



**PEDECIBA BIOLOGÍA**  
**TESIS DE DOCTORADO**



**Estudio del papel que cumple una nueva  
proteína, Patched-related, en la  
embriogénesis de *Drosophila melanogaster***



**MSc. Carmen Isabel Selene Bolatto Pereira**

Laboratorio de Biología del Desarrollo (Depto. De  
Histología y Embriología-Facultad de Medicina-  
UdelaR) - Laboratorio de Bioinformática y  
Expresión Génica (INTA-Universidad de Chile)

Orientador: Dra. Verónica Cambiazo

Co-orientador: Dra. Rossana Sapiro

Tribunal: Dr. Rafael Cantera

Dr. José Badano

Dra. Inés Carrera

Dr. Flavio Zolessi

Resumen .....	4
Introducción.....	6
1. El desarrollo embrionario de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	7
1.1 Oogenesis y establecimiento de los ejes embrionarios.....	7
1.2 Primeras etapas del desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i> . ....	9
1.3 Patrones moleculares en el desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i> . .	11
2. El morfógeno Hedgehog .....	13
2.1 La vía señalización activada por Hedgehog .....	13
2.2 La vía de señalización de Hh durante el desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i> . .....	14
2.3 Componentes de la vía señalización activada por Hedgehog.....	16
3. Patched-related .....	19
3.1 Identificación de Patched-related una nueva proteína de transmembrana de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	19
Hipótesis y Objetivos específicos.....	22
Materiales y Métodos.....	23
1. Materiales generales .....	23
Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	23
Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	23
Células de <i>Drosophila</i> .....	24
Vectores .....	24
Anticuerpos y Sondas .....	25
2. Métodos Generales .....	26
Colecta de embriones .....	26
Electroforesis de ADN y ARN.....	26
Análisis densitométricos .....	27
Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	27
Preparación de muestras para SDS-PAGE .....	27
Western Blots.....	28
Cuantificación de proteínas .....	28
Transformación bacteriana .....	28
Purificación de ácidos nucleicos.....	29
Extracción de ADN Plasmídico .....	29
Digestión del ADN .....	30
Extracción de ADN desde gel .....	30
Desfosforilación de ADN .....	30
Obtención de ADN genómico a partir de una mosca .....	30
Extracción de ARN total .....	31
Síntesis de ADNc.....	31
PCR .....	31
PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).....	32
Inmunofluorescencias de embriones.....	32
Inmunofluorescencias en células .....	33
Adquisición de imágenes.....	33
3. Métodos particulares para lograr objetivos específicos.....	33
OE 1 .....	33
Generación de anticuerpo $\alpha$ -Ptr .....	33
Microscopía Electrónica (pre-embedding Immunogold) .....	36

OE2 y OE3.....	36
Cultivo de células de <i>Drosophila</i> .....	36
Construcción de vectores para sobre-expresión de Ptr en células de <i>Drosophila</i> .....	37
Generación de ARN doble hebra (ARNds) .....	37
Transfección de células de <i>Drosophila</i> .....	37
Ensayos Reportero Luciferasa.....	38
Inmunoprecipitación.....	39
OE4.....	39
Ensayos de silenciamiento in vivo de Ptr mediante la expresión de ARNds.....	39
Escisión del gen <i>Ptr</i> .....	39
Preparaciones cuticulares.....	41
4. Tablas de cebadores.....	42
Resultados .....	44
1. Analizar el patrón de expresión y localización subcelular de la proteína Ptr durante la embriogénesis normal de <i>Drosophila melanogaster</i> . .....	44
1.1 Generación de un anticuerpo específico para reconocer Ptr.....	44
1.2 Distribución espacial y temporal de Ptr durante la embriogénesis de <i>Drosophila</i> . .....	49
1.3 Distribución de Ptr respecto a la localización de los hemocitos. ....	53
2. Identificar a Ptr como componente de la vía mediada por Hh en células en cultivo y determinar su jerarquía de interacciones dentro de la misma. ....	53
3. Determinar si Ptr es capaz de interactuar directamente con Hh. ....	56
4. Determinar si la ausencia y/o la disminución de la expresión de <i>Ptr</i> están asociadas a la aparición de alteraciones particulares del desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	57
4.1 Escisión imprecisa del gen <i>Ptr</i> . .....	57
4.2 ARNi.....	62
Discusión.....	65
Distribución espacio-temporal de Ptr durante la embriogénesis de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	65
Evaluación de la participación de Ptr en la vía Hh. ....	69
Conclusiones generales y perspectivas.....	73
Bibliografía.....	74
Anexo .....	84
Artículo I .....	84
Artículo II .....	86
Artículo III .....	88

## Resumen

Hedgehog (Hh) es una proteína modificada lipídicamente que participa en un complejo e intrincado sistema de señalización intercelular. Si bien los actores y la bioquímica principal de la vía se encuentra caracterizada, los mecanismos por los cuales controla diferentes procesos vitales presentan varias incertidumbres, resultando esencial identificar nuevos participantes o mediadores de la vía para comprender como sucede su fina regulación. Patched-related (Ptr), es una nueva proteína transmembrana que presenta una topología y una organización en dominios similar a la descrita para Patched, el receptor canónico de la cascada de señalización que involucra a Hh. Teniendo como base estas similitudes moleculares se propuso como objetivo central de la presente tesis determinar si Ptr se encuentra vinculada con la vía de señalización gatillada por Hh. Para abordar esta hipótesis se plantearon cuatro objetivos específicos (1) Analizar el patrón de expresión y localización subcelular de la proteína Ptr durante la embriogénesis normal de *Drosophila melanogaster*; (2) Identificar si Ptr es un componente de la vía mediada por Hh en células en cultivo y determinar su jerarquía de interacciones dentro de la misma; (3) Determinar si Ptr es capaz de interactuar directamente con Hh; (4) Determinar si la ausencia y/o la disminución de la expresión de *Ptr* origina alteraciones durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* que indiquen su participación en la vía de Hh.

Nuestros resultados indican que, según lo esperado, Ptr se encuentra localizado en estrecha asociación con las membranas celulares, detectándose una distribución diferencial de la proteína en relación al estadio del desarrollo estudiado. De esta forma, mientras Ptr exhibe una distribución generalizada en los embriones tempranos, se observa acumulada en zonas de extensión restringida en los embriones tardíos. Estas zonas resultan ser coincidentes con la presencia de los hemocitos. La generación de un mutante nulo para *Ptr* no solo corrobora la especificidad de la señal encontrada sino que da cuenta de la relevancia de su función al constatarse que los embriones portadores de la mutación mueren antes de eclosionar. Al mismo tiempo el estudio morfológico preliminar de estos mutantes revela la presencia de alteraciones (aumento del número de células apoptóticas, y malformaciones del aparato digestivo) que son consistentes con la malfunción fagocítica embrionaria.

Por su parte los estudios realizados utilizando sistema reportero luciferasa en células en cultivo, evidencia la capacidad de Ptr de responder a la presencia de Hh en dependencia de la abundancia de la proteína en la célula y la posiciona como un



potencial regulador negativo de la misma. Este hecho, sumado al desarrollo de fusiones en los dentículos cuticulares producto de la ausencia o silenciamiento de la expresión de *Ptr*, enfatizan su participación durante la generación del patrón de la epidermis a través de la acción directa o indirecta con la vía de señalización gatillada por el morfógeno Hh.

En conclusión, los datos obtenidos sugieren que *Ptr* estaría participando en la vía de Hh localizándolo de forma primordial y novedosa a nivel de los hemocitos. Estos hallazgos permiten especular con la función de *Ptr* como un receptor de Hh que permite percibir la señal quimioatrayente y dirigir la migración de los hemocitos hacia blancos específicos durante la embriogénesis de *Drosophila*. De esta forma, el conjunto de observaciones realizadas abre las puertas para el análisis de la vía de Hh en un proceso fundamental para el desarrollo como resulta ser la fagocitosis.

El trabajo aquí presentado ha dado lugar a los siguientes manuscritos:

- Molecular Characterization of a Novel Patched-Related Protein in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. Luis Pastenes, Freddy Ibáñez, **Carmen Bolatto**, Leonardo Pavéz & Verónica Cambiazo. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 68:156–170 (2008)
- Spatial and temporal distribution of Patched-related protein in the *Drosophila* embryo. **Carmen Bolatto**, Cristina Parada, Fiorella Revello, Alejandro Zuñiga, Pablo Cabrera & Verónica Cambiazo. Gene Expression Patterns 19:120-128 (2015). Una de las fotos de este artículo fue elegida por el editor de la revista para que fuera tapa de la misma por todo el año 2016.
- Functional and genetic assays of Patched-related protein in *Drosophila* suggest a role within Hedgehog signalling pathway. **Carmen Bolatto**, Cristina Parada, Fiorella Revello, Alejandro Zuñiga & Verónica Cambiazo. Enviado a BMC Developmental Biology.



## Introducción

En circunstancias normales, el genoma de todas las células que componen un organismo es idéntico. La condición esencial para que una célula epitelial y una neurona puedan diferenciarse morfológica y funcionalmente, radica en que expresan genes diferentes. La expresión diferencial se logra, por ejemplo durante el desarrollo embrionario, proceso que posibilita que las distintas poblaciones celulares adquieran en un momento dado, una posición y señalización particular. Estas circunstancias son determinantes para las células, ya que las especifica en relación a procesos fundamentales (proliferación, interacción y movimiento) y las define en su camino de especialización hacia un tipo celular particular. Llamativamente, no sólo los mecanismos básicos que gobiernan el desarrollo en los diferentes organismos del reino animal son similares, sino también las moléculas que los sustentan están altamente conservadas a lo largo de la filogenia (Hanks et al, 1998; Tomarev, 1997). Este hecho permite trabajar con especies modelo para realizar estudios sobre determinados procesos y los resultados pueden ser extrapolados a otras especies.

En la presente tesis de Doctorado utilicé a la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para determinar si Patched-related (Ptr) es un nuevo componente de la vía de señalización mediada por Hedgehog (Hh), cuya actividad es relevante en procesos esenciales del desarrollo embrionario, tales como la especificación de destinos celulares y/o la formación de las extremidades. La secuenciación del genoma de *Drosophila* ha permitido concretar la realización de variados estudios de expresión génica a gran escala con la finalidad de poner en evidencia redes genéticas que conducen el desarrollo embrionario del organismo. En nuestro caso, algunos trabajos previamente realizados en el Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica de la Universidad de Chile, han permitido identificar un conjunto de genes a través de hibridización sustractiva que se expresan de forma diferencial al inicio de la gastrulación (Gonzalez-Aguero et al, 2005; Zuniga et al, 2009). Muchos de los genes así identificados aún no han sido caracterizados molecularmente, por lo que solo es posible establecer correlaciones entre sus patrones de expresión y la información contenida en las secuencias aminoacídicas de las proteínas por ellos codificadas. Entre estos genes no caracterizados, encontramos el gen *Patched-related*

(*Ptr*), que codifica para una proteína con dominio sensor de esteroides (SSD) con alta similitud con Patched (*Ptc*), el receptor descrito para la vía de Hh. El propósito general del presente trabajo es estudiar el gen *Ptr* y avanzar en determinar la función que desempeñaría la proteína por él codificada en el contexto del desarrollo embrionario de *Drosophila*.

A continuación haré una breve descripción del desarrollo embrionario de *Drosophila* y los procesos morfogénicos asociados, repasaré algunos aspectos de la regulación génica poniendo especial énfasis en la participación de la vía de señalización gatillada por Hh durante la embriogénesis y terminaré exponiendo los antecedentes específicos que sustentan la presente propuesta de investigación.



## **1. El desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster***

### **1.1 Oogenesis y establecimiento de los ejes embrionarios.**

La estructuración del huevo comienza antes de la fecundación y es dependiente de la interacción del ovocito con las células que acompañan su maduración (células nodrizas y células foliculares). Un ovocito y 15 células nodrizas rodeadas por un epitelio de células foliculares somáticas, conforman una estructura denominada cámara del huevo (Figura 1 A, una revisión de este tema puede ser encontrada en (Becalska & Gavis, 2009)).

Tanto el ovocito como las 15 células nodrizas comprendidas en una cámara se originan a partir de divisiones incompletas del mismo citoblasto, por lo que permanecen conectadas por puentes citoplásmicos o canales anillo. Las células nodrizas son poliploides y productoras de ARNm maternos, proteínas y orgánulos que se entregan al ovocito en desarrollo a través de los canales anillo (Figura 1 B). Estos ARNm se localizan en diferentes regiones del ovocito (por ejemplo el ARNm *bicoid* se encuentra localizado anteriormente, el ARNm *nanos* posteriormente y los ARNm *hunchback* y *caudal* se distribuyen a través de todo el ovocito) y son críticos para la formación del eje antero-posterior del embrión. Por su parte, las células somáticas foliculares que rodean al grupo ovocito/células nodrizas participan del establecimiento del eje dorso-ventral del embrión al ser las receptoras de Gurken, la señal de dorsalización que proviene del propio ovocito. Asimismo son las responsables de la formación de las dos envolturas

que encierran y protegen al óvulo maduro (la membrana vitelina y el corion). La más interior de ellas, la membrana vitelina, presenta la apertura micropilar para el paso de los espermatozoides y constituye un indicador del polo anterior del embrión. El corion es una estructura ornamentada con figuras hexagonales y pentagonales, que representan las impresiones de las células foliculares ováricas responsables del depósito de esta envoltura antes de la ovulación. En esta envoltura también se identifican un par de delicados filamentos situados en la superficie dorsal no muy lejos del extremo anterior del huevo. El huevo de *Drosophila melanogaster* tiene 0.5 mm de largo, bilateralmente simétrico y presenta curvaturas distintivas en su superficie dorsal y ventral (el lado dorsal es aplanado mientras que el lado ventral es ligeramente convexo). Presenta, como la mayoría de los huevos de insecto, una gran masa de vitelo localizada centralmente (huevo centrolecito) hecho que condiciona y confina el tipo de segmentación al borde citoplasmático que queda en la superficie del huevo (segmentación superficial).

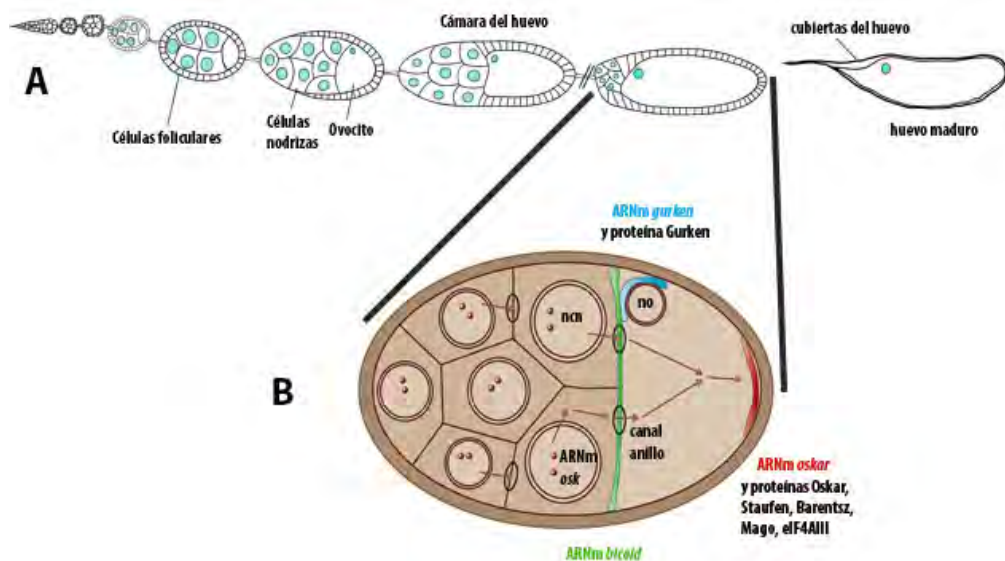


Figure 1. *Establecimiento temprano de los ejes embrionarios.* A) Representación esquemática de una ovariola donde se indica los diferentes estadios de la cámara del huevo de *Drosophila melanogaster*. B) Se muestra en mayor detalle el último estadio de maduración de la cámara del huevo con la localización de tres transcritos: *bicoid* (verde), *gurken* (azul) y *oskar* (rojo); los cuales establecen la generación del patrón temprano del ovocito y del embrión. El ARNm de *oskar* es transcripto (ARNm *osk*) en los núcleos de las células nodrizas (*ncn*) y es transportado a través de los canales anillo (c) donde se localiza en el polo posterior del ovocito. Esta localización determina que la proteína Oskar se encuentre expresada solo a nivel del sector posterior del ovocito, promoviendo el reclutamiento de otros importantes componentes del polo posterior (Vasa y Nanos). El ARNm de *gurken* se encuentra localizado a forma de capuchón cerca del núcleo del ovocito (no), mientras que ARNm de *bicoid* se dispone en el polo anterior del ovocito. Diagrama extraído y modificado de Davis I., 2004.

## 1.2 Primeras etapas del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

Una revisión general de este tema se puede encontrar en (Bate & Martínez-Arias, 1993). Un aspecto destacable de la segmentación superficial que ocurre en los huevos centrolecitos de insectos es que las células no se forman hasta que los núcleos se han dividido y migrado hacia la superficie. Es así que, hasta el ciclo celular número 12, no existe otra membrana celular más que la del ovocito y 6000 núcleos compartiendo un mismo citoplasma (blastodermo sincicial) (Figura 2, izquierda).

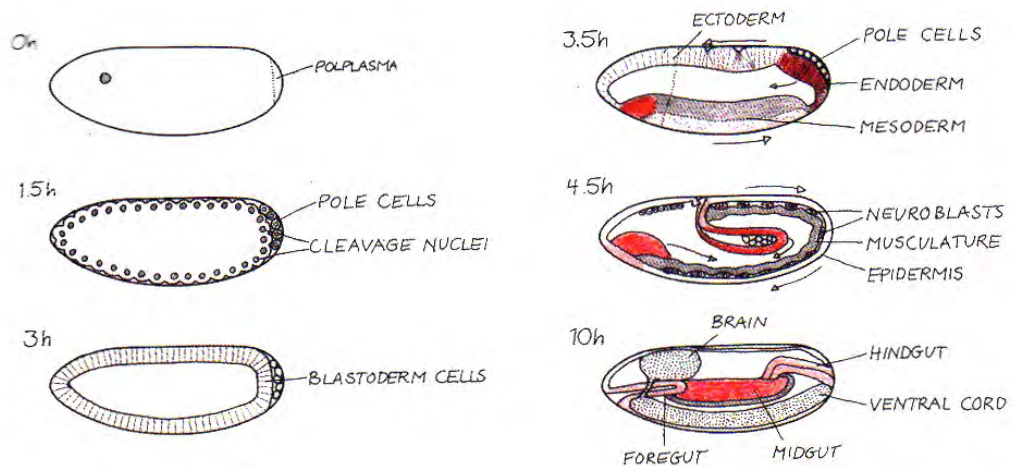


Figura 2. *Desarrollo embrionario de Drosophila*. Durante las primeras horas del desarrollo (1.5 horas) se forma el blastodermo sincicial, en el cual todos los núcleos comparten el mismo citoplasma. Tres horas luego de la fertilización, la membrana zigótica se invagina entre los núcleos dando origen al blastodermo celular. Durante el inicio de la gastrulación (aproximadamente 3.5 horas post fertilización), un grupo de células migran hacia el interior del embrión originando el endodermo (rojo) y el mesodermo (gris). Más tarde en el desarrollo (4.5 horas) el embrión extiende la banda germinal para luego retraerla en las etapas finales del desarrollo embrionario (las flechas en el dibujo indican estos movimientos). Finalmente el primordio del tracto digestivo (ilustrado en rojo) se conecta en el centro y el cordón nervioso ventral, diferenciado a partir de los neuroblastos, se condensa y acorta. En el diagrama los embriones se encuentran dibujados con el extremo anterior hacia la izquierda y el lado ventral hacia abajo. Los números en la izquierda del diagrama hacen referencia a las horas que han transcurrido luego de la fertilización. Diagrama extraído y modificado de Nüsslein-Volhard C., 2006.

A partir del ciclo 13 la membrana del blastodermo se pliega entre los núcleos, creando células individuales. Este proceso, mediante el cual se forma el blastodermo celular, presenta dos fases o etapas en las cuales la reorganización de la actina y los microtúbulos parece jugar un rol trascendental. En la primera etapa ocurre la invaginación de la membrana celular a nivel de las zonas internucleares. Representa la fase lenta de la celularización, y si bien la red subcortical de actina guía la invaginación de la membrana, la misma ha probado ser dependiente de la integridad y funcionalidad de los microtúbulos. La segunda etapa comienza cuando la membrana celular en su ingreso sobrepasa el nivel del núcleo. Dado que la tasa de invaginación de la

membrana incrementa rápidamente, esta etapa es conocida como la fase rápida de la celularización. La misma finaliza cuando el complejo membrana-actina forma un anillo contráctil que determina la constricción de la membrana a nivel basal.

Hacia el final de la celularización el plan básico del organismo se encuentra ya determinado. Los productos génicos de origen materno que fueron espacialmente distribuidos en el huevo no fertilizado van a ser determinantes de los gradientes dorso-ventral y antero-posterior del embrión. La transcripción zigótica comienza alrededor de dos horas luego de la fecundación, y los productos maternos activan una cascada jerárquica de factores de transcripción que conducen la expresión de un número cada vez mayor de genes en patrones que se vuelven cada vez más intrincados.

Durante la gastrulación (Figura 2, derecha), la forma sencilla del blastodermo (elipsoide/irregular pero de superficie lisa) se pierde rápidamente cuando comienzan a segregarse las tres capas germinativas. Mientras el mesodermo y el endodermo serán formados gracias a la invaginación de ciertas poblaciones celulares, el ectodermo se constituirá a expensas de las células que permanecen en la superficie. El embrión comienza así a desarrollar una serie de pliegues con la finalidad de esculpir la compleja arquitectura del organismo, siendo generalmente letal cualquier defecto que ocurra durante el proceso.

Los dos primeros pliegues o invaginaciones que se forman son el surco cefálico y el surco ventral. El surco cefálico se constituye en el tercio anterior del embrión como un collar parcial de tejido entrante cuyo establecimiento demarca la separación de la cabeza y el tórax en la mosca en desarrollo. Por su parte, el surco ventral denota la invaginación del mesodermo prospectivo el cual inicialmente se encuentra tapizando la superficie central media del embrión. Este surco eventualmente se desprende de la superficie para constituir un tubo ventral dentro del embrión que formará una capa de tejido mesodérmico. Por su parte, el endodermo prospectivo se invagina como dos bolsillos (uno anterior y otro posterior) en los extremos del surco ventral. Las células ectodérmicas de la superficie y el mesodermo sufren movimientos de convergencia y extensión, migrando hacia la línea media para formar la denominada banda germinal: un conjunto de células que se localiza a lo largo de la línea media ventral e incluye todas aquellas células que formarán el tronco del embrión. La banda germinal primero se extiende, determinando que las regiones más posteriores del embrión queden

cubriendo totalmente la región dorsal del mismo. Como consecuencia de este movimiento las células responsables de la formación de las estructuras más posteriores de la larva se encuentran localizadas inmediatamente detrás de la futura región de la cabeza. En este momento, los segmentos del cuerpo comienzan a aparecer dividiendo el ectodermo y el mesodermo. La banda germinal luego se retrae, localizando los segmentos presuntivos posteriores en el extremo del embrión y dejando un espacio cubierto por una membrana extraembrionaria (la amnioserosa) sobre la superficie dorsal del embrión. El cierre dorsal ocurre luego, como si fuera una cremallera, moviendo hacia la región media dorsal las células de la epidermis que se encuentran en contacto con la amnioserosa. En este punto del desarrollo el embrión ha completado su embriogénesis y se encuentra pronto para eclosionar. Mientras la banda germinal se encuentra extendida, ocurren varios procesos morfogénéticos (organogénesis, segmentación y segregación de los discos imaginales).

### **1.3 Patrones moleculares en el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.**

Dado que en general un mutante define un gen, el fenotipo de un animal que presenta un solo gen defectivo brinda información crucial acerca de las estructuras afectadas por la mutación o qué efecto tiene la misma en el desarrollo. En el estudio de la formación de patrones, la colección de mutantes de *Drosophila* tiene un particular valor porque contiene muchos de los genes que controlan el desarrollo (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980). En varios casos se observa que los fenotipos de mutantes de genes diferentes son similares hecho que nos informa que dichos genes cumplen funciones similares durante el desarrollo. Esta similitud ha permitido la clasificación de los genes en grupos específicos siendo sus productos relevantes para que se lleve a cabo un proceso en común.

Las mutaciones de efecto materno llevan a que la larva tenga defectos fenotípicos severos (pérdida de grandes regiones o estructuras larvales). La magnitud de las consecuencias morfológicas observadas ayudan a definir a los genes de efecto materno como un grupo de genes de expresión temporal temprana que son determinantes para generar un marco de información posicional para los genes zigóticos de expresión más tardía. (Figura 3, izquierda). Como ya se ha mencionado anteriormente, los genes maternos se expresan en el ovario de la madre siendo su ARNm depositado en

diferentes regiones del huevo no fertilizado. Las proteínas regulatorias que son traducidas a partir de estos mensajeros inmediatamente después de la fertilización, difunden a través del blastodermo sincicial y activan o reprimen a los genes zigóticos. Llamativamente, los cambios observados en los mutantes de genes efecto materno afectan a los ejes anterior-posterior o dorso-ventral, indicando la independencia de especificación que tienen ambos ejes. La mayoría de los mutantes dorso-ventrales pierden el lado ventral, de forma tal que se observan sólo estructuras dorsales a lo largo de la circunferencia del embrión (embrión dorsalizado). Por su parte los genes que influncian la formación del eje antero-posterior puede ser dividido en 3 grupos según el o los segmentos y/o estructuras faltantes: anterior (*bicoid*), posterior (*nanos*) y terminal (*torso*). De esta forma, el programa de desarrollo de origen materno es dividido en 4 procesos independientes, cada uno de los cuales determina solamente una región del embrión y conlleva la activación o represión de genes zigóticos.

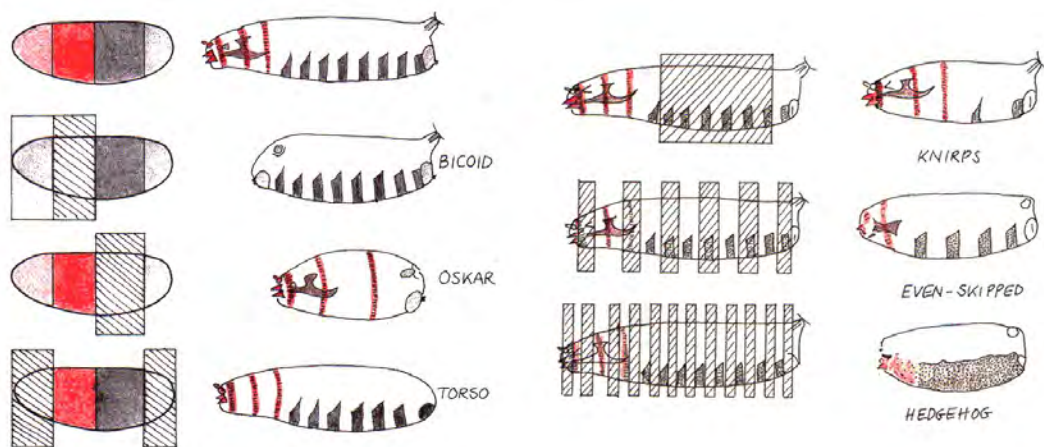


Figura 3. *Genes de efecto materno y zigóticos*. En el diagrama de la izquierda se observan las características que poseen embriones producidos por hembras mutantes de alguno de los genes que determinan el eje antero-posterior del embrión de *Drosophila* (genes de efecto materno). Por ejemplo, los embriones *bicoid* pierden todas las estructuras que se originarían a partir de la mitad anterior del huevo, los embriones *oskar* pierden el sector abdominal y los embriones *torso* pierden las estructuras terminales anteriores y posteriores. Existen varios genes cuya mutación ocasionan fenotipos como los de *oskar* o *torso*. Los productos de todos estos genes son generalmente activos durante el mismo proceso. Existe un cuarto grupo de genes de efecto materno (el que determina el eje dorso-ventral) el cual no se encuentra incluido en este diagrama. Por su parte, el diagrama de la izquierda muestra los efectos producidos por mutaciones en los genes que determinan la segmentación del embrión. El gen *knirps* pertenece al grupo de genes gap debido a que su mutación provoca la pérdida de una región grande y continua del embrión. En el caso particular de *knirps*, se pierde casi todo el abdomen. Los mutantes de genes pertenecientes al grupo de la regla par, como *even-skipped*, pierden regiones en cada segundo segmento. Por su parte los mutantes de algunos de los genes polaridad de segmento como *hedgehog* pierden partes en cada segmento, que en el caso particular de *hedgehog* sería el sector que involucra la cutícula desnuda. Diagrama extraído y modificado de Nüsslein-Volhard C., 2006.



Las mutaciones en los genes zigóticos dan cuenta de defectos visibles post-gastrulación con consecuencias morfológicas usualmente menores a las observadas para los mutantes de los genes de efecto materno (Figura 3, derecha). Por ejemplo, si bien el fenotipo obtenido para el grupo de genes *gap* (ej: *krüppel*) es muy similar al obtenido para el gen de efecto materno *oskar* (se provoca la pérdida de una región continua de extensión importante), el número de segmentos que se han perdido en este último caso es mucho mayor.

Las mutaciones en los grupos de genes denominados de regla par y polaridad de segmento también afectan varios segmentos. Los primeros lo hacen ocasionando la pérdida de regiones en cada segmento par, mientras que los segundos pierden partes en cada uno de los segmentos. Esta forma de organización nos habla de la existencia de un jerarquía en la función génica ligada al desarrollo del organismo, en ella los genes que están activos tempranamente controlan los efectos de aquellos genes que se activan más tardíamente y que dicha activación gradual conlleva la especificación cada vez más precisa de una región determinada en el organismo.

Los genes comprendidos dentro del grupo polaridad de segmento establecen los destinos celulares dentro de cada uno de los parasegmentos pre-establecidos mediante la señalización intercelular, para lo cual codifican proteínas que son constituyentes de dos importantes vías de transducción celular: Hh y Wingless (Wg).



## 2. El morfógeno Hedgehog

### 2.1 La vía señalización activada por Hedgehog.

En todo el reino animal se utilizan moléculas de señalización, denominadas morfógenos para informar a las células de su posición relativa al interior de un tejido en desarrollo. Tres clases de proteínas difusibles: Hh, Wnts y TGF- $\beta$ /Bone morphogenetic protein (BMP-2 y -4), se ajustan a este criterio; ellas activan la transcripción de diferentes grupos de genes en una forma que es dosis-dependiente, permitiendo así que las células adopten diferentes destinos según su posición a lo largo del gradiente del morfógeno. La familia de proteínas Hh, originalmente identificada en *Drosophila melanogaster* (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980), juega un papel crucial en la regulación de la morfogénesis de una variedad de tejidos y órganos durante el

desarrollo embrionario en todos los phyla animales estudiados, desde artrópodos a cordados (McMahon et al, 2003). La vía de señalización mediada por Hh controla también la proliferación de células madre en tejidos adultos y su activación aberrante está asociada con múltiples tipos de cáncer humano (Jiang & Hui, 2008; Taipale & Beachy, 2001). Durante el desarrollo de *D. melanogaster* la expresión selectiva del gen *hh* tiene tres propósitos principales: mantener la expresión de la molécula de señalización Wg en las células adyacentes a aquellas que expresan *hh* durante la embriogénesis temprana (Ingham, 1993); especificar de manera dosis-dependiente los destinos de las células epidérmicas dorsales durante la embriogénesis tardía (Heemskerk & DiNardo, 1994), y controlar el crecimiento y la generación del patrón en los discos imaginales larvales (las estructuras progenitoras de patas, alas y los ojos de los adultos).

## **2.2 La vía de señalización de Hh durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*.**

Como mencionamos anteriormente, la vía Hh juega un papel relevante en la embriogénesis temprana. En esta etapa, más precisamente durante la segmentación del embrión, las células vecinas utilizan a las proteínas secretadas Wg y Hh para distinguirse y también para potenciar su producción. Es así que constituyen un mecanismo de retroalimentación positiva por el cual la instauración de la vía de Wg en una franja de células no solo activa a la vía de Hh en la línea de células contiguas sino también fomenta su propia manutención.

El embrión salvaje de *Drosophila* secreta estructuras cuticulares con un patrón segmental indicando el alto grado de información posicional que se encuentra contenido en cada segmento. En la superficie ventral de cada uno de ellos se puede distinguir una banda de cutícula provista de dentículos y una sin dentículos (Figura 4, izquierda). La mutación de *hh* hace que se pierda esta última parte en cada uno de los segmentos, por lo cual el embrión tardío se observa, no solo de tamaño reducido, sino también con su superficie ventral llena de dentículos (hecho que hace recordar a la superficie de púas de un erizo y al cual debe su particular nombre) (Figura 4, derecha). En *Drosophila*, Hh cumple también un papel importante en el la generación del patrón en los discos imaginales. Los discos imaginales son monocapas epiteliales que originan las extremidades del adulto, ellas se presentan en números pares y se originan a partir

de un grupo de células fundadoras que se separan tempranamente del ectodermo embrionario. Durante el desarrollo larvario las células fundadoras proliferan hasta llegar a ser unas 50000 células por grupo y forman sacos epiteliales plegados monoestratificados. Los discos imaginales de ala presentan a sus células subdivididas en dos compartimientos (anterior y posterior) (Garcia-Bellido et al, 1973; Morata & Lawrence, 1977). La especificación de las células dentro de cada compartimiento y el establecimiento consecuente de los mismos se encuentra vinculado, en una primera instancia, con la expresión de los genes de polaridad de segmento *engrailed (en)* y *wingless (wg)* (Garcia-Bellido & Santamaria, 1972; Morata & Lawrence, 1977; Sharma & Chopra, 1976). Durante el desarrollo del disco imaginal de ala, las células del compartimiento posterior expresan el gen *hh* bajo el control del factor de transcripción En y secretan la proteína Hh. A su vez, este morfógeno induce la expresión de genes diana en las células situadas en el compartimiento anterior. Resulta esencial para la correcta generación del patrón del ala que la actividad de Hh se encuentre restringida a una estrecha banda de células en el compartimiento anterior. En primer lugar, la acción directa de Hh sobre los tejidos anteriores de ala, cerca del límite entre los compartimientos anterior y posterior, determina la posición de la vena L3 del ala. En segundo lugar, Hh induce la expresión del morfógeno Decapentaplegic (Dpp) (Basler & Struhl, 1994; Tabata & Kornberg, 1994), un miembro de la familia BMP en una estrecha franja de células. Dpp difunde en ambos compartimientos y controla el crecimiento y la generación del patrón de toda el ala, de manera que cuando la extensión del dominio de expresión de Dpp es alterada la generación del patrón del ala se ve dramáticamente afectado.



Figura 4. Fenotipo cuticular del mutante *hh*. En la imagen de la izquierda (WT) se observa las características del patrón normal de segmentos que presenta una larva de *Drosophila*. La mitad posterior de cada segmento se encuentra formada por una banda de cutícula desnuda mientras la mitad anterior del mismo exhibe una banda de denticulos. En la imagen de la derecha se observa el patrón del mutante *hedgehog (hh)*. Note la ausencia de las bandas desnudas mencionadas, resultando consecuentemente la fusión de las bandas de denticulos y el aspecto de "erizo".

La inducción de los genes diana de Hh refleja la existencia de umbrales bajos y altos de respuesta: la expresión de *ptc*, *en* y *knot (kn)* es inducida por niveles altos de señalización de Hh, mientras que la expresión de *dpp* y de los genes *iroquois (iro)* es consecuencia de la existencia de una respuesta a bajos niveles del ligando (Croizatier et al, 2003). Por otra parte, el aumento de expresión de *ptc* en respuesta a Hh es de suma importancia para determinar la extensión que tiene el dominio de señalización de este morfógeno en el disco imaginal, debido a que la acumulación de Ptc limita la difusión de Hh en el compartimiento anterior (Chen & Struhl, 1996). Este es el motivo por el cual, si bien todas las células que conforman el compartimiento anterior del disco imaginal expresan *ptc*, existe una franja de fuerte expresión en el límite de compartimientos anterior-posterior (Phillips et al, 1990). Este límite juega un rol importante en el establecimiento posicional de las células a lo largo de la superficie entera del disco, de forma similar a lo que se ha propuesto para los bordes parasegmentales en el embrión. Las mutaciones viables de *ptc* determinan en el disco imaginal un sobre-crecimiento local dentro del compartimiento anterior, pérdida de estructuras específicas y alteraciones tanto en el patrón de venas como de los órganos sensoriales (Phillips et al, 1990).

### **2.3 Componentes de la vía señalización activada por Hedgehog.**

Hh es una proteína modificada lipídicamente que es capaz de difundir a partir de las células que la producen, para unirse a aquellas que tengan en su membrana el receptor Ptc. De esta forma, Hh es capaz de especificar una amplia variedad de destinos celulares de una manera que es dependiente de su concentración (Torroja et al, 2005).

El procesamiento postraduccional de Hh incluye el clivaje de la secuencia del péptido señal y la transferencia intramolecular de colesterol formando el aducto HhN. La unión de colesterol facilita la asociación de Hh con las membranas y la última etapa del procesamiento en la cual una molécula de ácido palmítico se une al extremo N-terminal de HhN mediante la actividad O-aciltransferasa de Rasp (Skinny hedgehog en mamífero) (Chamoun et al, 2001; Lee et al, 2001; Micchelli et al, 2002). Esto origina una molécula con características distintivas y relevantes a la hora de provocar su asociación con las membranas y su posterior liberación (Gallet et al, 2006; Mann & Beachy, 2004; Peters et al, 2004). Asimismo, la liberación del Hh se encuentra facilitada por la presencia de una proteína con similitud de secuencia a transportadores de membrana

denominada Dispatched (Disp) la cual podría tener la función de facilitar la salida de los aductos de HhN de la membrana (Taipale et al, 2002). Con respecto a la movilidad que presenta HhN dentro de los tejidos blancos se ha determinado que es dependiente de la presencia de glicosaminoglicanos de heparán sulfato (HSPG); de hecho aquellos embriones que no pueden sintetizar las enzimas productoras del glicosaminoglicano mencionado, son incapaces de generar un gradiente adecuado de HhN (The et al, 1999; Zhu & Scott, 2004). Hasta la fecha, se ha demostrado que dos proteínas centrales de los HSPG, Dally y Dally-like (Dlp), desempeñan funciones redundantes en el movimiento de Hh desde sus lugares de síntesis (Lin, 2004). Dlp, por su parte, facilita la unión del ligando Hh a la célula receptora (Lum et al, 2003). Los componentes restantes de la vía se encuentran localizados en la célula que recibe la señal.

Ptc es una proteína con 12 dominios transmembrana, que en ausencia Hh actúa de forma catalítica para suprimir la actividad de otra proteína transmembrana denominada Smoothened (Smo). Por otra parte, se ha determinado tanto en vertebrados como en invertebrados, que la unión de HhN a las células blanco es también facilitada por las proteínas de transmembrana iHog y Boi (conocidas como Cdo y Boc, en mamíferos). Estas dos últimas moléculas presentan en su porción extracelular varios dominios fibronectina tipo III a través de los cuales interaccionan directamente con el ligando HhN e incrementan la afinidad de la unión del mismo al receptor Ptc (Lum et al, 2003; Tenzen et al, 2006; Yao et al, 2006). En contraparte también se ha detectado en vertebrados la presencia de una proteína transmembrana denominada Hip (Hedgehog-interacting protein) que se une a HhN con la finalidad de reducir el rango de movimiento de la molécula y producir la atenuación de la acción de la señal de Hh (Chuang & McMahon, 1999; Jeong & McMahon, 2005). La posibilidad de que existan tanto reguladores positivos como negativos de la vía de señalización brinda la capacidad de modular finamente la respuesta a la señal dada por las moléculas HhN.

La unión de Hh a Ptc permite liberar la actividad latente de Smo, una etapa esencial para la activación de una cascada de señalización intracelular. Una vez activada, la proteína Smo promueve la expresión de los genes que son blancos de regulación de la vía mediante una modulación de la actividad activadora/represora del factor de transcripción denominado Cubitus interruptus (Ci) en *D. melanogaster* o de la familia de factores de transcripción Gli en vertebrados (Ingham, 1993; Taipale & Beachy, 2001). Un paso importante en este proceso es la fosforilación secuencial de Ci por tres

proteínas quinasas, PKA, CK1 y GSK3. En *Drosophila*, Ci es retenida en el citoplasma por Costal-2 (Cos2) una proteína similar a kinesina que, en ausencia de Hh, promueve la fosforilación de Ci formando una plataforma sobre la cual se reclutan las tres proteínas quinasas en cercana proximidad a Ci. Subsecuentemente, la proteína Ci fosforilada es procesada por el proteosoma para originar una forma represora de menor peso molecular (CiR). Por otra parte, Cos-2 se encuentra unida al extremo carboxilo-terminal de Smo, y la activación de Smo por la señal de Hh provoca un cambio conformacional que promueve la liberación de una forma no procesada Ci desde Cos-2, este proceso requiere también de la actividad de la quinasa Fused, que fosforila Cos-2 en respuesta a la activación de Smo. Finalmente, la proteína Ci completa se transloca al núcleo actuando como un activador transcripcional (CiA) (Lum & Beachy, 2004). Si bien Ptc es esencial para inhibir la actividad de Smo y para la unión del ligando Hh, el receptor de Hh no ha sido bioquímicamente identificado *in vitro* y componentes adicionales podrían participar en la etapa inicial de la unión del ligando Hh. Hasta la fecha, Ihog y Boi son los candidatos mejor posicionados para ejercer el papel de co-receptores. A diferencia de Ptc, ellos no fueron identificados mediante análisis genéticos, sino por medio de búsquedas genómicas a gran escala utilizando la técnica de ARN interferente en cultivos de células de *D. melanogaster* (Lum et al, 2003; Yao et al, 2006). Por otra parte, las singularidades de la estructura del ligando Hh (péptido modificado por aductos de palmitoil y colesteril) y del receptor (presencia de un dominio sensor de esteroides o SSD) parecieran encontrarse en la base de la interacción entre las dos moléculas, sin embargo las evidencias indican que el aducto de colesterol no resulta ser imprescindible para que se produzca la unión de Hh a Ptc (Pepinsky et al, 1998). De esta forma Ptc podría tener otras funciones, no necesariamente asociadas con la actividad de receptor (Taipale et al, 2002).

El diagrama adjunto, resume los componentes de la vía de Hh anteriormente mencionados:

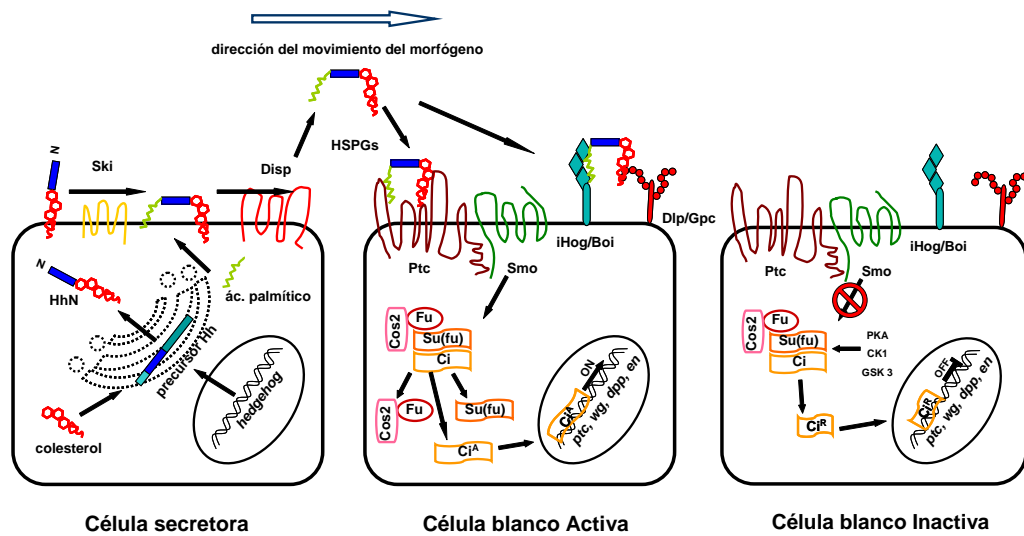


Figura 5. Esquema de la vía señalización activada por Hedgehog. Se representan los principales participantes de la vía incluyendo moléculas de membrana, intracelulares, extracelulares y genes blancos activados. Las abreviaturas hacen referencia a: Patched (Ptc), Smoothened (Smo), Dispatched (Disp), Dally like protein (Dlp), glypican (Gpc), interference Hedgehog (iHog), Brother of iHog (Boi), acetiltransferasa Skinny hedgehog (Ski), Cubitus interruptus (Ci), Cubitus interruptus represor(Ci<sup>R</sup>), Cubitus interruptus activador(Ci<sup>A</sup>), proteínas quinasas PKA, CK1 y GSK3, Suppressor of Fused (Su(fu)), Fused (Fu), costal 2 (Cos2). Moléculas extracelulares: heparin sulphate proteoglycanos (HSPGs), gen decapentaplegic (*dpp*), gen wingless (*wg*), engrailed (*en*), gen patched (*ptc*).

### 3. Patched-related

#### 3.1 Identificación de Patched-related, una nueva proteína de transmembrana de *Drosophila melanogaster*.

*Drosophila* resulta ser un modelo altamente idóneo para realizar la búsqueda de genes que controlan el desarrollo embrionario. Si bien la mayoría de los genes que se sabe están involucrados en las vías de señalización claves del desarrollo han sido identificados a través de "screenings" de genética clásica, dichas técnicas genéticas presentan ciertas limitaciones (tales como los genes cuya pérdida de función generan fenotipos sutiles difícilmente detectables o la existencia de redundancia génica). Por este motivo han surgido nuevas y efectivas aproximaciones para circunscribir la búsqueda a una clase molecular particular. Por ejemplo una identificación rápida de productos génicos secretados y transmembrana ha sido posibilitada por el desarrollo

de protocolos que alientan la preparación de bibliotecas de ARN enriquecido por fraccionamiento microsomal (Kopczynski et al, 1998).

Inspirados por esta idea, en el laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica de la Universidad de Chile se aplicó un procedimiento de hibridación sustractiva para aislar genes diferencialmente expresados entre embriones en blastodermo sincicial (estados 2 y 3) y en estado de gástrula (estados 6 y 7) de *D. melanogaster* (Gonzalez-Aguero et al, 2005). De esta forma se generó una genoteca de ADNc que contiene varios genes descritos (*stumps*, *sog*, *tailup*, *cubitus interruptus*, *antennapedia*, *thickveins*, *myosin heavy-chain like*, y *shibire*, etc.) y otros sin función conocida. En particular, dentro de estos genes no caracterizados, hay un número significativo que codifican para posibles proteínas de secreción y transmembrana, sugiriendo nuevos componentes de vías de señalización que pueden ser incorporados en las redes de regulación que controlan la morfogénesis temprana del embrión (Zuniga et al, 2009).

Uno de estos genes, CG11212, codifica para un producto proteico de 1169 aminoácidos que presenta 12 alfa hélices transmembrana y un SSD. La secuencia aminoacídica deducida de CG11212 posee un alto porcentaje de similitud con otras proteínas de insectos y moderada similitud con proteínas de vertebrados. Todas estas proteínas han sido denominadas Patched-related (Ptr), por poseer una topología muy similar a la descrita para la proteína Patched de invertebrados y vertebrados (Pastenes et al, 2008). Estas proteínas forman parte de una nueva clase de proteínas-SSD la cual aun no ha sido funcionalmente caracterizada. Si bien la presencia del dominio SSD potencialmente las involucra con el transporte de lípidos, esteroides o proteínas modificadas con esteroles (Kuwabara & Labouesse, 2002), la función que cumplen durante el desarrollo no ha sido establecida.

Por su parte, el nemátodo *Caenorhabditis elegans* presenta en su genoma 24 genes *Ptr*. Estudios utilizando ARNi para silenciar específicamente su expresión, han determinado que dichos genes cumplen funciones asociadas a la muda, crecimiento y metamorfogénesis (Zugasti et al, 2005). Por ejemplo, la proteína *Ptr* denominada DAF-6 es requerida para la formación del lumen de un importante órgano sensorial localizado en el extremo anterior del animal (Perens & Shaham, 2005). Conjuntamente con la expansión de genes *Ptr* anteriormente mencionada, se destaca la llamativa ausencia de



varios miembros típicos de la cascada de transducción de Hh (tales como *smo*, *fu*, *su(fu)*, *cos2*) (Burglin & Kuwabara, 2006; Zugasti et al, 2005). Este hecho ha permitido no solo concluir que en *C. elegans* los homólogos de Ptr podrían estar reteniendo un rol más ancestral, reminiscente de su origen evolutivo, sino también alientan al desarrollo de experimentos en *Drosophila* para determinar la posibilidad de vinculación funcional entre Ptr y la vía de señalización gatillada por Hh. En el mismo sentido, la evidente similitud estructural existente entre Ptr y Ptc ha constituido un elemento adicional para centrar el objetivo general de la presente tesis de Doctorado en estudiar si Ptr podría estar cumpliendo funciones asociadas con la vía de activación de Hh. Con tal finalidad se diseñaron y realizaron un conjunto de aproximaciones experimentales que permitieron explorar la distribución temporo-espacial del gen y de la proteína, observar los fenotipos obtenidos tras ocasionar la pérdida de función del gen, evaluar la actividad de la vía de Hh por ensayos reportero en cultivos celulares luego de ocasionar cambios en la concentración de Ptr y analizar la posibilidad de interacción directa de la proteína con Hh.



## Hipótesis y Objetivos específicos

Ptr es parte de la vía de señalización mediada por Hh durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*.

### Objetivos específicos

OE1) Analizar el patrón de expresión y localización subcelular de la proteína Ptr durante la embriogénesis normal de *Drosophila melanogaster*.

OE2) Identificar si Ptr es un componente de la vía mediada por Hh en células en cultivo y, si fuese así, determinar su jerarquía de interacciones dentro de la misma.

OE3) Determinar si Ptr es capaz de interactuar directamente con Hh.

OE4) Determinar si la ausencia y/o la disminución de la expresión de Ptr están asociadas a la aparición de alteraciones del desarrollo de *Drosophila melanogaster* que informen sobre su participación en la vía de Hh o sobre funciones no predecibles.



# Materiales y Métodos

## 1. Materiales generales

### Cepas de *Drosophila melanogaster*

La cepa Canton S fue utilizada como cepa silvestre.

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

I.  $y^1$ ,  $w^{67c23}$ ;  $P\{y^{+mDint2}$ ,  $w^{BR.E.BR}=SUPor-P\}$ KG01682 porta el elemento transponible  $P\{SUPor-P\}$  en la región 5' al gen *Ptr*.

II.  $w^*$ ;  $wg^{Sp-1}/CyO$ ;  $ry^{506}$ ,  $Dr^1$ ,  $P\{ry^{+t7.2}=\Delta 2-3\}$ 99B/TM6 portadora de la transposasa  $\Delta 2-3$  en el tercer cromosoma.

III.  $wg^{Sp-1}$ ,  $J^1$ ,  $L^2$ ,  $Pin^1/CyO$ ,  $P\{ry^{+t7.2}=ftz/lacB\}$ E3 porta un cromosoma 2 balanceador que expresa  $\beta$ -galactosidasa bajo el control del promotor del gen *fushi tarazu*.

IV.  $w^*$ ;  $P\{w^{+mC}=UAS-lacZ.B\}$ Bg4-2-4b porta un cromosoma 3 balanceador que expresa  $\beta$ -galactosidasa bajo el control del sistema GAL4-UAS.

V.  $w^*$ ;  $P\{mat\alpha 4-GAL4-VP16\}$ V37, en esta cepa el factor de transcripción GAL4 se encuentra fusionado al activador viral VP16, y se expresa bajo el control del promotor de  $\alpha$ -tubulina 67C.

VI.  $y^1 w^*$ ;  $P\{GAL4-nos.NGT\}$ 40, en esta cepa la expresión del factor de transcripción GAL4 en todo el embrión es regulada por el promotor del gen materno *nanos*.

VII.  $y^1$ ,  $w^*$ ;  $P\{w^{+mC}=crq-GAL4\}$ 2 en esta cepa la expresión del factor de transcripción GAL4 es regulada por el promotor del gen *croquemort*.

También parte del trabajo se realizó con cepas donadas por colegas:

I. *ptc*-GAL4 en esta cepa la expresión del factor de transcripción GAL4 es regulada por el promotor del gen *patched* y fue donada por Álvaro Glavic.

II. *Kr*-GFP en esta cepa la expresión de GFP es regulada por el promotor del gen *krüppel* y fue donada por Rafael Cantera.

### Cepas de *Escherichia coli*

I. Para el clonado de productos de interés se utilizó la cepa DH5- $\alpha$  (Invitrogen, F- $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$  U169 *recA1 endA1 hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_{k^+}$ ) *phoA supE44*  $\lambda$ -*thi-1 gyrA96 relA1*) de *Escherichia coli*. Esta cepa contiene un marcador ( $\phi 80lacZ\Delta M15$ ) que

proporciona complementación al gen de la  $\beta$ -galactosidasa presente en el vector pGEMT-Easy, permitiendo la identificación por color de las colonias transformantes positivas.

II. Cepa BL21 (Stratagene, B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal) de *Escherichia coli*. Esta cepa fue utilizada para la expresión de proteínas ya que carece de la proteasa lon y la proteasa de membrana externa ompT, que pueden degradar proteínas durante su expresión.

### **Células de *Drosophila***

I. Las células S2 (Schneider 2) de *Drosophila melanogaster* derivan de cultivos primarios de embriones tardíos (Schneider, 1972) y fueron adquiridas a Invitrogen. Estas células son débilmente adherentes y crecen preferentemente en suspensión.

II. Las células S2R<sup>+</sup> de *Drosophila* fueron obtenidas del *Drosophila* Genomics Resource Center de la Universidad de Indiana, Estados Unidos. Se aislaron a partir de células S2 pero, a diferencia de éstas, las células S2R<sup>+</sup> son mucho más adherentes y fueron aisladas, en principio, por su habilidad de responder al ligando Wnt (Yanagawa et al, 1998).

III. Las células cl-8 (clon 8) de *Drosophila* fueron obtenidas del *Drosophila* Genomics Resource Center de la Universidad de Indiana, Estados Unidos. Constituyen un línea celular inmortalizada que deriva de discos imaginales de ala de larvas del tercer estadio de *Drosophila melanogaster* (Peel & Milner, 1992), por lo que presentan intacta la cascada de señalización de Hh. Son células adherentes altamente sensibles al sobrecrecimiento por lo que su densidad de cultivo tiene que ser mantenida alrededor de 1-5 x 10<sup>6</sup> células/mL.

### **Vectores**

I. El vector pGEMT-Easy (Promega), contiene los promotores SP6 y T7 flanqueando la región de clonado y una secuencia que codifica para la enzima  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a Ampicilina. Estos vectores fueron utilizados para clonar los productos de PCR en todos los procedimientos de sub-clonado.

II. El vector pTRHis2-Topo (Invitrogen), es un vector de expresión en bacterias. Posee un promotor inducible por IPTG que precede a la región de clonado y a continuación una región que codifica para 6 histidinas y un epítipo Myc. Posee una secuencia que codifica para la enzima  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a Ampicilina.

III. El vector pGEX-6P1 (General Electric HealthCare) es un vector de expresión en bacterias. Contiene un sitio de múltiple clonado en la región C-terminal del gen GST (Glutathion-S-Transferasa), permitiendo crear una proteína de fusión a GST, cuya expresión es inducible por IPTG.

IV. El vector pMT/V5/His/Topo (Invitrogen) es un vector de expresión en células de *Drosophila*. Posee el promotor del gen metalotioneina, inducible por Cobre, y produce una proteína recombinante con una cola de histidinas y un epítipo V5. Posee un origen de replicación en bacterias y una secuencia que codifica para la enzima  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a Ampicilina.

V. El vector pUASpEGFPc1 codifica para una proteína Fluorescente verde mejorada y se expresa en células de *Drosophila* (Megraw et al, 2002). Posee un origen de replicación en bacterias y una secuencia que codifica para la enzima  $\beta$ -lactamasa.

VI. El vector pMT-Gal4 (*Drosophila* Genomics Resource Center) es un vector de expresión en células de *Drosophila* y codifica para la proteína Gal4 y posee un promotor del gen que codifica para metalotioneina y es inducible por  $\text{CuSO}_4$ . Posee un origen de replicación en bacterias y una secuencia que codifica para la enzima  $\beta$ -lactamasa.

VII. pGIBS-LYS, Adquirido en American Type Culture Collection (ATCC, cat. #87482,). Derivado del vector pBluescript II KS+, posee un marcador de selección ampR y un origen de replicación pMB1, f1. El gen posee en su extremo una secuencia de poliA agregada artificialmente y un sitio de unión para la ARN polimerasa T3. Fue utilizado en la síntesis *in vitro* del ARNs de Lys.

### **Anticuerpos y Sondas**

Los anticuerpos y sondas comerciales utilizados fueron:

I. Electron Microscopy Science: suero anti-conejo conjugado a partículas de oro coloidal de 15 nm (25112, 1:100).

II. Hybridoma Bank: anticuerpos específicos para Patched (Apa1, 1:100), beta galactosidasa (JIE7, 1:10), armadillo (N2 7A1, 1:50), Myc (9E 10, 1:20)

III. Jackson ImmunoResearch: suero anti-conejo Cy3 (1:1000)

IV. Molecular Probes: sueros anti-ratón Alexa Fluor 488 (1:800), anti-conejo Alexa 546 (1:800), DAPI (1:5000), faloidina Alexa Fluor 488 (1:600), ToPro3-Alexa 624 (1:200)

V. Promega: anticuerpo específico para beta galactosidasa (z3781, 1:500)

**VI.** Santa Cruz Biotechnology: anticuerpos específicos para Hedgehog (sc-25759, 1:100), V5 (sc-81594, 1:2000), Myc (sc-40, 1:2000), Patched (sc-6147, 1:200)

**VII.** Sigma: anticuerpo específico para V5 ( v 8012, 1:500)

**VIII.** Thermo Scientific: sueros anti-ratón HRP (1:1000); anti-conejo HRP (1:15000)

## **2. Métodos Generales**

### **Colecta de embriones**

Los embriones fueron colectados sobre placas conteniendo agar al 2% en jugo de uva, las placas fueron cubiertas con una capa de ácido acético y levadura para estimular la oviposición. Las moscas fueron incubadas a 25°C excepto los cruces con cepas portadoras de Gal4 las cuales fueron incubadas a 29°C.

Para la extracciones de ARN, los embriones fueron colectados en PBS de Dulbecco (DPBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM pH 7.2), preparado con agua libre de nucleasas conteniendo Tritón 0.05% (DPBS/Tritón). Los embriones fueron decorionizados con hipoclorito de sodio 50% en DPBS/Tritón hasta constatar la desaparición de los filamentos antero-dorsales que tiene el corión, lavados en DPBS/Tritón, seleccionados para ser introducidos en un tubo con RNAwiz (Ambion) y almacenados a -80°C hasta su utilización.

Para la obtención de una fracción enriquecida en membranas embrionarias se realizaron colectas de 4 horas de duración hasta completar 1.5 g de embriones. Los embriones se decorionizaron con hipoclorito de sodio 50% en DPBS/Tritón, lavaron en DPBS/Tritón y almacenaron a -80°C eliminando la mayor cantidad de líquido posible.

### **Electroforesis de ADN y ARN**

Todas las electroforesis de ADN se llevaron a cabo en geles de agarosa al 1% en solución TAE (Tris 40 mM, ácido acético 1.1%, EDTA 2 mM) conteniendo una concentración final de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (EtBr). Para las mediciones de tamaño y masa fue utilizado el estándar 1 Kb Gene Ruler (Fermentas). Para las electroforesis de ARN, se utilizaron geles desnaturalizantes de agarosa/formaldehído 37%. A cada muestra (10 µl en agua libre de nucleasas) se agregó 9 µl de formamida, 3 µl de formaldehído 37%, 2 µl de MOPS 10X y 1 µl de EtBr 10%. Las muestras fueron desnaturalizadas a 70°C por 15 min, enfriadas en hielo por 5 min y se agregó 2 µL de solución de carga (Ambion). El estándar de peso molecular RiboRuler (Fermentas) se

preparó igual que las muestras, a partir de 2  $\mu$ L del stock. La electroforesis se llevó a cabo en tampón MOPS 1X a 80 V por 40 minutos.

### **Análisis densitométricos**

Para la estimación de la masa de ácidos nucleicos obtenida en las reacciones de PCR y síntesis *in vitro* de ARNs, se utilizó el programa Kodak 1D para cuantificar la densidad de pixeles observada en geles de Agarosa. Para ello cada banda de los estándares de tamaño, cuya masa es conocida, fue cuantificada para obtener una curva estándar de masa vs intensidad. El mismo procedimiento de cuantificación fue aplicado a las bandas de interés observadas en las electroforesis y mediante un análisis de regresión se estimó la masa del ADN o ARN de interés.

### **Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)**

Muestras de proteínas fueron fraccionadas en geles de acrilamida al 10-12% y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.01 % en cámaras verticales de electroforesis MiniProtean II (BioRad) de acuerdo con protocolos estándares (Harlow & Lane, 1999). Los geles fueron teñidos en una solución de azul de Coomassie al 0.1 % p/v en ácido acético 10% y metanol 50% en agua destilada. Los geles fueron desteñidos en una solución de ácido acético 10% y metanol 10% en agua destilada, y fueron fotografiados usando el programa Kodak 1D.

### **Preparación de muestras para SDS-PAGE**

**I. Muestras de proteínas bacterianas:** Las muestras de proteínas bacterianas fueron disueltas en buffer de muestra (SDS 6%, glicerol 10%, Tris 192 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0,04% y  $\beta$ - mercaptoetanol 20%), e incubadas a 100°C por 10 min.

**II. Muestras de fracciones de membrana:** Para purificar la fracción de membrana de embriones se siguió el protocolo previamente descrito por (Zhang & Hsieh, 2000) que utiliza el equilibrio de sedimentación en un gradiente discontinuo de sacarosa (0.5M, 2.0M, 2.5M). Para examinar si Ptr era una proteína de membrana periférica o integral se trató la fracción de membrana obtenida con PBS, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M pH 10.0 o 1% (v/v) NP-40 en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 por 30 min. Para generar fracciones de sobrenadante y pellet, las preparaciones anteriores fueron centrifugadas a 30.000 x g a 4°C por 30 min. Los pellets se solubilizaron en el buffer de muestra con SDS mientras que los

sobrenadantes fueron liofilizados previamente a la adición del mencionado buffer. Antes de proceder a la carga del gel las muestras fueron incubadas a 100°C por 10 min.

**III. Muestras de extractos celulares:** Los extractos de células cl-8 sobre-expresando Ptr-V5 fueron obtenidos lisando tres placas de cultivo de 60 mm con 600 µl de buffer de lisis frío (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Triton X-100 1% y cocktail de inhibidores de proteasas). El lisado fue centrifugado por 10 min a 16.000 x g, 4°C y el sobrenadante almacenado a -80°C. Antes de proceder a la carga del gel, las muestras fueron incubadas con el buffer de muestra 30 min a 37°C con la finalidad de evitar la formación de agregados proteicos.

### **Western Blots**

Geles de SDS-PAGE fueron electrotransferidos a membranas de PVDF (Polivinilideno Fluoruro, Millipore) o Nitrocelulosa (NC) por 12 horas a 20 volts o 1 hora a 100 voltios a 4°C en módulos de electrotransferencia MiniProtean II (BioRad). La presencia de proteínas en la membrana de PVDF o NC fue verificada por tinción con Rojo Ponceau al 1% (Sigma). Las membranas fueron bloqueadas en leche descremada al 5% en solución de lavado (NaCl 100 mM, Tris 20 mM pH 7.4, Tween 20 0.1%) por 30 min y los anticuerpos fueron diluidos en leche descremada 1% en esta misma solución. En general, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios por 16 horas a 4°C con agitación suave y con los anticuerpos secundarios acoplado a peroxidasa por 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Ambos anticuerpos fueron lavados 3 veces por 15 min en solución de lavado. La unión de anticuerpos a la membrana fue detectada utilizando Supersignal West Pico Chemiluminescent reagent (Amersham Biosciences). Las membranas fueron expuestas a films radiográficos normales (Kodak) o sensibles (Amersham Biosciences) los cuales fueron revelados, fijados y fotografiados.

### **Cuantificación de proteínas**

Las proteínas fueron cuantificadas utilizando el protocolo establecido por Bradford (Bradford, 1976) y una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA).

### **Transformación bacteriana**

Para la transformación química, 30 µL de células competentes fueron transformadas con 2 µL de reacciones de ligación o 50 ng de ADN plasmídico e incubadas a 4°C por 30 min, luego de los cuales fueron incubadas 37°C por 45 s y sumergidas inmediatamente



en hielo por 2 min. Se agregó 1 mL de medio LB y las células fueron incubadas a 37°C con agitación vigorosa por una hora y luego fueron sembradas sobre placas de medio LB agar complementado con ampicilina a 50 µg/mL. En el caso de la transformación eléctrica, 30 µL de células electrocompetentes fueron incubadas con 50 ng de ADN plasmídico en hielo por 2 minutos y transformadas mediante un shock de 2.5 voltios por 5 ms. Se agregó 1 mL de medio LB y las bacterias fueron incubadas a 37°C con agitación vigorosa luego de los cuales fueron sembradas sobre placas de medio LB Agar complementado con ampicilina a 50 µg/mL.

### **Purificación de ácidos nucleicos**

Los ácidos nucleicos fueron separados de las proteínas mediante extracción con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. La mezcla fue agitada vigorosamente durante 20 segundos y centrifugada a 13000 x g por 1 minuto. La fase acuosa resultante fue tratada de la siguiente manera: en el caso de ADN, se mezcló con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 1 volumen de isopropanol, y se incubó a -20°C por 12 horas. Luego la muestra fue centrifugada a 13000 x g por 1 hora a 4°C, el sobrenadante fue descartado y el precipitado fue lavado con 500 µL de etanol 70%, centrifugado a 13000 x g por 1 hora a 4°C. Finalmente, el sobrenadante fue eliminado, el precipitado fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en agua libre de nucleasas.

En el caso del ARN, luego de la extracción fenólica la fase acuosa fue mezclada con 1 volumen de cloruro de litio 8 M, etanol absoluto y glicogeno (5 ug/mL) y se procedió igual que para el ADN.

### **Extracción de ADN Plasmídico**

**I. Miniprep:** Tres ml de bacterias en medio LB crecidas 16 horas a 37°C fueron centrifugados, el sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 200 µL de solución 1 (Tris 50 mM, EDTA 10 mM), lisadas agregando 200 µL de solución 2 (SDS 1%, NaOH 0.2 M) y neutralizadas con 200 µL de solución 3 (acetato de potasio 3M, ácido acético 11.5 %) y luego fueron centrifugadas a 13000 x g por 15 minutos. El sobrenadante fue rescatado y mezclado vigorosamente con 600 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1, centrifugado a 13000 x g por 10 minutos y la fase acuosa rescatada fue mezclada vigorosamente con 420 µL de isopropanol y centrifugado a 13000 x g por 10 minutos. El precipitado fue lavado con 1

ml de etanol al 70% y centrifugado a 13000 x g por 10 minutos. El Etanol fue descartado y el ADN fue resuspendido en 30  $\mu$ L de agua. El ARN fue degradado adicionando 1  $\mu$ L de ARNasa A 10 mg/ml e incubado a 37°C por 30 minutos. Las muestras fueron fraccionadas mediante electroforesis en geles de agarosa y cuantificadas por espectrofotometría a 260 nm, obteniéndose en promedio una concentración de 5  $\mu$ g/ $\mu$ L.

**II. Midiprep:** La extracción de ADN plasmídico utilizado para transfección de células de *Drosophila* y transformación de células bacterianas se realizó utilizando el sistema Plasmid Midi kit (QIAGEN) según instrucciones del fabricante, obteniéndose 300  $\mu$ L de ADN a una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L.

#### **Digestión del ADN**

Las digestiones de ADN plasmídico se realizaron en un volumen final de 10-20  $\mu$ L utilizando 1  $\mu$ g de ADN y 2.5-10 U de enzima de restricción incubando 1 hora a 37°C.

#### **Extracción de ADN desde gel**

Productos de PCR para secuenciar o fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción fueron fraccionados en geles de Agarosa mediante electroforesis y la o las bandas de interés fueron cortadas y el ADN fue recuperado utilizando el kit SV Gel & PCR Clean Up System (Promega) o QIAquick Gel extraction kit (Qiagen), según instrucciones del fabricante.

#### **Desfosforilación de ADN**

Los plásmidos linearizados fueron desfosforilados para evitar la re-circularización utilizando la enzima CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Fermentas). En las reacciones de desfosforilación se utilizó 1 U de enzima por cada picomol de ADN directamente en la reacción de digestión y la mezcla fue incubada por 30 min a 37°C. El ADN tratado fue sometido a extracción fenol:cloroformo, precipitado y resuspendido en agua libre de nucleasas. El ADN fue cuantificado por densitometría y almacenado a -20°C hasta su utilización.

#### **Obtención de ADN genómico a partir de una mosca**

Se homogeneizó una mosca en 500  $\mu$ L de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.2, EDTA 2mM, Tritón 0.2%, Proteinasa K 100  $\mu$ g/ml) e incubada a 56°C por 30 min y luego

a 95°C por 10 min para inactivar la Proteínasa K. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 14000 x g a 4°C por 15 min y el sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta su utilización. La calidad del ADN genómico fue evaluada mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores identificados en la tabla.

#### **Extracción de ARN total**

Embriones (10 a 15) o células transfectadas fueron homogeneizados en 1 ml del reactivo RNAwiz (Ambion) utilizando una jeringa de insulina. Luego de 5 min a temperatura ambiente, se le agregó 0.2 volúmenes de Cloroformo y se sometió a la muestra a un ciclo de agitación e incubación a temperatura ambiente por 10 min y centrifugación a 13.000 x g por 15 min a 4°C, el ARN rescatado desde la fase acuosa fue precipitado con isopropanol/glicogeno mediante centrifugación a 14.000 x g a 4°C por 15 min. El precipitado fue lavado con etanol 75% y centrifugado a 14.000 x g a 4°C por 5 min. Finalmente el ARN total fue resuspendido en 30 µl de agua libre de nucleasas. Se obtuvo un rendimiento promedio de 1 µg/µl de ARN. La integridad del ARN fue verificada por electroforesis en gel de agarosa. La calidad se evaluó mediante la síntesis de ADNc y la amplificación por PCR del transcrito de actina a partir de este ADNc.

#### **Síntesis de ADNc**

El ARN fue usado como sustrato para la síntesis de ADNc de hebra simple mediante transcripción reversa en una reacción estándar, utilizando 200 U de la enzima Superscript II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen) y 0.5 µg de partidor oligo dT (15 nucleótidos). La calidad del ADNc resultante fue verificada mediante su utilización como sustrato para la amplificación del transcrito de actina utilizando los cebadores actina-s y actina-as. A los ADNc utilizados en los ensayos de qPCR se les agregó 0.2 µg de ARNm spike poliadenilado. La presencia del ADNc spike fue verificada mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores pLys-s\_PCR y pLys-as\_PCR.

#### **PCR**

Las reacciones de amplificación mediante PCR fueron realizadas en un termociclador PTC-100 (MJ Research) o Biometra T-Gradient, utilizando el siguiente protocolo: los sustratos de la reacción de PCR fueron 50 ng de ADN plasmídico o 100 ng de ADNc, tampón 1X (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM y 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) en un volumen de 25 µl. En general se utilizó un programa de 35 ciclos de:

desnaturalización 30 segundos a 94°C, alineamiento 30 segundos a la temperatura acorde a cada pareja de cebadores y extensión de 2 minutos a 72°C. En general, se utilizó la enzima Taq DNA Polimerase High Fidelity (Fermentas), excepto en las reacciones destinadas a la búsqueda de deleciones cromosómicas del gen *Ptr*, en las cuales se utilizó la enzima Go Taq Green Master Mix (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)**

Para las reacciones de amplificación mediante qPCR se utilizó el sistema Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Invitrogen) en un equipo LightCycler® 1.5 Instrument (Roche). Cada reacción fue realizada mezclando 50 ng de ADNc, 0,5 uM de cada cebador, 0,5 µg de BSA y 5 µL de Platinum SYBR Green, en un volumen final de 10 µL. El programa de amplificación consistió en una etapa de activación a 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación que consistían en 2 segundos de desnaturalización a 95°C, 10 segundos de alineamiento a la temperatura adecuada para cada pareja de cebadores y una extensión de 15 segundos a 72°C. Los productos amplificados fueron examinados mediante electroforesis para descartar la presencia de amplificaciones inespecíficas. Los niveles de expresión relativa fueron calculados a partir de los “crossing points” (Cp) y de los valores de “cycle-threshold” (Ct) en un nivel constante de fluorescencia, y utilizando el modelo de cuantificación relativa  $\Delta\Delta C_p$  descrito por Livak y Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001). Brevemente, a partir de los valores de Cp de la muestra problema y la referencia, ambas normalizadas por los valores de Cp obtenidos para el spike lisina, se obtienen las variaciones relativas entre las condiciones comparadas.

### **Inmunofluorescencias de embriones**

Embriones de todos los estadios fueron colectados en DPBS/Tritón 0.05%, decorionizados con Hipoclorito de Sodio:DPBS/Tritón 1:1 por 1 minuto o hasta que los filamentos anterodorsales del corion hubiesen desaparecido y lavados 3 veces en DPBS/Tritón. Los embriones estadios específicos seleccionados fueron transferidos a una solución de paraformaldehído al 4% (PFA 4%):Heptano 1:1 e incubados por 30 min con agitación suave. La membrana vitelina se removió manualmente mediante el movimiento suave de los embriones pegados a una cinta de doble faz (“hand-peeling procedure”). Los embriones devitelinizados se post-fijaron en PFA 4% por 20 min, lavados 3 veces en DPBS/Tritón e incubados en solución de bloqueo (BSA 3%, Tritón X-

100 0.1%, Glicina 50mM en DPBS) a temperatura ambiente por 30 min. En general, la incubación de los anticuerpos primarios se realizó en solución de bloqueo por 16 horas a 4°C en agitación, mientras la incubación de los anticuerpos secundarios fue en la misma solución por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de los anticuerpos primarios se realizaron 4 lavados con solución de bloqueo de 15 minutos cada uno y luego de los anticuerpos secundarios se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno en DPBS/Tritón. El montaje de las preparaciones se realizó en glicerol/Tris 80%.

#### **Inmunofluorescencias en células**

Células sembradas en cubreobjetos fueron lavadas tres veces con DPBS, fijadas en PFA 4% por 15 minutos, lavadas tres veces en DPBS y permeabilizadas en PBST (Tritón 0.1%) durante 15 min. Posteriormente se incubaron en una solución de bloqueo (BSA 3%, Tritón 0.1% en DPBS) por 45 minutos a temperatura ambiente. Las incubaciones con los anticuerpos primarios y secundarios fueron realizadas en esta misma solución por 45 minutos a 37°C. Luego de cada uno de los anticuerpos, las células fueron lavadas 3 veces de 10 minutos cada una con DPBST. El montaje de las preparaciones se realizó utilizando glicerol/Tris 80%.

#### **Adquisición de imágenes**

Las inmunofluorescencias de células y embriones fueron examinadas y fotografiadas en el microscopio confocal Leica TCS-SP5-DMI6000 o Leica TCS SP5 y tratadas con Adobe Photoshop CS. Por su parte, las preparaciones cuticulares fueron observadas y fotografiadas utilizando un microscopio Nikon Optiphot con óptica de campo oscuro y cámara Nikon DS-Fi1e.

### **3. Métodos particulares para lograr objetivos específicos**

#### **OE 1**

##### **Generación de anticuerpos anti-Ptr**

##### **1a. Generación, expresión y purificación de proteína recombinante Ptr-MyHis:**

Utilizando como sustrato ADNc de embriones, se amplificó mediante PCR un fragmento carboxilo terminal (825 pb) de la secuencia codificante del gen *Ptr*. El producto fue ligado al vector inducible pTRHis2-Topo (Invitrogen) para producir una proteína de fusión que contiene un epítipo Myc, para su reconocimiento en inmunoensayos y una cola de 6 histidinas, que permite su purificación desde columnas de afinidad. Este

vector fue utilizado para transformar células quimiocompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , purificado y secuenciado. Para la purificación de proteína recombinante, se creció 1 l de cultivo del clon seleccionado a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 medida a 600 nm, momento en el cual fue agregado IPTG a una concentración final de 1 mM, y el cultivo fue crecido por 3 horas. Las bacterias fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en 10 ml de solución de lisis (cloruro de guanidinio 6 M, fosfato de sodio 20 mM pH 7.8, NaCl 500 mM, Triton X-100 1%), lisadas por sonicación y criofractura, incubadas con ADNsa I, ARNsa A (10  $\mu$ g/ml) e inhibidores de proteasas aprotinina (10  $\mu$ g/ml, Sigma), leupeptina (10  $\mu$ g/ml, Sigma), pepstatina (5  $\mu$ g/ml, Sigma) y PMSF (100  $\mu$ g/ml, Calbiochem), por 30 min a 4°C con agitación. Las bacterias lisadas fueron centrifugadas y el sobrenadante fue incubado con resina Ni-NTA Agarosa (Invitrogen) durante 2 horas a 4°C con agitación suave. La resina fue lavada con solución desnaturalizante de lavado (urea 8 M, fosfato de sodio 20 mM pH 7.8, NaCl 500 mM), y la proteína fue eluida con 1 ml de una solución urea 8 M, fosfato de sodio 20 mM pH 4.0, NaCl 500 mM. La expresión y purificación de la proteína fue verificada por SDS-PAGE y Western Blot.

**Ib. Generación, expresión y purificación de la proteína recombinante Ptr-GST:** El mismo fragmento utilizado para generar la proteína anterior fue ligado a un vector de expresión pGEX-6P-1 y se transformó con él bacterias quimiocompetentes BL21. El vector elegido posee, además de un promotor inducible por IPTG, un dominio glutatión transferasa (GST) a través del cual la proteína pudo ser purificada por cromatografía de afinidad usando una matriz de glutatión. Las condiciones óptimas de producción de Ptr-GST fueron determinadas por medio de experimentos piloto. Asimismo y con la finalidad de evitar la degradación de la proteína, los procedimientos que involucran la expresión y la purificación de la proteína fueron realizados en un solo día. Para la expresión de la proteína, las cepas fueron inoculadas en una proporción 1:100 utilizando para ello un pre-cultivo crecido durante toda la noche a 37°C en agitación. Luego de 2 horas de incubación a 37°C en agitación y con la finalidad de provocar la expresión de la proteína recombinante fue agregado IPTG a una concentración de 1mM. Luego de la inducción, el cultivo fue crecido a 37°C por 1 hora, centrifugado a 7700 x g por 10 min a 4°C y el pellet resuspendido en DPBS conteniendo coctel de inhibidores de proteasas (Sigma). Luego del apropiado sonicado, se le agregó Tritón X-100 1% dejándolo reposar 20 min en hielo para finalmente centrifugarlo 20 min a 12000 x g. Con la finalidad de evitar la degradación de la proteína todos los pasos de la

purificación de Ptr-GST fueron realizados a 4°C. El sobrenadante conteniendo las proteínas solubles fue incubado con 1 ml de resina Glutati6n Superflow (Qiagen). La resina con las proteínas que contiene GST unida fue decantada y el sobrenadante fue desechado. La resina fue lavada 2 veces y la proteína unida a la resina fue eluída en 1 ml de soluci6n con 50 mM de glutati6n reducido (GSH). Las diferentes fracciones colectadas fueron dializadas, filtradas y concentradas utilizando columnas Amicon con corte 30 kDa (Millipore). Se colectaron fracciones en volúmenes de 0,5 ml, se determin6 la concentraci6n proteica por Bradford y se almacenaron a -80°C con la adici6n de 10% Glicerol. La liberaci6n del péptido inmunogénico del dominio GST se realizó utilizando la enzima PreScission Protease (GE Healthcare Life Science), la cual específicamente reconoce la secuencia LeuGluValLeuPheGln/GlyPro cortando entre los residuos Gln y Gly, segùn protocolo establecido por el fabricante. Todos los resultados fueron examinados por SDS-PAGE.

**Inoculaci6n del inmun6geno al conejo:** Antes de comenzar el protocolo de inmunizaci6n se recuperaron 5 ml de suero (suero pre-inmune). La proteína recombinante Ptr-MycHis fue inyectada en conejo segùn el protocolo descrito por Kundsén (Kundsén, 1985). Brevemente, fracciones de proteína purificada fueron electrotransferidas a membranas de NC y teñidas con rojo Ponceau (Sigma), la banda de interés fue cortada, disuelta en 0.5 ml de DMSO (Sigma) e inyectada en el conejo. Se realizaron 5 inoculaciones cada 15 días. Luego de la quinta inyecci6n, el conejo fue sangrado para obtener 40 ml de suero.

Por su parte la proteína Ptr-GST fue proporcionada al servicio del Polo tecnol6gico de la Facultad de Química-UdelaR (Uruguay) en una concentraci6n 4.4 mg/ml en DPBS con cóctel de inhibidores de proteasas y 10% de glicerol para su posterior inoculaci6n.

**Purificaci6n del anticuerpo por inmunoadsorción:** Cualquiera de los dos antisueros producidos fueron inmunoadsorbidos utilizando Ptr recombinantes antes de su uso. Para ello se incub6 1 ml de suero por 16 horas a 4°C con fragmentos de membranas de NC que contenían la proteína recombinante. Luego las membranas fueron lavadas en DPBS 3 veces por 10 minutos cada uno, el anticuerpo unido a las membranas fue liberado mediante incubaci6n de las membranas con Glicina 0.1M pH 2.8 por 1 min, y rápidamente neutralizado con 0.1 volumen de Tris 1 M pH 8.0. Luego del agregado de BSA, las fracciones fueron guardadas a -20°C.

### **Microscopía Electrónica (“pre-embedding immunogold”)**

Los embriones fueron colectados, decorionizados y fijados por una 1 hora en una mezcla heptano: PFA 4% preparado fresco en DPBS (pH 7.3), 1:1 a temperatura ambiente. Posteriormente fueron manualmente devitelinizados y transferidos a PFA 4% por 30 min adicionales. Finalmente se lavaron en DPBS y se incubaron con buffer de bloqueo (BSA 3%, saponina 0.03% y suero de cabra normal 1% en DPBS) por 40 min (2 cambios). La incubación con el anti-Ptr (16 horas a 4°C, 1:20) y con los anticuerpos secundarios conjugados a partículas de 15 nm de oro coloidal (1 hora a temperatura ambiente, 1:100, EMS) se realizó en el mismo buffer de bloqueo. Los lavados luego de cada uno de los anticuerpos se realizaron con DPBS/saponina por 60 min (4 cambios de 15 min cada uno). Se realizó una post-fijación de 10 min con 2.5% glutaraldehído (Fluka) en DPBS luego de la cual los embriones se lavaron nuevamente con DPBS para ser teñidos con 2% acetato de uranilo (16 horas a 4°C, Merck). Finalmente, las muestras fueron deshidratadas por su pasaje a través de una serie de acetonas y embebidas en araldita. Los cortes finos y ultrafinos fueron obtenidos con un ultramicrotomo RMC MT-X, teñidos con citrato de plomo y observados en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 equipado con una cámara digital Hamamatsu CCD 4742-95.

### **OE2 y OE3**

#### **Cultivo de células de *Drosophila***

**I. Cultivo de células S2 o S2R+:** Estas células fueron cultivadas a 25°C sin CO<sub>2</sub> en placas de 60 mm en 4 ml de medio Schneider (Gibco) suplementado con Suero Fetal de Bovino (SBF, inactivado por calor) al 10%, 200 U/ml de penicilina (Gibco) y 200 µg/ml de estreptomycin (Gibco). Las células fueron mantenidas en una placa hasta alcanzar una densidad de 20 x 10<sup>6</sup> células/ml, momento en el cual fueron lavadas en PBS y sembradas en placas nuevas a una concentración de 1 x 10<sup>5</sup> células/ml en medio fresco.

**II. Cultivo de células cl-8 de *Drosophila*:** Estas células fueron cultivadas a 25°C sin CO<sub>2</sub> en placas de 60 mm en 4 ml de medio M3 (Sigma) suplementado con 2% de SBF inactivado, 10 µg/ml de insulina (Sigma), 58 µg/ml L-glutamina (Sigma), 100 U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomycin (Gibco) y 2.5% de extracto de mosca. La densidad óptima para su crecimiento es 1-5 x 10<sup>6</sup> células/ml. Es una línea muy inestable y los sobrecrecimientos determinan la muerte de las mismas.



### **Construcción de vectores para sobre-expresión de Ptr en células de *Drosophila***

El vector que expresa Ptr-V5 fue obtenido a partir de la amplificación por PCR de la secuencia codificante de la proteína completa. El molde utilizado para esta reacción fue ADNc de embriones de *Drosophila* y el producto fue clonado en el vector pMT/V5-His-TOPO (Invitrogen) según instrucciones del fabricante. Uno o más clones que portaban el inserto en la orientación correcta fueron secuenciados.

### **Generación de ARN doble hebra (ARNds)**

La síntesis de los diferentes ARNds fue realizada utilizando parejas de cebadores que contienen la secuencia del promotor de la ARN polimerasa T7 contigua a la secuencia específica del gen a silenciar. Estos cebadores fueron utilizados para amplificar un producto único de un exón usando como molde ADN genómico o ADNc. A su turno, los productos de PCR obtenidos fueron utilizados como moldes para la síntesis *in vitro* de los ARNds siguiendo las indicaciones del kit MEGAScript RNAi (Ambion). Este kit nos permitió tener cantidades importantes de ARNds a partir de una sola reacción. Los ARNds fueron cuantificados por densitometría y almacenados a -20°C hasta su utilización.

### **Transfección de células de *Drosophila***

**I. Transfección de células cl-8:** Se sembraron 300.000 células cl-8 de *Drosophila* por pocillo de 1.5 cm de diámetro y se dejaron descansar en la estufa a 25°C hasta el día siguiente. Tres o cuatro horas antes de la transfección, se realizó cambio de medio a las células y una hora antes de la misma se comenzó a preparar la mezcla para transfectar según las especificaciones del kit utilizado (Calcium Phosphate transfection kit, Invitrogen). Las células fueron incubadas en la estufa por 12 a 16 horas a 25°C. Pasado este tiempo y con la finalidad de aumentar la eficiencia de la transfección, se realizó el shock con glicerol según lo especificado en el kit mencionado y se dejaron descansando a las células por aproximadamente 36 horas. Si el vector transfectado era inducible por cobre, luego de las 36 horas se realizó la sustitución del medio por medio nuevo suplementado con 0.5 mM de CuSO<sub>4</sub> y se dejó induciendo por 24 horas. Para los experimentos de sobreexpresión y/o silenciamiento se utilizaron 2 ug de cada uno ARNds y/o vector de ADN por pocillo según condiciones experimentales establecidas.

Para realizar las inmunotinciones de algunas de estas condiciones, las células se levantaron y se transfirieron 50-100  $\mu$ L sobre un cubreobjeto previamente esterilizado dejando que se adhiran por 30 minutos.

**II. Transfección de células S2R+ de *Drosophila*:** Se sembraron  $3 \times 10^6$  células en 2 ml de medio Schneider (Gibco) suplementado con suero y antibióticos, en placas de 35 mm e incubadas a 25°C. Al día siguiente el medio fue reemplazado por 800  $\mu$ L de medio Schneider sin suero y las células fueron transfectadas con una mezcla de 10  $\mu$ L de Cellfectine (Invitrogen) y 10  $\mu$ g de ADN en 200  $\mu$ L de medio sin suero. La mezcla ADN/Cellfectine fue preincubada por 30 min con el objetivo de permitir la formación de los complejos ADN/liposomas. Las células fueron incubadas con la mezcla ADN/Cellfectine por 5-24 horas a 25°C. El medio de transfección fue removido y reemplazado con 2 ml de medio Schneider suplementado con suero al 10% v/v y penicilina/estreptomicina al 2%. Al tercer día post-transfección las células S2R+ fueron sembradas sobre cubreobjetos e incubadas en 1 ml de medio Schneider con suero al 10% v/v y 2% de penicilina/estreptomicina. Para inducir la producción de proteína recombinante Ptr-V5 se agregó 0.5 mM de  $\text{CuSO}_4$ .

### **Ensayos Reportero Luciferasa**

Las células cl-8 transfectadas con 2  $\mu$ g de ARNs y/o 2  $\mu$ g de vectores de ADN y/o plásmidos que expresan *ptc*-luciferasa, *dally-like* y copia-*Renilla* (éste último para normalizar la transfección) se dejaron descansar por 72 hs para permitir el recambio proteico y la degradación del ARNm respectivo. Posteriormente a este período, las células fueron divididas en dos grupos para exponerlas al medio control o al medio condicionado rico en HhN. Luego de 24 hs de incubación con el medio, las células fueron lisadas con la finalidad de poder determinar en cada condición de cultivo la actividad luciferasa utilizando el kit Dual –Luciferase Assay (Promega). Para establecer el nivel de activación de la vía de Hh en cada situación experimental, se determinó el cociente actividad *ptc*-luciferasa/actividad *Renilla* (L/R) tanto para la condición en presencia de Hh como en ausencia de Hh (actividad basal para el reportero). El grado de inducción en la que se encuentra activada la vía se calcula como el cociente entre ambas situaciones (L/R con Hh/ L/R sin Hh). En todos los experimentos se realizaron controles que involucraron la transfección de ARNs para silenciar el gen *diaminopimelate decarboxylase* de *B. subtilis* (*lys*) y/o un vector que expresa GFP.

## **Inmunoprecipitación**

El lisado de células cl-8 sobre-expresando Ptr-V5 fue realizado según lo especificado anteriormente. Por otra parte, el medio condicionado enriquecido en HhN fue liofilizado y concentrado 10 veces. Luego de determinar la concentración de proteínas de ambas muestras con el reactivo de Bradford (Fermentas), se incubó por 16 horas a 4°C partes iguales de el extracto celular y el medio enriquecido en HhN (1 mg/ml de cada uno). Esta mezcla fue la muestra utilizada para la inmunoprecipitación utilizando 1 µg del anticuerpo de ratón α-V5 (Santa Cruz Biotechnology) el cual previamente había sido adsorbido a las Dynabeads Goat anti-ratón IgG (Invitrogen). La presencia de HhN en el inmunocomplejo fue analizada por Western blotting utilizando el anticuerpo de conejo α-Hh (Santa Cruz Biotechnology). Para el control, las Dynabeads fueron incubados con un anticuerpo de ratón semejante al utilizado y en las mismas cantidades previamente estipuladas (α-c-myc, Santa Cruz Biotechnology). Las Dynabeads fueron lavadas tres veces y las proteínas eluidas usando el buffer de muestra. Con anterioridad a la carga en el gel las muestras fueron incubadas por 30 min a 37°C en el buffer de muestra.

## **OE4**

### **Ensayos de silenciamiento *in vivo* de Ptr mediante la expresión de ARNs**

Para estos experimentos, hembras de una cepa transgénica que porta la construcción UAS-ARNi-Ptr fueron cruzadas con machos de la línea y1 w\*; P{GAL4-nos.NGT}40, de la línea w\* y P{matα4 GAL4-VP16}V37, que dirigen la expresión de la proteína Gal4 (Brand & Perrimon, 1993) en todo el embrión desde estadios muy tempranos del desarrollo. Además, se utilizó la cepa *ptc*-GAL4 para promover la expresión del ARNs de Ptr en las células que expresan *ptc*. Los controles involucraron la realización de cruces de cada una de las cepas que expresan Gal4 fueron cruzadas con la cepa w\*; P{w+mC=UAS-lacZ.B}Bg4-2-4b. Los embriones de la F1 de cada uno de los cruces mencionados fueron procesados según se establece en la sección “Preparaciones cuticulares” que se encuentra detallada más abajo.

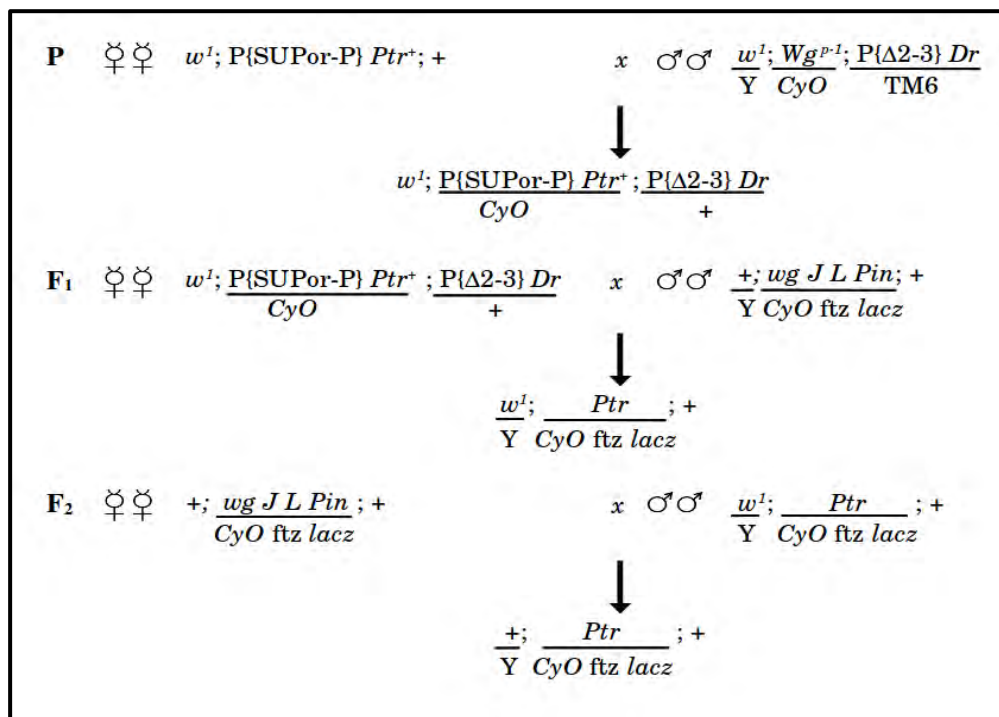
### **Generación de mutantes en Ptr mediante escisión imprecisa de un elemento P.**

**I. Generación de eventos de escisión de elemento P:** Hembras vírgenes de la línea y<sup>1</sup>, w<sup>67c23</sup>; P{y<sup>+mDint2</sup>, w<sup>BR.E.BR</sup>=SUPor-P}KG01682, homocigotas para la inserción del elemento

P (alas planas, ojos rojos normales), fueron cruzadas con machos de la cepa  $w^*$ ;  $wg^{Sp-1}/CyO$ ;  $ry^{506}$ ,  $Dr^1$ ,  $P\{ry^{+7.2}=\Delta 2-3\}99B/TM6$ , portadora de la transposasa  $\Delta 2-3$  (alas CyO, ojos blancos chicos). La descendencia de este cruce (F1) que portaba los marcadores CyO y ojos chicos (indicando la presencia de la transposasa) en mosaicos de color rojo y blanco (indicativo de eventos de escisión del elemento P en las células de los omatidios), fueron cruzadas con la cepa  $wg^{Sp-1}$ ,  $J^1$ ,  $L^2$ ,  $Pin^1/CyO$ ,  $P\{ry^{+7.2}=ftz/lacB\}E3$ , que portaba un cromosoma 2 balanceador (alas CyO, ojos rojos chicos). La descendencia de este cruce (F2) fue seleccionada por la presencia de los marcadores ojos blancos normales y alas CyO, y fue cruzada individualmente con la cepa  $wg^{Sp-1}$ ,  $J^1$ ,  $L^2$ ,  $Pin^1/CyO$ ,  $P\{ry^{+7.2}=ftz/lacB\}E3$ , con el objetivo de estabilizar la mutación originada por un evento único de escisión. Finalmente, machos y hembras de esta descendencia (F3) fueron seleccionados por tener ojos rojos normales y alas CyO con el objetivo de establecer una línea (Figura 1). Los descendientes de esta línea que fueron homocigotos para la mutación originada por la escisión fueron analizados por PCR.

**II. Genotipificación de embriones:** El método utilizado para hacer el genotipado fue descrito por Ghanim y White (Ghanim & White, 2006). Básicamente este método involucra dejar poner huevos por 1 hora en placas de agar /jugo de uva a las moscas heterocigotas de líneas portadoras de la mutación del gen *Ptr*. Estos huevos fueron colectados, decorionizados con hipoclorito al 50% y examinados bajo lupa para determinar su estadio. Para realizar la extracción de ARN de 10-15 embriones homocigotos, fueron seleccionados 100 embriones en estadio 5 del desarrollo e individualmente transferidos a un tubo de PCR conteniendo 14.5  $\mu$ l de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH8.2, 1mM EDTA y 25 mM NaCl). Luego se realizó la homogenización de cada embrión con una punta de pipeta y 11  $\mu$ l de cada extracto fueron individualmente almacenados en un tubo nuevo conteniendo 30  $\mu$ l de RNA<sub>WIZ</sub> (Ambion) y congelado a  $-20^\circ\text{C}$  con la finalidad de preservar la integridad del ARN. El extracto remanente (3.5  $\mu$ l) fue incubado a  $28^\circ\text{C}$  por 30 min con 200  $\mu\text{g/ml}$  de proteinasa K (Sigma- Aldrich), seguida por una incubación a  $95^\circ\text{C}$  por 2 min. Luego de esta última incubación, el extracto fue usado en PCR. En nuestro caso la ausencia de la banda específica para lacZ o GFP junto con la presencia de la banda control (CG9650) fueron los indicadores de la existencia de embriones homocigotos letales. Además, la elección de parejas de cebadores adecuados permitió no solo verificar la integridad del

ADN y la ocurrencia de la escisión del transposón, sino también determinar el tipo de escisión (precisa o imprecisa) y determinar en este último caso que región del gen *Ptr* y/o de los genes adyacentes fue eliminada con el salto del elemento P. Todas las parejas de cebadores utilizados son especificados en la tabla adjunta.



*Esquema de cruces para generar la escisión del gen *Ptr*.* Esquema de los cruces necesarios para movilizar el elemento P inserto cercano al inicio de la transcripción del gen *Ptr* en la cepa  $w^1; P\{SUPor-P\}$ . Los símbolos representan al cromosoma balanceador del cromosoma 3 (TM6) y del cromosoma 2 (CyO), la transposasa (P[Δ2-3]), marcadores fenotípicos dominantes (Dr, J L Pin y Cy) y el transgen (ftz lacZ). La movilización del elemento P{SUPor-P} se confirma mediante la pérdida del marcador mini-white ( $w^1$ ).  $Ptr^+$  indica la presencia del gen, y  $Ptr$  posibles alelos producidos por escisión del gen. P indica el cruce parental y F denota el cruce realizado con la descendencia del cruce anterior.

### Preparaciones cuticulares

Los embriones de cada cruce o línea fueron colectados a intervalos de 12 horas e incubados a 25°C por 24 horas. Luego que se eliminaron de la placa de agar las larvas emergidas, los embriones remanentes decorionizados en una solución al 50% de hipoclorito de sodio por 2 min, lavados dos veces con PBS-Tritón al 0,1%, contados (embriones totales) e incubados por 24 horas más. Aquellos que aún permanecieron dentro de la membrana vitelina fueron contados (embriones sin eclosionar) y lavados en metanol:EGTA 50mM (ME). Para lograr eliminar la membrana vitelina se utilizó una mezcla de ME:heptano 1:2 para luego agregar una mezcla glicerol: ácido acético (1:4) por 1 hora a 60 °C. Posteriormente, los embriones fueron ubicados en portaobjetos de

vidrio, se les agregó una gota de una mezcla glicerol:ácido láctico (1:3), se cubrieron con un cubreobjetos y se incubaron a 60°C hasta que los tejidos internos se aclararan.

#### 4. Tablas de cebadores

##### Cebadores utilizados para genotipar las líneas mutantes

Nombre	Largo (pb)	Tm (°C)	Secuencia (5' 3')
LacZ-s	579	58	TTGAAAATGGTCTGCTGCTG
LacZ-a		62	TCTCTCCAGGTAGCGAAAGC
CG9650 (X)-s	455	60	AACCCCATCAAGGGTTAAGG
CG9650 (X)-a		62	GGAAGTGCACTCGTCTCACA

##### Cebadores utilizados para detectar el tipo de escisión del transposón

Nombre	Largo (pb)	Tm (°C)	Secuencia (5' 3')
DNAgCG11212-s	980	60	GTCCATCTGTTTTAGGGTCG
RT cg11212-a1		60	CCAAGATTTGTGTGCGACAG
DNAgCG11212-s	700	60	GTCCATCTGTTTTAGGGTCG
Plac1-a		76	CACCCAAGGCTCTGCTCCACAAT
Pry4-s	750	66	CAATCATATCGCTGTCTCACTCA
RT cg11212-a1		60	CCAAGATTTGTGTGCGACAG

##### Cebadores utilizados para localizar la región deletada en las líneas mutantes nulas de *Ptr*

Nombre	Largo (pb)	Tm (°C)	Secuencia(5' 3')
UpPtr2-s	1853	62	GTTTTTCTGGGCTCAGTCGG
UpPtr5-a		60	CACGCAGGTCTTGTGTTGAAG
UpPtr3-s	1637	62	GCGGCGAAGACAATGAGAGA
UpPtr4-a		60	TTGGAGTCCGAGTTAAGCCT

##### Cebadores utilizados en los ensayos de qPCR y RT-PCR

Nombre	Largo (pb)	Tm (°C)	Secuencia (5' 3')
Ptr ex3-s	1395/1065	72	AACAGACATTGGCTGGACAC
Ptr ex7-a		72	TTCGGGCGAGTCATTGTGA
ptc ex2 ex3-s	573/236	60	GGAAGTCTTCTGGGAGGGA
ptc ex2 ex3-a		62	ATTCAGTGGGTTTCAGGCAGG
Actin-s	280	62	CACCGGTATCGTTCTGGACT
Actin-a		62	CTCGTAGGACTTCTCCAACG

**Cebadores utilizados para sintetizar ARNs**

Nombre	Largo (pb)	Tm (°C)	Secuencia (5' 3')
plys-trans-a	614	50	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGTAACGGG AAGCATTT
plys-trans-s		50	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGCTGAGGA AGAGGGAC
ihog RNAi-s	637	56	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAAACCA GCACCACAG
ihog RNAi-a		56	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGATTACAC GCCAACGCTG
ptc RNAi- s	728	58	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGAGCATG CAGATGTCCCT
ptc RNAi-a		56	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTAACTCGT AAAGTTATAGCT
smo RNAi-s	709	60	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAATTCCT GCAGAAAAATGGC
smo RNAi-a		58	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAATAAC ATTTTGAGTTTGTC
ptc exon 5-s	232	60	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCTTCATCT TCTGGGAGCAG
ptc exon 5-a		60	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCACGCT GAGGATGAGTAT
ptc exon 6-s	206	60	TAATACGACTCACTATAGGGA GCCCTTTGAGTTTGTGATCC
ptc exon 6-a		60	TAATACGACTCACTATAGGGACATAGGATTT GCCCCGATCTC
PEP CG11212-s	829	66	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTCTTCGGAC CCGGATCTTGC
PEP CG11212-a		66	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTGTGGGC AGGCGAGTAAGC



## Resultados

### **1. Analizar el patrón de expresión y localización subcelular de la proteína Ptr durante la embriogénesis normal de *Drosophila melanogaster*.**

#### **1.1 Generación de anticuerpos específicos para reconocer Ptr.**

Con el objetivo de estudiar la localización de la proteína Ptr en embriones de *Drosophila melanogaster* (OE1), se generó un antisuero policlonal dirigido contra esta proteína mediante la inyección en conejos de un péptido recombinante. Con esta finalidad, primeramente se amplificó por PCR desde ADNc de embriones un fragmento de 825 pb de la secuencia codificante carboxilo terminal de la proteína Ptr, el cual fue clonado en el vector pTrcHis2Topo (pTrc-Ptr). Este vector de expresión en bacterias posee un promotor inducible por isopropil- $\beta$  D-tiogalactósido (IPTG) que dirige la expresión de una proteína recombinante fusionada a un dominio carboxilo-terminal Myc-hexahistidina. El diseño que presenta este dominio permite su reconocimiento mediante inmunoensayos con anticuerpos  $\alpha$ -Myc, y su purificación por cromatografía de afinidad en columnas de Agarosa-Níquel (Figura 1.1.1 A-B). El vector pTrc-Ptr, fue finalmente utilizado para transformar células *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , purificado y secuenciado. Se probaron varias condiciones de inducción de expresión variando parámetros tales como temperatura de crecimiento, concentración de IPTG y tiempo de inducción y los mejores resultados se obtuvieron con 3 horas de inducción utilizando 1 mM de IPTG a 37°C. Estas condiciones fueron las utilizadas para experimentos de purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de agarosa-níquel utilizando 1 l de cultivo inducido. Las bacterias inducidas fueron lisadas, sonicadas y centrifugadas obteniéndose en el sobrenadante las proteínas solubles. Este sobrenadante fue incubado con la resina de agarosa-níquel, logrando la unión de la proteína gracias a la afinidad de las histidinas con el níquel. La proteína que permaneció unida a la resina fue desplazada con Imidazol, molécula con estructura similar a la histidina y afinidad por el níquel. La proteína purificada fue electrotransferida a membranas de nitrocelulosa, las cuales fueron teñidas con rojo Ponceau y las bandas correspondientes a la proteína pura fueron cortadas, solubilizadas en DMSO y utilizadas para inyectar un conejo. El suero obtenido fue purificado y enriquecido por inmuoadsorción utilizando la misma proteína Ptr recombinante.



La capacidad que tienen los anticuerpos adsorbidos (anticuerpos purificados) de detectar la presencia de Ptr nativa fue evaluada mediante varios inmunoensayos:

i. Western blot utilizando los anticuerpos purificados  $\alpha$ -Ptr y muestras de fracciones enriquecidas en membranas celulares. Debido a que la secuencia de Ptr predice la presencia de 12 dominios transmembrana, es esperable encontrarla localizada en vinculación a las superficies y/o en componentes membranosos celulares. Por este motivo se aislaron membranas celulares de embriones tempranos de *D. melanogaster* utilizando un protocolo de fraccionamiento celular con gradientes de sacarosa. Además, con la finalidad de determinar la asociación de Ptr con las membranas, se realizaron tratamientos con diferentes agentes solubilizantes. Los resultados obtenidos indican que solamente el tratamiento con un detergente no iónico como NP-40 es capaz de liberar una fracción importante de Ptr. Este comportamiento es consistente con la predicción de que Ptr es una proteína de membrana y que los anticuerpos purificados a partir del antisuero generado son capaces de detectarla adecuadamente (Figura 1.1.1 C).

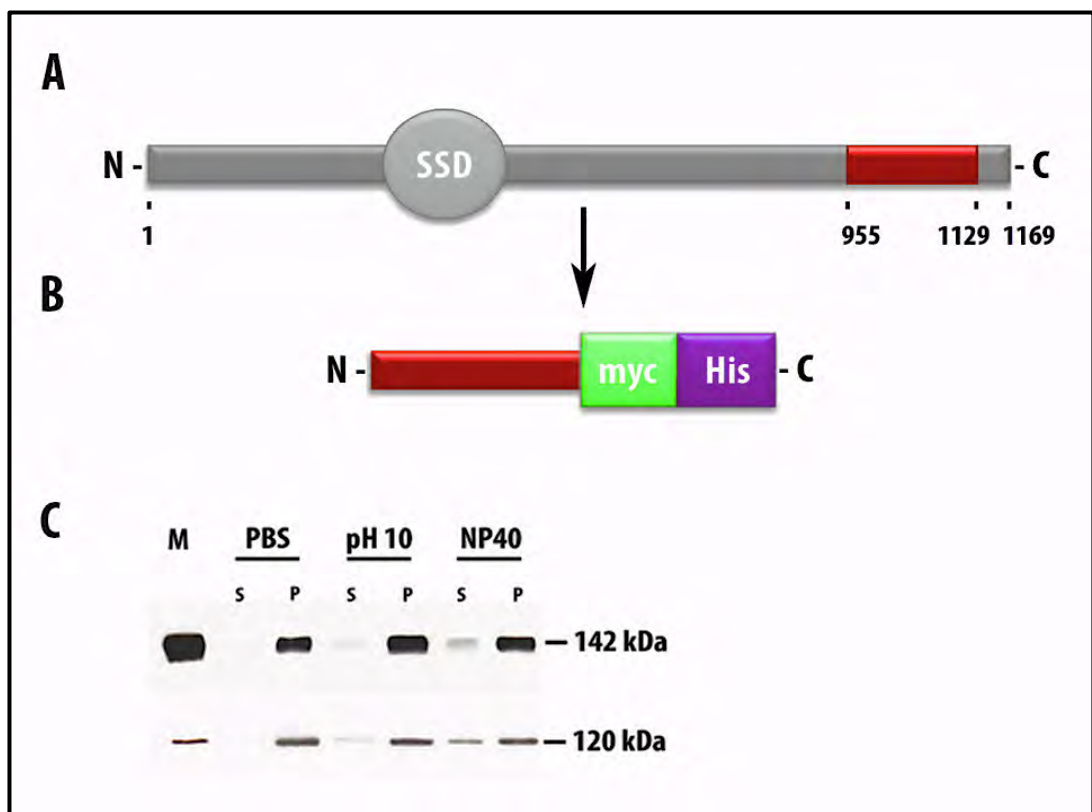


Figura 1.1.1- Diseño y expresión de péptido inmunogénico PtrHis (A) Esquema representando la proteína Ptr en el que se indica la presencia del dominio SSD y el fragmento carboxilo terminal (825 pb, segmento rojo) amplificado y clonado para generar el antisuero. (B) Proteína recombinante producida por el vector pTrcHis2-Topo utilizada para inmunizar el conejo y generar un antisuero policlonal  $\alpha$ -PtrHis. (C) Western blot utilizando los anticuerpos  $\alpha$ -Ptr en muestras de fracciones de membrana de embriones tempranos de *Drosophila*. Las fracciones de membrana fueron tratadas con diferentes agentes solubilizantes para determinar el tipo de asociación de Ptr. Luego del tratamiento se cargaron iguales volúmenes del (S) sobrenadante y del (P) pellet. El control involucró la detección de Ptc (142kDa).

- ii. Inmunofluorescencia de células S2R+ de *Drosophila* transfectadas con el constructo Ptr-V5. Se observa que la proteína se encuentra localizada cercana a la superficie celular y dispersa en el citoplasma de la célula manifestando un patrón puntillado. Dada la característica estructural que la define (presencia de 12 dominios transmembrana), este patrón podría estar evidenciando su relación con compartimientos membranosos intracelulares. La señal no se observa cuando las células no se encuentran inducidas y/o transfectadas (Figura 1.1.2 A).
- iii. Inmunofluorescencia de embriones tempranos de *Drosophila*. En el blastodermo celular, la proteína Ptr nativa se detecta localizada a nivel del dominio apical de cada una de las células epiteliales que rodean al embrión. La señal obtenida se encuentra localizada principalmente en el citoplasma y/o en compartimientos membranosos celulares (Figura 1.1.2 B-D). Asimismo mucho del inmunomarcado superficial de Ptr parece encontrarse al mismo nivel de los filamentos corticales de actina que enmarcan cada una de las células mencionadas (señal verde), localización sugerente de la asociación de Ptr con la membrana plasmática (1.1.2 C).

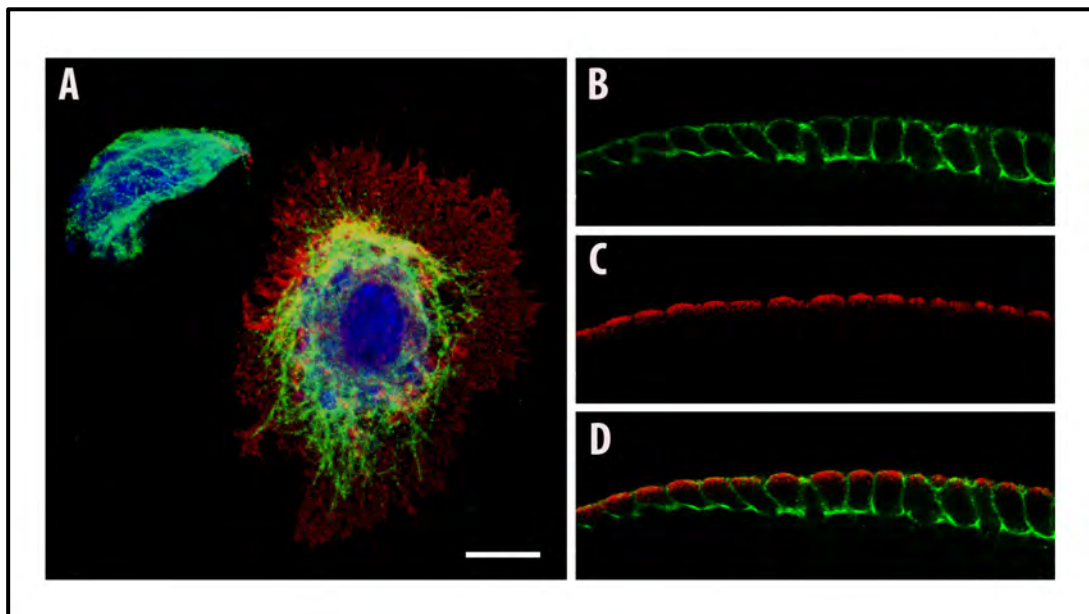


Figura 1.1.2- Caracterización primaria del anticuerpo  $\alpha$ -PtrHis. (A) Inmunofluorescencia de células S2R+ sobrexpresando la proteína Ptr-V5 donde se observa a la proteína recombinante localizada predominantemente en acumulaciones citoplasmáticas (señal roja). Estas acumulaciones se distinguen hacia la periferia de la célula, por fuera de los microtúbulos (señal verde). Las células fueron individualizadas utilizando la sonda Topro, de unión al ADN (señal azul) por lo cual se puede distinguir en el campo la presencia de una célula que no sobrexpresando la proteína Ptr-V5 (B-D) Inmunofluorescencia de embriones tempranos de *Drosophila* donde se observa a la proteína Ptr nativa (señal roja) localizada mayoritariamente en acumulaciones citoplasmáticas en el dominio apical de las células que conforman el blastodermo. El margen de cada célula se encuentra delimitado por los filamentos de actina visualizados por la sonda faloidina (señal verde) que lindan con la membrana plasmática. Barra: (A) 8  $\mu$ m, (B-D) 20  $\mu$ m.

Si bien el anticuerpo policlonal recientemente descrito fue utilizado para realizar la caracterización subcelular de la distribución de Ptr en estadios embrionarios tempranos, la misma fue parcial debido a que las sucesivas fracciones del anticuerpo debieron ser utilizadas a diluciones cada vez menores con resultados poco reproducibles. Por este motivo se generó un nuevo antisuero utilizando el mismo segmento de la proteína pero ligado a otro vector de expresión en bacterias para mejorar la eficiencia de producción de la proteína recombinante. Por este motivo primero se amplificó por PCR el mismo segmento mencionado anteriormente, se lo ligó al plásmido de expresión pGEX-6P1 y se transformó con él bacterias quimiocompetentes BL21. El vector elegido posee, además de un promotor inducible por IPTG, un dominio glutatión transferasa (GST). Por este motivo la nueva proteína recombinante pudo ser purificada por cromatografía de afinidad usando una matriz glutatión sefarosa, liberándose el mencionado dominio por medio del uso de la enzima proteasa PreScission. La proteína recombinante así obtenida fue utilizada tanto para inocular el conejo como para purificar por inmunoadsorción el anticuerpo  $\alpha$ -Ptr del suero.

Con la finalidad de evaluar ese nuevo anticuerpo se realizaron las siguientes aproximaciones:

- i. Western blot contra la proteína Ptr-V5 sobreexpresada en células cl-8 de *Drosophila* utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -Ptr o el anticuerpo  $\alpha$ -V5. Ambos anticuerpos detectan la misma proteína de aproximadamente 95 kDa, así como también el  $\alpha$ -Ptr es capaz de detectar la presencia de la proteína recombinante generada con el vector anterior (pTrc-Ptr). Si bien el peso molecular de la proteína detectada es algo menor a lo esperado (120 kDa), el protocolo que se ha tenido que utilizar para evitar la aglutinación de las proteínas de membrana de la muestra (muestras sin hervir) explicaría el cambio en el peso molecular. Este comportamiento, conocido y frecuente en las proteínas de membrana, se denomina “gel shifting” y se explicaría por la unión no uniforme del SDS a las proteínas (Figura 1.1.3 C).

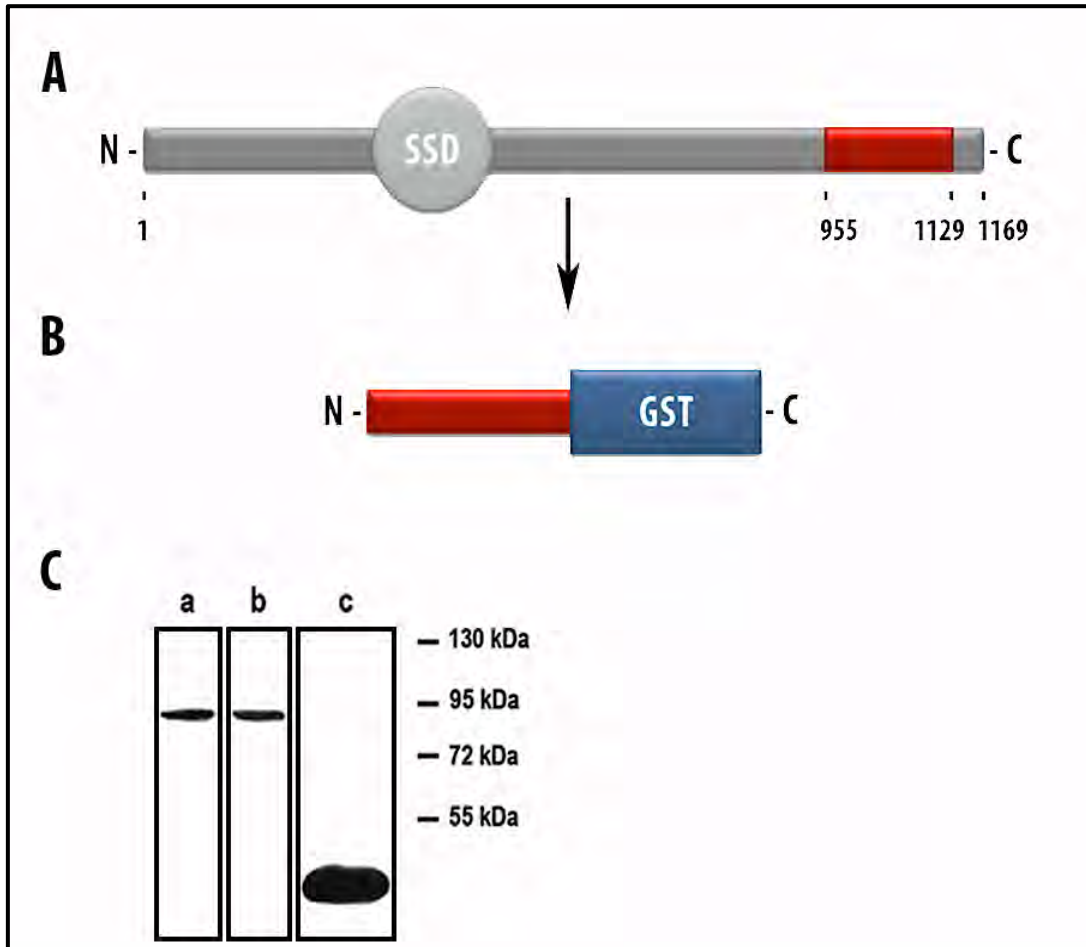


Figura 1.1.3- *Diseño y expresión de péptido inmunogénico PtrGST* (A) Si bien el fragmento de la proteína es el mismo, el dominio al cual se encuentra fusionado es diferente y requiere un procedimiento de purificación distinto (ver materiales y métodos). B) Proteína recombinante producida por el vector pGex-6P1 utilizada para inmunizar el conejo y generar un anticuerpo policlonal  $\alpha$ -PtrGST. (C) Western blot utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -Ptr generado en lisados de células cl-8 que sobre-expresan Ptr-V5 (derecha, carril a). Los controles involucraron la detección de Ptr a través del su V5 (carril b) o de la proteína recombinante inoculada (carril c).

- ii. Inmunofluorescencia en células cl-8 de *Drosophila* transfectadas con un vector que expresa la proteína recombinante Ptr-V5 utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -PtrGST. La figura 1.1.4 A, muestra una imagen representativa donde se advierte la presencia de varias células visibles en campo claro, cuyos núcleos son teñidos con ToPro3-Alexa 624 (señal azul). Una de estas células expresa la proteína recombinante Ptr-V5 detectada con el anticuerpo policlonal purificado  $\alpha$ -Ptr (señal verde). La fusión de las imágenes identifica a Ptr localizada no solo a nivel de acumulaciones intracelulares sino también en pequeños parches de situación próxima a la superficie celular (Figura 1.1.4 A).
- iii. Inmunofluorescencia de embriones tempranos de *Drosophila*. Con los nuevos anticuerpos  $\alpha$ -Ptr purificados se logró recuperar la señal obtenida por el anticuerpo anterior en las células del blastodermo celular. Este hecho es un elemento que permite

validar no solo la calidad del nuevo anticuerpo sino también los resultados que se logran al utilizarlo (Figura 1.1.4 B-D).

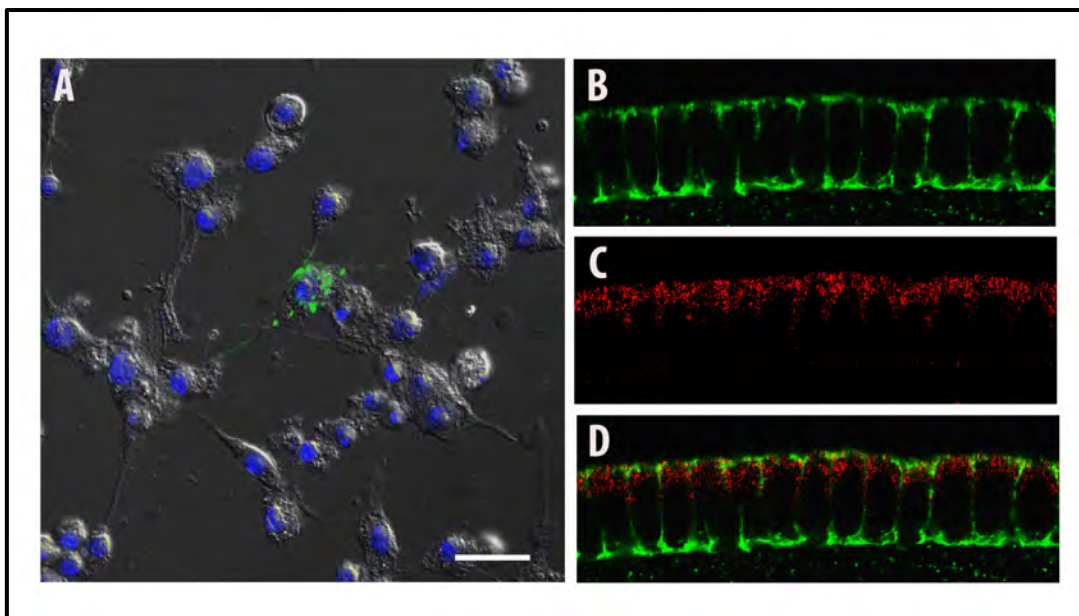


Figura 1.1.4- *Caracterización del anticuerpo policlonal  $\alpha$ -PtrGST.* (A) Inmunofluorescencia de células cl-8 sobrexpresando la proteína Ptr-V5 donde se observa a la proteína recombinante localizada tanto en vinculación con la superficie celular como en acumulaciones citoplasmáticas. Las células fueron individualizadas utilizando la sonda Topro, de unión al ADN (señal azul), y por medio de microscopía de luz transmitida. (B-D) Inmunofluorescencia de embriones tempranos de *Drosophila* donde se observa a la proteína Ptr nativa (señal roja) localizada mayoritariamente en acumulaciones citoplasmáticas en el dominio apical de las células que conforman el blastodermo. El margen de cada célula se encuentra delimitado por los filamentos de actina visualizados por la sonda faloidina (señal verde) que lindan con la membrana plasmática. Barra: 20  $\mu$ m.

## 1.2 Distribución espacial y temporal de Ptr durante la embriogénesis de *Drosophila*.

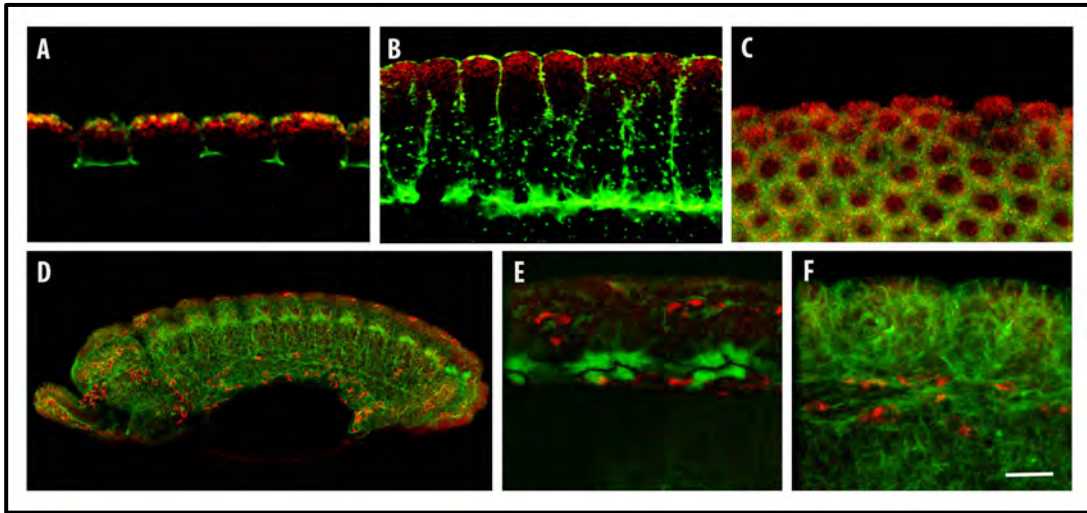
Los anticuerpos  $\alpha$ -Ptr obtenidos por inmuoadsorción de los antiseros fueron utilizados en inmunofluorescencias indirectas de embriones enteros con el objetivo de determinar la localización de Ptr a nivel celular, del embrión y a través de los sucesivos estadios de la embriogénesis.

Con la finalidad de caracterizar la señal obtenida, se realizaron ensayos de inmufluorescencia utilizando como contratinción una sonda que permite visualizar los filamentos de actina (faloidina-Alexa 488). De esta forma, se pudo determinar que Ptr presenta una expresión dinámica durante el desarrollo embrionario, siendo su proteína detectada no solo en estadios embrionarios tempranos (blastodermo y gástrula) sino también en etapas tardías de la embriogénesis. En el blastodermo sincicial, Ptr se detecta a partir de las primeras fases de la celularización (fase lenta) en localización apical y polarizada dentro de cada una de las célula que se están formando (Figura

1.2.1 A). Debido a que los filamentos de actina cubren la superficie entera del embrión inmediatamente por debajo de la membrana plasmática (actina cortical), claramente la contratinción con faloidina demarca las membranas en crecimiento. Durante la segunda fase de la celularización, la señal positiva para Ptr se puede observar sobre las membranas laterales que se están formando entre cada uno de los núcleos del blastodermo sincicial, extendiéndose hacia abajo a partir de la superficie. Finalmente las membranas terminan encerrando el núcleo junto con el territorio citoplasmático adyacente dentro de una célula cilíndrica alargada (Figura 1.2.1 B). En el dominio apical de esta célula, en una región emplazada entre el núcleo y la actina cortical, la señal de Ptr se encuentra distribuida siguiendo un patrón puntillado sugerente de su localización en vesículas citoplasmáticas. Algunos de los puntos del inmunomarcado pueden verse superpuestos con la actina cortical, pudiendo ser indicadores de la localización de Ptr en la membrana plasmática. Asimismo, la detección de Armadillo corrobora la localización predominantemente apical de la señal Ptr ya que la misma se alza por encima de los anillos demarcados por la presencia de la unión adherente (Figura 1.2.1 C).

En estadios más tardíos del desarrollo se puede observar un cambio drástico en la distribución de Ptr. Si bien se detecta la existencia de una señal basal y extendida de Ptr en muchas de las células que conforman el embrión, llama la atención el enriquecimiento de la proteína en zonas muy restringidas (figura 1.2.1 D-F). Estas zonas, que corresponden a células o conjunto de pocas células, se encuentran en estrecha vinculación con el sistema nervioso en desarrollo y serán estudiadas a continuación con mayor detalle.

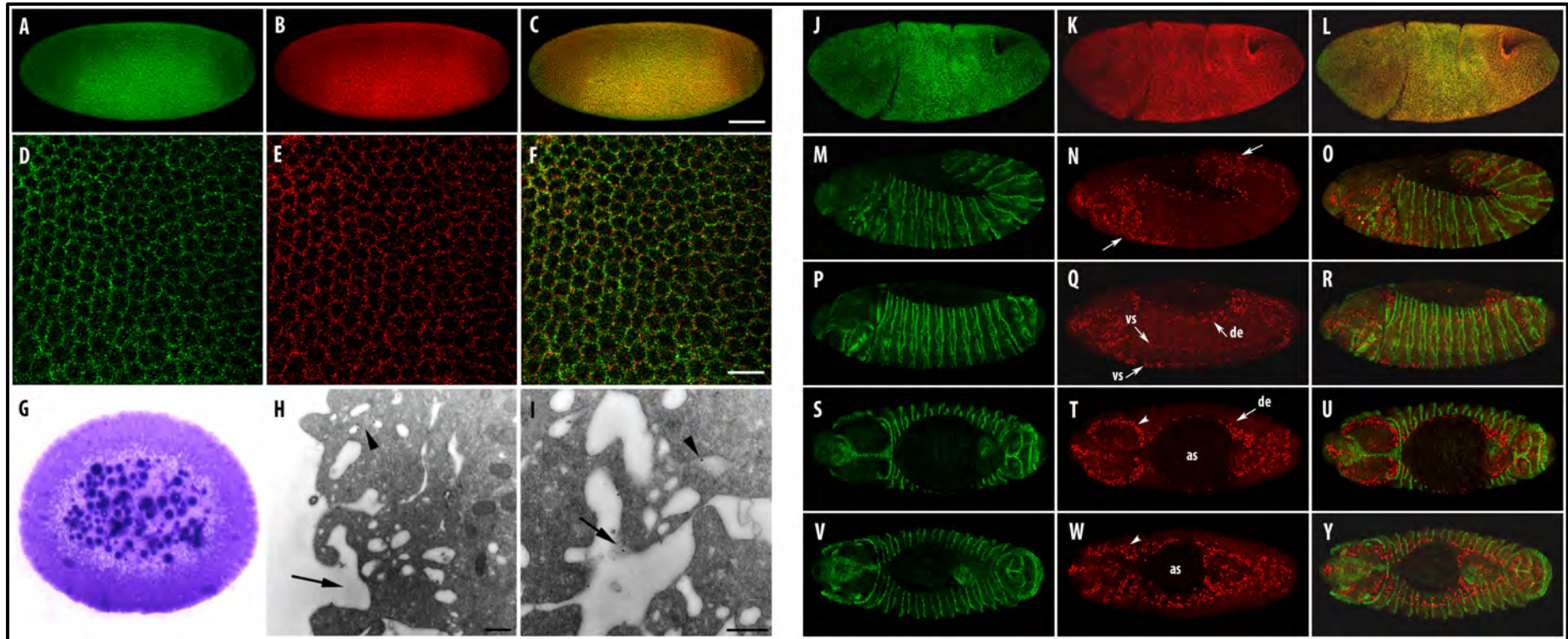
Por otra parte, basados en las características que presenta la proteína Ptr y en la hipótesis de la presente tesis, se comparó el patrón de expresión de Ptr con el de Ptc en estadios tempranos y tardíos de la embriogénesis. En embriones tempranos (blastodermo celular y gástrula) las señales obtenidas por ambas fracciones de anticuerpos purificados demuestran una distribución uniforme en casi todas las células. Ptr se encuentra en la periferia celular, observándose también a nivel del citoplasma una señal leve con patrón puntillado, distribución muy similar a la descrita y observada para Ptc (Figura 1.2.2 A-F). Por su parte, la realización de ensayos de inmunomicroscopía electrónica (inmunogold) en blastodermos celulares localiza precisamente la señal de Ptr asociada a membrana (membrana plasmática y vesicular) (Figura 1.2.2. G-I).



1.2.1- *Expresión de Ptr en relación con la distribución algunos marcadores celulares.* Imágenes representativas de la expresión de Ptr (rojo) en (A-C) embriones tempranos o en (D-F) embriones tardíos en relación a la distribución de los filamentos de actina (verde en A-B y D-F) y de armadillo (verde en C). Durante la fase lenta y rápida de la celularización se puede observar a Ptr localizado predominantemente en la región apical del blastodermo en formación, mientras que en los estadios tardíos la distribución de la marca cambia drásticamente apareciendo una parte importante de ella en asociación con el sistema nervioso en formación. Barra: (A-C) 5  $\mu\text{m}$ , (D) 40  $\mu\text{m}$ , (E-F) 8  $\mu\text{m}$ .

En el estadio 12 de la embriogénesis, cuando se produce el acortamiento de la banda germinal, Ptc se observa altamente expresada en 15 franjas alternantes a lo largo del tronco del embrión y en menor concentración en las zonas que se encuentran entre las franjas (Capdevila et al, 1994). Por su parte, la señal de Ptr también se localiza en zonas de alta y baja concentración: las primeras son zonas pequeñas cuya distribución cambia según el estadio embrionario observado (no son coincidentes con las franjas previamente descritas para Ptc) y las segundas se localizan a nivel de las interfranjas (coincidentemente con la distribución observada para Ptc). A lo largo de los diferentes estadios, las zonas de alta expresión de Ptr presentan un patrón espacial reminiscente a las rutas que recorren los hemocitos cuando migran hacia el interior del embrión (Evans et al, 2010; Tepass et al, 1994; Wood & Jacinto, 2007). De esta forma se observa a las células Ptr positivas primeramente concentradas en ambos extremos del embrión (Figura 1.2.2N, flechas) para luego distinguirlas tanto a nivel de la superficie ventral y dorsal de la cuerda nerviosa como a nivel de la epidermis dorsal (Figura 1.2.2Q, flechas vs y de respectivamente). Si bien clásicamente se describe una cuarta ruta de migración para los hemocitos, como es interna y rodeando al intestino, no resulta claramente visible en las tinciones inmufluorescentes. En estadios embrionarios tardíos las células Ptr positivas se distinguen alrededor del cerebro y bilateralmente alrededor de la amnioserosa (Figura 1.2.2TW, cabeza de flecha y flecha respectivamente).





1.2.2- Patrón de expresión de *Ptr* durante la embriogénesis de *Drosophila*. Imágenes tomadas a partir de embriones enteros inmunoteñidos para visualizar la distribución de Ptc (señal verde: A, D, J, M, P, S, V) y/o Ptr (señal roja: B, E, K, N, Q, T, W). La señal amarilla indicaría zonas en donde las señales anteriores se superponen (C, F, L, O, R, U, Y). (A-C) Blastodermo, (D-F) Imágenes a gran aumento del blastodermo para mostrar la distribución similar que tienen ambas proteínas. (G-I) Inmunogold usando  $\alpha$ -Ptr como anticuerpo primario para demostrar la asociación que la proteína presenta con la membrana plasmática (flecha) o vesicular (cabeza de flecha). (J-L) Gástrula, (M-O) Embrión con la banda germinal en proceso de retracción, (P-U) Embrión con la banda germinal retraída, (V-Y) Involución de la cabeza y cierre dorsal. Imágenes (A-B y J-R) laterales y (S-Y) ventrales de los embriones. Si bien en los estadios tempranos de la embriogénesis la localización de las señales presenta una distribución similar, en los embriones tardíos la misma resulta menos evidente con la aparición de zonas conspicuas con alta concentración de Ptr. La distribución de estas zonas es coincidente con la mayoría de las rutas esterotipadas de los hemocitos: superficie ventral del cordón nervioso (vs), superficie dorsal del cordón nervioso (ds), epidermis dorsal (ed), amnioserosa (as), alrededor del cerebro (cabeza de flechas), alrededor del amnioserosa (flechas). Barras: (C) 50  $\mu$ m, (F) 10  $\mu$ m and (H-I) 500 nm.



### 1.3 Distribución de Ptr respecto a la localización de los hemocitos.

Con la finalidad de verificar si la señal más conspicua de Ptr se encuentra relacionada con la población de hemocitos, se realizaron cruces de hembras llevando el elemento UAS-*lacZ* con machos que expresan Gal4 bajo el control de un promotor específico de hemocitos (*croquemort-Gal4*) (Evans et al, 2010; Olofsson & Page, 2005). Los embriones obtenidos a partir de este cruce se inmunotñieron utilizando anticuerpos  $\alpha$ -Ptr y  $\alpha$ -beta galactosidasa (beta-gal) con la finalidad de ser cuidadosamente observados mediante microscopia confocal (Figura 1.3.1). Las imágenes revelaron que los patrones de ambos anticuerpos fueron altamente similares, indicando que Ptr estaba enriquecida en los hemocitos en estadios embrionarios tardíos.

Si bien el patrón de expresión de *lacZ* que se obtuvo como consecuencia de la utilización de la construcción *crq-GAL4*, estuvo de acuerdo a las descripciones previamente realizadas por otros autores (la señal se detecta a partir del estadio de retracción de la banda germinal), el solapamiento de las señales logradas con  $\alpha$ -Ptr y  $\alpha$ -beta-gal no fue del todo completo y denota la posibilidad que exista un subgrupo de hemocitos embrionarios positivos para Ptr.

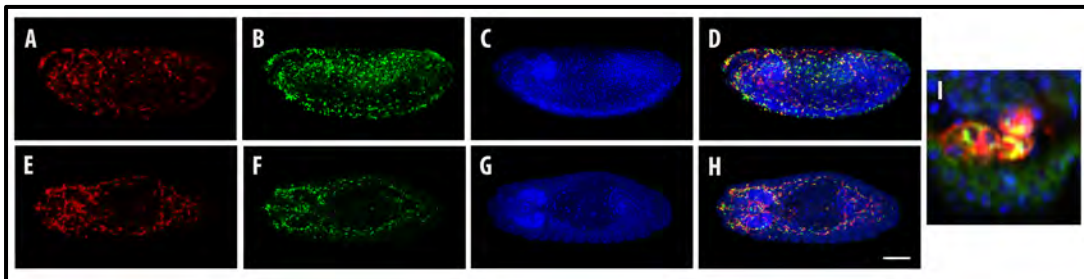


Figura 1.3.1- *Ptr* es expresado en los macrófagos embrionarios. Imágenes de embriones en estadio 13/14 vistos (A-D) lateralmente o (E-H) ventralmente evidenciando el patrón de localización de beta-gal (cuya expresión es dirigida por el vector de expresión *crq-GAL4*, señal roja: A.E. I) y Ptr (señal verde, B, F, J). (C, G, K) La tinción con DAPI colabora en la observación de la morfología general de embrión y del sistema nervioso en formación. (D, H) Las imágenes fusionadas muestran la co-localización de las señales (amarillo) en el embrión entero o (I) en una región cercana a la superficie ventral del embrión Barras: (A-H) 50  $\mu$ m and (I) 20  $\mu$ m.

## 2. Identificar si Ptr es un componente de la vía mediada por Hh en células en cultivo y, si fuese así, determinar su jerarquía de interacciones dentro de la misma.

Con la finalidad de evaluar la participación de Ptr como componente de la vía gatillada por Hh (OE2), se realizaron ensayos reporteros en células en cultivo similares a los diseñados por el grupo de Philip Beachy (Chen et al, 1999; Lum et al, 2003). Estos ensayos han demostrado ser cuantitativos y específicos de la respuesta celular a Hh y han sido utilizados para identificar nuevos componentes de la vía de Hh (Yao et al, 2006). Se basan en la transfección

de células derivadas de disco imaginal de ala o clon 8 (cl-8) con un reportero control (*Renilla*) y un reportero luciferasa que es capaz de responder a Hh (*ptc*-luciferasa). La transfección de ARNs junto con ambos reporteros afectan la respuesta de la vía de señalización de forma tal que cuando el ARNs tiene como blanco un regulador positivo de la vía (como Smo, Fu o Ci) se produce la inhibición de la respuesta producida por la presencia de Hh, mientras que si el blanco es un regulador negativo (Cos2 o Ptc) se produce la activación basal de la misma o una respuesta potenciada al morfógeno (Chen et al, 1999; Lum et al, 2003).

La transfección de ARNs de *Ptr* fue causante de la reducción exclusiva de los niveles del ARNm de *Ptr* y de un incremento moderado de la actividad luciferasa (Figura 2.1 A-B). De la misma forma la transfección de las mismas células con un constructo que sobre-expresa *Ptr* produce una respuesta robusta y opuesta a la obtenida en el experimento anterior en la relación con la actividad de la vía de Hh (Figura 2.1 C-D). La intensidad del efecto estaría sugiriendo que los niveles normales de *Ptr* en las células cl-8 podrían estar actuando como un factor limitante de la respuesta a la vía de señalización por Hh. Por su parte la respuesta que se obtiene indicaría que *Ptr* es capaz de responder a la presencia de Hh y que el tipo de respuesta (aumento o disminución de la actividad reportero) obtenida se encontraría estrechamente vinculada con el nivel de expresión de *Ptr* en la célula.

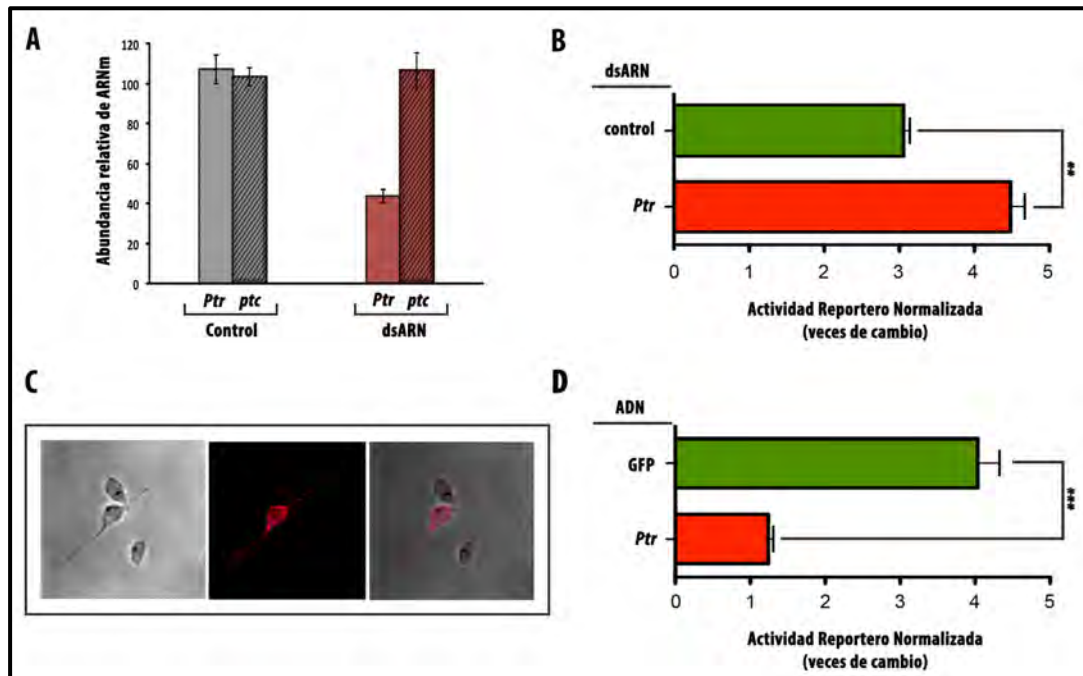


Figura 2.1- *Ptr* actúa como un componente negativo de la vía de Hh en células cl-8. (A) El ARNs de *Ptr* reduce eficientemente y específicamente los niveles de los transcritos de *Ptr*, no registrándose cambios en el nivel de expresión de *ptc*. (B) Los ARNs de *Ptr* elevan de forma moderada la actividad de la vía en relación con la actividad obtenida en la situación control. (C) La sobre-expresión de *Ptr*-V5 en las células cl-8 fue verificada por inmunotinción utilizando anticuerpo  $\alpha$ -V5. (D) La sobre-expresión de *Ptr* reduce fuertemente la respuesta de la vía al ligando Hh. En B y D, las barras verdes representan los controles y las barras rojas son las situaciones experimentales. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SD (n=3 por grupo). Los análisis estadísticos realizados fueron unpaired t-test, two tailed, \*\*P<0.01 y \*\*\*P< 0.001.

Dado que el diseño de esta clase de experimentos sirve también para delinear la jerarquía con la cual actúa cada uno de los participantes dentro de la vía de señalización estudiada, se decidió determinar qué tipo de respuesta se obtiene cuando el silenciamiento de la expresión de *ptc* se realiza conjuntamente con el silenciamiento o sobreexpresión de *Ptr* (Figura 2.2 A-B). Mientras la sobreexpresión de *Ptr* fue capaz de suprimir el incremento de la actividad de la vía propiciada por el ARNs de *ptc*, el silenciamiento de ambos genes provocó una activación mayor que la obtenida por ambos ARNs separadamente. Los resultados observados no solo sugerirían que *Ptr* podría estar funcionando río abajo o al mismo nivel que *Ptc* sino también indicarían que ambas proteínas podrían actuar de manera sinérgica dentro de la vía.

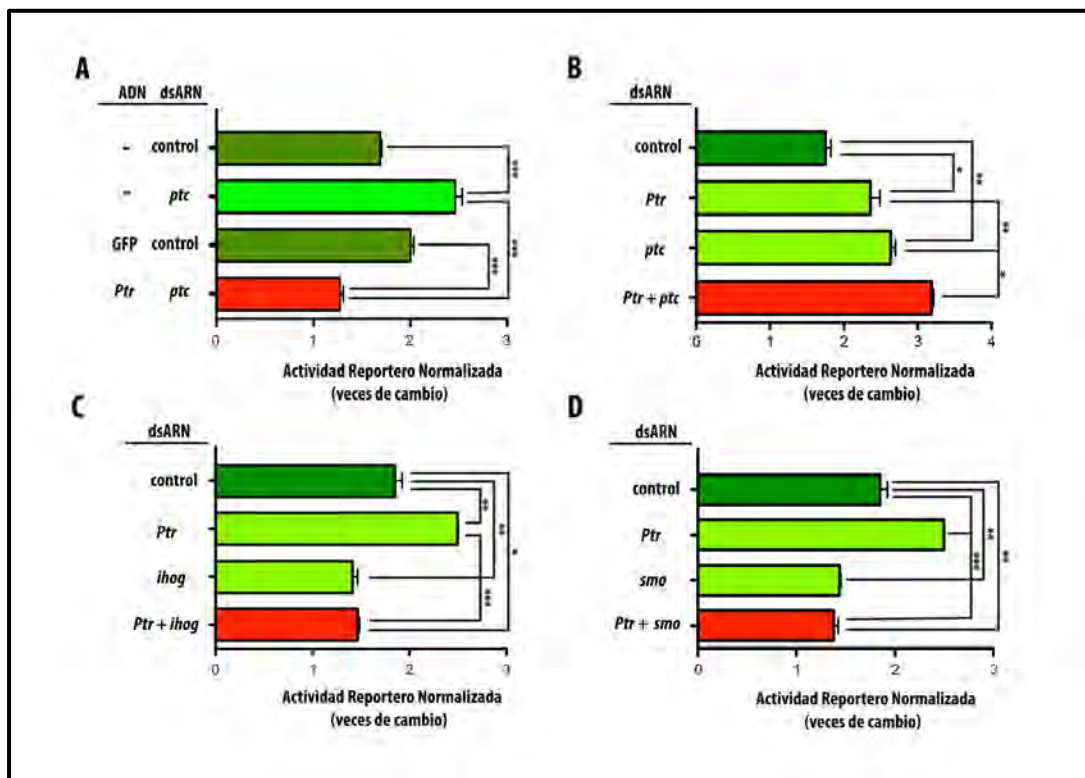


Figura 2.2- En la vía de señalización gatillada por Hh, *Ptr* estaría actuando río abajo o al mismo nivel que *Ptc*. (A) La respuesta potenciada al ligando Hh causada por el silenciamiento de *ptc* puede ser suprimida por la co-transfección de un vector que expresa *Ptr*. (B) La co-transfección de dsARN de *Ptr* y *ptc* producen una activación de la señalización que es más robusta que la activación obtenida por el silenciamiento independiente de cada uno de los genes. *Ptr* funciona río arriba de (C) *ihog* o (D) *Smo*. La transfección del dsARN de *Ptr* no afecta el nivel de activación de la vía de Hh que se obtiene tras el silenciamiento de los genes *ihog* y *smo*. En todos los gráficos, las barras verdes representan controles (verde oscuro, controles negativos y verde claro, controles internos para los dsARN y los vectores transfectados) y las barras rojas representan condiciones experimentales para cada grupo de experimentos. Los datos son presentados como promedio  $\pm$  SD, n=3 por grupo. Los análisis estadísticos fueron obtenidos usando one-way ANOVA con Tukey post-hoc tests, \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\* P< 0.001.

Simultáneamente, se investigó el efecto que produce la co-transfección de ARNs dirigido contra genes que son reconocidos reguladores positivos de la vía de Hh (Figura 2.2 C-D). La transfección simultánea de ARNs de *Ptr* y ARNs de *smo* o *ihog*, demuestra que la función de estas dos proteínas son necesarias para que la transfección con el ARNs de *Ptr* produzca una activación de la vía de Hh y sugiere que *Ptr* actúa río arriba de ambos componentes.

### 3. Determinar si *Ptr* es capaz de interactuar directamente con Hh.

Dado los resultados expuestos anteriormente y la topología conocida de la proteína *Ptr*, es posible preguntarse si *Ptr* y Hh tendrían la capacidad de interactuar directamente (OE3). Para indagar acerca de esta posibilidad, se diseñaron ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando el lisado de células cl-8 que sobre-expresan la proteína de fusión *Ptr-V5*. El lisado fue preincubado con medio condicionado enriquecido en Hh y luego inmunoprecipitado utilizando el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -V5. La identificación de las moléculas co-inmunoprecipitadas fue realizada por Western blot usando anticuerpos  $\alpha$ -V5 y  $\alpha$ -Hh. Tanto *Ptr* como Hh fueron identificados en los inmunocomplejos, indicando que ambas proteínas tendrían la capacidad de interactuar directamente (Figura 3.1).

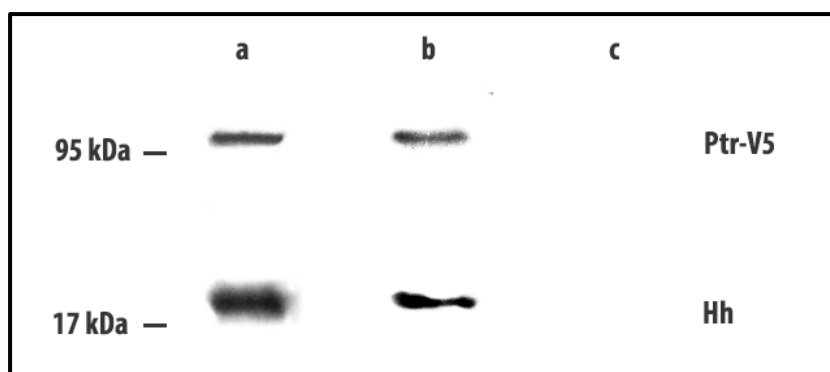


Figura 3.1- Hh y *Ptr* fueron expresados en células S2 y cl-8 respectivamente. La muestra inicial que se inmunoprecipitó involucra un mezcla de medio condicionado enriquecido en Hh y de lisado celular sobreexpresando *Ptr* (a). Los inmunocomplejos obtenidos fueron analizados por western blot con anticuerpos anti-V5 y anti-Hh. El anticuerpo monoclonal anti-V5 fue capaz de inmunoprecipitar un complejo que contiene Hh y *Ptr* (b). Un anticuerpo monoclonal anti-cMyc fue usado como control de la inmunoprecipitación (c).

En este resultado también se corrobora el desplazamiento en el peso molecular de *Ptr* el cual, como mencionamos anteriormente, se encuentra fundamentado en varios reportes (Nybo, 2012; Rath et al, 2009). En nuestro caso particular la necesidad de no hervir la muestra para prevenir la agregación proteica promovería la unión no uniforme del SDS

posibilitando que *Ptr* migrara más rápido a lo esparado (95 KDa en vez de 120 kDa). La magnitud del desplazamiento (35 KDa) no excede los valores previamente reportados, que logran alcanzar diferencias de 50 kDa mayores o menores al peso molecular esperado (Rath et al, 2009).

#### **4. Determinar si la ausencia y/o la disminución de la expresión de *Ptr* están asociadas a la aparición de alteraciones del desarrollo de *Drosophila melanogaster* que informen sobre su participación en la vía de Hh o sobre funciones no predecibles.**

Con el propósito de evaluar la función del gen *Ptr* en el desarrollo de *Drosophila*, se analizaron los efectos de una pérdida de función del gen (OE4). Para ello se abordaron dos estrategias: generación de un mutante por delección del gen *Ptr* y silenciamiento del gen mediante ARN interferente. Se puso particular atención en la detección de fenotipos mutantes congruentes con una posible función en la vía de Hh.

##### **4.1 Escisión imprecisa del gen *Ptr*.**

Con el objetivo de generar un alelo mutante del gen *Ptr*, se realizaron experimentos adecuados para obtener una delección parcial o total del gen mediante la movilización de un elemento P, denominado P<sup>SUPor-P</sup>KG01682 (Bellen et al, 2004), el cual está inserto a 335 pb del extremo putativo 5'-UTR de *Ptr* en moscas de la línea  $w^1;P^{SUPor-P} Ptr^+$ . Esta cepa fue cruzada con moscas que portan la transposasa  $\Delta 2-3$  (el esquema del cruce de detalla en la sección Materiales y Métodos, Figura 1), la cual reconoce los sitios P del vector y lo escinde del ADN genómico (ADNg) (Robertson et al, 1988). En la mayoría de los casos la transposasa escinde el vector dejando la secuencia original del cromosoma intacta (escisión precisa), en otros deja un trozo de vector y en unos pocos provoca que parte de las regiones adyacentes al sitio de inserción del vector sean eliminadas. En este último caso de delección del ADNg, denominado escisión imprecisa, puede implicar deleciones que van desde 1 a 10 kb y ocurre solo el 1% de las veces aproximadamente (Adams & Sekelsky, 2002). Los descendientes de este primer cruce fueron cruzados con moscas portadoras de cromosomas balaceadores. Estos cromosomas permiten mantener a las mutaciones, ya que cada evento de recombinación que ocurra en balaceador no será viable. Los eventos de escisión son reconocidos en esta etapa por la pérdida del gen marcador *white* el cual se encuentra contenido en el vector escindido y confiere el color de ojos rojos. Por lo tanto, los descendientes que perdieron el vector fueron seleccionados debido a que poseen ojos de

color blanco. Estas moscas fueron cruzadas individualmente con líneas que portan cromosomas balanceadores, estableciendo en cada caso una línea que representa un evento único de escisión del transposón. En el transcurso de este trabajo se obtuvieron un total de 408 líneas, 44 de las cuales no tenían adultos homocigotos (no se visualizaban moscas con alas planas). Con el propósito de caracterizar estas líneas se realizó un análisis molecular de cada uno de los 44 eventos de escisión del vector mediante PCR a partir de ADN extraído de embriones homocigotos de cada una de las líneas. Por este motivo, el primer paso en nuestra estrategia de análisis involucró la identificación de los embriones homocigotos por un proceso denominado Genotipificación (Ghanim & White, 2006) y que involucra la detección conjunta por PCR de un gen en el cromosoma X (control para evaluar la integridad del ADN extraído) y de un gen en el cromosoma balanceador (en nuestro caso *lacZ*). La ausencia de este último sería la condición determinante para asegurar que se está frente a un ADN de embriones homocigotos para la delección de *Ptr* (Figura 4.1.1).

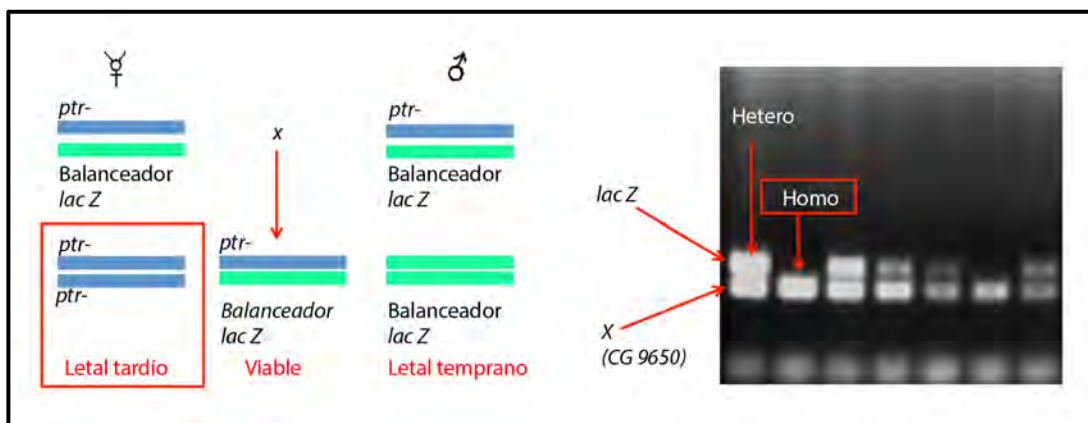


Figura 4.1.1- Identificación de embriones homocigotos en las líneas generadas por escisión imprecisa. Izquierda, esquema donde se indica el genotipo de la descendencia de cada línea sin homocigotos adultos viables. Solo los embriones homocigotos mutantes para el gen *Ptr* presentan ausencia del gen *lacZ*. Derecha, el hecho se detecta a través de la amplificación por PCR de la secuencia de *lacZ*. La ausencia de la banda respectiva así como la presencia de la banda correspondiente a la amplificación del gen CG9650 (control) serían los indicadores de ADN de embriones homocigotos para la ausencia del gen *Ptr*.

Una vez identificado este ADN se procedió a determinar en él, mediante la amplificación con cebadores específicos del elemento P y cebadores específicos del gen *Ptr*, la ocurrencia de escisión imprecisa. En todos los ciclos de amplificación se incluyeron controles de ADN de una línea silvestre (CS) y de la cepa parental  $w^1;P\{SUPor-P\} Ptr^+$  así como la amplificación del gen CG9650 que, como ya se mencionó, fue utilizada para evaluar la calidad del ADN extraído. En las 44 líneas analizadas solo en dos, denominadas *Ptr*<sup>23C</sup> y *Ptr*<sup>74C</sup>, el evento de escisión de transposón se realizó de forma imprecisa.

Con el propósito de determinar la extensión y localización de la delección genómica ocurrida en cada una de las dos líneas mencionadas, se diseñaron varias parejas de cebadores para detectar la presencia de los exones e intrones del gen *Ptr* y de los genes vecinos que se encuentran río arriba de él. Usando PCR se pudo establecer que, en ambas líneas de moscas, la delección involucraba la delección parcial del extremo 5'-UTR de gen *Ptr* así como también la remoción completa del gen vecino CG30432. Dado que CG30432 ha sido reportado como un gen moderadamente expresado en discos imaginales y en testículos, pero con muy baja o nula expresión durante el desarrollo embrionario (Graveley et al, 2011), es esperable que las alteraciones que se observen en el embrión mutante sean consecuencia exclusiva de la ausencia de *Ptr*.

Si bien esta primera aproximación en la caracterización de la delección permitió establecer que la escisión del elemento P produjo una delección de 1617 pb localizada entre el 5'-UTR del gen *Ptr* y el gen vecino CG30432, en una segunda etapa se procedió a diseñar varias parejas de cebadores para cubrir las regiones río arriba y río abajo de esta zona. Los cebadores fueron diseñados con el propósito de que cualquier cebador sense pudiera ser usado con cualquier cebador anti-sense. El producto de PCR mínimo obtenido de esta forma para cada una de las dos líneas mutantes, fue secuenciado y analizado mediante el programa MEGA3 (Kumar et al, 2004) contra la secuencia de *Ptr* en la base de datos Flybase (ID = FBgn0262867) de forma de poder demarcar precisamente la zona de delección. La Figura 4.1.2 muestra una representación esquemática de la extensión de la delección para cada una de las líneas *Ptr*<sup>23C</sup> y *Ptr*<sup>74C</sup>. Mientras la línea *Ptr*<sup>23C</sup> tiene una delección de 3852 pb (elimina el inicio de la transcripción de *Ptr* y 1212 pb de la región codificante del 5'-UTR), la línea *Ptr*<sup>74C</sup> presenta una delección de 7038 pb que incluye el sitio de transcripción y 3087 pb del 5'-UTR del primer intrón del gen.

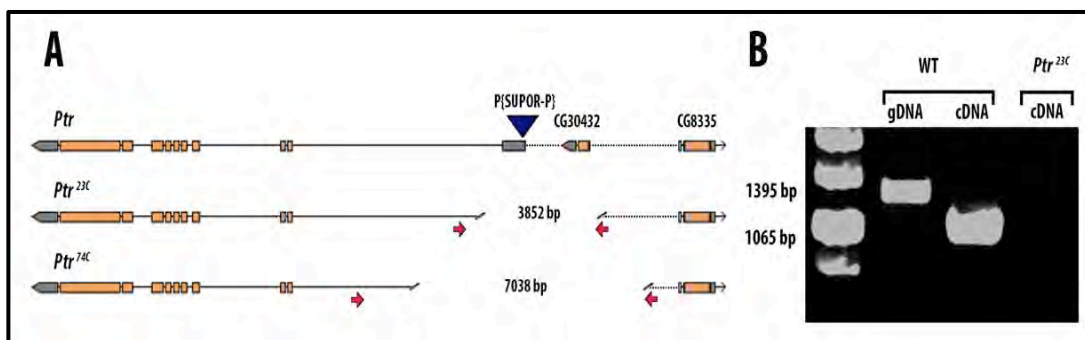


Figura 4.1.2- (A) Representación esquemática de la región genómica que contiene a *Ptr*. El triángulo azul localiza el elemento P{SUPOR-P} inserto a 335 bp de inicio de la transcripción de *Ptr*. Producto de la escisión imprecisa de este elemento P se generaron dos líneas mutantes (*Ptr*<sup>23C</sup> y *Ptr*<sup>74C</sup>), las cuales presentan delecciones de 3852 pb y 7038 pb respectivamente (flechas rojas) e involucran al gen localizado río arriba de *Ptr* (CG30432). (B) Para detectar la presencia de los transcritos codificantes de *Ptr* se realizó RT-PCR usando un par de cebadores que alinean con los exones 3 y 7 del gen. El diseño de estos cebadores sirvió para descartar la contaminación de ADNg en las muestras. Mientras los transcritos se encuentran presentes en el ADnc de embriones salvajes (WT), los mismos no se detectan en el ADnc de embriones homocigotos mutantes para *Ptr* (*Ptr*<sup>23C</sup>).



Para estudiar si la delección afectaba eficientemente la expresión de *Ptr*, se realizaron ensayos de RT-PCR usando parejas de cebadores que alineaban con los exones 3 y 7 de *Ptr*. Si bien no fue posible obtener un amplicón utilizando como molde el ADNc obtenido de embriones homocigotos de las líneas mutantes, si se obtuvo amplificación cuando el molde utilizado fue ADNg (1395 pb) o ADNc de embriones silvestres (1065 pb).

Concomitantemente con estos ensayos, ambas líneas de moscas fueron re-balanceadas utilizando una cepa de moscas con un cromosoma que expresaba el gen GFP bajo el control del promotor del gen *krüppel* (Casso et al, 1999). De esta forma, la ausencia de la expresión de GFP anunciaba la presencia de un embrión homocigoto para la ausencia de *Ptr*. Con la ayuda de esta herramienta se pudo determinar que los embriones homocigotos nulos para *Ptr* morían antes o momentos después de eclosionar (Figura 4.1.3).

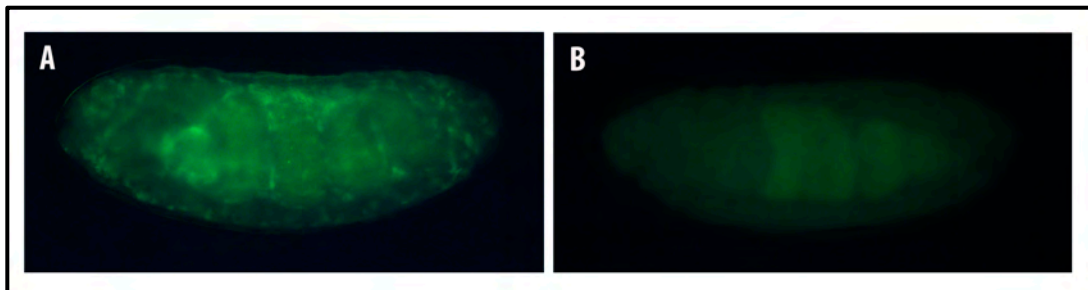


Figura 4.1.3- Los embriones mutantes nulos del gen *Ptr* pueden ser visualmente pre-seleccionados al ser balanceados con un cromosoma que expresa GFP. (A) Un embrión heterocigoto de la línea mutante 23C balanceado con un cromosoma que expresa GFP bajo el control del promotor del gen *krüppel* muestra el patrón normal GFP positivo esperado en un embrión en el estadio 16 de la embriogénesis. (B) Un embrión de la misma línea mutante y del mismo estadio de la embriogénesis de A mostrando la ausencia de expresión de GFP tal cual como se espera para los embriones homocigotos mutantes nulos para *Ptr*.

Debido a que las mutaciones que afectan a los participantes de la vía de Hh son reconocidas por ocasionar alteraciones fenotípicas en el patrón de dentículos, se procedió a analizar la presencia de esta característica en preparaciones cuticulares provenientes de embriones no eclosionados de cada una de las líneas nulas para *Ptr*. Las líneas *Ptr*<sup>23C</sup> y *Ptr*<sup>74C</sup> mostraron cutículas que consistentemente desarrollaban fusiones en los cinturones de dentículos (Figura 4.1.4). Este hecho reforzaría el concepto de que *Ptr* estaría actuando en la vía de Hh y que la mutación ocasionada interferiría con el apropiado funcionamiento de la misma y por ende, con la especificación del patrón de segmentos de la larva (Mohler, 1988; Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980; Yao et al, 2006).



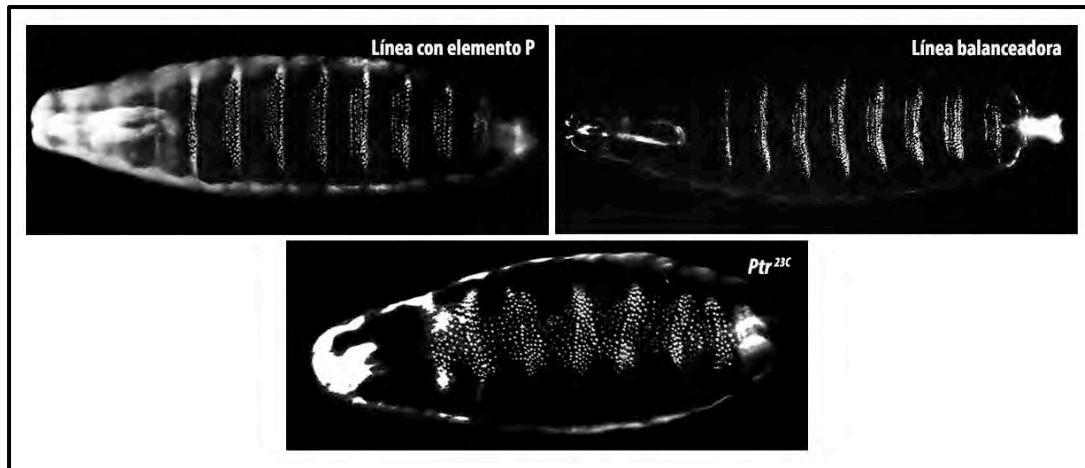


Figura 4.1.4- La actividad de *Ptr* es necesaria para la especificación adecuada del patrón en los segmentos embrionarios. La figura muestra preparaciones cuticulares obtenidas a partir de embriones no eclosionados de la línea mutante nulo *Ptr*<sup>23C</sup> en comparación con las obtenidas a partir de embriones tardíos obtenidos de las cepas parentales. Nótese la alteración en patrón normal de las bandas de denticulos observándose reiterados eventos de fusión o de ausencia de cutícula desnuda.

La posibilidad de haber desarrollado durante este trabajo un mutante nulo para *Ptr* balanceado con un cromosoma portador de GFP y un anticuerpo que específicamente reconoce a la proteína, fue motivador para implementar inmunotinciones que involucraran embriones homocigotos para la delección *Ptr* con la finalidad de evaluar, no solo la especificidad de la señal previamente caracterizada, sino también para determinar la presencia de alguna alteración morfológica en estadios más tempranos de la embriogénesis.

La selección de los embriones nulos para *Ptr* en estadios tempranos de la embriogénesis fue ardua debido a la interferencia provocada por la fluorescencia proveniente del vitelo. Por esta razón se seleccionaron embriones de estadios 13-14 por la ausencia de la fluorescencia de GFP a nivel de amnioserosa y de los hemocitos (Casso et al, 1999). Igualmente, y debido a que el nivel de expresión del GFP es bastante variable entre embriones, fue importante realizar la inmunotinción utilizando los anticuerpos purificados  $\alpha$ -*Ptr* con la finalidad de descartar la presencia de falsos positivos entre los embriones seleccionados. Adicionalmente se realizó la contratinción con DAPI para visualizar el tamaño y distribución de los núcleos, monitoreándose el estado de desarrollo del intestino medio por intermedio de la autofluorescencia del vitelo contenido en él. La Figura 4.1.5 muestra que mientras en el embrión normal se distingue la señal de *Ptr* en hemocitos (A, C, E, F), los núcleos con tamaños normales (aproximadamente 5  $\mu$ m de diámetro, G) y el intestino medio encerrando una única masa de vitelo (intestino con forma de corazón); los mutantes nulos para *Ptr* muestran la ausencia de la señal respectiva, la presencia de varios núcleos pequeños con

cromatina condensada y el intestino medio conteniendo varias acumulaciones de vitelo (A', C', E', F').

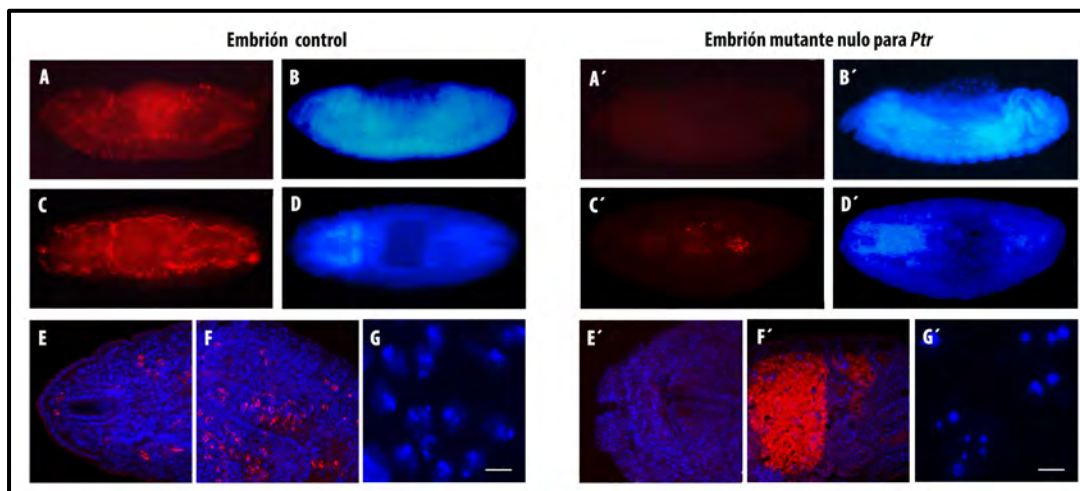


Figura 4.1.5- Primer acercamiento a la caracterización fenotípica de embriones mutantes nulos para *Ptr*. Imágenes (A-B) laterales y (C-D) ventrales de embriones en estadio 14 teñidos con anti-*Ptr* (señal roja) y DAPI (señal azul). La señal de *Ptr* se observa preferentemente localizada en hemocitos. (E-G) Un mayor aumento de la región cefálica del embrión control muestra en detalle la tinción vinculada a los hemocitos, el intestino medio y núcleos de tamaño normal (5  $\mu$ m), respectivamente. Imágenes (A'-B') laterales y (C'-D') ventrales de embriones mutantes nulos para *Ptr* teñidos con anti-*Ptr* y DAPI. No se detecta la presencia de señal *Ptr* en los embriones mutantes. (E'-G') Aumentos mayores de la región cefálica no permiten visualizar la señal de *Ptr* y se detecta la presencia del intestino con forma alterada así como una llamativa cantidad de núcleos pequeños.

#### 4.2 Efecto de la expresión de un ARNs contra *Ptr*.

Se obtuvieron líneas de moscas transgénicas, *UAS-PtrRI*, portadoras de un vector UAS con un inserto que corresponde a la secuencia del primer exón del gen *Ptr* repetida e invertida (Figura 4.2.1). Esta conformación determina que, como consecuencia de expresarse el inserto, se forme una horquilla de ARNs que silencia el transcrito del gen de forma específica. La expresión de este ARNs es dirigida por el activador Gal4 de manera espacial y temporalmente controlada (Dietzl et al, 2007; Enerly et al, 2002; Piccin et al, 2001; Reichhart et al, 2002; Schmid et al, 2002).

Con la finalidad de que el silenciamiento del gen *Ptr* se produjera de forma generalizada y temprana en el desarrollo, la línea *UAS-PtrIR* se cruzó con la línea *mat $\alpha$ -Gal4*, la cual porta un vector de expresión de la proteína Gal4 bajo el control de la región reguladora del gen  *$\alpha$ -tubulina*. Para verificar si el gen *Ptr* fue silenciado exitosamente, se extrajo el ARN total de 10-15 embriones del cruce que mostraban anomalías morfológicas y se lo utilizó como sustrato para la síntesis de ADNc desde el cual se midió la abundancia del transcrito *Ptr* mediante qPCR. Como control se utilizó ARN total de embriones obtenidos a partir del cruce de la línea parental *UAS-PtrRI*. La Figura 4.2.2 A muestra en un gráfico de barras la

abundancia del transcrito de *Ptr* (eje Y) en cada una de las muestras examinadas (eje X). La abundancia del transcrito *Ptr* fue normalizada respecto de la abundancia del transcrito del gen *pLys*, el que fue sintetizado *in vitro* y agregado en iguales proporciones a cada muestra. Este análisis se realizó por triplicado y la normalización se realizó con los valores promedio. Las barras en el gráfico indican la desviación estándar.

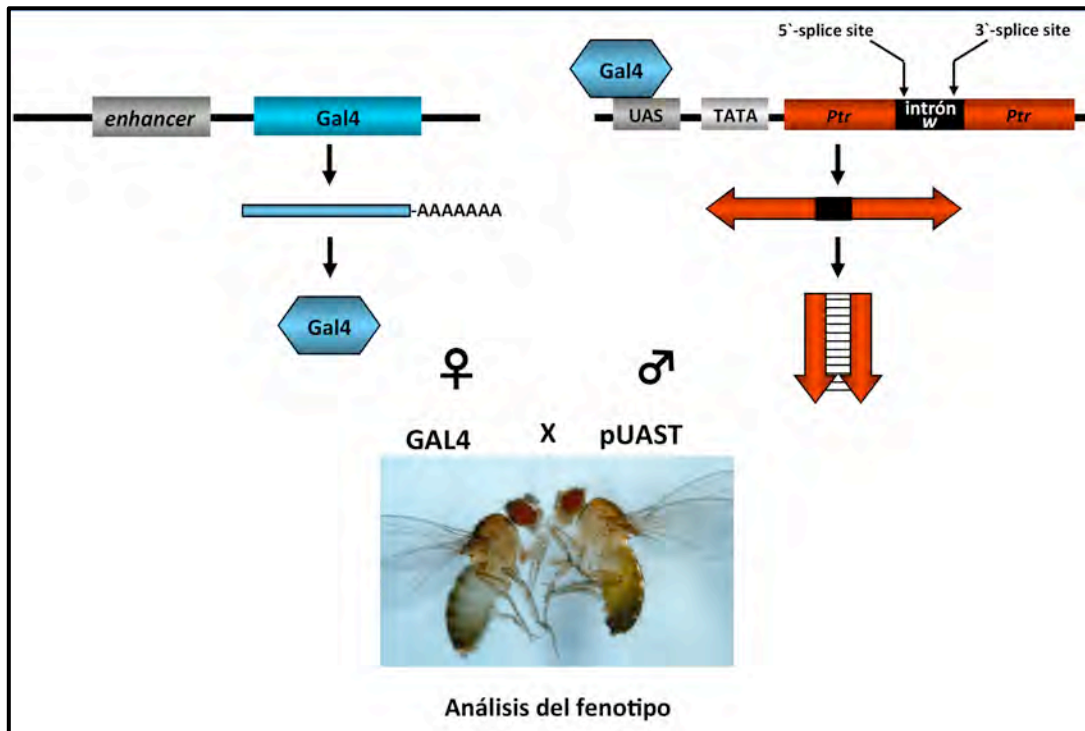


Figura 4.2.1- Sistema bipartito UAS/GAL4 en *Drosophila*. Cuando se cruzan hembras portadoras de la secuencia UAS con machos portadores de driver GAL4, la progenie que se genera contiene ambos elementos. En nuestro caso GAL4 va a promover la transcripción de un ARNs que silenciará específicamente la expresión de *Ptr*.

Cada medición fue dividida por el valor máximo alcanzado obteniendo una escala de valores relativos entre 0 y 1. El resultado indica que la abundancia relativa del transcrito *Ptr* disminuye a menos del 20% en embriones que expresan el ARNs respecto a embriones control, indicando que se logra el silenciamiento del gen *Ptr*. Tomando en cuenta los resultados obtenidos con el mutante de pérdida de función de *Ptr*, se realizaron preparaciones cuticulares con embriones no eclosionados de estos cruces. El examen de estas preparaciones mostró que la expresión ubicua del ARNs de *Ptr* provoca fusiones en los dentículos ventrales reminiscente a la observada en la línea con pérdida de función del gen (Figura 4.2.2B). Los resultados expuestos impulsaron la realización de nuevos experimentos utilizando la línea *nanos-Gal4* y la línea *ptc-Gal4*. La primera de las líneas determina que la horquilla codificante del ARNs de *Ptr* sea expresada en estadios tempranos del desarrollo, mientras la segunda determina que la misma ocurra siguiendo el mismo patrón de expresión

temporo-espacial de *ptc*. Las preparaciones cuticulares obtenidas a partir de la descendencia de estos cruces revelaron la existencia de fusiones similares a las anteriormente descritas, siendo las obtenidas para el caso de *ptc*-Gal4 de apariencia más severa. Concomitantemente con la realización de los cruces se realizaron cuantificaciones para determinar si la expresión del ARNs de *Ptr* afectaba la viabilidad de los embriones (Figura 4.2.3C). De esta forma se determinó que la disminución de la expresión de *Ptr* provocada por la expresión del ARNs aumentará entre 15-45% la cantidad de embriones no eclosionados. La variabilidad encontrada estaba relacionada o en dependencia con las líneas utilizadas en cada cruzamiento (línea portadora del *UAS-PtrRI* y línea de expresión de Gal4). De esta forma los resultados muestran que el silenciamiento de la expresión de *Ptr* aumenta la letalidad embrionaria, siendo un elemento determinante en la aparición del fenotipo cuticular asociado a la fusión de los dentículos ventrales.

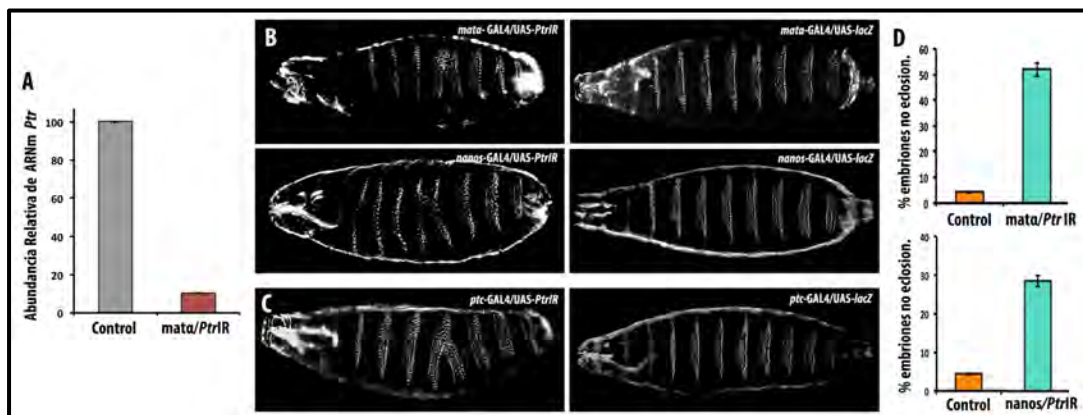


Figura 4.2.2- Silenciamiento *in vivo* de *Ptr* (A) El qPCR realizado para comparar embriones que expresan *UAS-PtrRI* con embriones controles, muestra que la abundancia del ARNm de *Ptr* disminuyó fuertemente luego de la expresión del dsARN (más de un 80%) (B) La expresión *in vivo* del dsARN de *Ptr* produce fusiones en los dentículos ventrales en embriones tardíos tanto si se lo expresa de forma ubicua como (C) si se los expresa temporo-espacialmente relacionado con *ptc*. (D) El porcentaje de embriones no eclosionados aumenta fuertemente (15% y 45%) cuando el dsARN se expresan bajo el control de los drivers que se muestran en B. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  desvío estándar.



## Discusión

El propósito de la genómica funcional es ampliar, integrando el conocimiento genómico y proteómico, la comprensión de las propiedades dinámicas de un organismo a nivel molecular y celular. Esta práctica proporcionaría un panorama más completo de cómo la función biológica surge de la información codificada en el genoma de un organismo.

La secuencia de nucleóticos del gen *Ptr* porta información que permite clasificar a su producto como perteneciente a una familia de proteínas transmembrana de topología estrechamente relacionada a *Ptc*, escasamente caracterizada hasta el momento. Por tal motivo el trabajo que realizamos durante esta tesis procuró determinar o elucidar la función que estaría cumpliendo *Ptr* en la embriogénesis de *Drosophila*.

### **Distribución espacio-temporal de *Ptr* durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*.**

Los resultados iniciales demuestran que durante la celularización (estadio 5) el embrión se encuentra enriquecido en transcritos de *Ptr*. Dicho estadio del desarrollo se caracteriza por la invaginación de la membrana plasmática para formar los surcos de clivaje entre los 6000 núcleos que se encuentran localizados en la zona cortical del embrión. La celularización prosigue, transcurriendo las fase lenta (40 min) y rápida (60 min), hasta finalizar con la formación de células individuales y constituyentes de un epitelio polarizado (Foe et al, 1993). El análisis de la distribución de *Ptr* en este momento del desarrollo, demuestra que la misma se encuentra localizada en el dominio apical de la células, en estrecha asociación con las membranas. Este último hecho se condice con la distribución de la inmunoreactividad que se obtiene en células S2R+ (Zuniga et al, 2009) o cl-8 tras la expresión de la proteína *Ptr-V5*, y con los ensayos de inmunogold realizados en blastodermos celulares. Además, la localización de *Ptr* en la membrana se corroboró a través de análisis bioquímicos que incluyen tratamientos con detergentes (Pastenes et al, 2008). La comparación de estos resultados con la evidencia reportada acerca de la función de *Ptr* en *C. elegans*, permite realizar especulaciones acerca de la participación de *Ptr* en procesos independientes de Hh.

Los estudios realizados en el nemátodo han identificado homólogos de *Ptc* y *Ptr*, pero no así de Hh y Smo, y la presencia de una familia de proteínas denominadas Hedgehog-related (Hh-r) consideradas homólogas evolutivas a Hh por ser bipartitas con dominios similares a Hh (un dominio C-terminal y un dominio N-terminal potencialmente vinculado con procesos de señalización). La utilización de ARNi en este modelo ha demostrado que los genes *ptc*, *ptr* y

*hh-r* (2, 24 y 27 genes respectivamente) son funcionales encontrándose involucrados en el transporte de proteínas, lípidos y esteroides. Este hecho podría estar evidenciando roles ancestrales de estas proteínas en procesos claves para el desarrollo embrionario tal como lo es la citoquinesis (Kuwabara et al, 2000; Perens & Shaham, 2005; Zugasti et al, 2005). En consecuencia, en estadios tempranos de la embriogénesis en *Drosophila* cuando los eventos de proliferación y/o de expansión de membrana son preponderantes, Ptr podría estar promoviendo el tráfico vesicular y/o los eventos de fusión de membrana necesarios para que la citoquinesis se complete.

Por otro lado, el análisis de secuencia permitió clasificar a Ptr en la familia de proteínas con dominio de unión de esteroides (SSD) y reveló que posee una estructura y topología similar a Ptc, un regulador negativo de la cascada de señalización gatillada por Hh (Chen & Struhl, 1996; Ingham et al, 1991; Taipale et al, 2002). En este sentido, Ptr podría ser parte de la vía de Hh actuando como un posible co-receptor o modulador de la misma, dando pie a realizar la comparación de los patrones de expresión de ambas proteínas durante la embriogénesis. Utilizando los anticuerpos generados para detectar Ptr pudimos determinar que, mientras en los estadios tempranos del desarrollo Ptr y Ptc muestran un patrón de expresión muy similar, los estadios posteriores a la formación de las 15 franjas Ptc positivas evidencian a Ptr predominantemente localizado en los hemocitos, sugiriendo que ambas proteínas desempeñarían roles no completamente solapados.

El hecho de haber encontrado Ptr en hemocitos es consistente con los datos obtenidos a partir del análisis del transcriptoma temporal publicado por el proyecto modENCODE (Graveley et al, 2011), ya que la transcripción de Ptr muestra un brusco incremento a partir de la mitad de la embriogénesis el cual resulta ser co-temporal con la diferenciación de los hemocitos y su migración como células fagocíticas (Tepass et al, 1994).

En *Drosophila*, como en otros invertebrados, los hemocitos son células circulantes que tienen la responsabilidad de fagocitar a las células apoptóticas. Además durante la embriogénesis, tienen el cometido de llevar a cabo funciones esenciales resultando ser células relevantes para que ocurran complejos procesos como la formación del tejido embrionario y su remodelación durante la metamorfosis (Abrams et al, 1993; Franc et al, 1996; Franc et al, 1999; Tepass et al, 1994). Dado que, los hemocitos son responsables del depósito de muchas de las moléculas constituyentes de la matriz extracelular en el embrión (Cecchini et al, 1987; Fessler & Fessler, 1989; Fogerty et al, 1994; Kusche-Gullberg et al, 1992; Le Parco et al, 1986; Mirre et al, 1988; Yasothornsrikul et al, 1997), la contracción muscular somática coordinada es relevante para que ocurra la eclosión de embrión (Stronach et al, 1999; Wright, 1960) y los

embriones nulos para *Ptr* han demostrado no ser capaces de emerger de la membrana vitelina, parece interesante planificar a la brevedad estudios que ayuden a evaluar el estado que presenta la matriz extracelular en estos animales. Creemos que sería probable encontrar alteraciones a nivel de los anclajes de los músculos relacionados con su pared corporal. De forma similar, y debido a que la disfunción de los hemocitos se encuentra asociada con la ocurrencia de alteraciones a nivel del intestino y sistema nervioso (Brown, 1994; Schmid et al, 2002; Sears et al, 2003; Yarnitzky & Volk, 1995), parece también oportuno analizar de forma precisa la morfología de estos órganos o sistemas en los mutantes. Algunas de las observaciones realizadas durante esta tesis, han permitido evidenciar no solo alteraciones morfológicas a nivel del intestino medio de los mutantes nulos para *Ptr* sino también la presencia de un elevado número de núcleos pequeños. Estos núcleos presentan cromatina condensada y uniformemente distribuida, características morfológicas que se corresponden con las imágenes nucleares descritas para células apoptóticas. Estos hechos motivan el desarrollo inmediato de inmunodetecciones con marcadores celulares/tisulares adecuados que permitan la caracterización, cuantificación y/o delimitación apropiada de las alteraciones mencionadas.

Es un hecho conocido que la capacidad que presentan los hemocitos de migrar hacia un destino determinado, mientras reconocen y fagocitan células moribundas, se encuentra relacionada con la expresión de proteínas transmembrana específicas que ofician de receptores. De esta forma Croquemort (Crq), un miembro de la familia de proteínas CD36, es un receptor de *Drosophila* presente en la mayoría de los macrófagos que contienen cuerpos apoptóticos en su interior. La función de este receptor se encontraría relacionada con la unión y eliminación de los células apoptóticas (Franc et al, 1996). Otro receptor que parece estar involucrado con la fagocitosis de estas células es Draper, el homólogo en *Drosophila* de CED-1 en *C. elegans*. En *Drosophila*, se ha sugerido que esta proteína cumple una función en la fagocitosis de células apoptóticas por parte de la glía y plasmátocitos embrionarios (Manaka et al, 2004). Por otro lado, el receptor PDGF/VEGF (Pvr) es constituyente del mecanismo por el cual los hemocitos migran, dirigiendo a sus precursores a lo largo de las rutas migratorias estereotipadas (Cho et al, 2002; Heino et al, 2001; Wood et al, 2006). Además, este receptor es relevante para promover la sobrevivencia de las células sanguíneas en el animal, hecho que se confirma al observarse que Pvr, no solo se encuentra fuertemente expresado en los plasmátocitos embrionarios, sino también porque los embriones mutantes presentan un alta cantidad de hemocitos apoptóticos a la vez que un número llamativamente reducido de hemocitos totales (Bruckner et al, 2004). Dado estas evidencias y que nuestros

resultados iniciales registran un aumento en el número de núcleos con características apoptóticas, creemos importante abordar aproximaciones que nos permitan corroborar en el mutante nulo de *Ptr* no solo la presencia de los hemocitos sino también el estado funcional de los mismos así como comprobar, por el uso de técnicas específicas, el enriquecimiento de células apoptóticas en el embrión.

Aunque se ha detectado la existencia de una estrecha correlación entre los patrones de apoptosis y las rutas migratorias recorridas por los hemocitos embrionarios (Abrams et al, 1993; Tepass et al, 1994), no hay elementos aún que ayuden a explicar cómo los procesos morfogénicos son capaces de coordinar las migraciones que ocurren en el desarrollo con el movimiento de los hemocitos por rutas estereotipadas hacia las células moribundas y como los mismos tienen la capacidad de censar su presencia a distancia (Cho et al, 2002; Wood & Jacinto, 2007). Lo que parece ser claro, es que las funciones especificadas son llevadas a cabo por los hemocitos porque los mismos pueden responder a las diversas señales que llegan desde la matriz extracelular o desde otras células como factores de señalización. Debido a que los receptores y las vías de señalización intracelular activadas en los procesos mencionados no se encuentran aún bien definidas, resulta interesante haber podido detectar la presencia de *Ptr* como una proteína transmembrana presente en los hemocitos en migración.

Dado que en la propia anotación computacional de *Ptr*, se le asigna una función de receptor de Hh (<http://flybase.org/reports/FBgn0262867.html>) es razonable pensar que *Ptr* puede estar actuando como un receptor alternativo del morfógeno en hemocitos. Curiosamente en mamíferos hay antecedentes que refieren a Hh como una señal quimioatrayente de monocitos-macrófagos durante la iniciación de la gastritis (Schumacher et al, 2012). Este rol como quimioatrayente también ha sido puesto en evidencia por los experimentos llevados a cabo por Dunaeva y colaboradores, los cuales no solo demuestran que los monocitos humanos expresan *Ptc* sino que *Shh* es un inductor específico de su migración. Asimismo, estos autores determinan que los monocitos de pacientes con diabetes mellitus son incapaces de responder al morfógeno, hecho que parece estar involucrado con el desarrollo de importantes alteraciones funcionales como defectos en la migración, reducción de la fagocitosis e incremento de la adhesión a las células endoteliales (Dunaeva et al, 2010). El hallazgo de que los hemocitos contienen *Ptr* a partir del estadio 13 de la embriogénesis, es coincidente con la descripción de la aparición de la actividad fagocítica de hemocitos (macrófagos) (Tepass et al, 1994), la mayoría de los cuales están localizados en zonas donde



ocurre muerte celular programada (alrededor del sistema nervioso y la cabeza) (Abrams et al, 1993).

En resumen, estos resultados nos permitieron determinar el patrón de expresión de *Ptr*, demostrando que en estadios tardíos esta proteína con SSD se encuentra expresada mayoritariamente en hemocitos. Esta observación no era esperada y nos motiva a delinear a futuro estudios funcionales más sofisticados para elucidar la función de *Ptr* en estas células.

### **Evaluación de la participación de *Ptr* en la vía Hh.**

Las similitudes estructurales expuestas entre *Ptc* y *Ptr* junto con el hecho que se logró detectar a *Ptr* en asociación con membranas, nos permitió especular que *Ptr* podría estar involucrado en la cascada de señalización de Hh. Por ese motivo se realizaron un conjunto de estudios con ensayos reportero en cultivos celulares destinados a determinar si *Ptr* es capaz de modular la respuesta Hh. Los resultados muestran que *Ptr* produce un tipo de respuesta que ha sido reportada como característica de los componentes regulatorios negativos de la vía (Lum et al, 2003). De esta forma se constató que el ARNi de *Ptr* es capaz de incrementar la actividad basal desarrollada por el reportero mientras que la sobre-expresión de la proteína suprime la activación del reportero provocada como consecuencia de la adición de Hh. Utilizando el mismo tipo de aproximación experimental, también se pudo determinar que el incremento de la actividad reportero producido por el ARNs de *Ptr* puede ser potenciado por la adición de ARNs de *ptc*. Estos resultados son compatibles con la idea que las células pueden mediar los efectos de Hh expresando dos tipos de receptores diferentes. Más aún, la posibilidad de que las células puedan expresar receptores con diferentes afinidades por el ligando fue previamente indicado por experimentos en donde un alelo de *Ptc* con menos afinidad a Hh (*Ptc*<sup>Con</sup>), fue co-expresado en células de disco imaginal de ala junto con el *Ptc* salvaje. Los resultados indican que *Ptc*<sup>Con</sup> compite con el *Ptc* salvaje por la unión con Hh de forma tal que las células que expresan ambos tipos de receptores interpretan el nivel de Hh como menor al esperado para su situación real dentro del gradiente de Hh. La diferencia entre las afinidades celulares implica diferentes estados de actividad de Ci y, por lo tanto, diferentes grupos de genes activados (Mullor & Guerrero, 2000). En nuestro caso, la unión de Hh a *Ptr* puede regular la disponibilidad de Hh a *Ptc*, hecho que determinaría que una célula que expresa ambas proteínas tendría una lectura del gradiente de Hh diferente cuando se lo compara con una célula que expresa predominantemente *Ptc*. La posibilidad de expresar receptores diferentes con afinidades distintas por el ligando podría resultar importante para obtener un mayor grado de modulación en la señalización (Mac Gabhann & Popel, 2008;

Shibuya & Claesson-Welsh, 2006; Yarden & Sliwkowski, 2001). Por ejemplo, en mamíferos la proteína interactuante con Hh (Hhip) codifica una glicoproteína de membrana que inhibe la señalización de Hh al unirse físicamente con las proteínas Hh (Chuang & McMahon, 1999). En este sentido, los resultados de nuestros ensayos reportero sugieren que el nivel de expresión de Ptr expresado en las células cl-8 resultaría ser un factor limitante en la respuesta iniciada por la unión a Hh. Estos resultados son también consistentes con la posibilidad de que Ptr compita con Ptc limitando la señalización mediada por Hh. Otra posibilidad a ser contemplada sería que Ptr secuestrara Hh con la finalidad de liberarlo a un pool de Ptc vesicular, lo cual no solo controlaría el gradiente de Hh sino también regularía la posibilidad de interacción entre el Ptc vesicular y Smo.

Por otra parte, a los componentes centrales de la vía de señalización de Hh en *Drosophila* se le han ido anexando varias proteínas de superficie implicadas en la modulación de la respuesta (Beachy et al, 2010), habiendo sido también propuesta la existencia de un receptor alternativo para la acción del mencionado morfógeno. Por ejemplo, Torroja et al. describió la presencia de Hh internalizado en mutantes que tiene impedida la internalización de Ptc y sugiere la presencia de un mecanismo de internalización de Hh independiente de Ptc (Torroja et al, 2004). Dado que la secuencia del extremo C-terminal intracelular de Ptr contiene el mismo motivo (PPXY) que ha sido avalado como necesario para la endocitosis de Ptc (Hicke & Dunn, 2003), parecería interesante determinar si Ptr tiene la capacidad de mediar la internalización de Hh.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos reporteros en células muestran que Ptr podría estar actuando en la vía de señalización de Hh río arriba de Smo. Un próximo paso a explorar involucraría la existencia de interacciones funcionales entre Ptr y Smo. Por ejemplo, Ptr podría afectar el tráfico intracelular de Smo, dado que la integridad del dominio SSD en Ptc (el cual es altamente conservado en Ptr) parece ser necesario para que ocurra la traslocación de Smo a la superficie celular (Strutt et al, 2001). Asimismo se ha propuesto una función alternativa como transportador de membrana a proteínas estructuralmente relacionadas con Ptr -Ptc, Dispatched y Niemann–Pick protein (NPC1)- teniendo como base la similitud en la topología de los segmentos transmembrana con los miembros de la familia RND de permeasas procariotas (Tseng et al, 1999). Consistentemente, NPC1 se encuentra involucrada en el transporte de colesterol a través de las membranas intracelulares (Davies et al, 2000), mientras hay evidencia a favor que Ptc y Disp son capaces de comportarse como transportadores moleculares transmembrana (Ma et al, 2002; Taipale et al, 2002).

Curiosamente se ha sido sugerido que PTCH1 en ratón transportaría vitamina-D3 fuera de las células para inhibir la actividad de SMO (Bijlsma et al, 2006).

Además, nuestros resultados dieron cuenta que la combinación de los ARNi de *Ptr* e *ihog* son capaces de inhibir la activación de la vía inducida por Hh e indican que *Ptr* podría estar actuando río arriba de *Ihog*, un resultado que difiere un poco del reportado para la interacción entre *Ptc* y *Ihog*. En este último caso, el ARNi de *ptc* es capaz de revertir de forma parcial la pérdida de respuesta a Hh producida por el ARNi de *ihog* mientras que la sobre-expresión de *Ptc* suprime el incremento de la respuesta producida por sobre-expresión de *Ihog* (Yao et al, 2006). Nuestro resultado también podría indicar que otra molécula, y no *Ihog*, fuera la responsable de la interacción de Hh y *Ptr*. Por ejemplo, hay evidencia que indicarían que *Ihog* y Brother of *ihog* (*Boi*) son esenciales para la activación de la vía pero no así para la recepción y secuestro de Hh (Camp et al, 2014),

Por otra parte, la unión de Hh a *Ptr* podría requerir de la presencia de Dally-like (*Dlp*), un proteoglicano de heparán sulfato tipo glicicano que actúa potenciando la estabilidad de Hh y promueve su internalización con *Ptc* (Yan et al, 2010). Dado que estudios previos demostraron que *Dlp* es específicamente requerido en los ensayos basados en células y en embriones (Desbordes & Sanson, 2003; Han et al, 2004; Lum et al, 2003), nuestro protocolos de transfección incluyeron siempre un vector para producir la expresión de *Dlp*. De esta forma, podríamos especular que nuestros ensayos reporteros utilizando células de la línea cl-8 tendrían de por sí *Dlp* facilitando la interacción de Hh con *Ptr*. Por este motivo sería interesante no solo determinar si *Ptr* podría unir Hh por sí mismo o podría estar requiriendo la asistencia de *Dlp*, sino también como la mencionada interacción podría contribuir a la señalización de Hh en *Drosophila*. Aunque los resultados obtenidos en los ensayos de inmunoprecipitación muestran la posibilidad de interacción directa entre *Ptr* y Hh, no se puede excluir que esta interacción pudiera estar facilitada por la existencia de conglomerados de moléculas de *Ptr*, siendo un número más bajo de las mismas responsable de desarrollar un afinidad diferente por el ligando. En este contexto, el uso de los ensayos reporteros adicionales podrían ser relevante a la hora de evaluar si el efecto obtenido en la respuesta de señalización por Hh es dependiente de la concentración de *Ptr*.

De forma concomitante al resultado obtenido en los ensayos reportero, el fenotipo cuticular observado en los embriones nulos para *Ptr* y en aquellos que expresan ARNi de *Ptr* resulta ser reminiscente de los fenotipos causados por mutaciones en los miembros de la vía de Hh, sugiriendo la participación de *Ptr* en la vía.

En mamíferos, hay dos receptores funcionales de Hh los cuales son expresados de forma diferencial durante el desarrollo de la epidermis. Ptc2 en ratón (o PTCH2 en humano) se encuentra co-expresado con el ligando Sonic hedgehog (SHH), mientras Ptc1 (PTCH1) es expresado de una forma complementaria. Este patrón de expresión sugeriría que los dos receptores tiene funciones específicas durante el desarrollo de la epidermis aunque actúen en la misma vía de señalización (Smyth et al, 1999). Más aún, algunos datos sugieren que PTCH2 podría estar actuando como un receptor que afinara la señalización a expensas de los diferentes ambientes celulares (Rahnama et al, 2004). De esta forma la sobreposición funcional de Ptc y Ptr durante el desarrollo de la epidermis podría estar reflejando la acción de Ptc como un mediador primario de la actividad de Hh mientras Ptr podría tener una función complementaria y restringida.

En resumen, nuestros resultados proveen evidencia *in vivo* e *in vitro* que sugiere la participación de la proteína transmembrana Ptr en la vía de Hh actuando, probablemente, como un co-receptor o receptor alternativo a Ptc. Resulta interesante planificar estudios con la finalidad de determinar si Ptr estaría actuando en diferentes tejidos durante el desarrollo así como para determinar su acción precisa dentro de los mecanismos conocidos de regulación que tiene la mencionada vía de señalización.



## Conclusiones generales y perspectivas

La identificación de genes no caracterizados cuyo nivel de expresión cambia drásticamente en asociación a la evolución de determinados estadios del desarrollo o procesos morfogénicos particulares, estimula la planificación de estudios específicamente dirigidos a determinar la función que cumplen dentro de los mismos. *Ptr* es uno de los 118 genes -según lo reportado en el 2009 por Zúniga y colaboradores- que se expresan de forma diferencial al inicio de la gastrulación de *Drosophila*. Los estudios desarrollados en esta tesis han permitido avanzar en su caracterización funcional obteniendo datos relevantes acerca de su secuencia, dinámica de expresión y la localización subcelular de la proteína que codifica, identificándola asociada a membranas. Asimismo hemos obtenido resultados relevantes acerca de la función de *Ptr*, determinado que se comporta como un regulador negativo de la vía de señalización gatillada por Hh. Su actividad se ha conseguido mapear río abajo o al mismo nivel que *Ptc* y río arriba y/o independiente de *Ihog* y *Smo*, corroborándose también la posibilidad de interacción directa entre *Ptr* y Hh. En concordancia con estos resultados realizados en células en cultivo, hemos obtenido otros datos *in vivo* que muestran embriones no eclosionados de líneas mutantes para *Ptr* o de líneas que expresan ARNs contra *Ptr* con defectos en la generación del patrón antero-posterior de sus cutículas. Específicamente las preparaciones cuticulares de estos embriones evidencian la presencia de fusiones en las bandas de dentículos ventrales. Concomitantemente se ha demostrado la presencia de señal perteneciente a *Ptr* colocalizando con los hemocitos, siendo su ausencia vinculada con la aparición de hallazgos embriológicos llamativos como incremento de núcleos apoptóticos y malformaciones intestinales. Si bien hemos avanzado en conocer la función que *Ptr* cumple en la embriogénesis de *Drosophila*, quedan desafíos pendientes como comprender cuál es la contribución de la proteína en la regulación fina de la vía Hh y si su asociación con esta vía tiene vinculación directa con la presencia de la misma en hemocitos.



## Bibliografía

Abrams JM, White K, Fessler LI, Steller H (1993) Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**: 29-43

Adams MD, Sekelsky JJ (2002) From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nature reviews Genetics* **3**: 189-198

Basler K, Struhl G (1994) Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* **368**: 208-214

Bate M, Martínez-Arias A (1993) *The Development of Drosophila melanogaster*.

Beachy PA, Hymowitz SG, Lazarus RA, Leahy DJ, Siebold C (2010) Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes & development* **24**: 2001-2012

Becalska AN, Gavis ER (2009) Lighting up mRNA localization in *Drosophila* oogenesis. *Development* **136**: 2493-2503

Bellen HJ, Levis RW, Liao G, He Y, Carlson JW, Tsang G, Evans-Holm M, Hiesinger PR, Schulze KL, Rubin GM, Hoskins RA, Spradling AC (2004) The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* **167**: 761-781

Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F, Peppelenbosch MP (2006) Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS biology* **4**: e232

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254

Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-415

Brown NH (1994) Null mutations in the alpha PS2 and beta PS integrin subunit genes have distinct phenotypes. *Development* **120**: 1221-1231

Bruckner K, Kockel L, Duchek P, Luque CM, Rorth P, Perrimon N (2004) The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in *Drosophila*. *Developmental cell* **7**: 73-84

Burglin TR, Kuwabara PE (2006) Homologs of the Hh signalling network in *C. elegans*. *WormBook : the online review of C elegans biology*: 1-14

Camp D, He BH, Li S, Althaus IW, Holtz AM, Allen BL, Charron F, van Meyel DJ (2014) Ihog and Boi elicit Hh signaling via Ptc but do not aid Ptc in sequestering the Hh ligand. *Development* **141**: 3879-3888

Capdevila J, Pariente F, Sampedro J, Alonso JL, Guerrero I (1994) Subcellular localization of the segment polarity protein patched suggests an interaction with the wingless reception complex in *Drosophila* embryos. *Development* **120**: 987-998

Casso D, Ramirez-Weber FA, Kornberg TB (1999) GFP-tagged balancer chromosomes for *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of development* **88**: 229-232

Cecchini JP, Knibiehler B, Mirre C, Le Parco Y (1987) Evidence for a type-IV-related collagen in *Drosophila melanogaster*. Evolutionary constancy of the carboxyl-terminal noncollagenous domain. *European journal of biochemistry / FEBS* **165**: 587-593

Chamoun Z, Mann RK, Nellen D, von Kessler DP, Bellotto M, Beachy PA, Basler K (2001) Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* **293**: 2080-2084

Chen CH, von Kessler DP, Park W, Wang B, Ma Y, Beachy PA (1999) Nuclear trafficking of Cubitus interruptus in the transcriptional regulation of Hedgehog target gene expression. *Cell* **98**: 305-316

Chen Y, Struhl G (1996) Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**: 553-563

Cho NK, Keyes L, Johnson E, Heller J, Ryner L, Karim F, Krasnow MA (2002) Developmental control of blood cell migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell* **108**: 865-876

Chuang PT, McMahon AP (1999) Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* **397**: 617-621

Crozatier M, Glise B, Khemici V, Vincent A (2003) Vein-positioning in the *Drosophila* wing in response to Hh; new roles of Notch signaling. *Mechanisms of development* **120**: 529-535

Davies JP, Chen FW, Ioannou YA (2000) Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science* **290**: 2295-2298

Desbordes SC, Sanson B (2003) The glypican Dally-like is required for Hedgehog signalling in the embryonic epidermis of *Drosophila*. *Development* **130**: 6245-6255

Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ (2007) A

genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**: 151-156

Dunaeva M, Voo S, van Oosterhoud C, Waltenberger J (2010) Sonic hedgehog is a potent chemoattractant for human monocytes: diabetes mellitus inhibits Sonic hedgehog-induced monocyte chemotaxis. *Basic research in cardiology* **105**: 61-71

Enerly E, Larsson J, Lambertsson A (2002) Reverse genetics in *Drosophila*: from sequence to phenotype using UAS-RNAi transgenic flies. *Genesis* **34**: 152-155

Evans IR, Zanet J, Wood W, Stramer BM (2010) Live imaging of *Drosophila melanogaster* embryonic hemocyte migrations. *Journal of visualized experiments : JoVE*

Fessler JH, Fessler LI (1989) *Drosophila* extracellular matrix. *Annual review of cell biology* **5**: 309-339

Foe VE, Odell GM, Edgar BA (1993) Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: point and counterpoint. In *The development of Drosophila melanogaster*, A M-A (ed), Vol. 1, pp 149-300. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Fogerty FJ, Fessler LI, Bunch TA, Yaron Y, Parker CG, Nelson RE, Brower DL, Gullberg D, Fessler JH (1994) Tiggrin, a novel *Drosophila* extracellular matrix protein that functions as a ligand for *Drosophila* alpha PS2 beta PS integrins. *Development* **120**: 1747-1758

Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, Hoffmann J, Ezekowitz RA (1996) Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**: 431-443

Franc NC, Heitzler P, Ezekowitz RA, White K (1999) Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* **284**: 1991-1994

Gallet A, Ruel L, Staccini-Lavenant L, Therond PP (2006) Cholesterol modification is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in *Drosophila* epithelia. *Development* **133**: 407-418

Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G (1973) Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nature: New biology* **245**: 251-253

Garcia-Bellido A, Santamaria P (1972) Developmental analysis of the wing disc in the mutant engrailed of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **72**: 87-104



Ghanim M, White KP (2006) Genotyping method to screen individual *Drosophila* embryos prior to RNA extraction. *BioTechniques* **41**: 414, 416, 418

Gonzalez-Aguero M, Zuniga A, Pottstock H, Del Pozo T, Gonzalez M, Cambiazo V (2005) Identification of genes expressed during *Drosophila melanogaster* gastrulation by using subtractive hybridization. *Gene* **345**: 213-224

Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, Duff MO, Landolin JM, Yang L, Artieri CG, van Baren MJ, Boley N, Booth BW, Brown JB, Cherbas L, Davis CA, Dobin A, Li R, Lin W, Malone JH, Mattiuzzo NR, Miller D, Sturgill D, Tuch BB, Zaleski C, Zhang D, Blanchette M, Dudoit S, Eads B, Green RE, Hammonds A, Jiang L, Kapranov P, Langton L, Perrimon N, Sandler JE, Wan KH, Willingham A, Zhang Y, Zou Y, Andrews J, Bickel PJ, Brenner SE, Brent MR, Cherbas P, Gingeras TR, Hoskins RA, Kaufman TC, Oliver B, Celniker SE (2011) The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **471**: 473-479

Han C, Belenkaya TY, Wang B, Lin X (2004) *Drosophila* glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process. *Development* **131**: 601-611

Hanks MC, Loomis CA, Harris E, Tong CX, Anson-Cartwright L, Auerbach A, Joyner A (1998) *Drosophila* engrailed can substitute for mouse Engrailed1 function in mid-hindbrain, but not limb development. *Development* **125**: 4521-4530

Harlow E, Lane D (1999) *Using antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Heemskerk J, DiNardo S (1994) *Drosophila* hedgehog acts as a morphogen in cellular patterning. *Cell* **76**: 449-460

Heino TI, Karpanen T, Wahlstrom G, Pulkkinen M, Eriksson U, Alitalo K, Roos C (2001) The *Drosophila* VEGF receptor homolog is expressed in hemocytes. *Mechanisms of development* **109**: 69-77

Hicke L, Dunn R (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual review of cell and developmental biology* **19**: 141-172

Ingham PW (1993) Localized hedgehog activity controls spatial limits of wingless transcription in the *Drosophila* embryo. *Nature* **366**: 560-562

Ingham PW, Taylor AM, Nakano Y (1991) Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature* **353**: 184-187

Jeong J, McMahon AP (2005) Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development* **132**: 143-154

Jiang J, Hui CC (2008) Hedgehog signaling in development and cancer. *Developmental cell* **15**: 801-812

Kopczynski CC, Noordermeer JN, Serano TL, Chen WY, Pendleton JD, Lewis S, Goodman CS, Rubin GM (1998) A high throughput screen to identify secreted and transmembrane proteins involved in *Drosophila* embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 9973-9978

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics* **5**: 150-163

Kundsen KA (1985) Proteins transferred to nitrocellulose for use as immunogens. *Anal Biochem* **147**: 285-288

Kusche-Gullberg M, Garrison K, MacKrell AJ, Fessler LI, Fessler JH (1992) Laminin A chain: expression during *Drosophila* development and genomic sequence. *The EMBO journal* **11**: 4519-4527

Kuwabara PE, Labouesse M (2002) The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends in genetics : TIG* **18**: 193-201

Kuwabara PE, Lee MH, Schedl T, Jefferis GS (2000) A *C. elegans* patched gene, *ptc-1*, functions in germ-line cytokinesis. *Genes & development* **14**: 1933-1944

Le Parco Y, Knibiehler B, Cecchini JP, Mirre C (1986) Stage and tissue-specific expression of a collagen gene during *Drosophila melanogaster* development. *Experimental cell research* **163**: 405-412

Lee JD, Kraus P, Gaiano N, Nery S, Kohtz J, Fishell G, Loomis CA, Treisman JE (2001) An acylatable residue of Hedgehog is differentially required in *Drosophila* and mouse limb development. *Developmental biology* **233**: 122-136

Lin X (2004) Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* **131**: 6009-6021

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **25**: 402-408

Lum L, Beachy PA (2004) The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* **304**: 1755-1759

Lum L, Yao S, Mozer B, Rovescalli A, Von Kessler D, Nirenberg M, Beachy PA (2003) Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science* **299**: 2039-2045

Ma Y, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K, Beachy PA (2002) Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell* **111**: 63-75

Mac Gabhann F, Popel AS (2008) Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation* **15**: 715-738

Manaka J, Kuraishi T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Higashida H, Henson P, Nakanishi Y (2004) Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *The Journal of biological chemistry* **279**: 48466-48476

Mann RK, Beachy PA (2004) Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annual review of biochemistry* **73**: 891-923

McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ (2003) Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Current topics in developmental biology* **53**: 1-114

Megraw TL, Kilaru S, Turner FR, Kaufman TC (2002) The centrosome is a dynamic structure that ejects PCM flares. *Journal of cell science* **115**: 4707-4718

Micchelli CA, The I, Selva E, Mogila V, Perrimon N (2002) Rasp, a putative transmembrane acyltransferase, is required for Hedgehog signaling. *Development* **129**: 843-851

Mirre C, Cecchini JP, Le Parco 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**: 369-376

Mohler J (1988) Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics* **120**: 1061-1072

Morata G, Lawrence PA (1977) The development of wingless, a homeotic mutation of *Drosophila*. *Developmental biology* **56**: 227-240

Mullor JL, Guerrero I (2000) A gain-of-function mutant of patched dissects different responses to the hedgehog gradient. *Developmental biology* **228**: 211-224

Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**: 795-801

Nybo K (2012) Molecular biology techniques Q&A. Western blot: protein migration. *BioTechniques* **53**: 23-24

Olofsson B, Page DT (2005) Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Developmental biology* **279**: 233-243

Pastenes L, Ibanez F, Bolatto C, Pavez L, Cambiazo V (2008) Molecular characterization of a novel patched-related protein in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *Archives of insect biochemistry and physiology* **68**: 156-170

Peel DJ, Milner MJ (1992) The response of *Drosophila* imaginal disc cell lines to ecdysteroids. *Roux's archives of developmental biology* **202**: 23-35

Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A (1998) Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *The Journal of biological chemistry* **273**: 14037-14045

Perens EA, Shaham S (2005) *C. elegans* daf-6 encodes a patched-related protein required for lumen formation. *Developmental cell* **8**: 893-906

Peters C, Wolf A, Wagner M, Kuhlmann J, Waldmann H (2004) The cholesterol membrane anchor of the Hedgehog protein confers stable membrane association to lipid-modified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 8531-8536

Phillips RG, Roberts IJ, Ingham PW, Whittle JR (1990) The *Drosophila* segment polarity gene patched is involved in a position-signalling mechanism in imaginal discs. *Development* **110**: 105-114

Piccin A, Salameh A, Benna C, Sandrelli F, Mazzotta G, Zordan M, Rosato E, Kyriacou CP, Costa R (2001) Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucleic acids research* **29**: E55-55

Rahnama F, Toftgard R, Zaphiropoulos PG (2004) Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *The Biochemical journal* **378**: 325-334

Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM (2009) Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 1760-1765

Reichhart JM, Ligoxygakis P, Naitza S, Woerfel G, Imler JL, Gubb D (2002) Splice-activated UAS hairpin vector gives complete RNAi knockout of single

or double target transcripts in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* **34**: 160-164

Robertson HM, Preston CR, Phillis RW, Johnson-Schlitz DM, Benz WK, Engels WR (1988) A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**: 461-470

Schmid A, Schindelholz B, Zinn K (2002) Combinatorial RNAi: a method for evaluating the functions of gene families in *Drosophila*. *Trends in neurosciences* **25**: 71-74

Schneider I (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology* **27**: 353-365

Schumacher MA, Donnelly JM, Engevik AC, Xiao C, Yang L, Kenny S, Varro A, Hollande F, Samuelson LC, Zavros Y (2012) Gastric Sonic Hedgehog acts as a macrophage chemoattractant during the immune response to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **142**: 1150-1159 e1156

Sears HC, Kennedy CJ, Garrity PA (2003) Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal *Drosophila* CNS morphogenesis. *Development* **130**: 3557-3565

Sharma RP, Chopra VL (1976) Effect of the Wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* **48**: 461-465

Shibuya M, Claesson-Welsh L (2006) Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental cell research* **312**: 549-560

Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, Pietsch T, Wicking C, Wainwright BJ (1999) Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Human molecular genetics* **8**: 291-297

Stronach BE, Renfranz PJ, Lilly B, Beckerle MC (1999) Muscle LIM proteins are associated with muscle sarcomeres and require dMEF2 for their expression during *Drosophila* myogenesis. *Molecular biology of the cell* **10**: 2329-2342

Strutt H, Thomas C, Nakano Y, Stark D, Neave B, Taylor AM, Ingham PW (2001) Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Current biology : CB* **11**: 608-613

Tabata T, Kornberg TB (1994) Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **76**: 89-102

Taipale J, Beachy PA (2001) The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* **411**: 349-354

Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA (2002) Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* **418**: 892-897

Tenzen T, Allen BL, Cole F, Kang JS, Krauss RS, McMahon AP (2006) The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Developmental cell* **10**: 647-656

Tepass U, Fessler LI, Aziz A, Hartenstein V (1994) Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**: 1829-1837

The I, Bellaiche Y, Perrimon N (1999) Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Molecular cell* **4**: 633-639

Tomarev SI (1997) Pax-6, eyes absent, and Prox 1 in eye development. *The International journal of developmental biology* **41**: 835-842

Torroja C, Gorfinkiel N, Guerrero I (2004) Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. *Development* **131**: 2395-2408

Torroja C, Gorfinkiel N, Guerrero I (2005) Mechanisms of Hedgehog gradient formation and interpretation. *Journal of neurobiology* **64**: 334-356

Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, Saier MH, Jr. (1999) The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **1**: 107-125

Wood W, Faria C, Jacinto A (2006) Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of cell biology* **173**: 405-416

Wood W, Jacinto A (2007) *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 542-551

Wright TR (1960) The phenogenetics of the embryonic mutant, lethal myospheroid, in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of experimental zoology* **143**: 77-99

Yan D, Wu Y, Yang Y, Belenkaya TY, Tang X, Lin X (2010) The cell-surface proteins Dally-like and Ihog differentially regulate Hedgehog signaling strength and range during development. *Development* **137**: 2033-2044

Yanagawa S, Lee JS, Ishimoto A (1998) Identification and characterization of a novel line of *Drosophila* Schneider S2 cells that respond to wingless signaling. *The Journal of biological chemistry* **273**: 32353-32359

Yao S, Lum L, Beachy P (2006) The ihog cell-surface proteins bind Hedgehog and mediate pathway activation. *Cell* **125**: 343-357

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 127-137

Yarnitzky T, Volk T (1995) Laminin is required for heart, somatic muscles, and gut development in the *Drosophila* embryo. *Developmental biology* **169**: 609-618

Yasothornsrikul S, Davis WJ, Cramer G, Kimbrell DA, Dearolf CR (1997) viking: identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene* **198**: 17-25

Zhang CX, Hsieh T (2000) Preparation of membrane proteins from *Drosophila* embryos. In *Drosophila Protocols*, Sullivan W AM, Hawley RS (ed), pp 563-569. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Zhu AJ, Scott MP (2004) Incredible journey: how do developmental signals travel through tissue? *Genes & development* **18**: 2985-2997

Zugasti O, Rajan J, Kuwabara PE (2005) The function and expansion of the Patched- and Hedgehog-related homologs in *C. elegans*. *Genome research* **15**: 1402-1410

Zuniga A, Hodar C, Hanna P, Ibanez F, Moreno P, Pulgar R, Pastenes L, Gonzalez M, Cambiazo V (2009) Genes encoding novel secreted and transmembrane proteins are temporally and spatially regulated during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *BMC biology* **7**: 61



## Anexo

### Artículo I

Dada la identificación de *Ptr* como uno de los genes espaciotemporalmente regulados durante el desarrollo temprano de *Drosophila melanogaster* (Zuniga et al, 2009), nos planteamos caracterizar molecularmente la proteína codificada por el mencionado gen con la finalidad de obtener datos particulares acerca de su secuencia que nos permitieran, a su turno, acercarnos a establecer la función que la misma cumple durante la embriogénesis. Asimismo se puso especial énfasis en corroborar, en relación a la características establecidas, la localización subcelular y el comportamiento bioquímico de la proteína deducida. Debido a que estas proteínas constituyen un grupo conservado a través de la evolución (Zugasti et al, 2005) y con la finalidad de expandir o unificar la potencial función establecida, parte de los estudios también fueron conducidos en *Apis mellifera*.

Los resultados expuestos en el artículo adjunto demuestran que *Ptr* se encuentra tempranamente regulado, siendo preferentemente expresado entre los estadios 5-8 del desarrollo. Su secuencia codifica una proteína con 1169 aminoácidos que presenta 12 alfa hélices putativas transmembrana, cinco de las cuales constituyen el SSD. Por su parte, la comparación filogenética revela que la proteína *Ptr* de *Drosophila* pertenece a una clase divergente y previamente no caracterizada de proteínas-SSD de insectos. Asimismo los resultados obtenidos por medio de los estudios bioquímicos apoyan los datos de secuencia, al localizar a la proteína asociada a membrana encontrándose la inmunoreactividad en embriones tempranos relacionada con los sitios donde ocurre la formación de los surcos de segmentación durante el proceso de celularización. Estos resultados fueron respaldados por los estudios realizados en células S2+ que expresan la proteína de fusión *Ptr-V5*, donde un anticuerpo que reconoce el tag de la misma (V5), localiza a *Ptr* tanto en la superficie como en el citoplasma celular. El patrón puntillado y disperso que presenta esta última localización es sugerente de su asociación a la membrana de vesículas.

Durante el desarrollo de este trabajo participé de la generación del anticuerpo policlonal anti-*Ptr* utilizando como antígeno un proteína de fusión con histidinas así como de la localización de la proteína en fracciones enriquecidas de membrana por western blot y en preparaciones *whole-mount* de embriones tempranos de *Drosophila*. La obtención de estos resultados requirió de mi adiestramiento en técnicas o protocolos que me habilitarán a la



generación de anticuerpos y la puesta a punto de las condiciones de utilización del anticuerpo generado para western blot e inmunofluorescencia para finalmente obtener un resultado confiable y reproducible.

En relación con los objetivos de la tesis previamente expuestos, los datos recogidos permiten contestar parcialmente el primer objetivo *específico* (OE1): Analizar el patrón de expresión y localización subcelular de la proteína Ptr durante la embriogénesis normal de *Drosophila melanogaster*. Este objetivo se terminó de concluir con los datos incorporados en el artículo que se encuentra a continuación y que se publicó en la revista Archives of Insect Biochemistry and Physiology.

## Artículo II

Debido a que el suero policlonal utilizado en los experimentos detallados en el primer artículo se estropeó, tuvimos la necesidad de desarrollar un segundo anti-suero usando esta vez la proteína recombinante fusionada a GST. Cabe la pena mencionar que en ambas oportunidades el fragmento de Ptr clonado y expresado fue el mismo, cambiándose solamente el vector en el cual se clonó para lograr una mayor eficacia en producción de la proteína recombinante y facilitar los pasos siguientes de purificación e inoculación.

El anticuerpo policlonal generado se utilizó en una primera instancia para mapear la distribución de Ptr a lo largo de la embriogénesis de *Drosophila* y en relación a la distribución de Ptc. Los resultados obtenidos indican que, en los estadios más tempranos del desarrollo, Ptr exhibe una distribución semejante a Ptc, mientras que a partir de la retracción de la banda germinal (estadio 11) aparecen zonas restringidas con alto contenido en Ptr. La distribución y aspecto de la señal obtenida fue sugerente de su correspondencia con la presencia de los hemocitos. Por este motivo se procedió a corroborar este punto realizando inmunodetecciones dobles utilizando anticuerpos anti-Ptr y anti-beta Galactosidasa en embriones obtenidos del cruce hembras vírgenes UAS-*lacZ* y machos *Crq*-Gal4.

Asimismo se generó un alelo mutante del gen *Ptr* promoviendo la delección parcial o total del gen mediante la movilización de un elemento P, denominado PSUPor-P, el cual se encuentra adyacente al extremo 5'-UTR predicho de Ptr en moscas de la línea PSUPor-PKG01682. Esta cepa fue cruzada con moscas que portan la transposasa  $\Delta 2-3$  (se adjunta el esquema del cruce), la cual reconoce los sitios P del vector y lo escinde del ADN genómico (ADNg). En la mayoría de los casos esta escisión se realiza de manera precisa dejando la secuencia original del cromosoma intacta; en otros deja un trozo de vector o produce la remoción de parte del ADNg adyacente al mismo. Este último tipo de evento denominado escisión imprecisa provoca delecciones alrededor del sitio original de inserción del elemento P y ocurre aproximadamente en el 1% de los casos (Adams & Sekelsky, 2002). Los descendientes de este primer cruce fueron cruzados con moscas que portan cromosomas balanceadores con la finalidad principal de mantener aquellas mutaciones que sean letales. Los eventos de escisión que conllevan la pérdida del elemento P son reconocidos en esta etapa por la pérdida del gen marcador mini-white localizado en el vector y que produce descendientes con ojos de color blancos. Estas moscas fueron cruzadas individualmente con cepas que

portan cromosomas balanceadores, estableciéndose en cada caso una línea que representa un evento único de escisión del vector. En el transcurso de este trabajo se obtuvieron un total de 408 líneas, 44 de ellas no presentaron homocigotos adultos viables y fueron las primeras en ser caracterizadas. La caracterización se realizó mediante PCR utilizando ADNg de individuos homocigotos de cada línea. La estrategia de análisis abarcó una serie de pasos secuenciales que pueden resumirse de la siguiente forma: 1) determinación de la permanencia del vector en el ADNg mediante la amplificación con cebadores específicos del elemento P y cebadores específicos del gen *Ptr*, 2) determinación de la presencia/ausencia del gen *Ptr* en ADNg amplificándolo con cebadores específicos para el gen, 3) en el caso de detectar líneas con eventos de escisión imprecisa se procedió a determinar la extensión de la deleción utilizando diferentes parejas de cebadores. La línea denominada 23C evidenció la presencia de un evento de escisión imprecisa con remoción 3852 pb adyacentes al elemento P, corroborándose la ausencia de ARNm de *Ptr* por medio de RT-PCR. Las inmunodetecciones realizadas utilizando embriones de esta línea confirmaron la ausencia de señal por parte del anticuerpo  $\alpha$ -*Ptr* generado, hecho que permite avalar la especificidad de la señal obtenida en hemocitos.

En su conjunto los hallazgos realizados permiten especular acerca la función de *Ptr* en relación con los hemocitos y los importantes procesos en los cuales participan tales como fagocitosis de los cuerpos celulares apoptóticos, formación de tejidos embrionarios (por ejemplo, intestino y sistema nervioso), depósito de matriz extracelular y remodelación de los órganos durante la metamorfosis.

Como mencionaba anteriormente, estos resultados permiten completar el OE1, así como también aportar más datos a los ya obtenidos al OE4. Mi participación en el presente trabajo ha sido extensa habiendo estado involucrada con el diseño, desarrollo y el análisis de la mayor parte de los experimentos. Los resultados fueron enviados recientemente a la revista *Gene Expression Patterns* y aceptados para ser publicados.

### Artículo III

Dadas las similitudes de topología y de organización de dominio que presenta *Ptr* con respecto a *Ptc*, el receptor conocido de la vía de Hh, nos preguntamos si *Ptr* podría estar actuando como un receptor alternativo de la vía de señalización gatillada por el mencionado morfógeno. Se llevaron a cabo ensayos reportero utilizando cultivo celulares. Estos ensayos, desarrollados por el grupo liderado por Philip Beachy, son cuantitativos y han sido exitosamente usados para identificar nuevos componentes de la vía de Hh (por ej, *lhog*) (Lum et al, 2003; Yao et al, 2006). El ensayo cuenta con la ventaja adicional de utilizar Hh exógeno, por lo cual también resulta ser independiente de la síntesis o distribución del ligando. La base del ensayo es la transfección de células derivadas de disco imaginal de ala (*cl-8*) con un reportero control y un reportero ligado a luciferasa que es capaz de responder a Hh. Con la misma finalidad y a efectos de evaluar la función del gen *Ptr* en el desarrollo de *Drosophila* se realizaron esfuerzos para analizar los efectos obtenidos por la pérdida de la expresión del gen abordando dos estrategias: la generación de un mutante por delección del gen *Ptr* y el silenciamiento del mismo mediante ARNi.

Los resultados obtenidos permiten sugerir que *Ptr* es capaz de responder a la presencia de Hh siendo su actividad similar a la de un regulador negativo de la misma, ya que no solo se obtiene un aumento moderado de la respuesta al transfectar las células con ARNs específicos para *Ptr*, sino que también existe una drástica disminución de la respuesta cuando ocurre la sobreexpresión de la proteína. Por su parte el análisis epistático realizado en relación a otros componentes de la vía, sitúa a *Ptr* por debajo o en el mismo nivel de acción que *Ptc* y por encima y/o independientemente de *Smo* e *lhog*.

Dados los resultados expuestos se evaluó la posibilidad de interacción entre *Ptr* y Hh realizando ensayos de inmunoprecipitación. En éstos se utilizó como muestra de partida extractos celulares de *cl8* que sobreexpresan la proteína de fusión *Ptr-V5* preincubados con medio condicionado enriquecido en ligando. Dado que tanto *Ptr* como Hh son detectados en el complejo inmunoprecipitado utilizando un anticuerpo anti-V5, se deduce una interacción directa entre ambas proteínas.

Se analizó el fenotipo cuticular de las líneas nulas para el gen *Ptr* generadas anteriormente, detectándose en embriones no eclosionados la presencia de alteraciones cuticulares

concordantes con que la ausencia de *Ptr* estuviera interfiriendo con la vía de señalización de Hh.

Por otra parte se generaron moscas transgénicas UAS-RNAi-*Ptr* utilizando un vector que porta UAS con un inserto que corresponde a la secuencia del primer exón del gen *Ptr* repetida de forma invertida. Esta construcción al expresarse forma una horquilla de ARNs dirigido contra el transcrito del gen (Dietzl et al, 2007). Estas moscas transgénicas se cruzaron con cepas GAL4: *nanos*-Gal4, *mata*-GAL4 o *ptc*-GAL4 para que el transgen codificante de la horquilla sea expresado en todo el embrión a partir de estadios tempranos del desarrollo o en el patrón espacio-temporal correspondiente a la expresión endógena de *ptc*. Los controles se llevaron a cabo cruzando las cepas GAL4 mencionadas con una cepa UAS-lacZ. Asimismo se verificó por QPCR que el silenciamiento del gen *Ptr* fue realizado exitosamente, estableciéndose una disminución de un 80% en la abundancia del transcrito *Ptr*. Por su parte el examen de las cutículas de embriones tardíos no eclosionados evidenciaron la presencia de fusiones en los cinturones de dentículos similares a los observados en el mutante de pérdida de función del gen.

El conjunto de las evidencias obtenidas utilizando diferentes aproximaciones *in vivo* e *in vitro* nos permiten sugerir que *Ptr* podría estar actuando en la vía de señalización gatillada por Hh, pudiendo ser un co-receptor junto con *Ptc* o como un receptor alternativo de la misma. El manuscrito que se encuentra a continuación y que contempla los resultados expuestos en mayor detalle, dan contestación a los objetivos específicos restantes de la presente tesis (OE2, OE3, OE4). El mismo fue enviado a la revista BMC Developmental Biology para su publicación. De la misma forma que en el artículo anterior, no solo realicé el diseño, desarrollo y análisis de la mayor parte de los experimentos involucrados en este manuscrito, así como también fui responsable directo de su redacción.

# Molecular Characterization of a Novel Patched-Related Protein in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*

Luis Pastenes,<sup>1</sup> Freddy Ibáñez,<sup>1</sup> Carmen Bolatto,<sup>2</sup> Leonardo Pavéz,<sup>1</sup> and Verónica Cambiazo<sup>1\*</sup>

The molecular identification and characterization of the *patched-related* (*ptr*) gene and protein in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster* are reported. Ptr proteins are closely related in predicted topology and domain organization to the protein encoded by the *Drosophila* segment polarity gene *patched*. Ptrs have 12 potential transmembrane domains arranged in two sets of 1+5 membrane-spanning segments containing a conserved sterol-sensing domain (SSD) and functional GxxxD and PPXY motifs. Phylogenetic analysis showed that Ptrs belong to a previously uncharacterized class of insect proteins that share a high level of sequence identity. Analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) indicates that *ptr* gene is preferentially expressed during embryo stages of *A. mellifera* development; interestingly, this pattern of temporal expression was also observed for the *D. melanogaster* homologue, suggesting that these proteins might be involved in embryo morphogenesis. To understand Ptr function at the molecular level, we investigated the subcellular distribution of *DmPtr*. We have shown by biochemical analysis that *DmPtr* protein is tightly associated with membranes. Consistently, Ptr immunoreactivity appears to be localized at the sites of membrane furrow formation during cellularization of *D. melanogaster* embryos. These studies indicated that Ptrs belong to a previously uncharacterized class of insect transmembrane proteins that share a high level of sequence identity. Our analysis of *ptr* gene expression and protein localization suggest that Ptr might fulfil a developmental role by participating in processes that require growth and stabilization of plasma membrane. Arch. Insect Biochem. Physiol. 68:156–170, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

KEYWORDS: *Apis mellifera*; sterol-sensing domain; patched-related; membrane protein; *D. melanogaster*

## INTRODUCTION

The membrane protein Patched (Ptc) and its ligand, the cholesterol-modified morphogen Hedgehog (Hh), control numerous processes during embryonic development. In *Drosophila*, Ptc and Hh specify cell fate in the developing embryo and along the anteroposterior (A/P) axis of the adult wing. During vertebrate development, Ptc is involved in neural tube differentiation and axon guidance (Ingham and McMahon, 2001). In hu-

mans, dysfunction of Hh–Ptc signaling is associated with a variety of malignancies (Ingham, 1998). Biochemical and genetic studies indicate that upon binding to Hh, Ptc relieves the inhibition of the activity of another membrane protein, Smoothed (Smo), which transduces the Hh signal to downstream effectors (Hooper and Scott, 1989). Ptc proteins have been identified in a number of species, and their roles in Hh signal transduction appear to be conserved.

Ptc is proposed to contain 12 potential trans-

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, INTA, Universidad de Chile, Macul 5540, CP 138-11, Santiago, Chile

<sup>2</sup>Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, General Flores 2125, CP 11800, Uruguay

Contract grant sponsor: Fondecyt; Contract grant number: 1050235; Fellowship sponsors: CSIC-Programa de Recursos Humanos; Universidad de la República; AMSUD Pasteur-Regional Training Fellowship Program.

\*Correspondence to: Verónica Cambiazo, Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, INTA, Universidad de Chile, Macul 5540, CP 138-11, Santiago, Chile. E-mail: vcambiaz@inta.cl

Received 27 September 2007; Accepted 12 February 2008

membrane domains (Hooper and Scott, 1989), five of which comprise a putative 180-amino acid sterol-sensing domain (SSD) (Carstea et al., 1997; Loftus et al., 1997). A common feature shared by many SSD-containing proteins is their participation in processes that involve the transport of lipids, sterols, or sterol-modified proteins (Kuwabara and Labouesse, 2002). This domain was initially identified in HMG-CoA reductase (HMGCR) and SREBP cleavage activating protein (SCAP), two proteins involved in sterol synthesis and sterol-dependent transcription, respectively (Hampton, 2002). Additional SSD-containing proteins are Niemann-Pick disease type C1 (NPC1) with functions in cholesterol trafficking (Carstea et al., 1997) and Dispatched (Disp), a protein that shares sequence similarity to Ptc and facilitates the release of Hh from Hh-producing cells (Burke et al., 1999).

Recently, a group of membrane proteins, the Patched-related (Ptr), were characterized in *Caenorhabditis elegans* (Kuwabara and Labouesse, 2002). They are closely related in predicted topology to Ptc and Disp and share the greatest sequence similarity within their putative SSDs. Studies using dsRNA-mediated interference suggested that several of the *C. elegans* Ptrs are involved in development processes, including cell growth, patterning, and molting (Zugasti et al., 2005). Functional analysis of *C. elegans* Ptc-1 and Ptrs has revealed that they play essential roles in germline cytokinesis, as well as in different morphogenetic processes that involve vesicle trafficking (Kuwabara et al., 2000; Michaux et al., 2000; Zugasti et al., 2005; Perens and Shaham, 2005). Considering the fact that *C. elegans* lacks the components of the Hh signal transduction pathway, it has been proposed that Ptc-1 and Ptrs perform functions that differ from those previously assigned to Ptc and Disp, among them, the regulation of lipid transport and vesicle trafficking during development (Zugasti et al., 2005; Perens and Shaham, 2005).

Since Ptrs appear to be conserved through evolution (Zugasti et al., 2005), studies can be performed with a variety of model organisms to expand or unify their possible action models. In this regard, we have isolated a *D. melanogaster ptr*

gene (*Dmptr*) in a subtractive hybridization screening designed to identify genes that are differentially expressed at early stages of embryogenesis (González-Agüero et al., 2005). We have cloned the full-length cDNA of *Dmptr* and deduced that the product is a 1,169-amino acid protein with 12 putative transmembrane alpha helices and a SSD conserved domain. When we compared the amino acid identity of the whole protein and the SSD domain among SSD-containing proteins from different species of insects and vertebrates, we found that *DmPtr* belongs to a divergent, previously uncharacterized, class of insect Ptr proteins. In the present study, we extend the analyses of these novel SSD-containing proteins by cloning and characterizing a full-length cDNA encoding a Ptr protein from *A. mellifera* (*AmPtr*). We show that the expression of *ptr* genes from both species is developmentally regulated, being preferentially expressed in embryo stages. Moreover, biochemical analysis revealed that, consistent with our protein sequence prediction, Ptr was found to be associated with embryo membranes, whereas immunohistochemistry analyses allowed us to localize this protein to the growing plasma membranes of newly forming cells in early *D. melanogaster* embryos. Additional studies that are currently in progress will help us to understand Ptr function during development in *D. melanogaster* and to increase our understanding of the mechanisms that regulate cellular activities of insect Ptrs.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental Insects

Embryos, larvae, pupae, and adult workers of Africanized *A. mellifera* were collected from hives of the experimental apiary of the National Institute of Agropecuary Research, Santiago, Chile. Developmental stages were determined according to criteria established by Jean-Prost (1987). Specimens were washed with 0.1% Ringer-Triton solution (182 mM KCl, 46 mM NaCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM Tris-HCl, pH 7.2), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. *D. melanogaster* embryos

and larvae were handled and staged as described in González-Agüero et al. (2005).

### RNA Extraction and cDNA Synthesis

Total RNA was extracted using the TRI Reagent Kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of the RNA were assessed by spectrophotometry (OD 260/280) and by electrophoresis on 1.2% (w/v) formaldehyde-agarose gels. Single-strand cDNA was synthesized in a standard reverse transcription reaction, using 200U M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) and 0.5 µg oligo(dT)<sub>15</sub> (Promega). This cDNA was used as template for both standard and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assays.

### *Ampt*r and *Dmpt*r cDNA Cloning

Putative *A. mellifera ptr* cDNAs were identified by Blast analysis, using *D. melanogaster Ptr* (*DmPtr*, GenBank accession number NM\_136365) as the protein input. Two putative cDNAs (GenBank accession numbers NW\_055478 and NW\_048484), initially named *Ampt*r1 and *Ampt*r2, with amino acid sequence similarity to the N- and the C-terminal of *DmPtr*, were found. PCR primers (s1: 5'-CGTCAA-GATGCGATAGGAGC-3', and a1: 5'-TATTCTCCG-CTTACTACCACCTGT-3') were designed to test whether *Ampt*r1 and *Ampt*r2 were part of a single transcript. RT-PCR reactions using total RNA from *A. mellifera* embryos as template produced a single PCR product (1,025 bp) that was isolated, cloned into pGEM-T Easy vector (Promega), and sequenced. The resulting composite cDNA sequence (*Ampt*r, 2,620 bp) was assembled from the *Ampt*r1, the *Ampt*r1-*Ampt*r2 amplicon, and *Ampt*r2 sequences and used to design gene-specific primers for 5'- and 3'-RACE PCR.

*Dmpt*r was amplified by long-distance RT-PCR with the gene-specific primers, using Advantage 2 PCR mix (Clontech, Mountain View, CA). As template total RNA isolated from stage 6–7 embryos was used. A single band of ~3,500 bp, that matched the size of the predicted coding sequence, was iso-

lated from the gel, subcloned into pGEM-T Easy vector (Promega), and sequenced.

### 5'- and 3'-RACE PCR

The 5'- and 3'-ends of the *Ampt*r transcript were amplified using the RLM-RACE GeneRacer™ kit, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA). Briefly, 5 µg of total RNA from *A. mellifera* embryos was used as the starter material. For 5'-end amplification, the adaptor-ligated cDNA was PCR amplified using Advantage-2 Polymerase Mix (Clontech), GeneRacer™ 5' Primer and 10 µM of Gene-Specific Primer a2 (5'-GACGCA-AACCTGGCAGTGGTAATG-3') under the following conditions: 2 min at 94°C, 5 cycles of 30 s at 94°C and 40 s at 72°C, 5 cycles of 30 s at 94°C and 40 s at 70°C and 25 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 65°C and 40 s at 68°C. The resulting PCR products were used in a Nested PCR reaction with GeneRacer™ 5' Nested Primer and the Gene-Specific Primer a2. The Nested PCR program comprises 2 min at 94°C and 25 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 65°C and 2 min at 68°C. The PCR product (1,100 bp) was cloned into pGEM-T Easy vector and sequenced. For 3'-end amplification, the same adaptor-ligated cDNA was amplified using GeneRacer™ 3' Primer, the Gene-Specific Primer s2 (5'-AGGCGTCCT-CTATGGAATGTCTC-3') and the same PCR enzyme and programs. The resulting PCR product (650 bp) was cloned into pGEM-T Easy vector and sequenced.

### qPCR Assays

Samples of cDNA from *A. mellifera* at different stages of development were produced as described later, in the section on RNA Extraction and cDNA Synthesis. To normalize *A. mellifera* data, a spike RNA was in vitro transcribed from the vector pGIBS-*dap* (ATCC 87486) and added to the total RNA prior to cDNA synthesis in a 1:1000 ratio. Specific primers for *Ampt*r (s3: 5'-TTACAATCC-TACCGACAACC-3', and a3: 5'-TTCTCCGCTTAC-TACCACCT-3') and *dap* (ds1: 5'-TTGCATTAGAGC-ACGGAGTC-3' and da1: 5'-GCGTATCTGAAGCGT-TTGG-3') were designed using Primer Premier 5.0



software (BioSoft International, Palo Alto, CA). Reactions were monitored by using LightCycler 1.5 Instrument (Roche, Basel, Switzerland) and LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche). A standard curve was generated for *Amptr* and *dap* based on serial dilutions ( $10^1$ – $10^{-2}$  pg/ $\mu$ l) of plasmid templates. The thermal cycle conditions were: Pre-incubation at 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 3 s, 57°C for 10 s, and 72°C for 25 s. The purity of amplified products was verified by melting curves analysis. Control reactions included a subset of PCR components lacking the cDNA template. The initial amount of *Amptr* in each sample was calculated from the standard curve, using the default (fit point/arithmetic) method of LightCycler Software Version 3.5 (Roche) and normalized to the values of *dap*. Data represent the averaged of two experimental replicates from two independent sets of samples.

### Northern Blot Analysis

Total RNA (10  $\mu$ g) from *D. melanogaster* staged embryos and third-instar larvae was fractionated in 1% (w/v) agarose gels containing 6% (v/v) formaldehyde. Northern transfer, membrane hybridization, and washing were carried out as described by González-Agüero et al. (2005). A *Dmptr* probe (650 bp) was labeled with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP, using the random primer labeling method (Invitrogen). Blots were stripped and re-hybridized with a 540-bp-labeled fragment of *ribosomal protein 49* (*rp49*) cDNA. Blots were exposed to phosphor screens and scanned with a phosphorimaging instrument (Molecular Imager FX; Bio-Rad, Hercules, CA). Relative hybridization levels were determined by densitometry using the Quantity One software (Bio-Rad).

### Antibody Production

An 825-bp fragment of *Dmptr* cDNA of the deduced amino acid sequence was PCR amplified and cloned into pTrcHis2Topo vector (Invitrogen). The resulting histidine-tagged protein was purified using Ni-NTA agarose (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and employed to gen-

erate an antiserum in rabbits following the protocol described by Knudsen (1985). Freund's complete and incomplete adjuvants were used for the primary immunization and for subsequent boosts, respectively. Pre-immune and immune sera were affinity purified against the *DmPtr* fusion protein, previously subjected to SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose. After staining the nitrocellulose with Ponceau S to visualize the protein, the appropriate band was cut out and incubated with the antiserum overnight at 4°C. The nitrocellulose strip was washed four times with 20 mM Tris pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween-20, and bound antibodies were eluted from the strips with 100 mM glycine (pH 3.0); the eluted fraction was neutralized with one-tenth volume of Tris 1 M (pH 8.0). On Western blots of embryo extracts, a single band corresponding to the calculated size of *DmPtr* was detected at a dilution of 1:1000.

### Transfection and Immunofluorescent Staining of S2R<sup>+</sup> Cells

Primers specific for the *Dmptr* transcript were used to create a PCR product encompassing the entire open reading frame (ORF). The product was cloned into the pMT/V5-His-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced to confirm its identity. The plasmid was then used for the transient transfection of S2R<sup>+</sup> cells under conditions of Cu<sup>2+</sup>-inducible expression. Cells were cultured in Schneider's *Drosophila* Medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. For transient transfections,  $3 \times 10^6$  cells were cultured in 35-mm culture dishes for 24 h and then transfected with 3  $\mu$ g of vector DNA by using Cellfectin Reagent according to standard techniques (Invitrogen). Expression of *DmPtr* construct was induced 48 h post-transfection by adding CuSO<sub>4</sub> to a final concentration of 0.5 mM to the cell medium. At 24 h later, induced and uninduced (control) cells were harvested and transferred onto coverslips for 4 h before fixing with 4% paraformaldehyde. Cells were permeabilized with phosphate-buffered saline (PBS), 0.1% saponin for 15 min and then blocked with PBS, 5%

BSA, 0.1% saponin for 45 min before incubation with mouse monoclonal anti-V5 antibody (1:500, Sigma). Cells were washed three times in PBS, 0.1% saponin, and incubated with the secondary antibodies: anti-mouse Alexa Fluor 488 (1/500, Molecular Probes, Eugene, OR). Alexa Fluor 546 phalloidin (1:200, Molecular Probes) was used to stain F-actin. Confocal images were collected using a Confocal Laser Scanning Microscope-510 META (Zeiss) and processed using LSM Image Browser software (Zeiss) and Adobe Photoshop 7.0. The pinhole diameters for each fluorescence channel were set between 1.3–1.4  $\mu\text{m}$ . All images were taken using objective Plan-Apochromat 63 $\times$ /1.4 Oil at 1,024-pixel resolution.

### ***DmPtr* Immunolocalization in Embryos**

*D. melanogaster* (Canton S) embryos at cellular blastoderm stage were collected as described in González-Aguero et al. (2005). Embryos were dechorionated using 50% commercial bleach solution in PBS, 0.03% Triton X-100. Embryos were fixed in a 1:1 mixture of heptane and 4% formaldehyde for 90 min, vitelline membranes were removed by the hand-peeling procedure (Rothwell and Sullivan, 2000), and then embryos were postfixated in 4% paraformaldehyde for 30 min. Embryos were incubated at 4°C for 16–18 h in blocking solution containing 3% BSA, 0.1% Triton X-100, 50 mM glycine in PBS, and then incubated in *DmPtr* affinity-purified antibody, diluted 1:25. After overnight incubation at 4°C with primary antibody, the samples were incubated for 1 h with Alexa Fluor 546  $\alpha$ -rabbit (1:200, Molecular Probes) antibodies. FITC-conjugated phalloidin (1:200, Sigma) was used to stain F-actin. All the confocal images were obtained and processed as described above. Affinity-purified pre-immune serum does not generate a visible signal (data not shown).

### **Membrane Association Analysis**

In this analysis, 4-h collections of embryos were dechorionated, rinsed, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . A membrane fraction was prepared from 1.5 g of fro-

zen embryos using equilibrium sedimentation in a sucrose density step gradient as described by Zhang and Hsieh (2000). To examine whether *DmPtr* was an integral or peripheral membrane protein, the membrane fraction was treated with PBS, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 10.0 or 1% (v/v) NP-40 in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 for 30 min, and then centrifuged at 30,000g at 4°C for 30 min to generate supernatant and pellet fractions. The pellets were solubilized in SDS sample buffer, and the supernatants were lyophilized, followed by solubilization in SDS sample buffer. Both fractions were analyzed on SDS-PAGE and Western blot (Harlow and Lane, 1999), using the anti-*DmPtr* antibody, diluted 1:1000. As a control of membrane fraction identity we checked for the presence of *D. melanogaster* Ptc in our membrane preparations using a monoclonal anti-Ptc antibody (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

### **Bioinformatics**

Initial sequence homology searches were done against honey bee genome (all assemblies) sequence database, using the Blastn and Blastx programs at NCBI. Homologous protein sequences from various invertebrate and vertebrate species, derived as best matches to *D. melanogaster* Ptr, Ptc and Disp protein sequences, were acquired by using NCBI, FlyBase, and BeeBase databases and Blast tools. Domain-based analyses using SMART and InterPro, protein topology, and hydropathy were predicted by using HMMTOP v.2.0. BioEdit v.7.0 software was used to perform a multiple sequence alignment, using ClustalW. A parsimony analysis of the protein sequence alignment was performed using PAUP\* v.4.0b10. Bootstrap analyses were conducted using 1,000 resampling. Accession numbers for all genes used for phylogenetic analysis are shown in Figure 2.

## **RESULTS**

### **Molecular Characterization of *AmPtr* and *DmPtr***

We began a characterization of the *AmPtr* gene by obtaining a full-length cDNA sequence. In do-

ing so, we Blast searched the *A. mellifera* cDNA sequences at NCBI using the deduced amino acid sequence of *Drosophila ptr* (*DmPtr*, 1,169 aa; GenBank accession number NM\_136365) as input. The analysis revealed a high sequence identity with two putative cDNAs, named as *AmPtr1* and *AmPtr2*. When the deduced *AmPtr1* and *AmPtr2* amino acid sequences were compared to that of *DmPtr*, we observed that *AmPtr1* showed a 58% of identity with 479 aa from the C-terminal end of *DmPtr*, while *AmPtr2* showed 60% of identity with 317 aa from the N-terminal end of *D. melanogaster* protein, suggesting that *A. mellifera* cDNAs might be part of a single transcript. Following amplification of *A. mellifera* embryo cDNA with primers designed from the nucleotide sequences of *AmPtr1* and *AmPtr2*, we obtained a single PCR product of 1,025 bp. After cloning and sequencing of the PCR product, a composite cDNA sequence of 2,650 bp was assembled and used to design the specific primers for 5'- and 3'-RACE PCR assays. RACE analysis allowed us to identify a single *AmPtr* transcript of 3,825 bp that was also detected by Northern analysis (data not shown). This full-length cDNA containing an ORF of 3,141 bp, starting at nucleotide 308 and ending at nucleotide 3,448, encodes a predicted protein of 1,047 amino acid residues (GenBank accession number EF442429); the stop codon was located 351 bp upstream of the poly(A) tail, and no usual polyadenylation (AAUAAA) signal was found. The intron/exon organization of the *AmPtr* locus was deduced by comparing the full-length cDNA to the corresponding genomic sequence. A Blast search in the *A. mellifera* genome at NCBI database revealed that our *AmPtr* cDNA sequence had a perfect match to exonic sequences of contig *AmeLG8\_WGA353\_4* (GenBank accession number NW\_001253519), which contains the full-length genomic structure for *AmPtr* (26,692 nucleotides). Comparative analysis of the full-length cDNA and the genomic sequence permitted characterization of 9 exons separated by 8 introns.

Hydropathy analysis estimated that *AmPtr* and *DmPtr* have 12 potential transmembrane (TM) domains and a putative SSD, which consists of 158

amino acids that form five consecutive membrane spanning domains (Fig. 1). The predicted topology of *Ptrs* is similar to that calculated for *Ptc*, *Disp*, and *C. elegans* *Ptr* proteins (Kuwabara and Labouesse, 2002), including a long C-terminal intracellular tail and large extracellular loops between TM segments 1 and 2 and 7 and 8. The deduced amino acid sequence of these proteins contain important conserved motifs common to SSD-containing proteins (Fig. 1), such as GxxxD motifs present in the middle of the TM4 and TM10 (Taipale et al., 2002) and a PPXY found in the C-terminal of *Ptrs* from *A. mellifera*, *N. vitripennis* and three *Drosophila* species, which might be a target for ubiquitin ligases (Hicke and Dunn, 2003).

When we compare the amino acid sequence of *AmPtr* and *DmPtr* with *C. elegans* *Ptr-10* and *Ptr-2* low level of sequence identities (averaged 23%) were detected even within the conserved SSD regions (34%). However, a screening for *Ptr* homologues at NCBI, Flybase, and Beebase databases retrieved predicted insect gene products with a high percentage of identity (averaged 56%) to *AmPtr* and *DmPtr* (Fig. 1). *Ptr* homologues share a 12-pass modular topology, the presence of an SSD, and putative functional domains such as GxxxD, suggesting that *Ptr* structures are highly conserved among insect species. Then, we asked whether the sequence of the SSD was conserved between the structurally related insect SSD-containing proteins, *Ptc*, *Disp*, and *Ptrs*. Sequence comparisons between the SSD from insect *Ptrs* with equivalent domains from *Ptc* and *Disp* proteins only reach average values of 20% of identity (data not shown). Moreover, pairwise comparisons between complete *Ptr* proteins and *Ptc* and *Disp* from *A. mellifera* and *D. melanogaster* reveal low identity values (between 10.1% and 13.6%). A phylogenetic analysis based on 68 *Ptc*, *Disp*, and *Ptr* protein sequences from various invertebrates and vertebrates species, resolved three separate clades of proteins and further indicated the closer sequence relationships *Ptr* proteins from insect species (Fig. 2). Thus, this result suggests that *Ptrs* belong to a new class of insect SSD-containing proteins.







## Expression Pattern of *Amptr* and Its Homologue *Dmptr*

To examine the expression of *Amptr*, we performed quantitative PCR analyses by using RNA preparations from different developmental stages of *A. mellifera*. As shown in Figure 3A, the relative expression level of *Amptr* reached its highest value in embryonic stages and markedly decreased in 4-day larvae, remaining at low levels in pupae and adults. This result indicates that *Amptr* is transcriptionally regulated during the life cycle of *A. mellifera* and suggest its possible involvement in *A. mellifera* embryogenesis. Next, we evaluated whether the *D. melanogaster* homologue of *Amptr* exhibited a similar pattern of developmental expression. Northern blot analysis (Fig. 3B) revealed that *Dmptr* transcript was undetectable in preblastoderm embryos (stages 2–3). In 5 and 6–8 embryonic stages, the abundance of the transcript dramatically increases; interestingly, this is a period during which key morphogenetic process take place to cellularize the embryo and initiate gastrulation. *Dmptr* transcript levels declined sharply in 9–12-stage embryos and remain low throughout the rest of embryogenesis and in the third-instar larvae, indicating that embryonic levels of *Dmptr* transcript are subject to strong temporal regulation.

The higher level of *Dmptr* gene expression at cellularization led us to hypothesize that this gene might play a role during early embryo development. For an indication of its function, we examined the distribution of the protein by immunofluorescence and confocal microscopy. The distribution of

*DmPtr* protein during cellularization of the embryo (stage 5) was analyzed using a polyclonal antibody raised against *DmPtr* (see Materials and Methods). Double immunofluorescence analyses were performed by staining the embryos with the anti-*DmPtr* antibody and FITC-phalloidin to label actin filaments (F-actin), which are located in close apposition to the cell membranes during embryo cellularization. Sagittal views of the embryo during the first or slow phase of cellularization reveal that *DmPtr* immunoreactivity is mainly detected in the apical domain of the newly forming cells and to a moderate extent, is present along the growing plasma membranes (Fig. 4A), giving rise to a honeycomb pattern that can be observed in transversal focal sections of the cellular blastoderm surface (Fig. 4B). F-actin-rich cortical layer covers the whole surface of the embryo and clearly marks the ingrowing membranes (Fig. 4A',B'). During the second or fast phase of cellularization, *DmPtr* immunoreactivity is observed on the growing lateral membrane, which extended downward from the cell surface and enclosed each nucleus within a long columnar cell (Fig. 4C–C', arrowheads), whereas in the apical cellular domain the immunoreactivity appears to be localized to the cytoplasm and/or to cytosolic vesicles of uniform size evenly distributed between the cell apices and the nuclei (Fig. 4C). *DmPtr* staining was not detected in the basal constrictive rings where F-actin concentrates at this phase of cellularization (Fig. 4C', arrows). Before cellularization, we did not detect *Ptr* immunoreactivity at a level that was above background. Thus, our observations of protein distribution are consistent with the idea that *DmPtr* might have a role during embryo cellularization.

## Subcellular Distribution of *DmPtr*

As *Ptr* proteins are predicted to contain 12 transmembrane spans, they should be localized either to the cell surface or to a membranous cellular compartment. To test the subcellular distribution of *Ptr*, we performed cellular fractionation experiments with early *D. melanogaster* embryos, since we could detect the *D. melanogaster* protein in the

Fig. 1. Comparison of the structures of insect SSD-containing proteins. Protein sequence alignment of selected insect *Ptrs*, including *A. mellifera* (EF442429 Am), *N. vitripennis* (XM\_001602890 Nvi), *A. aegypti* (XM\_001652962 Aa), *T. castaneum* (XM\_964117 Tc), *A. gambiae* (XM\_311553 Ag), *D. melanogaster* (NM\_136365 Dm), *D. pseudoobscura* (GA18464 Dp), and *D. virilis* (GJ20884 Dv). Sequence similarities are shown by the intensities of the gray background. Protein features are shown as follows: red bars, transmembrane domains; blue bars, SSD; yellow open box, GxxxD motif; green line, PPXY motifs.

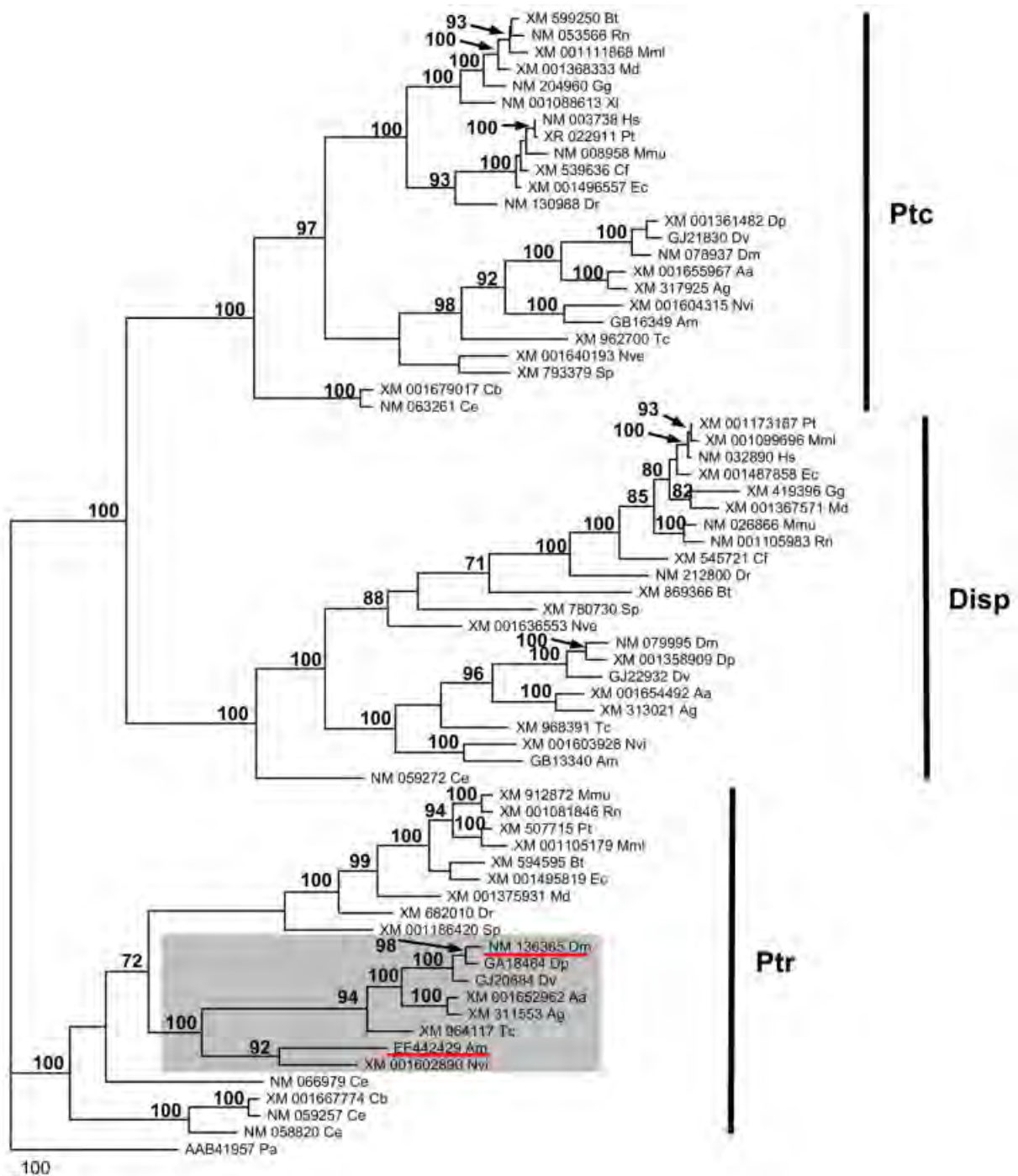


Fig. 2. Phylogenetic tree comparing the sequences of Ptr, Ptc, and Disp proteins. Analysis was performed with multiple alignments from amino acid sequences using ClustalW. Bootstrap values (1,000 pseudo-replicates) are shown above branches. The tree is displayed rooted by *Pseudomonas aeruginosa* RND family exporter MexD (GenBank accession number AAB41957). Protein sequences were from: Aa, *Aedes aegypti*; Ag, *Anopheles gambiae*; Am, *Apis mellifera*; Bt, *Bos taurus*; Cb, *Caenorhabditis briggsae*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Cf, *Canis familiaris*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Dp, *Drosophila*

*phila pseudoobscura*; Dr, *Danio rerio*; Dv, *Drosophila virilis*; Ec, *Equus caballus*; Gg, *Gallus gallus*; Hs, *Homo sapiens*; Md, *Monodelphis domestica*; Mml, *Macaca mulatta*; Mmu, *Mus musculus*; Nve, *Nematostella vectensis*; Nvi, *Nasonia vitripennis*; Pt, *Pan troglodytes*; Rn, *Rattus norvegicus*; Sp, *Strongylocentrotus purpuratus*; Tc, *Tribolium castaneum*; Xl, *Xenopus laevis*. GenBank accession numbers are indicated. AmPtr and DmPtr are underlined; insect Ptrs are shown inside gray box. [Color figure can be viewed in the online issue which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)]

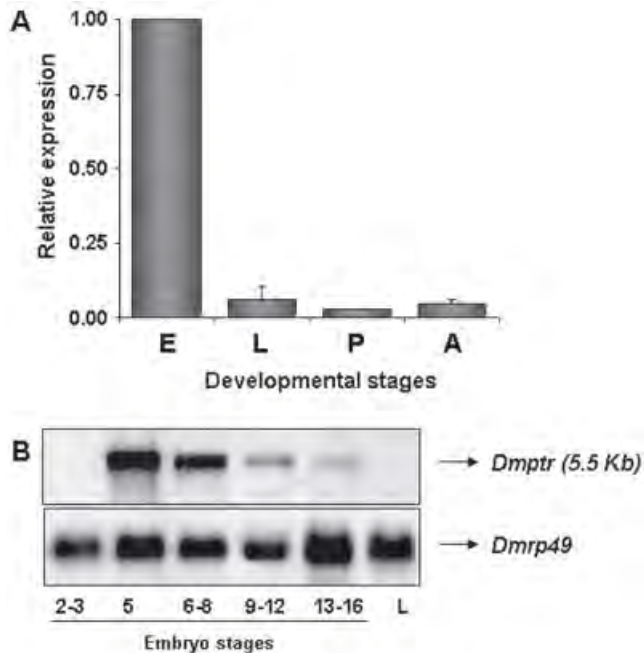


Fig. 3. Analysis of *Amptr* and *Dmptr* gene expression. **A:** Total RNA was isolated from 2-day embryos (E), 4-day larvae (L), unpigmented pupae (P), and adults (A). For each developmental stage, the relative expression of *Amptr* was normalized using *dap* spike mRNA (see Materials and Methods). The results are presented as a fraction of the highest value of relative expression. **B:** *D. melanogaster* total RNA (10  $\mu$ g) from stages 2–3, 5, 6–8, 9–12, and 13–16 embryos and third instar larva (L) were hybridized with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP-labeled probe for *Dmptr* (650 bp, upper panel) or *Dmrp49* (540 bp, lower panel). Estimated molecular weight of *Dmptr* mRNA is shown inside the parenthesis. Relative *Dmptr* transcript levels were estimated by normalization to *rp49* hybridization signals.

different fractions by using the anti-Ptr antibody. In doing so, membrane fractions were isolated according to their buoyant densities in sucrose step gradients (Zhang and Hsieh, 2000) and treated with various solubilizing reagents to examine the nature of *DmPtr* association with membranes (Fig. 5A, lane 1). *DmPtr* remains associated with the membranes after PBS and alkaline treatment at pH 10, indicating a tight association between *DmPtr* and membrane (Fig. 5, lanes 2–3 and 4–5). When the nonionic detergent NP-40 was used to solubilize the membranes, a large fraction of *DmPtr* could be released by the detergent (Fig. 5, lanes 6–7), we noted that a minor fraction of *DmPtr* remained

insoluble, this was probably due to an incomplete solubilization of the membranes, since we did not perform serial NP-40 washes. These results are consistent with the prediction that *DmPtr* is a transmembrane protein. In addition, we examined the subcellular localization of *DmPtr* using an epitope-tagged version of the protein. A construct expressing *DmPtr*-V5 fusion protein was transfected into a *Drosophila* culture cell line (S2R+) and the subcellular localization of *DmPtr* was determined by immunofluorescence using anti-V5 antibodies (Fig. 5B, panels a and c). We observed that *DmPtr* is localized to the cell surface and dispersed throughout the cytoplasm in a punctate pattern. In a higher-magnification view, *DmPtr*-V5 immunostaining can be observed along the cell filopodia (Fig. 5B, panels c–e). No immunostaining was detected in uninduced cells with the anti-V5 antibody (data not shown).

## DISCUSSION

### Sequence Analysis of *AmPtr* and *DmPtr* Proteins

*A. mellifera* and *D. melanogaster* Ptrs share characteristics common to all known Ptc, Disp, and *C. elegans* Ptr proteins (Kuwabara and Labouesse, 2002). These proteins are predicted to have 12-membrane spanning domains with cytoplasmic N- and C-terminal ends. The membrane domains can be further subdivided into two cassettes of 1+5, which are separated by a large intracellular loop. Carried within the first set of TM domains is an SSD, a phylogenetically conserved domain that has been identified in several multipass transmembrane proteins involved in the transport of lipids, sterols, or sterol-modified proteins and in cholesterol homeostasis (Kuwabara and Labouesse, 2002). The role of the SSD is still open to debate; questions have arisen as to whether SSD has a function common to all the SSD-containing proteins. Recent studies indicate that in HMG-CoA reductase and SCAP, the SSD modulates sterol-dependent interactions with the resident endoplasmic reticulum proteins, Insig-1 and Insig-2 (Yang et al., 2002; Sever et al., 2003), whereas in NPC1, SSD mediates LDL-cholesterol trafficking to the plasma



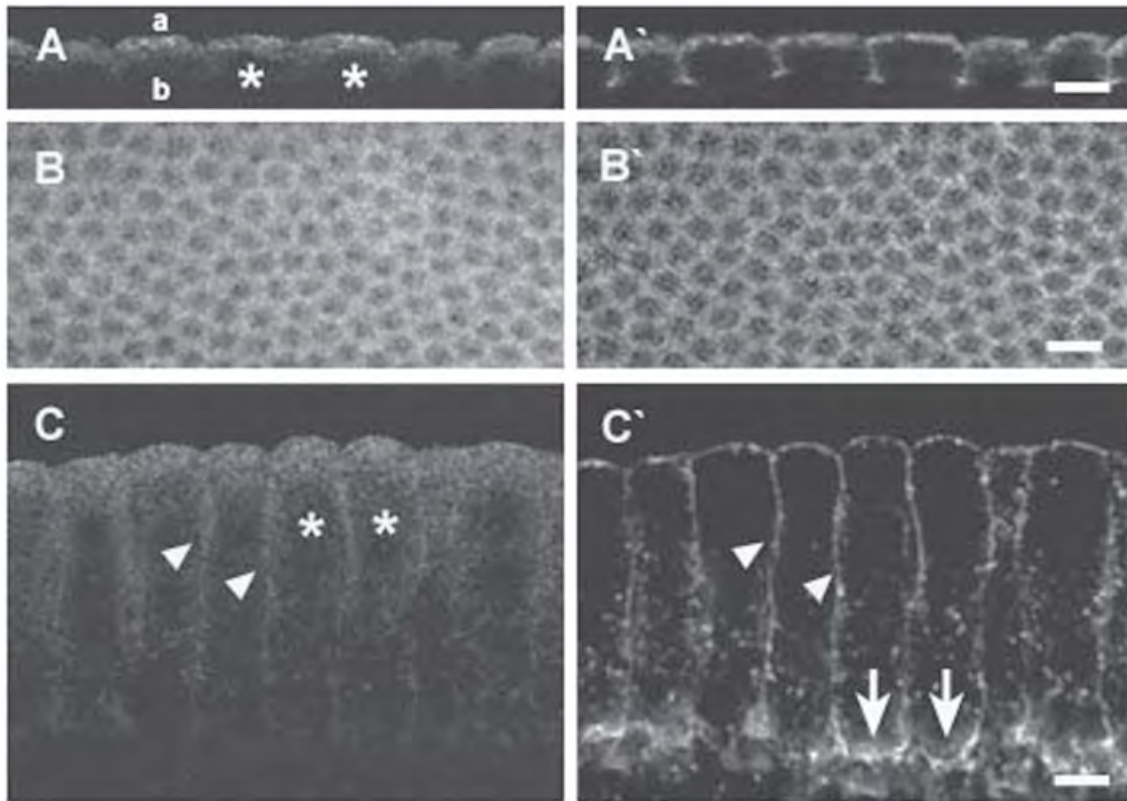


Fig. 4. *DmPtr* localization by antibody staining and confocal microscopy in whole-mount stage 5 embryos. Embryos were double-stained for: *DmPtr* (A,B,C); and F-actin; (A',B',C') a, apical; b, basal; \*, nuclei. (A and B) Sections from an embryo during the slow phase of cellularization. *DmPtr* is localized to the apical cellular region and moderately to the newly formed furrows as seen in a sagittal

image of the embryo (A) or in a surface view (B). C: *DmPtr* distribution during the fast phase of cellularization. *Ptr* immunoreactivity is detected along the length of the growing lateral membrane (arrowheads), no immunoreactivity was observed to associate with the basal F-actin constrictive rings (C', arrows). Scale bars = 5  $\mu$ m in A; 15  $\mu$ m in B; 5  $\mu$ m in C.

membrane and endoplasmic reticulum (Millard et al., 2005). In the case of *Ptc*, an obvious suggestion would be that the SSD has a role in binding the cholesterol adducts of Hh. However, the data indicate that the absence of the cholesterol moiety does not alter the *in vitro* affinity of *Ptc* for Hh (Pepinsky et al., 1998). Moreover, mutations in the SSD of *D. melanogaster Ptc* do not interfere with Hh binding *in vivo* (Martin et al., 2001; Strutt et al., 2001). Instead, the SSD seems to regulate the vesicular trafficking of *Ptc* between the plasma membrane and the endosomes (Martin et al., 2001; Strutt et al., 2001). A similar function has been reported for the SSD in *C. elegans Ptr-7*, since mutations in this domain affect the subcellular localization of this protein (Perens and Shaham, 2005).

The predicted topology of *AmPtr* and *DmPtr* includes a long C-terminal intracellular tail showing the most prominent structural differences between insect *Ptrs* (Fig. 1). The C-terminal tail of *D. melanogaster Ptc* is required for both protein internalization and turnover (Lu et al., 2006) and contains a PPXY motif that is predicted to bind HECT and WW domain ubiquitin ligases, such as the *Drosophila Nedd4* protein, which targets transmembrane receptors containing the PPXY motif for endocytosis (Hicke and Dunn, 2003). Interestingly, the C-terminal of *Ptrs* from *A. mellifera*, *N. vitripennis*, and the three *Drosophila* species contain a PPXY sequence that might be a target for such ubiquitin ligases, whereas *Ptr* proteins from *A. aegypti*, *A. gambiae*, and *T. castaneum* seem to lack



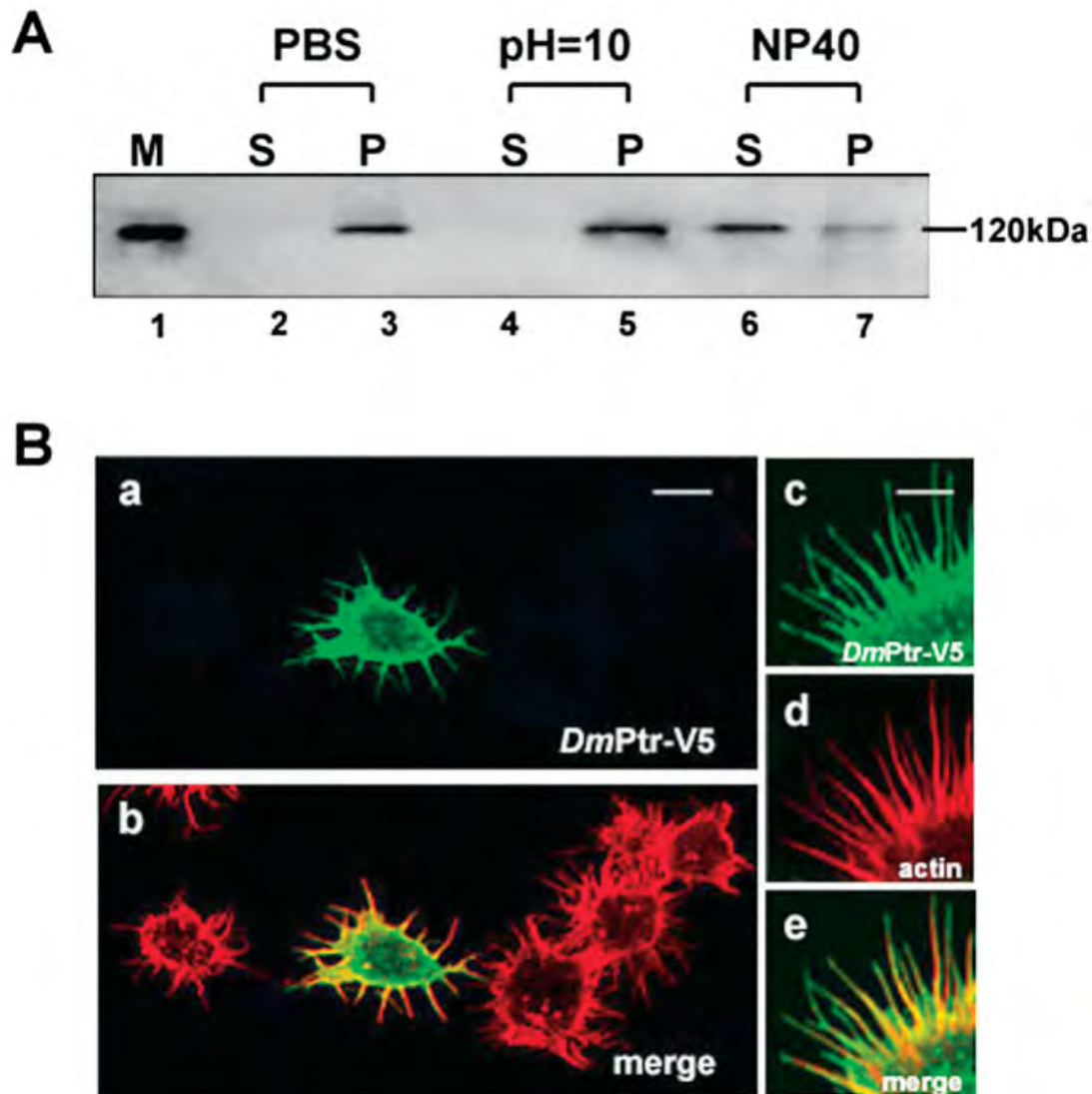


Fig. 5. Membrane association of *DmPtr*. A: Embryos (0–4 h) membranes were prepared by cellular fractionation on a sucrose step gradient (M). Three solubilizing reagents were used to wash the membrane fraction. These reagents were PBS, 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 10), and 1% NP-40. After washing, the same volume of supernatant (S) and pellet (P) was loaded on the gel and subjected to Western

blot analysis using an anti-*DmPtr* polyclonal antibody (1:1000 dilution). Estimated molecular weight of *DmPtr*, 120 kDa. B: Subcellular localization of the *DmPtr*-V5 fusion protein. (a–e) S2R<sup>+</sup> cells were transiently transfected with the fusion protein and stained with an anti-V5 monoclonal antibody (green in a, b, c, and e) and phalloidin to visualize actin (red in b, d, and e). Scale bar = 3 μm.

this conserved motif (Fig. 1). Another structural characteristic of SSD-containing proteins is the presence of large extracellular loops between TM segments 1 and 2 and 7 and 8. The extracellular loops appear to be necessary for protein function since deletion of *D. melanogaster* Ptc second loop blocks the ability of cells to bind and transduce Hh signal (Briscoe et al., 2001). Similarly, deletion

of *C. elegans* Ptr-7 first and second loop affects protein function, suggesting that Ptr activity might be regulated by extracellular signals (Perens and Shaham, 2005). Insect Ptrs, as well as Ptc, Disp, and *C. elegans* Ptr proteins, share an overall similarity in membrane topology with members of the RND family of prokaryotic permeases (Tseng et al., 1999). In addition, all of the present GxxxD motifs,

in the middle of the TM4 and the TM10, these residues and their position in the protein are highly conserved between RND permeases, and they are essential for their transporter function (Tseng et al., 1999). Consistently with this structural similarity, it has been reported that Ptc and Disp are able to behave as transmembrane molecular transporter (Ma et al., 2002; Taipale et al., 2002). Therefore, topology and domain analysis indicate a close structural relation between the Ptr proteins described here and SSD-containing proteins from other species.

Our data indicate that the predicted *AmPtr* and *DmPtr* protein sequences are highly conserved among other insect species as *N. vitripennis* (67% and 51% identity), *A. gambiae* (59% and 62% identity), *T. castaneum* (57% and 54% identity), *A. aegypti* (55% and 63% identity), *D. pseudoobscura* (51% and 90% identity), and *D. virilis* (51% and 86% identity). Sequence comparisons of the Ptr insect orthologues indicate that these proteins are more closely related to each other than to other SSD-containing proteins, such as Ptc and Disp. Thus, insect Ptrs appear to belong to a conserved, previously uncharacterized subfamily of SSD-containing proteins.

### Expression Analysis of *ptr* Gene and Its Encoded Protein


Our results on the temporal expression pattern of *AmPtr* gene suggest that it might be playing a role during *A. mellifera* embryogenesis. To gain insight into the cellular functions of Ptrs, we took advantage of the well-established *D. melanogaster* model to analyze the expression pattern of the *DmPtr*, which shares a high level of sequence identity with *AmPtr*. The results indicate that *DmPtr* transcripts are highly accumulated during embryo cellularization (stage 5), a developmental stage at which the plasma membrane invaginates to form cleavage furrows between 6,000 nuclei that are localized at the cortex of the embryo. Cellularization proceeds first in a slow phase (40 min) and then in a fast phase (20 min) to form individual cells within a polarized epithelium (Foe et al., 1993).

When we analyzed Ptr protein distribution using an anti-*DmPtr* antibody, we observed that during the slow phase of cellularization *DmPtr* was detected on the apical cellular domain. As cellularization progress Ptr immunoreactivity was localized at the sites where membrane formation is taking place. The distribution of *DmPtr* was consistent with a peripheral localization of the *DmPtr*-V5 fusion protein in S2R+ cells and with our biochemical analysis showing that *DmPtr* was tightly associated with embryo membranes. The spatial expression pattern of *DmPtr* in embryos during cellularization is reminiscent of that described for *D. melanogaster* transmembrane membrane protein Syntaxin 1 (Burgess et al., 1997), which displays a similar enrichment on the newly forming lateral cell membranes and is required for a normal embryo cellularization, suggesting that *DmPtr* is recruited to the invaginating membranes and might play a role in furrow extension.

To our knowledge, Ptr proteins have been only characterized in *C. elegans*, where they seem to regulate vesicular transport during developmental processes that require the growth and stabilization of the plasma membrane (Kuwabara et al., 2000; Perens and Shaham, 2005). Within the *C. elegans* germline syncytium, bipolar cytokinesis involves membrane fusion that requires vesicular transport and stabilization of the incomplete membrane furrows within the syncytium. It has been suggested that in *C. elegans*, *ptc-1* and Ptr proteins contribute to the process of syncytial cytokinesis by helping establish or maintain the incomplete plasma membrane furrows that separate individual nuclei within the syncytium (Kuwabara, 2000). As it has been mentioned, the evidence generated in the *C. elegans* model, which lacks other Hh pathway components, suggests that a novel, or perhaps ancestral, activity for Ptc and Ptrs has been uncovered that is not dependent on Hh or Smo but relies on a fundamental mechanism of cytokinesis that implies the regulation of vesicle trafficking. Interestingly, it has been shown that the regulated mobilization of intracellular pools of vesicles at defined sites of the plasma membrane underlies membrane growth and surface polarization during *D. melanogaster*

cellularization. Moreover, proteins that are specifically induced during cellularization, such as Nullo and Slam (Hunter et al., 2002; Lecuit et al., 2002), represent developmental regulators of membrane growth during cellularization. Whether the insect Ptrs are also involved in such functions constitute the obvious questions which will support our future investigations. Nevertheless, our results on the temporal expression pattern of *Dmptr* gene along with Ptr protein localization at sites where membrane addition occurs during cellularization are consistent with a potential role of *DmPtr* in membrane furrow growth. Certainly, further work will be required to determine the molecular function(s) of insect Ptrs; toward that goal, the high sequence identity between these proteins would allow to perform functional assays in a model system such as *D. melanogaster*, which has proved more amenable to genetic screenings.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fondecyt 1050235 (to V.C.). C.B. was supported by fellowships from: CSIC-Programa de recursos humanos (Proyecto 720-contrapartida de convenios), Universidad de la República and AMSUD Pasteur-regional training fellowship program. 

## LITERATURE CITED

- Briscoe J, Chen Y, Jessell TM, Struhl G. 2001. A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 7:1279–1291.
- Burgess RW, Deitcher DL, Schwarz TL. 1997. The synaptic protein syntaxin 1 is required for cellularization of *Drosophila* embryos. *J Cell Biol* 138:861–875.
- Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, Basler K. 1999. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99:803–815.
- Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, Gu J, Rosenfeld MA, Pavan WJ, Krizman DB, Nagle J, Polymeropoulos MH, Sturley SL, Ioannou YA, Higgins ME, Comly M, Cooney A, Brown A, Kaneski CR, Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Neufeld EB, Chang T-Y, Liscum L, Strauss III JE, Ohno K, Zeigler M, Carmi R, Sokol J, Markie D, O'Neill RR, van Diggelen OP, Elleder M, Patterson MC, Brady RO, Vanier MT, Pentchev PG, Tagle DA. 1997. Niemann-P C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277:228–231.
- Foe VE, Odell GM, Edgar BA. 1993. Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: point and counterpoint. In: Martinez-Arias A, editor. *The development of Drosophila melanogaster*. Vol 1. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 149–300.
- González-Agüero M, Zúñiga A, Pottstock H, Del Pozo T, González M, Cambiazo V. 2005. Identification of genes expressed during *Drosophila melanogaster* gastrulation by using subtractive hybridization. *Gene* 345:213–224.
- Gotoh N, Kusumi T, Tsujimoto H, Wada T, Nishino T. 1999. Topological analysis of an RND family transporter, MexD of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* 456:32–36.
- Hampton RY. 2002. Proteolysis and sterol regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:345–378.
- Harlow E, Lane D. 1999. *Using antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 495 p.
- Hicke L, Dunn R. 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:141–172.
- Hooper JE, Scott MP. 1989. The *Drosophila patched* gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* 59:751–765.
- Hunter C, Sung P, Schejter ED, Wieschaus E. 2002. Conserved domains of the Nullo protein required for cell-surface localization and formation of adherens junctions. *Mol Biol Cell* 13:146–157.
- Ingham PW. 1998. The *patched* gene in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 8:88–94.
- Ingham P, McMahon A. 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15:3059–3087.
- Jean-Prost P. 1987. *Apicultura: Conocimiento de la Abeja*,

- Manejo de la Colmena. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 573 p.
- Knudsen KA. 1985. Proteins transferred to nitrocellulose for use as immunogens. *Anal Biochem* 147:285–288.
- Kuwabara PE, Lee MH, Schedl T, Jefferis GS. 2000. A *C. elegans* *patched* gene, *ptc-1*, functions in germ-line cytokinesis. *Genes Dev* 14:1933–1944.
- Kuwabara PE, Labouesse M. 2002. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet* 18:193–201.
- Lecuit T, Samanta R, Wieschaus E. 2002. *Slam* encodes a developmental regulator of polarized membrane growth during cleavage of the *Drosophila* embryo. *Dev Cell* 2:425–436.
- Loftus SK, Morris JA, Carstea ED, Gu JZ, Cummings C, Brown A, Ellison J, Ohno K, Rosenfeld MA, Tagle DA, Pentchev PG, Pavan WJ. 1997. Murine model of Niemann–P C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* 277:232–235.
- Lu X, Liu S, Kornberg TB. 2006. The C-terminal tail of the Hedgehog receptor Patched regulates both localization and turnover. *Genes Dev* 20:2539–2551.
- Ma Y, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K, Beachy PA. 2002. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of *dispatched*. *Cell* 111:63–75.
- Martín V, Carrillo G, Torroja C, Guerrero I. 2001. The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothed activity through Patched vesicular trafficking. *Curr Biol* 11:601–607.
- Michaux G, Gansmuller A, Hindelang C, Labouesse M. 2000. CHE-14, a protein with a sterol-sensing domain, is required for apical sorting in *C. elegans* ectodermal epithelial cells. *Curr Biol* 10:1098–10107.
- Millard EE, Gale SE, Dudley N, Zhang J, Schaffer JE, Ory DS. 2005. The sterol-sensing domain of the Niemann–P C1 (NPC1) protein regulates trafficking of low density lipoprotein cholesterol. *J Biol Chem* 280:28581–28590.
- Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A. 1998. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 273:14037–14045.
- Perens EA, Shaham S. 2005. *C. elegans daf-6* encodes a patched-related protein required for lumen formation. *Dev Cell* 8:893–906.
- Rothwell WF, Sullivan W. 2000. Fluorescent analysis of *Drosophila* embryos. In: Sullivan W, Ashburner M, Scott Hawley, R, editors. *Drosophila* protocols. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 141–157.
- Sever N, Yang T, Brown MS, Goldstein JL, DeBose-Boyd RA. 2003. Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of *insig-1* to its sterol-sensing domain. *Mol Cell* 11:25–33.
- Strutt H, Thomas C, Nakano Y, Stark D, Neave B, Taylor AM. 2001. Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr Biol* 11:608–613.
- Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. 2002. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* 418:892–897.
- Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, Saier MH Jr. 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1:107–125.
- Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS. 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110:489–500.
- Zhang CX, Hsieh T. 2000. Preparation of membrane proteins from *Drosophila* embryos. In: Sullivan W, Ashburner M, Hawley RS, editors. *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 563–569.
- Zugasti O, Rajan J, Kuwabara PE. 2005. The function and expansion of the Patched- and Hedgehog-related homologs in *C. elegans*. *Genome Res* 15:s1402–1410.



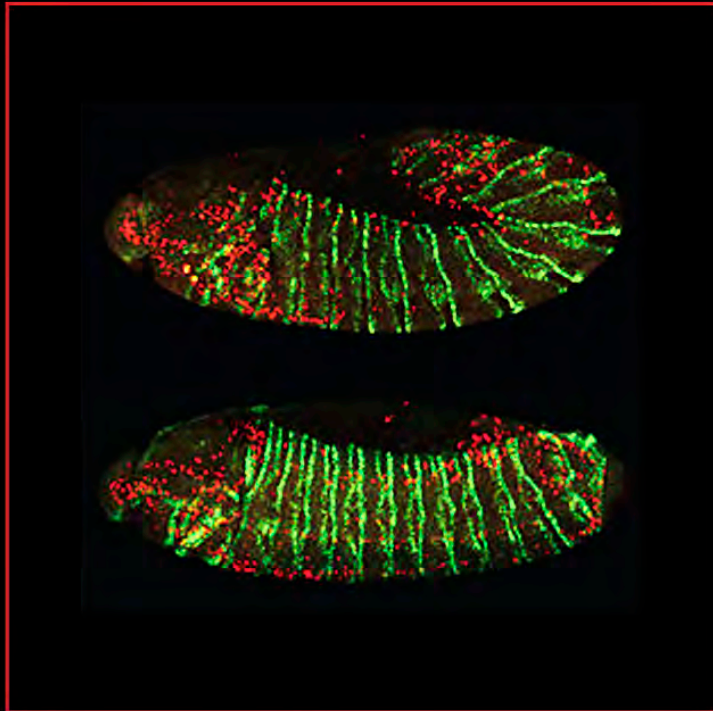


Volume 20, issue 1, January 2016

ISSN 1567-133X

GE P

GENE EXPRESSION PATTERNS



ACCESS OUR HOMEPAGE AT  
<http://www.elsevier.com/locate/gep>



Contents lists available at ScienceDirect

## Gene Expression Patterns

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/gep>

## Spatial and temporal distribution of Patched-related protein in the *Drosophila* embryo

Carmen Bolatto <sup>a</sup>, Cristina Parada <sup>a</sup>, Fiorella Revello <sup>a</sup>, Alejandro Zuñiga <sup>b</sup>, Pablo Cabrera <sup>b</sup>, Verónica Cambiazo <sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Biología del Desarrollo, Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina-Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, INTA-Universidad de Chile and Fondap Center for Genome Regulation (CGR), Santiago, Chile

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 May 2015

Received in revised form

8 October 2015

Accepted 21 October 2015

Available online xxx

## Keywords:

*Drosophila*

Patched-related

Hemocyte

Embryogenesis

## ABSTRACT

*Patched-related (Ptr)* encodes a protein with 12 potential transmembrane domains and a sterol-sensing domain that is closely related in predicted topology and domain organization to Patched, the canonical receptor of the Hedgehog pathway. Here we describe the production of an antibody specific for *Drosophila* Ptr and analyse its spatial and temporal distribution in the embryo. We find that at early developmental stages Ptr is predominantly localized at cell periphery but later on it becomes strongly and almost exclusively expressed in hemocytes. Interestingly *Ptr* null mutant embryos died without hatching. Our findings suggest that Ptr plays an essential function in *Drosophila* development, perhaps as a new receptor of embryonic hemocytes.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Seven classes of multipass transmembrane proteins carry a conserved domain known as sterol-sensing domain (SSD), which consists of about 180 amino acids that form 5 consecutive membrane spanning segments. This motif was initially identified in HMG CoA reductase (HMGCR) and SREBP cleavage activating protein (SCAP), two proteins involved in sterol synthesis and sterol-dependent transcription, respectively (Hampton, 2002). Subsequently additional proteins such as 7-dehydrocholesterol reductase (Witsch-Baumgartner et al., 2001), Niemann–Pick disease type C1 (NPC1) (Carstea et al., 1997), Patched (Ptc) (Hooper and Scott, 1989) and Dispatched (Disp) (Burke et al., 1999) with roles in cholesterol biosynthesis, lipid transport and transport of cholesterol-modified

morphogen Hedgehog (Hh) have been shown to carry the SSD motif. More recently a group of membrane proteins named as Patched-related (Ptr), which is closely related in predicted topology to Ptc and Disp, were characterized in *C. elegans* (Kuwabara and Labouesse, 2002). The Ptr proteins seem to function in multiple aspects of development, including cell growth, patterning, and molting, a process that depends on the availability of sterols (Zugasti et al., 2005).

The SSD-containing proteins are found in a variety of organisms, in *Drosophila* a repertoire of SSD-containing proteins with structural and functional similarities to their vertebrate counterparts has been identified, highlighting the central importance of these proteins in variety of cellular processes, such as cholesterol homeostasis, vesicle trafficking, cell signalling and cytokinesis (Kuwabara and Labouesse, 2002). In an evolutionary sense, studies in *Drosophila* have provided insights on the ancestral function of SSD-containing proteins. For instance, in mammals activation of SREBP (sterol response element binding proteins) by SCAP is regulated by low levels of sterols, whereas in flies SCAP responds to palmitic acid (Seegmiller et al., 2002), suggesting that the original function of the SCAP-SREBP pathway may have been to maintain the integrity of the cell membrane.

A *Drosophila* *Ptr* gene (CG11212) was originally isolated in a subtractive hybridization screening designed to identify genes that

**Abbreviations:** SSD, sterol-sensing domain; HMGCR, HMG CoA reductase; SCAP, SREBP cleavage activating protein; NPC1, Niemann–Pick disease type C1; Ptc, Patched; Disp, Dispatched; Hh, Hedgehog; Ptr, Patched-related; SREBP, sterol response element binding proteins; GST, glutathione S-transferase; ECM, extracellular matrix; Crq, Croquemort; Pvr, PDGF/VEGF receptor.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [cbolatto@fmed.edu.uy](mailto:cbolatto@fmed.edu.uy) (C. Bolatto), [cristinap@fmed.edu.uy](mailto:cristinap@fmed.edu.uy) (C. Parada), [fiorev85@gmail.com](mailto:fiorev85@gmail.com) (F. Revello), [jano@inta.uchile.cl](mailto:jano@inta.uchile.cl) (A. Zuñiga), [vcambiaz@inta.cl](mailto:vcambiaz@inta.cl) (V. Cambiazo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gep.2015.10.002>

1567-133X/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

are differentially expressed at the beginning of gastrulation (Zuniga et al., 2009). We cloned the gene and deduced that the product is a 1061 amino acids protein closely related in predicted topology and domain organization to the protein encoded by the *Drosophila* segment polarity gene *ptc*. In addition, our biochemical analysis revealed that Ptr is associated with embryo membranes and immunohistochemistry analyses allowed us to localize this protein to the growing plasma membranes in *Drosophila* blastoderms and in vesicles-like structures of S2 cells overexpressing a Ptr-V5 fusion protein (Zuniga et al., 2009; Pastenes et al., 2008).

Here we describe the production of an antibody specific for *Drosophila* Ptr and analyse its temporal and spatial distribution in the embryo. In addition, we present an initial characterization of a null mutation in the *Ptr* gene, created by imprecise P-element excision. *Ptr* null mutant embryos died without hatching, indicating that Ptr plays an essential function in *Drosophila* development.

## 2. Results

### 2.1. Generation of antibody specific for Ptr protein

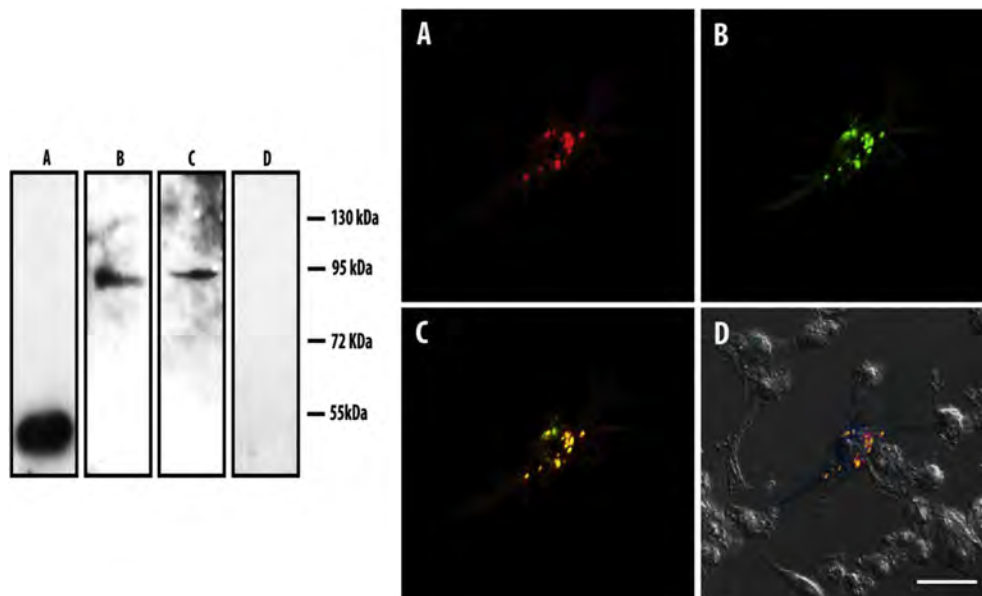
The spatial and temporal pattern of Patched-related expression has been only briefly reported (Pastenes et al., 2008) with antibodies no longer available, so a new polyclonal antiserum against a 275 amino acids peptide from the carboxyl termini of Ptr (aa 855 to 1129) was generated. The quality of the signal displayed by the new anti-Ptr antibody, was first tested by Western blot assays using a purified recombinant Ptr protein consisting of the 275 amino acids peptide fused to a poly-His tag (Fig. 1, lane A). Then, Western blot assays were performed using lysates of cl-8 cells that overexpress a Ptr-V5 construct under the control of an inducible metallothionein promoter (see Sections 4.2–4.4). To confirm the specificity of the signal, these experiments included as control the use of a monoclonal anti-V5 antibody to recognize the protein tag. The results showed that both the polyclonal anti-Ptr and the monoclonal anti-V5 antibodies recognized a single band at 95 kDa (Fig. 1 left, lanes B

and C). The apparent molecular weight of Ptr was different to that predicted by its sequence (120 kDa). This biochemical behaviour, termed “gel shifting”, was reported previously in other studies and appears to be frequent for membrane proteins (Rath et al., 2009; Nybo, 2012). The origin of gel shift behaviour might derive from altered binding caused by the detergent. In our experiment, the need to avoid boiling the sample to prevent protein aggregation conspired against the uniform binding of SDS to the sample proteins. Nevertheless, the correspondence of the 95 kDa signal to Ptr was confirmed by the co-staining with anti-V5 antibody. Uninduced cells were used as control to confirm the absence of reactivity with anti-Ptr antibody (Fig. 1 left, lane D). In addition, transfected cl-8 were processed for immunofluorescence using the anti-Ptr and anti-V5 antibodies (green and red signal, respectively). Ptr and V5 signals colocalized in vesicle-like structures (Fig. 1, right). The specificity of the anti-Ptr antiserum was further demonstrated by the absence of immunostaining in a *Ptr* null mutant embryos (see Section 2.3). Thus, we concluded that the antiserum generated specifically recognized the Ptr protein.

### 2.2. Expression pattern of Ptr during *Drosophila* embryogenesis

The structural similarities of Ptr and Ptc along with the association of Ptr with embryo membranes (Zuniga et al., 2009; Pastenes et al., 2008) prompted us to compare the expression pattern of Ptr and Ptc at early and late stages of embryogenesis. To do this, we performed double immunofluorescence analyses by staining embryos with anti-Ptr and anti-Ptc antibodies. The spatial distribution of Ptc protein expression here was consistent with that reported previously (Capdevila et al., 1994; Taylor et al., 1993) allowing us to compare it with that of Ptr.

In early embryos (cellular blastoderm and gastrula stages) the immunofluorescence signals of Ptr and Ptc showed a uniform distribution in almost all cells (Fig. 2 A–L). As previously showed (Pastenes et al., 2008), Ptr is distributed around the periphery of the cell and accumulates in cytoplasmic dots (Fig. 2 D–F). This



**Fig. 1. Polyclonal anti-Ptr antibody specifically recognizes recombinant Ptr proteins.** Left panel, anti-Ptr detected the presence of Ptr recombinant protein (lane A). A lysate of cl-8 cells induced to express Ptr-V5 was used as sample in western blot analysis. Monoclonal anti-V5 (lane B) and polyclonal anti-Ptr (lane C) antibodies detected a coincident signal at 95 kDa in the lysate. A lysate of uninduced cells was used as a control and probed with the anti-Ptr antibody (lane D). Right panel, overexpression of Ptr-V5 in cl-8 cells was verified by immunostaining using the same antibodies mentioned above. Both, anti-V5 (red in A) and anti-Ptr (green in B) showed a similar signal. Colocalization of signals was corroborated in the merged image (yellow in C). Cells were visualized using Nomarski microscopy (D). Scale bar: 10  $\mu$ m.

subcellular arrangement is reminiscent to that described for Ptc. Ultrastructural localization of anti-Ptr using electron microscopy and a pre-embedding immunogold method demonstrated that Ptr is associated to vesicular and plasma membranes (Fig. 2G–I). At stage 12 of embryogenesis when germ band shortening takes place, Ptc is expressed in 15 alternating stripes over the trunk region (Capdevila et al., 1994), whereas the anti-Ptr antibody stained conspicuous zones with high concentration of the protein (Fig. 2M–U) that were not coincident with the Ptc-positive stripes. During germ band shortening, distribution of Ptr positive cells was reminiscent of the spatial pattern of migrating hemocytes. Thus, Ptr positive cells were concentrated at both ends of the embryo (Fig. 2N, arrows) from where they migrated towards the middle of the embryo. Migration took place along different paths that were highly coincident with those previously described as the stereotyped paths of hemocyte migration: ventral surface of ventral nerve cord (vs), dorsal surface of ventral nerve cord (ds) and dorsal epidermis (de) (Fig. 2Q and T). There is a fourth path followed by hemocytes during migration, but it is inside the embryo, surrounding the gut and it was not clearly visible in our immunofluorescence stainings (Evans et al., 2010; Wood and Jacinto, 2007; Tepass et al., 1994). At a later stage of development Ptr positive cells were observed around the brain (Fig. 2W, arrowheads) and bilaterally around the amnioserosa (Fig. 2W, as).

In order to verify whether Ptr staining was enriched in the hemocyte population of cells, (Evans et al., 2010; Olofsson and Page, 2005) embryos expressing UAS-*lacZ* under the control of hemocyte-specific GAL4 driver (*crq*-GAL4) were immunostained using anti-Ptr and anti-beta galactosidase (beta-gal) antibodies (Fig. 3). We found that the patterns of immunostaining for beta galactosidase and Ptr were highly similar, indicating that Ptr is enriched in the hemocytes at late stages of embryonic development. Although expression pattern of *lacZ* driven by *crq*-GAL4 was according to previous descriptions (i.e. starts at germ band retraction stage), the overlap between anti-Ptr and anti-beta-gal signals was incomplete and denoted a potential subset of Ptr positive embryonic macrophages. The specificity of the Ptr staining in blood cells was confirmed by the absence of immunofluorescence in *Ptr* null mutant embryos (Fig. 4).

### 2.3. Generation of a *Ptr* mutant and antibody validation

We searched the Flybase for P-element insertion lines near *Ptr* gene and identified the line PSUPor-PKG01682 in which the PSUPor-P element (Bellen et al., 2004) was adjacent to the predicted 5'-UTR of *Ptr*. The line was homozygous viable lacking an obvious mutant phenotype. To identify the complete 5'-UTR of *Ptr* gene, we performed a 5' Race using embryos at stage 5. Sequencing of the 5' Race PCR products revealed two 5'-UTR sequences, 5'-UTR 1 (357 bp) and 5'-UTR 2 (614 bp) (data not shown). Based on EST (expressed sequence tag) sequence data, the 5'-UTR 1 appears to be predominantly transcribed (FlyBase, <http://flybase.bio.indiana.edu>). This result allowed us to map the insertion site of the P-element 335 bp 5' of the 5'-UTR 1. To obtain mutants for *Ptr* we mobilized the P element in a standard cross with the Δ2–3 strain, which stably expresses transposase (Robertson et al., 1988), then flies were generated and selected in which imprecise excision events eliminated the P-element. We recovered one excision line (23C) that was homozygous lethal, the extent of the genomic deletion is shown in Fig. 4A. Line 23C has a deletion of 3852 bp removing the transcription start site and 1212 bp encoding the 5'-UTR and part of the first intron of the gene. In the 23C line the neighbouring gene CG30432 is completely deleted. CG30432 is reported as a gene moderately expressed in imaginal discs and testis, with very low or no expression during embryonic

development (Graveley et al., 2011), suggesting that the observed lethality could be caused by the mutation in *Ptr*.

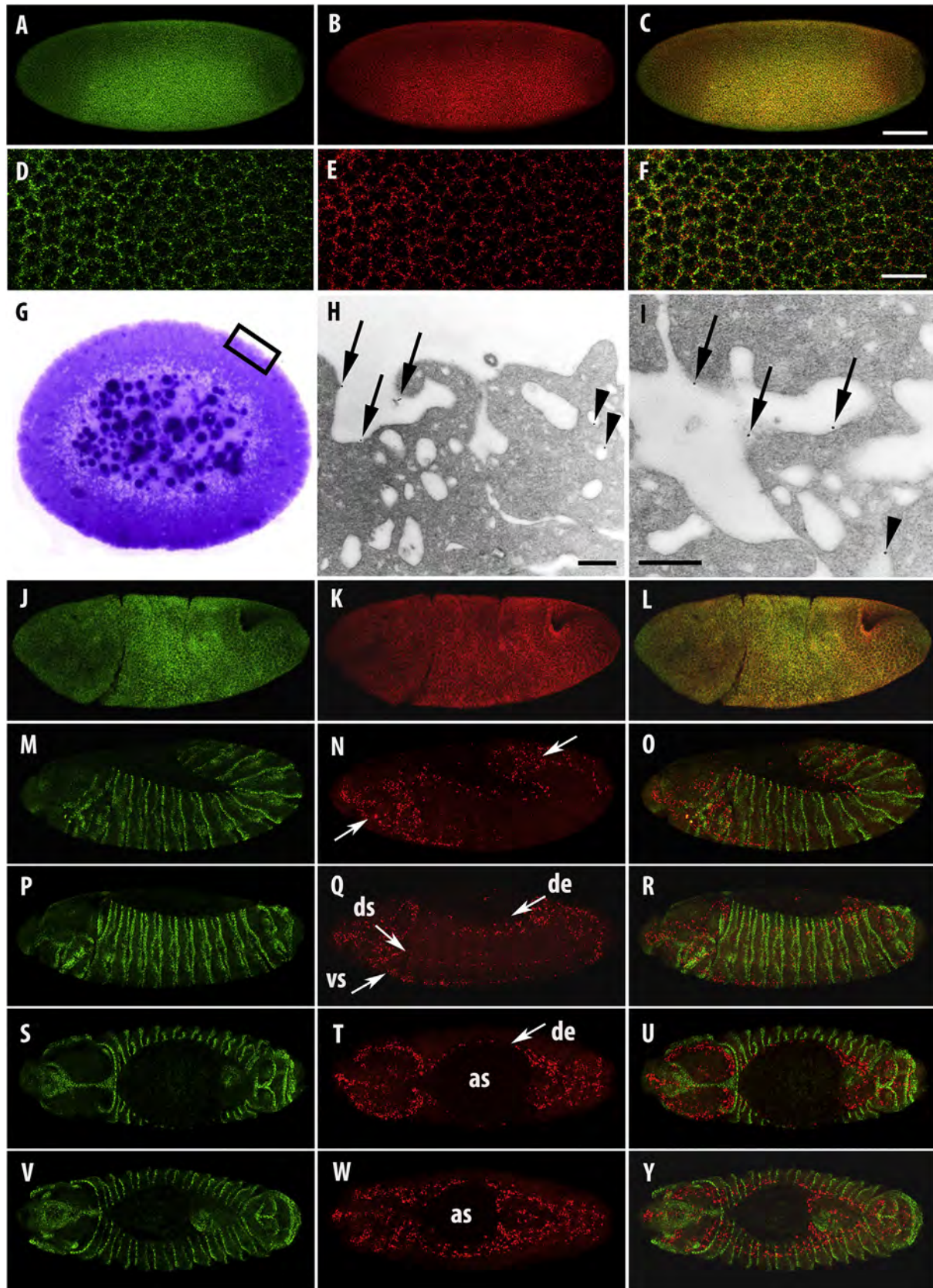
To test whether this deletion efficiently affected the expression of *Ptr*, PCR assays were performed using a pair of primers that annealed with exons 3 and 7 of *Ptr*. Amplification products were not recovered when the cDNA of homozygous mutant embryos from line 23C was used as substrate, whereas fragments of correct sizes were detected when genomic DNA or cDNA from wild type embryos were used as substrates for the PCR reactions (Fig. 4B). In addition, line 23C was balanced with a marked balancer chromosome to distinguish homozygous mutant embryos by their lack of GFP expression (see Section 4.6) (Casso et al., 1999). With the help of this tool we determined that all the homozygous *Ptr* null embryos (i.e. GFP negative) died before or short time after hatching. Therefore, we conclude that a null mutation for *Ptr* gene (*Ptr*<sup>23C</sup>) was obtained. Using the *Ptr*<sup>23C</sup> line the newly generated anti-Ptr antibody was validated by an absence of signal in the *Ptr* null mutant (Fig. 4C–F). As a first step to characterize the *Ptr*<sup>23C</sup> line, we examined the presence of hemocytes in wild type and *Ptr* mutant embryos using an anti-fascin antibody that labels the subpopulation of migrating hemocytes (Zanet et al., 2009). Differences could be detected in the number and distribution of migrating hemocytes between wild type (Fig. 5A) and *Ptr*<sup>23C</sup> embryos (Fig. 5B).

### 3. Discussion

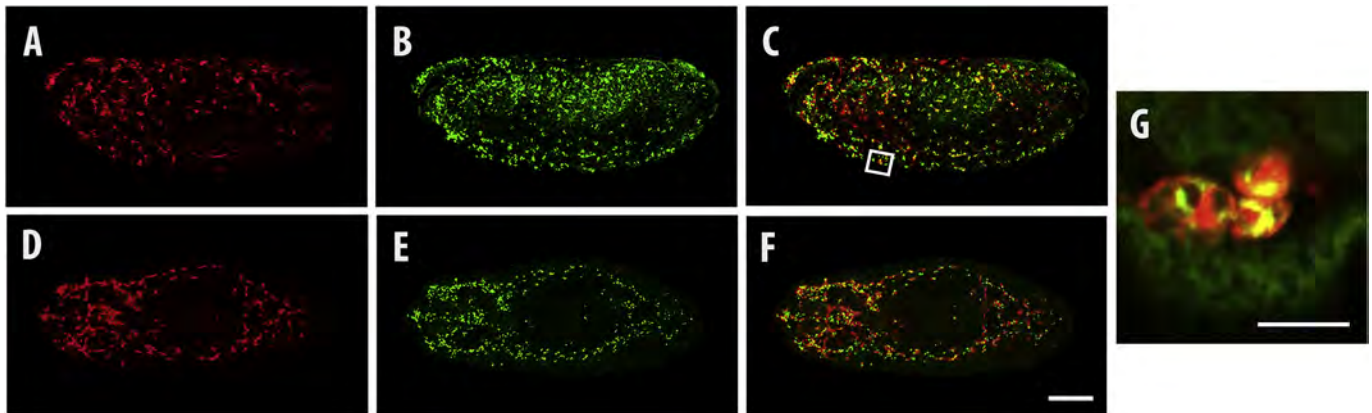
Previous work indicate that *Ptr* displays a similar structure and topology with *Ptc*, a negative regulator of the Hh pathway (Taipale et al., 2002; Chen and Struhl, 1996; Ingham et al., 1991). Here, we showed that *Ptc* and *Ptr* display distinctive expression patterns during embryogenesis. At early stages, *Ptr* and *Ptc* immunoreactivity seem to be predominantly associated to cell membranes. At later stages, when *Ptc*-positive stripes are formed, *Ptr* becomes highly enriched in the migrating hemocytes. According to the temporal transcriptome of *Drosophila* published by the mod-ENCODE project (Graveley et al., 2011) the transcription profile of *Ptr* shows a sharp increment from mid-embryogenesis, co-temporal with hemocyte differentiation and migration as phagocytic cells (Tepass et al., 1994). This is consistent with our findings of strong *Ptr* immunoreactivity in hemocytes at this stage. In this regard, *Ptr* immunostaining in embryos expressing UAS-*lacZ* under the control of the *crq*-GAL4 driver showed that a subset of migrating hemocytes expressing beta-galactosidase coexpressed *Ptr*, suggesting the existence of a subset of *Ptr*-positive cells. To our knowledge, distinct subsets of cells have not been characterized among migrating hemocytes, although the expression of a Tn antigen, with putative roles in immune response, has been detected in a subgroup of embryonic hemocytes (Yoshida et al., 2008).

Hemocytes are circulating cells responsible for the phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila* and other invertebrates. During embryogenesis, hemocytes carry out essential functions within the embryo, in addition, they are important for embryonic tissue formation as well as organ remodelling during metamorphosis (Tepass et al., 1994; Franc et al., 1996; Abrams et al., 1993; Franc et al., 1999). The ability of the hemocytes to recognize, migrate towards and engulf dying cells is controlled by transmembrane proteins acting as receptors. For example Croquemort (Crq), a member of the CD36 family of proteins, is a *Drosophila* macrophage receptor with roles in the binding and clearance of apoptotic cells in *Drosophila* embryos (Franc et al., 1996). Another receptor that is involved in apoptotic engulfment is Draper that functions in phagocytosis of apoptotic cells by migrating hemocytes (Manaka et al., 2004). On the other hand, the PDGF/VEGF receptor (Pvr) is part of the mechanism of hemocyte migration, directing hemocyte precursors along stereotyped migratory routes (Heino et al., 2001;





**Fig. 2. Expression pattern of Ptr during *Drosophila* embryogenesis.** Confocal microscopy images of whole-mount wild-type embryos double stained for Ptc (green signal: A, D, J, M, P, S, V) and Ptr (red signal: B, E, K, N, Q, T, W)). Yellow indicates signal overlapping in the merged images (C, F, L, O, R, U, Y). (A–C) Stage 5 embryo (blastoderm cellularization), (D–F) Higher magnification images of blastoderm stage to show similar distribution of the two proteins. (G–I) Pre-embedding immunogold using anti-Ptr to show the association of the protein with plasmatic (arrow) and vesicular (arrowhead) membranes at blastoderm stage. Magnified area in H and I is outlined in G by a black rectangle. (J–L) Stage 7 embryo (gastrulation), (M–U) Stage 12 embryo (germ band shortening), (V–Y) Stage 13 embryo (completion of germ band shortening). (A–B and J–R) Lateral and (S–Y) ventral views. At late stages of embryogenesis the antibody detected conspicuous zones with high concentration of Ptr. The distribution of these zones is coincident with some of the stereotyped paths of hemocyte migration: ventral surface of ventral nerve cord (vs), dorsal surface of ventral nerve cord (ds), dorsal epidermis (de), around the brain and around the amnioserosa (as). Scale Bars: (C) 50  $\mu$ m, (F) 10  $\mu$ m and (H–I) 500 nm.



**Fig. 3. Ptr is expressed in embryonic macrophages.** Confocal images of *Drosophila* embryos at stage 13/14, viewed (A–C) laterally or (D–F) dorsally with the anterior end to the left of the panel. The expression pattern of the *lacZ* gene product under control of the macrophage driver *crq-GAL4* (red signal: A, D) indicated that Ptr (green signal: B, E) accumulates in hemocytes. (C and F). Merged images indicate signal co-localization (yellow) in the entire embryo (C, F) or in a region close to its dorsal surface (G) to show hemocytes placed in the ventral surface of ventral nerve cord. Magnified area (G) is outlined in C by a white rectangle. Scale bars: (F) 50  $\mu$ m and (G) 20  $\mu$ m.

Cho et al., 2002; Wood et al., 2006). In addition, it is relevant to promote the survival of blood cells in the embryo. Thus, *Pvr* mutant embryos have large numbers of apoptotic hemocytes and drastically reduced total hemocyte number. Interestingly, the absence of Ptr also seems to affect the number of the migrating hemocytes at least at late stages of embryogenesis, suggesting that the lack of Ptr alters cell proliferation or induces hemocyte apoptosis. Further studies will be necessary to determine the role of Ptr on the development and differentiation of embryonic hemocytes.

Although it has been detected a close correlation between the pattern of apoptosis on the migratory routes travelled by hemocytes in the embryo (Tepass et al., 1994; Abrams et al., 1993), it is not clear how morphogenetic processes are able to coordinate developmental migrations with hemocyte homing toward dying cells along stereotyped migration pathways and how hemocytes are able to sense apoptotic cells at a distance (Wood and Jacinto, 2007; Cho et al., 2002). Thus, hemocytes have to respond to a diversity of signals arriving from extracellular matrix (ECM) or from other cells to perform vital functions: the clearance of apoptotic cells and the deposition of ECM. Because receptors and intracellular pathways activated by such signals are still partially known, it is attractive for us to trace the presence of Ptr, a transmembrane protein, to the migrating hemocytes.

Hemocyte malfunction has been related with alterations in the intestine and nervous system (Brown, 1994; Yarnitzky and Volk, 1995; Schmid et al., 2002; Sears et al., 2003). Future studies will clarify the existence of such malformations in *Ptr* null embryos. In this sense, the observation that these mutant embryos fail to hatch from the vitelline membrane encouraged us to define future experiments to evaluate the deposition level of ECM components. Because somatic muscle contraction is important for the embryos to hatch from the eggshell (Wright, 1960; Stronach et al., 1999) and hemocytes lay down much of ECM in the embryo (Fessler and Fessler, 1989; Cecchini et al., 1987; Mirre et al., 1988; Kusche-Gullberg et al., 1992; Yasothornsrikul et al., 1997; Le Parco et al., 1986; Fogerty et al., 1994), it would be of interest to determine whether *Ptr* null mutant embryos show alterations in somatic muscle attachment.

In summary, our results help to determine the expression pattern of Ptr, a SSD-containing protein whose role in the development has not yet been established. It was demonstrated that at later stages of embryogenesis, Ptr protein was highly expressed in a hemocyte-specific pattern. In addition, lack of Ptr seems to affect the number and distribution of hemocytes. These observations were unexpected

and encourages us to delineate more sophisticated functional investigations to elucidate the role of Ptr in these cells.

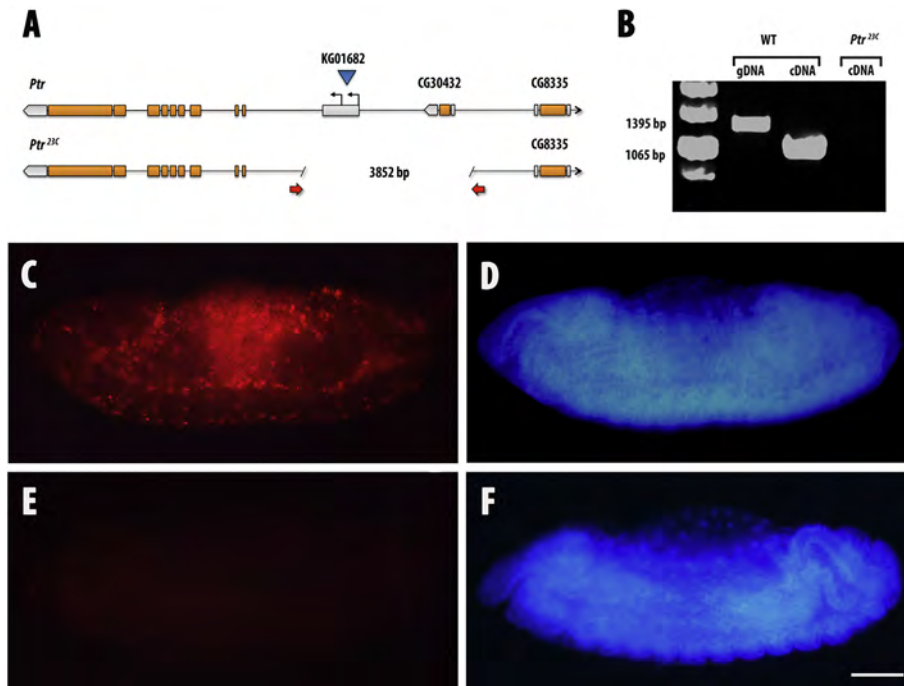
#### 4. Experimental procedures

##### 4.1. Production of *Ptr* anti-serum

To generate the Ptr-GST fusion protein, an 825 bp fragment of Ptr, encompassing residues 855 to 1129, was cloned into a pGEX-6P-1 vector (Amersham Biosciences). The construct was then used to transform BL21 competent cells. An overnight culture of bacteria carrying the fusion protein construct was inoculated (1:100 dilution) into 200 ml of LB plus ampicillin. Expression of the fusion protein was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 1 mM and culture was growth 1 h at 37 °C. The bacteria were harvested by cold centrifugation (4 °C) at 8000 $\times$  g for 10 min. The pellet was resuspended in 10 ml of phosphate buffered saline (PBS) with protease inhibitors and sonicated on ice (ten times for 10 s each, with 1 min rest between sonications). Then, TritonX-100 was added to a final concentration of 1%, the mix was incubated for 20 min and centrifuged at 12,000 $\times$  g (4 °C) for 20 min. Examination of Coomassie blue stained gels revealed that after induction of bacteria transformed with pGEX constructs, the 275 amino acids Ptr peptide was expressed as part of a GST fusion protein. The GST fusion protein was purified using Glutathione Superflow resin (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The release of the recombinant polypeptide from its GST tag was performed by on-column procedure using PreScission protease (GE Healthcare). After the cleavage, the product was dialysed using Amicon (molecular weight cutoff 30 kDa, EMD Millipore) and employed to immunize a rabbit. Freund's complete and incomplete adjuvants were used for the primary immunization and for subsequent boosts, respectively. After several boosts, the presence of antibodies specific for Ptr was detected in the serum of this animal by Western blot (data not shown). Finally, the serum was affinity purified against Ptr fusion protein without GST. In western blot analysis the antibody was used at a dilution 1:1000 whereas in immunofluorescence the same antibody was used at a dilution 1:100.

The same 825 bp fragment of Ptr was PCR amplified and cloned into pTrcHis2Topo vector (Invitrogen). The resulting histidine-tagged protein was purified using Ni-NTA agarose (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and employed as positive control on western blot studies.





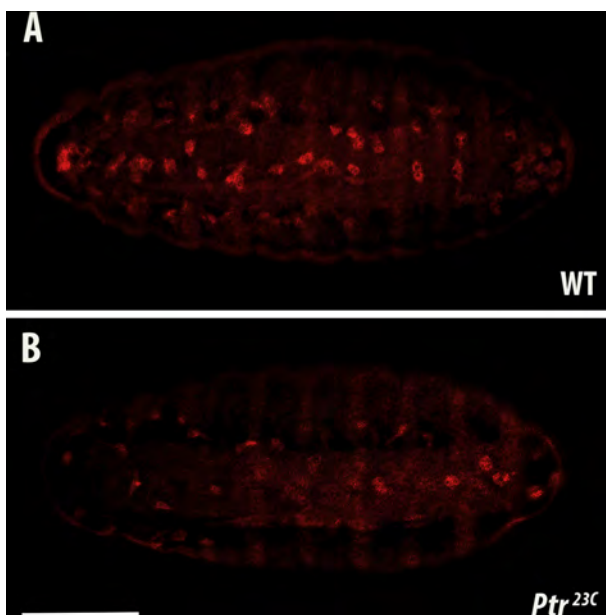
**Fig. 4.** *Ptr*-null mutant embryos lack of anti-*Ptr* immunoreactivity. (A) Schematic representation of the *Ptr* genomic region. The intron-exon structures of *Ptr* and two adjacent genes, CG30432 and CG8335, depicting translated regions (orange bars) and untranslated regions (grey bars) are indicated. *Ptr* transcriptional start sites are indicated by arrows. The blue triangle indicates the site of the PSUPor-P element insertion, from which the line *Ptr*<sup>23C</sup> was generated by imprecise excision. The extent of the deletion is indicated by red arrows. (B) To detect *Ptr* transcripts RT-PCR assays were performed using cDNA samples from wild type (WT) or *Ptr*<sup>23C</sup> mutant embryos and a pair of primers that annealed with exons 3 and 7 of *Ptr*. (*Ptr* ex3-s and *Ptr* ex7-a in Table 1). Using the same primers, genomic DNA (gDNA) from wild type embryos was also amplified. In wild type embryos *Ptr* transcripts were present whereas in *Ptr*<sup>23C</sup> mutant embryos the transcripts were absent. (C and D) Lateral views of a wild type stage 14 embryo stained with anti-*Ptr* (red) and DAPI (blue). *Ptr* protein can be detected predominantly in hemocytes. (E and F) Lateral views of *Ptr*-null mutant embryos at similar developmental stage stained with anti-*Ptr* and DAPI, respectively. Anti-*Ptr* staining can not be detected in *Ptr*<sup>23C</sup> mutant embryos. Scale Bar: 50  $\mu$ m.

#### 4.2. Cell cultures and transfection

CI-8 cells (obtained from the *Drosophila* Genomics Resource) were cultured in Shields and Sang M3 insect medium (Sigma) supplemented with 2% heat-inactivated fetal bovine serum, 2.5% fly extract, 0.5 mg/ml insulin and antibiotics. To overexpress *Ptr*, cells were transfected with 2  $\mu$ g of pMT/V5-His-Topo (Invitrogen) vector containing the coding sequence of gene *Ptr* (residues 1 to 1129) using Calcium phosphate transfection kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Expression of the constructs was induced 48 h post-transfection by adding CuSO<sub>4</sub> to the cell medium (final concentration 0.5 mM). After 24 h, induced and uninduced (control) cells were harvested, transferred onto coverslips, and fixed with 4% paraformaldehyde.

#### 4.3. Cell lysate and western blotting

Cell extract was obtained by lysing with 600  $\mu$ l cold lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail) three 60 mm culture dishes of ci-8 cells induced or uninduced with CuSO<sub>4</sub> to express *Ptr*-V5. The lysate was centrifuged for 10 min at 16,000 $\times$  g at 4  $^{\circ}$ C and the supernatant was stored at -80  $^{\circ}$ C. Protein determination was performed on aliquots using Bradford reagent (Fermentas). To detect the presence of *Ptr*-V5, 16  $\mu$ g of the cell lysate was separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for 2 h at 100 V. Before loading the gel, the samples were incubated with Laemmli sample buffer 30 min at 37  $^{\circ}$ C (not boiled) to avoid the formation of protein aggregates. The membrane was blocked (5% low-fat milk in Tris-buffered saline pH 7.4) for 1 h at room temperature and



**Fig. 5.** Hemocytes detection in wild type and *Ptr*<sup>23C</sup> embryos. Whole mounts of wild type (A) and *Ptr*<sup>23C</sup> (B) embryos at stage 15/16 stained with anti-fascin antibody which labels hemocytes, epidermal cells and central nervous system. Images correspond to ventral views of embryos with the anterior end to the left. Homozygous mutant embryos were distinguished by the lack of *lacZ* product detection in double immunofluorescence assays with an anti-beta galactosidase antibody. Scale bar: 50  $\mu$ m.

incubated for 16 h at 4 °C with rabbit anti-Ptr or mouse anti-V5 (Santa Cruz Biotechnology) antibodies diluted 1:1000 and 1:100. To detect the primary antibodies, anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies conjugated to peroxidase were used (Thermo Scientific).

#### 4.4. Immunostaining of cells and embryos

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100 for 15 min, and then incubated in blocking buffer (3% BSA 0.1% Triton X-100 in PBS) for 45 min prior to incubation with primary antibodies: monoclonal anti-V5 (1:500, Sigma) and polyclonal anti-Ptr (1:100). Cells were washed three times in PBS plus 0.1% Triton and incubated with the secondary antibodies and probes: anti-mouse Alexa 488 (Molecular Probes, 1:800), anti-rabbit Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, 1:800) and DAPI (Molecular Probes, 1:5000).

Embryos of all stages were collected from grape juice agar plates and dechorionated (50% commercial bleach solution in PBS, 0.05% Triton X-100). Embryos were staged, fixed in a 1:1 (v/v) mixture of n-heptane and 4% formaldehyde for 30 min, and their devitellinisation was performed by the hand-peeling procedure. Embryos were then postfixed in 4% paraformaldehyde (Sigma–Aldrich) for 20 min, incubated at 4 °C for 30 min in blocking buffer (3% BSA, 0.1% Triton X-100, 50 mM glycine in PBS), and then incubated with Ptr affinity purified antibody (diluted 1:100) or anti-Ptc (Apa1, Development Studies Hybridoma Bank-DSHB, diluted 1:100) or anti-fascin (sn 7C, DSHB, diluted 1/20) or anti-β-galactosidase (Hybridoma Bank, diluted 1:10 or eBioscience, diluted 1:400). After overnight incubation at 4 °C the embryos were washed four times (15 min each) with blocking buffer and incubated for 1 h with anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:800, Molecular Probes) or anti-rabbit Cy3 antibodies (1:1000 Jackson ImmunoResearch). DAPI (1:5000, Molecular Probes) was added together with the secondary antibodies to stain the nuclei. Digital images were captured with laser confocal microscopy using either a Leica TCS-SP5-DMI6000 or a Nikon C2 Plus-SiR microscope.

#### 4.5. Electron microscopy

Embryos were collected and fixed for 1 h in a 1:1 mixture of heptane and freshly prepared 4% paraformaldehyde (Fluka) in PBS (pH 7.3) at room temperature. Then, embryos were manually devitellinized in PBS, transferred again to fixative for 30 min, washed in PBS and incubated in 3% BSA, 0.03% saponin and 1% goat serum in PBS for 40 min (two changes). The embryos were incubated with anti-Ptr antibody diluted 1/20 in the same buffer and incubation was performed for 16 h at 4 °C. Then, embryos were washed and incubated with secondary antibodies conjugated to 15 nm colloidal gold particles (anti-rabbit, EMS) in the same buffer for 1 h at room temperature. The embryos were then washed in PBS plus 0.03% saponin and incubated for 60 min, post-fixed in 2.5% glutaraldehyde (Fluka) in PBS for 10 min and washed again using PBS and stained overnight at 4 °C with 2% uranyl acetate (Merck). Then, the samples were dehydrated through an acetone series and embedded in Araldite for sectioning. Thin sections were obtained with a RMC MT-X ultramicrotome, stained with lead citrate, observed under a JEOL JEM-1010 transmission electron microscope and photographed using Hamamatsu Digital Camera CCD 4742–95.

#### 4.6. *Drosophila* strains and genetic manipulations

All *Drosophila* stocks were maintained and crossed at 25 °C according to standard procedures. The *Ptr* mutant lines were generated by imprecise excision using the following stocks:  $w^{67c23}$ , P

$\{y^{+mDint2}, w^{BR.E.BR} = \text{SUPor-P}\} \text{KG01682}$  (P element line),  $w^*$ ;  $wg^{Sp-1}/\text{CyO}$ ;  $ry^{506}$ ,  $Dr^1$ ,  $P\{ry^{+t7.2} = \text{Delta2-3}\}99B/\text{TM6}$  (transposase line),  $wg^{Sp-1}$ ,  $J^1$ ,  $L^2$ ,  $Pin^1/\text{CyO}$ ,  $P\{ry^{+t7.2} = \text{ftz}/\text{lacB}\}E3$  (CyO balancer line). The primer sequences used to characterize the deletion are described in Table 1. For lethal phase determination we balanced *Ptr* alleles over *CyO*, *kr*–GFP balancer gently donated by R. Cantera. Each mutant line was crossed with wild-type (Canton-S strain) flies. Males and females heterozygous for the mutation ( $Ptr^{23C}/+$ ) were subsequently crossed to each other. Embryonic hemocytes were detected using embryos from a cross between  $y^1 w^*$ ;  $P\{w^{+mC} = \text{crq-GAL4}\} 2$  (*crq*-GAL4) and  $w^{1118} w^*$ ;  $P\{UAS-lacZ-B\}Bg4-2-4b$  (UAS-lacZ). All the stocks were obtained from the Bloomington Stock Center.

#### 4.7. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

The 5'-end of the *Ptr* transcript was amplified using the RLM-RACE GeneRacer™ kit, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Carlsbad, CA). Briefly, 5 μg of total RNA from *Drosophila melanogaster* stage 5–7 embryos was used as starting material. The adaptor-ligated cDNA was PCR amplified using Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen Carlsbad, CA), GeneRacer™ 5' Primer and 10 μM of gene-specific primer RACE11212-a2 under the following conditions: 2 min at 94 °C, 5 cycles of 30 s at 94 °C and 40 s at 72 °C, 5 cycles of 30 s at 94 °C and 40 s at 70 °C and 25 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 65 °C and 40 s at 68 °C. The resulting PCR products were used in a Nested PCR reaction with GeneRacer™ 5' Nested Primer and the gene-specific primer RACE 11212-a1 (see primer sequences in Table 1). The Nested PCR program comprises 2 min at 94 °C and 25 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 65 °C and 2 min at 68 °C. The PCR products were cloned into pGEM-T Easy vector and sequenced.

#### 4.8. Embryo genotyping

The method for genotyping was described by Ghanim and White (Ghanim and White, 2006). Briefly, heterozygous fly lines carrying the *Ptr* mutation were allowed to lay eggs on grape agar plates for 1 h. The collected embryos were dechorionated in 50% bleach and staged under light microscope. To perform RNA extraction of 10–15 homozygous embryos, one hundred embryos in stage 5 of development were selected and individually transferred into PCR tube containing 14.5 μl of extraction buffer (100 mM Tris–HCl pH8.2, 1 mM EDTA and 25 mM NaCl). After homogenization with a pipette tip, 11 μl from each single embryo extract were individually stored in a new tube containing 30 μl of RNAwiz reagent from Ambion (Austin, TX, USA) and frozen (–20 °C) to preserve RNA integrity. The remaining extract (3.5 μl) was incubated at

**Table 1**  
Primers used in this study.

Primers used to characterize the deletion			
Name	Length (bp)	Tm (°C)	Sequence (5' 3')
UpPtr2-s	1853	62	GTTTTTCTGGGCTCAGTCGG
UpPtr5-as		60	CACCCAGGTCTGTGTTGAAG
UpPtr3-s	1637	62	GCGGCAAGACAATGAGAGA
UpPtr4-as		60	TTGGAGTCCGAGTTAAGCCT
Primers used in RT-PCR and RACE analyses			
Name	Length (bp)	Tm (°C)	Sequence (5' 3')
Ptr ex3-s	1395 gDNA	72	AACAGACATTGGCTGGACAC
Ptr ex7-a	1065 cDNA	72	TTCCGGCGAGTCATTGTGA
RACE 11212-a1		72	TCGTTATCGCTCCGACGTTAAAGC
RACE 11212-a2		72	ACGTATAGGTATCACCATCATAAGT

28 °C for 30 min with 200 µg/ml of proteinase K (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), followed by incubation at 95 °C for 2 min. After the incubation with proteinase K the extract was used in PCR. In our case, absence of *lacZ* or GFP specific band together with the presence of a control band (gene CG9650) were indicators of homozygous lethal embryos.

#### 4.9. RNA extraction

Extracts of homozygous mutant staged embryos preserved in RNA<sub>WIZ</sub> reagent (N = 10 to 15) were pooled adding 300 µl of the reagent. To perform adequate tissue disaggregation, the samples were carefully homogenized in a 1.5 ml Eppendorf tube on ice with the aid of RNase-free polypropylene pellet pestle. After complete the volume of each sample up 1 ml with RNA<sub>WIZ</sub>, RNA extraction was performed using standard protocols. To increase the recovery of RNA, precipitation was made with the addition of glycogen (Ambion, Austin, TX, USA) to the isopropanol step. After 15 min of centrifugation at 13,000× g, RNA quality and quantity was evaluated by spectrophotometry (OD260/280) and by electrophoresis (1.2% formaldehyde-agarose gel). Samples were treated with TURBO DNA-free DNase (Ambion, Austin, TX, USA) to remove contaminating DNA.

#### Acknowledgements

We would like to thank Soledad Astrada, Lucía Guggeri, Lucía Pastro and Fiorella Scandroglio for their technical assistance; Beatriz Garat and Rafael Cantera for their advice and critical comments during this work; and the Bloomington *Drosophila* Stock Center for providing stocks used in this study. The Apa1 monoclonal anti-Ptc developed by Isabel Guerrero, the 40-1a monoclonal anti-Galactosidase developed by Joshua Sanes and sn 7C monoclonal anti-fascin developed by Lynn Cooley were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. Some materials were received through the *Drosophila* Genomics Resource Center. This work was supported by CSIC I+D 2010 to CB and Fondecyt N° 1120254 to VC. CP and FR were supported by CSIC I+D 2010. AZ was supported by Postdoctoral Fondecyt N° 3110147. CB was also supported by fellowships from: CSIC (Programa de Recursos Humanos), PEDECIBA, AMSUD-Pasteur (Regional Training Fellowship Program) and Proyecto 720 (Contrapartida Convenios-UdelaR).

#### References

- Abrams, J.M., White, K., Fessler, L.L., Steller, H., 1993. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 117 (1), 29–43.
- Bellen, H.J., Levis, R.W., Liao, G., He, Y., Carlson, J.W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P.R., Schulze, K.L., Rubin, G.M., et al., 2004. The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* 167 (2), 761–781.
- Brown, N.H., 1994. Null mutations in the alpha PS2 and beta PS integrin subunit genes have distinct phenotypes. *Development* 120 (5), 1221–1231.
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.A., Dickson, B.J., Basler, K., 1999. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99 (7), 803–815.
- Capdevila, J., Pariente, F., Sampietro, J., Alonso, J.L., Guerrero, I., 1994. Subcellular localization of the segment polarity protein patched suggests an interaction with the wingless reception complex in *Drosophila* embryos. *Development* 120 (4), 987–998.
- Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., et al., 1997. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277 (5323), 228–231.
- Casso, D., Ramirez-Weber, F.A., Kornberg, T.B., 1999. GFP-tagged balancer chromosomes for *Drosophila* melanogaster. *Mech. Dev.* 88 (2), 229–232.
- Cecchini, J.P., Knibiehler, B., Mirre, C., Le Parco, Y., 1987. Evidence for a type-IV related collagen in *Drosophila melanogaster*. Evolutionary constancy of the carboxyl-terminal noncollagenous domain. *Eur. J. Biochem. FEBS* 165 (3), 587–593.
- Chen, Y., Struhl, G., 1996. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87 (3), 553–563.
- Cho, N.K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F., Krasnow, M.A., 2002. Developmental control of blood cell migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell* 108 (6), 865–876.
- Evans, I.R., Zanet, J., Wood, W., Stramer, B.M., 2010. Live imaging of *Drosophila melanogaster* embryonic hemocyte migrations. *J. Vis. Exp. JoVE* 36.
- Fessler, J.H., Fessler, L.L., 1989. *Drosophila* extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 309–339.
- Fogerty, F.J., Fessler, L.L., Bunch, T.A., Yaron, Y., Parker, C.G., Nelson, R.E., Brower, D.L., Gullberg, D., Fessler, J.H., 1994. Tiggrin, a novel *Drosophila* extracellular matrix protein that functions as a ligand for *Drosophila* alpha PS2 beta PS integrins. *Development* 120 (7), 1747–1758.
- Franc, N.C., Dimarq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., Ezekowitz, R.A., 1996. Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* 4 (5), 431–443.
- Franc, N.C., Heitzler, P., Ezekowitz, R.A., White, K., 1999. Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* 284 (5422), 1991–1994.
- Ghanim, M., White, K.P., 2006. Genotyping method to screen individual *Drosophila* embryos prior to RNA extraction. *BioTechniques* 41 (4), 414, 416, 418.
- Graveley, B.R., Brooks, A.N., Carlson, J.W., Duff, M.O., Landolin, J.M., Yang, L., Artieri, C.G., van Baren, M.J., Boley, N., Booth, B.W., et al., 2011. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471 (7339), 473–479.
- Hampton, R.Y., 2002. Proteolysis and sterol regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 345–378.
- Heino, T.I., Karpanen, T., Wahlstrom, G., Pulkkinen, M., Eriksson, U., Alitalo, K., Roos, C., 2001. The *Drosophila* VEGF receptor homolog is expressed in hemocytes. *Mech. Dev.* 109 (1), 69–77.
- Hooper, J.E., Scott, M.P., 1989. The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* 59 (4), 751–765.
- Ingham, P.W., Taylor, A.M., Nakano, Y., 1991. Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature* 353 (6340), 184–187.
- Kusche-Gullberg, M., Garrison, K., MacKrell, A.J., Fessler, L.L., Fessler, J.H., 1992. Laminin A chain: expression during *Drosophila* development and genomic sequence. *EMBO J.* 11 (12), 4519–4527.
- Kuwabara, P.E., Labouesse, M., 2002. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet.* 18 (4), 193–201.
- Le Parco, Y., Knibiehler, B., Cecchini, J.P., Mirre, C., 1986. Stage and tissue-specific expression of a collagen gene during *Drosophila melanogaster* development. *Exp. Cell Res.* 163 (2), 405–412.
- Manaka, J., Kurashiki, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P., Nakanishi, Y., 2004. Draper-mediated and phosphatidylinositol-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J. Biol. Chem.* 279 (46), 48466–48476.
- Mirre, C., Cecchini, J.P., Le Parco, 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 (2), 369–376.
- Nybo, K., 2012. Molecular biology techniques Q&A. Western blot: protein migration. *BioTechniques* 53 (1), 23–24.
- Olofsson, B., 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 (1), 233–243.
- Pastenes, L., Ibanez, F., Bolatto, C., Pavez, L., Cambiazo, V., 2008. Molecular characterization of a novel patched-related protein in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 68 (3), 156–170.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V.G., Chen, G., Deber, C.M., 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (6), 1760–1765.
- Robertson, H.M., Preston, C.R., Phillis, R.W., Johnson-Schlitz, D.M., Benz, W.K., Engels, W.R., 1988. A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118 (3), 461–470.
- Schmid, A., Schindelholz, B., Zinn, K., 2002. Combinatorial RNAi: a method for evaluating the functions of gene families in *Drosophila*. *Trends Neurosci.* 25 (2), 71–74.
- Sears, H.C., Kennedy, C.J., Garrity, P.A., 2003. Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal *Drosophila* CNS morphogenesis. *Development* 130 (15), 3557–3565.
- Seegmiller, A.C., Dobrosotskaya, I., Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Brown, M.S., Rawson, R.B., 2002. The SREBP pathway in *Drosophila*: regulation by palmitate, not sterols. *Dev. Cell* 2 (2), 229–238.
- Stronach, B.E., Renfranz, P.J., Lilly, B., Beckerle, M.C., 1999. Muscle LIM proteins are associated with muscle sarcomeres and require dMEF2 for their expression during *Drosophila* myogenesis. *Mol. Biol. Cell* 10 (7), 2329–2342.
- Taipale, J., Cooper, M.K., Maiti, T., Beachy, P.A., 2002. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 418 (6900), 892–897.
- Taylor, A.M., Nakano, Y., Mohler, J., Ingham, P.W., 1993. Contrasting distributions of patched and hedgehog proteins in the *Drosophila* embryo. *Mech. Dev.* 42 (1–2), 89–96.
- Tepass, U., Fessler, L.L., Aziz, A., Hartenstein, V., 1994. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* 120 (7), 1829–1837.

- Witsch-Baumgartner, M., Löffler, J., Utermann, G., 2001. Mutations in the human DHCR7 gene. *Hum. Mutat.* 17 (3), 172–182.
- Wood, W., Jacinto, A., 2007. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (7), 542–551.
- Wood, W., Faria, C., Jacinto, A., 2006. Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* 173 (3), 405–416.
- Wright, T.R., 1960. The phenogenetics of the embryonic mutant, lethal myospheroid, in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 143, 77–99.
- Yarnitzky, T., Volk, T., 1995. Laminin is required for heart, somatic muscles, and gut development in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* 169 (2), 609–618.
- Yasothornsrikul, S., Davis, W.J., Cramer, G., Kimbrell, D.A., Dearolf, C.R., 1997. viking: identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene* 198 (1–2), 17–25.
- Yoshida, H., Fuwa, T.J., Arima, M., Hamamoto, H., Sasaki, N., Ichimiya, T., Osawa, K., Ueda, R., Nishihara, S., 2008. Identification of the *Drosophila* core 1 beta1,3-galactosyltransferase gene that synthesizes T antigen in the embryonic central nervous system and hemocytes. *Glycobiology* 18 (12), 1094–1104.
- Zanet, J., Stramer, B., Millard, T., Martin, P., Payre, F., Plaza, S., 2009. Fascin is required for blood cell migration during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 136 (15), 2557–2565.
- Zugasti, O., Rajan, J., Kuwabara, P.E., 2005. The function and expansion of the Patched- and Hedgehog-related homologs in *C. elegans*. *Genome Res.* 15 (10), 1402–1410.
- Zuniga, A., Hodar, C., Hanna, P., Ibanez, F., Moreno, P., Pulgar, R., Pastenes, L., Gonzalez, M., Cambiazo, V., 2009. Genes encoding novel secreted and transmembrane proteins are temporally and spatially regulated during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *BMC Biol.* 7, 61.



# BMC Developmental Biology

## Functional and genetic assays of Patched-related protein in *Drosophila* suggest a role within Hedgehog signalling pathway

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Functional and genetic assays of Patched-related protein in <i>Drosophila</i> suggest a role within Hedgehog signalling pathway
<b>Article Type:</b>	Research article
<b>Section/Category:</b>	Early development
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background</b>            In <i>Drosophila melanogaster</i> Patched-related (Ptr) is a multipass transmembrane protein containing a sterol-sensing domain that shares common characteristics with Patched (Ptc) and Ptr proteins from <i>C. elegans</i>. In <i>C. elegans</i> this sterol-sensing domain family of proteins is involved in cell growth, patterning and molting but there is no conclusive evidence of its function in other organisms. Using a genetic approach, RNA interference and cell-based reporter gene assays we investigated the possibility that Ptr could act in Hedgehog (Hh) signalling pathway in <i>Drosophila</i>.</p> <p><b>Results</b>            Ptr transcript was first detected in the dorsal side of cellular blastoderm embryos and during gastrulation; it was highly expressed in eight stripes along the anterior-posterior axis of the embryo. We used a luciferase based cell culture assay for Hh signal transduction along with over-expression or RNAi targeting of Ptr to show that Ptr acts as a negative regulator of Hh signalling. The use of this approach allowed us to place Ptr activity upstream or at the same level of Ptc and upstream of the positive regulators Ihog and Smo. Co-immunoprecipitation assays using cell culture extracts premixed with conditioned medium suggested a direct interaction between Ptr and Hh. Loss-of-function of Ptr caused a denticle-belt phenotype and led to increased lethality at late developmental stages. These two characteristics are consistent with the participation of Ptr in Hh pathway and were recapitulated by Ptr RNA interference in transgenic flies expressing a UAS-PtrIR under the control of different drivers.</p> <p><b>Conclusions:</b>            Our data indicate that in <i>Drosophila</i> Ptr has a role in patterning during early embryogenesis, probably acting as a negative regulator of the Hh pathway.</p>
<b>Corresponding Author:</b>	Veronica Cambiazo, Ph.D. INTA-Universidad de Chile Santiago, CHILE
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	INTA-Universidad de Chile
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Carmen Bolatto
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Carmen Bolatto Cristina Parada Fiorella Revello Alejandro Zuñiga Veronica Cambiazo, Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	

1 **Title**

2

3 **Functional and genetic assays of Patched-related protein in *Drosophila***  
4 **suggest a role within Hedgehog signalling pathway.**

5

6 <sup>1</sup>Carmen Bolatto, <sup>1</sup>Cristina Parada, <sup>1</sup>Fiorella Revello, <sup>2</sup>Alejandro Zuñiga, <sup>2</sup>Verónica  
7 Cambiazo<sup>§</sup>

8

9 <sup>1</sup>Laboratorio de Biología del Desarrollo, Departamento de Histología y  
10 Embriología, Facultad de Medicina-Universidad de la República, Montevideo,  
11 Uruguay.

12 <sup>2</sup>Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, INTA-Universidad de Chile  
13 and Fondap Center for Genome Regulation (CGR), Santiago, Chile.

14

15 <sup>§</sup>Corresponding author

16

17 Email addresses:

18 CB: [cbolatto@fmed.edu.uy](mailto:cbolatto@fmed.edu.uy)

19 CP: [cristinap@fmed.edu.uy](mailto:cristinap@fmed.edu.uy)

20 FR: [fiorev85@gmail.com](mailto:fiorev85@gmail.com)

21 AZ: [jano@inta.uchile.cl](mailto:jano@inta.uchile.cl)

22 VC: [vcambiaz@inta.cl](mailto:vcambiaz@inta.cl)

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 34 Abstract

## 36 Background

37 In *Drosophila melanogaster* Patched-related (Ptr) is a multipass transmembrane  
38 protein containing a sterol-sensing domain that shares common characteristics  
39 with Patched (Ptc) and Ptr proteins from *C. elegans*. In *C. elegans* this sterol-  
40 sensing domain family of proteins is involved in cell growth, patterning and  
41 molting but there is no conclusive evidence of its function in other organisms.  
42 Using a genetic approach, RNA interference and cell-based reporter gene assays  
43 we investigated the possibility that Ptr could act in Hedgehog (Hh) signalling  
44 pathway in *Drosophila*.

## 46 Results

47 *Ptr* transcript was first detected in the dorsal side of cellular blastoderm  
48 embryos and during gastrulation; it was highly expressed in eight stripes along  
49 the anterior-posterior axis of the embryo. We used a luciferase based cell culture  
50 assay for Hh signal transduction along with over-expression or RNAi targeting of  
51 *Ptr* to show that *Ptr* acts as a negative regulator of Hh signalling. The use of this  
52 approach allowed us to place *Ptr* activity upstream or at the same level of *Ptc* and  
53 upstream of the positive regulators *Ihog* and *Smo*. Co-immunoprecipitation  
54 assays using cell culture extracts premixed with conditioned medium suggested  
55 a direct interaction between *Ptr* and Hh. Loss-of-function of *Ptr* caused a  
56 denticle-belt phenotype and led to increased lethality at late developmental  
57 stages. These two characteristics are consistent with the participation of *Ptr* in  
58 Hh pathway and were recapitulated by *Ptr* RNA interference in transgenic flies  
59 expressing a UAS-*Ptr*IR under the control of different drivers.

## 61 Conclusions:

62 Our data indicate that in *Drosophila* *Ptr* has a role in patterning during early  
63 embryogenesis, probably acting as a negative regulator of the Hh pathway.

67 **Keywords**

68 *Drosophila*, embryogenesis, Hedgehog receptor, Hedgehog signalling, Patched-  
69 related.

71 **Background**

72 Patched (Ptc) and Patched-related (Ptr) are two of the seven families of proteins  
73 that are presently known to share a phylogenetically conserved domain trough  
74 in the metazoans, known as the sterol-sensing domain (SSD) [1]. Ptc was  
75 originally identified because of its role in patterning the *Drosophila* embryo [2].  
76 More recently, its malfunction in humans was associated with the initiation and  
77 growth of a variety of deadly cancers [3]. The Ptc protein has 12-transmembrane  
78 domains, including the SSD, and two large extracellular loops implicated in  
79 binding Hedgehog (Hh) [4, 5]. This binding is the key to the release of  
80 Smoothened (Smo) from Ptc inhibition, leading to the activation of an  
81 intracellular signal cascade that activates the latent cytoplasmic transcription  
82 factors Cubitus interruptus (Ci) in *Drosophila* or the homologous Gli proteins in  
83 vertebrates. These proteins subsequently stimulate the transcriptional activation  
84 of several target genes of the Hh pathway. The model for Hh signalling in  
85 *Drosophila* originally was developed on the observation and characterization of  
86 abnormal cuticle morphology in mutant embryos. In *hh* mutants, for example, a  
87 zone of the cuticle that is normally devoid of denticles (“naked”) in the posterior  
88 region of each body segment, becomes covered by denticles [2]. In some other  
89 mutants the denticles are oriented in the wrong direction, indicating a segment  
90 polarity phenotype. The genes and proteins members of this pathway are  
91 reviewed in [2, 6, 7].

92 Ptr was first described in *C. elegans*, where [8, 9] functional studies suggested  
93 that *C. elegans*’ Ptrs are involved in cell growth, patterning and molting [8]. The  
94 *Drosophila* Ptr gene was originally isolated in a subtractive hybridization  
95 screening designed to identify genes that are differentially expressed at the  
96 beginning of gastrulation [10]. We cloned the gene and deduced that the product  
97 is a 1,061 amino acid protein closely related in predicted topology and domain  
98 organization to the protein encoded by the *Drosophila* segment polarity gene *ptc*.  
99 In addition, our biochemical analysis revealed that Ptr was associated with

100 embryo membranes and immunohistochemistry analyses allowed us to localize  
101 this protein to the growing plasma membranes in *Drosophila* blastoderms [11].  
102 Based on the above observations of *Ptr* protein characteristics and subcellular  
103 localization we sought to investigate whether *Ptr* might act an alternative  
104 receptor to change the cell affinity for Hh, the specificity of the signalling, or to  
105 provide an alternative mechanism for diversification of cell responses. The  
106 possibility that *Ptr* might act as an additional receptor in the Hh pathway was  
107 made by others before [12-14] and encouraged the present study.  
108 Here we further characterize *Ptr* expression during embryogenesis and present  
109 genetic, biochemical and molecular evidence indicative of *Ptr* involvement in the  
110 Hh pathway, probably acting as an alternative receptor for Hh ligand.

111

## 112 **Results**

### 113 **Expression pattern of *Ptr* during embryogenesis**

114 The spatiotemporal pattern of *Ptr* mRNA expression during embryonic  
115 development was analysed by *in situ* hybridization (Figure 1A). *Ptr* transcripts  
116 were first detected in the early cellular blastoderm embryo (a). At this stage *Ptr*  
117 was highly expressed in the dorsal-lateral region of the embryo. During  
118 gastrulation and germ band extension *Ptr* was expressed in eight stripes along  
119 the anterior-posterior axis of the embryo (b-c). At later stages of embryogenesis  
120 the expression of *Ptr* became restricted to the cephalic region (d, arrow). The  
121 results of real-time PCR showed that *Ptr* reached a peak of expression at stage 5  
122 of embryogenesis and its expression significantly decreased at later stages of  
123 embryogenesis (Figure 1B). Based on the observed expression pattern of *Ptr*, we  
124 analysed the changes in gene expression in ventralized embryos laid by *Toll*<sup>10B</sup>  
125 mutant females that carry a dominant, activated allele of Toll [15]. In *Toll*<sup>10B</sup>  
126 mutant embryos early expression of *Ptr* is greatly reduced as shown by QPCR  
127 assays and *in situ* hybridization (Figure 1C and D, respectively), indicating that  
128 *Ptr* is a direct or indirect target gene of the transcription factor Dorsal and  
129 placing it within Dorsal gene regulatory network [16].

130

131

132

### 133 **Ptr functions as a negative component of the Hh pathway in cl-8 cells**

134 To evaluate the involvement of Ptr in the Hh pathway, we used a cultured cell-  
135 based reporter assay developed by Philip Beachy's group [17, 18], which is  
136 quantitative, specific for cellular response and has been successfully used to  
137 identify new components of the Hh pathway [19]. In these assays, clone-8 (cl-8)  
138 cells were treated with control or *Ptr*-specific dsRNA and assayed for changes in  
139 Hh-mediated induction of an Hh pathway-responsive luciferase reporter (*ptc*-  
140 luciferase reporter construct) [17, 18]. We used this strategy since RNAi in  
141 *Drosophila* cultured cells is frequently employed as a functional test of gene  
142 products of known or predicted sequence [17-19]. The transfection of *Ptr* dsRNA  
143 caused an exclusive reduction in *Ptr* mRNA levels (Figure 2A) and a moderate  
144 increase in the response to Hh signalling (Figure 2B). On the other hand,  
145 transfection of cells with a *Ptr* DNA construct to obtain cells with higher levels of  
146 Ptr protein (Figure 2C) produced a strong and opposite effect on Hh pathway  
147 activity (Figure 2D). The observed effect suggest that normal levels of Ptr in cl-8  
148 cells could be acting as limiting factor in the response to Hh signalling. These  
149 results suggest that Ptr can respond to Hh ligand, and that the type of response is  
150 connected with the level of Ptr expression in the cell.

151 To investigate the role of the Ptr protein in Hh signalling with regards to Ptc, we  
152 performed luciferase reporter assays in cl-8 cells to provoke down-regulation of  
153 Ptc via dsRNA together with down-regulation or over-expression of Ptr. Whereas  
154 the over-expression of Ptr was able to suppress the increase in Hh pathway  
155 activity produced by *ptc* dsRNA (Figure 3A), the co-transfection with *ptc* and *Ptr*  
156 dsRNAs produced an activation of the signalling pathway stronger than the  
157 activation detected by separate transfections with dsRNAs targeting each gene  
158 (Figure 3B). These results not only indicate that Ptr functions upstream or at the  
159 same level of Ptc in the Hh signalling cascade but also suggest the existence of an  
160 synergic effect of both transmembrane proteins on Hh signalling pathway.

161 To further investigate the mechanism of Ptr action on the Hh response, we  
162 examined the effect produced by cell transfection with dsRNA of *Ptr* in  
163 combination with dsRNAs targeting two other known pathway components.  
164 Simultaneous transfection of *Ptr* dsRNA and either *ihog* or *smo* dsRNA showed  
165 that Smo and Ihog functions are required for activation of the Hh pathway by

166 RNAi of *Ptr* (Figure 3C, D). These results suggest that *Ptr* acts upstream of these  
167 two components of the Hh signalling pathway. Taken together the results  
168 indicate the participation of *Ptr* in the Hh pathway upstream or at the same level  
169 of *Ptc* and points to a role in the regulatory mechanism of the signal transduction  
170 of Hh.

171

### 172 ***In vitro* binding of *Ptr* and Hh**

173 The response observed in the cell-based reporter gene assay and the observation  
174 that *Ptr* is a membrane protein [11], raises the question of whether *Ptr* can  
175 interact directly with Hh, in order to test this possibility, we employed an  
176 immunoprecipitation assay. In doing so, cl-8 cells over-expressing a *Ptr*-V5  
177 fusion protein were pre-incubated with conditioned HhN medium and the  
178 lysates were immunoprecipitated with mouse anti-V5 antibody (for details see  
179 Methods). The identification of co-immunoprecipitated molecules was  
180 performed by Western blot analysis using antibodies anti-V5 and anti Hh. Both  
181 *Ptr* and HhN were identified in the immunocomplexes, indicating a direct  
182 interaction between both proteins (Figure 4). The apparent molecular weights of  
183 *Ptr* and heavy/light chains of anti-V5 are slightly different than predicted (for  
184 *Ptr*-V5 a signal at 120KDa was predicted, instead of 95KDa). This biochemical  
185 behaviour, termed “gel shifting”, was reported previously in other studies and  
186 appears to be frequent for membrane proteins [20, 21]. The origin of gel shift  
187 behaviour might derive from altered binding caused by the detergent. In our  
188 experiment, the need to avoid boiling of the sample to prevent protein  
189 aggregation conspired against the uniform binding of SDS to the sample proteins  
190 (see Methods). Thus, the data obtained using this method indicates that *Ptr* was  
191 able to bind Hh.

192

### 193 **Generation of a *Ptr* mutant**

194 To investigate the physiological function of *Ptr*, we searched the Flybase for P-  
195 element insertion lines near *Ptr* gene and identified the line PSUPor-PKG01682  
196 in which the PSUPor-P element [22] was adjacent to the predicted 5`-UTR of *Ptr*.  
197 The line was homozygous viable lacking an obvious mutant phenotype. To  
198 identify the complete 5`-UTR of *Ptr* gene, we performed a 5` Race using embryos

199 at stage 5. Sequencing of the 5` Race PCR products revealed two 5`-UTR  
200 sequences, 5`-UTR 1 (357 bp) and 5`-UTR 2 (614 bp) (data not shown). Based on  
201 EST (expressed sequence tag) sequence data, the 5`-UTR 1 appears to be  
202 predominantly transcribed (FlyBase, <http://flybase.bio.indiana.edu>). This result  
203 allowed us to map the insertion site of the P-element 335 bp 5` of the 5`-UTR 1.  
204 To obtain mutants for *Ptr* we mobilized the P element in a standard cross with  
205 the  $\Delta 2-3$  strain, which stably expresses transposase [23], then flies were  
206 generated and selected in which imprecise excision events eliminated the P-  
207 element. We recovered one excision line (23C) that was homozygous lethal, the  
208 extent of the genomic deletion is shown in Figure 5A. Line 23C has a deletion of  
209 3,852 bp removing the transcription start site and 1,212 bp encoding the 5`-UTR  
210 and the first intron of the gene. In the 23C line the neighbouring gene CG30432 is  
211 completely deleted. CG30432 is reported as a gene moderately expressed in  
212 imaginal discs and testis, with very low or null expression during embryonic  
213 development [17], suggesting that the phenotypes that we observed were caused  
214 by the mutations in *Ptr*.

215 To test whether this deletion efficiently affected the expression of *Ptr*, a RT-PCR  
216 was performed using a pair of primers that annealed with exons 1 and 2 of *Ptr*.  
217 Amplification products were not recovered when the cDNA of homozygous  
218 mutant embryos from line 23C was used as substrate, whereas *Ptr* fragments of  
219 correct sizes were detected when genomic DNA or cDNA from wild type embryos  
220 were used as substrates for the RT-PCR reactions (Fig. 5B). In addition, line 23C  
221 was balanced with a marked balancer chromosome to distinguish homozygous  
222 mutant embryos by their lack of GFP expression (see Methods, [24]). With the  
223 help of this tool we determined that all the homozygous *Ptr* null embryos (i.e.  
224 GFP negative) die before or short time after hatching. For further phenotypic  
225 analysis, mutant *Ptr* embryos were distinguished by collecting unhatched  
226 progeny (60-72 h after egg laying) and analysing their cuticle patterns. Mutant  
227 embryos consistently showed the fusion of denticle belts (Fig. 5C), as expected if  
228 *Ptr* mutation interfered with the proper functioning of a signal pathway that  
229 specified the segmental pattern of the larvae [2, 6, 19].

230 Then, we used the RNA interference (RNAi) technology to knockdown *Ptr* [25-  
231 28] at early stages of development or in the expression domains of *ptc*. In doing

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

232 so, we generated a transgenic fly line that expresses an inverted repeat of the  
233 first exon of *Ptr* under the control of the UAS promoter in the vector pWIZ (UAS-  
234 *PtrIR*). These transgenic flies were crossed to flies carrying either *nanos*-GAL4,  
235 *mata*-GAL4 (Figure 6B) or *ptc*-GAL4 (Figure 6C) to drive the transcription of the  
236 hairpin-encoding transgene in the progeny. As a control, the GAL4 flies were  
237 crossed with UAS-*lacZ* flies. We examined by QPCR the expression level of *Ptr*  
238 transcript in a group of embryos that exhibited evident morphological  
239 abnormalities and found that the amount of *Ptr* mRNA was reduced by 80 to  
240 85% relative to control embryos (Figure 6A). Examination of embryonic cuticle  
241 preparations showed that consistently with the cuticle malformation phenotype  
242 observed in the P-element excision line, ubiquitous expression of UAS-*PtrIR*  
243 produced denticle belt fusions. Likewise, the expression of UAS-*PtrIR* in the  
244 spatio-temporal pattern corresponding to endogenous *ptc* expression produced  
245 similar and somewhat more severe denticle belt fusion phenotypes (Figure 6C).  
246 Embryo viability was affected by *Ptr* RNAi, thus the proportion of unhatched  
247 embryos incremented between 15% and 45% among embryos expressing UAS-  
248 *PtrIR* compared with control embryos (Figure 6D). The variability in the  
249 incidence of embryonic lethality depended on the driver and the RNAi line used  
250 for each cross (data not shown). Therefore, our results showed that loss-of-  
251 function of *Ptr* cause embryonic lethality and a cuticular phenotype of denticle  
252 fusions.

253

## 254 **Discussion**

255 We previously identified *Ptr* as a gene up-regulated in *Drosophila* during  
256 gastrulation by using suppression subtractive hybridization. Sequencing analysis  
257 of *Ptr* indicated that it belongs to a previously uncharacterized transmembrane  
258 protein closely related in predicted topology to *Ptc*. The structural similarities of  
259 *Ptr* and *Ptc* along with the association of *Ptr* with embryo membranes raised the  
260 possibility that *Ptr* could be involved in the Hh signalling pathway. Here, we  
261 investigated whether *Ptr* modulates the Hh response using a cell-based reporter  
262 gene assay. We showed that *Ptr* displayed a type of response that has been  
263 reported as characteristic of negative regulatory components of the pathway  
264 [18]. Thus, RNAi of *Ptr* increased basal reporter activity whereas overexpression

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

265 of *Ptr* suppressed Hh-induced pathway activation. Using the same type of  
266 experimental approach, we also showed that the increase in basal reporter  
267 activity produced by the dsRNA of *Ptr* was enhanced by the dsRNA of *pct*.  
268 These results suggest that the cells could mediate the effects of the Hh by  
269 expressing two different receptors. Moreover, the possibility that cells could  
270 express receptors with different affinities for the ligand was previously indicated  
271 by experiments where a *Ptc* allele that have less affinity to Hh (*Ptc<sup>Con</sup>*), was co-  
272 expressed together with wild type *Ptc* in wing imaginal discs cells. Results  
273 indicated that *Ptc<sup>Con</sup>* competes with the wild type *Ptc* for the binding to Hh so a  
274 cell containing both receptors interprets the level of Hh as lower than expected  
275 by its actual position within the Hh gradient. The difference between cell  
276 affinities implies different states of Ci activity and thus, the activation of different  
277 groups of genes [4]. In our case, the binding of Hh by *Ptr* could regulate its  
278 availability to *Ptc*, as a result a cell that expresses both *Ptr* and *Ptc* could  
279 translate the gradient of Hh signalling into a different transcriptional readout  
280 when compared to a cell expressing predominantly *Ptc*. The possibility of  
281 expressing receptors with different or similar affinities for a ligand would be  
282 important to obtain a higher degree of signalling modulation [29-31]. For  
283 example, in mammals the Hedgehog-interacting protein (*Hhip*) encodes a  
284 membrane glycoprotein that inhibits Hh signalling by physical binding  
285 mammalian Hh proteins [32]. In this sense, the results of our luciferase reporter  
286 assays suggest that normal levels of *Ptr* expressed by *cl-8* cells are a limiting  
287 factor in the response initiated by Hh binding. These results are also consistent  
288 with the possibility that *Ptr* competes with *Ptc* limiting Hh signalling. Another  
289 possibility would be that *Ptr* was sequestering Hh for delivery it to vesicular  
290 pools of *Ptc*, which not only controls the Hh gradient but also regulates the  
291 potential of complexing vesicular *Ptc* with *Smo*.  
292 Beside the core components of Hh signalling pathway in *Drosophila*, several cell  
293 surface proteins have been implicated in modulating the responses to Hh [33]  
294 and the existence of an alternative receptor mediating the Hh signalling has been  
295 proposed. For example, Torroja et al. described the existence of internalized Hh  
296 in mutants that have prevented the internalization of *Ptc* and suggested the  
297 presence of a *Ptc*-independent Hh internalization mechanism [13]. Given that the



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

298 intracellular C-terminal tail of Ptr contains the same motif (PPXY sequence) that  
299 has been proved necessary for endocytosis of Ptc [34], it would be interesting to  
300 know if Ptr has the capacity to mediate the internalization of Hh.  
301 The results of cell-based reporter gene assays showed that Ptr could be acting in  
302 the Hh signalling pathway upstream of Smo. Therefore, a future challenge will be  
303 to investigate whether functional interactions take place between Ptr and Smo.  
304 For example Ptr could affect the intracellular trafficking Smo, given that the  
305 integrity of the SSD domain of Ptc, which is highly conserved in Ptr, seems to be  
306 required for the translocation of Smo to the cell surface [35]. Besides that, an  
307 alternative function as membrane transporter has been proposed for proteins  
308 structurally related to Ptr, such as Ptc, Dispatched and Niemann–Pick protein  
309 (NPC1), based on their overall similarity in membrane topology with members of  
310 the RND family of prokaryotic permeases [36]. Consistently, NPC1 is involved in  
311 the transport of cholesterol across intracellular membranes [37] and the  
312 evidence indicates that Ptc and Disp are able to behave as transmembrane  
313 molecular transporter [38, 39]. Interestingly, recently it has been suggested that  
314 mouse PTCH1 transports vitamin-D3 out of cells to inhibit SMO activity [40]. In  
315 addition, using the cell-based reporter gene assays, we detected that the  
316 combined RNAi of *Ptr* and *ihog* inhibited Hh-induced pathway activation,  
317 suggesting that Ptr is acting upstream of Ihog; a result that differs from those  
318 reported for the interaction between Ptc and Ihog. In that case, *ptc* RNAi partially  
319 reversed the loss of Hh response produced by *ihog* RNAi whereas  
320 overexpression of Ptc suppressed the increase in Hh pathway activity produced  
321 by overexpression of Ihog [19]. One possible explanation is that Ihog might not  
322 be necessary for the binding of Hh to Ptr, since recent evidences indicated that  
323 Ihog and Brother of ihog (Boi) are essential for pathway activation, but not for  
324 reception and sequestration of Hh [41],  
325 On the other hand, binding of Hh to Ptr might require the presence of Dally-like  
326 (Dlp), a glypican-type heparin sulphate proteoglycan that acts by enhancing the  
327 stability of Hh and promotes its internalization with Ptc [42]. Since previous  
328 studies demonstrated that Dlp is specifically required in the cell-based assays  
329 and in embryos [18, 43, 44], our cell transfection protocols were performed  
330 using an expression vector for Dlp (see Methods). Thus, it is possible to speculate

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

331 that in our cell assay experiments Dlp could be facilitating the interaction of Hh  
332 with Ptr. It will be an interesting issue to determine whether Ptr could bind Hh  
333 by itself or required the assistance of Dlp and how this interaction may  
334 contribute to *Drosophila* Hh signalling. Although the immunoprecipitation assays  
335 showed a direct interaction between Ptr and Hh, we cannot rule out the  
336 possibility that this interaction could be facilitated by the existence of a  
337 conglomerate of Ptr molecules, while a lower number of them could display a  
338 different affinity by the ligand. In this context, the use of the luciferase reporter  
339 assay could be important to evaluate whether the effect obtained in the Hh  
340 signalling response shows concentration dependence of *Ptr* expression vectors.  
341 The cuticle phenotype observed in *Ptr* null embryos as well as in *Ptr* RNAi  
342 embryos is reminiscent of phenotypes caused by mutations in members of the  
343 Hh pathway, further suggesting the participation of Ptr in this pathway. The  
344 results presented here also enable to speculate that during the cuticle patterning  
345 process the action of Ptr could be functionally redundant to Ptc. In mammals, the  
346 two functional receptors of the Hh pathway are expressed differentially during  
347 epidermis development. Mice *Ptc2* (or human PTCH2) is co-expressed with the  
348 Sonic hedgehog (SHH) ligand while *Ptc1* (PTCH1) is expressed in a  
349 complementary fashion. This expression pattern suggests that the two receptors  
350 have specific roles in epidermal development although they act in the same  
351 signalling pathway [45]. Furthermore, some data suggests that PTCH2 may act as  
352 Hh receptor that tunes finely the signalling in various cellular environments [46].  
353 Thus, the functional overlap of Ptc and Ptr during epidermal development could  
354 reflect that Ptc is the primary mediator of Hh activity and Ptr may have a more  
355 restricted and complementary function.  
356 In this regard, our results demonstrated that *Ptr* expression is under strong  
357 temporal regulation, being preferentially expressed in early embryo stages  
358 (stages 5-8). Likewise, the temporal transcriptome of *Drosophila* published by  
359 the modENCODE project showed moderately high level of *Ptr* expression during  
360 mid-embryogenesis [47]. Similarly, *in situ* hybridization assays showed that *Ptr*  
361 transcripts exhibited a spatially restricted expression pattern in the embryo,  
362 however, Ptr seems to be absent in imaginal wing discs where Hh pathway is  
363 active (unpublished result). Moreover, unlike *ptc*, which is transcriptionally

1 364 regulated by Ci the transcription factor of the Hh pathway, *Ptr* seems to be  
2 365 regulated directly or indirectly by Dorsal, which controls the dorsoventral  
3 366 patterning of the *Drosophila* embryo. These results together with the description  
4 367 that the mammalian ortholog of *Ptr*, PTCHD3 is expressed at the male germ cells  
5 368 and its protein precisely localized in sperm middle piece, suggest additional  
6 369 complexity of the Hh pathway and potential regulators or mediators of the  
7 370 pathway that are specific for a particular tissue or cell context [48].

8 371 In summary, we provide *in vivo* and *in vitro* evidence showing that the  
9 372 transmembrane protein *Ptr* acts in the Hh pathway, probably as co-receptor with  
10 373 *Ptc*, or as alternative receptor. Further studies should be performed to know  
11 374 whether *Ptr* acts in different developing tissues and to place its actions within  
12 375 known mechanisms regulated by the Hh pathway.

13 376

## 14 377 **Conclusions**

15 378 Using *in vitro* approaches, we provide evidence that *Ptr* acts as a negative  
16 379 regulator of the Hh pathway and interacts directly with Hh. Supporting this  
17 380 result, unhatched embryos obtained from either *Ptr* mutant flies or embryos  
18 381 expressing an UAS-*Ptr*IR, showed anterior-posterior patterning defects that  
19 382 suggested alterations in the Hh signalling. Interestingly, the activity of *Ptr* was  
20 383 mapped upstream or at the same level of *Ptc* and upstream of *Ihog* and *Smo*.  
21 384 Because of the importance of the Hh pathway in biology and medicine, the  
22 385 identification of a new member is a relevant landmark that gives us the  
23 386 opportunity to improve our knowledge of the function and regulation of an  
24 387 important signalling pathway. A future challenge will be to understand which is  
25 388 the input of *Ptr* in the function and regulation of the Hh signalling pathway.

26 389

## 27 390 **Methods**

### 28 391 ***Drosophila* strains and genetic manipulations**

29 392 All *Drosophila* stocks were maintained and crossed at 25°C according to standard  
30 393 procedures. To obtain a better efficiency to silence genes, the crosses involving  
31 394 RNAi experiments were carried out at 29°C. The stock that expresses GAL4  
32 395 under the *ptc* promoter (*ptc*-GAL4) was kindly donated by A. Glavic, while the  
33 396 other GAL4-drivers were obtained from the Bloomington Stock Center. The

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

397 drivers used to express dsRNA were  $w^*$ ;  $P\{mata4-GAL-VP16\}V37$  ( $mata-GAL4$ )  
398 and  $P\{GAL4::VP16-nos.UTR\}MVD2$  ( $nanos-GAL4$ ), whereas  $w[1118]$   $w^*$ ;  $P\{UAS-$   
399  $lacZ-B\}Bg4-2-4b$  ( $UAS-lacZ$ ) was used in the control crosses. The  $Ptr$  mutant line  
400 (23C) was generated by imprecise excision using the following stocks:  
401  $w[67c23];P\{y[+mDint2],w[BR.E.BR]=SUPor-P\}KG01682$  (P element line),  
402  $w^*;wg[Sp-1]/CyO;ry[506],Dr[1],P\{ry[+t7.2]=Delta2-3\}99B/TM6$  (transposase  
403 line),  $wg[Sp-1],J[1],L[2]Pin[1]/CyO;ry[+t7.2]=ftz/lacB\}E3$  (CyO balancer). For  
404 lethal phase determination we balanced  $Ptr$  alleles over  $CyO$ ,  $kr-GFP$  balancer  
405 gently donated by R. Cantera. Each mutant line was crossed with wild-type  
406 (Canton-S strain) flies. Males and females heterozygous for the mutation  
407 ( $Ptr^{23C}/+$ ) were subsequently crossed to each other.

408

#### 409 ***In situ* hybridization of whole-mount embryos.**

410 *In situ* hybridization using 2 ng/ $\mu$ L DIG-labeled RNA probes was carried out as  
411 described by Hodar et al. [49], with the following modifications: stained embryos  
412 were washed with PBT:ethanol (1:1), PBT and PBS:glycerol (1:1) before  
413 mounting them in PBS:glycerol (1:3). Embryos were photographed on a Nikon  
414 Eclipse 80i microscope with a Nikon DS-Fi1-U3 digital camera. Image files were  
415 processed using Adobe Photoshop CS.

416

#### 417 **Cell culture and generation of conditioned medium**

418 Cultures of cl-8 cells (derived from *Drosophila* wing imaginal disk) were  
419 performed as described at the *Drosophila* RNAi Screening Center website  
420 (<http://www.flyrnai.org/DRSC-PRC.html>). The HhN conditioned medium was  
421 prepared incubating S2-HhN-transfected cells (generously donated by P. Beachy)  
422 with cl-8 medium and  $CuSO_4$  at a final concentration of 0.5 mM for 48 h. The  
423 control medium was made incubating S2 cells in the same medium and  
424 conditions.

425

#### 426 **dsRNA synthesis**

427 Primer pairs encoding a T7 promoter sequence and gene-specific sequences  
428 were used to amplify a product from a single exon using genomic DNA template  
429 or cDNA. These PCR products were the templates for *in vitro* dsRNA synthesis

1  
2 430 using T7 RNA polymerase (Ambion, Austin, TX, USA). See Additional file 1 for a  
3 431 list of primers used.  
4

5 432

### 6 433 **Luciferase reporter assays**

7 434 dsRNA (2  $\mu$ g) or/and DNA vectors (2  $\mu$ g) or/and plasmids that express *ptc*-  
8 435 luciferase, *dally-like* and *copia-Renilla* (to normalize transfection efficiency) were  
9 436 transfected using the Calcium Phosphate Kit of Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)  
10 437 followed by incubation for 72 hrs to allow for protein turnover and degradation  
11 438 of targeted mRNA. Transfected cells in 24-well plates were then split into  
12 439 control, or exposed to HhN conditioned media and incubated for an additional 24  
13 440 hrs. In experiments that required it, CuSO<sub>4</sub> was added to the cell medium at a  
14 441 final concentration 0.5 mM to induce fusion protein expression. Then, cells were  
15 442 lysed and the luciferase activity in lysates was measured using Dual-Luciferase  
16 443 Assay Kits (Promega, Madison, USA). Fold induction upon stimulation with Hh  
17 444 following transfection of pooled dsRNAs was derived by dividing the normalized  
18 445 reporter activity (firefly luciferase (L) to *Renilla* luciferase (R) ratio, L/R)  
19 446 obtained in the presence of Hh by the L/R ratio measured in the absence of Hh  
20 447 (basal reporter activity). In all experiments, dsRNA targeting the *B. subtilis lys*  
21 448 gene for diaminopimelate decarboxylase or/and a vector expressing GFP were  
22 449 used as controls.  
23

24 450

### 25 451 **Immunoprecipitation assays**

26 452 Cell extract was obtained by lysing the content of three 60 mm culture dishes of  
27 453 Ptr-V5-expressing cl-8 cells with 600  $\mu$ l cold lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5,  
28 454 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100 and Protease Inhibitor  
29 455 Cocktail). The lysate was centrifuged for 10 min at 16000  $\times g$  at 4°C and the  
30 456 supernatant stored at -80°C. HhN conditioned medium was lyophilized and  
31 457 concentrated 10-fold. Protein determination of each sample was performed on  
32 458 aliquots with Bradford reagent (Fermentas). The input sample for the  
33 459 immunoprecipitation was obtained incubating for ~16 hours at 4°C equal parts  
34 460 of cell extract and HhN containing medium (1 mg/ml of protein each). This  
35 461 premixed sample was immunoprecipitated with 1  $\mu$ g of mouse anti-V5 antibody  
36 462 (Santa Cruz Biotechnology) adsorbed to 25  $\mu$ l of Dynabeads Goat anti Mouse IgG  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

463 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The presence of HhN in the immunocomplex was  
464 analysed by Western blotting. For the control, Dynabeads were incubated with  
465 an alternative mouse antibody (anti-c-myc, Santa Cruz Biotechnology). Beads  
466 were washed three times and proteins eluted in Laemmli sample buffer.

467

### 468 **Western blotting**

469 To detect the presence of HhN and or Ptr-V5, the immunocomplex was separated  
470 by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane for 2 hours at 100 V. Before  
471 loading the gel, the samples were incubated with Laemmli sample buffer for 30  
472 min at 37°C (not boiled) to avoid the formation of aggregates. The membrane  
473 was blocked with 5% low-fat milk in Tris-buffered saline pH 7.4 for 1 hr at RT  
474 and cut at the level of pre-stained molecular weight 43 KDa (Fermentas). The  
475 part of the membrane with lower molecular weights was incubated overnight at  
476 4°C with rabbit anti-Hh (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:100 in 1% low-fat  
477 milk, 0.05% Tween 20 in Tris-buffered saline (pH 7.4). The rest of the membrane  
478 was incubated with mouse anti-V5 in similar conditions. To detect the primary  
479 antibodies and/or the immunocomplex heavy and light chains, the membranes  
480 were incubated with anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies coupled to  
481 peroxidase (Thermo Scientific) and the reaction product revealed using  
482 Supersignal West Pico chemiluminescent reagent (Amersham Biosciences,  
483 Bucks, United Kingdom) and sensitive X-ray film (Amersham Biosciences, Bucks,  
484 United Kingdom).

485

### 486 **Genotyping method to identify homozygous lethal embryos**

487 At early stages of embryogenesis the presence of *lacZ* or GFP balancer was  
488 monitoring using the genotyping method described by Ghanim and White [50].  
489 Heterozygous fly lines carrying *Ptr* mutation were allowed to lay eggs on grape  
490 agar plates for 1 hour. The collected embryos were dechorionated in 50% bleach  
491 and staged under light microscope. To perform RNA extraction of 10-15  
492 homozygous embryos, one hundred embryos in stage 5 of development were  
493 selected and individually transferred into PCR tube containing 14.5 µl of  
494 extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH8.2, 1mM EDTA and 25 mM NaCl). After  
495 homogenization with a pipette tip, 11 µl from each single embryo extract were

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

496 individually stored in a new tube containing 30 µl of RNA<sub>WIZ</sub> reagent from  
497 Ambion (Austin, TX, USA) and frozen (-20°C) to preserve RNA integrity. The  
498 remaining extract (3.5 µl) was incubated at 28°C for 30 min with 200 µg/ml of  
499 proteinase K (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), followed by incubation at 95°C  
500 for 2 min. After the incubation with proteinase K the extract was used in PCR. In  
501 our case, absence of *lacZ* or GFP specific band together with the presence of a  
502 control band (CG9650) were indicators of homozygous lethal embryos.

503

#### 504 **RNA extraction**

505 Total RNA was extracted from staged embryos ( $N = 10$  to 15) or transfected cells  
506 using the RNA<sub>WIZ</sub> reagent from Ambion (Austin, TX, USA). The samples were  
507 carefully homogenized in a 1.5 ml Eppendorf tube with 1 ml of RNA<sub>WIZ</sub> reagent  
508 using a plastic tissue grinder. To increase the recovery of RNA, precipitation was  
509 made with the addition of glycogen (Ambion, Austin, TX, USA) to the isopropanol  
510 step. After 15 min of centrifugation at 13,000  $\times g$ , RNA quality and quantity was  
511 evaluated by spectrophotometry (OD<sub>260/280</sub>) and by electrophoresis (1.2%  
512 formaldehyde-agarose gel). Samples were treated with TURBO DNA-free DNase  
513 (Ambion, Austin, TX, USA) to remove contaminating DNA from RNA. Quantitative  
514 real-time PCR was performed using 1 µg of total RNA as a template for reverse  
515 transcription reactions to synthesize single strand (ss) cDNA using MMLV-RT  
516 reverse transcriptase (Promega, Madison, USA) and oligo-dT primer (Invitrogen,  
517 Carlsbad, CA, USA), according to standard procedures. A poly(A)-RNA was *in*  
518 *vitro* transcribed from the vector pGIBS-*dap* (ATCC 87486) and added to the  
519 embryo or cells RNA samples prior to cDNA synthesis in a 1/1000 ratio, to be  
520 used as spike mRNA.

521

#### 522 **cDNA synthesis and quantitative real-time PCR (QPCR)**

523 QPCR was performed using 1 µg of total RNA as a template for reverse  
524 transcription reactions to synthesize single strand (ss) cDNA using MMLV-RT  
525 reverse transcriptase (Promega, Madison, USA) and oligo-dT primer (Invitrogen,  
526 Carlsbad, CA, USA), according to standard procedures. A poly(A)-RNA was *in*  
527 *vitro* transcribed from the vector pGIBS-*dap* (ATCC 87486) and added to the

1 528 embryo or cells RNA samples prior to cDNA synthesis in a 1/1000 ratio, to be  
2 529 used as spike mRNA .  
3  
4 530 QPCR amplifications and fluorescence detection were performed using the  
5 531 LightCycler® 1.5 Instrument (Roche, Basel, Switzerland) and  
6  
7 532 LightCycler® FastStart DNA Master SYBR® Green I (Roche). Reactions contained  
8  
9 533 100 ng of dscDNA or 50 ng of sscDNA. Primers were designed using Primer  
10 534 Premier 5.0 software (Palo Alto, CA, USA) and synthesized by Alpha DNA,  
11 535 (Montreal, Quebec). Primer sequences, annealing temperatures and amplicon  
12  
13 536 lengths are listed in Table 1. The thermal cycle conditions were: denaturation at  
14  
15 537 95°C for 10 min, followed by 35 three-step cycles of template denaturation at  
16 538 95°C with a 2 s hold, primer annealing at 58-62°C for 15 s, and extension at 72°C  
17  
18 539 for 60 s/1000 bp. The method described by Pfaffl (2001) [51] was used to  
19  
20 540 determine relative expression levels of genes and *actin* was employed as internal  
21  
22 541 reference gene. The purity of amplified products was verified by melting curve  
23  
24 542 analyses. Control reactions included a subset of PCR components lacking the  
25  
26 543 cDNA template. Data represent the mean of at least three experimental replicates  
27  
28 544 and differences among conditions were analyzed using Student's t-test (p<0.05)  
29  
30 545 or One-way ANOVA.  
31  
32

33 546

#### 34 547 **Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)**

35 548 The 5'-end of the Ptr transcript was amplified using the RLM-RACE  
36  
37 549 GeneRacer™ kit, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen  
38  
39 550 Carlsbad, CA). Briefly, 5 µg of total RNA from *D. melanogaster* stage 5-7 embryos  
40  
41 551 was used as started material. The adaptor-ligated cDNA was PCR amplified using  
42  
43 552 Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen Carlsbad, CA), GeneRacer™ 5'  
44  
45 553 Primer and 10 µM of gene-specific primer RACE11212-a2 under the following  
46  
47 554 conditions: 2 min at 94 °C, 5 cycles of 30 s at 94 °C and 40 s at 72 °C, 5 cycles of  
48  
49 555 30 s at 94 °C and 40 s at 70 °C and 25 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 65 °C and 40  
50  
51 556 s at 68 °C. The resulting PCR products were used in a Nested PCR reaction with  
52  
53 557 GeneRacer™ 5' Nested Primer and the gene-specific primer RACE 11212-a1. The  
54  
55 558 Nested PCR program comprises 2 min at 94 °C and 25 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s  
56  
57 559 at 65 °C and 2 min at 68 °C. The PCR products were cloned into pGEM-T Easy  
58  
59 560 vector and sequenced.  
60  
61



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

561 **RNAi vector construction and microinjection**

562 A region of the first exon of *Ptr* was generated by PCR using genomic DNA as  
563 template with the primers indicated in Additional file 1. To create the knock-  
564 down plasmid UAS-*Ptr*IR, the PCR product was inserted into the pWiz vector  
565 (*Drosophila* Genomics Resource Center, Bloomington, IN, USA) at each of the  
566 AvrII and NheI restriction sites, in opposite orientations [52]. Clones were  
567 confirmed by sequencing. *W[1118]* embryos were injected with the UAS-*ptr*IR  
568 construct at Genetic Services, Inc. (Sudbury, MA, USA), according to standard  
569 protocols [53]. Homozygous lines were generated with standard balancer  
570 chromosomes.

571

572 **Preparation of cuticles**

573 Embryos between 0 and 12 hours after egg deposition were collected and aged  
574 for an additional 24 hours at 25 °C. Then, wandering larvae were removed from  
575 the agar plate. The remaining embryos were dechorionated, counted (total  
576 embryos) and incubated in PBS 24 hrs more. Those that were still inside the  
577 vitelline membrane were counted as unhatched embryos, washed first with PBS-  
578 Triton 0.1% and then with methanol-EGTA 50mM. To remove the vitelline  
579 membrane a mixture of methanol-EGTA 50mM: heptane (1:2) was used. After  
580 taking out the liquid, the embryos were covered with a mixture of glycerol-acetic  
581 acid (1:4) and incubated in an oven during 1 hr at 60°C. The embryos were  
582 transferred to a drop of a mixture of glycerol: lactic acid (1:3) on a glass slide  
583 covered with a coverslip and incubated at 60°C until the internal tissue was  
584 cleared (generally overnight). Embryos were viewed and photographed using an  
585 Olympus microscope equipped with phase optics.

586

587 **List of abbreviations**

588 Clone-8 cells: cl-8; Boi: Brother of ihog; dsRNA: double strand RNA; Dlp: Dally-  
589 like; Hh: Hedgehog; Hhip: Hedgehog-interacting protein; Ihog: Interference  
590 hedgehog; NPC1: Niemann–Pick protein; Ptc: Patched; *Ptr*: Patched-related;  
591 RNAi: RNA interference; Smo: Smoothened; SHH: Sonic hedgehog; SSD: sterol  
592 sensor domain.

593

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

594 **Authors' contributions**

595 CB performed the experiments, participated in their design, analysis and  
596 interpretation and drafted the manuscript. CP and FR carried out all the process  
597 necessary to obtain the two *Ptr* null mutation lines, CP performed the  
598 characterization of the deletion to each line and helped in data analysis, AZ  
599 carried out *in situ* hybridization and QPCR assays with wild type and *Toll<sup>10B</sup>*  
600 mutant embryos as well as the identification of the complete 5'-UTR region of *Ptr*  
601 gene, VC conceived and coordinated the study, drafted the manuscript and gave  
602 final approval of the version to be published. All authors read and approved the  
603 final manuscript. None of the authors have any competing interests.

604  
605 **Acknowledgements**

606 We would like to thank Philip Beachy from Howard Hughes Medical Institute  
607 (HHMI) at Stanford University who generously donated the vectors and HhN S2  
608 cells that were necessary to evaluate the role of *Ptr* in Hh pathway using cell  
609 based luciferase reporter assays. We were grateful to Adam Saunders, Wenchaun  
610 Liang, Paula Quezada and Leticia Pérez for their advice and/or technical  
611 assistance; Beatriz Garat, Rafael Cantera and Mauricio González for their advice  
612 and critical comments during this work; and the Bloomington *Drosophila* Stock  
613 Center for providing stocks used in this study. This work was supported by CSIC  
614 I+D 2010 to CB and Fondecyt N°1120254 to VC. CP and FR were supported by  
615 CSIC I+D 2010. AZ was supported by Postdoctoral Fondecyt N° 3110147. CB was  
616 also supported by fellowships from: CSIC (Programa de Recursos Humanos),  
617 PEDECIBA, AMSUD-Pasteur (Regional Training Fellowship Program) and  
618 Proyecto 720 (Contrapartida Convenios-UdelaR).

619  
620  
621 **References**

- 622  
623 1. Kuwabara PE, Labouesse M: **The sterol-sensing domain: multiple**  
624 **families, a unique role?** *Trends in genetics : TIG* 2002, **18**(4):193-201.  
625 2. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E: **Mutations affecting segment number**  
626 **and polarity in *Drosophila*.** *Nature* 1980, **287**(5785):795-801.

1 627 3. Ingham PW, McMahon AP: **Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles.** *Genes & development* 2001, **15**(23):3059-3087.

2 628

3 629

4 630 4. Mullor JL, Guerrero I: **A gain-of-function mutant of patched dissects different responses to the hedgehog gradient.** *Developmental biology* 2000, **228**(2):211-224.

5 631

6 632

7 633 5. Briscoe J, Chen Y, Jessell TM, Struhl G: **A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube.** *Molecular cell* 2001, **7**(6):1279-1291.

8 634

9 635

10 636

11 637 6. Mohler J: **Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of Drosophila.** *Genetics* 1988, **120**(4):1061-1072.

12 638

13 639

14 640 7. Bejsovec A, Wieschaus E: **Segment polarity gene interactions modulate epidermal patterning in Drosophila embryos.** *Development* 1993, **119**(2):501-517.

15 641

16 642

17 643 8. Kuwabara PE, Lee MH, Schedl T, Jefferis GS: **A C. elegans patched gene, ptc-1, functions in germ-line cytokinesis.** *Genes & development* 2000, **14**(15):1933-1944.

18 644

19 645

20 646 9. Michaux G, Gansmuller A, Hindelang C, Labouesse M: **CHE-14, a protein with a sterol-sensing domain, is required for apical sorting in C. elegans ectodermal epithelial cells.** *Current biology : CB* 2000, **10**(18):1098-1107.

21 647

22 648

23 649

24 650 10. Zuniga A, Hodar C, Hanna P, Ibanez F, Moreno P, Pulgar R, Pastenes L, Gonzalez M, Cambiazo V: **Genes encoding novel secreted and transmembrane proteins are temporally and spatially regulated during Drosophila melanogaster embryogenesis.** *BMC biology* 2009, **7**:61.

25 651

26 652

27 653

28 654

29 655 11. Pastenes L, Ibanez F, Bolatto C, Pavez L, Cambiazo V: **Molecular characterization of a novel patched-related protein in Apis mellifera and Drosophila melanogaster.** *Archives of insect biochemistry and physiology* 2008, **68**(3):156-170.

30 656

31 657

32 658

33 659 12. Ramirez-Weber FA, Casso DJ, Aza-Blanc P, Tabata T, Kornberg TB: **Hedgehog signal transduction in the posterior compartment of the Drosophila wing imaginal disc.** *Molecular cell* 2000, **6**(2):479-485.

34 660

35 661

36 662 13. Torroja C, Gorfinkiel N, Guerrero I: **Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction.** *Development* 2004, **131**(10):2395-2408.

37 663

38 664

39 665

40 666 14. Amanai K, Jiang J: **Distinct roles of Central missing and Dispatched in sending the Hedgehog signal.** *Development* 2001, **128**(24):5119-5127.

41 667

42 668 15. Erdelyi M, Szabad J: **Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of Drosophila melanogaster. I. Mutations on the third chromosome.** *Genetics* 1989, **122**(1):111-127.

43 669

44 670

45 671 16. Levine M, Davidson EH: **Gene regulatory networks for development.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(14):4936-4942.

46 672

47 673

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

- 674 17. Chen CH, von Kessler DP, Park W, Wang B, Ma Y, Beachy PA: **Nuclear**  
675 **trafficking of Cubitus interruptus in the transcriptional regulation of**  
676 **Hedgehog target gene expression.** *Cell* 1999, **98**(3):305-316.
- 677 18. Lum L, Yao S, Mozer B, Rovescalli A, Von Kessler D, Nirenberg M, Beachy  
678 PA: **Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in**  
679 **Drosophila cultured cells.** *Science* 2003, **299**(5615):2039-2045.
- 680 19. Yao S, Lum L, Beachy P: **The ihog cell-surface proteins bind Hedgehog**  
681 **and mediate pathway activation.** *Cell* 2006, **125**(2):343-357.
- 682 20. Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM: **Detergent binding**  
683 **explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins.**  
684 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*  
685 *America* 2009, **106**(6):1760-1765.
- 686 21. Nybo K: **Molecular biology techniques Q&A. Western blot: protein**  
687 **migration.** *BioTechniques* 2012, **53**(1):23-24.
- 688 22. Bellen HJ, Levis RW, Liao G, He Y, Carlson JW, Tsang G, Evans-Holm M,  
689 Hiesinger PR, Schulze KL, Rubin GM *et al*: **The BDGP gene disruption**  
690 **project: single transposon insertions associated with 40% of**  
691 **Drosophila genes.** *Genetics* 2004, **167**(2):761-781.
- 692 23. Robertson HM, Preston CR, Phillis RW, Johnson-Schlitz DM, Benz WK,  
693 Engels WR: **A stable genomic source of P element transposase in**  
694 **Drosophila melanogaster.** *Genetics* 1988, **118**(3):461-470.
- 695 24. Casso D, Ramirez-Weber F, Kornberg TB: **GFP-tagged balancer**  
696 **chromosomes for Drosophila melanogaster.** *Mechanisms of*  
697 *development* 2000, **91**(1-2):451-454.
- 698 25. Enerly E, Larsson J, Lambertsson A: **Reverse genetics in Drosophila:**  
699 **from sequence to phenotype using UAS-RNAi transgenic flies.** *Genesis*  
700 2002, **34**(1-2):152-155.
- 701 26. Piccin A, Salameh A, Benna C, Sandrelli F, Mazzotta G, Zordan M, Rosato E,  
702 Kyriacou CP, Costa R: **Efficient and heritable functional knock-out of**  
703 **an adult phenotype in Drosophila using a GAL4-driven hairpin RNA**  
704 **incorporating a heterologous spacer.** *Nucleic acids research* 2001,  
705 **29**(12):E55-55.
- 706 27. Reichhart JM, Ligoxygakis P, Naitza S, Woerfel G, Imler JL, Gubb D: **Splice-**  
707 **activated UAS hairpin vector gives complete RNAi knockout of single**  
708 **or double target transcripts in Drosophila melanogaster.** *Genesis*  
709 2002, **34**(1-2):160-164.
- 710 28. Schmid A, Schindelholz B, Zinn K: **Combinatorial RNAi: a method for**  
711 **evaluating the functions of gene families in Drosophila.** *Trends in*  
712 *neurosciences* 2002, **25**(2):71-74.
- 713 29. Shibuya M, Claesson-Welsh L: **Signal transduction by VEGF receptors**  
714 **in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis.** *Experimental*  
715 *cell research* 2006, **312**(5):549-560.
- 716 30. Mac Gabhann F, Popel AS: **Systems biology of vascular endothelial**  
717 **growth factors.** *Microcirculation* 2008, **15**(8):715-738.
- 718 31. Yarden Y, Sliwkowski MX: **Untangling the ErbB signalling network.**  
719 *Nature reviews Molecular cell biology* 2001, **2**(2):127-137.
- 720 32. Chuang PT, McMahon AP: **Vertebrate Hedgehog signalling modulated**  
721 **by induction of a Hedgehog-binding protein.** *Nature* 1999,  
722 **397**(6720):617-621.

- 1 723 33. Beachy PA, Hymowitz SG, Lazarus RA, Leahy DJ, Siebold C: **Interactions**  
2 724 **between Hedgehog proteins and their binding partners come into**  
3 725 **view.** *Genes & development* 2010, **24**(18):2001-2012.
- 4 726 34. Hicke L, Dunn R: **Regulation of membrane protein transport by**  
5 727 **ubiquitin and ubiquitin-binding proteins.** *Annual review of cell and*  
6 728 *developmental biology* 2003, **19**:141-172.
- 7 729 35. Strutt H, Thomas C, Nakano Y, Stark D, Neave B, Taylor AM, Ingham PW:  
8 730 **Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for**  
9 731 **vesicular trafficking in Smoothened regulation.** *Current biology : CB*  
10 732 2001, **11**(8):608-613.
- 11 733 36. Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, Saier MH,  
12 734 Jr.: **The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and**  
13 735 **diverse family that includes human disease and development**  
14 736 **proteins.** *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 1999,  
15 737 **1**(1):107-125.
- 16 738 37. Davies JP, Chen FW, Ioannou YA: **Transmembrane molecular pump**  
17 739 **activity of Niemann-Pick C1 protein.** *Science* 2000, **290**(5500):2295-  
18 740 2298.
- 19 741 38. Ma Y, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K, Beachy PA: **Hedgehog-**  
20 742 **mediated patterning of the mammalian embryo requires**  
21 743 **transporter-like function of dispatched.** *Cell* 2002, **111**(1):63-75.
- 22 744 39. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA: **Patched acts catalytically to**  
23 745 **suppress the activity of Smoothened.** *Nature* 2002, **418**(6900):892-  
24 746 897.
- 25 747 40. Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F, Peppelenbosch  
26 748 MP: **Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin**  
27 749 **D3 secretion.** *PLoS biology* 2006, **4**(8):e232.
- 28 750 41. Camp D, He BH, Li S, Althaus IW, Holtz AM, Allen BL, Charron F, van Meyel  
29 751 DJ: **Ihog and Boi elicit Hh signaling via Ptc but do not aid Ptc in**  
30 752 **sequestering the Hh ligand.** *Development* 2014, **141**(20):3879-3888.
- 31 753 42. Yan D, Wu Y, Yang Y, Belenkaya TY, Tang X, Lin X: **The cell-surface**  
32 754 **proteins Dally-like and Ihog differentially regulate Hedgehog**  
33 755 **signaling strength and range during development.** *Development* 2010,  
34 756 **137**(12):2033-2044.
- 35 757 43. Desbordes SC, Sanson B: **The glypican Dally-like is required for**  
36 758 **Hedgehog signalling in the embryonic epidermis of Drosophila.**  
37 759 *Development* 2003, **130**(25):6245-6255.
- 38 760 44. Han C, Belenkaya TY, Wang B, Lin X: **Drosophila glypicans control the**  
39 761 **cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent**  
40 762 **process.** *Development* 2004, **131**(3):601-611.
- 41 763 45. Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench  
42 764 G, Pietsch T, Wicking C, Wainwright BJ: **Isolation and characterization**  
43 765 **of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene**  
44 766 **in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32.**  
45 767 *Human molecular genetics* 1999, **8**(2):291-297.
- 46 768 46. Rahnema F, Toftgard R, Zaphiropoulos PG: **Distinct roles of PTCH2**  
47 769 **splice variants in Hedgehog signalling.** *The Biochemical journal* 2004,  
48 770 **378**(Pt 2):325-334.

- 771 47. Graveley BR, Brooks AN, Carlson JW, Duff MO, Landolin JM, Yang L, Artieri  
 772 CG, van Baren MJ, Boley N, Booth BW *et al*: **The developmental**  
 773 **transcriptome of *Drosophila melanogaster***. *Nature* 2011,  
 774 **471(7339):473-479.**
- 775 48. Fan J, Akabane H, Zheng X, Zhou X, Zhang L, Liu Q, Zhang YL, Yang J, Zhu  
 776 GZ: **Male germ cell-specific expression of a novel Patched-domain**  
 777 **containing gene *Ptchd3***. *Biochemical and biophysical research*  
 778 *communications* 2007, **363(3):757-761.**
- 779 49. Hodar C, Zuniga A, Pulgar R, Travisany D, Chacon C, Pino M, Maass A,  
 780 Cambiazo V: **Comparative gene expression analysis of *Dtg*, a novel**  
 781 **target gene of *Dpp* signaling pathway in the early *Drosophila***  
 782 ***melanogaster* embryo**. *Gene* 2014, **535(2):210-217.**
- 783 50. Ghanim M, White KP: **Genotyping method to screen individual**  
 784 ***Drosophila* embryos prior to RNA extraction**. *BioTechniques* 2006,  
 785 **41(4):414, 416, 418.**
- 786 51. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in**  
 787 **real-time RT-PCR**. *Nucleic acids research* 2001, **29(9):e45.**
- 788 52. Lee YS, Carthew RW: **Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use**  
 789 **of intron spacers**. *Methods* 2003, **30(4):322-329.**
- 790 53. Rubin GM, Spradling AC: **Genetic transformation of *Drosophila* with**  
 791 **transposable element vectors**. *Science* 1982, **218(4570):348-353.**

792  
793  
794  
795 **Figure legends**

796  
797 **Figure 1. Spatial and temporal expression of *Ptr* in wild type and *Toll<sup>10B</sup>***  
 798 **mutant embryos.** (A) Whole-mount *in situ* hybridization of embryos, lateral  
 799 views with anterior to the left and dorsal uppermost (a) stage 5 (cellular  
 800 blastoderm), showing strong expression in the dorsal side of the embryo; (b)  
 801 stage 6 (gastrula); (c) stage 8 and (d) stage 11 showing expression of *Ptr* in the  
 802 cells that form the procephalic ectoderm (arrow). (B). The relative abundance of  
 803 *Ptr* was determined by QPCR in total RNA samples from embryos at stages 2-3, 5,  
 804 6-7, 8-9 and 10-12 of development. In all case, bars represent the mean of three  
 805 biological replicate determinations ( $\pm$  SEM). Analysis was performed using one-  
 806 way ANOVA with Tukey post-hoc tests, \*\*P<0.01. (C). The relative abundance of  
 807 *Ptr* was determined by QPCR assays in wild type and *Toll<sup>10B</sup>* mutant embryos at  
 808 stage 5 of development. Bars represent the mean of three replicate  
 809 determinations ( $\pm$  SEM); \*P<0.05 (Student's t test). (D) Whole-mount *in situ*  
 810 hybridization of stage 5 wild type and *Toll<sup>10B</sup>* mutant embryos.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

811 **Figure 2. Ptr functions as a negative component in the Hh pathway in cl-8**  
812 **cells.** (A) The Ptr-specific dsRNA reduced efficiently the level of *Ptr* transcripts.  
813 Knockdown was specific for the target *Ptr* gene and no changes in the level of  
814 expression of *ptc* were detected. (B) dsRNA targeting *Ptr* moderately enhanced  
815 responsiveness to Hh when compared to the control dsRNA. (C) The  
816 overexpression of Ptr-V5 in cl-8 cells was verified by immunostaining using an  
817 anti-V5 antibody. (D) Expression of *Ptr* strongly reduced the response to Hh  
818 signal. As a control, a construct expressing GFP was transfected into cl-8 cells. In  
819 B and D, the green bars are controls and the red bars are the experimental  
820 condition for each set of experiments. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n=3 per  
821 group). Analysis was performed using unpaired t-test, two tailed, \*\*P<0.01 and  
822 \*\*\* P< 0.001.

823  
824 **Figure 3. Ptr functions upstream or at the same level of Ptc in the Hh**  
825 **signalling cascade.** (A) The enhanced response to the Hh signal caused by the  
826 knockdown of *ptc* can be suppressed by the co-transfection of a vector that express  
827 Ptr. dsRNAs targeting *B. subtilis lys* gene and a construct for expression of GFP  
828 serve as controls. (B) The co-transfection of *Ptr* and *ptc* dsRNA produced an  
829 activation of the signalling pathway that it is stronger than the activation  
830 obtained by the independent knockdown of each gene. Ptr functions upstream of  
831 (C) iHog or (D) Smo. The transfection of *Ptr* dsRNA does not affect the activation  
832 level of Hh pathway resulting from the knockdown of *ihog* or *smo* genes. In all  
833 the graphics, the green bars are controls (dark green, negative control and light  
834 green, internal controls for the dsRNA and vector transfected) and the red bars  
835 are the experimental condition for each set of experiments. Data are presented  
836 as mean  $\pm$  SD, n=3 per group. Analysis was performed using one-way ANOVA  
837 with Tukey post-hoc tests, \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\* P< 0.001.

838  
839 **Figure 4. Hh can precipitate Ptr-V5.**

840 Hh and Ptr-V5 expression vectors were transfected into S2 and cl-8 cells,  
841 respectively. A premix of conditioned medium and cell lysate or input sample (a)  
842 was immunoprecipitated and analysed by western blotting with the antibodies

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

843 anti-V5 and anti-Hh. Monoclonal anti-V5 is able to immunoprecipitate a complex  
844 containing Hh as well as Ptr (b). A similar monoclonal tag antibody (anti c-Myc)  
845 was used as immunoprecipitation control (c).

846

847 **Figure 5. Ptr functions in patterning of embryonic segments.** (A) Schematic  
848 representation of *Ptr* genomic region. The transposon insertion site is indicated  
849 with a triangle. The intron-exon structures of *Ptr* and two adjacent genes,  
850 CG30432 and CG8335 are indicated. A mutant allele was generated by imprecise  
851 excision of the P-element and the deleted region is indicated with red arrows. (B)  
852 To detect *Ptr* transcripts we performed RT-PCR assays using a pair of primers  
853 located within the *Ptr* coding sequence and between a small intron. In wild type  
854 embryos the transcripts were present whereas in *Ptr<sup>23C</sup>* mutant embryos the  
855 transcripts were absent. (C) Cuticle preparations of *Ptr<sup>23C</sup>* mutant embryos.

856

857 **Figure 6. In vivo down-regulation of Ptr.** (A) QPCR assay performed in  
858 embryos expressing UAS-*PtrIR* compared with control embryos shows that *Ptr*  
859 mRNA abundance has a strong decrease after *Ptr* dsRNA expression (more than  
860 80%). (B) *In vivo* expression of *Ptr* dsRNA produces fusions at ventral denticles  
861 at late embryo stages either using a ubiquitous or (C) a *ptc* GAL4 driver. (D) there  
862 is a strong increase in the percentage of unhatched embryo (15% and 45%)  
863 when the dsRNA is expressed under the control of the drivers shown in B. Data  
864 are presented as mean  $\pm$  SD.

865

866 **Additional files**

867

868 Additional file 1. List of primers used in this study

869 File format: doc.



Figure 1  
[Click here to download Figure: Figure 1.pptx](#)

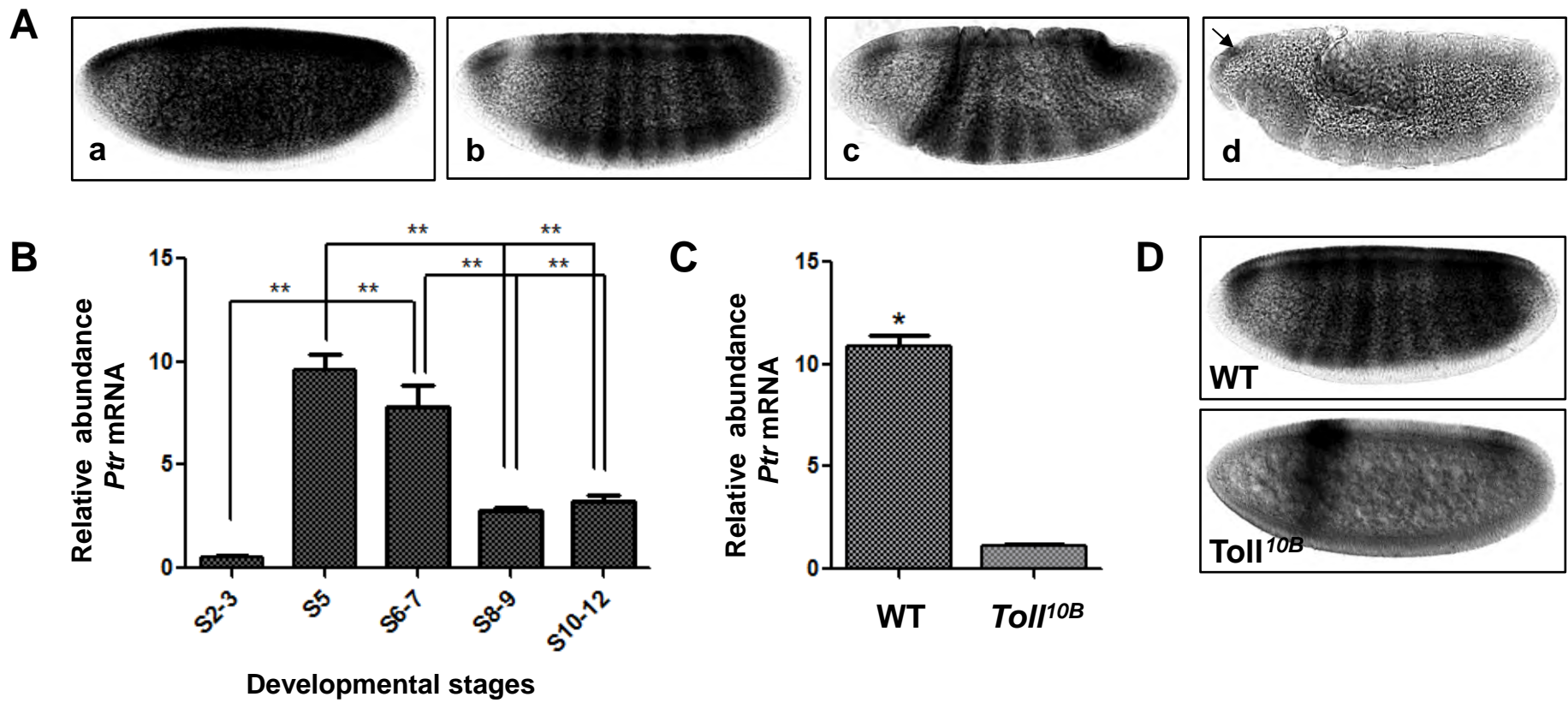


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

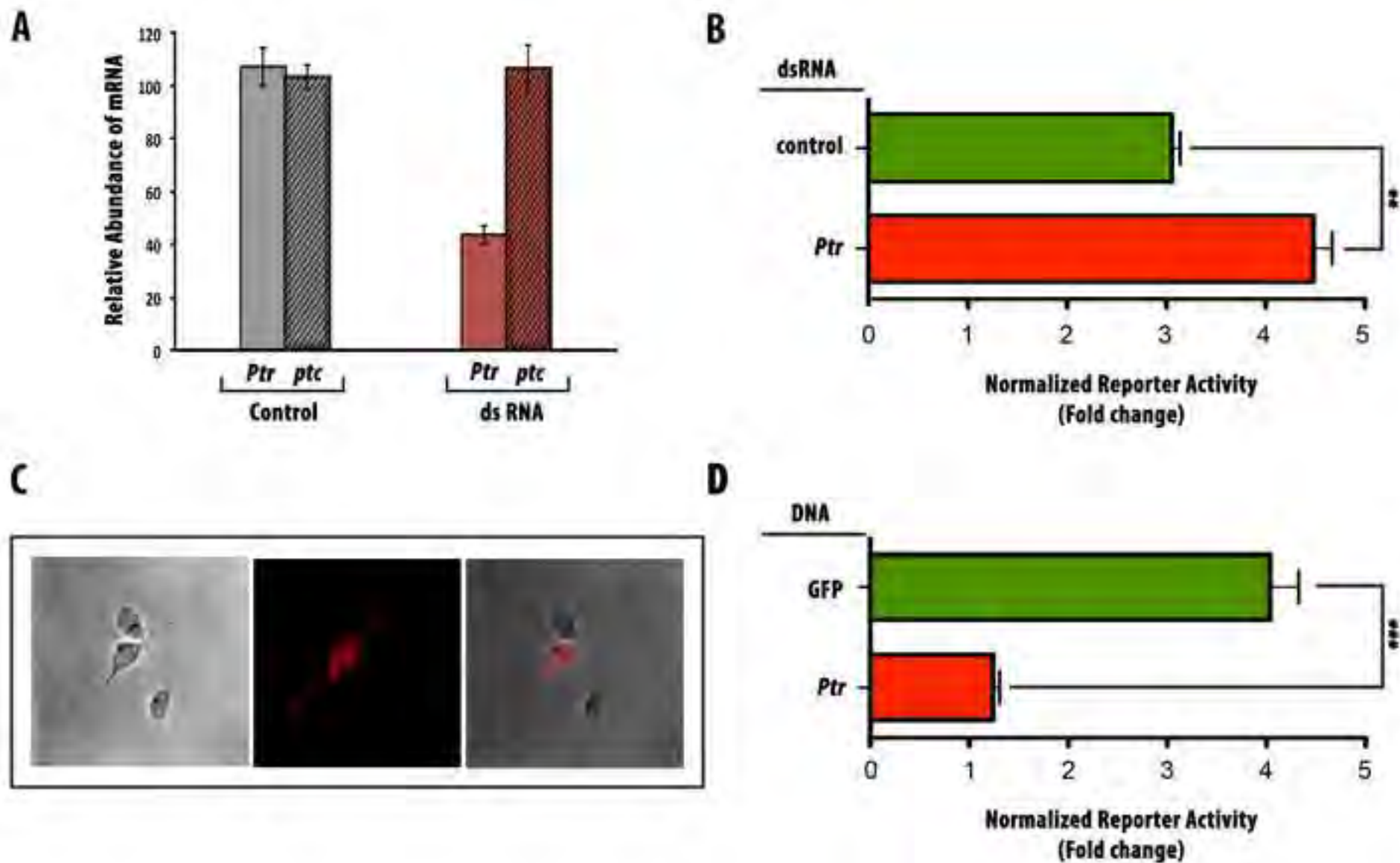


Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)

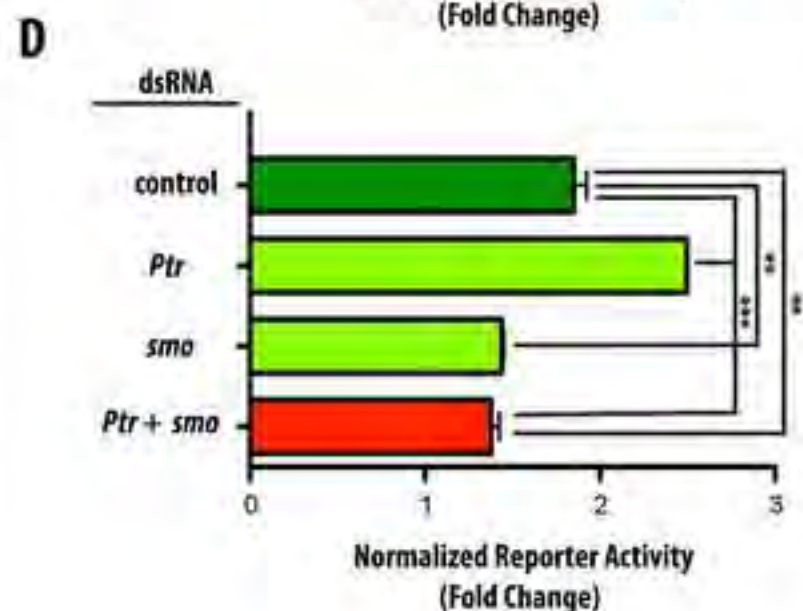
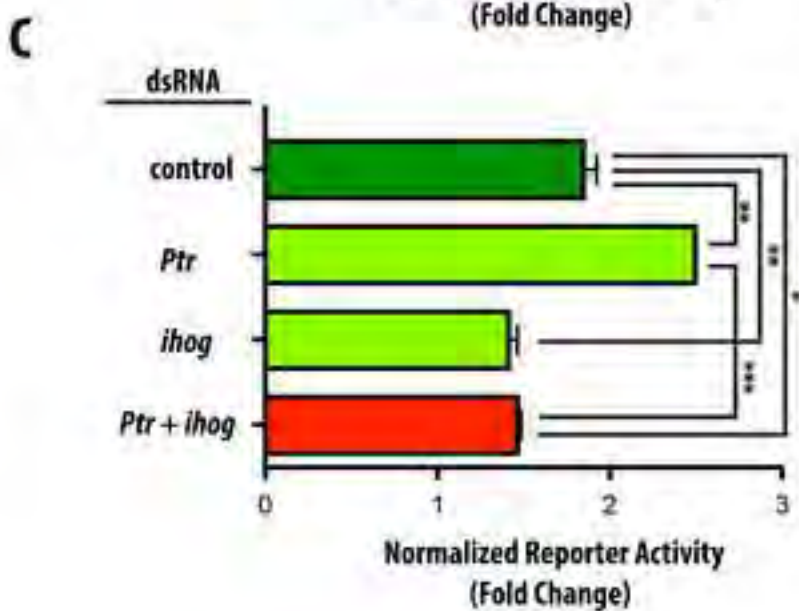
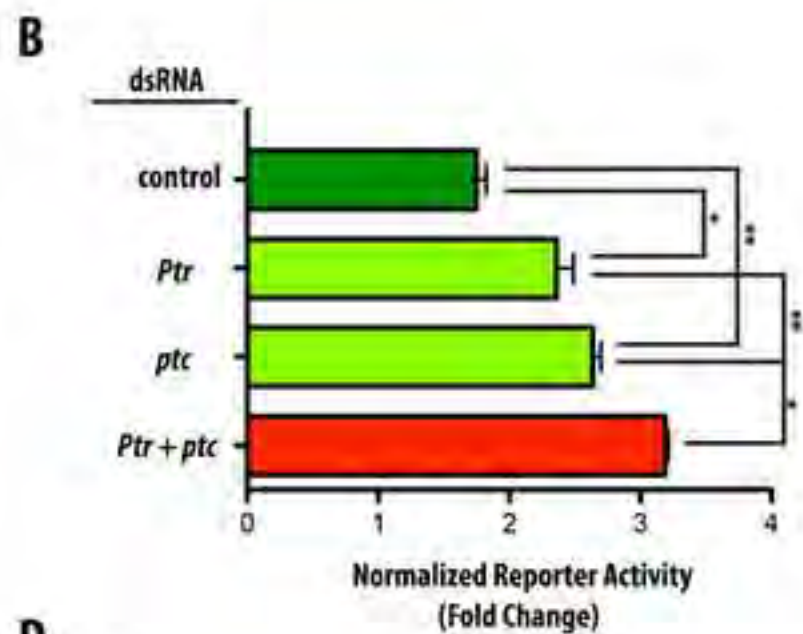
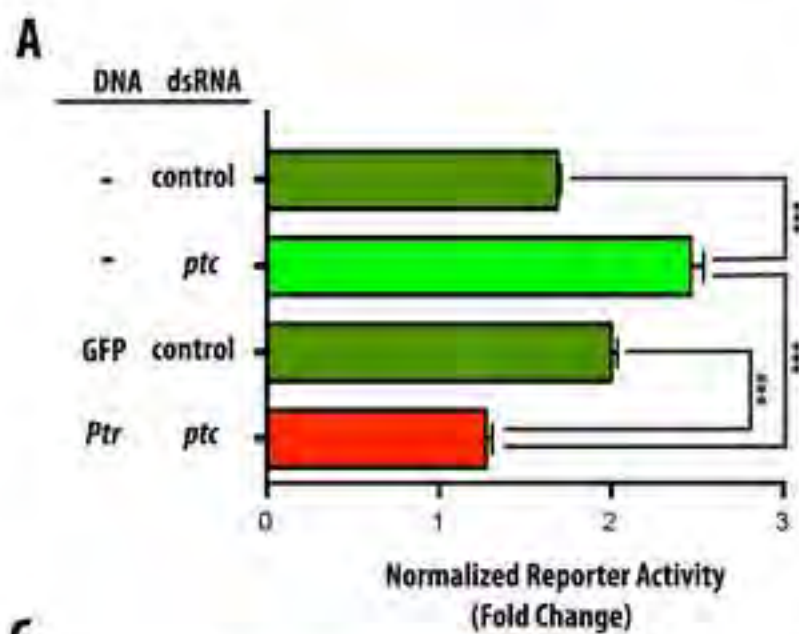


Figure 4  
[Click here to download high resolution image](#)



Figure 5  
[Click here to download high resolution image](#)

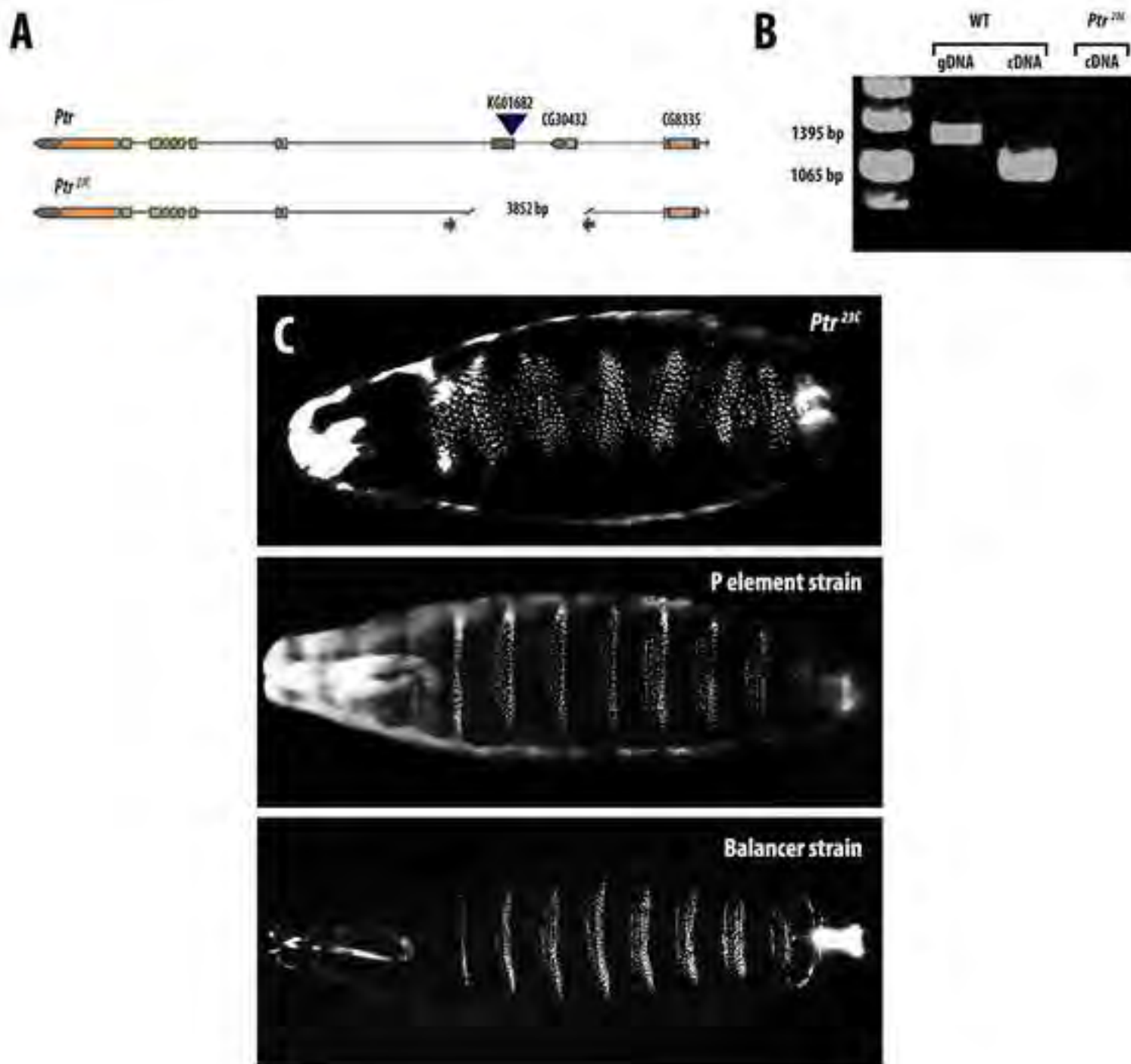


Figure 6  
[Click here to download high resolution image](#)

