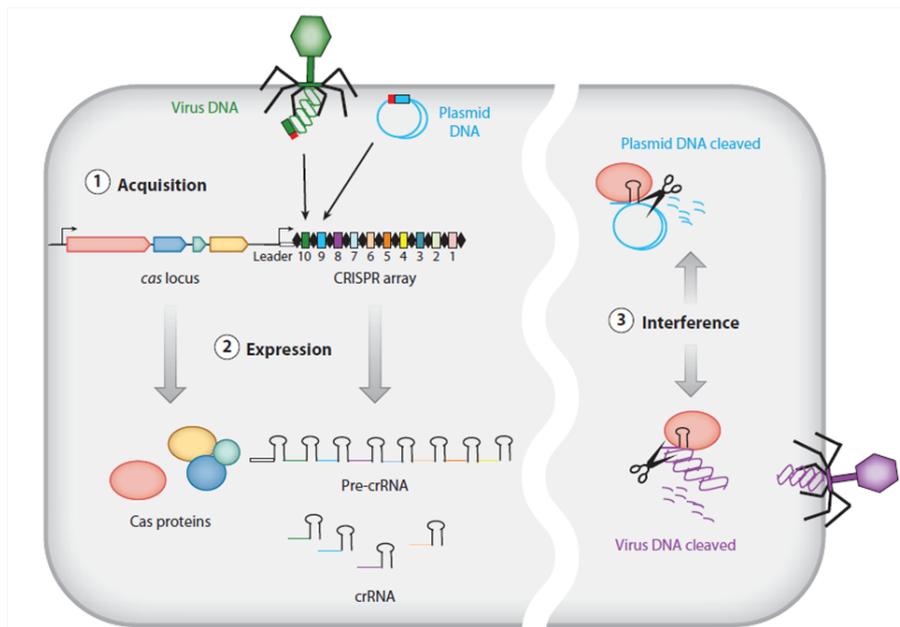
Para conocer de manera más precisa el alcance de las delecciones generadas, los productos de PCR se enviaron a secuenciar lo que nos permitió definir los dos extremos de cada deficiencia. Estos resultados confirmaron que el mutante Ndg15 portaba la deficiencia más pequeña donde se eliminaban los genes *ndg*, *CG12909* y *Obp46a*.



**Fig. 56.** Representación esquemática de las 6 deleciones creadas por salto del trasposón  $Mi\{ET1\}Ndg[MB12298]$ . En negro se observa el DNA presente en la deleción, contrastado por secuenciación del DNA genómico, y en rojo la zona eliminada en la deleción.

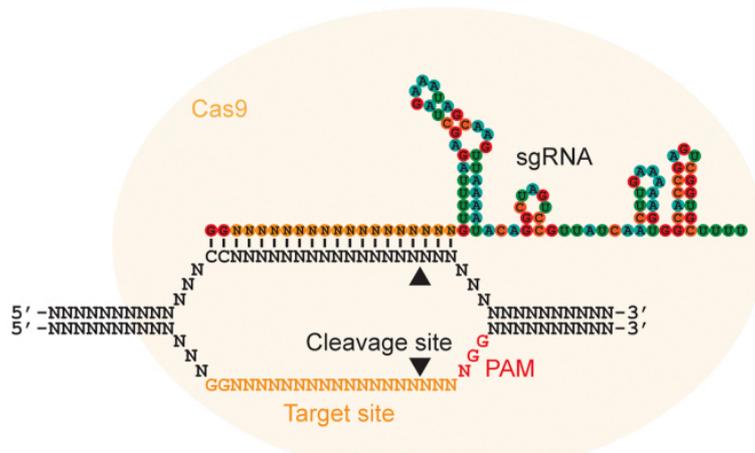
## 1.2. Generación por CRISPR.

Debido a que el salto del trasposón provocó deleciones que eliminaban más genes aparte de *ndg*, se buscó una alternativa que permitiese obtener mutantes sólo en el gen *ndg*. Para este fin, se usó la novedosa técnica CRISPR, una técnica de última generación que ha permitido la producción de mutaciones puntuales en multitud de animales modelos, incluido *Drosophila*. CRISPR que proviene de las siglas en inglés “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” fue descrita en 1987 por primera vez, como un sistema inmune primitivo de las bacterias frente a los virus (Fig. 48). (Barrangou et al., 2007; Ishino et al., 1987; Jinek et al., 2012; Makarova et al., 2006; Mojica et al., 1995).



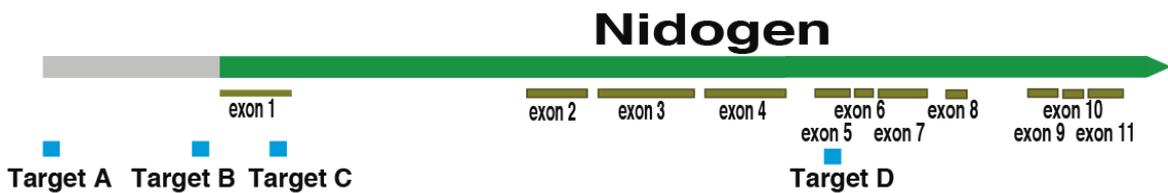
**Fig. 57.** Esquema del origen de CRISPR.

Años más tarde, se identificaron diferentes componentes del sistema y se comprendió mejor su funcionamiento. El año 2013 es el inicio de su uso como sistema de manipulación genética precisa y fiable. El sistema se ha optimizado para su uso en células en cultivo, *Drosophila*, levaduras, pez cebra y ratones (Chang et al., 2013; Cho et al., 2013; Cong et al., 2013; Dicarlo et al., 2013; Ding et al., 2013; Gratz et al., 2013; Hwang et al., 2013; Jinek et al., 2013; Mali et al., 2013; Shen et al., 2013). El sistema utiliza una proteína llamada Cas9 y un RNA guía que se genera a partir de la secuencia del gen a eliminar. El RNA guía debe contener una secuencia de 20 a 24 nucleótidos flanqueada por una región denominada PAM (Protospacer adjacent motif), la cual se encuentra de forma natural a lo largo de todo el genoma. De esta forma, lo primero que se hace es buscar estas secuencias PAM en nuestro gen de interés, y después se diseña un RNA guía capaz de hibridar con esa zona concreta. Este RNA guía una vez este en la célula reconocerá su región homologa en el DNA e hibridará con ella. Esta unión es reconocida por la proteína Cas9, la cual se une al RNA guía formando un complejo Cas9-RNA guía-DNA. Tras la unión, la Cas9 corta la doble cadena entre el 3º y 4º nucleótido del RNA guía. Este corte puede provocar una pequeña deleción en la zona de corte (Fig. 49) (Jinek et al., 2012). Alternativamente, si se usan dos RNA guías al mismo tiempo se podría generar una deficiencia.



**Fig. 58.** Esquema del sistema CRISPR. SgRNA es el RNA guía.(Bassett et al., 2013).

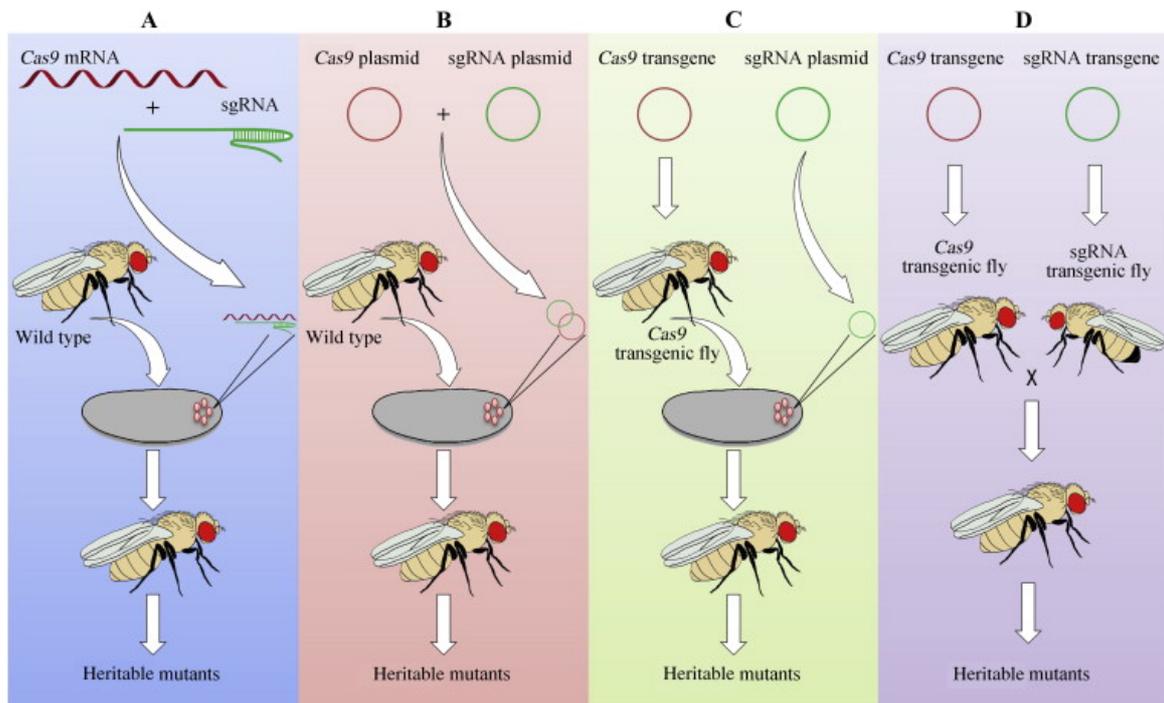
En el caso de *ndg* se diseñaron cuatro RNAs guía diferentes, Target A, B, C y D, que se corresponden con diferentes regiones del gen (Fig. 50). La estrategia a seguir fue la combinación de dos RNAs guía con la intención de generar una delección. De esta forma, se combinaron los RNA guía A y C y los B y D.



**Fig. 59.** Esquema de las RNAs guías (Target) diseñadas para *Nidogen*.

Las estrategias para introducir los RNA guía en las células de la línea germinal son varias (Fig. 60):

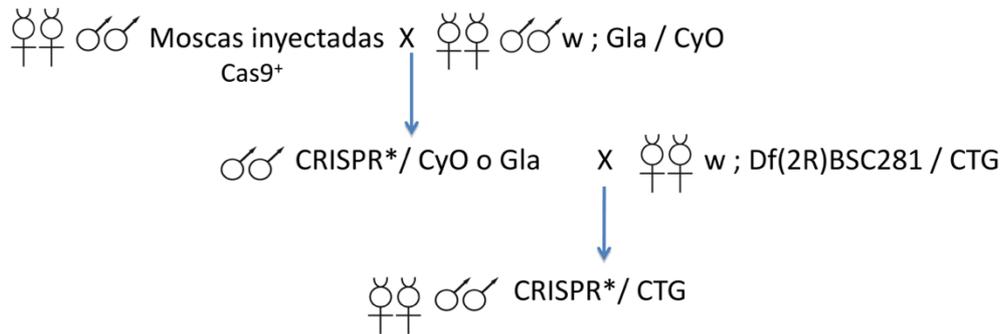
- A. Inyección directa de los RNAm que transcriben la proteína Cas9 y el RNA guía.
- B. Inyección directa de los plásmidos portadores de los RNA guías junto al plásmido que expresa la proteína Cas9 en embriones control.
- C. Inyección directa de los plásmidos portadores los RNA guías en embriones portadores de una fuente constitutiva de Cas9, embriones Cas9<sup>+</sup>.
- D. Obtención de moscas transgénicas que expresen los RNA guía de forma constitutiva, para después cruzar con moscas transgénicas que expresan la proteína Cas9 de forma constitutiva.



**Fig. 60.** Resumen de las diferentes estrategias a seguir para la realización de la técnica CRISPR. (Xu et al., 2015).

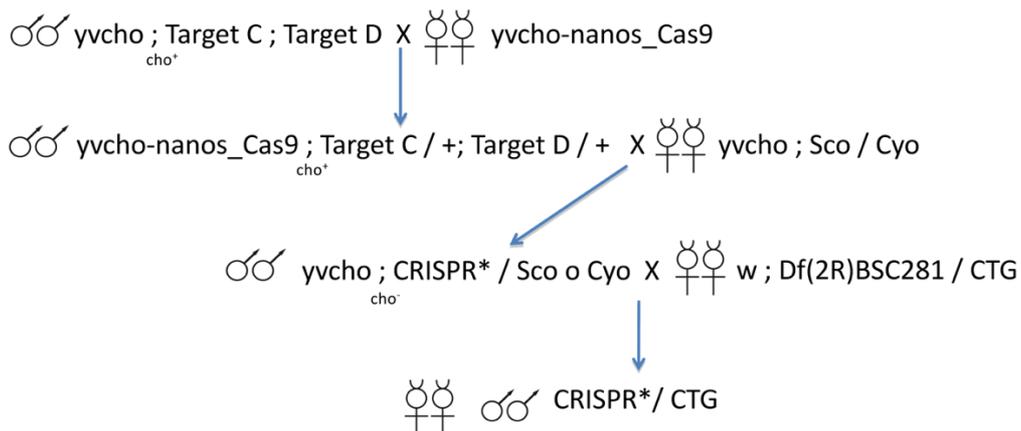
En nuestro caso, se optó en un primer intento por la tercera opción, inyección directa de los plásmidos portadores de los RNA guía en embriones Cas9<sup>+</sup>. De este modo, se inyectaron por una parte los plásmidos de los RNA guía A y C y por otra, los plásmidos para los RNA guía B y D en embriones que expresaban constitutivamente la proteína Cas9, regulada su expresión por el promotor de la línea germinal *Vasa* (Fig. 61). De la inyección del mix Nidogen A-C, nacieron 39 moscas y 20 del mix Nidogen B-D. Estas se cruzaron de manera individual con moscas Gal/CyO y de los cruces se recogen 268 y 172 machos posibles mutantes de los mix A-C y B-D, respectivamente. Cada uno de estos machos se cruzan de manera individual con hembras vírgenes de la deficiencia Df(2R)BSC281/CTG para por una parte testar su viabilidad sobre la deficiencia y por otra establecer las líneas de los posibles mutantes. Se observó que todas las líneas eran viables sobre la deficiencia y sobre sí mismas. Por lo tanto para mapear molecularmente la posible mutación, se extrajo DNA genómico a adultos homocigóticas para cada una de las líneas y se comprueba por PCR si se ha generado una delección del DNA comprendido entre los dos targets. En ningún caso se generó una delección de la región que contiene a *ndg*.

## Resultados II



**Fig. 61.** Cruces realizados en la estrategia de inyección directa de plásmido portador de los RNA guía.

Tras este resultado negativo, se optó por la cuarta opción, establecer líneas de moscas transgénicas que expresaran de forma constitutiva los RNA guía para después cruzarlas con moscas que expresan Cas9 de forma constitutiva. Para este segundo intento, se usaron solo los targets C y D, ya que estaban situados en dos exones de *ndg*, y así se podrían incrementar las posibilidades de provocar una mutación en un exón o en ambos, o incluso una delección. Para generar las líneas transgénicas portadoras de los RNA guías C y D, se clonaron los targets C y D en el plásmido pCFD3 (Port et al., 2014). Este plásmido porta un marcador genético, el gen *vermillion* (*v*), que permite reconocer aquellas líneas que portan el plásmido sobre un fondo genético *vermillion chocolate*. (*v cho*).



**Fig. 62.** Cruces realizados durante la segunda estrategia CRISPR, donde se cruzan moscas que expresan constitutivamente los RNA guía, con moscas cas9<sup>+</sup>.

Se establecieron moscas transgénicas con el target C en el cromosoma II y el target D en el cromosoma III. Tras conseguir las líneas transgénicas se combinaron en una sola mosca, obteniéndose moscas que portaban los dos targets, C y D. Machos con esta

combinación se cruzaron con hembras transgénicas que expresan constitutivamente el Cas9, regulado por el promotor de la línea germinal *nanos*. De este cruce, se seleccionaron 101 machos que portaban la Cas9 y los dos targets, C y D. Así, en la línea germinal de estos machos se estaba expresando paralelamente los dos targets, C y D y la proteína Cas9, pudiéndose producir cortes en los targets C y D, y como consecuencia una deleción. Estos 101 machos se cruzaron de manera individual con hembras vírgenes yvcho; Sco/CyO. De cada cruce se seleccionó un solo macho que se cruzó individualmente con vírgenes de la deficiencia Df(2R)BSC281, para, como en el caso anterior, por una parte testar si es viable sobre la deficiencia y por otra establecer las líneas de los posibles mutantes. Se observó que sólo una línea era letal sobre la deficiencia y sobre sí mismo. De las 100 líneas viables se extrajo DNA genómico a adultos homocigóticos y se comprobó por PCR que en ningún caso se había generado una deleción del DNA comprendido entre los dos targets. La única línea letal resultó letal larvaria, así que se extrajo el DNA genómico a larvas homocigóticas y por medio de PCR se encontró que presentaban una deleción entre los targets C y D. Esta deleción resultó ser aún mayor que las obtenidas hasta el momento (Tabla 5).

Oligos Mutantes	Ndg14	Ndg 10	Ndg 11	Ndg 6	Ndg 7	Ndg5.2REV-Ndg1.2	Ndg1.2REV-Ndg2.2	Ndg 8	Ndg 9.1-8.2	Ndg 9	Ndg 12	Ndg13
Mut 1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Mut 15	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Mut 49	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Mut 72	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Mut 111	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Mut 118	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CRISPR 55	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

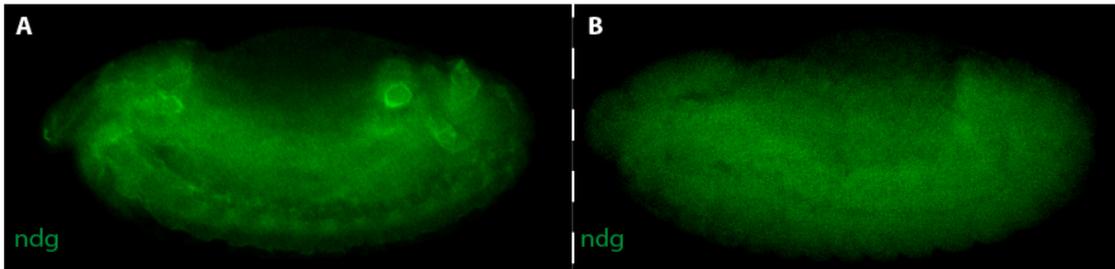
**Tabla 5.** Resumen del resultado de las diferentes PCR realizadas a los 6 posibles mutantes de *ndg* (Amarillo) y al mutante obtenido por la técnica CRISPR (Morado). Cada casilla azul representa una pareja de cebadores usados con cada genotipo de la casilla amarilla. Si la casilla que la intercepta es verde (+) significa un resultado positivo y si la casilla es roja (-) significa que esa pareja de cebadores no amplificó ningún fragmento para ese DNA.

## 2. Análisis del fenotipo del mutante Ndg15.

A pesar de no haber obtenido un mutante que eliminase sólo el gen *ndg* y con el objetivo de analizar si este se requiere para la migración de macrófagos, se decidió analizar fenotípicamente el mutante Ndg15 que es la deficiencia más pequeña generada hasta el

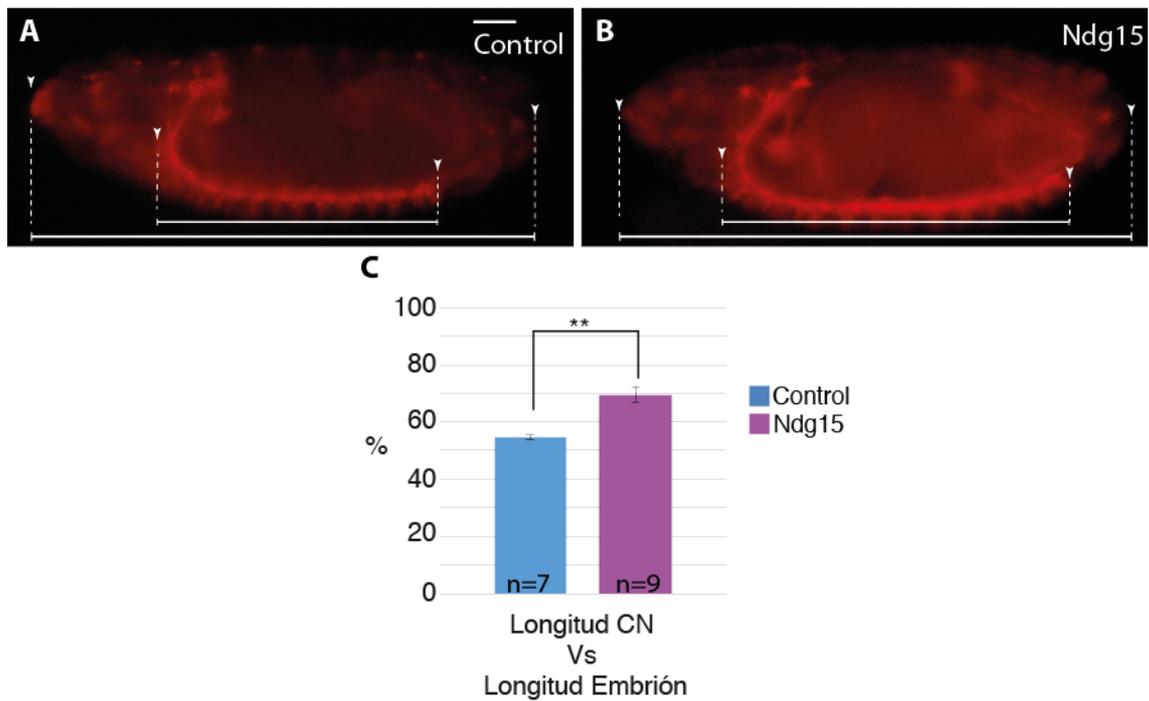
## Resultados II

momento. La expresión de *ndg* en embriones homocigóticos para esta deficiencia desaparece (Fig. 63 ), lo que corrobora que la deficiencia elimina completamente a *ndg*. Respecto a la fase de letalidad de los mutantes Ndg15, se observó que morían en el estadio larvario L2.



**Fig. 63.** Visión lateral de embriones control (A) y mutante Ndg15 (B) de estadio 13. Anti-*ndg* visualizado en verde.

Entonces, se analizó si la migración de varias poblaciones celulares que expresan *ndg*, como los macrófagos, las células cardíacas o las células del mesodermo caudal, estaban afectadas en ausencia de *ndg* y se vio que no. Así mismo, y ya que *ndg* se expresa en los músculos y en la membrana basal que rodea a la cuerda nerviosa se analizó si en los mutantes Ndg15 estos tejidos estaban afectadas. Si bien, se observó que los músculos se formaban correctamente en los embriones mutantes, se encontró que la cuerda nerviosa no se condensaba bien. Para analizar en qué medida estaba afectada la condensación de la cuerda nerviosa, se calculó el ratio entre la longitud del embrión y la de la cuerda nerviosa en embriones de estadio 16, controles y embriones mutantes Ndg15 (Fig. 64). Se observó, que este ratio era de un 55% en embriones control y de un 71% en embriones mutantes Ndg15, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Todo esto parece indicar que la cuerda nerviosa necesita la presencia de Nidogen para su correcta formación.



**Fig. 64.** . Visión lateral de embriones control (A) y mutantes Ndg15 (B) de estadio 16. Se visualiza la cuerda nerviosa con anti-FasII (rojo). (C) Ratio entre la longitud del embrión y la de la cuerda nerviosa.

En un futuro se intentará comprobar si la falta de Nidogen, afecta de alguna manera a la deposición de otros componentes de la MEC como Perlecan, Colágeno o las lamininas. También, se analizará la posible interacción de Nidogen con otros componentes de la MEC, mediante el análisis fenotípico de embriones mutantes para *ndg* y lamininas, Colágeno o Perlecan.

# Discusión II



### **Papel de *nidogen* durante la embriogénesis**

Nidogen es una glicoproteína compuesta por diferentes dominios globulares que se sabe median un papel esencial en la formación de complejos Laminina-Colágeno tipo IV y Laminina-Perlecan (Aumailley et al., 1993; Hopf et al., 1999). Sin embargo, es el componente de la matriz extracelular del que menos se sabe sobre su papel durante el desarrollo embrionario. Además, lo poco descrito en organismos como ratón o *C. elegans* sugiere que su función pudiera no estar evolutivamente conservada. De este modo se sabe que ratones doble mutantes para las dos isoformas de *nidogen* que existen en vertebrados mueren al final del desarrollo embrionario, debido a fallos en la formación de pulmones y corazón (Bader et al., 2005). Mientras que, en el caso de *C. elegans*, los mutantes para *nidogen*, llegan a adulto siendo estos viables y fértiles, aunque presentan alteraciones en la correcta formación del sistema nervioso periférico (Kim & Wadsworth, 2000).

Para ahondar más en el posible papel de *ndg* durante el desarrollo embrionario, en este trabajo se decidió aislar mutantes de *ndg* en *Drosophila*. Como hemos mencionado anteriormente, durante la embriogénesis de *Drosophila* *ndg* se expresa en muchas poblaciones de origen mesodermal, incluyendo precursores musculares, células cardíacas y células del mesodermo visceral, así como en algunas células nerviosas (Urbano et al., 2011; Zhu et al., 2012). En este trabajo se ha demostrado que *ndg* también se expresa en los macrófagos durante su migración. Basado exclusivamente en este patrón de expresión, *ndg* podría requerirse tanto en poblaciones mesodermales como nerviosas, y si este fuera el caso la función de *ndg* en *Drosophila* estaría conservada con la encontrada en ambos ratón y *C. elegans*. Aunque en este trabajo no se ha conseguido aislar mutaciones que sólo eliminen la función de *ndg*, la generación de una deficiencia, Ndg15, en la región que contiene a *ndg*, nos ha permitido obtener alguna información sobre su posible función en las poblaciones celulares donde se expresa, así como su papel en la embriogénesis en general.

Embriones homocigóticos para la deficiencia Ndg15 mueren en estadio larvario L2. Lo que podría indicar un papel vital para *ndg* durante la embriogénesis de *Drosophila*. Sin embargo, como se ha mostrado en este trabajo, la deficiencia Ndg15 elimina *nidogen* y otros dos genes, *CG12909* y *Obp46a*. Aún no existen mutantes individuales para los genes

*CG12909* y *Obp46a*, por lo que no se sabe si su ausencia produce o no letalidad. Cabe comentar aquí que estudios realizados con RNAi contra cada uno de estos tres genes muestran que el único que expresado ubicuamente provoca letalidad es el RNAi contra *Nidogen* (Neely et al., 2010a; Neely et al., 2010b). Sin embargo, este resultado es preliminar y no es en absoluto concluyente, ya que por ejemplo se desconoce la eficiencia de los distintos RNAs. Añadir que estudios del patrón de expresión de *ndg* han mostrado que se produce a altos niveles en el “Carcass”, término que se refiere a los músculos, la cutícula y los tejidos asociados a ambos durante el estadio larvario (Flybase). Esto podría ser indicativo de un requerimiento para *ndg* en los estadios larvarios y así explicar la letalidad larvaria de la deficiencia *Ndg15*. Sin embargo, saber si *ndg* se requiere en *Drosophila* para la supervivencia del organismo, como es el caso en ratón (Bader et al., 2005), o por el contrario es dispensable para la misma, como es el caso de *C. elegans* (Kim & Wadsworth, 2000), aguarda la obtención de mutantes exclusivos en el gen *ndg*.

Los estudios presentados en este trabajo muestran que macrófagos, células musculares y células del mesodermo visceral caudal migran correctamente en embriones homocigóticos para la *Ndg15*, lo que demuestra que *Nidogen* no es imprescindible para estos procesos migratorios. De la misma forma, se ha visto que la musculatura somática se forma correctamente en los embriones mutantes para la deficiencia, por lo cual, y en contra de lo que se ha visto en el ratón (Bader et al., 2005), *ndg* no se requiere para la morfogénesis de este tipo muscular en *Drosophila*. Sin embargo, en este estudio se ha mostrado que embriones homocigóticos para *Ndg15* presentan un fallo en la condensación de la cuerda nerviosa. Estos resultados sugieren que en *Drosophila*, como es el caso en ratón (Bader et al., 2005) y en *C. elegans* (Kim & Wadsworth, 2000), *ndg* se podría requerir para la correcta morfogénesis del sistema nervioso. De nuevo, no podemos descartar que los otros genes eliminados en la deficiencia *CG12909* y *Obp46a* también se requieran de manera individual o en combinación para la condensación de la cuerda nerviosa. Por otra parte, merece la pena comentar aquí que aunque se ha encontrado una expresión elevada del RNAm de *ndg* en el corazón embrionario de *Drosophila* (Flybase), en un análisis preliminar de la migración y correcta disposición de los cardioblastos, células precursoras del corazón, en embriones homocigóticos para la deficiencia *Ndg15* se ha observado que esta ocurre de manera correcta. Esto sugiere que en *Drosophila* *ndg* no se

## Discusión II

requiere para los estadios tempranos de la morfogénesis del corazón. En el futuro, sería interesante testar si *ndg* se requiere para el mantenimiento y buen funcionamiento del corazón en estadios larvarios y/o en el adulto en *Drosophila*.

En resumen, los resultados obtenidos hasta ahora nos permiten concluir que a diferencia de lo que ocurre en ratón (Bader et al., 2005), en *Drosophila ndg* no se requiere ni para la supervivencia del embrión ni para la correcta morfogénesis del corazón. El hecho de que los requerimientos de una proteína de la matriz extracelular no estén conservados no es novedoso. Así, resultados obtenidos en el laboratorio en colaboración con el grupo del Profesor J. de Celis, demostraron que mientras que en *Drosophila* embriones carentes de todas las lamininas mueren al final de la embriogénesis, en ratón embriones que no producen lamininas  $\beta 1$  no se implantan bien y presentan fallos desde estadios tan tempranos como la gastrulación (Miner et al 2004). Así mismo, se ha descrito que en erizo de mar la inyección de anticuerpos que inhiben la función de las lamininas  $\alpha 1$  inhiben la gastrulación (Benson et al., 1999). Curiosamente, la inhibición de la función de las lamininas en embriones *C. elegans* interrumpe su completo desarrollo en estadios más tardíos (Kao et al., 2006). Por todo, es posible, que como en el caso de las lamininas, mientras la función temprana de *ndg* no este conservada, si podría estarlo una posible función tardía en la morfogénesis de algunos órganos, como por ejemplo el sistema nervioso.

Como se ha mencionado anteriormente, uno de las funciones principales de Nidogen es contribuir al ensamblaje correcto de membranas basales que rodean órganos y tejidos, favoreciendo la interacción entre las redes de lamininas y Colágenos e integrando otras proteína de la matriz extracelular, como Perlecan (Aumailley et al., 1993; Hopf et al., 1999). Así, interacciones entre Nidogen y Colágenos tipo IV se han implicado en la migración de las gónadas en *C. elegans* (Kubota et al., 2008). Así mismo, el bloqueo de las interacciones entre Nidogen y lamininas desencadenó fallos en la formación de epitelios, pulmones y riñones en ratón (Tunggal et al., 2003; Willem et al., 2002). Por ello en el futuro, una vez se obtengan mutantes sólo para *ndg*, sería interesante, además de confirmar los fenotipos hasta ahora descritos, realizar estudios de interacción entre Nidogen y los otros componentes de la MEC.

Alteraciones en la expresión de *ndg* se ha relacionado con algunas enfermedades y con algunos tipos de cáncer. Este es el caso de la enfermedad congénita Hirschsprung que si no se trata produce muerte en los bebés que la padecen. Esta enfermedad se caracteriza porque los pacientes carecen de ciertas terminaciones nerviosas en los intestinos. Ello produce un bloqueo del tránsito intestinal, generando taponamientos que si no se operan provocan la muerte del bebé. Análisis de expresión de Nidogen en las zonas del intestino afectadas de estos enfermos ha mostrado una expresión y distribución anormal de la proteína en la membrana basal de los mismos, así como en su musculatura (Kahn, 2010; Parikh et al., 1995). Si bien aún no se sabe a ciencia cierta el grado de co-relación entre los niveles anormales de Nidogen en los pacientes y la enfermedad. Por otra parte, se ha visto que los niveles de *ndg* se encuentran alterados en varios tipos de cáncer, como cáncer gastrointestinal, ovárico y renal, entre otros (Katz et al., 1991; Kuk et al., 2010; Lee et al., 2006; Lin Li et al., 2015; Ulazzi et al., 2007). Así, los niveles de Ndg-1 se encontraron significativamente elevados en el plasma de pacientes con cáncer de ovario. De hecho los niveles de Nidogen se utiliza hoy por hoy como biomarcador de este tipo de cáncer. embargo, se ha visto que algunos tumores gastrointestinales expresan niveles bajos de Nidogen, sugiriendo que la ausencia de Nidogen podría favorecer la invasión debido a la pérdida de interacción de las células con la membrana basal y a una posible alteración de la misma (Ulazzi et al., 2007). Así, el papel de Nidogen en migración celular permanece aún controversial.

Debido a las ventajas que aporta *Drosophila* como sistema modelo para estudiar la función de un gen in vivo y sus mecanismos de acción, el aislamiento de mutantes para *ndg* en *Drosophila* supondría un gran avance en el conocimiento de la función de este componente de la matriz extracelular en diversos procesos celulares, lo que nos podría ayudar a entender su papel tanto en la embriogénesis como en cáncer y enfermedades asociadas al mal funcionamiento del mismo.

# Conclusiones

## Conclusiones

1. Las lamininas se requieren para la migración de los macrófagos durante todas sus etapas, salida de la cabeza hacia la cola del embrión, entrada en la cola del embrión, migración a lo largo de la cuerda nerviosa, migración lateral sobre la cuerda nerviosa y migración aleatoria.
2. Los macrófagos y la cuerda nerviosa son los principales productores de las lamininas necesarias para la migración de los macrófagos.
3. Los macrófagos son necesarios para una correcta deposición de la matriz extracelular a lo largo de la cuerda nerviosa.
4. Los macrófagos necesitan producir su propia Laminina para migrar correctamente durante la embriogénesis.
5. Las lamininas regulan la direccionalidad y estabilidad de las proyecciones de los macrófagos durante su migración.
6. La expresión de lamininas en la cuerda nerviosa se requiere para la migración de los macrófagos a lo largo de la misma.
7. Las lamininas controlan la formación del espacio intersticial entre la cuerda nerviosa y el ectodermo.
8. La cuerda nerviosa necesita producir su propia Laminina para su correcta condensación.
9. Los macrófagos expresan la proteína Rab8 durante su migración.
10. La expresión de formas dominantes negativas de Rab8 o Rab10 en los macrófagos provoca un fallo en su migración.
11. Los GEFs Crag y CG7787 son necesarios en los macrófagos para su correcta migración.
12. Las lamininas e integrinas regulan la actividad de la vía PVR en los macrófagos durante su migración.
13. Las lamininas se requieren para la migración de los macrófagos hacia las heridas.
14. Lamininas e integrinas son necesarias para una correcta actividad fagocítica de los macrófagos.
15. Colágeno IV se requiere para una migración apropiada de macrófagos durante la embriogénesis.

## Conclusiones

16. Colágeno IV y las lamininas cooperan durante la migración de macrófagos.
17. La deficiencia Ndg15 es letal larvario en estadio L2.
18. Embriones homocigóticos para la deficiencia Ndg15 presentan una migración normal de los macrófagos y de células del mesodermo caudal visceral y una morfogénesis correcta de los músculos somáticos.
19. La cuerda nerviosa de embriones Ndg15 homocigóticos mutantes no se condensa propiamente.



# **Materiales y Métodos**



## I. Genética de *Drosophila melanogaster*.

### A. Cepas usadas.

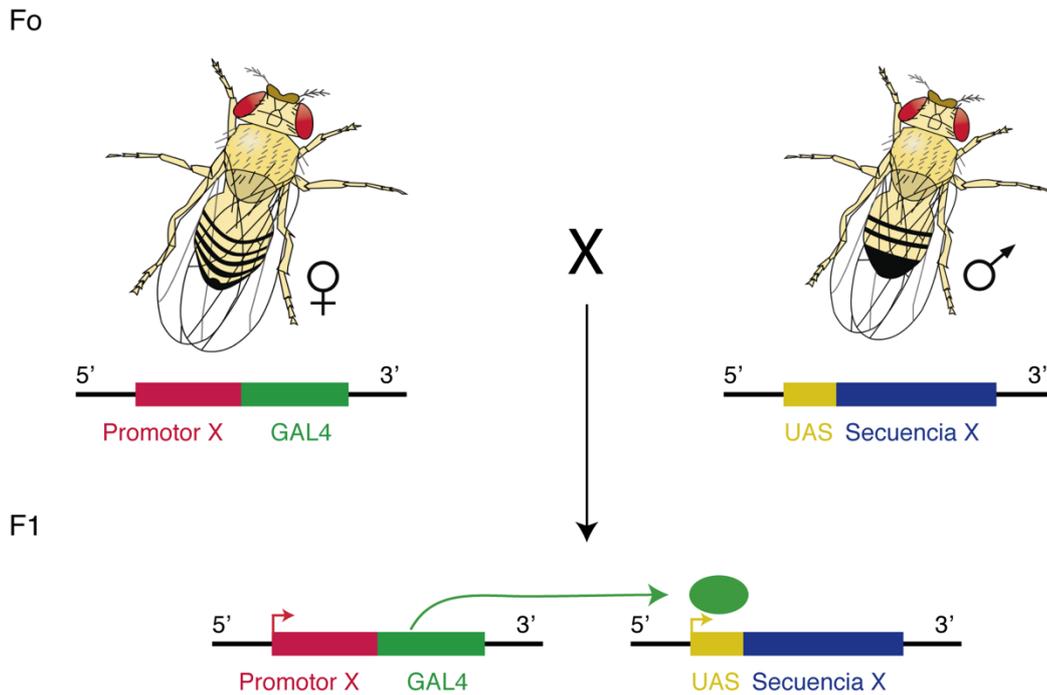
En esta tesis doctoral se usaron las siguientes cepas de *Drosophila melanogaster*, de forma individual, o mediante cruces, para obtener los diferentes genotipos analizados:

- *w; sp / CyO; TM2 / TM6, B.*
- *w; sp / CTG; Dr / TTG.*
- *w; sp / Cyo df YFP; Dr / TM3 df YFP.*
- *UAS-dicer.*
- *w; UAS-LanB2RNAi.*
- *w; ; UAS-LanB1RNAi.*
- *w; LanB1<sup>D<sup>ef</sup></sup> / CyO, actina::GFP; TM2 / TM6.*
- *w; ; Srp.h.G4-U-GFP.*
- *w; Srp.G4-U-CherryMoesin.*
- *Mys / FMZ FLacZ; ; TM2 / TM6.*
- *Elav-Gal4.*
- *w; ; LanB1GFP.*
- *w; Df(2L)BSC172/CyO.*
- *w; ; U-VkgRNAi.*
- *w; ; UAS-PVR.*
- *w; ; srp<sup>3</sup>.*
- *w; ; srp<sup>45</sup>.*
- *y v ; ; UAS-CG7787RNAi.*
- *y w CragA P{neoFRT}19A/FM7c, P{GAL4-Kr.C}DC1, P{UAS-GFP.S65T}DC5.*
- *y w; P{UASp-YFP.Rab8.T22N}12.*
- *w; ; TI{TI}Rab8<sup>EYFP</sup>.*
- *y w; P{UASp-YFP.Rab10.T23N}25a.*
- *w; TI{TI}Rab10<sup>EYFP</sup>.*
- *w; ; NdgGFP.*
- *w; Mi{ET1}NdgMB12298*
- *y w; Mi{MIC}NdgMI15397*
- *w; Df(2R) BSC281 / CyO.*

- $w; Sco / Sm6aP(hsILMiT)2,4.$
- $w; ; BlmD3 / TM3, sb.$
- $w; ; BLmNi / TM3, sb.$
- $y2 cho2 v1; sco / Cy0.$
- $y2 cho2 v1; ; TM2 / TM6.$
- $y2 cho2 v1 P\{nos-Cas9, y+, v+\}1A / FM7c, KrGAL4 UAS-GFP.$
- $y1 P (act5c-Cas9, w+) M(3xP3-RFP.attP)\zeta H-2A w*.$

### **B. Sistema UAS/GAL4**

La técnica UAS/GAL4 permite una expresión ectópica, de una secuencia genética, controlada de forma temporal y espacial en *Drosophila melanogaster* (Brand y Perrimon, 1993). El sistema consta de: un factor de transcripción llamado GAL4 y una secuencia UAS (del inglés “upstream activation sequence”). El proceso es sencillo, la secuencia UAS es reconocida específicamente por el factor de transcripción GAL4 el cual se une e inicia una transcripción de la zona aguas abajo del UAS. La aplicación de este sistema consiste en combinar por un lado una línea transgénica que exprese el factor de transcripción GAL4 de manera específica en un tipo celular o en un tejido, junto a otra línea transgénica que presente la secuencia UAS seguida de una secuencia codificante de interés (Fig. 65). La actividad del factor GAL4 es dependiente de temperatura. En *Drosophila melanogaster* la temperatura experimental está comprendida entre los 18 °C y los 29 °C. Dentro de este rango, la actividad de GAL4 es mayor cuanto más alta sea la temperatura (Duffy, 2002).

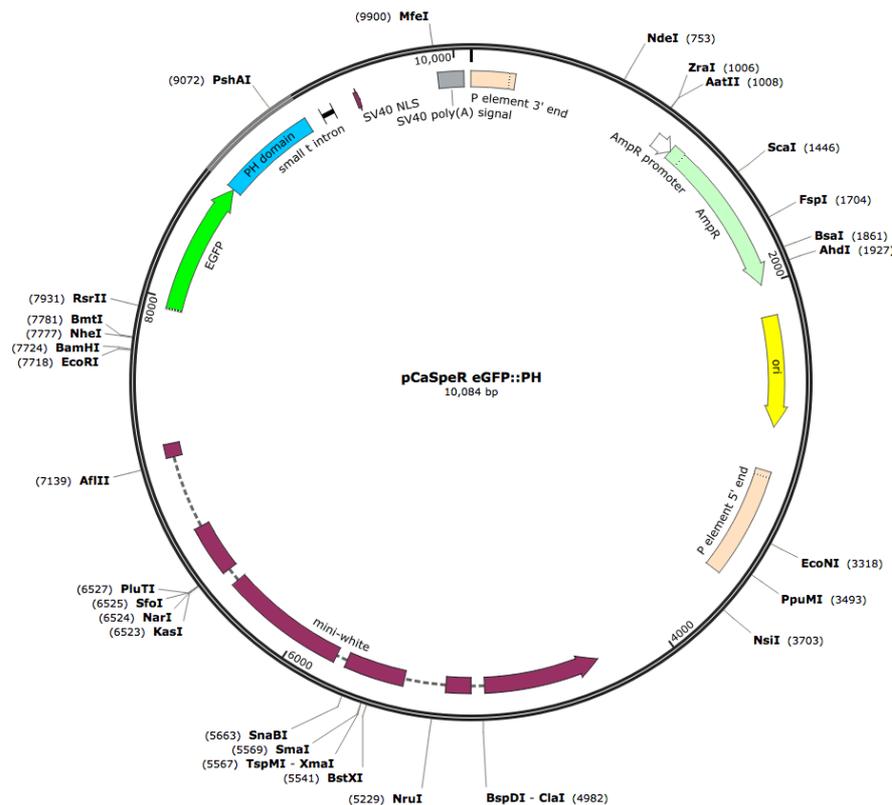


**Fig. 65.** Esquema del sistema UAS/GAL4, a través del cual se puede expresar una secuencia génica de interés (secuencia X) mediante el control indirecto de un promotor específico (promotor X). El género representado para los organismos parentales es aleatorio.

### C. Generación de moscas transgénicas.

Para poder visualizar los macrófagos in vivo se ha estado usando el sistema UAS/Gal4, estando la secuencia del Gal4 vinculada al promotor del gen *serpent*, y las secuencia UAS vinculada a la secuencia de una proteína verde fluorescente (GFP) y en otras ocasiones, a la proteína roja fluorescente (RFP). Para poder modificar genéticamente el sustrato por el que migran los macrófagos, la cuerda nerviosa, lo cual se realizó usando el sistema UAS/Gal4, y al mismo tiempo poder visualizar los macrófagos in vivo, se decidió generar moscas transgénicas que permitiera visualizar los macrófagos independientemente del sistema UAS/Gal4. Para ello se diseñaron dos construcciones plasmídicas diferentes, partiendo de los plásmidos pCasper eGFP::PH y pCasper eRFP::PH (Fig. 66) (Sanchez-Higueras et al., 2014). A ambos se les añadió una región reguladora del gen *serpent* llamada *srp.he\_T-Y* (3kb), la cual se expresa en los macrófagos embrionarios durante todo su desarrollo (Spahn et al., 2014). Estas construcciones además llevan insertada la secuencia del gen *miniwhite* de *Drosophila melanogaster*, lo que provoca que el ojo de la mosca en un fondo w<sup>-</sup> sea naranja o rojo, en función del número de copias de plásmido insertadas en el genoma de la misma. Este gen permite visualizar las moscas transgénicas en un fondo

w, facilitando la búsqueda de candidatos transgénicos. Tras el proceso de transgénesis se establecieron 5 líneas diferentes para el Srp-pCasper eGFP::PH y 5 para el Srp-pCasper eRFP::PH, en las cuales se testó si se visualizaban bien los macrófagos mediante filmación in vivo de embriones. En todas ellas se pudieron ver los macrófagos durante su migración a lo largo del embrión.



**Fig. 66.** Representación del plásmido pCasper eGFP::PH.

Los protocolos seguidos para realizar la transgénesis son los siguientes:

### **Digestión de DNA.**

1. Se añaden en un tubo eppendorf los siguientes productos:

- DNA genómico o DNA plasmídico a digerir 5 µL.
- Enzima de restricción 1 0,5 µL.
- Enzima de restricción 2 0,5 µL.
- Buffer (según las enzimas usadas) 2 µL.
- BSA (en función de las enzimas que se usen) 0,2 µL.
- Agua mq hasta 20 µL.

## Materiales y Métodos

2. Poner la digestión entre 2 y 3 horas en un baño a 37° C.
3. Correr la digestión en un gel de agarosa para aislar el producto de la digestión y conservar a -20° C hasta su uso.

### **Ligación**

1. Añadir los siguientes productos a un tubo eppendorf:
  - DNA a insertar en el plásmido, en este caso srp.he\_T-Y 5 µL.  
Aquí se hace un control de la ligación, añadiendo en otro tubo agua mq en lugar de DNA para comprobar la capacidad de religación del plásmido.
  - Plásmido pCasper eGFPP::H o pCasper eRFP::PH 1 µL.
  - Buffer de ligación 1 µL.
  - Enzima T4 ligasa 1 µL.
  - Agua mq hasta 10 µL.
2. Dejar la ligación a 10° C durante toda la noche.

### **Transformación**

1. Descongelar en hielo el volumen necesario de bacterias competentes E. Coli Dh5α para una transformación efectiva.
2. Mezclar 50 µL de las bacterias competentes con los 10 µL de la ligación en un tubo eppendorf y dejar durante 30 minutos en hielo.
3. Dar un golpe de calor a 42° C durante 45 segundos y volver a meter el tubo en hielo durante 2 minutos.
4. Añadir 900 µL de LB líquido e incubar 1 hora a 37° C.
5. Sembrar 100 µL de bacterias en una placa Petri de LB sólido con ampicilina.
6. El resto centrifugar durante un 1 minuto, quitar el sobrenadante y resuspender el pellet en 100 µL de LB líquido, sembrar en una placa Petri de LB sólido con ampicilina.
7. Incubar las placas Petri durante toda la noche (mínimo 12 horas) a 37° C.
8. Conservar placa Petri a 4° C hasta su uso.
9. De las colonias crecidas, seleccionar 2-3 colonias aisladas y crecer en 5 mL de LB líquido con penicilina para posteriormente realizar una miniprep, de forma, que se obtenga una concentración adecuada de ese plásmido y se pueda comprobar por digestión y PCR que contienen el fragmento a clonar.

Los plásmidos positivos se usaron en una posterior midiprep para obtener una concentración adecuada para su inyección en embriones de *Drosophila melanogaster*.

**Kits comerciales usados.**

- Kit midiprep: QIAGEN plasmid plus midi kit.
- Kit extracción de DNA de geles de agarosa: BIOLINE isolate II PCR.
- Kit miniprep: INTRON DNA-spin plasmid DNA purification.

## **II. Fijación de embriones.**

Protocolo de fijación extraído de Ashburner, 1989.

**Materiales necesarios para la fijación de embriones:**

- Placa de puesta rellena con agar y zumo de manzana (ver receta).
- Cestilla de recolección.
- Lejía.
- Agua destilada.
- Metanol.
- Vial de cristal.
- Solución de fijación: para cada vial añadir:
  - 5 mL de heptano.
  - 1.35 mL de formaldehído 37%.
  - 0.5 mL de PBS 10x (ver receta).
  - 3.15 mL Agua mq.

**Pasos a seguir para la fijación de embriones:**

1. Incubar durante 7-12 horas moscas del genotipo deseado en cajas de puestas sobre placas Petri rellenas con agar y zumo de manzana (ver recetas). La temperatura de incubación dependerá del tipo de experimento que se esté realizando, siempre será dentro del rango de 18 °C y 29 °C.
2. Recolectar los embriones de las placas de puesta, usando agua destilada y un pincel, filtrar los embriones a través de una cestilla de recolección.
3. Preparar el medio fresco de fijación en los viales (ver recetas).

4. Decoronar los embriones sumergiendo las cestillas en lejía 50% durante 5 minutos.
5. Lavar los embriones en las cestillas con abundante agua destilada.
6. Con un pincel recoger los embriones y añadirlos al vial que contiene el medio fresco de fijación. Este medio contiene dos fases, la inferior, acuosa, formada entre otros por el formaldehído y la superior formada por el heptano.
7. Agitar a 125 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los embriones quedarán en la interfase.
8. Descartar la fase acuosa del fondo (formaldehído).
9. Añadir 5 mL de metanol 100% y agitar fuerte durante 1 minuto. Este proceso perfora la capa vitelina de los embriones permitiendo la entrada posterior de los anticuerpos durante la inmunohistoquímica. En este paso se observan dos fases la superior formada por el heptano, y la inferior formada por el metanol, en esta última se encuentran los embriones fijados.
10. Recoger embriones precipitados y transferir a un eppendorf de 1.5 mL.
11. Añadir 2 mL de metanol 100% al vial y mezclar fuerte durante 1 minuto.
12. Recoger todos los embriones precipitados y transferir al mismo eppendorf.
13. Lavar 3-4 veces los embriones con metanol 100% para eliminar los restos de la membrana vitelina.
14. Almacenar en metanol a -20°C hasta su uso.

### **III. Hibridación in situ.**

Mediante esta técnica se puede obtener información sobre que células son las que transcriben un gen determinado. Para poder realizar esta técnica se necesita primero diseñar una sonda RNAm frente a la secuencia del gen de interés, en este caso el gen *LanB1*. Para ello, lo primero es saber qué región del DNA vamos a usar de modelo, normalmente un exón o el final de un exón y principio del siguiente. Tras seleccionar la zona a sondear, se debe diseñar una pareja de oligonucleótidos, sentido y antisentido, para mediante PCR obtener un fragmento del cDNA el cual se utilizará como sustrato para generar la sonda de RNAm. Este fragmento se purifica por columna y se resuspende en TE 1/10 en H<sub>2</sub>O DEPC. Una vez purificado se procedió a su transcripción para

generar la sonda de RNAm, la cual se utilizó para la hibridación in situ siguiendo el protocolo de Lécuyer et al., 2007; Wilk et al., 2010.

**Materiales necesarios para este protocolo:**

- H<sub>2</sub>O DEPC (ver receta).
- PBT tween 0,2% (ver receta).
- PBT tween 0,1% (ver receta).
- Kit “SP6/T7 Transcription” de Roche.
- Kit “DIG RNA labeling Mix” de Roche.
- Kit “TSA Signal Amplification” de Perkin Elmer

**Pasos a seguir para la hibridación in situ:**

**Generar Sonda.**

Seguir protocolo del kit “SP6/T7 Transcription” de Roche.

1. En un eppendorf estéril añadir:
  - 2 µg de DNA, volumen de 5 µL máximo.
  - 1 µL de 10x NTP labeling mixture.
  - 1 µL de 10x transcripción buffer.
  - 1 µL de 100mM DTT.
  - 1 µL de RNA polimerasa T7, T3 o SP6.
  - 1 µL de Protector RNase hinbitor.
  - Volumen final 10 µL.
2. Mezclar y dar un spin para que todo quede abajo.
3. Incubar durante 2 horas a 37° C.
4. Añadir 2 µL DNasa I, RNase-free para eliminar el DNA.
5. Incubar durante 15 minutos a 37° C.
6. Comprobar que la reacción de transcripción ha funcionado satisfactoriamente corriendo en un gel de agarosa 1 µL de reacción.
7. Una vez verificada la obtención de la sonda se para la reacción añadiendo 2 µL de 0,2 M EDTA.

## Materiales y Métodos

Los cebadores diseñados para la sonda son:

Sentido: GAGGATCCAGATGACGAAGC.

Antisentido:

CTAATACGACTCACTATAGGGCATAGGTCTCCGGCATAACAC.

### **Precipitar Sonda.**

Seguir protocolo del kit “DIG RNA labeling Mix” de Roche.

1. Añadir 2.5 µL de 4M LiCl y 75 µL de ethanol 100% (FRIO). Mezclar bien.
2. Dejar a -20° C al menos 2 horas, preferiblemente toda la noche.
3. Centrifugar a 13000g durante 15 minutos a 4° C.
4. Tirar el sobrenadante y lavar el pellet con 50 µL de ethanol 70% (H2O DEPC) frío.
5. Centrifugar a 13000g durante 5 minutos a 4° C.
6. Tirar el sobrenadante y secar el pellet.
7. Resuspender el pellet en 75 µL de solución de hibridación y conservar a -20° C hasta su uso.

### **Hibridación.**

1. Preparar solución: PBS 0,1% Tween y 4%formaldehido.
2. Fijar embriones según el protocolo mencionado anteriormente.
3. Refijar los embriones:
  - Retirar Metanol.
  - Añadir 1 mL de 3:1 metanol:PBST0,1% -4%formaldehido. Dejar durante 5 minutos en rotor orbital a temperatura ambiente. Retirar solución.
  - Añadir 1 mL de 1:3 metanol:PBST0,1% -4%formaldehido. Dejar durante 5 minutos en rotor orbital a temperatura ambiente. Retirar solución.
  - Añadir 1 mL de PBST0,1% -4%formaldehido. Dejar durante 10 minutos en rotor orbital a temperatura ambiente. Retirar solución.
4. Lavar con 1 mL de PBST0,1%. Dejar durante 5 minutos en rotor orbital a temperatura ambiente. Repetir 3 veces.
5. Lavar con 1:1 PBST0,1% : Solución de hibridación. Dejar durante 5 minutos en rotor orbital a temperatura ambiente. Retirar solución.

6. Lavar con 1 mL de Solución de hibridación. Dejar durante 5 minutos en rotor orbital a temperatura ambiente. Retirar solución.
7. Prehibridar con 0,5 mL de solución de hibridación. Dejar durante 1 hora a 55° C. Retirar solución.
8. Añadir 125 µL de solución de hibridación.
9. Añadir sonda en concentración que se requiera para su uso.
10. Incubar durante toda la noche a 55° C.
11. Lavar los embriones con 1 mL de solución de hibridación a 55° C, durante 20 minutos, mezclar ocasionalmente. Repetir 4 veces.
12. Lavar con 1:1 PBST0,1% : Solución de hibridación. Dejar durante 5 minutos en rotor orbital a temperatura ambiente. Retirar solución.
13. Lavar con 1 mL de PBST 0,2% durante 15 minutos en rotor orbital a temperatura ambiente. Repetir 4 veces. Retirar solución.
14. Añadir 0,5 mL de 1:2000 anti-DIG preabsorbido en PBST 0,2%. Incubar durante 1 hora en rotor orbital a temperatura ambiente. Retirar solución.
15. Lavar embriones con 1 mL de PBST 0,2% durante 15 minutos en rotor orbital a temperatura ambiente. Repetir 4 veces. Retirar solución.
16. Lavar embriones con 1 mL de AP buffer durante 5 minutos en rotor orbital a temperatura ambiente. Repetir 4 veces.
17. Añadir 0,5 mL de NBT/BCIP en cada tubo.
18. Mover hasta que los embriones empiecen a cambiar de color.
19. Parar revelado con PBST 0,2%.

## **IV. Inmunohistoquímica**

### **A. Tinción de embriones**

#### **Materiales necesarios para este protocolo:**

- BBT (ver receta).
- PBT tritón 0,3% (ver receta).
- Anticuerpos primarios.
- Anticuerpos secundarios.

### **Pasos a seguir para la tinción de embriones:**

1. Rehidratar embriones fijados con anterioridad según protocolo aquí expuesto. Retirar el máximo metanol posible del eppendorf donde se encuentran los embriones y añadir 1 mL de BBT. Incubar durante 1 hora en un rotor orbital a temperatura ambiente.
2. Incubar toda la noche a 4° C con los anticuerpos primarios diluidos en BBT (ver tabla de anticuerpos).
3. Lavar durante una 1 hora con 1 mL de BBT en un rotor orbital a temperatura ambiente.
4. Incubar con anticuerpos secundarios diluidos en 600 µL de BBT durante 2 horas en un rotor orbital a temperatura ambiente. De aquí en adelante la tinción debe estar protegida de la luz para preservar la fluorescencia.
5. Lavar durante 1 hora con 1 mL de PBT tritón 0,3% en un rotor orbital a temperatura ambiente.
6. Retirar el máximo posible de PBT tritón 0,3%.
7. Añadir medio de montaje (vectashield), conservar a 4° C grados hasta su uso.
8. Montar preparación en un portaobjetos.

### **B. Técnica TUNEL**

Esta técnica se ha utilizado para marcar los cuerpos apoptóticos presentes en embriones.

### **Materiales necesarios para este protocolo:**

- PTX (ver receta).
- CTX (ver receta).
- Kit TUNEL assay de Roche.

### **Pasos a seguir para para la tinción TUNEL.**

1. A partir de embriones fijados, retirar y enrasar tres veces con PTX.
2. Incubar durante 15 minutos con PTX en un rotor orbital a temperatura ambiente.
3. Retirar PTX y enrasar con CTX una vez.
4. Añadir CTX e incubar 30 minutos a 65° C.

5. Enrasar con PTX.
6. Retirar PTX y enrasar dos veces con “Tunel dilution buffer”.
7. Retirar, enrasar con “Tunel labeling” y dejar a 37 grados durante 5 minutos.
8. Retirar el “tunel labeling” e incubar con el mix de “Tunel enzyme:tunel labeling” a una concentración 1:10 durante toda la noche a 37° C.
9. Enrasar varias veces con PTX, si se desea teñir con otros anticuerpos realizar una tinción normal de embriones teniendo en cuenta que la señal de Tunel es con GFP, si no se desea teñir nada más, añadir medio de montaje. Vectashield y reservar a 4° C hasta su visualización.

### **C. Tinción de embriones con pERK o srp.**

Ciertos anticuerpos necesitan un protocolo especial de tinción, ya que necesitan una amplificación mayor de la señal, un ejemplo son las tinciones con anticuerpos anti pERK o anti srp. Para estas tinciones, se siguió el protocolo descrito en Helman and Paroush, 2010 y se usó el kit “TSA Signal Amplification” de Perkin Elmer.

#### **Materiales necesarios para este protocolo:**

- TNT (ver receta).
- TNB (ver receta).
- Anticuerpos primarios.
- Anticuerpos secundarios.
- “TSA Signal Amplification” de Perkin Elmer.

#### **Pasos a seguir para la tinción especial de embriones:**

1. Rehidratar los embriones prefijados. Retirar el máximo metanol posible del eppendorf donde se encuentran los embriones y lavar en diferentes pasos con 1 mL de metanol 70%, 50% y 30% en PBT 0.1% (tween-20), respectivamente. Agitar durante 2 minutos entre lavados.
2. Lavar los embriones con 300 µL de 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en buffer de amplificación procedente del Kit “TSA Signal Amplification” de Perkin Elmer. Incubar en agitación durante 10 minutos. En este paso, los embriones deben estar protegidos de la luz para evitar que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se deteriore.

## Materiales y Métodos

3. Lavar los embriones en 1 mL de TNT durante 5 minutos en agitación.
4. Incubar los embriones con 1 mL de TNB durante 30 minutos.
5. Añadir 300  $\mu$ L de TNB con los anticuerpos primarios que se deseen.
6. Lavar los embriones con 1 mL de TNT durante 20 minutos en agitación. Repetir 3 veces.
7. Incubar embriones en 300  $\mu$ L de TNB con secundarios asociados a biotina (en el caso de ratón anti dpERK y conejo anti srp) durante 1 hora en agitación. Añadir otros anticuerpos secundarios (asociados a fluoróforos) frente a los otros anticuerpos primarios.
8. Lavar los embriones con 1 mL de TNT durante 20 minutos en agitación.
9. Incubar los embriones con 300  $\mu$ L de streptavidin-HRP diluido 1:100 en TNB durante 20 minutos en agitación.
10. Lavar los embriones con 1 mL de TNT durante 20 minutos en agitación. Repetir 3 veces.
11. Incubar con 150  $\mu$ L del buffer de amplificación del kit “TSA Signal Amplification” de Perkin Elmer con tiramida asociada al fluoróforo deseado (cy2, cy3 o cy5) a una concentración 1:50. Dejar durante 10 minutos.
12. Lavar con 1 mL de TNT durante 20 minutos en agitación. repetir 3 veces.
13. Retirar el TNT y añadir medio de montaje (vectashield).

## V. Anticuerpos y microscopía

### A. Anticuerpos.

<b>Anticuerpos 1<sup>os</sup></b>	<b>Concentración</b>	<b>Procedencia</b>
Rata anti-RFP	1:200	Chromotek.
Conejo anti-LanB1	1:1000	Hybridoma Bank.
Conejo anti-Perlecan	1:600	Dr. A. González Reyes (sin publicar).
Pollo anti- $\beta$ Gal	1:500	Abcam.
Conejo anti-GFP	1:10000	Life Technologies.
Pollo anti-GFP	1:500	Abcam.
Ratón anti pERK	1:200	Abcam.
Conejo anti-srp	1:5000	Reuter, 1994.

Rata anti-Tropomiosina	1:400	Babrahan Bioscience Technologies.
Conejo anti-Ndg	1:100	Stefan Baumgartner.
Raton anti-pericardin	1:2	Michael Semeriva.
Raton anti-FASII	1:7	Hybridoma Bank.

### **Anticuerpos 2<sup>os</sup> (fluoróforo conjugado) Concentración Procedencia**

Cabra anti-IgG de conejo (Alexa 488)	1:200	Life Technologies.
Cabra anti-IgG de rata (Cy3)	1:200	Jackson.
Cabra anti-IgG de rata (Cy5)	1:200	Jackson.
Cabra anti-IgG de cobaya (555)	1:200	Life Technologies.
Cabra anti-IgG de ratón (488)	1:200	Life Technologies.
Cabra anti-IgG de conejo (Cy5)	1:200	Jackson.
Cabra anti-IgG de rata (Texas Red)	1:200	Life Technologies.
Cabra anti-IgG de pollo (488)	1:200	Life Technologies.
Cabra anti-IgG de pollo (568)	1:200	Life Technologies.

## **B. Microscopia.**

Todas las imágenes confocales se obtuvieron en los microscopios Leica SP2-AOBS, Spining Disc y Leica SP5 MP-AOBS, empleándose los objetivos 10x, 20x, 40x y 63x. Las imágenes adquiridas se procesaron y analizaron con los softwares: ImageJ (NIH, Bethesda), Imaris (bitplane) y Adobe Photoshop.

## **VI. Mapeo molecular de mutantes de Nidogen**

Para mapear molecularmente los mutantes de Nidogen generados mediante los saltos de elemento P y las deficiencias generadas con el sistema CRISPR, se amplificó mediante PCR la región de DNA genómico de la zona a delecionar o mutar de los distintos mutantes y de controles. Para diseñar los cebadores se usó una herramienta online, Primer3 (Untergasser et al., 2012), que facilita un diseño óptimo de cebadores .

Se utilizó la termocicladora MyCycler (Biorad).

La siguiente tabla muestra los cebadores usados para mapear genéticamente los mutantes generados a través de los saltos de elemento P y los originados por el sistema CRISPR:

<b>Nombre</b>	<b>Sequence</b>		<b>Tamaño Estimado</b>
<b>Ndg1</b>	<b>1</b>	GTGTGGACTCGGTGTGACTG	3995
	<b>2</b>	ACTTCGAACAGCCAGACTCC	
<b>Ndg2</b>	<b>1</b>	CCTTCGGCAGTAAGTTGCTC	3994
	<b>2</b>	GTGCTGTTGGACAGACAACG	
<b>Ndg3</b>	<b>1</b>	CGATCAAGCGGCGCAATATC	3429
	<b>2</b>	CCAACATGCCACAATGGGTG	
<b>Ndg4</b>	<b>1</b>	GTCTGAGTGGTTTCGGCAC	606
	<b>2</b>	TTTGCTTAAAGTGGGTGTTGC	
<b>Ndg5</b>	<b>1</b>	CCATTGTGGCATGTTGGATA	612
	<b>2</b>	TGTTTCGAAGGCGATACTCA	
<b>Ndg6</b>	<b>1</b>	AAACTGAAAAGCGGGGAAT	1905
	<b>2</b>	TTAATCAGTGCACCGCAGAG	
<b>Ndg7</b>	<b>1</b>	GATGAAGGAGGCAAAGCAAG	1575
	<b>2</b>	TTTTCATCTGCAGTGCGTTC	
<b>Ndg8</b>	<b>1</b>	GAGGAGCAGATACCCCAACA	2372
	<b>2</b>	CAGTGCCGTCATATTTGGTG	
<b>Ndg9</b>	<b>1</b>	GGATTCAGAGGCGATGGATA	2041
	<b>2</b>	GACCAGTTCCGTCCAGGTTA	
<b>Ndg10</b>	<b>1</b>	TTTCTGCCAGTTTTTCGCTTT	842
	<b>2</b>	CGTGTTGTTGGATTGTGGAG	
<b>Ndg11</b>	<b>1</b>	GTGCTGTGCCTCAGATGAAA	839
	<b>2</b>	GGGAACCCAATGTGCTTAGA	
<b>Ndg12</b>	<b>1</b>	TTACCTTCACGCACGATCAG	969
	<b>2</b>	GGCTGCGGCATTAGAGATAC	

Cebadores usados como control positivo de la reacción de PCR fueron:

Pelo F (sentido): GGTCTCCCACATTACAAAGTCCG.

Pelo R (antisentido): CATCATCATCGTCGCTGTCCTC.

**Pasos a seguir para realizar la reacción de PCR:**

1. A cada tubo de reacción se le añade:
  - GoTaq Flexi DNA pol (5U/ $\mu$ L) (Promega) 0,30  $\mu$ L
  - Buffer Green GoTaq Flexi (5x) (Promega) 4,00  $\mu$ L

- MgCl<sub>2</sub> (25mM) (Sigma) 2,00 µL
- dNTP mix (10mM cada uno) (Bioline) 0,50 µL
- Cebador sentido (10 µM) 0,50 µL
- Cebador antisentido (10 µM) 0,50 µL
- DNA 2,00 µL
- Agua mq 10,2 µL

2. Programa usado en el termociclador:

95° C 5 minutos

95° C 30 segundos	35x
60° C 30 segundos	35x
72° C xx segundos	35x

72° C 10 minutos

El valor xx depende de la pareja de cebadores, según la longitud que se amplifique ese valor cambia, la polimerasa amplifica 1 kb por cada 45 s.

Las muestras obtenidas se sometieron posteriormente a electroforesis en gel de agarosa (Sigma) 1 % en TBE (ver receta en la sección de recetas) 0,5X, y las bandas se visualizaron con RedSafe (iNtRON). Se purifican mediante columna y se enviaron a secuenciar a la empresa Biomedal.

## VII. Técnicas de filmación de imágenes in vivo.

En este apartado se detalla el protocolo para filmar embriones in vivo, para realizar heridas en el ectodermo del embrión y para realizar el experimento de trasplante de macrófagos.

### A. Filmación de imágenes in vivo.

**Para esta técnica se necesitan los siguientes materiales:**

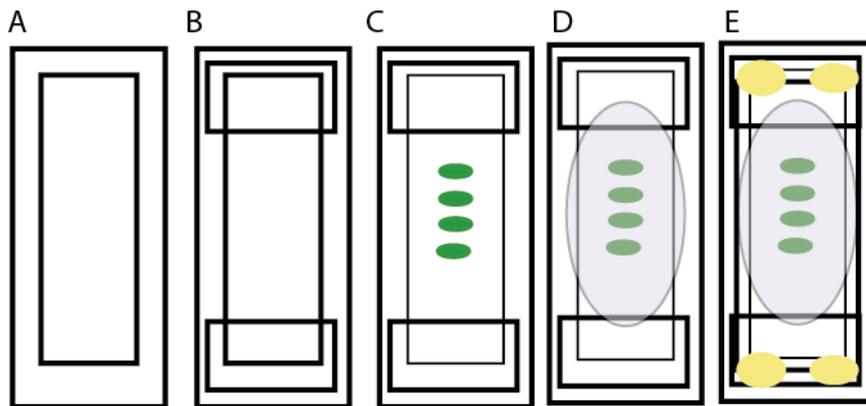
- Placa de puesta.
- Cestilla de recolección.
- Lejía.

## Materiales y Métodos

- Agua destilada.
- Cinta adhesiva doble cara.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Aguja de diseccionar.
- Aceite Voltalef 10s.

### **Para este experimento se siguieron los siguientes pasos:**

1. Incubar las moscas del genotipo deseado para recoger embriones en cajas de puestas sobre placas Petri rellenas con agar y zumo de manzana.
2. Recolectar embriones de las placas de puesta usando agua y un pincel y colocarlos en las cestillas de recolección.
3. Decoronar los embriones sumergiendo las cestillas en lejía durante 1:15 minutos.
4. Lavar los embriones en las cestillas con abundante agua. Dejar la cestilla sumergida en agua mientras se prepara el resto de materiales.
5. Colocar un trozo de cinta adhesiva de doble cara sobre un portaobjetos (Fig. 67 A). Depositar dos cubreobjetos en los extremos de la cinta de doble cara, para que actúen como puente (Fig. 67 B).
6. Sacar la cestilla con los embriones del agua y secar con cuidado sobre un papel secante. No dejar los embriones en la cestilla sin agua por más de 2 minutos, ya que se secarían.
7. Colocar la cestilla bajo la lupa y, con la ayuda de una aguja de diseccionar, seleccionar embriones donadores y hospedadores tempranos. Colocarlos sobre la cinta adhesiva de doble cara en fila y orientar de forma deseada, según el momento del desarrollo que queramos filmar (Fig. 67 C).
8. Colocar sobre los embriones una gota de aceite voltalef (Fig. 67 D).
9. Colocar un cubreobjetos rectangular sobre los cubreobjetos pequeños y sellar las esquinas con laca de uñas (Fig. 67 E). Así se crea una pequeña cámara con aceite y se evita que los embriones se rompan.
10. Filmar los embriones con un microscopio confocal Leica SP5 MP-AOBS durante el tiempo necesario. Las imágenes se captan cada 1 o 2 minutos.



**Fig. 67.** Representación de los pasos de preparación de los embriones para su filmación in vivo.

### **B. Realización de heridas en el ectodermo del embrión.**

La realización de heridas en la epidermis del embrión se realizó según viene descrito en el artículo Wood et al 2002.

#### **Para esta técnica se necesitan los siguientes materiales:**

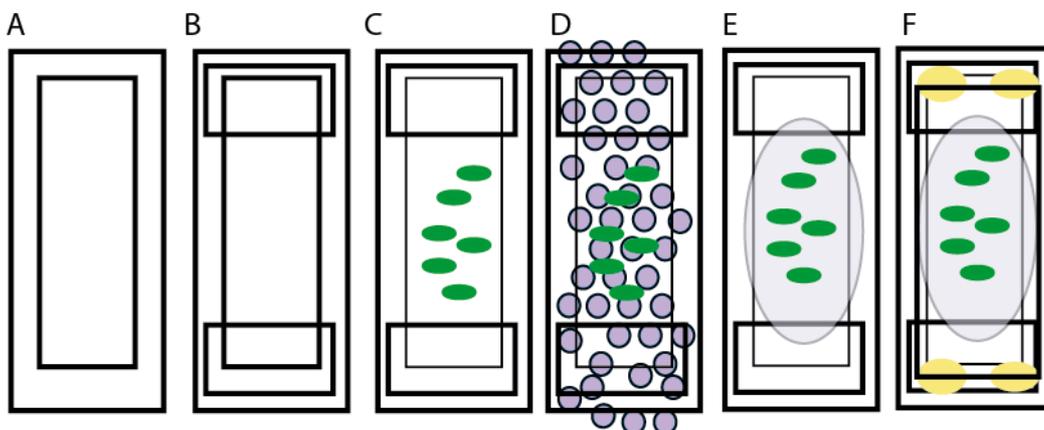
- Placa de puesta.
- Cestilla de recolección.
- Lejía.
- Agua destilada.
- Cinta adhesiva doble cara.
- Bolas de sílice.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Aguja de disecar.
- Aceite Voltalef 10s.

#### **Para este experimento se siguieron los siguientes pasos:**

1. Incubar las moscas del genotipo deseado, en cajas de puestas sobre placas Petri rellenas con agar y zumo de manzana.
2. Recolectar embriones de las placas de puesta usando agua y un pincel y colocarlos en las cestillas de recolección.
3. Decorionar los embriones sumergiendo las cestillas en lejía durante 1:15 minutos.

## Materiales y Métodos

4. Lavar los embriones en las cestillas con abundante agua. Dejar la cestilla sumergida en agua mientras se prepara el resto de materiales.
5. Colocar un trozo de cinta adhesiva de doble cara sobre un portaobjetos (Fig. 10 A). Depositar dos cubreobjetos en los extremos de la cinta de doble cara, para que actúen como puente (Fig. 10 B).
6. Preparar un recipiente con bolas sílice deshidratadas previamente a 60° C durante toda la noche.
7. Sacar la cestilla con los embriones del agua y secar con cuidado sobre un papel secante. No dejar los embriones en la cestilla sin agua por más de 2 minutos, ya que se secarían.
8. Colocar la cestilla bajo la lupa y, con la ayuda de una aguja de disecar, seleccionar embriones del estadio 15. Colocarlos sobre la cinta adhesiva de doble cara y orientar la zona dorsal hacia la cinta adhesiva.
9. Dejar el portaobjetos con los embriones sobre las bolas de sílice durante 1:15 minutos (Fig. 10 D) para deshidratarlos levemente.
10. Colocar sobre los embriones una gota de aceite voltalef (Fig. 10 E).
11. Colocar un cubreobjetos rectangular sobre los cubreobjetos pequeños y sellar las esquinas con laca de uñas (Fig. 10 F). Así se crea una pequeña cámara con aceite y se evita que los embriones se rompan.
12. Filmar los embriones con un microscopio confocal Spinning Disc, antes de la realización de la herida y después de la misma. La herida se realiza con un láser 405 al 100% de potencia y en un área de 40 micras.



**Fig. 68.** Esquema de los pasos a seguir para la realización de heridas en el embrión.

### **C. Trasplante de macrófagos.**

#### **Para esta técnica se necesitan los siguientes materiales:**

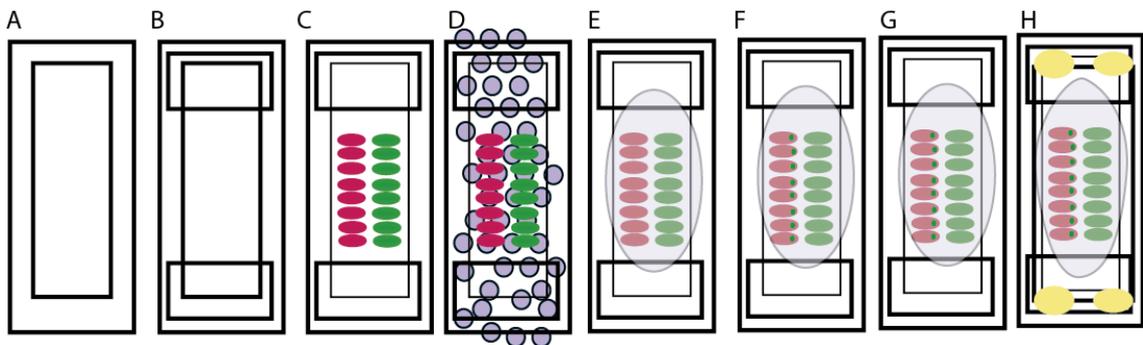
- Placa de puesta.
- Cestilla de recolección.
- Lejía.
- Agua destilada.
- Cinta adhesiva doble cara.
- Bolas de sílice.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Aguja de disecar.
- Aceite Voltalef 10s.
- Aguja de borosilicato cortada a los 9 mm.
- Micromanipulador de narishige.

#### **Para este experimento se siguieron los siguientes pasos:**

1. Incubar las moscas del genotipo deseado, “w;;srpGal4:UAS-RFP”, “w;DfLam;srpGal4:UAS-GFP” y “w;;srpGal4:UAS-GFP” para recoger embriones hospedadores y donadores respectivamente, en cajas de puestas sobre placas Petri rellenas con agar y zumo de manzana.
2. Recolectar embriones de las placas de puesta usando agua y un pincel y colocarlos en las cestillas de recolección.
3. Decorionar los embriones sumergiendo las cestillas en lejía durante 1:15 minutos.
4. Lavar los embriones en las cestillas con abundante agua. Dejar la cestilla sumergida en agua mientras se prepara el resto de materiales.
5. Colocar un trozo de cinta adhesiva de doble cara sobre un portaobjetos (Fig. 69 A). Depositar dos cubreobjetos en los extremos de la cinta de doble cara, para que actúen como puente (Fig. 69 B).
6. Preparar un recipiente con bolas sílice deshidratadas previamente a 60° C durante toda la noche.

## Materiales y Métodos

7. Sacar la cestilla con los embriones del agua y secar con cuidado sobre un papel secante. No dejar los embriones en la cestilla sin agua por más de 2 minutos, ya que se secarían.
8. Colocar la cestilla bajo la lupa y, con la ayuda de una aguja de disección, seleccionar embriones donadores y hospedadores tempranos. Colocarlos sobre la cinta adhesiva de doble cara en dos filas paralelas, de manera que los embriones donadores (Fig. 69 C-verdes) y hospedadores (Fig. 69 C-rojos) se enfrenten a los hospedadores (Fig. 69 C).
9. Dejar el portaobjeto con los embriones sobre las bolas de sílice durante 1:15 minutos (Fig. 69 D) para deshidratarlos levemente.
10. Colocar sobre los embriones una gota de aceite voltalef (Fig. 69 E).
11. Con una aguja de inyección de borosilicato conectada al micromanipulador de narishige ir succionando material en la zona de la cabeza de los embriones donadores e inyectar las células succionadas en la zona de la cabeza de un embrión receptor. Repetir el proceso, tantas veces como embriones tengamos en la preparación (Fig. 69 F).
12. Introducir el porta en una placa Petri con papel humedecido, para preservar un cierto grado de humedad, y dejar a 25 grados durante 3 horas para que la herida se cierre y el embrión se desarrolle con normalidad (Fig. 69 G).
13. Colocar un cubreobjetos rectangular sobre los cubreobjetos pequeños y sellar las esquinas con laca de uñas (Fig. 69 H). Así se crea una pequeña cámara con aceite y se evita que los embriones se rompan.
14. Filmar los embriones con un microscopio confocal Leica SP5 MP-AOBS durante una hora. Las imágenes se captan cada 1 minuto.



**Fig. 69.** Esquema de los pasos a seguir para la realización del trasplante de macrofagos.

## VIII. Análisis estadístico

En este trabajo se han comparado estadísticamente las diferencias entre diferentes genotipos en algunas variables de interés. Para ello, se realizó el test de T de Student. Las cuantificaciones se han representado de la siguiente manera: las barras representan la media y las barras de error, el error de la desviación estándar.

El número de macrófagos cuantificados individualmente siempre han procedido de un número de embriones igual o superior a 5.

## IX. Recetas

### Placas de LB:

1. Derretir 200 mL de LB sólido.
2. Añadir el antibiótico deseado a la concentración necesaria, en función de la resistencia que presente el plásmido usado, en nuestro caso para los plásmidos pCasper se usa penicilina a una concentración final de 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .
3. Repartir en las placas de Petri estériles y dejar enfriar antes de tapar y conservar a 4° C hasta su uso.

### Placas de manzana (1 L):

1. Mezclar 15 g de Glucosa (Sigma), 25 g de agar (Sigma) y 750 mL de agua mq.
2. Disolver la mezcla en el microondas y añadir 250 mL de zumo de manzana.
3. Cuando la temperatura descienda a 65 °C añadir 5 mL de penicilina-estreptomicina.

#### Penicilina-Estreptomicina (100mL):

Penicilina G (Life Technologies)	0,6 g.
Estreptomicina (Life Technologies)	1 g.
NaCl (Sigma)	0,9 g.
Agua mq	hasta completar 100 mL.

4. Añadir 5 mL de Nipagín (sigma) 10% en etanol.
5. Plaquesear, y una vez solidificada la mezcla, almacenar a 4 °C hasta su uso.

**PBS 10 x:**

Disolver 10 tabletas PBS Gibco en 500 mL de agua mq.

**BBT**

PBS 10X	50mL.
Tritón X-100 al 10%	15 mL.
BSA 0,5%	2,5 gr.
Agua mq	hasta los 500 mL.

**PBT triton 0,3% o PTX (500 mL):**

PBS 10x	50 mL.
Tritón (Sigma)	0,3 mL.
Agua mq	449 mL.

**PBT tween 0,2% o PBST 0,2% (500 mL):**

PBS 10x	50 mL.
Tween (Sigma)	0,2 mL.
Agua mq	449 mL.

**PBT tween 0,1% o PBST 0,1% (500 mL):**

PBS 10x	50 mL.
Tween (Sigma)	0,1 mL.
Agua mq	449 mL.

**Metanol 70%, 50% y 30 % en PBS al 0.1% de tween-20.**

	Agua mq (mL)	PBS 10x (mL)	Metanol (mL)	Tween-20 al 0.1% (mL)	Total (mL)
<b>Metanol 70</b>	10	5	35	0.05	50
<b>Metanol 50</b>	20	5	25	0.05	50
<b>Metanol 30</b>	30	5	15	0.05	50

**TNT**

Tris HCL pH=7.5 1M	50 mL.
NaCl	15 mL.
Tween-20	0.25 mL.
Agua mq	hasta completar 500 mL.

**TNB**

Tris HCL pH=7.5 1M	50 mL.
NaCl	15 mL.
Bloqueante del kit “TSA Signal Amplification” de Perkin Elmer	2.5 g.
Agua mq	hasta completar 500 mL.

**TBE 5x (500 mL):**

Tris base (Sigma)	27 g.
Ácido bórico (Sigma)	13,75 g.
EDTA (Sigma) 0,5 M pH 8	10 mL.
Agua mq	hasta completar 500 mL.

**Preparación de geles de agarosa al 0,8%**

1. Añadir 0,2 gramos de agar a un matraz.
2. Añadir 25 mL de TBE 0,5x al matraz.
3. Calentar el matraz hasta que se disuelva el agar por completo.
4. Añadir 1,25 µl del marcador de DNA (RedSafe).
5. Agitar con suavidad y verter sobre el molde. Colocar el peine con el tamaño de pocillo deseado y dejar enfriar.

**CTX (50 mL):**

Citrato sódico 1M	5 mL.
Triton (Sigma)	0,03 mL.
Agua mq	45 mL.

# Bibliografía

**Bibliografía.**

- Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I. y Steller, H.** (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**, 29-43.
- Agaisse, H., Petersen, U. M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B. y Perrimon, N.** (2003). Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev. Cell* **5**, 441-450.
- Andrae, J., Gallini, R. y Betsholtz, C.** (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 1276-1312.
- Anton, E. S., Kreidberg, J. a y Rakic, P.** (1999). Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* **22**, 277-289.
- Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J. R. y Yamada, Y.** (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.* **23**, 354-358.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook*.
- Assaker, G., Ramel, D., Wculek, S. K., González-Gaitán, M. y Emery, G.** (2010). Spatial restriction of receptor tyrosine kinase activity through a polarized endocytic cycle controls border cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 22558-63.
- Aumailley, M., Battaglia, C., Mayer, U., Reinhardt, D., Nischt, R., Timpl, R. y Fox, J. W.** (1993). Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney Int.* **43**, 7-12.
- Aumailley, M., Brucknertuderman, L., Carter, W., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E. y Jones, J.** (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* **24**, 326-332.
- Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G. y Yayon, A.** (1994). Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* **79**, 1005-1013.
- Babbey, C. M., Ahktar, N., Wang, E., Chih-Hsiung Chen, C., Grant, B. D. y Dunn, K. W.** (2006). Rab10 Regulates Membrane Transport through Early Endosomes of Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3156-3175.
- Babcock, D. T., Brock, A. R., Fish, G. S., Wang, Y., Perrin, L., Krasnow, M. a y Galko, M. J.** (2008). Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10017-10022.
- Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D. y Hynes, R. O.** (1998). Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* **95**, 507-519.
- Bader, B. L., Smyth, N., Nedbal, S., Baranowsky, A., Mokkapati, S., Miosge, N., Murshed, M., Nischt, R., Baranowsky, A., Mokkapati, S., et al.** (2005). Compound Genetic Ablation of Nidogen 1 and 2 Causes Basement Membrane Defects and Perinatal Lethality in Mice. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6846-6856.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. y Horvath, P.** (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science (80-. ).* **315**, 1709-1712.
- Bassett, A., Tibbit, C., Ponting, C. y Liu, J.** (2013). Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep.* **4**, 220-8.

- Baum, P. D. y Garriga, G.** (1997). Neuronal migrations and axon fasciculation are disrupted in *ina-1* integrin mutants. *Neuron* **19**, 51-62.
- Bean, D. M., Heimbach, J., Ficorella, L., Micklem, G., Oliver, S. G. y Favrin, G.** (2014). esyN: Network building, sharing and publishing. *PLoS One* **9**, 1-5.
- Benson, S., Page, L., Ingersoll, E., Rosenthal, E., Dungca, K. y Signor, D.** (1999). Developmental characterization of the gene for laminin alpha-chain in sea urchin embryos. *Mech. Dev.* **81**, 37-49.
- Bökel, C. y Brown, N. H.** (2002). Integrins in development: Moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev. Cell* **3**, 311-321.
- Boube, M., Martin-Bermudo, M. D., Brown, N. H. y Casanova, J.** (2001). Specific tracheal migration is mediated by complementary expression of cell surface proteins. *Genes Dev.* **15**, 1554-1562.
- Bradshaw, A. D.** (2009). The role of SPARC in extracellular matrix assembly. *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 239-246.
- Brand, a H. y Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Bretscher, M. S.** (1976). Directed lipid flow in cell membranes. *Nature* **260**, 21-3.
- Bridgewater, R. E., Norman, J. C. y Caswell, P. T.** (2012). Integrin trafficking at a glance. *J. Cell Sci.* **125**, 3695-3701.
- Broadie, K., Baumgartner, S. y Prokop, A.** (2011). Extracellular matrix and its receptors in *Drosophila* neural development. *Dev. ...* **71**, 1102-30.
- Brown, E. J.** (1986). The Role of Extracellular Matrix in the Control of Phagocytosis Proteins. *J. Leukoc. Biol.* **39**, 579-591.
- Brown, N. H.** (2000). Cell-cell adhesion via the ECM: Integrin genetics in fly and worm. *Matrix Biol.* **19**, 191-201.
- Brown, N. H.** (2011). Extracellular matrix in development: Insights from mechanisms conserved between invertebrates and vertebrates. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1-14.
- Brückner, K., Kockel, L., Duchek, P., Luque, C. M., Rørth, P. y Perrimon, N.** (2004). The PDGF / VEGF Receptor Controls Blood Cell Survival in *Drosophila*. *Dev. Cell* **7**, 73-84.
- Bunt, S., Hooley, C., Hu, N., Scahill, C., Weavers, H. y Skaer, H.** (2010). Hemocyte-secreted type IV collagen enhances BMP signaling to guide renal tubule morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Cell* **19**, 296-306.
- Carragher, N. O. y Frame, M. C.** (2004). Focal adhesion and actin dynamics: A place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol.* **14**, 241-249.
- Chan, C. C., Scoggin, S., Wang, D., Cherry, S., Dembo, T., Greenberg, B., Jin, E. J., Kuey, C., Lopez, A., Mehta, S. Q., et al.** (2011). Systematic discovery of Rab GTPases with synaptic functions in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **21**, 1704-1715.
- Chang, J., Zhou, Y., Hu, X., Lam, L., Henry, C., Green, E. M., Kita, R., Kobor, M. S. y Fraser, H. B.** (2013). The Molecular Mechanism of a Cis-Regulatory Adaptation in Yeast. *PLoS Genet.* **9**, 1-8.
- Charras, G. y Sahai, E.** (2014). Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 813-824.
- Chen, W. y Wandinger-Ness, A.** (2001). Expression and functional analyses of Rab8 and Rab11a in exocytic transport from trans-Golgi network. *Methods Enzymol.* **329**, 165-175.

- Chen, Y. T., Holcomb, C. y Moore, H. P.** (1993). Expression and localization of two low molecular weight GTP-binding proteins, Rab8 and Rab10, by epitope tag. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 6508-6512.
- Chia, J., Kusuma, N., Anderson, R., Parker, B., Bidwell, B., Zamurs, L., Nice, E. y Pouliot, N.** (2007). Evidence for a role of tumor-derived laminin-511 in the metastatic progression of breast cancer. *Am. J. Pathol.* **170**, 2135-2148.
- Chihara, T., Kato, K., Taniguchi, M., Ng, J. y Hayashi, S.** (2003). Rac promotes epithelial cell rearrangement during tracheal tubulogenesis in *Drosophila*. *Development* **130**, 1419-1428.
- Cho, N. K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F. y Krasnow, M. A.** (2002). Developmental control of blood cell migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell* **108**, 865-76.
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M. y Kim, J.-S.** (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* **31**, 230-2.
- Choi, J. S.-P. y Jones, A. Y.-M.** (2005). Effects of manual hyperinflation and suctioning in respiratory mechanics in mechanically ventilated patients with ventilator-associated pneumonia. *Aust. J. Physiother.* **51**, 25-30.
- Clauss, M.** (2000). Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin. Thromb. Hemost.* **26**, 561-569.
- Coles, E. G., Gammill, L. S., Miner, J. H. y Bronner-Fraser, M.** (2006). Abnormalities in neural crest cell migration in laminin alpha5 mutant mice. *Dev Biol* **289**, 218-228.
- Comber, K., Huelsmann, S., Evans, I. I., Sánchez-Sánchez, B. J. B., Reuter, R., Wood, W., Martín-bermudo, M. D. M. D., Chalmers, A., Reuter, R., Wood, W., et al.** (2013). A dual role for the  $\beta$ PS integrin myospheroid in mediating *Drosophila* embryonic macrophage migration. *J. cell ...* **126**, 3475-84.
- Comoglio, P. M., Boccaccio, C. y Trusolino, L.** (2003). Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: Breaking the rules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 565-571.
- Cong, L., Ran, F., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. a. LA, et al.** (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819-23.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszodi, A., Mergelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R. y Fessler, R.** (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J. Cell Biol.* **147**, 1109-1122.
- Costell, M., Carmona, R., Gustafsson, E., González-Iriarte, M., Fessler, R. y Muñoz-Chapuli, R.** (2002). Hyperplastic conotruncal endocardial cushions and transposition of great arteries in perlecan-null mice. *Circ. Res.* **91**, 158-164.
- Daley, W. P. y Yamada, K. M.** (2013). ECM-modulated cellular dynamics as a driving force for tissue morphogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 408-14.
- Datta, S. y Kankel, D. R.** (1992). *l(1)trol* and *l(1)devl*, loci affecting the development of the adult central nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **130**, 523-537.
- De Arcangelis, A. y Georges-Labouesse, E.** (2000). Integrin and ECM functions: Roles in vertebrate development. *Trends Genet.* **16**, 389-395.
- Denef, N., Chen, Y., Weeks, S. D., Barcelo, G. y Schüpbach, T.** (2008). Crag regulates epithelial architecture and polarized deposition of basement membrane proteins in *Drosophila*. *Dev. Cell* **14**, 354-364.

- Dicarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J. y Church, G. M.** (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4336-4343.
- Diekmann, Y., Seixas, E., Gouw, M., Tavares-Cadete, F., Seabra, M. C. y Pereira-Leal, J. B.** (2011). Thousands of Rab GTPases for the cell biologist. *PLoS Comput. Biol.* **7**,.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblauer, S., et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151-156.
- Ding, Q., Regan, S., Xia, Y., Oostrom, L., Cowan, C. y Musunuru, K.** (2013). Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell stem* **12**, 393-394.
- Domínguez-Giménez, P., Brown, N. H. y Martín-Bermudo, M. D.** (2007). Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the *Drosophila* wing epithelium. *J. Cell Sci.* **120**, 1061-1071.
- Duchek, P., Somogyi, K., Jékely, G., Beccari, S. y Rørth, P.** (2001). Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell* **107**, 17-26.
- Duffy, J. B.** (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1-15.
- Dunst, S., Kazimiers, T., von Zadow, F., Jambor, H., Sagner, A., Brankatschk, B., Mahmoud, A., Spann, S., Tomancak, P., Eaton, S., et al.** (2015). Endogenously Tagged Rab Proteins: A Resource to Study Membrane Trafficking in *Drosophila*. *Dev. Cell* **33**, 351-365.
- Durbeej, M.** (2010). Laminins. *Cell Tissue Res.* **339**, 259-268.
- Eckes, B., Kessler, D., Aumailley, M. y Krieg, T.** (1999). Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* **21**, 415-429.
- Elias, M., Brighouse, a., Gabernet-Castello, C., Field, M. C. y Dacks, J. B.** (2012). Sculpting the endomembrane system in deep time: high resolution phylogenetics of Rab GTPases. *J. Cell Sci.* **125**, 2500-2508.
- Evans, I. R., Hu, N., Skaer, H. y Wood, W.** (2010). Interdependence of macrophage migration and ventral nerve cord development in *Drosophila* embryos. *Development* **137**, 1625-1633.
- Evans, I., Ghai, P., Urbančič, V., Tan, K.-L. y Wood, W.** (2013). SCAR/WAVE-mediated processing of engulfed apoptotic corpses is essential for effective macrophage migration in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* **20**, 709-20.
- Fan D et al.** (2012). Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, 1-13.
- Fessler, J. y Fessler, L.** (1989). *Drosophila* extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Biol.*
- Fessler, L. I., Campbell, a G., Duncan, K. G. y Fessler, J. H.** (1987). *Drosophila* laminin: characterization and localization. *J. Cell Biol.* **105**, 2383-91.
- Fessler, L., Nelson, R. E. y Fessler, J.** (1994). *Drosophila* extracellular matrix. En *Methods in enzymology*, pp. 271-294.
- Forsberg-Nilsson, K., Behar, T. N., Afrakhte, M., Barker, J. L. y McKay, R. D.** (1998). Platelet-derived growth factor induces chemotaxis of neuroepithelial stem cells. *J. Neurosci. Res.* **53**, 521-30.
- Fox, J., Mayer, U., Nischt, R., Aumailley, M., Reinhardt, D., Wiedemann, H.,**

- Mann, K., Timpl, R., Krieg, T., Engel, J., et al.** (1991). Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J.* **10**, 3137-46.
- Franc, N. C.** (1999). Requirement for Croquemort in Phagocytosis of Apoptotic Cells in *Drosophila*. *Science (80-. )*. **284**, 1991-1994.
- Franc, N., Dimarcq, J., Lagueux, M., Hoffmann, J. y Ezekowitz, R.** (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**, 431-443.
- Frank, D. E. y Carter, W. G.** (2004). Laminin 5 deposition regulates keratinocyte polarization and persistent migration. *J. Cell Sci.* **117**, 1351-1363.
- Friedrich, M. V, Schneider, M., Timpl, R. y Baumgartner, S.** (2000). Perlecan domain V of *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. ...* **267**, 3149-3159.
- Gallegos, M. E., Balakrishnan, S., Chandramouli, P., Arora, S., Azameera, A., Babushekar, A., Bargoma, E., Bokhari, A., Chava, S. K., Das, P., et al.** (2012). The *C. elegans* Rab Family: Identification, Classification and Toolkit Construction. *PLoS One* **7**,
- Garg, A. y Wu, L. P.** (2014). *Drosophila* Rab14 mediates phagocytosis in the immune response to staphylococcus aureus. *Cell. Microbiol.* **16**, 296-310.
- Goldenring, J. R.** (2013). A central role for vesicle trafficking in epithelial neoplasia: intracellular highways to carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **13**, 813-820.
- Gorski, J. P. y Olsen, B. R.** (1998). Mutations in extracellular matrix molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 586-593.
- Gratz, S. J. S., Cummings, A. M. A., Nguyen, J. J. N., Hamm, D. D. C., Donohue, L. K. L., Harrison, M. M., Wildonger, J. y O'Connor-Giles, K. M.** (2013). Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* **194**, 1029-1035.
- Guilak, F., Alexopoulos, L. G., Upton, M. L., Youn, I., Choi, J. B., Cao, L., Setton, L. A. y Haider, M. A.** (2006). The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1068**, 498-512.
- Gumbiner, B. M.** (1996). Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357.
- Gupta, M. C., Graham, P. L. y Kramer, J. M.** (1997). Characterization of alpha1(IV) collagen mutations in *Caenorhabditis elegans* and the effects of alpha1 and alpha2(IV) mutations on type IV collagen distribution. *J. Cell Biol.* **137**, 1185-96.
- Haigo, S. L. y Bilder, D.** (2011). Global Tissue Revolutions in a Morphogenetic Movement Controlling Elongation. *Science (80-. )*. **331**, 1071-1074.
- Hamill, K. J., Kligys, K., Hopkinson, S. B. y Jones, J. C. R.** (2009). Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *J. Cell Sci.* **122**, 4409-17.
- Hanna, S. y El-Sibai, M.** (2013). Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell. Signal.* **25**, 1955-1961.
- Hartenstein, V.** (1993). *Atlas of Drosophila Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hattula, K., Furuhejm, J., Tikkanen, J., Tanhuanpää, K., Laakkonen, P. y Peränen, J.** (2006). Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation. *J. Cell Sci.* **119**, 4866-77.
- Hayashi, Y. K., Chou, F. L., Engvall, E., Ogawa, M., Matsuda, C., Hirabayashi, S.,**

- Yokochi, K., Ziober, B. L., Kramer, R. H., Kaufman, S. J., et al.** (1998). Mutations in the integrin alpha7 gene cause congenital myopathy. *Nat. Genet.* **19**, 94-97.
- Heino, T. I., Kärpänen, T., Wahlström, G., Pulkkinen, M., Eriksson, U., Alitalo, K. y Roos, C.** (2001). The Drosophila VEGF receptor homolog is expressed in hemocytes. *Mech. Dev.* **109**, 69-77.
- Helman, A. y Paroush, Z.** (2010). *MAP Kinase Signaling Protocols*. (ed. Seger, R.) Totowa, NJ: Humana Press.
- Henderson, D. J. y Copp, A. J.** (1997). Role of the extracellular matrix in neural crest cell migration. *J. Anat.* **191**, 507-515.
- Hoch, R. V y Soriano, P.** (2003). Roles of PDGF in animal development. *Development* **130**, 4769-4784.
- Hoffmann, J. a y Reichhart, J.-M.** (2002). Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.* **3**, 121-126.
- Hollfelder, D., Frasch, M. y Reim, I.** (2014). Distinct functions of the laminin  $\beta$  LN domain and collagen IV during cardiac extracellular matrix formation and stabilization of alary muscle attachments revealed by EMS mutagenesis in Drosophila. *BMC Dev. Biol.* **49**, 26.
- Holz, A., Bossinger, B. y Strasser, T.** (2003). The two origins of hemocytes in Drosophila. *Development* 4955-4962.
- Hopf, M., Göhring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y. y Timpl, R.** (1999). Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur. J. Biochem.* **259**, 917-925.
- Horwitz, R. y Webb, D.** (2003). Cell Migration. *Curr. Biol.* **13**, 756-759.
- Hresko, M. C., Williams, B. D. y Waterston, R. H.** (1994). Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **124**, 491-506.
- Huang, C. -c.** (2003). Laminin subunits and their role in *C. elegans* development. *Development* **130**, 3343-3358.
- Huang, C., Jacobson, K. y Schaller, M. D.** (2004). MAP kinases and cell migration. *J. Cell Sci.* **117**, 4619-4628.
- Huelsmann, S., Hepper, C., Marchese, D., Knöll, C. y Reuter, R.** (2006). The PDZ-GEF dizzy regulates cell shape of migrating macrophages via Rap1 and integrins in the Drosophila embryo. *Development* **133**, 2915-24.
- Hutagalung, A. H. y Novick, P. J.** (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* **91**, 119-49.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Shengdar, Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. J. y Keith, J.** (2013). Efficient In Vivo Genome Editing Using RNA-Guided Nucleases Woong. *Nat. Biotechnol.* **31**, 227-229.
- Hynes, R. O.** (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Hynes, R. O.** (2009). The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science (80-. )*. **326**, 1216-1219.
- Hynes, R. O. y Zhao, Q.** (2000). The Evolution of Cell Adhesion. *Cell* **150**, 89-95.
- Ishikawa, T., Wondimu, Z., Oikawa, Y., Gentilcore, G., Kiessling, R., Egyhazi Brage, S., Hansson, J. y Patarroyo, M.** (2014). Laminins 411 and 421 differentially promote tumor cell migration via  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 integrin and MCAM (CD146). *Matrix Biol.* **38**, 69-83.

- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. y Nakata, A.** (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429-33.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. y Charpentier, E.** (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (80-. )*. **337**, 816-821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. y Doudna, J.** (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* **2013**, 1-9.
- Kahn, E. D. F.** (2010). Anatomy, Histology, Embryology, and Developmental Anomalies of the Small and Large Intestine. En *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease - 2 Volume Set*, pp. 1615-1640.
- Kalluri, R.** (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 422-433.
- Kang, S. H. y Kramer, J. M.** (2000). Nidogen is nonessential and not required for normal type IV collagen localization in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3911-23.
- Kao, G., Huang, C. C., Hedgecock, E. M., Hall, D. H. y Wadsworth, W. G.** (2006). The role of the laminin ?? subunit in laminin heterotrimer assembly and basement membrane function and development in *C. elegans*. *Dev. Biol.* **290**, 211-219.
- Katz, a, Fish, a J., Kleppel, M. M., Hagen, S. G., Michael, a F. y Butkowski, R. J.** (1991). Renal entactin (nidogen): isolation, characterization and tissue distribution. *Kidney Int.* **40**, 643-652.
- Kawataki, T., Yamane, T., Naganuma, H., Rousselle, P., Andur??n, I., Tryggvason, K., Patarroyo, M., Andurén, I., Tryggvason, K. y Patarroyo, M.** (2007). Laminin isoforms and their integrin receptors in glioma cell migration and invasiveness: Evidence for a role of alpha5-laminin(s) and alpha3beta1 integrin. *Exp. Cell Res.* **313**, 3819-3831.
- Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J. y Connolly, D. T.** (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science (80-. )*. **246**, 1309-1312.
- Kim, S. y Wadsworth, W. G.** (2000). Positioning of longitudinal nerves in *C. elegans* by nidogen. *Science (80-. )*. **288**, 150-154.
- Kim, S. H., Turnbull, J. y Guimond, S.** (2011). Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* **209**, 139-151.
- Kjoller, L. y Hall, a** (1999). Signaling to Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* **253**, 166-179.
- Klöpffer, T. H., Kienle, N., Fasshauer, D. y Munro, S.** (2012). Untangling the evolution of Rab G proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biol.* **10**, 71.
- Knibiehler, B. y Mirre, C.** (1987). Haemocytes accumulate collagen transcripts during *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Roux's Arch. ...* 243-247.
- Knox, S. M. y Whitelock, J. M.** (2006). Perlecan: How does one molecule do so many things? *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2435-2445.
- Kohfeldt, E., Sasaki, T., Göhring, W. y Timpl, R.** (1998). Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J. Mol. Biol.* **282**, 99-109.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. y Lim, L.** (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs

- and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1942-52.
- Kubota, Y., Ohkura, K., Tamai, K. K. K., Nishiwaki, K., Nagata, K. y Nishiwaki, K.** (2008). MIG-17/ADAMTS controls cell migration by recruiting nidogen to the basement membrane in *C. elegans*. *Proc. ...* **105**, 20804-20809.
- Kuk, C., Gunawardana, C. G., Soosaipillai, A., Kobayashi, H., Li, L., Zheng, Y. y Diamandis, E. P.** (2010). Nidogen-2: A new serum biomarker for ovarian cancer. *Clin. Biochem.* **43**, 355-361.
- Kurant, E., Axelrod, S., Leaman, D. y Gaul, U.** (2008). Six-Microns-Under Acts Upstream of Draper in the Glial Phagocytosis of Apoptotic Neurons. *Cell* **133**, 498-509.
- Kusche-Gullberg, M., Garrison, K., Mackrell, A. J., Fessler, L. I. y Fessler, J. H.** (1992). Laminin A chain: expression during *Drosophila* development and genomic sequence. *EMBO J.* **11**, 4519-27.
- Kusuma, S., Zhao, S. y Gerecht, S.** (2012). The extracellular matrix is a novel attribute of endothelial progenitors and of hypoxic mature endothelial cells. *FASEB J.* **26**, 4925-4936.
- Lavine, M. . y Strand, M. R.** (2002). Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1295-1309.
- Le Bras, S., Rondanino, C., Kriegel-Taki, G., Dussert, a. y Le Borgne, R.** (2012). Genetic identification of intracellular trafficking regulators involved in notch dependent binary cell fate acquisition following asymmetric cell division. *Development* **139**, e1807-e1807.
- Le Parco, Y., Knibiehler, B., Cecchini, J. P. y Mirre, C.** (1986). Stage and tissue-specific expression of a collagen gene during *Drosophila melanogaster* development. *Exp. Cell Res.* **163**, 405-412.
- Lécuyer, E., Parthasarathy, N. y Krause, H. M.** (2007). Fluorescent In Situ Hybridization Protocols in *Drosophila* Embryos and Tissues. En *Methods in Molecular Biology: Drosophila: Methods and Protocols*, pp. 289-302.
- Lee, H. K., Seo, I. A., Park, H. K. y Park, H. T.** (2006). Identification of the basement membrane protein nidogen as a candidate ligand for tumor endothelial marker 7 in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* **580**, 2253-2257.
- Lerner, D. W., McCoy, D., Isabella, A. J., Mahowald, A. P., Gerlach, G. F., Chaudhry, T. a. y Horne-Badovinac, S.** (2013). A Rab10-Dependent Mechanism for Polarized Basement Membrane Secretion during Organ Morphogenesis. *Dev. Cell* **24**, 159-168.
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V y Ferrara, N.** (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309.
- Li, S., Edgar, D., Fässler, R., Wadsworth, W. y Yurchenco, P. D.** (2003). The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev. Cell* **4**, 613-624.
- Lin Li, Zhang, Y., Li, N., Feng, L., Yao, H., Zhang, R., Li, B., Li, X., Han, N., Gao, Y., et al.** (2015). Nidogen-1: A candidate biomarker for ovarian serous cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **45**, 176-182.
- Lindner, J. J. R., Hillman, P. R. P., Barrett, A. A. L., Jackson, M. M. C., Perry, T. T. L., Park, Y. y Datta, S.** (2007). The *Drosophila* Perlecan gene trol regulates multiple signaling pathways in different developmental contexts. *BMC Dev. Biol.*

- 7, 121.
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G. L., Hahn, K. M. y Danuser, G.** (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* **461**, 99-103.
- Magie, C. R., Meyer, M. R., Gorsuch, M. S. y Parkhurst, S. M.** (1999). Mutations in the Rho1 small GTPase disrupt morphogenesis and segmentation during early *Drosophila* development. *Development* **126**, 5353-64.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. y Koonin, E. V.** (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* **1**, 7.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E. J., Norville, J. E. J. y Church, G. G. M.** (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823-6.
- Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P. y Nakanishi, Y.** (2004). Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J. Biol. Chem.* **279**, 48466-76.
- Martin-Bermudo, M. D., Alvarez-Garcia, I. y Brown, N. H.** (1999). Migration of the *Drosophila* primordial midgut cells requires coordination of diverse PS integrin functions. *Development* **126**, 5161-5169.
- Martinek, N., Shahab, J., Saathoff, M. y Ringuette, M.** (2008). Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J. Cell Sci.* **124**, 670-670.
- Mayer, U., Mann, K., Fessler, L. I., Fessler, J. H. y Timpl, R.** (1997). *Drosophila* laminin binds to mammalian nidogen and to heparan sulfate proteoglycan. *Eur. J. Biochem.* **245**, 745-750.
- McKerracher, L., Chamoux, M. y Arregui, C. O.** (1996). Role of laminin and integrin interactions in growth cone guidance. *Mol. Neurobiol.* **12**, 95-116.
- Merz, D. C., Alves, G., Kawano, T., Zheng, H. y Culotti, J. G.** (2003). UNC-52/Perlecan affects gonadal leader cell migrations in *c. elegans* hermaphrodites through alterations in growth factor signaling. *Dev. Biol.* **256**, 173-186.
- Metaxakis, A., Oehler, S., Klinakis, A. y Savakis, C.** (2005). Minos as a genetic and genomic tool in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **171**, 571-581.
- Meyer, S., Schmidt, I. y Klämbt, C.** (2014). Glia ECM interactions are required to shape the *Drosophila* nervous system. *Mech. Dev.*
- Mills, L., Tellez, C., Huang, S., Baker, C., McCarty, M., Green, L., Gudas, J. M., Feng, X. y Bar-Eli, M.** (2002). Fully Human Antibodies to MCAM/MUC18 Inhibit Tumor Growth and Metastasis of Human Melanoma. *Cancer Res.* **62**, 5106-5114.
- Miosge, N., Sasaki, T. y Timpl, R.** (2002). Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. *Matrix Biol.* **21**, 611-621.
- Mirre, C., Cecchini, J. P., Le Parco, Y. y Knibiehler, B.** (1988). De novo expression of a type IV collagen gene in *Drosophila* embryos is restricted to mesodermal derivatives and occurs at germ band shortening. *Development* **102**, 369-76.
- Mojica, F. J. M., Ferrer, C., Juez, G. y Rodríguez-Valera, F.** (1995). Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon

- partitioning. *Mol. Microbiol.* **17**, 85-93.
- Mokkapat, S., Bechtel, M., Reibetanz, M., Miosge, N. y Nischt, R.** (2012). Absence of the basement membrane component nidogen 2, but not of nidogen 1, results in increased lung metastasis in mice. *J. Histochem. Cytochem.* **60**, 280-9.
- Momota, R., Naito, I., Ninomiya, Y. y Ohtsuka, A.** (2011). Drosophila type XV/XVIII collagen, Mp, is involved in Wingless distribution. *Matrix Biol.* **30**, 258-266.
- Montell, D. J. y Goodman, C. S.** (1989). Drosophila laminin: sequence of B2 subunit and expression of all three subunits during embryogenesis. *J. Cell Biol.* **109**, 2441-53.
- Murshed, M., Smyth, N., Miosge, N., Karolat, J., Krieg, T., Paulsson, M. y Nischt, R.** (2000). The Absence of Nidogen 1 Does Not Affect Murine Basement Membrane Formation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7007-7012.
- Myllyharju, J. y Kivirikko, K. I.** (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* **20**, 33-43.
- Nagaosa, K., Okada, R., Nonaka, S., Takeuchi, K., Fujita, Y., Miyasaka, T., Manaka, J., Ando, I. y Nakanishi, Y.** (2011). Integrin  $\beta$ v-mediated phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila embryos. *J. Biol. Chem.* **286**, 25770-25777.
- Nakamura, R., Nakamura, F. y Fukunaga, S.** (2015). Perlecan Diversely Regulates the Migration and Proliferation of Distinct Cell Types in vitro. *Cells Tissues Organs* **200**, 374-393.
- Nalbant, P.** (2004). Activation of Endogenous Cdc42 Visualized in Living Cells. *Science (80-. ).* **305**, 1615-1619.
- Neely, G. G., Kuba, K., Cammarato, A., Isobe, K., Amann, S., Zhang, L., Murata, M., Elm??n, L., Gupta, V., Arora, S., et al.** (2010a). A Global In Vivo Drosophila RNAi Screen Identifies NOT3 as a Conserved Regulator of Heart Function. *Cell* **141**, 142-153.
- Neely, G. G., Hess, A., Costigan, M., Keene, A. C., Goulas, S., Langeslag, M., Griffin, R. S., Belfer, I., Dai, F., Smith, S. B., et al.** (2010b). A Genome-wide Drosophila screen for heat nociception identifies  $\alpha$ 2 $\delta$ 3 as an evolutionarily conserved pain gene. *Cell* **143**, 628-638.
- Nelson, R. E., Fessler, L. I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., Parker, C. G. y Fessler, J. H.** (1994). Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of Drosophila development. *EMBO J.* **13**, 3438-47.
- Nobes, C. D. y Hall, a** (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- Nobes, C. D. y Hall, A.** (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* **144**, 1235-1244.
- Nonaka, S., Nagaosa, K., Mori, T., Shiratsuchi, A. y Nakanishi, Y.** (2013). Integrin  $\alpha$ PS3/ $\beta$ v-mediated Phagocytosis of Apoptotic Cells and Bacteria in Drosophila. *J. Biol. Chem.* **288**, 10374-10380.
- Oikawa, Y., Hansson, J., Sasaki, T., Rousselle, P., Domogatskaya, A., Rodin, S., Tryggvason, K. y Patarroyo, M.** (2011). Melanoma cells produce multiple laminin isoforms and strongly migrate on alfa5 laminin(s) via several integrin receptors. *Exp. Cell Res.* **317**, 1119-1133.
- Olofsson, B. y Page, D. T.** (2005). Condensation of the central nervous system in embryonic Drosophila is inhibited by blocking hemocyte migration or neural

- activity. *Dev. Biol.* **279**, 233-243.
- Page, D. T. y Olofsson, B.** (2008). Multiple roles for apoptosis facilitating condensation of the *Drosophila* ventral nerve cord. *Genesis* **46**, 61-68.
- Paladi, M. y Tepass, U.** (2004). Function of Rho GTPases in embryonic blood cell migration in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **117**, 6313-26.
- Parikh, D. H., Leibl, M., Tam, P. K. . y Edgar, D.** (1995). Abnormal expression and distribution of nidogen in Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* **30**, 1687-1693.
- Parsons, B. y Foley, E.** (2013). The *Drosophila* platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor-receptor related (Pvr) protein ligands Pvf2 and Pvf3 control hemocyte viability and invasive migration. *J. Biol. Chem.* **288**, 20173-83.
- Pastor-Pareja, J. C., Wu, M. y Xu, T.** (2008). An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* **1**, 144-154.
- Paulsson, M., Aumailley, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Beck, K. y Engel, J.** (1987). Laminin-nidogen complex. Extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur. J. Biochem.* **166**, 11-19.
- Peränen, J., Auvinen, P., Virta, H., Wepf, R. y Simons, K.** (1996). Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **135**, 153-167.
- Pereira-Leal, J. B. y Seabra, M. C.** (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* **313**, 889-901.
- Perris, R. y Perissinotto, D.** (2000). Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech. Dev.* **95**, 3-21.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L. y Hahn, K. M.** (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* **440**, 1069-72.
- Petley-Ragan, L. M., Ardiel, E. L., Rankin, C. H. y Auld, V. J.** (2016). Accumulation of Laminin Monomers in *Drosophila* Glia Leads to Glial Endoplasmic Reticulum Stress and Disrupted Larval Locomotion. *J. Neurosci.* **36**, 1151-1164.
- Port, F., Chen, H.-M., Lee, T. y Bullock, S. L.** (2014). Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* E2967-E2076.
- Porther, N. y Barbieri, M. A.** (2015). The role of endocytic Rab GTPases in regulation of growth factor signaling and the migration and invasion of tumor cells. *Small GTPases* **6**, 135-144.
- Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y. y Mayer, U.** (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* **131**, 1619-1628.
- Rehorn, K., Thelen, H., Michelson, A. y Reuter, R.** (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* **122**, 4023-31.
- Reuter, R.** (1994). The gene *serpent* has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut. *Development* **120**, 1123-35.
- Ridley, A. J. y Hall, A.** (1992a). Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. En *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, pp. 661-672.
- Ridley, A. J. y Hall, A.** (1992b). The small GTP-binding protein rho regulates the

- assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.
- Rizki, T. M. y Rizki, R. M.** (1992). Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Dev. Comp. Immunol.* **16**, 103-10.
- Robinson, D. R., Wu, Y. M. y Lin, S. F.** (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548-5557.
- Robling, A. G., Castillo, A. B. y Turner, C. H.** (2006). Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **8**, 455-98.
- Rogalski, T. M., Gilchrist, E. J., Mullen, G. P. y Moerman, D. G.** (1995). Mutations in the *unc-52* gene responsible for body wall muscle defects in adult *Caenorhabditis elegans* are located in alternatively spliced exons. *Genetics* **139**, 159-169.
- Roote, C. E. y Zusman, S.** (1995). Functions for PS integrins in tissue adhesion, migration, and shape changes during early embryonic development in *Drosophila*. *Dev Biol* **169**, 322-336.
- Roshana, S. y Gateff, E.** (1982). Ultrastructure and Cytochemistry of the Cell Types in the Larval Hematopoietic Organs and Hemolymph of *Drosophila Melanogaster*. *Dev. Growth Differ.* **24**, 65-82.
- Ruhrberg, C.** (2003). Growing and shaping the vascular tree: Multiple roles for VEGF. *BioEssays* **25**, 1052-1060.
- Sanchez-Higueras, C., Sotillos, S. y Castelli-Gair Hombria, J.** (2014). Common origin of insect trachea and endocrine organs from a segmentally repeated precursor. *Curr. Biol.* **24**, 76-81.
- Sander, E. E., Ten Klooster, J. P., Van Delft, S., Van Der Kammen, R. A. y Collard, J. G.** (1999). Rac downregulates Rho activity: Reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J. Cell Biol.* **147**, 1009-1021.
- Sarov, M., Barz, C., Jambor, H., Hein, M. Y., Schmied, C., Suchold, D., Stender, B., Janosch, S., Vikas, V. K. J., Krisnan, R. T., et al.** (2015). *A genome-wide resource for the analysis of protein localisation in Drosophila*.
- Schuck, S., Gerl, M. J., Ang, A., Manninen, A., Keller, P., Mellman, I. y Simons, K.** (2007). Rab10 is involved in basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Traffic* **8**, 47-60.
- Schwartz, S. L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A. y Wandinger-Ness, A.** (2007). Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* **120**, 3905-3910.
- Schymeinsky, J., Nedbal, S., Miosge, N., Pöschl, E., Rao, C., Beier, D. R., Skarnes, W. C., Timpl, R. y Bader, B. L.** (2002). Gene structure and functional analysis of the mouse *nidogen-2* gene: *nidogen-2* is not essential for basement membrane formation in mice. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6820-30.
- Sehgal, B. U., DeBiase, P. J., Matzno, S., Chew, T. L., Claiborne, J. N., Hopkinson, S. B., Russell, A., Marinkovich, M. P. y Jones, J. C. R.** (2006). Integrin  $\alpha 4$  regulates migratory behavior of keratinocytes by determining laminin-332 organization. *J. Biol. Chem.* **281**, 35487-35498.
- Settleman, J.** (1999). Rho GTPases in development. *Prog Mol Subcell Biol* **22**, 201-229.
- Sheetz, M. P., Felsenfeld, D. P. y Galbraith, C. G.** (1998). Cell migration : regulation of force on extracellular- complexes. *Trends Cell Biol.* **8**, 51-54.
- Shen, B., Zhang, J., Wu, H., Wang, J., Ma, K., Li, Z., Zhang, X., Zhang, P. y**

- Huang, X.** (2013). Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res.* **23**, 720-3.
- Shim, J., Lee, S. M., Lee, M. S., Yoon, J., Kweon, H. S. y Kim, Y. J.** (2010). Rab35 mediates transport of Cdc42 and Rac1 to the plasma membrane during phagocytosis. *Mol Cell Biol* **30**, 1421-1433.
- Siekhaus, D., Haesemeyer, M., Moffitt, O. y Lehmann, R.** (2010a). Supplementary information RhoL controls invasion and Rap1 localization during immune cell transmigration in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* **12**, 605-10.
- Siekhaus, D., Haesemeyer, M., Moffitt, O. y Lehmann, R.** (2010b). RhoL controls invasion and Rap1 localization during immune cell transmigration in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* **12**, 605-610.
- Simpson, P. B. y Armstrong, R. C.** (1999). Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration. *Glia* **26**, 22-35.
- Spahn, P., Huelsmann, S., Rehorn, K.-P. P., Mischke, S., Mayer, M., Casali, A. y Reuter, R.** (2014). Multiple regulatory safeguards confine the expression of the GATA factor *Serpent* to the hemocyte primordium within the *Drosophila* mesoderm. *Dev. Biol.* **386**, 272-9.
- Stramer, B., Wood, W., Galko, M. J., Redd, M. J., Jacinto, A., Parkhurst, S. M. y Martin, P.** (2005). Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *J. Cell Biol.* **168**, 567-73.
- Stramer, B., Moreira, S., Millard, T., Evans, I., Huang, C., Sabet, O., Milner, M., Dunn, G., Martin, P. y Wood, W.** (2010). Clasp-mediated microtubule bundling regulates persistent motility and contact repulsion in *Drosophila* macrophages in vivo. *J. cell ...* **189**, 681-689.
- Suh, H. N. y Han, H. J.** (2010). Laminin regulates mouse embryonic stem cell migration: involvement of Epac1/Rap1 and Rac1/cdc42. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C1159-C1169.
- Sung, B. H., Zhu, X., Kaverina, I. y Weaver, A. M.** (2011). Cortactin controls cell motility and lamellipodial dynamics by regulating ECM Secretion. *Curr. Biol.* **21**, 1460-1469.
- Tang, B. L. y Ng, E. L.** (2009). Rabs and cancer cell motility. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 365-370.
- Tepass, U. y Hartenstein, V.** (1994). The Development of Cellular Junctions in the *Drosophila* Embryo. *Dev. Biol.*
- Tepass, U., Fessler, L., Aziz, A. y Hartenstein, V.** (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 1829-1837.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M. y Martin, G. R.** (1979). Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* **254**, 9933-9937.
- Traver, D. y Zon, L. I.** (2002). Walking the walk: Migration and other common themes in blood and vascular development. *Cell* **108**, 731-734.
- Tremble, P. M., Lane, T. F., Sage, E. H. y Werb, Z.** (1993). SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J. Cell Biol.* **121**, 1433-1444.
- Tucker, M. y Han, M.** (2008). Muscle cell migrations of *C. elegans* are mediated by

- the  $\alpha$ -integrin INA-1, Eph receptor VAB-1, and a novel peptidase homologue MNP-1. *Dev. Biol.* **318**, 215-223.
- Tunggal, J., Wartenberg, M., Paulsson, M. y Smyth, N.** (2003). Expression of the nidogen-binding site of the laminin gamma1 chain disturbs basement membrane formation and maintenance in F9 embryoid bodies. *J Cell Sci* **116**, 803-812.
- Ulazzi, L., Sabbioni, S., Miotto, E., Veronese, A., Angusti, A., Gafà, R., Manfredini, S., Farinati, F., Sasaki, T., Lanza, G., et al.** (2007). Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer. *Mol. Cancer* **6**, 17.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. y Rozen, S. G.** (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1-12.
- Urbano, J., Torgler, C., Molnar, C., Ulrich, T., López-Varea, A., Brown, N., Celis, J. y Martín-Bermudo, M.** (2009). Drosophila laminins act as key regulators of basement membrane assembly and morphogenesis. *Development* **136**, 4165-4176.
- Urbano, J., Domínguez-Giménez, P., Estrada, B. y Martín-Bermudo, M.** (2011). PS integrins and laminins: key regulators of cell migration during Drosophila embryogenesis. *PLoS One* **6**, e23893.
- Veit, G., Kobbe, B., Keene, D. R., Paulsson, M., Koch, M. y Wagener, R.** (2006). Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J. Biol. Chem.* **281**, 3494-3504.
- Viveiros, R., Hutter, H. y Moerman, D. G.** (2011). Membrane extensions are associated with proper anterior migration of muscle cells during *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Dev. Biol.* **358**, 189-200.
- Voigt, A., Pflanz, R., Schäfer, U. y Jäckle, H.** (2002). Perlecan participates in proliferation activation of quiescent Drosophila neuroblasts. *Dev. Dyn.* **224**, 403-412.
- Wilk, R., Murthy, S. U. M., Yan, H. y Krause, H. M.** (2010). In situ hybridization: Fruit fly embryos and tissues. *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.* 1-24.
- Willem, M., Miosge, N., Halfter, W., Smyth, N., Jannetti, I., Burghart, E., Timpl, R. y Mayer, U.** (2002). Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin  $\gamma$ 1 chain interferes with kidney and lung development. *Development* **129**, 2711-2722.
- Williams, M. J.** (2007). Drosophila hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.* **178**, 4711-4716.
- Wilson, D. G., Phamluong, K., Li, L., Sun, M., Cao, T. C., Liu, P. S., Modrusan, Z., Sandoval, W. N., Rangell, L., Carano, R. A. D., et al.** (2011). Global defects in collagen secretion in a Mia3/TANGO1 knockout mouse. *J. Cell Biol.* **193**, 935-951.
- Witsell, A., Kane, D., Rubin, S. y McVey, M.** (2009). Removal of the bloom syndrome DNA helicase extends the utility of imprecise transposon excision for making null mutations in Drosophila. *Genetics* **183**, 1187-1193.
- Wolfstetter, G. y Holz, A.** (2012). The role of LamininB2 (LanB2) during mesoderm differentiation in Drosophila. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 267-82.
- Wood, W. y Jacinto, A.** (2007). Drosophila melanogaster embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 542-551.
- Wood, W., Faria, C. y Jacinto, A.** (2006). Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in Drosophila melanogaster. *J.*

- Cell Biol.* **173**, 405-16.
- Xie, X. y Auld, V. J.** (2011). Integrins are necessary for the development and maintenance of the glial layers in the *Drosophila* peripheral nerve. *Development* **138**, 3813-3822.
- Xiong, B., Bayat, V., Jaiswal, M., Zhang, K., Sandoval, H., Charng, W. L., Li, T., David, G., Duraine, L., Lin, Y. Q., et al.** (2012). Crag Is a GEF for Rab11 Required for Rhodopsin Trafficking and Maintenance of Adult Photoreceptor Cells. *PLoS Biol.* **10**,.
- Xu, J., Ren, X., Sun, J., Wang, X., Qiao, H. H., Xu, B. W., Liu, L. P. y Ni, J. Q.** (2015). A Toolkit of CRISPR-Based Genome Editing Systems in *Drosophila*. *J. Genet. Genomics* **42**, 141-149.
- Yang, X., Chrisman, H. y Weijer, C. J.** (2008). PDGF signalling controls the migration of mesoderm cells during chick gastrulation by regulating N-cadherin expression. *Development* **135**, 3521-3530.
- Yasothornsrikul, S., Davis, W. J., Cramer, G., Kimbrell, D. a y Dearolf, C. R.** (1997). viking: identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene* **198**, 17-25.
- Yoshimura, S. I., Gerondopoulos, A., Linford, A., Rigden, D. J. y Barr, F. A.** (2010). Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors. *J. Cell Biol.* **191**, 367-381.
- Yurchenco, P. D., Amenta, P. S. y Patton, B. L.** (2004). Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol.* **22**, 521-538.
- Zerial, M. y McBride, H.** (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117.
- Zettervall, C.-J., Anderl, I., Williams, M. J., Palmer, R., Kurucz, E., Ando, I. y Hultmark, D.** (2004). A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *PNAS* **101**, 14192-14197.
- Zhang, J., Schulze, K. L., Robin Hiesinger, P., Suyama, K., Wang, S., Fish, M., Acar, M., Hoskins, R. A., Bellen, H. J. y Scott, M. P.** (2007). Thirty-one flavors of *Drosophila* Rab proteins. *Genetics* **176**, 1307-1322.
- Zhu, X., Ahmad, S. M., Aboukhalil, A., Busser, B. W., Kim, Y., Tansey, T. R., Haimovich, A., Jeffries, N., Bulyk, M. L. y Michelson, A. M.** (2012). Differential regulation of mesodermal gene expression by *Drosophila* cell type-specific Forkhead transcription factors. *Development* **139**, 1457-66.



# Agradecimientos.

Bueno, como es de bien nacido ser agradecidos, pues empecemos:

Lola, gracias por confiar en mí, por darme esta oportunidad y por enseñarme tanto, aunque a veces acabara con tu paciencia jejejeje, eres mi madre científica y eso es para toda la vida, por suerte o desgracia xD (carita sonriente).

Acaimo, a ti que te digo, gracias por tener siempre un minuto para ayudar e implicarte en mi trabajo, ya me voy y te la dejo libre para ti, a Lola digo, en el laboratorio 111 siempre seré el macho alfa.

Pa no liarme con mis compis lo hare en orden de poyata en sentido 111-114 jejeje. En general he de decir que GRACIAS.

Bea I. Eres la primera, tú me enseñaste a fijar embriones y a no abrir ordenadores, jeje gracias por tu ayuda siempre.

Ceci, lia para los amigos, a ti que te digo que no sepas, gracias por ayudarme tanto y por tener tanta paciencia con mi meneo de patas, siempre me diste un punto de cordura.

Mari chus, gracias por enseñarme tanta genética de moscas, por los deberes de cruces, y por enseñarme a tener paciencia.

Juanjo, gracias por tu ayuda estos años, aunque no habláramos mucho (verdad MC), siempre estuvimos hay ayudándonos jejeje.

Clarita, ainss no sabría nada de molecular sino fuera por ti, gracias por ser tan amiga y tan sevillana.

BEM, gracias por tu punto de vista de la vida inocente y sincero, ha sido un placer compartir contigo estos años, y aprender de tu forma de hacer ciencia y de ver la vida.

Carmeli, tu has sido mi hermana mayor, mi maestra de ImageJ, Imaris, Photoshop, Illustrator, una poquita de molecular, de videos, de huertos, de todo, eso mismo, sin ti no sería yo. Gracias carmeliamor.

Alicia, en verdad también sé molecular por ti, jeje siempre con una sonrisa dispuesta a ayudarme, traducirme o guiarme, gracias madre por estos años.

Alfonsita, tu eres como mi hermana pequeña, gracias por hacerme hueco al principio y ayudarme, tu eres la primera que trato de traducirme al castellano, y quererme tal cual.

One, gracias por enseñarme y ayudarme siempre que lo necesite, eres mu grande tío, eso sí, relaja el ritmo de vida que no llegas a los 40 jajajaj. (no intentes dormir en Pilas y trabajar en UK, vale).

Andrea, la mitad de la custodia de mis embriones es tuya, sin tus cambios de caja me faltaría n. Jejeje. Me va costar decirte adiós amiga, pero bueno, esto en verdad es un hasta luego, sigue así que llegarás muy lejos, y GRACIAS por todo, eres sencilla y sublimemente perfecta.

Carminar, o revienta, jeje, eres agua amiga, donde vas, te incrustas y te haces imprescindible en horas, llegaste justo a tiempo al laboratorio, gracias por quererme tanto.

Patri, Patri, Patri chula, PatriPatri ven aquí, jejeje eres sin lugar a dudas mi mejor alumna xD. Gracias por tu ayuda estos últimos meses, y por estar siempre dispuesta para ayudarme, eres un CRISPR digo una CRACK.

Lobooo, que voy hacer yo sin ti, con quien me voy a reír yo ahora!!!! Ainss, gracias gracias y gracias por tus por qué infinitos y por toda tu, que eres de lo que no hay.

Adri, eres la nueva adquisición, pórtate bien y sigue así, eres mu grande, y no me refiero a tus dos metros de altura.

Ahora gracias a todas las gentes que he conocido, tutorizado, o me han ayudado por su paso por el laboratorio: Inka, Allie, Antonio Jesus, Camille, Elisa, Esperanza, Ester, Eva, José Antonio, María José, Michelle, Nuria, Pablo, Pilar, Rocío, etc (si sois más pero no recuerdo vuestros nombres).

Diana, Carlos y Gema, gracias también a vosotros por vuestra infinita ayuda y por ser más que compañeros de trabajo.

Gracias Pepe por tu ayuda en diferido, siempre tuviste tiempo para mis correos electrónicos y mis dudas infinitas.

Finalmente gracias a toda mi familia, a mi hermano Neftali que siempre me dijo que llegaría lejos, a mi madre, Fideli, luchadora como leona para que pudiera llegar, a mi padre, Pepito, que nunca dudo de que lo lograría, a mi hermano Izertel, por protegerme para que llegara. Sin vosotros no soy yo, os debo la vida, y esto es lo mínimo que puedo hacer para agradecéroslo. Os quiero muchísimo. Sin olvidar a la alegría de mi vida, Minerva y Desire.

Al resto de mi familia, desde los Sánchez Macias a las Tinajas, somos una familia grande, llena de grandes personas, nunca estaré solo en este mundo gracias a vosotros.

Gracias a mi Joaquí, Irene e Inma, por ser mis pilare en esta vida, sin vosotros nada sería igual, os quiero amigos, y por lejos que estemos siempre seremos uno.

Ains niñato y que hago contigo... desde que te conocí, me seguiste y apoyaste sin rechistar, nunca has dudado de saltar conmigo al vacío ni de apoyarme y venir conmigo donde hiciera falta, gracias por todo estos años de paciencia, comprensión, amistad, amor y enritaciones, jejeje. Sin lugar a dudas, esta tesis es también para ti, que me has soportado mis horas infinitas de laboratorio, mis fines de semana de bañar moscas, mis vueltas del cine a quitar microscopios, en fin por tu santa paciencia y amor, GRACIAS mi vida.

## Agradecimientos

Posiblemente la migración celular sea la función más conocida que se le asigna a la matriz extracelular (MEC) durante la embriogénesis. Sin embargo, poco se sabe de cómo la MEC regula la migración celular in vivo, ya que su estudio en el ambiente tridimensional de un organismo en desarrollo es complicado. Por ello, la mayoría del conocimiento que se tiene sobre el papel de la MEC en embriogénesis deriva de experimentos realizados con células u órganos en cultivo. Esta función de la MEC en migración celular durante la embriogénesis ha sido clásicamente atribuida a la MEC expuesta en el sustrato, matriz exógena. Sin embargo, experimentos realizados recientemente en células en cultivo, han revelado que las células al migrar también pueden usar una MEC endógena, secretada de manera autocrina. Sin embargo, se desconoce si esta capacidad de las células de usar su propia matriz para migrar se utiliza durante la embriogénesis. Por ello, en esta tesis doctoral se han usado los macrófagos de *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para el estudio in vivo del papel de la MEC en migración celular durante la embriogénesis. En concreto, esta tesis se ha centrado en los siguientes aspectos. Por una parte, se ha estudiado el papel de las lamininas, principales componentes de la MEC, en la migración de los macrófagos in vivo. Por otra, se ha analizado la contribución de las lamininas endógenas y exógenas en este proceso de migración. Y finalmente, se han examinado los mecanismos moleculares y celulares por los cuales las lamininas regulan la migración de los macrófagos. Los resultados obtenidos demuestran que los macrófagos usan lamininas endógenas y exógenas para su migración a través del embrión. Si bien, se propone que estas dos fuentes de lamininas ejercen funciones distintas. Así, mientras que la laminina endógena promovería la migración, la exógena tendría un papel más estructural, implicado en la correcta formación del espacio intersticial por el cual migran los macrófagos. También muestra que las lamininas regulan la direccionalidad y la estabilidad de las proyecciones de macrófagos al migrar. Además, se implica a las Rho GTPasas Rabs en la secreción de las lamininas. Así mismo, se plantea que uno de los mecanismos moleculares por el cual las lamininas regularían la migración de los macrófagos es mediante la modulación de la actividad de sus receptores las integrinas y el receptor de los factores guías, el PVR. Por último, se ha analizado el posible papel de otros componentes de la MEC, como Nidogen y Colágeno IV, en la migración de los macrófagos. Los resultados demuestran que si bien Colágeno IV se requiere, aunque en menor medida que las lamininas, Nidogen es prescindible.

