



Papel de las proteínas SNARE en guía axonal y progresión tumoral

Pablo José Barrecheguren Manero

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE BARCELONA
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**Papel de las proteínas SNARE en guía axonal y progresión
tumoral**

Pablo José Barrecheguren Manero

Programa de doctorado en Biomedicina

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE BARCELONA
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

Papel de las proteínas SNARE en guía axonal y progresión tumoral

Memoria presentada por el doctorando, **Pablo José Barrecheguren Manero** para optar al grado de Doctor en la Universidad de Barcelona.

Programa de doctorado en Biomedicina

Septiembre 2014

Doctorando	Director	Director	Tutor
Pablo Barrecheguren	Dr.Fausto Ulloa	Dr. Sofía Araùjo	Eduardo Soriano

“More than machinery, we need humanity”

The Great Dictator. Charles Chaplin.

Dedicada con cariño a Paula Climent Cantó.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Tras cuatro años de trabajo es mucha gente la que debería aparecer en este texto. A todos vosotros en primer lugar quisiera disculparme porque no he podido disponer del tiempo ni el espacio para mencionaros uno por uno como es debido. Lo único que puedo hacer antes de hacer algunas mencione puntuales es agradecer a toda la gente que me ha ayudado el tiempo que hemos compartido. Sin vosotros nunca hubiera aprendido una de las lecciones que, en mi opinión, debe de aprender todo estudiante de doctorado “Cuando haces Ciencia lo más interesante no es la ciencia sino la gente que conoces mientras haces Ciencia”.

Quisiera en primer lugar agradecerles mis padres su paciencia y apoyo incondicional desde que me fui de casa. Sé que no nos vemos tanto como desearíais pero si sirve de algo le podéis preguntar a cualquier compañero mío del doctorado y os dirán lo mucho que hablo de vosotros. Por supuesto gracias al resto de mi familia por todo su apoyo y por continuar dirigiéndome la palabra pese a las melenas que llevo.

Gracias al programa de becas de la Obra Social “La Caixa” por haber hecho posible que cursara este doctorado.

Por supuesto, gracias a mi tutor y mis dos directores por su trabajo y ayuda durante estos años. Os agradezco la paciencia que habéis tenido que tener conmigo y gracias haberme enseñado cosas más allá de la parte experimental, como por ejemplo la importancia madurar como investigador y ser capaz de tomar tus propias decisiones o comprender el valor de vuestro trabajo para que la tesis se pueda desarrollar adecuadamente. Quisiera mencionar especialmente al Dr. Fausto Ulloa por su ayuda, preocupación y consejos independientemente que fuera mi director o no.

Aunque al final no sabría decir de que laboratorio soy (y si pregunto a los de neuro me diréis que soy de moscas y los de moscas me decís que soy de neuro). Gracias a los dos grupos porque he conocido en ambos gente que merece mucho la pena. En especial quiero agradecerle al Dr. Jordi Casanova el haberme acogido en su laboratorio todos estos años aunque mi trabajo no tenga que ver nada con la tráquea y a veces,

siempre, hable un poquito alto en el laboratorio ¡Y no me olvido de los llimarguenses! Al final tanto con comer con vosotros se os coge cariño. En especial, sabéis que tengo que mencionar a ese científico pero mejor jugador del LOL: Guillermo Martínez Corrales. Desde que te fuiste la sala de moscas no volvió a ser lo mismo.

Al Dr. Alfonso Martinez Arias y Dr. Joaquín De Navascues por todo lo que me han enseñado en estos años.

To the people I meet in the EMBO course.

A mis compañeros de la Escuela de Escritura, en especial a mi profesora Rosa María Prats.

A mi Shihan Miguel Fernández por enseñarme que la vida sólo dura diez segundos si los cuenta él mientras estas aguantando en una postura increíblemente dolorosa. ¡Y también gracias a mis compañeros de entreno!

Me temo que tengo que ir acabando... a todos mis amigos, colegas de trabajo, compañeros de pisos, colegas del Student Council, gente de administración a la cual siempre doy el coñazo con preguntas tontas, los miembros de los departamentos de estadística y microscopia que me ayudaron en mi trabajo... y en definitiva a todas esas personas con las que me cruzo en los pasillos y nunca me he quedado hablando más de 1 minuto (± 50).

Gracias.

Pablo José Barrecheguren Manero

ÍNDICE

PORTADA 1

AGRADECIMIENTOS 9

ÍNDICE 13

OBJETIVOS 19

INTRODUCCIÓN 23

- 1.- El desarrollo del sistema nervioso. 24
- 2.- Mecanismos de guía axonal. 25
- 3.- *Drosophila melanogaster* en los mecanismos de guía axonal. 29
 - 3.1.- *Drosophila melanogaster* como modelo. 29
 - 3.2.- Embriogénesis del sistema nervioso. 33
 - 3.3.- Principales rutas de guía axonal en *Drosophila melanogaster*. 37
 - 3.2.1.- La vía Slit/Robo en la formación del VNC. 38
 - 3.2.1.1.- Slit. 38
 - 3.2.1.2.- Receptores Robo. 41
 - 3.3.2.- Reguladores de la vía Slit/Robo. 47
 - 3.3.2.1.- *Commissureles*. 48
 - 3.3.2.2.- Heparán sulfato proteoglicanos. 51
 - 3.3.3.- La vía Netrina/Frazzled en la formación de la VNC. 56
 - 3.3.3.1.- Netrina. 57
 - 3.3.3.2.- Receptores de Netrina. 60
- 4.- Las proteínas SNARE en los procesos de guía axonal. 65
- 5.- Tráfico de membrana y las proteínas SNARE. 66
- 6.- Las Sintaxinas. 71
- 7.- Los procesos de guía axonal en la progresión tumoral. 76
 - 7.1. - Netrina/DCC. 77
 - 7.2. - Slit/Robo. 79
8. - Glioblastomas. 82
 - 8.1.- Origen y desarrollo del glioblastoma. 84

RESULTADOS 89

Parte I: las proteínas SNARE en guía axonal.

- 1.- Desarrollo del cordón ventral neural (VNC) en mutantes para proteínas SNARE. 91
- 2.- Desarrollo del sistema nervioso periférico en mutantes para proteínas SNARE. 101
- 3.- Los mutantes para Syx1A presentan los fenotipos más severos de todas las SNARE analizadas. 105
- 4.- Los defectos presentes en mutantes para *Syx1A* son debidos principalmente a problemas en la guía axonal. 108
- 5.- Estudios adicionales sobre los defectos en la guía axonal de mutantes para *Syx1A*. 111
- 6.- Mutantes para proteínas SNARE presentan defectos en guía axonal no asociados a Netrina/DCC. 116
- 7.- En embriones mutantes para la proteína SNARE Syx1A no se observa una alteración en niveles de expresión y localización de varias proteínas vinculadas con la vía Slit/Robo. 131

Parte II: las proteínas SNARE en la progresión tumoral 139

- 1.- El bloqueo de Stx1 produce *in vitro* una disminución de la proliferación e invasividad de células de glioblastoma. 139
- 2.- El bloqueo de Stx1 *in vivo* disminuye la progresión del glioblastoma en modelos murínicos. 155

DISCUSIÓN 159

Parte I: las proteínas SNARE en la guía axonal

- 1.- Mutantes para proteínas SNARE en *Drosophila melanogaster* desarrollan problemas de guía axonal. 161

- 2.- Diferencias fenotípicas entre los mutantes para las proteínas SNARE. 165
- 3.- ¿Qué causas generan las diferencias entre los fenotipos del cordón nervioso central y los nervios motores? 169
- 4.- Causas mecánicas de los defectos de guía axonal. 170
- 5.- Estado de la ruta Slit/Robo en mutantes para *Syx1A*. 174
- 6.- ¿Los fenotipos asociados a la vía Slit/Robo podrían aparecer en mutantes de proteínas SNARE si se afectaran otras vías? 179
- 7.- Modelo resumen. 180

Parte II: las proteínas SNARE en la progresión tumoral.

- 1.- El bloqueo de la función de Stx1 causa una disminución de la capacidad proliferativa de células de glioblastoma *in vitro* e *in vivo*. 183
- 2.- *In vitro* se observa una disminución de la capacidad celular invasiva al bloquear la función de Stx1. 185
- 3.- Modelo resumen. 186

Parte III: El papel de las proteínas SNARE en guía axonal y progresión tumoral.

- 1.- Modelo final. 187

CONCLUSIONES 189

MATERIALES Y MÉTODOS 193

Parte I: las proteínas SNARE en la guía axonal.

- 1.- Líneas genéticas. 195
- 2.- Tinción de embriones de *Drosophila melanogaster*. 196
- 3.- Anticuerpos. 197

- 4.- Adquisición de imágenes. 198
- 5.- Cuantificación de los niveles de proteínas en el cordón nervioso central mediante inmunofluorescencia. 199
- 6.- Protocolo de cuantificación de los defectos de guía axonal en el cordón nervioso ventral. 200
- 7.- Protocolo de cuantificación de los defectos de guía axonal en los nervios motores. 201

Parte II: las proteínas SNARE en el crecimiento tumoral.

1.- Experimental *in vitro*. 202

- 1.1.- Líneas celulares. 202
- 1.2.- Ensayos de luciferasa. 203
- 1.3.- Medición de la incorporación de BrdU. 204
- 1.4.- Curvas de proliferación. 206
- 1.5.- Ensayos de movilidad celular. 207
- 1.6.- Ensayos de adhesión. 207
- 1.7.- Ensayos de invasión. 209
- 1.8.- Zimografía en gel de gelatina. 209
- 1.9.- Inmunofluorescència *in vitro*. 210
- 1.10.- *Western Blot*. 211

2.- Experimental *in vivo*. 212

- 2.1.- Inoculación de células tumorales en el cerebro de ratones. 212
- 2.2.- Experimentos de incorporación de BrdU. 213

BIBLIOGRAFÍA 215

OBJETIVOS

Parte I: las proteínas SNARE en la guía axonal.

1.- Analizar la función de Sintaxina1A en la guía axonal durante el desarrollo embrionario.

2.- Estudiar la participación de otras proteínas SNARE en los procesos de guía axonal.

3.- Determinar si la función de Stx1 en guía axonal se encuentra limitada a la vía Netrina/DCC o es también importante en otros sistemas.

Parte II: las proteínas SNARE en la progresión tumoral.

4.- Evaluar la función de Stx1 la progresión de tumoral.

INTRODUCCIÓN

1.- El desarrollo del sistema nervioso.

Todos los organismos complejos, desde invertebrados como *Drosophila melanogaster* a mamíferos como el *Homo sapiens*, consiguen desarrollar una compleja red neuronal a través de una serie de mecanismos durante la embriogénesis. La compleja red neuronal que conforma el sistema nervioso de los individuos está formada por dos grupos celulares complementarios: las células gliales y las neuronas, siendo estas últimas las encargadas de la transmisión de la información a través del sistema.

Durante la embriogénesis, las neuronas pasan por los mecanismos de proliferación y migración comunes entre todos los tipos celulares pero a diferencia los otros grupos celulares, una vez se ha generado la cantidad adecuada de neuronas y estas han migrado adecuadamente a sus localizaciones dentro del sistema nervioso, es necesario un último paso: se ha de producir la conexión del cuerpo o soma de la neurona con su tejido diana a través del axón. Para ello el axón debe crecer direccionalmente desde el soma hasta su diana a travesando en algunos casos distancias tan largas como las que recorre en un embrión humano los axones de médula espinal que inervan las yemas de los dedos de las manos. Los procesos que dirigen la punta del axón, llamado también cono de crecimiento, son denominados procesos de guía axonal y se encuentran altamente regulados por mecanismos evolutivamente conservados que implican un gran grupo de señales (de corta o larga distancia, secretadas o adheridas a la membrana plasmática o la matriz extracelular, repulsivas o atractivas...), y sus correspondientes receptores, que se encuentran en el cono de crecimiento y modulan o contextualizan la información recibida.

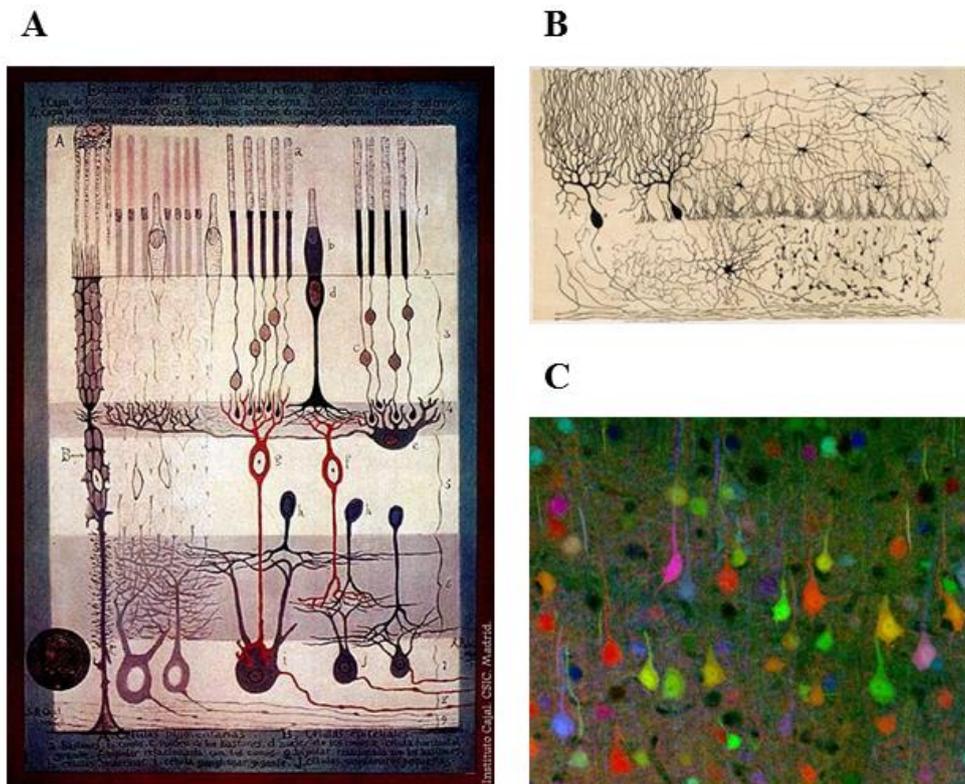


Figura 1. Las neuronas en el sistema nervioso. A, dibujo esquemático de la retina de mamíferos realizado por el Dr. Ramón y Cajal en “La retina de los mamíferos”. Madrid, 1900. B, dibujo esquemático de las células del cerebelo de pollo realizado por el Dr. Ramón y Cajal en “Estructura de los nervios de las aves”. Madrid, 1905. C, imagen de inmunofluorescencia de neuronas de ratón en la cual se ha utilizado la técnica *Brainbow* para marcar individualmente cada neurona (Smith, 2007).

2.- Mecanismos de guía axonal.

Durante el desarrollo del sistema nervioso, los procesos de guía axonal son clave en la generación de una red neuronal adecuadamente interconectada y funcional. Las rutas de señalización que dirigen al cono de crecimiento en este fenómeno se conocen tanto en invertebrados y como en vertebrados (Song and Poo, 2001).

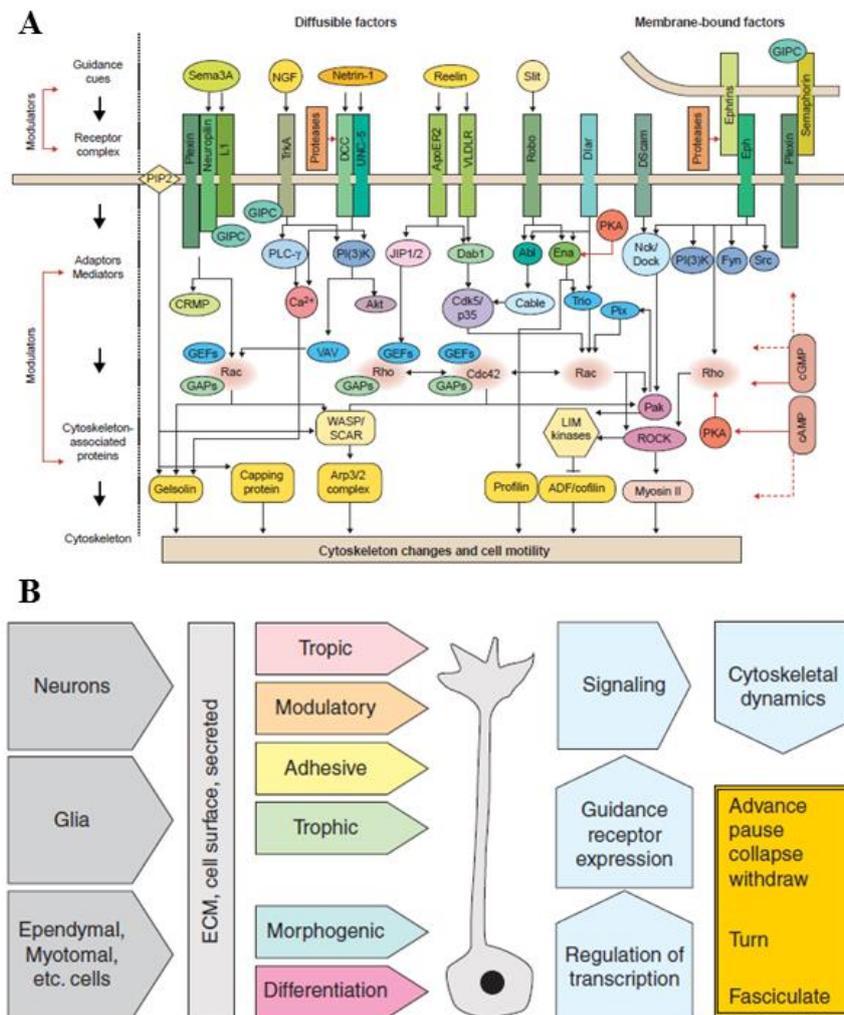


Figura 2. Señales de guía axonal. A, (Song and Poo, 2001) representación esquemática de las señales de guía axonal y las rutas moleculares que lo controlan (mecanismos de regulación del citoesqueleto, tráfico de membrana (no representado en el esquema), etc). B, (Raper and Mason, 2010) dibujo de las señales a las que está expuesto el cono de crecimiento y de los mecanismos que activa durante su desarrollo.

En muchos casos, el cono de crecimiento es dirigido a través de los tejidos por moléculas que difunden desde su fuente hasta el cono. En otros casos las moléculas se encuentran ancladas a la matriz extracelular o la superficie celular y dibujan caminos o barreras que mueven al axón hacia su diana (Lowery and Van Vactor, 2009). Todas estas señales están divididas en dos grupos:

- Señales generadas por moléculas difusibles. Entre ellas están incluidas muchas de las señales clásicamente descritas como quimioattractivas (por ejemplo, las provenientes de netrinas (Dickson, 2002) (Chilton, 2006)), o repulsivas (como por ejemplo, Slit (Kidd et al., 1999, cell)). Además de múltiples morfógenos (como Wnt, sonic hedgehog (SHH) o la proteína morfogénica de hueso (BMP) (Zou and Lyuksyutova, 2007)), o neurotransmisores (Mattson et al., 1988).
- Señales generadas por moléculas no difusibles. En este grupo están incluidas todas las moléculas ancladas a la membrana plasmática (por ejemplo, las moléculas transmembrana de adhesión celular (CAMs), (Maness and Schachner, 2007)), las efrinas, o aquellas moléculas que están presentes en la matriz extracelular (por ejemplo, la laminina y la fibronectina) (Evans et al., 2007).

En todos los casos, tanto si la molécula es difusible o como si no, la función quimioattractiva o quimiorepulsiva de la proteína depende de los receptores expresados en el cono de crecimiento. Las diferentes combinaciones de receptores expresados en el cono de crecimiento modulan positiva o negativamente la respuesta a una señal determinada, pudiendo en muchos casos generar respuestas opuestas según el contexto.

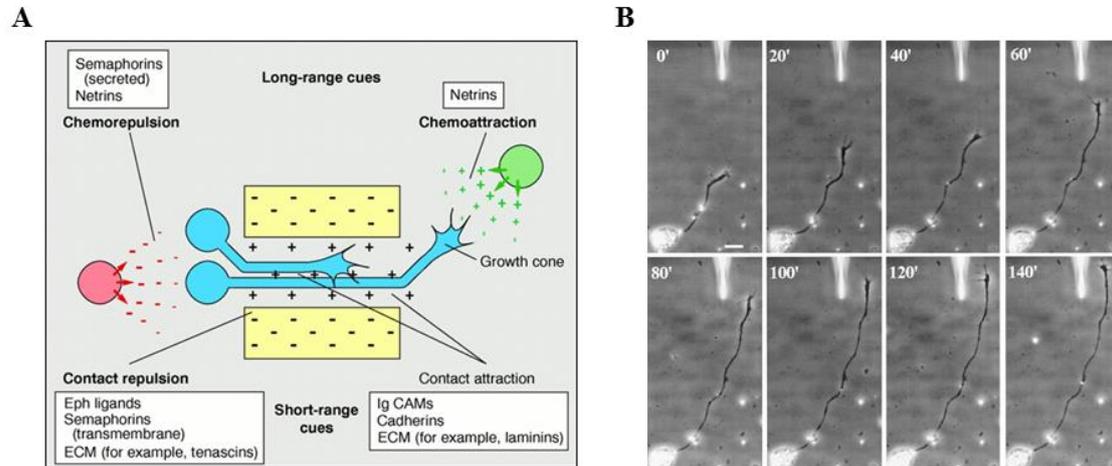


Figura 3. El cono de crecimiento. A, esquema representativo de algunas de las señales de guía axonal y su papel a corta o larga distancia. B, (Ming et al., 1997) imágenes *in vitro* de un cono de crecimiento en presencia de un gradiente de Netrina1 generado a través de una pipeta (punta gris en la parte superior derecha de cada imagen). El crecimiento en zigzag refleja una oscilación entre una respuesta atractiva-repulsiva del cono ante el gradiente de Netrina1. Esto es debido a que Netrina1 se va uniendo a un homodímero de su receptor DCC (que da una respuesta atractiva) o aun heterodímero DCC/UNC5 (que da una respuesta repulsiva) según el contexto ambiental. A bajas concentraciones de Netrina1 el resultado es un comportamiento atractivo del cono hacia la fuente de Netrina1 porque Netrina1 se une prioritariamente al homodímero DCC/DCC. Sin embargo, a cortas distancias (en las proximidades de la pipeta), el incremento de la concentración de Netrina1 satura los homodímeros DCC/DCC y también los heterodímeros DCC/UNC5, lo que genera la repulsión del cono de crecimiento.

3.- *Drosophila melanogaster* en los mecanismos de guía axonal.

3.1.- *Drosophila melanogaster* como modelo.

Durante siglos el estudio de vertebrados e invertebrados ha servido para obtener un conocimiento preciso de los mecanismos que rigen el funcionamiento de los seres vivos. Con este objetivo, uno de los modelos más utilizados por la Biología moderna es la mosca *Drosophila melanogaster*. Desde los trabajos realizados por Thomas Hunt Morgan (premio novel de medicina 1933) sobre la herencia de caracteres a través de los genes, *Drosophila melanogaster* se ha convertido en uno de los modelos del desarrollo más utilizados en el siglo XX y XXI.

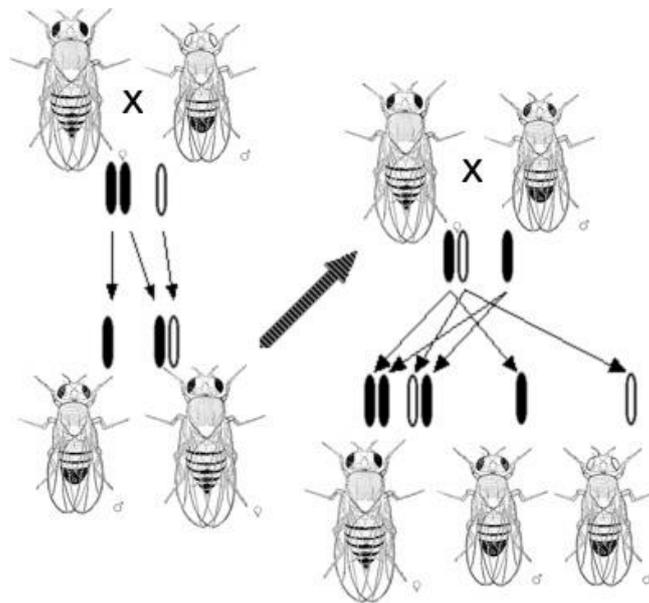


Figura 4. *Drosophila melanogaster* como modelo de investigación. (Hunt, T. (1919). The Physical basis of heredity.). Esquema que refleja la herencia asociada al sexo de la mutación *white*, que otorga un color de ojos blanco a los individuos. A la izquierda se representa un primer cruce entre un macho de ojos blancos y una hembra con los cromosomas sexuales sin la mutación *white*. Del cruce se obtiene una hembra heterocigota para la mutación *white*, (por lo tanto tiene los ojos rojos ya que *white* no es un carácter dominante), y esta hembra se cruza con un macho sin la mutación dando lugar a una nueva generación de cuyo fenotipo se puede deducir que *white* se hereda a través de cromosomas sexuales (esquema de cruce de la derecha).

La elección de un modelo de estudio adecuado es clave en cualquier línea de investigación. Independientemente del modelo elegido, todos ellos están sujetos a una serie de limitaciones y ventajas que los hacen más o menos aptos para abordar un problema experimental u otro. De todos los organismos utilizados como organismos modelo en la Biología, sólo unos pocos han acabado siendo utilizados universalmente debido a sus ventajas y actualmente, sirven como patrón experimental en cualquier trabajo científico. A continuación expongo algunos de los factores que han convertido a *Drosophila melanogaster* en uno de los modelos principales:

3.1.1.- Un ciclo de vida breve (10-12 días desde la puesta de los huevos fertilizados hasta la obtención de adultos sexualmente maduros) y dividido en distintas fases claramente diferenciadas: fase embrionaria, larval y adulta. Lo cual permite estudiar en plazos cortos de tiempo procesos como la embriogénesis, la maduración sexual y el envejecimiento.

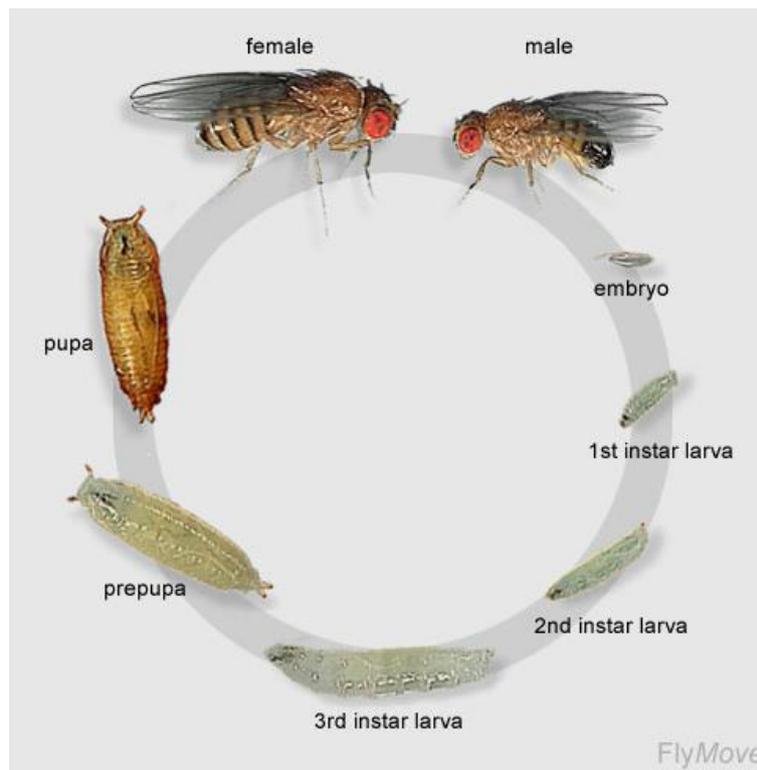


Figura 5. (flymove) Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*. A 25°C el ciclo completo tiene una duración aproximada de los diez días y se divide en varias fases: embriogénesis (1 día), primera fase larvaria (1 día), segunda fase larvaria (1 día), tercera fase larvaria (2-3 días) y fase de pupa (5 días). Tras la eclosión los adultos alcanzan la madurez sexual en menos de 12 horas.

3.1.2.- Desarrollo embrionario extrauterino. Los embriones son de fácil manipulación e incluso es posible eliminar las capas más externas que los recubren para hacerlos parcialmente transparentes y estudiar su desarrollo *in vivo* o mediante tinciones. Esto facilita el estudio de la guía axonal y otros procesos que se dan durante la embriogénesis.

3.1.3.- Bajo coste de mantenimiento y alto número de individuos por puesta. Una única hembra fértil genera puestas de 100-200 huevos y los individuos requieren instalaciones de bajo coste durante todo su desarrollo. Las moscas crecen en recipientes cerrados que permiten el intercambio de gases y como fuente de alimentos tienen una

papilla de frutas y levadura. Los recipientes (normalmente tubos de plástico), se guardan en cámaras termoreguladas (a 18°C o 25°C) con humedad y ciclos de luz controlados. En general no se requiere esterilidad, suplementos específicos en la alimentación o un espacio importante para el mantenimiento y almacenamiento de las líneas genéticas. Estos factores, junto con su corto ciclo vital, facilitan el trabajo simultáneo con un gran número de individuos o líneas genéticas.

3.1.4.- Alto grado de conservación evolutiva de los procesos biológicos de *Drosophila melanogaster*. Más del 60% de los genes presentes en la mosca se encuentran conservados en vertebrados, y muchas de las rutas moleculares están conservadas total o parcialmente a lo largo de la evolución.

3.1.5.- Herramientas de manipulación genética. Técnicas como el sistema Gal4 (Brand and Perrimon, 1993), que permite la expresión de proteínas, RNA, etc... dirigida por promotores a nuestra elección, el MARCM (Análisis de mosaicos con un marcador celular reprimible) que permite la generación de clones mutantes identificables en un entorno control (Lee and Luo, 1999), (Lai and Lee, 2006), o la adaptación de la técnica *Brainblow* a *Drosophila*: *d-brainblow* (Hampel et al., 2011), son ejemplos del nivel de sofisticación alcanzado en la manipulación genética de *Drosophila melanogaster*.

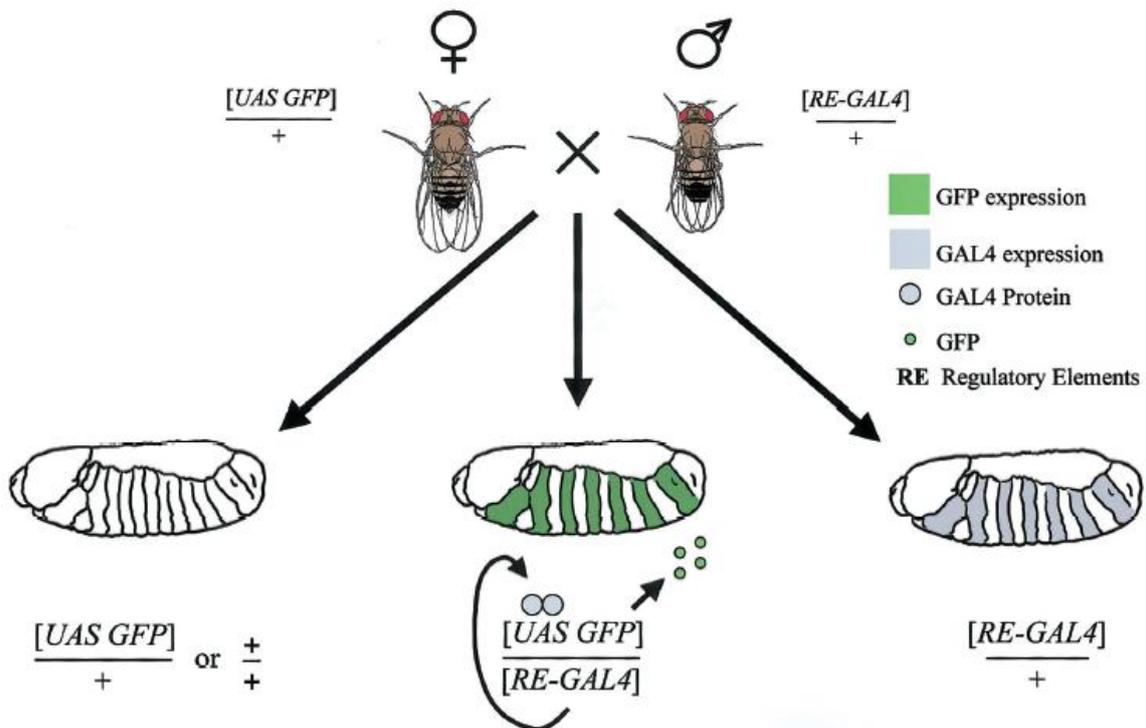


Figura 6. Técnicas de manipulación genética en *Drosophila melanogaster*: sistema Gal4-UAS. (Brand and Perrimon, 1993) (Duffy, 2002) ejemplo del funcionamiento del sistema Gal4: hembras con el elemento UAS-GFP son cruzadas con machos portadores de la proteína Gal4 asociada a un elemento regulador (normalmente a un gen concreto), que en este caso se expresa en un patrón a bandas durante la embriogénesis. Cuando la descendencia hereda los elementos Gal4 y UAS-GFP, el Gal4 expresado en un patrón definido por su elemento regulador se une al UAS provocando la producción de GFP con el patrón del elemento regulador del Gal4 (dando en este caso una expresión de GFP en bandas durante la embriogénesis).

3.2.- Embriogénesis del sistema nervioso.

En *Drosophila melanogaster*, la formación del sistema nervioso comienza con la neurogénesis a estadios 10-12 del desarrollo embrionario y concluye con los fenómenos de guía axonal que finalizan a estadio 17. Todos estos procesos tienen como objetivo la formación del sistema nervioso. Esta estructura neuronal se divide en dos partes:

3.2.1.- Sistema nervioso central: es una estructura de simetría bilateral con las neuronas situadas a ambos lados de la línea media (zona central del sistema nervioso central). En la línea media se encuentran las células gliales, que regulan parcialmente la proyección ipsilateral o contralateral de los axones. La mayoría de los axones tienen una proyección contralateral (que es única) y forma los nervios comisurales que atraviesan la línea media (Araujo and Tear, 2003). Tras esta proyección los axones se unen al resto de axones ipsilaterales y crean los nervios situados en los laterales de la línea media. Todo este proceso se inicia a estadio 12 y finaliza a estadio 17.

3.2.2.- Sistema nervioso periférico: se encuentra compuesto por las neuronas sensoriales y los nervios motores. Ambas estructuras están estudiadas en menor profundidad que el sistema nervioso central aunque actualmente existe un creciente número de trabajos sobre ambos, especialmente sobre los nervios motores.

Los nervios periféricos se distribuyen por segmentos siendo las estructuras en los segmentos A1-A7 iguales en su organización, mientras que en el resto de segmentos hay estructuras de diversa morfología como los órganos sensoriales del segmento abdominal A8 y el órgano de Telson (A9). Los nervios periféricos situados en los segmentos A1-A7 están formados por dos fascículas, una anterior y una posterior, que no se relacionan entre sí hasta su entrada en el cordón nervioso ventral (Campos-Ortega J. A., Hartenstein V., (1985). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*).

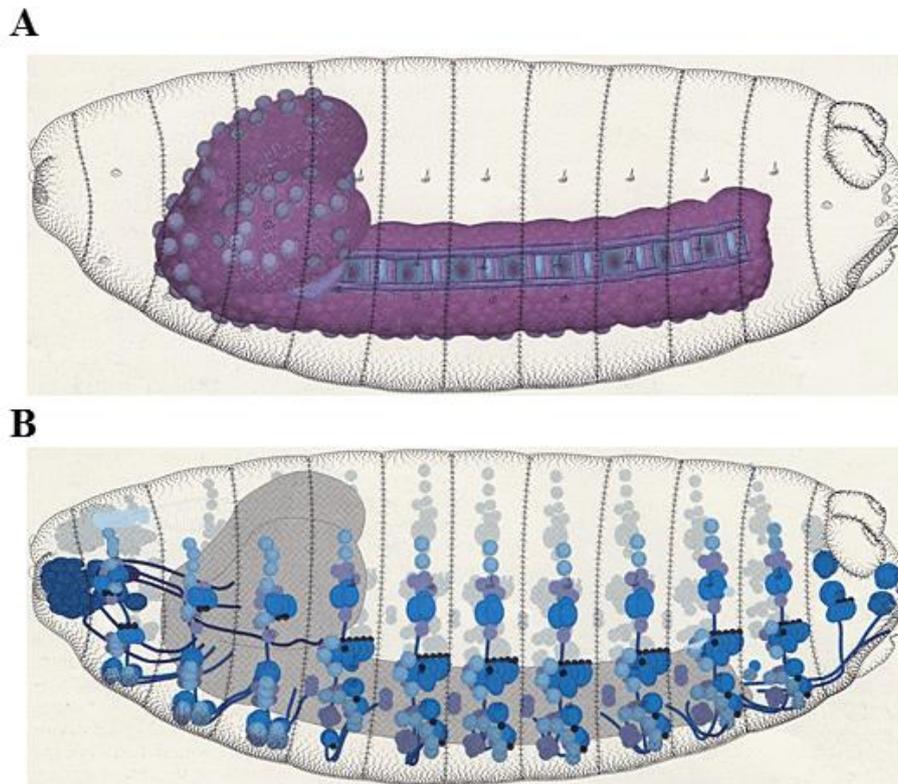


Figura 7. Sistema nervioso central y periférico en embriones de *Drosophila melanogaster*. A, (flybase) dibujo esquemático del sistema nervioso central una vez finalizado el desarrollo embrionario (estadio 17). Se han representado los núcleos neuronales cerebrales (esferas azules), las neuronas y axones del sistema nervioso central (líneas azuladas), y todo el tejido glial (color púrpura). B, (flybase) dibujo esquemático del sistema nervioso periférico una vez finalizado el desarrollo embrionario (estadio 17). Se han representado con esferas y líneas de distintos colores los núcleos neuronales y algunas de las proyecciones axonales (especialmente del sistema sensorial).

Si nos centramos en los nervios motores, es importante recordar que en el embrión de *Drosophila melanogaster* las paredes musculares están formadas por treinta fibras individuales en cada hemisegmento abdominal (segmentos A2-A7) (Bate, 1990) (Vactor et al., 1993). La inervación de estas fibras es llevada a cabo por treinta y cuatro motoneuronas que forman patrones muy concretos de conectividad con los músculos (Johansen et al., 1989) (Sink and Whittington, 1991) (Halpern et al., 1991). Los axones salen del sistema nervioso central hacia las paredes musculares agrupándose en dos nervios: el nervio intersegmental (ISN) que inerva exclusivamente fibras dorsales y

INTRODUCCIÓN

dorsolaterales cuando la pared muscular es todavía un conjunto de mioblastos sin diferenciar, y el nervio segmental (SN), que sale del sistema nervioso central cuando las fibras musculares se han formado por completo e inerva únicamente fibras musculares ventrales. El SN se subdivide en cuatro nervios: SNa, SNb, SNc y SNd. Todo este proceso se inicia con la salida de los nervios motores desde el sistema nervioso central (estadio 13-14) y finaliza con las últimas sinapsis en las fibras musculares en fases tardías del estadio 16 o a principios del 17.

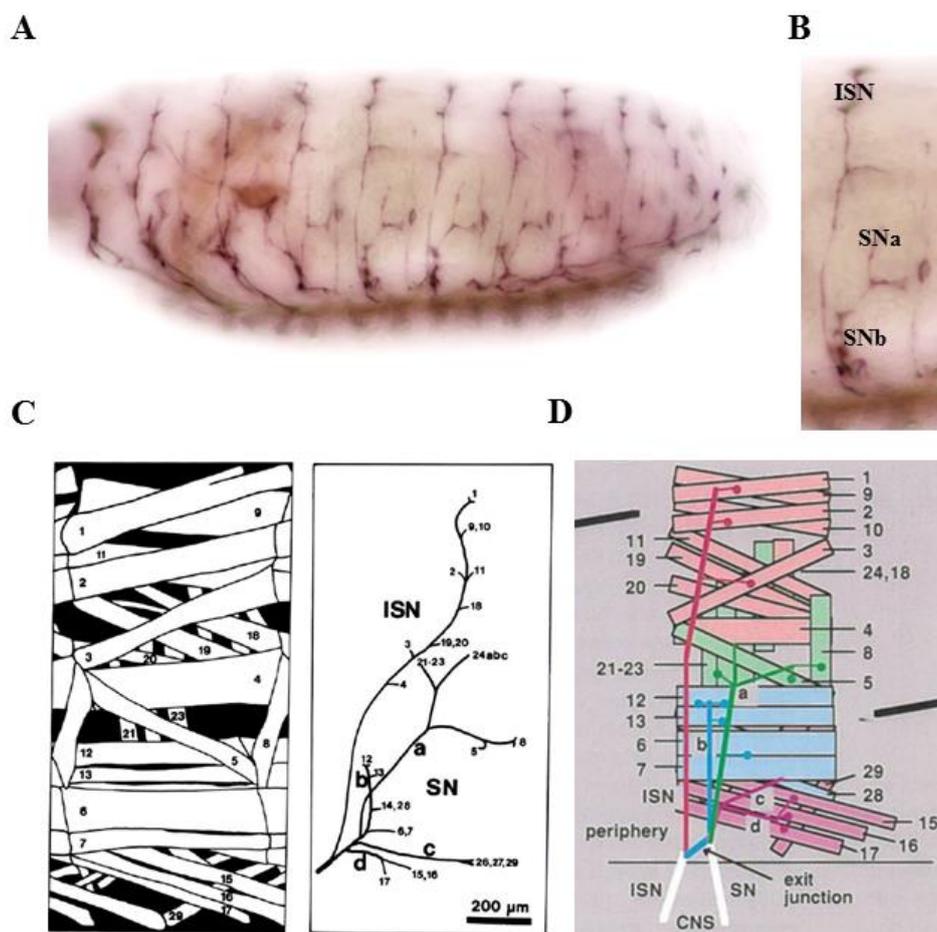


Figura 8. Sistema nervioso motor en embriones de *Drosophila melanogaster*. A, perspectiva lateral de un embrión control a estadio 17 marcado con anti-FasciclinII, que permite reconocer el ISN, SNa y SNb. B, zoom del embrión donde se muestra un único segmento abdominal. C, (Johansen et al., 1989) dibujo esquemático de las fibras musculares a la izquierda y los nervios motores a la derecha. D, (Vactor et al., 1993) representación de los nervios motores y las fibras musculares que inervan.

Es importante señalar que el sistema motor es un modelo menos estudiado que el sistema nervioso central pero la presencia de nervios aislados facilita la detección de problemas en la guía axonal. Por lo tanto, pese a la existencia de ciertas diferencias entre el sistema central y el motor (aunque ambas estructuras comparten la mayor parte de los mecanismos de guía axonal, existen ciertas diferencias entre ambos como el papel de las células gliales, la organización estructural, el rol de la sinaptogénesis, etc.), en nuestro trabajo hemos utilizado el desarrollo del sistema nervioso motor como un complemento al trabajo realizado en el sistema nervioso central.

3.3- Principales rutas de guía axonal en *Drosophila melanogaster*.

Durante años, *Drosophila melanogaster* ha permitido la identificación de moléculas clave en la guía axonal (Brose et al., 1999) (Kidd et al., 1998a) y ha confirmado la conservación de las rutas principales que dirigen el cono de crecimiento (Kolodziej et al., 1996).

Casi todos los estudios clásicos en *Drosophila* utilizaron la formación del cordón neuronal ventral (VNC) como modelo para analizar los procesos de guía axonal. Como consecuencia de esta práctica, las rutas de guía axonal están descritas con mayor precisión en el VNC.

3.2.1.- La vía Slit/Robo en la formación del VNC.

La vía Slit/Robo (junto con la vía Netrina/Frazzled), es la principal reguladora de los procesos de guía axonal en el VNC. Su función principal es controlar el cruce contralateral de nervios a través de la línea media repeliendo la mayor parte de los conos de crecimiento. Esta repulsión se produce mediante la secreción de Slit en las células gliales de la línea media y la expresión sus receptores (las proteínas transmembrana Robo), en los conos de crecimiento.

Además de Slit y sus receptores Robo, el funcionamiento de esta vía está condicionado por otras proteínas que modulan la respuesta del cono a la presencia de Slit. Algunas de estas proteínas son *Commisureles* (Tear et al., 1996) o los heparán sulfato proteoglicanos (Johnson et al., 2004) (Smart et al., 2011).

3.2.1.1.- Slit.

En *Drosophila melanogaster* los primeros mutantes de *slit* fueron encontrados en un cribado donde los individuos presentaban defectos en la formación de la cutícula larvaria, el sistema nervioso central y la involución de la cabeza (Nüsslein-Volhard et al., 1984). Posteriormente, Slit se identificó como una molécula clave en los procesos de guía axonal (Brose et al., 1999) (Kidd et al., 1999) (Rajagopalan et al., 2000a) y se comprobó que existe un alto grado de conservación evolutiva en los mecanismos relacionados con *slit*, ya que las tres variantes genéticas de *slit* presentes en vertebrados tienen más de un 40% de su secuencia conservada en *Drosophila melanogaster* (Brose et al., 1999) (Rothberg et al., 1990).

Durante el desarrollo del sistema nervioso central Slit es secretado por las células gliales *single minded* (*sim*) (Crews et al., 1988) (Thomas et al., 1988), y difunde generando un gradiente a ambos lados del sistema nervioso central (CNS) (Kidd et al., 1999) (Steigemann et al., 2004a). Pero como Slit es una molécula con una baja capacidad de difusión, su gradiente se concentra en el VNC y su efecto se aplica a corta distancia (Bhat et al., 2007).

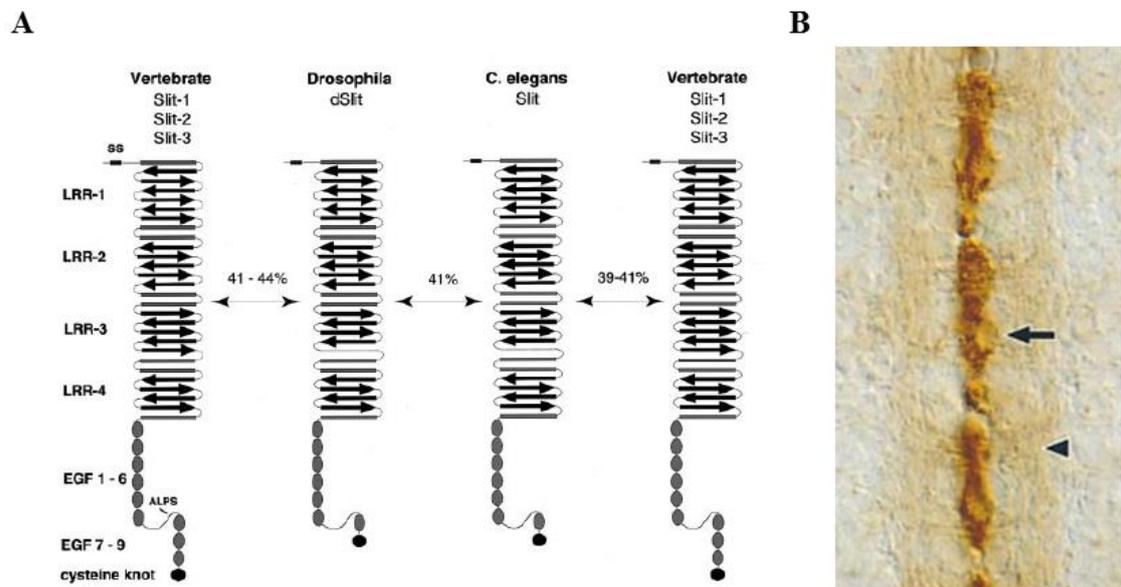


Figura 9. Estructura y patrón de expresión de *slit* en el VNC. A, (Brose et al., 1999) diagrama ilustrando los dominios estructurales de los miembros de la familia Slit y el porcentaje de identidad entre ellos. B, (Kidd et al., 1999) embrión control a estadio 16 teñido con anticuerpos anti-C555 para mostrar la expresión de *slit*. Los niveles más elevados de Slit se encuentran en la glía de la línea media (flecha) y se observa el patrón de difusión ambos lados del VNC (cabeza de flecha).

La ausencia de Slit en el desarrollo del sistema nervioso central (CNS), genera problemas de guía axonal. En embriones mutantes *slit*^{-/-} (Kidd et al., 1999), el cono de crecimiento penetra en la línea media pero es incapaz de abandonarla (pese a que expresa anormalmente elevados niveles de receptores Robo). Este hecho atribuye a la

vía Slit/Robo propiedades repulsivas a corta distancia ya que en condiciones normales los conos de crecimiento con altos niveles de Robo son repelidos ante la presencia de Slit, pero el efecto es de corta distancia por lo cual los axones no se alejen indefinidamente de la línea media sino que se posicionan longitudinalmente a ambos lados de la línea media, donde los niveles de Slit son menores.

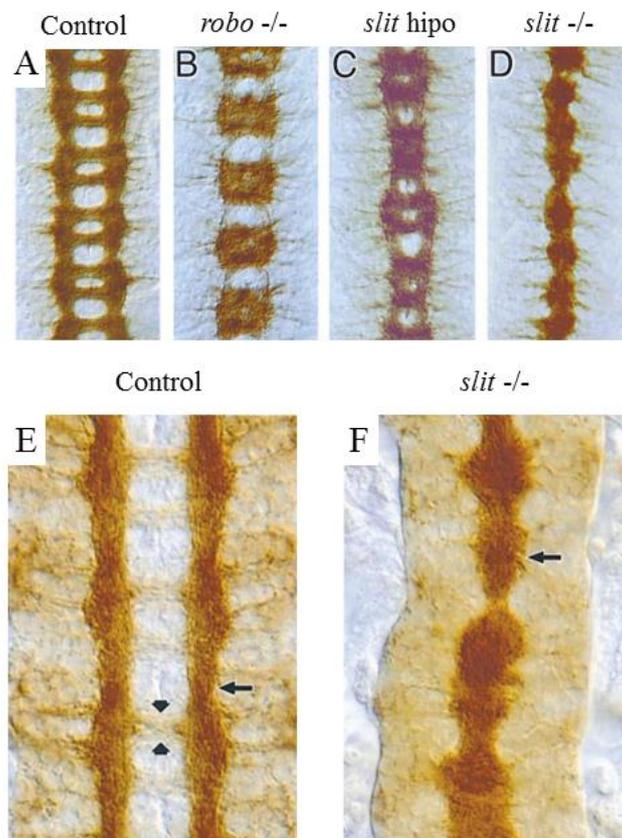


Figura 10. (Kidd et al., 1999) **Fenotipos de embriones mutantes para *slit*.** A, embrión control teñido con anti-BP102, que muestra el patrón normal de dos haces comisurales cruzando la línea media por segmento. B, mutante nulo para *robo*, receptor de *slit*, donde se aprecia una acumulación de nervios cruzando la línea media y una disminución del grosor de los haces nerviosos laterales. C, embrión hipomorfo para *slit* en el cual se ve una acumulación de nervios en la línea media y una disminución del grosor de los nervios laterales. D, embrión nulo para *slit* en el cual se observa un colapso total de los axones y su incapacidad para salir de la línea media. E, embrión control a estadio 16 que ha sido teñido con el anticuerpo 13C9 para mostrar la expresión de Robo. Los niveles más elevados de Robo se encuentran en los haces longitudinales del VNC (flecha), y se aprecian una niveles bajos de Robo en los axones comisurales (flechas cortas). F, embrión nulo para *slit* teñido con 13C9 que muestra unos niveles elevados de Robo en los axones colapsados en la línea media (flecha).

3.2.1.2.- Receptores Robo.

En *Drosophila melanogaster* inicialmente fue identificado un único receptor de Slit: Robo, que tiene en algunas de sus regiones hasta un 58% de homología con el receptor Robo1 de humanos (Kidd et al., 1998b) Posteriormente se identificaron dos receptores adicionales en *Drosophila melanogaster*: Robo2 y Robo3.

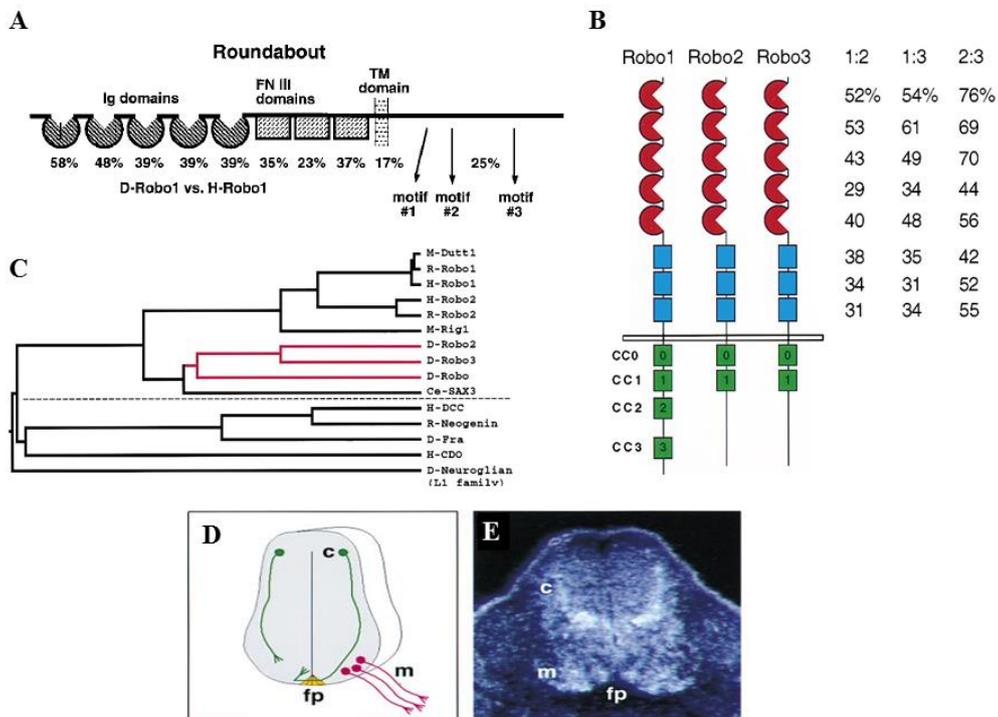


Figura 11. Estructura y patrón de expresión de los receptores Robo en diferentes especies A, (Kidd et al., 1998b) esquema de la estructura de la proteína Robo donde se muestran las posiciones de los dominios de inmunoglobulina (Ig), fibronectina (FN), los dominios transmembrana (TM) y la parte intracelular. También se muestran los porcentajes de identidad de aminoácidos entre Robo y su homólogo en humanos: H-Robo. B, (Simpson et al., 2000a) esquema de la composición estructural de las proteínas Robo en *Drosophila melanogaster* (en rojo los motivos Ig, azul los FN y verde los motivos intracelulares) y el porcentaje de homología entre los distintos receptores Robo. C, (Simpson et al., 2000) árbol filogenético generado comparando la secuencia completa de Robo, Robo2 y Robo3 con las proteínas genéticamente más próximas. D-E, (Kidd et al., 1998b) expresión de robo1 en el desarrollo de la médula espinal de rata. D, representación esquemática de las proyecciones donde a E13 la mayoría de los axones comisurales (c) han cruzado la *floor plate* (fp) y los nervios motores (m) han proyectado más

Es importante recalcar que aunque los tres receptores Robo se unen a Slit, existen diferencias en las funciones que ejerce cada receptor durante el desarrollo. Estas variaciones se generan por variaciones en las estructuras y los niveles de expresión proteicos. (Spitzweck et al., 2010).

3.2.1.2.1- Estructura, expresión y funcionamiento de los receptores Robo.

Los tres receptores Robo presentes en *Drosophila melanogaster* son proteínas transmembrana con un único motivo transmembrana (figura 11). Su ectodominio es muy similar entre ellos y está compuesto por una serie de cinco dominios inmunoglobulina y tres de fibronectina tipo III (Brose et al., 1999). Sin embargo, los receptores difieren en la composición de sus dominios citoplasmáticos: Robo1 tiene las 4 regiones cortas conservadas con una secuencia consenso (CC0-CC3) común entre casi todos los robos, pero Robo2 y Robo3 carecen de los motivos CC2 y CC3, que median interacciones con múltiples con elementos intracelulares (Evans et al., 2010). A parte de estas diferencias intracelulares, todos los receptores se unen a Slit, aunque lo pueden hacer con distinta afinidad de unión y/o estequiometría de unión (se han observado diferencias de estas dos cualidades entre Robo y Robo2) (Evans and Bashaw, 2010).

allá de la línea media. E, sección transversal de médula espinal de rata a E3 donde el Robo1 mRNA se visualiza mediante hibridación *in situ*. Como se puede apreciar, el mRNA de Robo1 se detecta sobre los cuerpos celulares de las neuronas comisurales y motoras. Niveles más bajos de expresión se detectan en zonas intermedias de la médula espinal, pero no hay expresión en la *floor plate*, *roof plate* y *el dorsal root*.

robo1 y *robo2* están expresados en la mayoría, posiblemente en todas, las neuronas que definen las vías axonales durante la embriogénesis a estadio 12. *robo3* no se expresa hasta el estadio 13 y está limitado a varios subgrupos de neuronas. La expresión de *robo1* persiste durante toda embriogénesis mientras que la de *robo2* se extingue en muchas neuronas conforme el proceso avanza. De todos modos, desde el estadio 14 todas las neuronas del VNC expresan algún tipo de receptor Robo o combinaciones de ellos. Esta expresión diferencial posiciona los axones en las distintas fascículas longitudinales del cordón nervioso ventral según sus niveles de receptores Robo. (Simpson et al., 2000b) (Simpson et al., 2000a) (Araujo and Tear, 2003) (Spitzweck et al., 2010).

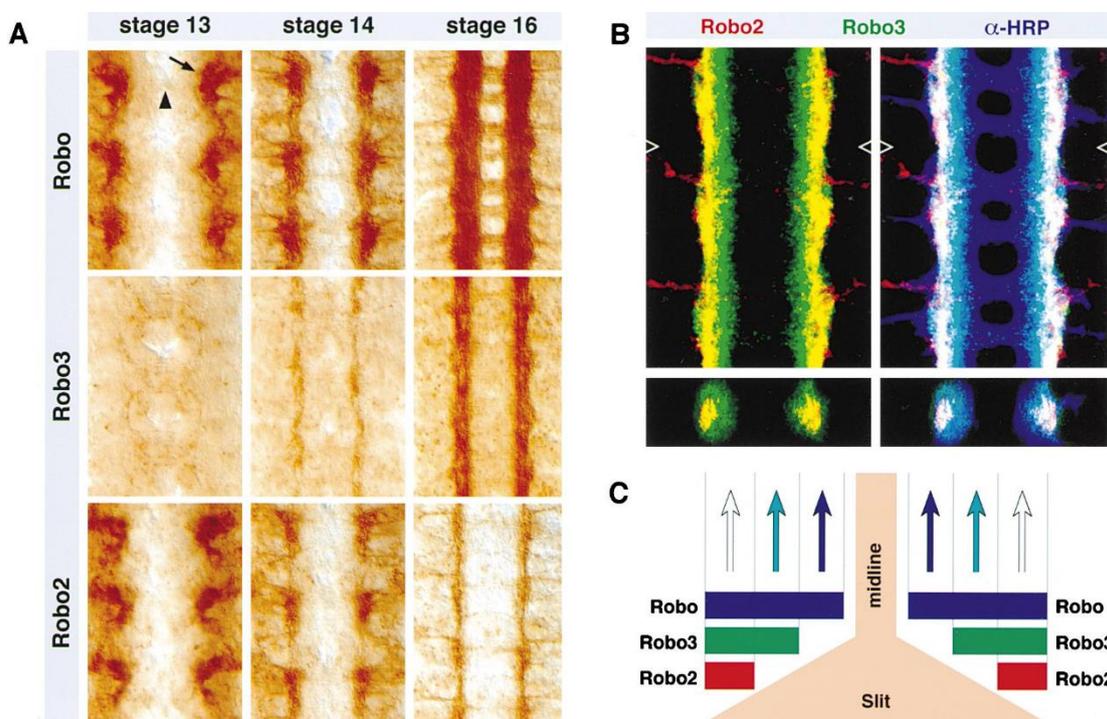


Figura 12. Estructura y patrón de expresión de los receptores Robo en el VNC. (Rajagopalan et al., 2000b) A, el sistema nervioso central de embriones control teñidos con anticuerpos contra Robo, Robo2 o Robo3. A fases tardías del estadio 12 o tempranas del 13 los patrones de expresión de Robo y Robo2 son casi idénticos, con altos niveles detectables en los conos de crecimiento de los axones pioneros en la formación de las vías longitudinales (flecha), pero no en los conos de crecimiento de los primeros axones comisurales (flecha cabeza). Sin embargo, Robo3 es casi indetectable a estos estadios. A estadio 14 los patrones de expresión entre Robo1 y Robo2 todavía son muy similares aunque Robo2 está presente en menos axones y la expresión de Robo3 ya es claramente detectable. A estadio 16 los tres robos se expresan en los axones longitudinales con patrones distintos aunque solapantes en las zonas laterales. B, imágenes inmunofluorescentes de embriones control a estadio 16 teñidos contra Robo2 (rojo), Robo3 (verde) y HRP (azul). El panel de la izquierda muestra Robo2 y Robo3, mientras que a la derecha se ven los tres marcadores solapados. C, esquema de los patrones de expresión de los receptores Robo y de la presencia de Slit en el VNC.

Es la expresión diferencial de los distintos receptores Robo el factor principal que posiciona los axones en unas fascículas longitudinales del cordón nervioso ventral u otras. El cruce a través de la línea media se produce porque los axones son atraídos hacia ella por señales atractivas como las generadas por la vía Netrina/Frazzled.

Inicialmente, el cono de crecimiento no expresa ningún receptor Robo por lo que no detecta el patrón repulsivo de Slit en la línea media. Sin embargo, conforme va penetrando en la línea media, el cono de crecimiento empieza a externalizar receptores Robo. Esto lo vuelve sensible a la presencia de Slit y provoca la salida del axón por el lado opuesto de la línea media. Tras este proceso los axones expresan permanentemente alguno de los receptores Robo (o combinaciones de ellos), por lo que son incapaces de volver a atravesar la línea media. En embriones *robo* ^{-/-} los axones no reconocen adecuadamente la presencia de Slit y colapsan en gran número en la línea media.

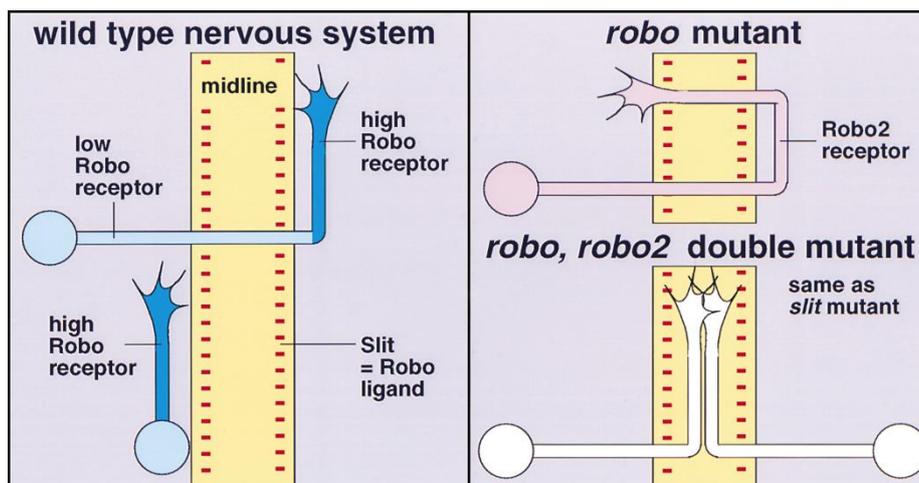


Figura 13. Mecanismo de acción de los receptores Robo en la formación del VNC. (Simpson et al., 2000a) En condiciones control los axones no proyectan contralateralmente mientras mantengan unos altos niveles de expresión de Robo en el cono de crecimiento. Si estos niveles disminuyen notablemente el cono, al ser insensible a los altos niveles de Slit presentes, penetra en la línea media hasta que aumenta la expresión de Robo en el cono de crecimiento. Este hecho genera la salida del cono de la línea media y la proyección contralateral del axón. En ausencia de Robo los axones penetran en la línea media, pero la presencia de los otros receptores Robo: Robo2 y Robo3 (robo3 no ha sido representado) mantiene una cierta respuesta ante la presencia de Slit y no se produce un colapso total de los axones. En ausencia de todos los receptores Robo, los axones colapsan en la línea media guiados por las señales de guía axonal atractivas y son incapaces de proyectar contralateralmente en ningún caso.

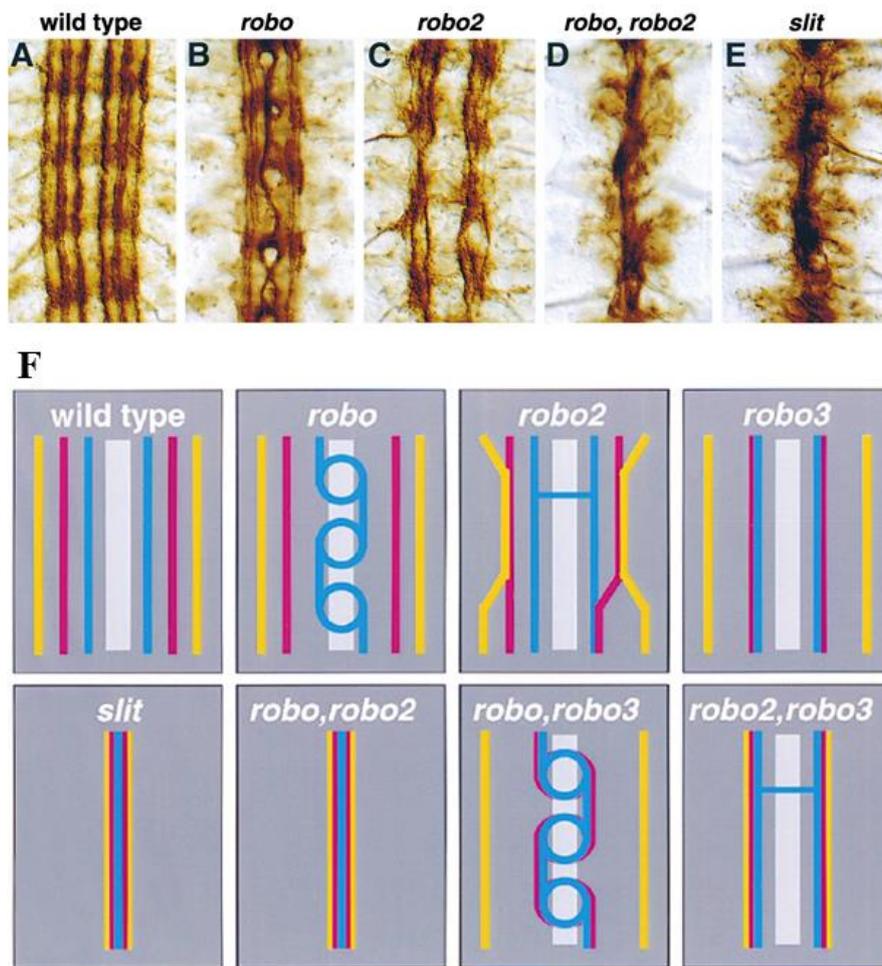


Figura 14. Fenotipos de embriones mutantes para receptores Robo. A, (Simpson et al., 2000b) embrión a estadio 17 teñido con anti-FasciclinaII para marcar las tres fascículas positivas para FasciclinaII: la medial, intermedia y lateral. Esta tinción no marca otras fascículas ipsilaterales o los haces comisurales que cruzan la línea media. B, mutante *robo*^{-/-} donde la fascícula medial (la más cercana a la línea media), colapsa en la línea media. C, en mutantes para *robo2*^{-/-} se producen cruces ocasionales a través de la línea media y la organización la fascícula longitudinal se encuentra afectada. Asimismo hay cruces entre las fascículas intermedia y medial o intermedia y lateral de un mismo lado. D-E, doble mutantes *robo*^{-/-}; *robo2*^{-/-} o mutante *slit*^{-/-}. Presentan todas las fascículas positivas para FasciclinaII colapsadas y desarrollándose a lo largo de la línea media. F, (Simpson et al., 2000) diagrama de los fenotipos en mutantes para la familia Robo. Este diagrama representa combinaciones de los fenotipos *robo* que muestran como *robo* y *robo2* regulan el cruce de la línea media, mientras que *robo2* y *robo3* están más especializados, junto con *robo*, en generar el adecuado posicionamiento de las fascículas. Aquí

Finalmente, es importante señalar la expresión diferencial de los receptores Robo está asociada a la distinta regulación genética controlada por cada receptor. Esto hace que cada robo tenga funciones concretas aunque algunas de ellas pueden ser redundantes entre los receptores. Por ejemplo, Robo1 está especializado en prevenir el cruce de axones longitudinales mientras que Robo2, aunque tiene una cierta capacidad para prevenir el cruce de axones longitudinales, también tiene una función favoreciendo el cruce de axones comisurales. Por último, Robo3 tiene un papel importante en la construcción de los axones intermedios y longitudinales (Spitzweck et al., 2010)

3.3.2.- Reguladores de la vía Slit/Robo.

En la vía Slit/Robo existen varias familias de proteínas que modulan la función repulsiva de Slit y sus receptores Robo. Esta regulación se da a múltiples niveles, desde la expresión de proteínas como los heparán sulfato proteoglicanos (HSPGs), que actúan como correceptores de Slit y además regulan de su patrón de difusión; hasta proteínas que controlan la externalización de los receptores Robo en el cono de crecimiento (como por ejemplo, *Commisureless*).

únicamente están marcadas las fascículas positivas pasa FasciclinaII a estadio 17 y han sido representadas del siguiente modo: color azul (fascícula medial), que únicamente expresa *robo*. Color púrpura (fascícula intermedia), que tiene niveles de *robo* y *robo3*, mientras que la fascícula lateral (color amarillo), expresa *robo*, *robo2* y *robo3*.

3.3.2.1.- Commissureles.

Commissureless (comm) es una proteína específica de *Drosophila melanogaster* que controla negativamente los niveles de los receptores Robo presentes en el cono de crecimiento. Aunque a estadios tempranos está expresada en varias bandas germinales perpendiculares a la línea media, posteriormente se concentra en los neuroblastos y las células madre ganglionarias. A estadio 12 aparece una banda a lo largo de toda la línea media y posteriormente el patrón va evolucionando hasta que a estadio 16 *Comm* se encuentra en algunas células gliales y en los axones que están cruzando la línea media (Tear et al., 1996).

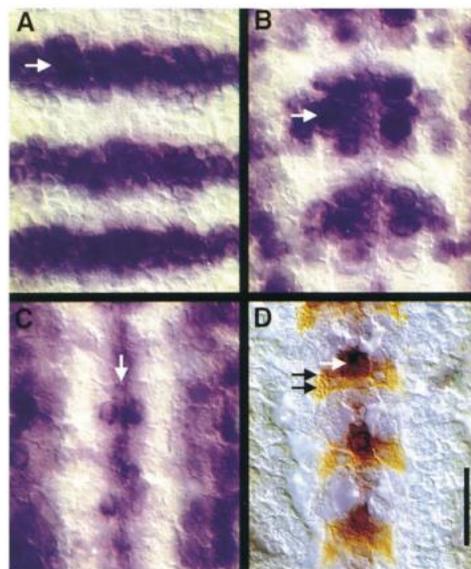


Figura 15. Expresión de *comm* RNA en la VNC. (Tear et al., 1996) Expresión de *comm* RNA durante la embriogénesis en embriones control utilizando hibridación *in situ* junto con una tinción anti-BP102 (D). A, embrión a estadio 6 que muestra la expresión de *comm* RNA en bandas germinales perpendiculares a la línea media (flecha blanca). B, embrión a estadio 10 la expresión se concentra en el desarrollo del sistema nervioso central, concretamente en los neuroblastos (flecha blanca) y las células madre ganglionarias. C, a estadio 12 se aprecia una banda a lo largo de toda la línea media (flecha blanca), así como la expresión en las columnas longitudinales de la epidermis adyacente al sistema nervioso central. D, en los embriones a estadio 16 *comm* se encuentra presente únicamente en el par de células gliales anterior y medial (flechas negras). Estas células son las encargadas de transmitir parte del RNA traducido ya en proteína a los axones comisurales que se encuentran cruzando la línea media (marcados con BP102, flecha blanca).

Commissureles es clave para regular la sensibilidad a Slit de los conos de crecimiento de los axones en *Drosophila melanogaster*. Esta sensibilidad se modula controlando los niveles de Robo presentes en el cono. Estos niveles son bajos inicialmente pero se disparan cuando el cono pasa al lado contralateral de la línea media y posteriormente se mantienen altos para evitar que el cono de crecimiento vuelva a penetrar en la línea media (Kidd et al., 1998a) (Kidd et al., 1998b) (Tear et al., 1996). Sin embargo, en mutantes *comm* ^{-/-} el cono de crecimiento expresa niveles elevados de Robo desde un principio por lo cual es incapaz de penetrar en la línea media. Aunque hay pruebas de que Comm ejerce una regulación negativa sobre Robo1 asociándose con él y evitando que alcance la superficie celular al reclutarlo hacia los endosomas (Tear et al., 1996) (Kidd et al., 1998a), no está claro si tiene la misma función regulando los niveles de Robo2 y Robo3 (Rajagopalan et al., 2000a).

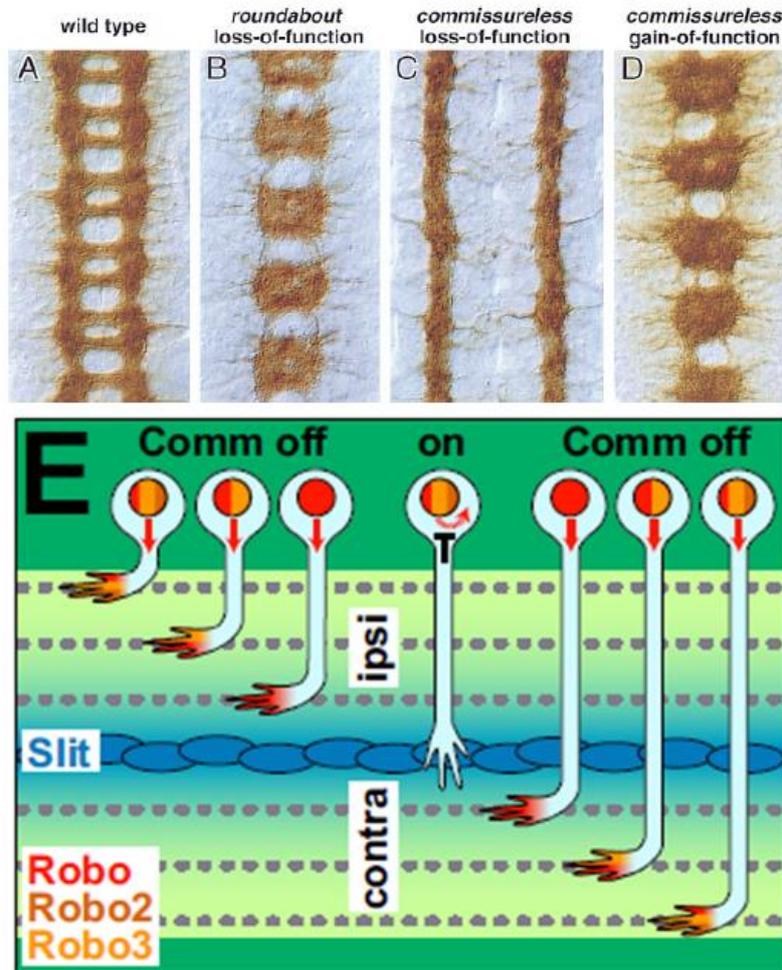


Figura 16. Fenotipo de embriones mutantes para *comm*. (Kidd et al., 1998a) Embriones fijados a estadio 16 y teñidos con anti-BP102, que marca todas las fascículas longitudinales y comisurales del sistema nervioso central. A, embrión control con el patrón característico de dos haces comisurales por segmento. B, embrión con una pérdida de función en *robo* donde se aprecia aun engrosamiento y acumulación de haces comisurales por segmento al mismo tiempo que hay una disminución en el grosor de las fascículas longitudinales. C, embrión con una pérdida de la función de *comm*. Se puede apreciar una desaparición de las fascículas comisurales y un engrosamiento de las longitudinales. D, embrión con una ganancia de función de *comm*, donde se aprecia aun engrosamiento y acumulación de haces comisurales por segmento al mismo tiempo que una disminución en el grosor de las fascículas longitudinales de un modo muy similar al ocurridos en la pérdida de función de *robo*. E, (Sánchez-Soriano et al., 2007) esquema sobre la regulación del cruce de axones a través de la línea media y elección de las vías mediolateral y longitudinal. *Comm* y una combinación de los receptores *Robo* codifica el posicionamiento mediolateral de los axones. Neurona expresando *comm* (T negra), lo cual previene el transporte de receptores *Robo* hacia el cono de crecimiento (representado en las otras neuronas con una flecha roja recta), y permite que el axón penetre en la línea media.

3.3.2.2.- Heparán sulfato proteoglicanos.

Los Heparán sulfato proteoglicanos (HSPGs) son un grupo de proteínas (la mayor parte transmembrana) presentes en la superficie celular, y consisten en un núcleo proteico unido a cadenas de heparán sulfato glucosaminas (Perrimon and Bernfield, 2000) (Couchman, 2003). Su compleja composición permite una gran variedad estructural mediante la utilización de diversos núcleos proteicos y/o modificaciones de las cadenas de heparán sulfato (HS) durante su síntesis. Estas proteínas tienen asociadas funciones en casi todos los procesos celulares: adhesión celular, movilidad, proliferación, morfogénesis, formación de espinas dendríticas, adhesiones focales o influir en mecanismos asociados con el citoesqueleto. Esto es debido a que la mayor parte de los HSPGs presentan modificaciones en su región HS que los permite actuar como correceptores en estos procesos, siendo una de sus funciones más conocidas su actuación durante la morfogénesis (por ejemplo, los glipicanos (subgrupo de HSPGs), regulan la función de varios morfógenos como BMP (proteínas morfogénica de hueso) o Wg-Dpp (Bernfield et al., 1999)). Además de estas funciones, existen múltiples ejemplos de la participación de los HSPGs en los procesos de guía axonal (Steigemann et al., 2004b) (Johnson et al., 2004) (Smart et al., 2011).

La familia de los HSPG se divide en dos subgrupos: los HSPG asociados a membrana (Sindecanos y Glipicanos), y los no asociados a membrana (Perlecanos y Agrininas).

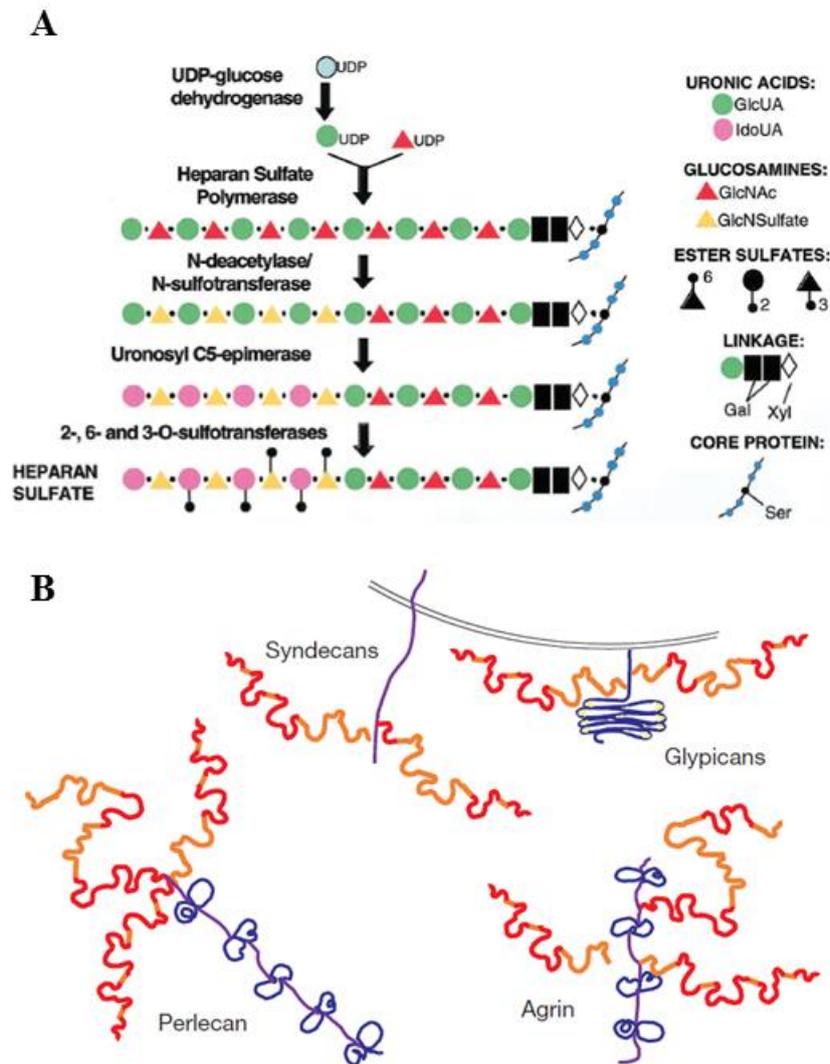


Figura 17. Estructura de los HSPG. A, (Bernfield et al., 1999) esquema de la biosíntesis de los HSPGs. B, (Perrimon and Bernfield, 2000) esquema de los HSPGs donde están representados los grupos transmembrana: Syndecanos y Glipicanos. Así como los grupos no anclados a membrana: Perlecanos y Agrinas.

3.3.2.2.1.- HSPGs asociados a membrana.

Sindecanos (Sdc): en mamíferos, y probablemente en todos los vertebrados, existen cuatro miembros de este grupo (Schwabiuk et al., 2009) mientras que en *Drosophila melanogaster* existe un único miembro (Couchman, 2003). Todos los sindecanos están formados por un núcleo proteico que es una extensa región de aminoácidos transmembrana con una pequeña parte (34 ± 38 residuos) citoplasmática, en el extremo C-terminal. Las cadenas HS están unidas a residuos de serina distales a la membrana plasmática

Glipicanos: en *Drosophila melanogaster* existen dos genes de esta familia (*dally* y *dally-like*) mientras que en vertebrados hay seis genes que codifican para glipicanos. Su núcleo proteico es una estructura globular estabilizada por uniones disulfuro, unida a la membrana plasmática por una extensa región C-terminal que acaba unida a glicosifosfatidil inositol (GPI). Las cadenas HS están unidas a residuos de serina adyacentes a la membrana plasmática (Perrimon and Bernfield, 2000) (Johnson et al., 2004).

Estos dos grupos suponen la mayoría de los polímeros HS presentes en la superficie celular (Bernfield et al., 1999). Pese a tener cadenas de HS muy similares, las funciones de ambas proteínas no son totalmente redundantes (Han et al., 2004) (Rawson et al., 2005) (Johnson et al., 2004) (Smart et al., 2011). Una de las funciones mejor detalladas es su papel en los procesos de guía axonal modulando la vía de Slit/Robo. Se

ha demostrado que la presencia HS mejora la afinidad de la interacción Slit-Robo *in vitro* (Hussain et al., 2006) e incluso hay datos *in vitro* que postulan la dependencia de HSPGs en la superficie celular para que se dé la unión Slit-Robo (Hu, 2001)

En *Drosophila melanogaster*, tanto *Sindecano* (*Sdc*) como *Dally-Like* (*dlp*) se expresan durante la embriogénesis en el sistema nervioso. Los niveles de ambas proteínas son elevados en el VNC aunque sus patrones de expresión no son totalmente solapantes. *Sdc* coopera con Slit y Robo regulando la guía axonal en la línea media (Johnson et al., 2004) (Steigemann et al., 2004b): posiciona Slit en las fascículas longitudinales y regula parcialmente la señal repulsiva proporcionada por la vía Slit/Robo. Además, *Sdc* también es necesario para el adecuado desarrollo de las fascículas próximas a la línea media. *Dlp* regula la formación de las fascículas más externas posicionando Slit en ellas y aportando los HS necesarios para mantener la repulsión generada por la vía Slit/Robo en ausencia de *Sdc* (Smart et al., 2011).

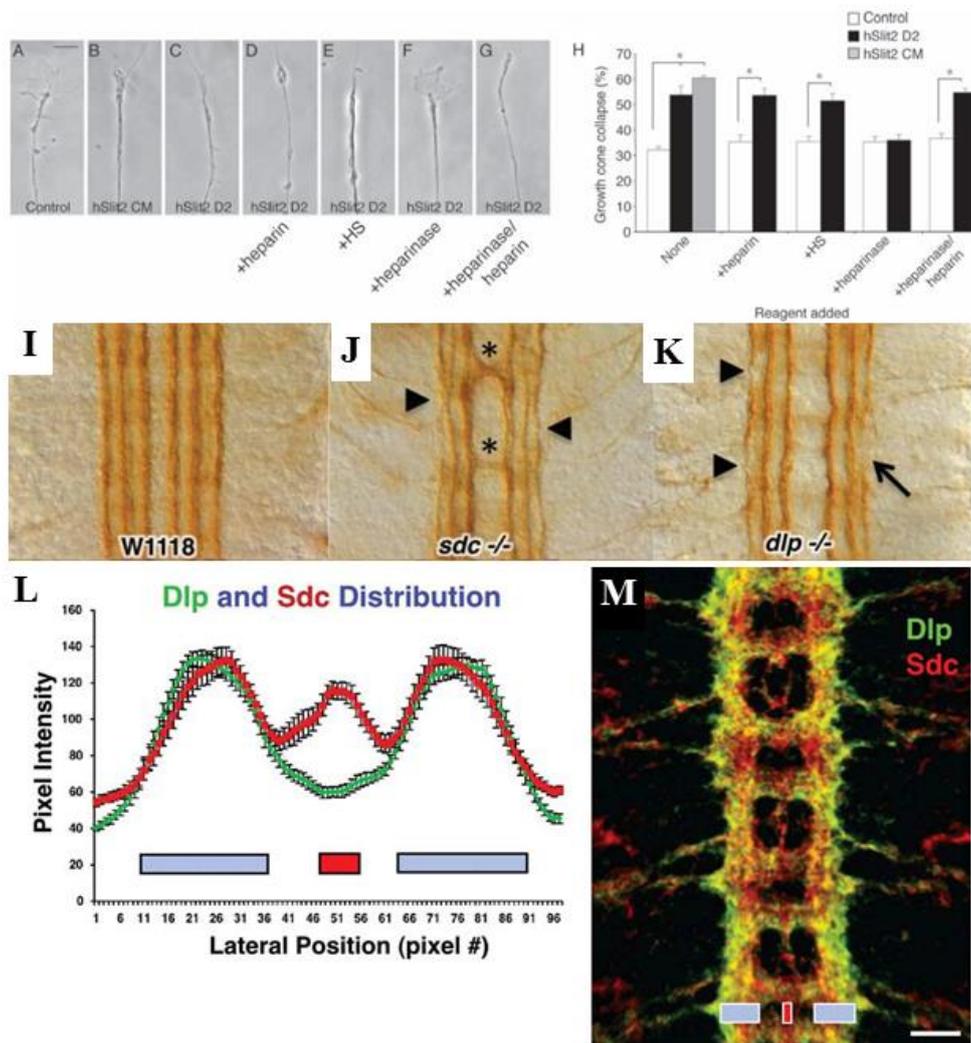


Figura 18. Función y expresión de los HSPG. A-H, (Hussain et al., 2006) ensayo *in vitro* de colapso de conos de crecimiento de retina de *Xenopus* provocado por la presencia de hSlit2 en dependencia de heparina/heparán sulfato (HS). A-G, imágenes de los conos de crecimiento en distintas condiciones en presencia o ausencia de Slit en el medio y/o heparina, heparinasa y HS. A y F, conos crecimientos no colapsado control (A) y cono no colapsado en presencia de hSlit2 D2 (constructo funcional de Slit) y heparinasa (F). B-C, casos control de conos colapsados al añadirse al medio diversos constructos de Slit. D y E, conos colapsados en presencia de hSlit2 D2 y heparina o HS. G, rescate del colapso de un cono de crecimiento en medio con hSlit2 D2 y tratado con heparinasa, que es rescatado al tratarlo con heparina. H, cuantificación del porcentaje de conos colapsados. I-M (Smart et al., 2011). I, embrión control a estadio 17 donde se aprecian las tres fascículas positivas para FasciclinaII del cordón nervioso. J, mutantes para *Sdc* donde aparecen defectos en la fasciculación tales como estrechamientos en la fascícula lateral (cabeza de flecha) o cruces a través de la línea media (asteriscos). K, mutantes para *dlp* donde se aprecian huecos en la fascícula lateral (flechas) y un estrechamientos de la fascícula (flecha cabeza), pero no se ven cruces a través de la línea media. L, distribución de los HSPGs en el sistema nervioso central. La intensidad de la señal inmunofluorescente de Dlp (verde) y Sdc (rojo) fue registrada mediante microscopía confocal y

3.3.2.2.2. - HSPGs no asociados a membrana.

En este grupo se encuentran los HSPG no anclados a las membrana: Perlecanos y Agrininas. Ambas son familias de grandes proteínas multidominio con cadenas HS en su extremo N-terminal. Se ha descrito que los perlecanos se encuentran en tejidos tales como los cartílagos, mientras que las agrininas son un componente de los músculos, uniones neuromusculares, el sistema nervioso, pulmones y riñones. Sin embargo, no existe mucha información acerca de una posible función de estas proteínas en los procesos de guía axonal (Perrimon and Bernfield, 2000).

3.3.3.- La vía Netrina/Frazzled en la formación de la VNC.

Netrina/Frazzled (Netrina/DCC en vertebrados) es una de las vía de guía axonal claves en la correcta formación del sistema nervioso central durante la embriogénesis. Su función principal es ejercer como señal atractiva de los axones, aunque según los receptores de Netrina, esta señal puede actuar como señal repulsiva a cortas distancias en algunas situaciones. Pero en general, esta vía es considerada una señal atractiva tanto en el sistema nervioso central como en el periférico.

representada en una línea perpendicular a la línea media. De cara a facilitar la orientación, la glía de la línea media ha sido indicada con una barra roja y los haces nerviosos longitudinales están señalados con unas barras azules debajo de las curvas de intensidad. Todos los puntos de las gráficas representan los valores medios de intensidad junto con la desviación estándar de la media. M, imagen solapante de ambos patrones de expresión: Dlp (verde) y Sdc (rojo), en un embrión control a estadio 17.

3.3.3.1- Netrina.

Las netrinas son una familia de proteínas secretadas con un papel importante en la guía axonal y cuyos receptores principales son Frazzled (homólogo de DCC en vertebrados) y Unc5 (homólogo de UNC5C en vertebrados), aunque existen otros secundarios como Dscam (Andrews et al., 2008).

La primera netrina caracterizada fue UNC-6 en neumatodos, identificada como producto del gen *unc-6* cuya mutación genera defectos en migración celular y guía axonal (Ishii et al., 1992) (Ishii et al., 1992) (McIntire et al., 1992). En *Drosophila melanogaster* existen dos netrinas, NetA y NetB, (existen cinco en vertebrados y una en *C.elegans*). Ambas están altamente conservadas ya que si comparamos sus secuencias con las de otros organismos, NetA es idéntica en un 49% a UNC-6 (*C.elegans*) y un 51% a netrin-1 (pollo), mientras que NetB es 49% y 54% respectivamente. Además NetA y NetB son un 55% idénticas entre sí (Harris et al., 1996) (Kolodziej et al., 1996).

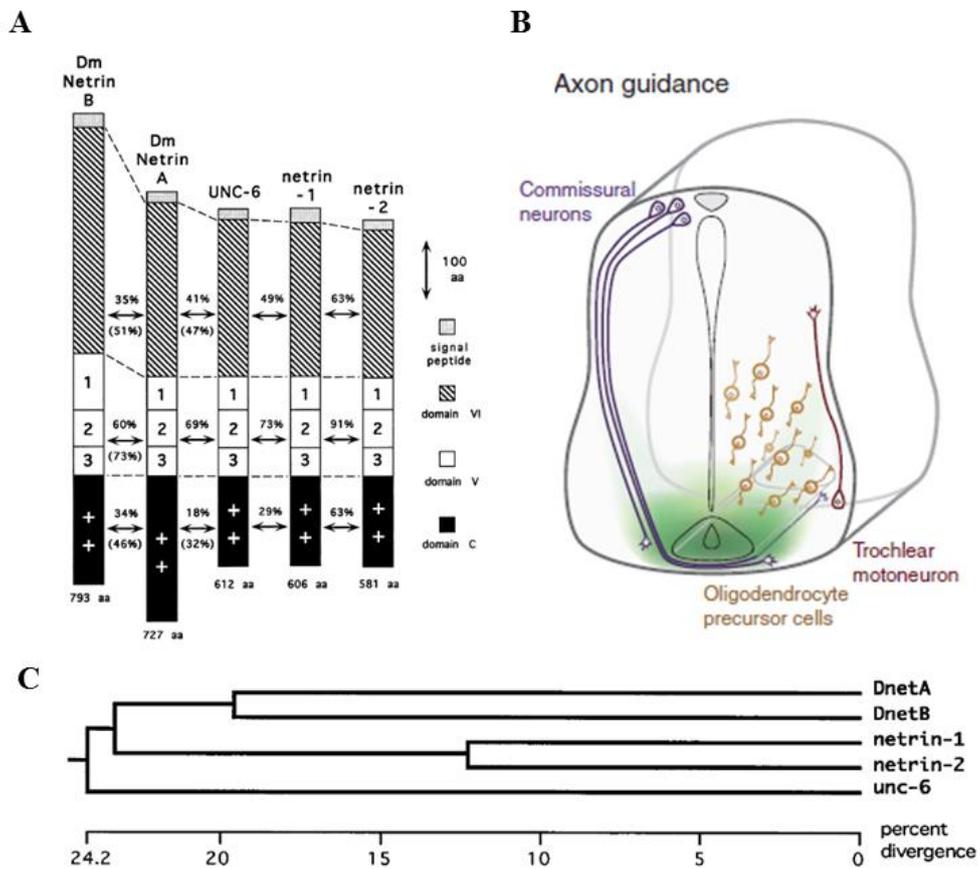


Figura 19. Estructura, evolución y función de Netrina. A, (Harris et al., 1996) esquema que representa miembros de la familia Netrina en distintos organismos, y representación de los dominios de las proteínas (adaptado de (Serafini et al., 1994)). En la imagen está representada la diferencia relativa de tamaño entre dominios y el porcentaje de identidad entre aminoácidos de dominios homólogos (el porcentaje de identidad de secuencia que se ha calculado excluyendo los saltos entre secuencias está escrito entre paréntesis). B, (Lai Wing Sun et al., 2011) ejemplo de la importancia de la familia netrina en vertebrados. Durante el desarrollo de la médula espinal, la Netrina1 (verde) secretada por la *floor plate* genera un gradiente desde la línea media ventral. Este gradiente cumple dos funciones: atrae los axones espinales comisurales (morado) y repele la migración de las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) (naranja) y los axones de motoneuronas en el *brainstem* (red). C, (Mitchell et al., 1996) árbol filogenético obtenido mediante el alineamiento de las secuencias excluyendo las regiones de alta variabilidad de longitud. El porcentaje de divergencia fue calculado utilizando el programa LaserGene.

INTRODUCCIÓN

En *Drosophila melanogaster* ambas netrinas son expresadas durante el desarrollo en el sistema nervioso central y en subgrupos de neuronas, músculos y células epiteliales. En el sistema nervioso central embriones *NetA*^{-/-}; *NetB*^{-/-} presentan una acortamiento del grosor de las fascículas comisurales, así como rupturas y una desestructuración general en las fascículas longitudinales.

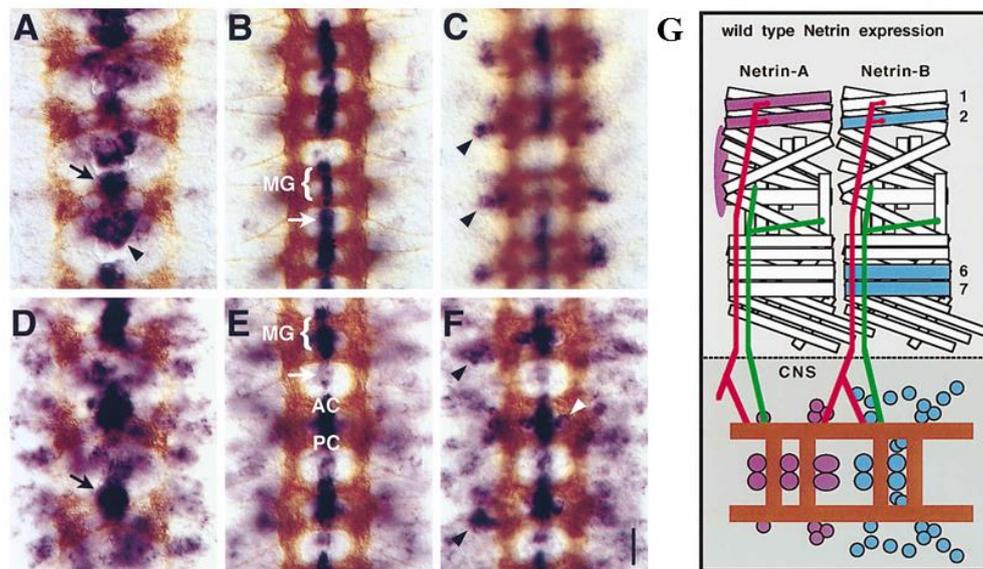


Figura 20. Expresión de Netrina en *Drosophila melanogaster*. (Mitchell et al., 1996), expresión embrionaria de NetA y NetB en el Sistema nervioso central. Embriones doblemente teñidos *in situ* (púrpura) contra NetrinaA (A-C) o NetrinaB (D-F) y el anticuerpo BP102, que marca todos los axones del sistema nervioso central (marrón). A, expresión de NetA a estadio 13. NetA aparece en la glía de la línea media (MG) (flecha) y en la células del clúster VUM (flecha cabeza), además de en algunas neuronas laterales con baja intensidad. B, expresión de NetB a estadio 14. Se aprecia expresión en la glía de la línea media (MG) y en células posteriores a la comisura posterior (flecha). C, igual embrión que B pero con un plano focal más ventral donde se puede apreciar la señal en algunas células (probablemente neuronas) (flecha cabeza). D, expresión de NetB a estadio 13, que se encuentra restringida a la MG (flecha) y algunas otras células a lo largo del sistema nervioso central. E, expresión de NetB a estadio 14. Se aprecia expresión en las MG pero muchos menos intensa en las células posteriores si lo comparamos con NetA (Flecha). AC y PC marcan las comisuras anterior (AC) y posterior (PC) respectivamente. F, igual embrión que en E pero con un plano focal más ventral. Están marcadas las células del clúster MP (flecha cabeza) y algunas neuronas en todo el sistema nervioso central (flecha cabeza negra). G, Diagrama de la expresión de NetA (púrpura) y NetB (azul) en el sistema nervioso central (CNS) y nervios motores. En la parte inferior están dibujados los axones del CNS (marrón), y algunos de los nervios motores que proyectan a la musculatura: ISN (rojo) y ISNa (verde). En el esquema se puede observar las diferencias en los patrones de expresión entre ambas Netrinas en el sistema nervioso central y los nervios motores.

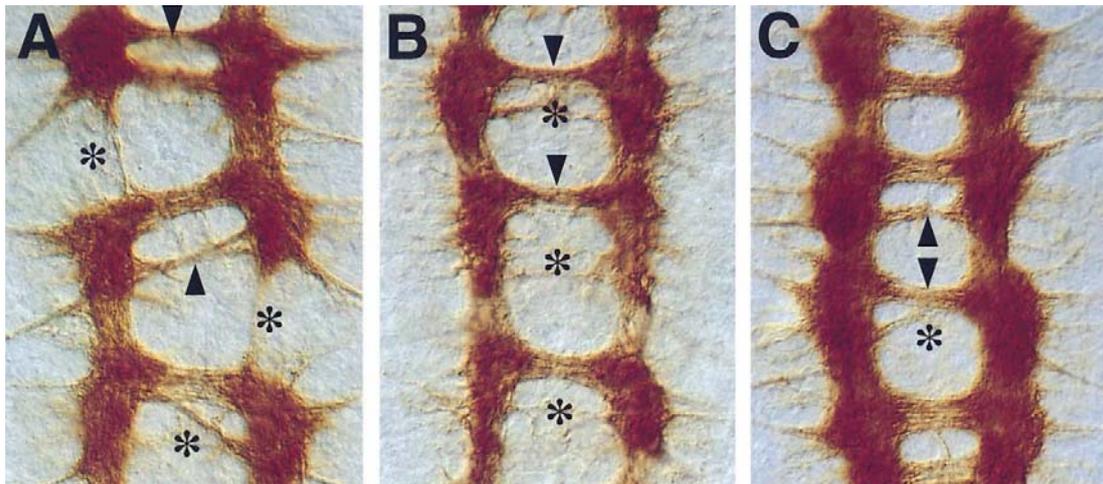


Figura 21. Fenotipo de embriones mutantes para Netrina. (Mitchell et al., 1996), embriones doble mutantes para *NetA* y *NetB* teñidos con anti-BP102 para marcar todos los axones del sistema nervioso central. A, ejemplo de fenotipo severo con un estrechamientos o ausencia de haces comisurales (flecha y asterisco central) y roturas completas en las fascículas longitudinales (asteriscos). B, fenotipo intermedio, con una organización estructural menos dañada aunque todavía las comisuras posteriores están prácticamente ausentes (asteriscos) y hay acortamientos de las comisuras anteriores (flechas). C, fenotipo leve donde hay una cierta desestructuración general y el estrechamiento (flechas) o falta (asterisco) de algunas fascículas comisurales.

3.3.3.2.- Receptores de Netrina.

Frazzled

En *Drosophila melanogaster* existe un único receptor Frazzled, que tiene un 43% de homología con DCC (que es uno de los receptores de netrina en vertebrados) (Kolodziej et al., 1996), mientras que en vertebrados existen dos miembros de la familia de DCC (DCC y Neogenina).

Durante la embriogénesis, Frazzled está presente en el sistema nervioso central y los nervios motores periféricos, en la epidermis y el epitelio intestinal. En el sistema nervioso central se expresa en altos niveles en las fascículas longitudinales y las comisurales; esta es una diferencia con los receptores Robo de la vía Slit/Robo, ya que estos se encuentran expresados a niveles muy bajos en los haces comisurales. La adecuada expresión de Frazzled es necesaria para la formación del VNC, y en embriones *fra*^{-/-}, algunas de las fascículas comisurales desaparecen o se estrechan notablemente, y se producen roturas en las fascículas longitudinales (figura 22 C-D) y (Kolodziej et al., 1996).

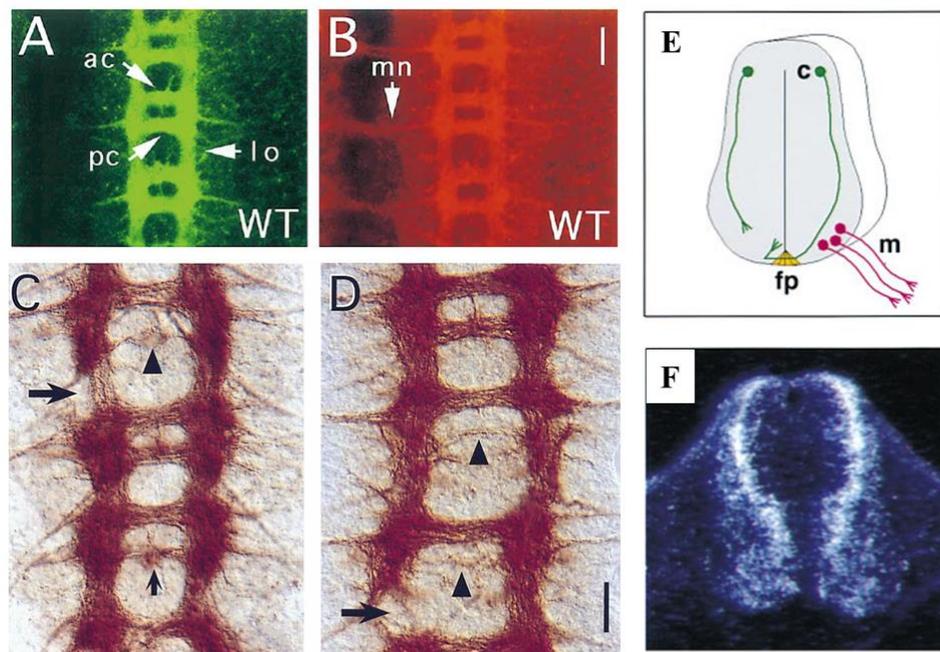


Figura 22. Expresión de Frazzled/DCC. A, (Kolodziej et al., 1996), axones longitudinales y comisurales de un embrión control a estadio 15 teñido con antiBP102. Gracias a esta tinción se pueden visualizar claramente las comisuras anteriores (ac), las posteriores (pc) y los axones longitudinales (lo). B, idéntico embrión teñido con anti-Frazzled, donde se observa un patrón de expresión muy similar al de BP102, y además se detecta la señal de Frazzled en los nervios motores (mn). C, embrión nulo para *frazzled* y teñido con anti-BP102. Se observan defectos tales como un adelgazamiento de algunas comisuras posteriores (flecha corta) o su ausencia (flecha cabeza), así como estrechamiento leve de las

Unc5.

A parte de Frazzled, existen otros receptores de Netrina como Dscam (*Drosophila Down Syndrome cell adhesion molecule*), que es un ejemplo de una proteína de adhesión capaz de funcionar como receptor de señales de guía axonal (Andrews et al., 2008), o Unc5 (Keleman and Dickson, 2001).

Unc5 resulta especialmente interesante porque está implicado en la función repulsiva de la vía Netrina/Frazzled. Como ya comentamos con anterioridad, en mamíferos la vía Netrina/DCC (homóloga de Netrina/Frazzled en *Drosophila*) no solo tiene una función atractiva a larga distancia sino que también posee una función repulsiva a corta distancia. Estas dos funciones se dan porque DCC no es el único receptor de netrina. En mamíferos, cuando netrina se une al homodímero de DCC/DCC, el cono de crecimiento es atraído hacia la fuente de netrina, pero si se une al heterodímero DCC/UNC5, se produce el efecto contrario y el cono es repelido. Esta repulsión aparece normalmente a cortas distancias.

comisuras anteriores y roturas en los haces longitudinales (flecha grande). D, embrión heterocigoto para *NetA* y *NetB* que desarrolla defectos similares a C. Se pueden observar rupturas en las fascículas longitudinales (flecha), y ausencia casi total de algunos haces comisurales posteriores (flecha cabeza). E-F, (Kidd et al., 1998b). E, representación esquemática de las proyecciones donde a E13 la mayoría de los axones comisurales (c) han cruzado la *floor plate* (fp) y los nervios motores (m) han proyectado más allá de la línea media. F, sección transversal de médula espinal de rata a E3 donde el DCC mRNA se visualiza mediante hibridación *in situ* y su patrón de expresión coincide con la posición de las neuronas comisurales.

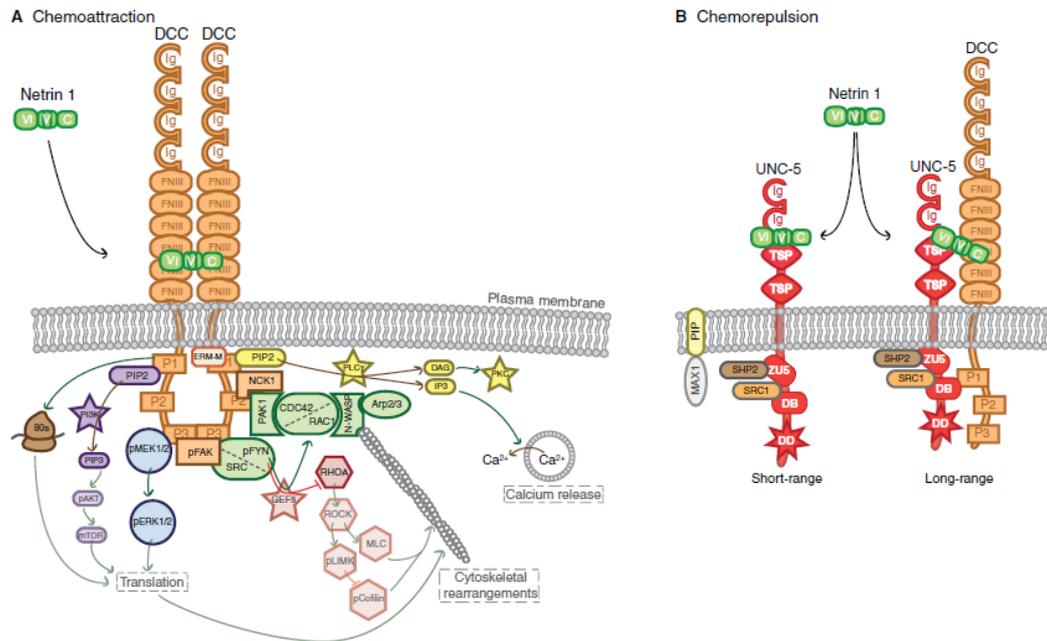


Figura 23. Mecanismos relacionados con la guía axonal mediada por Netrina1. A, (Lai Wing Sun et al., 2011) esquema de los fenómenos de quimioatracción. B, esquema de los procesos implicados en la quimiorepulsión mediada dirigida por Netrina1.

En *Drosophila melanogaster* el homólogo de UNC5C (vertebrados) es *unc5*. Tiene una homología general del 29 % con UNC5C, que llega en algunos dominios al 49 %. En *Drosophila melanogaster* la expresión de esta proteína en el sistema nervioso durante la embriogénesis está limitada a algunos de los nervios motores y células gliales de salida y periféricas. Así pues, no se aprecia expresión de *Unc5* en el sistema nervioso central (Keleman and Dickson, 2001).

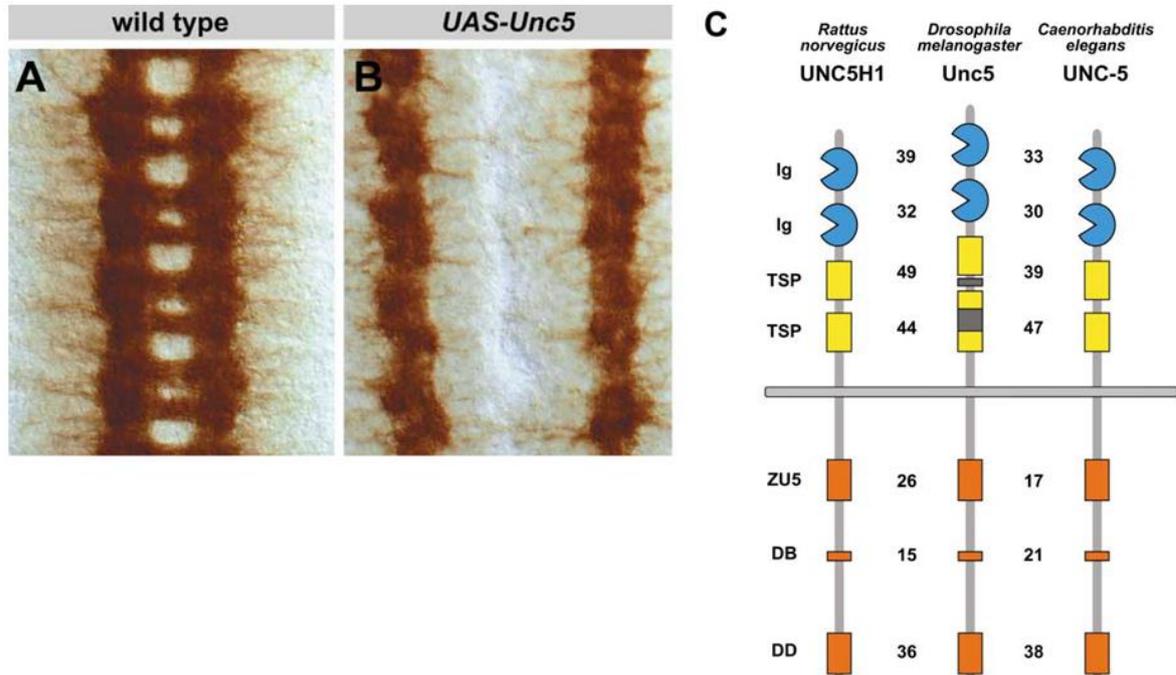


Figura 24. Estructura, homología y función de Unc5. (Keleman and Dickson, 2001) A-B, embriones a estadio 17 fijados con BP102 para ver todos los axones del sistema nervioso central. A, embrión control donde se aprecian claramente los axones comisurales. B, embrión donde se ha sobreexpresado *unc5* en todas las neuronas postmitóticas utilizando *elav-FAL4/UAS-Unc5* para demostrar el efecto repulsivo que puede generar la presencia de Unc5. Se puede observar los nervios comisurales desaparecen por completo y los axones se acumulan en las fascículas longitudinales debido a la sobreexpresión de *unc5*. C, comparación de las estructuras predichas para UNC5H1 (rata), Unc5 (*D. melanogaster*) y UNC-5 (*C. elegans*). Los números indican los porcentajes de identidad de aminoácidos entre dominios excluyendo las inserciones en *Drosophila* (bloques grises). La identidad media de Unc5 es de un 29% con UNC5H1 y un 24% con UNC-5.

4.- Las proteínas SNARE en los procesos de guía axonal.

Como hemos detallado en los apartados anteriores, son muchas las señales que dirigen el cono crecimiento durante su desarrollo hasta el tejido diana. La caracterización de vías como Slit/Robo o Netrina/DCC, que dirigen al cono, ha sido tan importante como el entendimiento de los mecanismos moleculares desencadenados por la activación de estas vías. Una vez el cono reacciona a las señales, intracelularmente se disparan una serie de mecanismos: dinámicas de remodelación del citoesqueleto, tráfico vesicular... Todos son procesos clave para el axón sea capaz de elongarse a través de los tejidos. (Lowery and Van Vactor, 2009) (Raper and Mason, 2010).

Si nos centramos en el tráfico vesicular y su papel en la guía axonal, hemos de considerar la gran demanda de membrana que genera un cono axonal en desarrollo. Para satisfacer esta demanda se produce un envío asimétrico de membrana al cono que permite mantener el desarrollo y la direccionalidad del crecimiento mientras se siguen las señales de guía (como por ejemplo, las generadas por la vía Netrina/DCC).

El trabajo realizado en el laboratorio del Dr. Eduardo Soriano ha demostrado *in vitro* y *ex vivo* que la vía Netrina/DCC es dependiente de una proteína directamente involucrada en el tráfico vesicular: Syntaxina1 (Cotrufo et al., 2011).

5.- Tráfico de membrana y las proteínas SNARE.

El transporte de membrana al cono de crecimiento es vital para que este pueda desarrollarse. Este transporte de membrana al cono está controlado por la misma maquinaria que gobierna el tráfico vesicular en cualquier parte de la célula. Esta maquinaria está compuesta por cuatro grupos de proteínas (Cai et al., 2007):

1.- Las proteínas de cubierta, que median la unión entre un compartimento donador de membrana y proteínas motoras que dirigen el transporte de las proteínas de cubierta por el citoesqueleto.

2.- Factores de enganche como el complejo exocisto y pequeñas GTPasas de la familia rab, cuya función es iniciar el punto de atraque, determinar los puntos de fusión entre membranas y especificar los puntos de acción de las vesículas.

3.- Las ATPasa NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*), son proteínas que regulan la formación y disociación de los complejos necesarios para la fusión entre membranas.

4.- Las proteínas receptores de las NSF o implicadas en atraer las NSF a la membrana donde se va a producir la fusión (los factores solubles atractivos de NSF, también llamados SNAP) (Teng et al., 2001). A este cuarto grupo pertenecen las proteínas SNARE.

INTRODUCCIÓN

Las SNARE son una familia de pequeñas proteínas (en su mayoría) ancladas a una membrana, y se caracterizan por la presencia, en casi todas ellas, del dominio SNARE. Los mecanismos mediados por proteínas SNARE están altamente conservados y muchas de las proteínas SNARE presentes en invertebrados están conservadas en los vertebrados, incluidos mamíferos (Teng et al., 2001).

Gen	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>G. gallus</i>	<i>D. melanogaster</i>
SNAP-25	SNAP-25	Snap25	SNAP-25	<i>Snap24/Snap25</i>
VAMP2	VAMP2	Vamp2	VAMP2	<i>nSyb</i>
VAMP7	VAMP7	Vamp7	VAMP7	<i>Vamp7</i>
STX1A	STX1A	Stx1a	STX1A	<i>Syx1A</i>

Tabla1. Homólogos de proteínas SNARE en diferentes organismos. Resumen de los genes de la familia SNARE directamente relacionados con fusión de vesículas en el cono axonal.

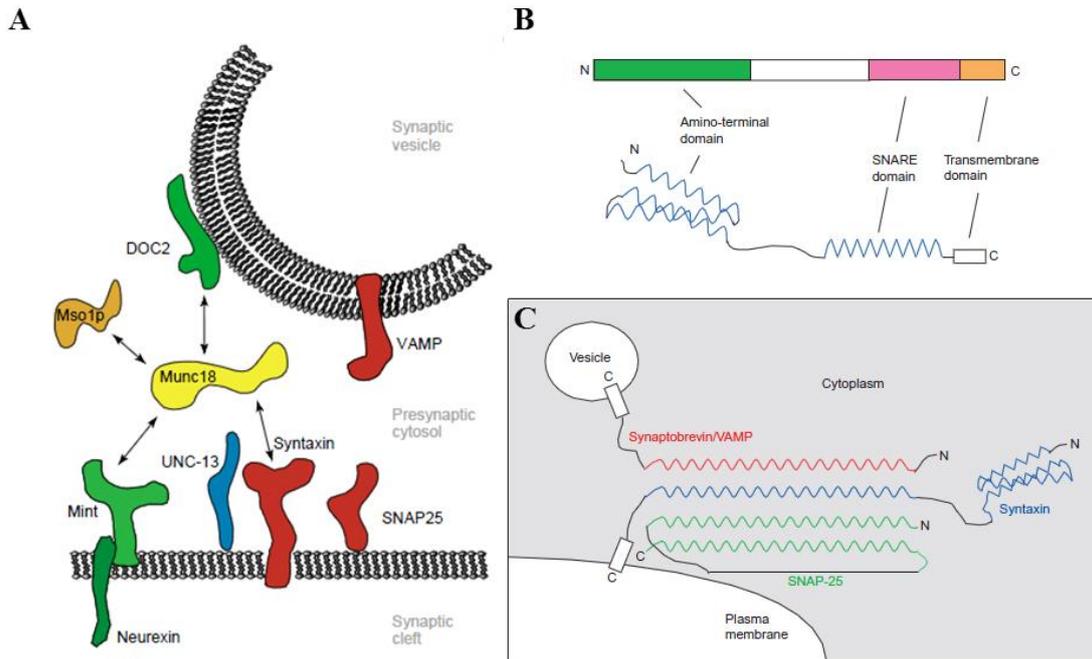


Figura 25. Las proteínas SNARE y el complejo SNARE (Toonen and Verhage, 2003). A, esquema de proteínas SNARE participantes en la formación de un complejo SNARE. En rojo están marcadas las proteínas que forman el complejo mientras que en otros colores están marcadas varias proteínas reguladoras. B, (Teng et al., 2001) representación esquemática de Sintaxina1A y la estructura de sus dominios. Se puede apreciar en rosa en dominio SNARE, que es compartido por casi todas las proteínas SNARE. (Teng et al., 2001) C, dibujo de tetrámero formado por Sinaptobrevina/VAMP, Sintaxina y dos unidades de SNAP25.

El dominio SNARE (presente en casi todas las proteínas SNARE), es el encargado de mediar la interacción entre los dos grupos principales de SNAREs: v-SNAREs y t-SNAREs

- v-SNARE: SNAREs ancladas a las vesículas o membranas donoras. En *Drosophila melanogaster* existen dos proteínas de este grupo: la sinaptobrevina (*Syb*) (homóloga de VAMP7 en ratones) y sinaptobrevina neuronal (*nSyb*) (homóloga de VAMP 2 en ratones), mientras que en vertebrados el número de v-SNAREs es mucho mayor (ncbi).

- t- SNARE: SNAREs presentes en las membranas diana o membranas receptoras. Entre ellas se encuentra Syntaxina1, cuyo homólogo en *Drosophila* es Syntaxina1A (*Syx1A*). En *Drosophila* están documentadas diez proteínas Syntaxina mientras que en vertebrados hay quince (ncbi)

Las proteínas SNARE regulan la fusión de la membrana donora con la receptora a través de la formación del complejo SNARE. Este complejo es un tetrámero compuesto por una v-SNARE, una t-SNARE y dos proteínas SNAP. La formación de este complejo cumple dos funciones: mediar la fusión entre las membrana y dar especificidad al proceso ya que la necesidad de unión entre los dos grupos de SNARE genera una especificidad en la formación del complejo SNARE (McNew et al., 2000). Acorde con este hecho, las distintas proteínas SNARE se encuentran en regiones concretas del espacio subcelular y cada una participa únicamente en determinadas rutas del tráfico vesicular.

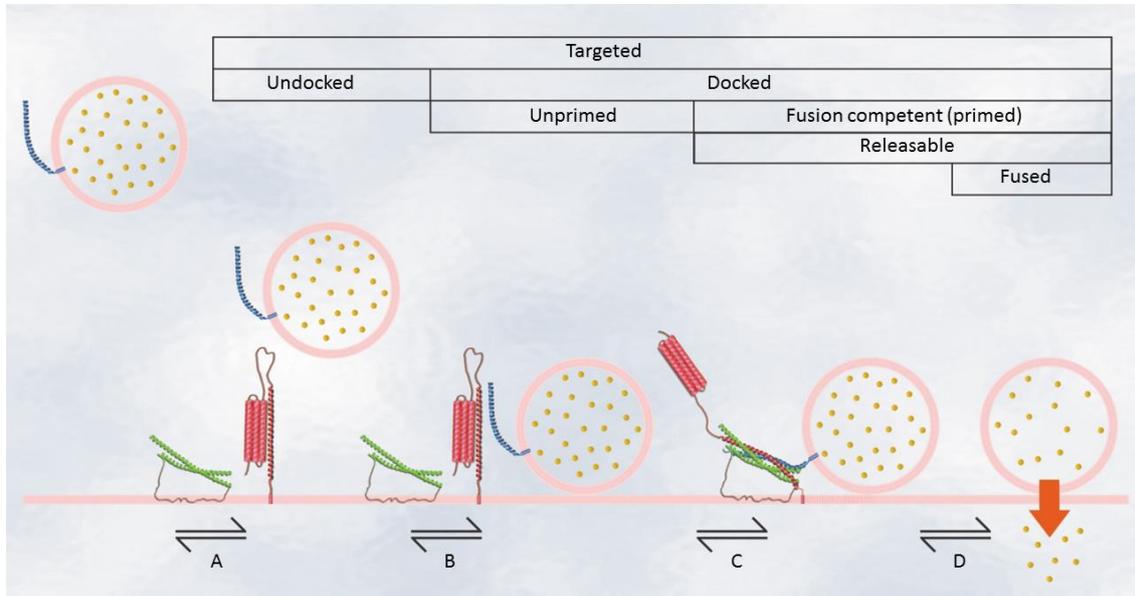


Figura 26. Representación de las fases finales del tráfico vesicular hacia la membrana plasmática (Toonen and Verhage, 2003). A, reclutamiento de la vesícula donadora hasta la membrana receptora. B, ataque de la vesícula y primer contacto con la membrana receptora a través de mecanismos independientes de las proteínas SNARE. C, preparación de la vesícula. Este paso intermedio vuelve competente la vesícula para la fusión y garantizar la rapidez y eficiencia del proceso. D, fusión vesicular mediada por las proteínas SNARE.

Un ejemplo del papel de estas proteínas en los procesos de tráfico de membrana es su importancia en los fenómenos de transporte de membrana de mielina que ocurren entre la región trans-Golgi y la membrana plasmática de los oligodendrocitos. Los oligodendrocitos son los responsables de las cubiertas de mielina que recubren los axones y permiten la adecuada transmisión de información a través de ellos. En estas células, que tienen que sintetizar y transportar grandes cantidades de membrana mielinizada durante el desarrollo para cubrir simultáneamente múltiples axones, se desarrolla una importante polaridad celular generada por señales extracelulares (por

ejemplo señales glía-axón) y rutas muy definidas de tráfico vesicular para transportar directamente los componentes de mielina por todo el axón. En este contexto, se ha demostrado que las proteínas SNARE son clave para el adecuado desarrollo de estos procesos que implican la fusión polarizada de membrana en la membrana plasmática (Südhof and Rothman, 2009) (Rizo and Südhof, 2012).

Además, se ha demostrado que las proteínas SNARE son esenciales en la exocitosis dependiente de calcio y la liberación de neurotransmisores en el tejido adulto así como en la mayoría de los eventos (incluidos procesos de desarrollo) de secreción presentes en células no neuronales (Rizo and Südhof, 2002) (Südhof and Rothman, 2009). Además, aunque en algunos casos las proteínas SNARE no afecten el tráfico de membrana mediante la formación del complejo SNARE, existen otros mecanismos por los cuales pueden regular el transporte y reciclaje de membrana, como por ejemplo influyendo en la polimerización de los microtúbulos (Nakayama et al., 2012).

6.- Las Syntaxinas.

Las syntaxinas son un subgrupo de proteínas t-SNARE. En mamíferos, Syntaxina1 fue descrita inicialmente como dos proteínas de 35kDa (ahora conocidas como Syntaxina1A y B), con una similitud entre ellas del 84 % y ambas interactúan con la proteína de vesículas sinápticas, llamada sinaptotagmina. Pronto se empezaron a encontrar homólogos de Syntaxina1 en tejidos nerviosos y no nerviosos hasta constituir la familia de las syntaxinas (Teng et al., 2001). Estudios recientes han determinado la importancia de Syntaxina1 en procesos de desarrollo en el sistema nervioso tales como la guía axonal dependiente de Netrina/DCC (Cotrufo et al., 2011) o la correcta migración de neuronas prebelares en embriones de ratón (Cotrufo et al., 2012).

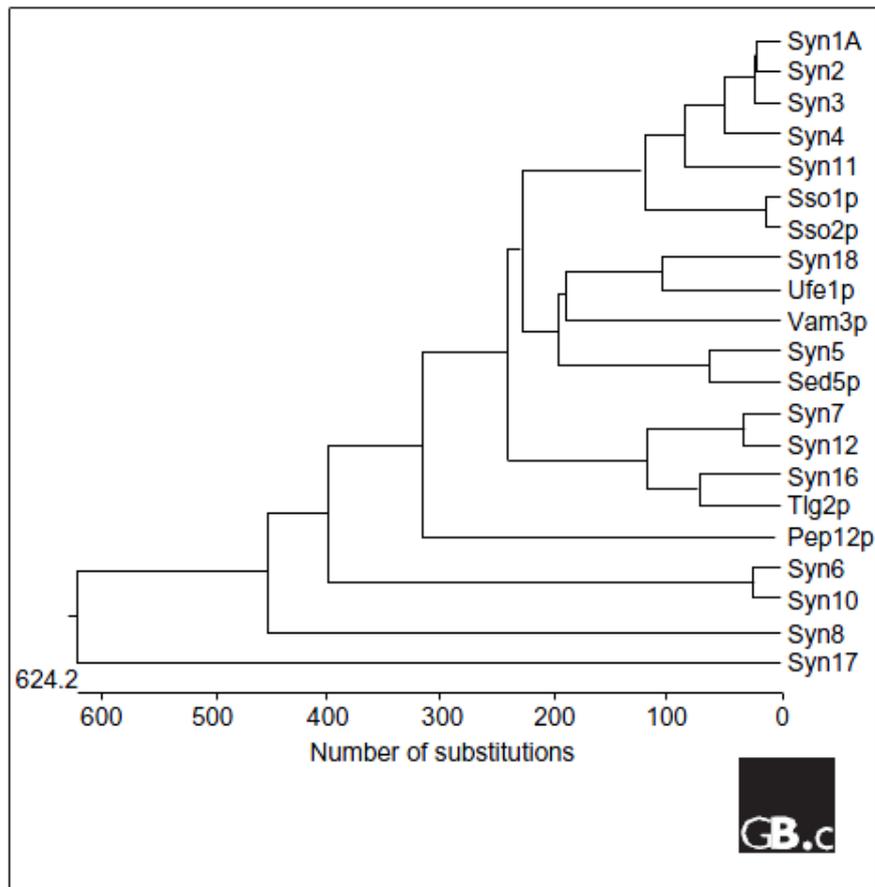


Figura 27. Esquema filogenético de la familia Sintaxina. (Teng et al., 2001) Esquema realizado mediante el programa DNASTAR donde se muestra el número de sustituciones ocurridas en un homólogo de Sintaxina en *C. cerevisiae* hasta llegar a los mamíferos.

La familia Sintaxina tiene siete miembros en levadura, diez en *Drosophila melanogaster* (flybase) y quince en los mamíferos. Además, en mamíferos las proteínas Sintaxina1, 2, 3, 5 y 16 tienen isoformas alternativas generadas por *splicing*. Estas isoformas son expresadas de modo diferencial en los tejidos según el periodo de desarrollo, vida adulta del individuo o incluso hay isoformas específicas durante el desarrollo tumoral.

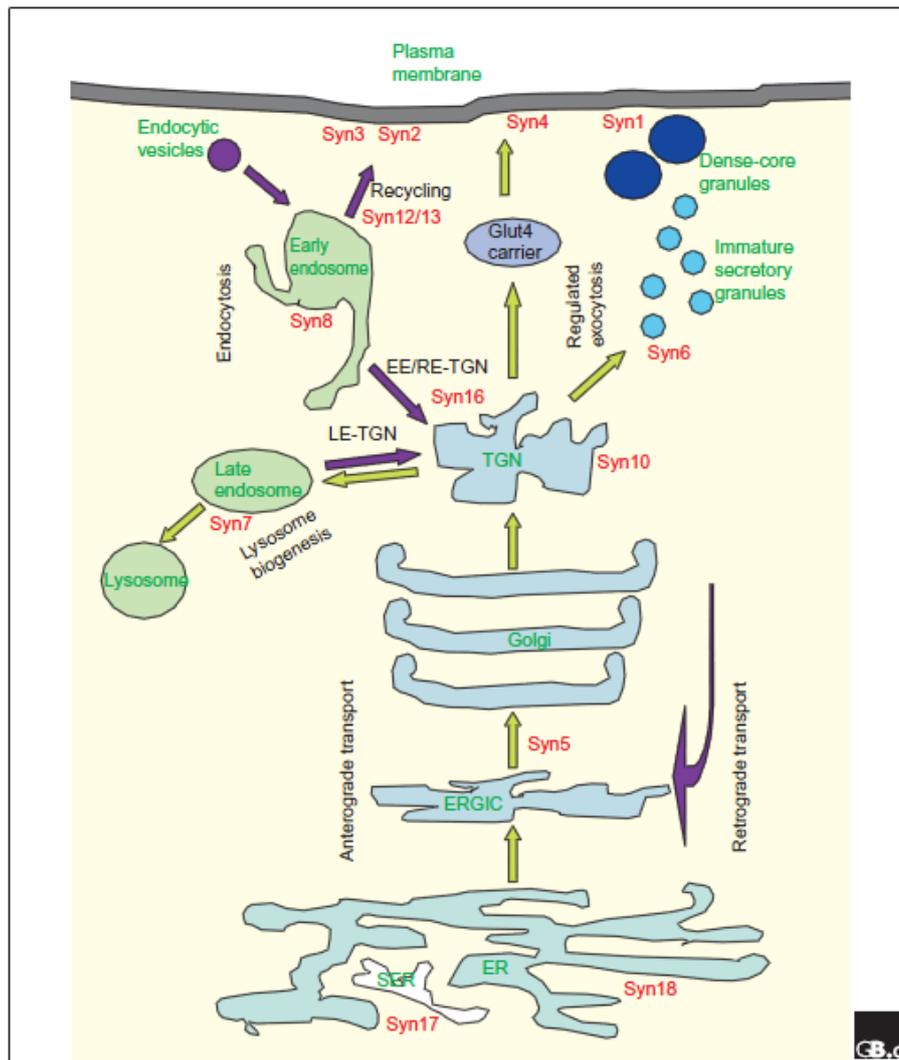


Figura 28. Las sintaxinas en la maquinaria celular. (Teng et al., 2001) Localización subcelular de las Sintaxinas (rojo) en una célula de mamíferos. El tráfico anterogrado y el retrogrado han sido representados (flechas verdes anterogrado y púrpuras retrogrado). EE, endosome temprano; ERGIC, compartimento intermedio ER-Golgi; Glut4, transportador de glucosa; LE, endosoma tardío; RE, endosoma de reciclaje; SER, retículo endoplasmático liso; Syn, sintaxina; TGN, entramado *trans*-Golgi.

Todas las Sintaxinas salvo Sintaxina11 y algunas isoformas de varias Sintaxinas, son proteínas transmembrana ancladas por el extremo C-terminal con una orientación tipo II (un extremo amino y la mayor parte de la proteína en el citoplasma). Aproximadamente los 60 residuos coil-coiled más proximales al extremo transmembrana, forman el dominio SNARE, que se encuentra conservado entre todas

las SNARE (Teng et al., 2001). La región amino-terminal de algunas sintaxinas como Sintaxina1, contienen otra región que se cree que varía entre las diferentes isoformas dando distintos comportamientos en el tráfico vesicular. En el caso de Sintaxina1 es un grupo de tres α -hélices con giro en sentido de las agujas del reloj (Lerman et al., 2000) que se cree que sirve como dominio autoregulador inhibidor. La chaperona n-sec1/Munc18, se une a este dominio y sólo la disociación o cambios conformacionales de n-sec1/Munc18 inducidos por pequeñas proteínas GTPasas Rab permiten la reactivación de la función de Sintaxina1. En las sintaxinas, este dominio regula las interacciones de la sintaxina con los dominios de otras t-SNARE como SNAP-25, para formar el complejo SNARE (al abrir la estructura de sintaxina, SNAP-25 puede participar en la formación del complejo).

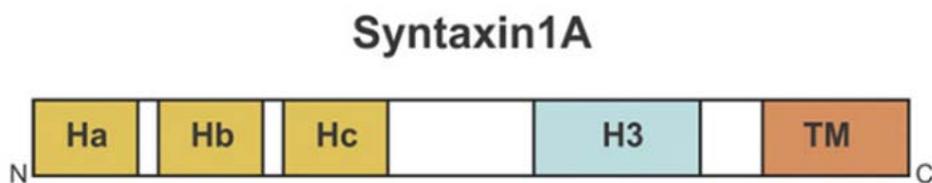


Figura 29. Estructura de Sintaxina1. A, (Cotrufo et al., 2012) detalle de los dominios de Sintaxina1A. Stx1A contiene un motivo transmembrana TM y un dominio citoplasmático (H3) que se encarga de interaccionar con otras proteínas SNARE. Finalmente, las regiones Habc se encargan de modular la formación del complejo SNARE.

Sin embargo, como ya hemos mencionado la mayor parte de las proteínas SNARE regulan el tráfico intracelular regulando la fusión entre membranas mediante la formación del complejo SNARE. El primer ejemplo conocido de esta función fue el complejo SNARE que regula la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico (Jahn and Südhof, 1999) (Chen and Scheller, 2001). Este complejo está formado por una subunidad de Sinaptobrevina neuronal (v-SNARE), dos subunidades de SNAP-25, y una subunidad de Sintaxina1 (t-SNARE). Inicialmente la sinaptobrevina se encuentra anclada a las vesículas con neurotransmisores, las SNAP-25 están en el citoplasma y Sintaxina1 (Stx1) está en la membrana plasmática. La fusión de las dos SNAP-25 a Stx1 incrementa la afinidad de Sinaptobrevina por Sintaxina1 y desencadena su unión que forma el complejo encargado de producir la fusión entre las membranas vesiculares y plasmáticas. Este hecho permite la secreción de los neurotransmisores presentes en la vesícula.

Es importante destacar que este fenómeno no sólo relaciona el complejo SNARE con la liberación de neurotransmisores sino que potencialmente lo vincula con cualquier molécula secretada, externalización de proteínas transmembrana presentes en la membrana vesicular o el tráfico de membrana (Cotrufo et al., 2011). Además, hay que recordar que los procesos de guía axonal a través de Netrina/DCC son dependientes de la t-SNARE Sintaxina1, y que esta proteína es clave para la correcta migración de neuronas precebelares en embriones de ratón (Cotrufo et al., 2012).

Se sabe que la vía Netrina/DCC es importante en el desarrollo de algunos tipos de tumores y que los procesos de migración celular son un factor de peso en fenómenos patológicos con el crecimiento tumoral (Mehlen et al., 2011). Sin embargo, hasta el momento se desconoce si la función de las proteínas SNARE tiene algún papel en la progresión tumoral.

7.- Los procesos de guía axonal en la progresión tumoral.

Actualmente existe un creciente interés en la relación entre los procesos de guía axonal y los de progresión tumoral. Se sabe que los mecanismos implicados en el desarrollo del cono de crecimiento participan en la migración de varios tipos celulares (Chédotal et al., 2005) (Mehlen et al., 2011), y se ha descubierto que numerosas vías de guía axonal se encuentran desreguladas en varios tipos de tumores, incluidos aquellos que no son de origen neuronal. Uno de los primeros ejemplos detectados es el caso del receptor de netrina, DCC (Deleted in colorectal cáncer) que fue inicialmente caracterizado como un gen supresor tumoral del cromosoma 18q (Fearon et al., 1990).

Gene	Locus	Expression in cancer
DCC	18q21	<ul style="list-style-type: none"> • LOH and homozygous deletion in colorectal and pancreatic cancers • Downregulation of expression in prostate cancer • Loss of protein function in many cancers
UNC5A	5q35.3	<ul style="list-style-type: none"> • LOH in colorectal cancers • Downregulation in breast, ovary, uterus, prostate, stomach, rectum, colon, thyroid, lung and kidney cancers
UNC5B	10q21-22	<ul style="list-style-type: none"> • LOH in colorectal cancers • Downregulation in breast, ovary, uterus, prostate, stomach, rectum, colon, thyroid, lung and kidney cancers
UNC5C	4q21-23	<ul style="list-style-type: none"> • LOH in colorectal cancers • Downregulation in breast, ovary, uterus, prostate, stomach, rectum, colon, thyroid, lung and kidney cancers
ROBO1	3p12	<ul style="list-style-type: none"> • Homozygous deletion in lung and breast cancers • Downregulation and LOH in prostate, breast, kidney and lung cancers • Upregulation in colorectal and prostate cancer
ROBO3	11q24.2	<ul style="list-style-type: none"> • Downregulation in cervical cancer, lung, breast and kidney cancers • Upregulation in prostate cancer
SLIT1	10q23.3-q24	<ul style="list-style-type: none"> • Downregulation in gliomas, breast and lung cancer • Upregulation in prostate tumours
SLIT2	4p15.2	<ul style="list-style-type: none"> • LOH in lung, colorectal, cervical, head and neck, and bladder cancers • Downregulation in gliomas, acute lymphocytic leukaemia, breast, colorectal and lung cancers • Upregulation in prostate tumours
SLIT3	5q35	<ul style="list-style-type: none"> • Downregulation in gliomas, breast and lung cancer • Upregulation in prostate tumours
NTN1	17p12-13	<ul style="list-style-type: none"> • Downregulation in prostate tumours • Upregulation in metastatic breast cancer, non-small-cell lung cancer, aggressive neuroblastoma, pancreatic adenocarcinoma and IBD-derived colorectal cancers

Tabla 2. (Mehlen et al., 2011) **Expresión de Slits y Netrinas en cáncer.** Representación de genes involucrados en las vías de guía axonal Slit/Robo y Netrina/DCC, y sus niveles de expresión en cáncer.

7.1.- Netrina/DCC.

DCC (Deleted colorectal cáncer), es uno de los receptores de netrina y tiene un papel fundamental en los procesos de guía axonal (Chan et al., 1996) (Fazeli et al., 1997). Sin embargo, también se encuentra implicado en múltiples tumores. El locus de DCC se encuentra delecionado en el 70% de los cánceres colorectales así como en otros tipos de tumores (Fearon et al., 1990). Varios estudios han demostrado que DCC puede suprimir las capacidades tumorogénicas en las células (Kato et al., 2000). Es más, el análisis de muestras humanas de cáncer colorectal en las cuales se produce pérdida de heterocigosis (LOH) de DCC, apoya la idea de DCC como un supresor tumoral (Thiagalingam et al., 1996) (Shin et al., 2007). Pese a todo, la falta de predisposición tumoral en ratones mutantes de DCC (Fazeli et al., 1997) (Mehlen and Fearon, 2004) implica que se requiere un estudio más detallado del papel de la vía Netrina/DCC en este campo.

Por otro lado, Netrina1 se encuentra subregulada en algunos cánceres como el cáncer de próstata (Latil et al., 2003), mientras que actúa como oncogén y está regulada positivamente en otros cánceres, incluyendo dos tercios de los cánceres metastáticos de mama, 50% de los cánceres pulmonares metastáticos no microcíticos, y una gran proporción de los neuroblastomas y adenocarcinomas pancreáticos, (Fitamant et al., 2008) (Delloye-Bourgeois et al., 2009a) (Delloye-Bourgeois et al., 2009b) (Dumartin et al., 2010)

Uno de los mecanismos postulados que relacionan la vía Netrina/DCC con el desarrollo tumoral es la conexión entre esta vía y la supervivencia celular. Un ejemplo es el caso de UNC5D (receptor de netrina). Aunque no se ha encontrado una correlación directa entre el estado de p53 y UNC5D si se ha descrito a UNC5D como una diana transcripcional de p53 (Tanikawa et al., 2003) (Arakawa, 2004), y se ha probado que la pérdida de UNC5B puede suprimir la apoptosis mediada por p53, (Tanikawa et al., 2003) (Pasquale, 2010).

Se ha postulado que receptores como UNC5D tendrían la habilidad de disparar la apoptosis en ausencia de su ligando. En el contexto de la vía Netrina/DCC, las células tumorales que expresan estos receptores sufrirían apoptosis tan pronto como las células tumorales se vuelven demasiado numerosas para la cantidad de Netrina1 secretada en el tejido circundante, o cuando metastatizan a tejidos secundarios donde netrina1 no se expresa o lo hace a niveles muy bajos. Esta hipótesis se apoya en estudios *in vivo* usando ratones transgénicos que sobreexpresan Netrina1, o Unc5c-knockouts. Estos ratones tienen pocas células apoptóticas en los tejidos tales como la bilis intestinal,

donde el ratio Netrina1/receptor está alterado, y estos ratones son más propensos a desarrollar cánceres intestinales agresivos (Mazelin et al., 2004) (Bernet et al., 2007).

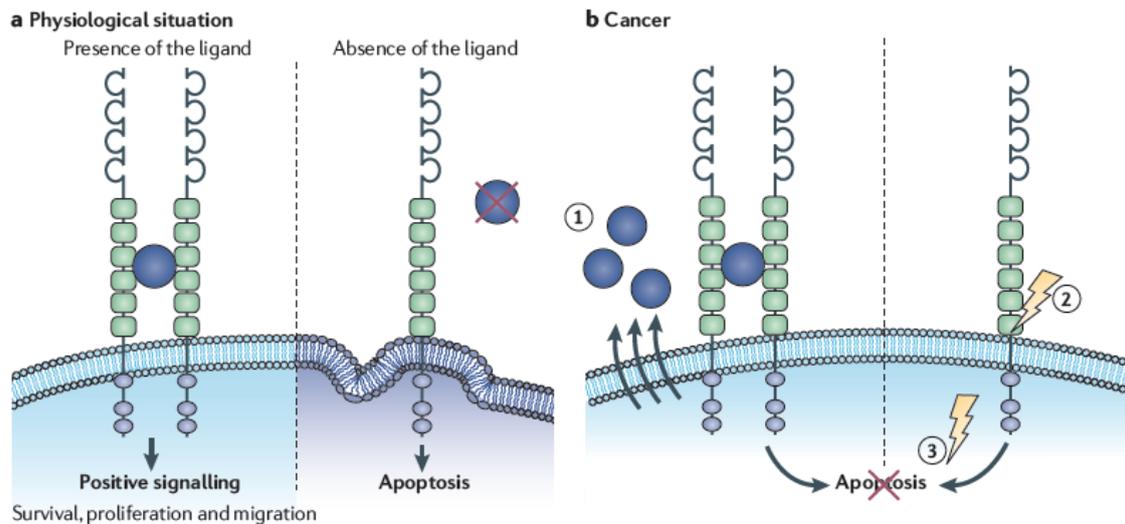


Figura 30. El papel dual de los receptores DCC-UNC5D en la muerte celular (Mehlen et al., 2011). A, en condiciones fisiológicas los receptores como DCC o UNC5D comparten la propiedad de inducir dos vías distintas según la presencia o ausencia de su ligando. En presencia de su ligando los receptores dimerizan o multimerizan e inducen una señal positiva que promueve la supervivencia celular, migración y/o la proliferación. En ausencia del ligando, el receptor monomérico induce apoptosis. B, en las células tumorales la producción autocrina del ligando, la pérdida de función del receptor o la falta de otros elementos pro-apotóticos permitirían al tumor evitar la apoptosis mediada por este mecanismo.

7.2.- Slit/Robo.

Al igual que ocurre con la vía Netrina/DCC, múltiples estudios relacionan la vía de Slit/Robo con el desarrollo tumoral, aunque su papel todavía resulta confuso.

En mamíferos hay evidencias de que la falta de ROBO1 es tumorigénica. Ratones Robo1-knockout tienen una alta morbilidad postnatal, pero los supervivientes sufren hiperplasia bronquial y displasia focal (Xian et al., 2001). Esto se correlaciona con la observación de que ROBO1 y ROBO3 están inactivados o ausentes en diferentes

cánceres humanos, entre ellos el cáncer invasivo cervical, el de pulmón, pecho o riñones. Sin embargo, una asociación directa de los niveles de expresión con el desarrollo tumoral no resulta sencilla ya que en otros tipos de tumores ROBO1 tiene incrementada su expresión, como por ejemplo en los carcinomas colorectales (Gröne et al., 2006) (aunque este hecho podría ser explicado por la expresión de los receptores Robo en la células endoteliales (Gröne et al., 2006)).

Respecto a los ligandos de los receptores Robo, apenas hay información sobre los Slits y el desarrollo tumoral aunque está asumido que SLIT2 y SLIT3 podrían actuar como supresores tumorales ya que aparecen frecuentemente inactivados en varios tipos de cáncer (Dickinson et al., 2004) (Narayan et al., 2006) (Dunwell et al., 2009), y la inactivación de Slit2 y Slit3 en ratones está asociada con la formación de lesiones desorganizadas hiperplásticas en el epitelio mamario (Marlow et al., 2008).

Se ha postulado que la vía Slit/Robo podría tener un papel en el desarrollo tumoral directamente relacionado con la migración de células tumorales, pero se desconocen los mecanismos exactos. Con los datos actuales se plantea un modelo en el cual la respuesta migratoria de células cancerosas a señales atractivas está limitada por SLIT2-ROBO1. Sin embargo, en tumores con propiedades metastáticas hay datos que sugieren un efecto opuesto por el cual la vía Slit/Robo contribuye a un incremento de la motilidad tumoral (Werbowsky-Ogilvie et al., 2006) (Marlow et al., 2008) (Yiin et al., 2009).

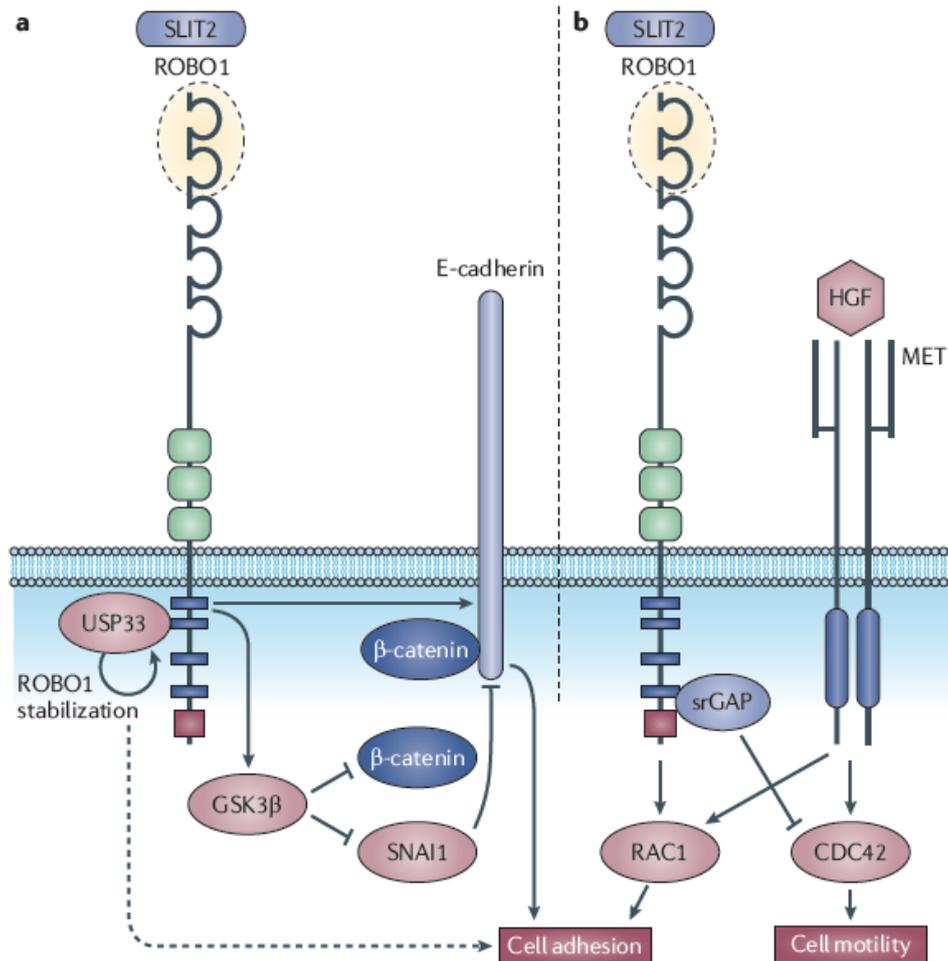


Figura 30. Implicaciones de SLIT2-ROBO1 en la regulación de la migración tumoral (Mehlen et al., 2011). A, La interacción entre SLIT2-ROBO1 promueve la activación de la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK3β), que fosforila (y por lo tanto inhibe en este caso) la β-Catenina y SNAI1. SNAI1 es un potente represor de la expresión de E-Cadherina, por lo que la unión SLIT2-ROBO1 promueve la expresión de E-Cadherina e inhibe los niveles de β-Catenina. Paradójicamente, SLIT2-ROBO1 mejora la estabilización del complejo E-Cadherina- β-Catenina en la membrana plasmática, lo cual facilita la adhesión celular. Este efecto está potenciado por la enzima USP33 que interacciona con ROBO1 y favorece su estabilidad (Yuasa-Kawada et al., 2009). B, SLIT2-ROBO1 inhibe la migración celular, invasión y tubulogénesis promovida por la unión del factor de crecimiento hepático (HGF) a su receptor MET. SLIT2-ROBO1 recluta varias proteínas activadoras de GTPasas específicas, que inhiben CDC42, antagonizando el efecto realizado por HGF-MET en la movilidad celular. Simultáneamente, SLIT2-ROBO1 potencia la actividad de RAC1, que promueve la adhesión celular.

8.- Glioblastomas.

Los astrocitomas de grado IV o glioblastomas son el caso más común de tumor cerebral primario y tienen una incidencia de 16,5 casos por cada 100.000 habitantes/año en los Estados Unidos (51.400 casos anuales) (Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS), 2008).

En general, los astrocitomas representan un heterogéneo grupo de hiperplasias que se pueden dividir (según World Health Organization (WHO)), en cuatro grados de severidad ascendente. Esta clasificación se organiza en base a caracteres histológicos, morfología nuclear, actividad mitótica, necrosis o el desarrollo vascular. Así pues, un alto grado en la escala se asocia a un fenotipo celular menos diferenciado y más maligno. La distribución en grupos de los tumores cerebrales es la siguiente: grado I (astrocitoma), grado II (astrocitoma difuso), grado III (astrocitoma anaplástico) y grado IV (glioblastoma multiforme o glioblastoma) (Louis et al., 2007). Los dos últimos grupos representan los gliomas malignos y están asociados con una mala prognosis siendo el peor de ellos el astrocitoma de grado IV o glioblastoma. (Germano et al., 2010)

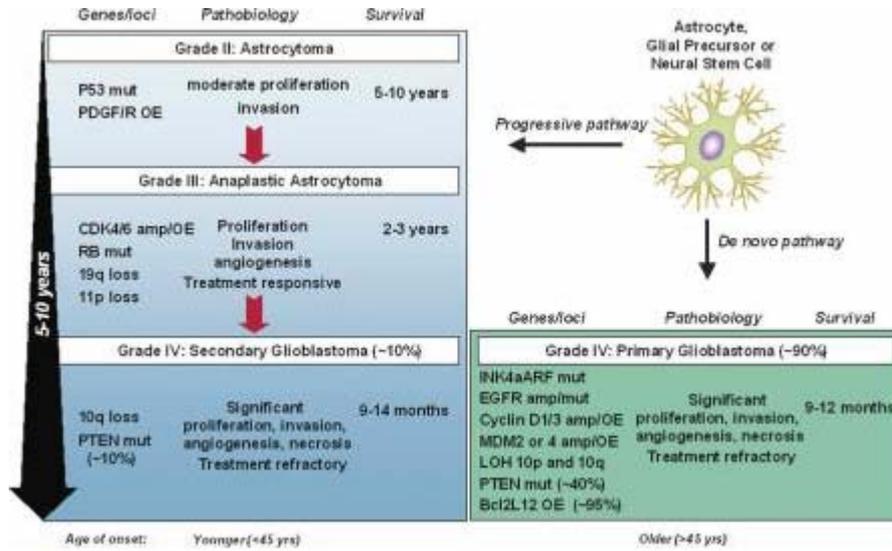


Figura 31. Clasificación de los astrocitomas según la OMS. (Furnari et al., 2007) Los tumores de grados bajos (I-II) tienden a estar bien diferenciados, presentan un incremento de la densidad celular y algunas anomalías celulares, pero en general se asemejan a las células no neoplásicas. A este nivel presentan alteraciones genéticas específicas que van acumulando progresivamente en una correlación con una mayor malignidad, linaje tumoral y progresión hacia un grado mayor. Los tumores de grado III son anaplásicos, muestran un aumento de la densidad de vasos sanguíneos, de las anomalías celulares, de la actividad mitótica y una alta densidad celular. Finalmente, el astrocitoma de grado IV, también conocido como glioblastoma, es el tumor cerebral más común y el más agresivo. Su característica principal es que presenta áreas necróticas rodeadas por células anaplásicas e hipervascularización, y tiene una gran capacidad de invasión intracerebral.

Actualmente, los casos de astrocitomas de grado IV, que suponen un 50 % de los casos de tumor cerebral primario, tienen una esperanza de vida de 14-15 meses pese al uso de tratamientos agresivos combinados de cirugía, radio y quimioterapia (Stupp et al., 2005).

8.1.- Origen y desarrollo del glioblastoma.

En la mayoría de los casos (90%), los glioblastomas son glioblastomas primarios que se forman *de novo* (Furnari et al., 2007), aunque a veces se pueden formar a partir de un astrocitoma preexistente de bajo grado que forma un glioblastoma secundario (este fenómeno se conoce como progresión). Los glioblastomas (GBM) primarios aparecen más frecuentemente en pacientes mayores de 50 años de edad y se caracterizan por mutaciones y amplificación del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), pérdidas de heterocigosidad (LOH) del cromosoma 10q, e inactivación de PTEN y p21. Los GBM secundarios, que son menos frecuentes que los primarios, se pueden manifestar en individuos jóvenes y tienen mutaciones en TP53, sobreexpresión de PDGFR y anomalías en las rutas de p16 y Rb. A pesar de que el fondo genético de GBMs primarios y secundarios es diferente, su morfología es muy similar.

Actualmente, la teoría más aceptada sobre el origen del GBM es que proviene de células madre neuronales normales, que debido a mutaciones en genes determinados se transforman en células madre tumorales que inician el tumor. Al igual que ocurre con otros tipos de cáncer, se cree que las células madre o iniciadoras de GBM (GIC, *glioma initiating cells*) son altamente resistentes a la radio/quimioterapia y son las responsables de las recaídas. Existen sin embargo, informes que indican que algunos GBM se pueden originar a partir de astrocitos desdiferenciados (Friedmann-Morvinski et al., 2012).

En modelos murinos, mutaciones en TP53, NF1 y PTEN son suficientes para que a partir de células madre neuronales normales se desarrollen tumores con características muy similares a los GBM de pacientes. En estos modelos, si las células madre neuronales están mutadas solamente en TP53 y NF1 se desarrollan con el tiempo tumores similares a astrocitomas de grado bajo que luego se transforman en tumores con características de GBMs (Alcantara Llaguno et al., 2009). Numerosas evidencias demuestran que rutas de señalización claves en la biología de células madre neuronales normales, como por ejemplo TGFbeta, Wnt canónico, Shh, Notch y Cxcl12/Cxc4, son claves en las GICs (Peñuelas et al., 2009) (Anido et al., 2010).

Una propiedad que determina la alta mortalidad del glioblastoma es el hecho de que a diferencia de otros tumores, los GBM no intravasan o metastatizan a otros tejidos del cuerpo pero son tumores altamente infiltrativos que pueden colonizar zonas del sistema nervioso central muy alejadas del tumor primario. La infiltración de los GBM y la consecuente formación de tumores satélite se efectúa principalmente a través de los vasos sanguíneos del cerebro (las células tumorales migran siguiendo la cara externa de los vasos, sin penetrar en su interior). Además, se ha descrito que las células tumorales del GBM son capaces de secretar factores angiogénicos, fundamentalmente VEGF, por lo que son capaces de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos según sus necesidades. Finalmente, se sabe que las GICs sobreviven en un nicho vascularizado (al igual que las células madre neuronales normales), esto hace que la inducción de nueva vasculatura lisa y la asociación a vasos sanguíneos sean procesos cruciales en la progresión del GBM.

El carácter altamente infiltrativo del GBM constituye, entre otros, un aspecto que lo hace mortal, pues es casi imposible que las resecciones quirúrgicas del tumor principal consigan la eliminación de todas las células tumorales. Este hecho se puede visualizar en la Figura 32, donde se muestra una imagen de un tumor de GBM generado en cerebros de ratón. El estudio del proceso infiltrativo del GBMs han dado lugar a la identificación de decenas de componentes moleculares de diversa naturaleza entre los que se incluyen: integrina β 8, efrina B, Aeg1, MMP9, autotaxina y PYK2 (Hoelzinger et al., 2005) (Nakada et al., 2007) (Liu et al., 2010) (Nakada et al., 2010) (Tchaicha et al., 2011).

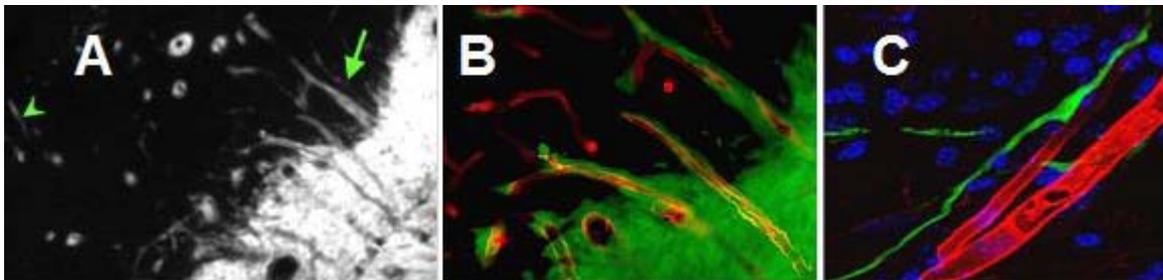


Figura 32. Infiltración de glioblastomas. Imágenes de microscopía de fluorescencia convencional (A y B) o confocal (C) obtenidas a partir de cortes histológicos provenientes del cerebro de un ratón inoculado con células de glioblastoma humano a 40 días después de la inoculación. Las células tumorales pueden ser identificadas gracias a que expresan GFP. A, en la imagen se puede observar que los procesos infiltrativos del tumor (flecha de cabeza) y las colonias de células tumorales están localizadas a una considerable distancia de la masa del tumor (flecha). Este patrón es usual en los pacientes y hace muy difícil, sino imposible, eliminar la totalidad de las células malignas por métodos quirúrgicos. B-C, las células tumorales (verde) infiltran al tejido circundante a través de vasos sanguíneos (rojo) sin intravasarse en ellos (Ulloa F, Seoane J y Soriano E, datos no publicados.).

Numéricamente los glioblastomas suponen un grupo poco frecuente de tumores pero su desproporcionada morbilidad y mortalidad comparada con otros tipos de tumores mucho más frecuentes, hacen del glioblastoma un importante desafío para la medicina actual. La elevada morbilidad y mortalidad no sólo se debe su localización histológica, que dificulta mucho la cirugía, sino también a su característico desarrollo y su resistencia a los tratamientos no-quirúrgicos. Actualmente no existe un cura para esta enfermedad y los tratamiendos combinados de cirugía con radio-quimioterapia únicamente aumentan la supervivencia, pero no impiden la reaparición del tumor.

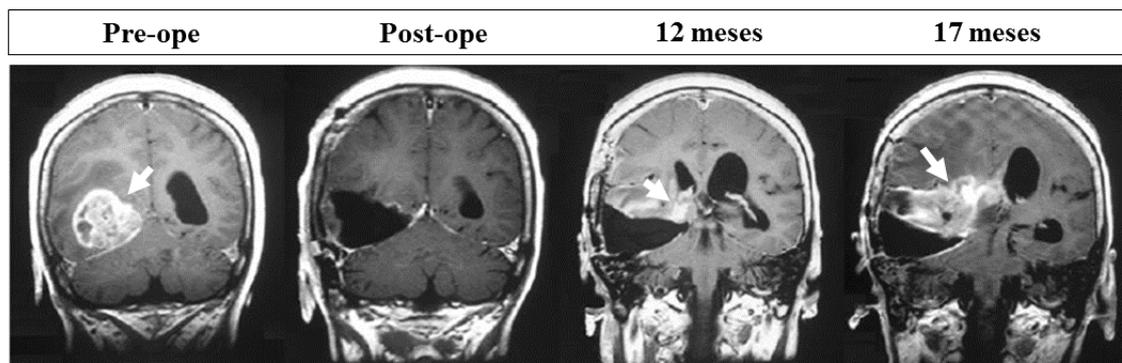


Figura 33. Imágenes de Resonancia magnética de un paciente con glioblastoma. (Nakada et al., 2007) En el paciente se había desarrollado un glioblastoma en la parte occipital derecha del cerebro (flecha) (imagen izquierda). Por MRI se confirmó tras la operación la eliminación completa del tumor (imagen centro izquierda). A los doce meses se detectó mediante una resonancia rutinaria un tumor recurrente adyacente a la cavidad seccionada (flecha, imagen centre derecha). Y finalmente el paciente murió diecisiete meses tras la operación habiendo desarrollado un nuevo glioblastoma en una zona próxima al tejido extirpado (flecha, imagen derecha).

RESULTADOS

Parte I: las proteínas SNARE en guía axonal.

Tras los experimentos *in vitro* y *ex vivo* que demostraban una relación entre las proteínas SNARE y los procesos de guía axonal, nos preguntamos si *in vivo* las proteínas SNARE tienen alguna función en los fenómenos que dirigen el axón durante su desarrollo (Südhof and Rothman, 2009) (Cotrufo et al., 2011) (Rizo and Südhof, 2012) (Nakayama et al., 2012). Ya que existe un caso documentado en *Drosophila melanogaster* donde un mutante para la proteína t-SNARE Sintaxina1A (Syx1A) desarrolla defectos en el sistema nervioso embrionario (Schulze and Bellen, 1996), decidimos estudiar en profundidad los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en este fenotipo y compararlo con las otras proteínas SNARE que forman con Stx1A el complejo canónico SNARE.

1.- Desarrollo del cordón ventral neural (VNC) en mutantes para proteínas SNARE.

1.1- Mutantes para Syx1A desarrollan defectos en la formación de las fascículas comisurales.

En un primer análisis, utilizamos la tinción con el anticuerpo BP102 para confirmar la presencia de defectos durante el sistema nervioso central de *Drosophila melanogaster* en embriones *Syx1A* *-/-*, y analizar el desarrollo del sistema nervioso central en embriones mutantes para proteínas que forman el complejo SNARE con Syx1A: Sinaptobrevina neuronal (nSyb) y Snap25. La tinción utilizada, contra un antígeno no identificado, marca todos los axones ipsilaterales y comisurales que forman el cordón nervioso ventral (VNC) pero no tiñe otras estructuras neuronales como son los nervios motores o las neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico.

Utilizamos esta tinción en mutantes para tres proteínas SNARE: Syx1A, Snap25 y nSyb. En mutantes *nSyb* *-/-* o *Snap25* *-/-* no observamos diferencias entre los mutantes y el grupo control (yw) (datos no mostrados), pero en los embriones *Syx1A* *-/-* detectamos un ensanchamiento anómalo en algunos haces de axones comisurales (figura 1). Todas las tinciones fueron realizadas en las fases finales del desarrollo nervioso (estadio 17).

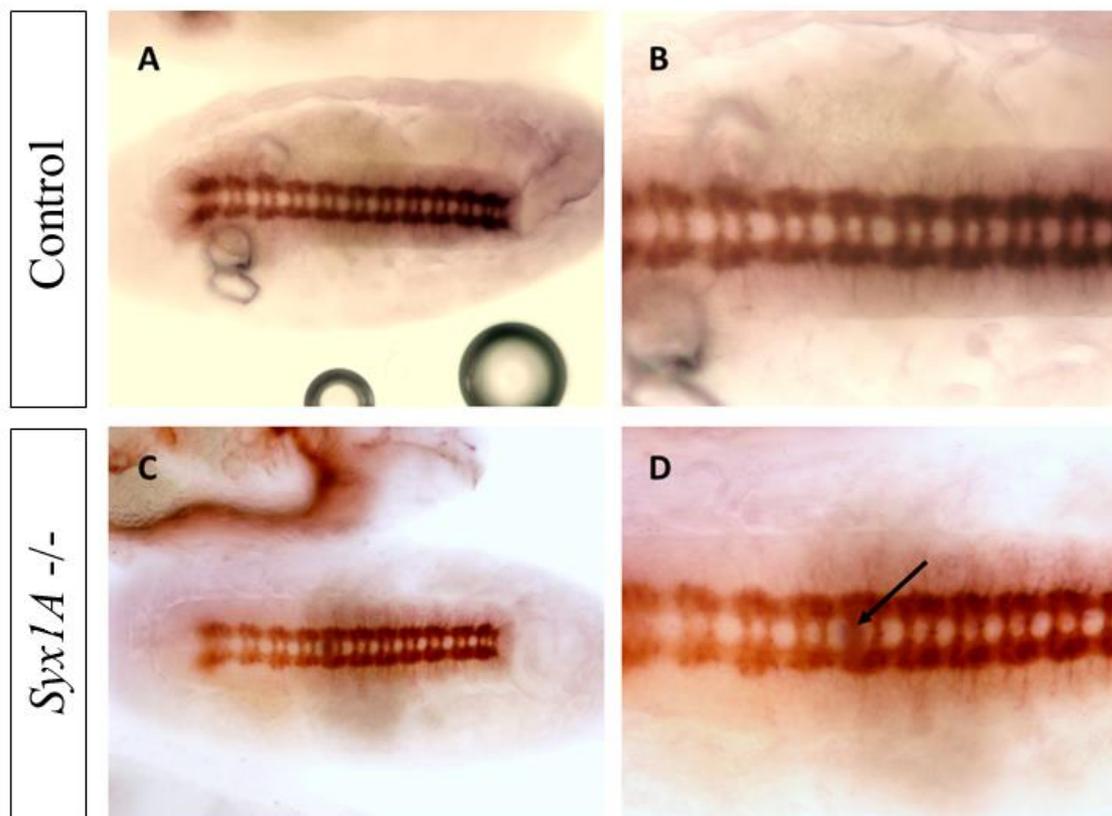


Figura 34. Embriones teñidos con BP102 a estadio diecisiete (perspectiva ventral). A-B, embrión control (yw). C-D, embrión nulo para *Syx1A* que presenta un ensanchamiento anómalo en un haz de axones comisurales (flecha).

1.2.- Los mutantes para proteínas SNARE desarrollan defectos en la guía axonal.

Con el primer estudio tuvimos una visión genérica de la formación de las fascículas nerviosas en los mutantes de proteínas SNARE. Sin embargo, la tinción BP102 no permite detectar defectos de guía axonal en fascículas concretas ya que tiñe el conjunto de fibras nerviosas del sistema nervioso central. Esto hace que la tinción sea útil en una primera aproximación para tener una visión genérica del sistema nervioso central, pero no permite detectar errores que impliquen a grupos concretos de fascículas porque el conjunto de las fascículas teñidas puede enmascarar el defecto desarrollado en unas pocas de ellas.

Por este motivo decidimos realizar un análisis más detallado de la guía axonal en los mutantes de proteínas SNARE centrándonos en el desarrollo de las tres fascículas positivas para FasciclinaII (fascículas medial, intermedia y lateral), existentes en el cordón nervioso ventral. A estadios tardíos (16 tardío-17 temprano) estas fascículas forman un patrón muy concreto donde es fácil detectar problemas de guía axonal. Además, esta tinción también marca muchos de los nervios motores y algunas neuronas sensoriales y motoras, por lo que es posible estudiar los nervios motores con la misma tinción.

Stock	Control	Syx1A	Snap25	nSyb	Vamp7
Detalles genéticos	yw	Alelo amórfico de Syntaxina1A	Deficiencia de Snap25	inserción de un elemento P en nSyb	inserción de un elemento P en Vamp7

Tabla3. Mutanes para proteínas SNARE utilizados en los experimentos de guía axonal.

En este trabajo todos los fenotipos encontrados fueron corroborados mediante cruces de los mutantes con las deficiencias de los genes afectados. Hicimos estos cruces para descartar que los fenotipos observados estuvieran originados por otras alteraciones genéticas en los cromosomas a parte de las mutaciones específicas en las proteínas SNARE.

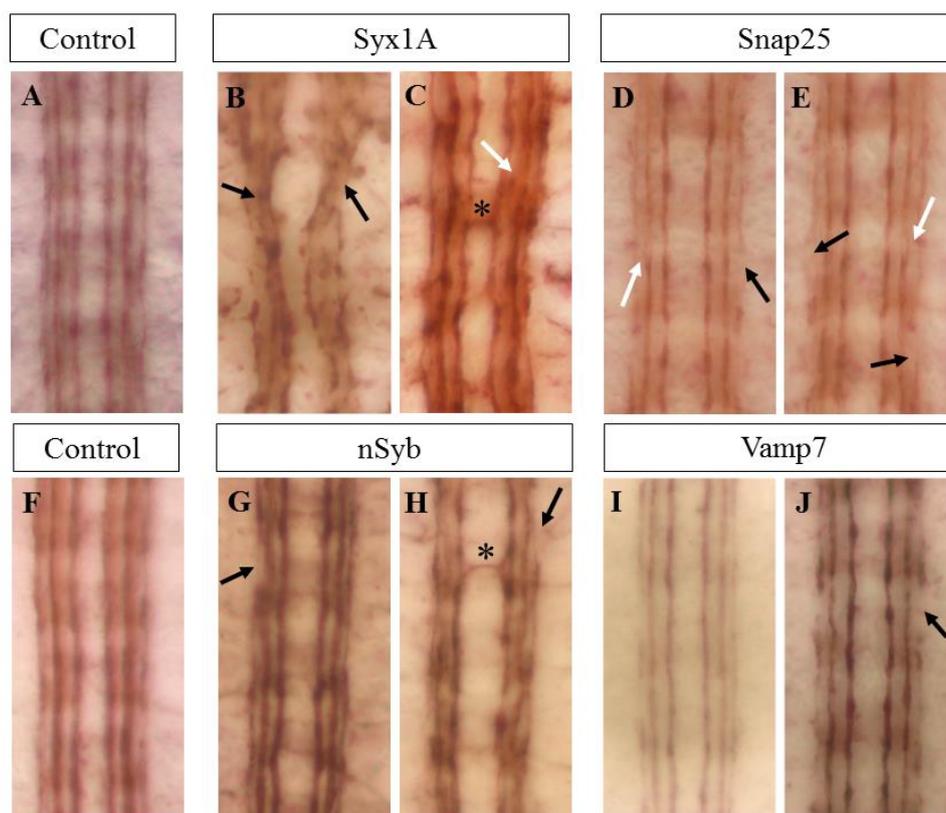


Figura 35. Fenotipos presentes en mutantes para proteínas SNARE en el cordón neural ventral (VNC). Embriones teñidos con anti-FasciclinaII a estadio diecisiete. A, F, embriones control (γw) en los cuales se pueden apreciar las fascículas medial, intermedia y lateral a ambos lados de la línea media. B, C, embriones mutantes para Syx1A. Detectamos colapsos entre las fascículas (flechas negras), desfasciculaciones (flecha blanca) y cruces de axones a través de la línea media (asteriscos). D, E, embriones mutantes para Snap25. Observamos rupturas en las fascículas (flechas negras), así como desfasciculaciones (flecha blanca). G, H, embriones mutantes para nSyb. Detectamos rupturas y colapsos (flechas negras), así como cruces de axones a través de la línea media (asteriscos). I, J, embriones mutantes para Vamp7. Apenas se pudieron observar algunos defectos de la guía axonal como rupturas en las fascículas (flechas negras).

Analizamos el desarrollo de las fascículas FasciclinaII en todas las proteínas SNARE susceptibles de participar en el complejo SNARE formado por Syx1A (incluyendo Syx1A). Los *stocks* utilizados fueron: un alelo nulo para la región funcional de Syx1A, una deficiencia de Snap25, un mutante de nSyb generado por inserción y otro mutante por inserción en una secuencia homóloga a la secuencia de VAMP7 en vertebrados (Vamp7). Estos fueron los resultados:

- Embriones mutantes para Syx1A. Syx1A es la proteína homóloga de Stx1 en vertebrados (flybase) (Schulze et al., 1995). En embriones mutantes para Syx1A teñidos con anti-FasciclinaII observamos defectos en los procesos de guía axonal: roturas o colapsos entre las fascículas, desfasciculaciones (en forma de ensanchamientos o burbujas en las fascículas) e incluso cruces de axones a través de la línea media.
- Embriones mutantes para Snap25. Snap25 es la proteína homóloga de SNAP-25 en vertebrados (flybase) (Vilinsky et al., 2002). En embriones mutantes para Snap25 teñidos con anti-FasciclinaII observamos defectos menores en los procesos de guía axonal: roturas, desfasciculaciones y pequeños colapsos entre las fascículas (pero nunca a través de la línea media).
- Embriones mutantes para la nSyb. nSyb es la proteína homóloga de VAMP2 en vertebrados (flybase) (Bhattacharya et al., 2002). En embriones mutantes para nSyb teñidos con anti-FasciclinaII observamos defectos en los procesos de guía axonal: roturas o colapsos entre las fascículas (incluidos cruces a través de la línea media), y desfasciculaciones.

- Embriones mutantes para Vamp7. Vamp7 es la proteína homóloga a VAMP7 en vertebrados (flybase) (genebank). Los embriones mutantes para dVAMP7 teñidos con anti-FasciclinaII no desarrollan apenas defectos en la formación del sistema nervioso central.

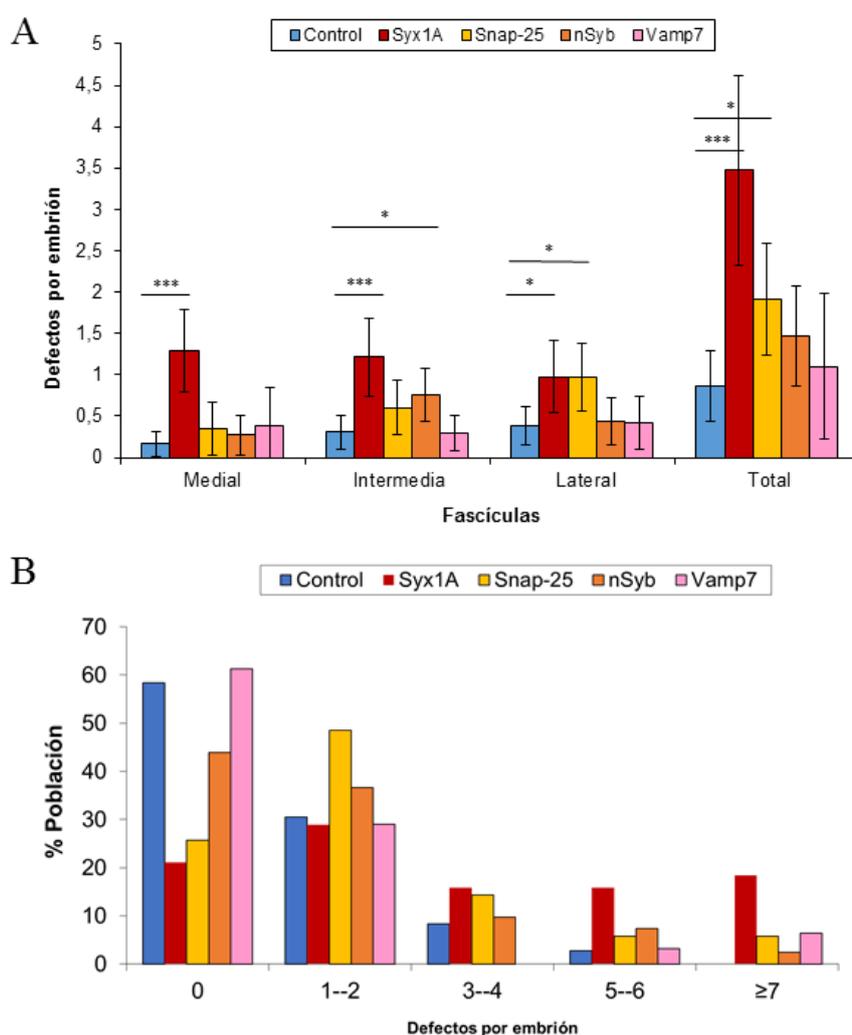


Figura 36. Cuantificación de los fenotipos presentes en mutantes para proteínas SNARE en el cordón neural ventral VNC. Control, n= 36. Syx1A, n= 38. Snap25, n= 35.nSyb, n= 41. Vamp7, n= 31. A, cuantificación de los defectos en la guía axonal en los mutantes distribuidos por fascículas. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre las medias de los grupos. B, distribución de la población de embriones según el número de defectos de guía axonal que desarrollan.

Tras una caracterización inicial de los fenotipos (figura 35), realizamos una cuantificación minuciosa de los defectos observados (figura 36). Durante el proceso de cuantificación descartamos todo defecto que tuviera un tamaño claramente inferior a la longitud de un segmento abdominal para descartar en gran medida los eventos que se producen durante el desarrollo y que no reflejan problemas en la guía axonal sino un sistema en desarrollo. Además, limitamos nuestra cuantificación a los cinco segmentos abdominales centrales (A2-A6), que son los más estables. Y finalmente utilizamos como control una línea *yw* para cuantificar el ruido intrínseco en la cuantificación. Aplicando estos criterios obtuvimos como resultados:

- Embriones mutantes para Syx1A. En ellos se produce un incremento significativo del número medio de defectos en todas las fascículas. Además, se observa que la proporción: (defectos Syx1A)/ (defectos control), es decreciente desde la fascícula medial (ratio= 7,74), hasta la intermedia (3,96) y lateral (2,50).
- Embriones mutantes para Snap25. Aunque hay un incremento del número de defectos en todos los grupos, este efecto sólo es estadísticamente significativo en la fascícula lateral y en el número total. Además, en este caso el ratio: (defectos Snap25)/ (defectos control) es casi constante: fascícula medial (2,1), intermedia (2,0) y lateral (2,5).

- Embriones mutantes para nSyb. En este caso el incremento del número de defectos es estadísticamente significativo en la fascícula intermedia. El ratio de defectos presenta notables diferencias entre las fascículas: medial (1,61), intermedia (2,47) y lateral (1,13).
- Embriones mutantes para Vamp7. No detectamos un incremento significativo en el número de defectos en ninguno de los grupos y los ratios de defectos son cercanos a 1 salvo en el caso de la fascícula medial: medial (2,32), intermedia (0,95) y lateral (1,08).

Adicionalmente, estudiamos la distribución poblacional de los fenotipos agrupándolos según la cantidad de defectos que presentaba cada embrión (figura 36B). En el grupo control (*yw*) un 58% de los embriones no desarrollan defectos y el porcentaje de embriones en cada grupo disminuye conforme se aumenta el número de defectos. En líneas generales, los mutantes para Snap25, nSyb y Vamp7 presentan un patrón similar de evolución decreciente del porcentaje de embriones en cada grupo según aumentamos la severidad del fenotipo, mientras que los mutantes de Syx1A tienen un patrón de valores entre 15-30% en todos los grupos. Es reseñable el hecho que salvo en el caso de Vamp7, los otros mutantes tienen siempre un porcentaje menor de población libre de defectos comparados con el control: control (58%), Syx1A (21%), Snap25 (26%), nSyb (44%) y Vamp7 (61%).

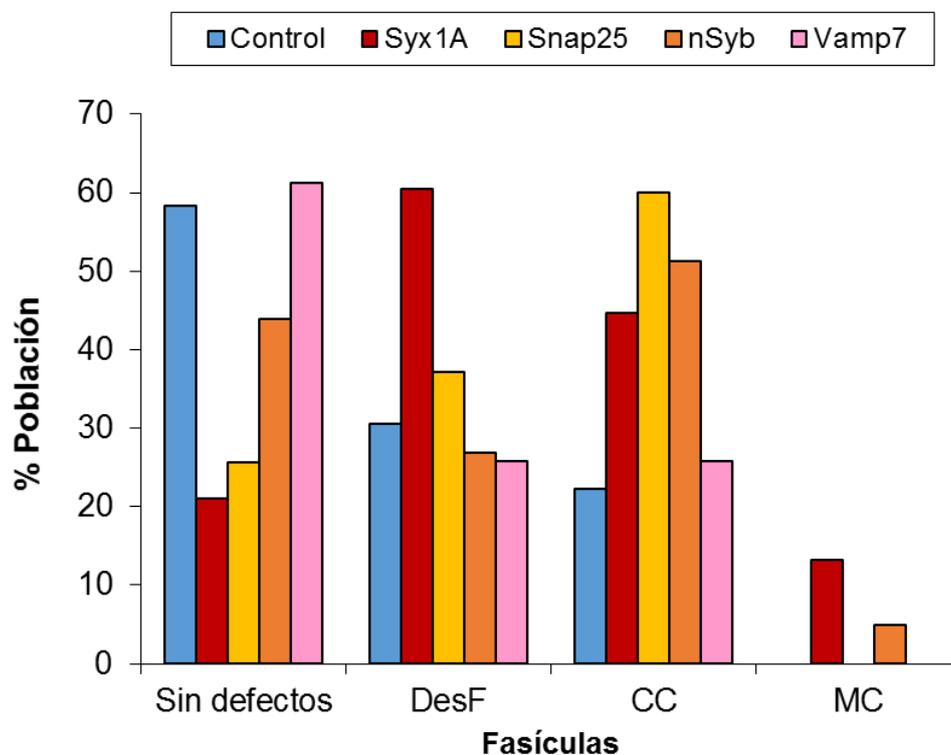


Figura 37. Distribución poblacional de los tipos de defectos de guía axonal en mutantes para proteínas SNARE en el cordón neural ventral VNC. Control, n= 36. Syx1A, n= 38. Snap25, n= 35. nSyb, n= 41. Vamp7, n= 31. Para este trabajo utilizamos la tinción anti-Fasciclina II y agrupamos los problemas desarrollados en tres grupos: desfasciculaciones (DesF), cruces o colapsos entre las fascículas (CC) o cruces de axones positivos para FasciclinaII a través de la línea media (MC).

Tras los datos sobre la población libre de defectos mencionados en el párrafo anterior, decidimos estudiar la distribución de los tipos de defectos en los mutantes para saber si existe alguna relación entre cualitativa entre los defectos desarrollados y el tipo de mutante. Los mutantes *Syx1A* *-/-* fueron los únicos que presentaron valores muy superiores al control en todos los casos, mientras que los mutantes para Snap25 o nSyb únicamente desarrollaron valores muy superiores en la población con cruces o colapsos entre las fascículas. Vamp7 presenta unos perfiles poblacionales casi idénticos a la población control. Finalmente, resulta destacable la aparición en Syx1A (13% de los

casos), y nSyb (5% de los casos), de un tipo de evento que nunca aparece en el control: el cruce de axones positivos para FasciclinaII a través de la línea media.

1.3- La proteína Vamp7 no presenta homología funcional con su homóloga VAMP7 en el desarrollo del VNC de *Drosophila melanogaster*.

Los datos presentes en las figuras 35-37 nos muestran que los embriones mutantes para Vamp7 no desarrollan una cantidad significativa de defectos de guía axonal mientras que el resto de mutantes para proteínas SNARE sí que lo hacen. Este hecho, sumado con el factor de que en *Drosophila melanogaster* únicamente están documentadas dos proteínas homólogas funcionales de las proteínas VAMP en vertebrados (flybase) (Bhattacharya et al., 2002), nos hizo descartar Vamp7 como homólogo funcional de VAMP7. Sin embargo, no podemos descartar que en *Drosophila melanogaster* Vamp7 podría no tener ninguna función durante el desarrollo del VNC o de tener una función, esta podría ser genéticamente redundante y estar compensada por otras proteínas VAMP como Sinaptobrevina o Sinaptobrevina neuronal.

2.- Desarrollo del sistema nervioso periférico en mutantes para proteínas SNARE.

2.1.- Los embriones mutantes para proteínas SNARE desarrollan defectos de guía axonal durante la formación de los nervios motores.

Como ya mencionamos anteriormente, la tinción anti-FasciclinaII marca otras estructuras al margen del sistema nervioso central. Si nos centramos en los nervios motores, esta tinción muestra los tres nervios motores principales: ISN (nervio intersegmental), SNa (nervio segmental A) y SNb (nervio segmental B) (Van Vactor et al., 1993).

En mutantes para las proteínas SNARE se observan defectos de guía axonal en los tres nervios motores principales. El tipo de defecto, su severidad y frecuencia varía según el nervio y mutante analizado pero en general detectamos problemas en la fasciculación de los nervios, cruces entre ellos o un crecimiento axonal a través de regiones distintas a las habituales (figura 38).

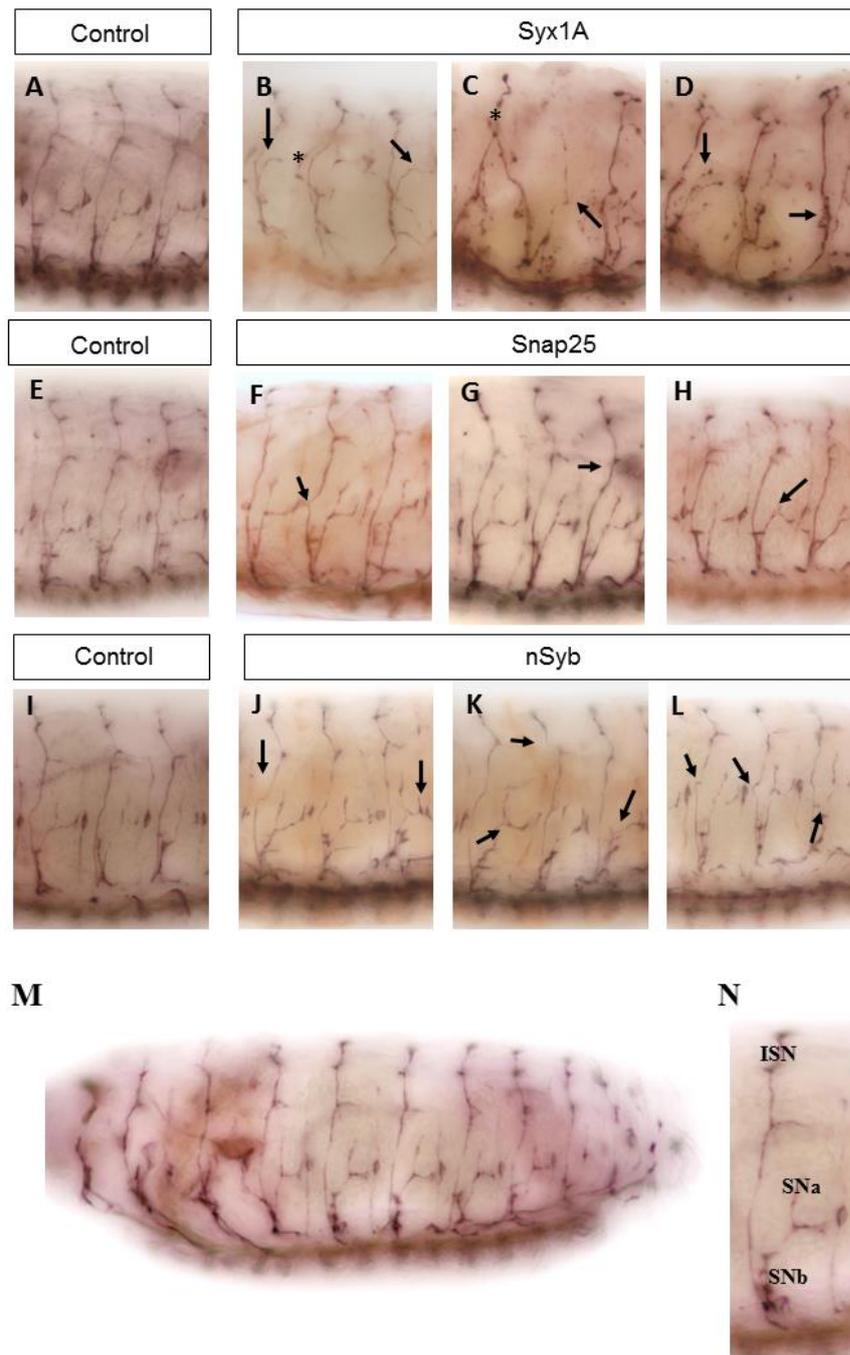


Figura 38. Fenotipos en los nervios motores de mutantes para proteínas SNARE. Todas las imágenes son de los nervios ISN, SNa y SNb de los segmentos A2-A4 de embriones teñidos con anti-FasciclinaII a estadio 17. A, E, I, embriones control (γw). B-D, mutantes para Syx1A donde se aprecian múltiples problemas en el desarrollo de los nervios motores tales como cruces entre nervios (asteriscos) o un desarrollo anómalo de los nervios (flechas). F-H, mutantes para Snap25 donde aparecen varios problemas en el desarrollo de los nervios motores (flechas). J-L, mutantes de nSyb donde se ven defectos en el desarrollo de los nervios motores (flechas). M, perspectiva lateral de un embrión control a estadio 17 marcado con anti-FasciclinaII, que permite reconocer el ISN, SNa y SNb. N, zoom del embrión donde se muestra un único segmento abdominal.

RESULTADOS

Tras una primera caracterización del fenotipo procedimos a cuantificar el número de nervios afectados en cada lateral embrionario (tomando de cada lateral únicamente los segmentos A2-A6). Este trabajo dio como resultado un incremento general del porcentaje de nervios afectados por algún defecto de guía axonal en comparación con la línea control (*yw*) (figura 39A). Además, en todos los mutantes hubo una disminución drástica del número de laterales sin nervios afectados por defectos de guía axonal en comparación con la línea control: Control (22%), Syx1A (0%), Snap25 (0%) y nSyb (3%), y un incremento en el porcentaje de población que tiene una cantidad elevada de defectos, destacando Syx1A (figura 39B).

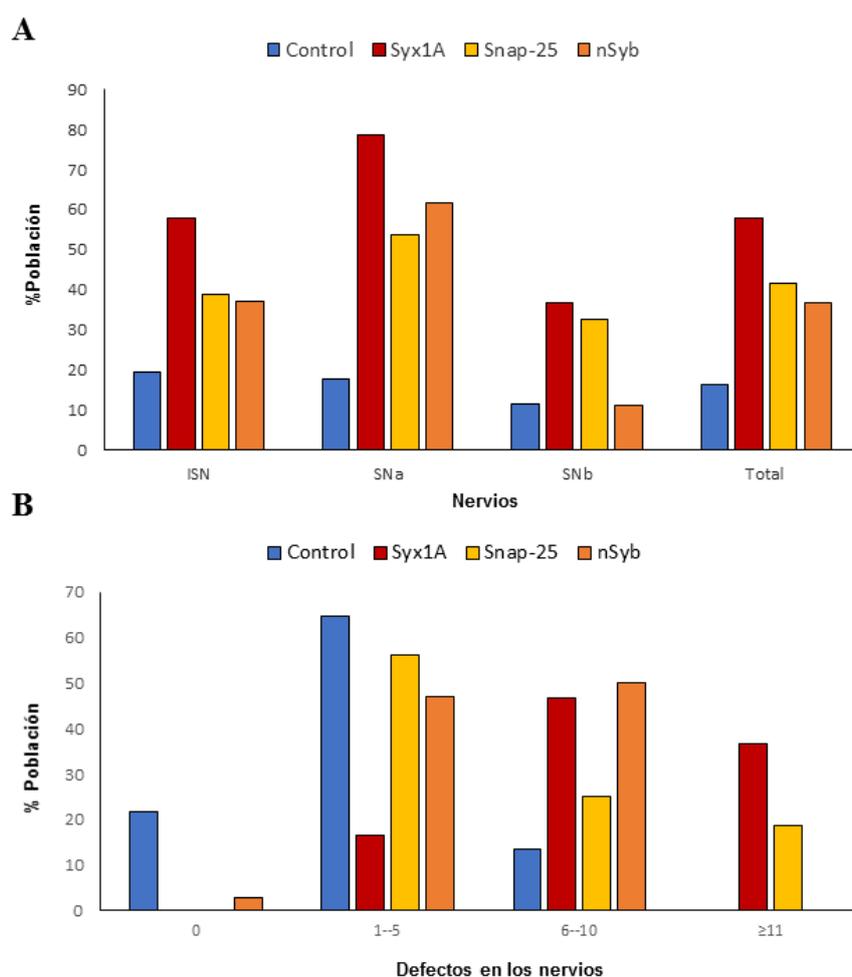


Figura 39. Cuantificación de los fenotipos en los nervios motores de mutantes para proteínas SNARE. Cantidad de nervios de cada subgrupo analizados: Control, n= 185. Syx1A, n= 150. Snap25, n= 80. nSyb, n= 170. A, cuantificación del porcentaje de nervios motores afectados por defectos en la guía

2.2- El sistema nervioso periférico se encuentra alterado en mutantes de *Syx1A*.

Analizados el sistema nervioso central y los nervios motores, procedimos a estudiar si los procesos de guía axonal también están alterados en el sistema nervioso periférico cuando se afecta a las proteínas SNARE. Para este estudio utilizamos mutantes de *Syx1A* teñidos con el anticuerpo 22C10, que reconoce la proteína Futsch y marca específicamente el sistema nervioso periférico. Como resultado detectamos problemas de guía axonal en el sistema nervioso periférico de mutantes para *Syx1A* como por ejemplo una mayor concentración de las terminaciones de las fascículas periféricas en el VNC, y en la zona lateral se observan alteraciones en el *terminal sencilla scolipidial* y en las fascículas nerviosas (figura 40).

axonal. Se analizaron individualmente los tres nervios motores principales: ISN (nervio intersegmental), SNa (Nervio segmental A) y SNb (nervio segmental B). B, distribución del número de defectos presentes por lateral embrionario (analizando los segmentos A2-A6). Cantidad de laterales analizados: Control, n= 37. *Syx1A*, n= 30. *Snap25*, n= 16. *nSyb*, n= 34.

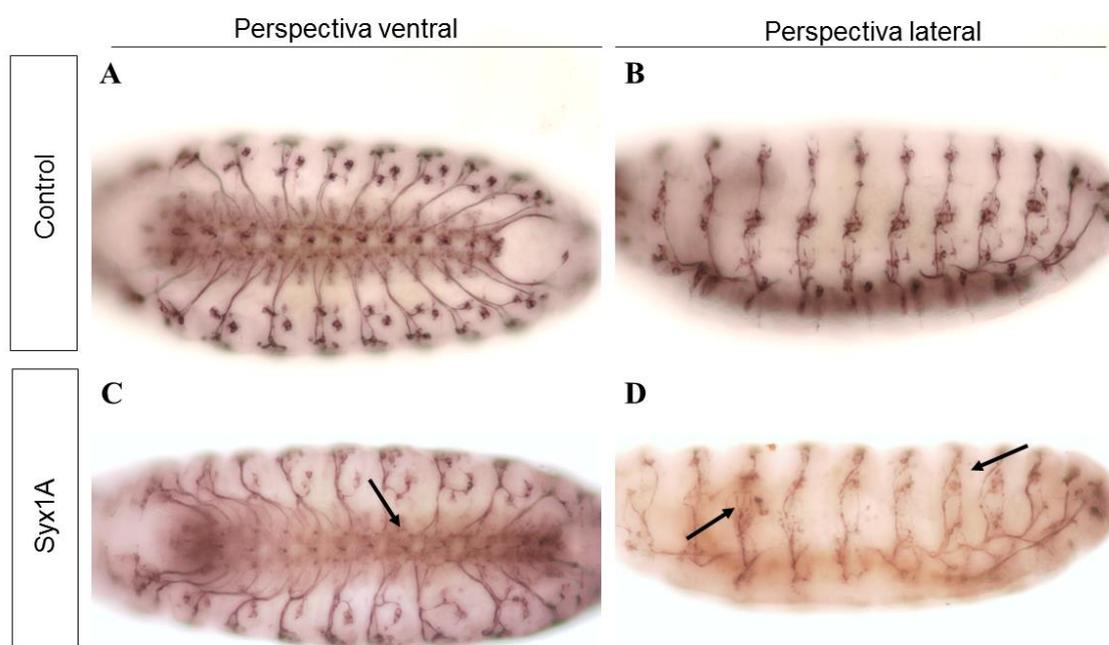


Figura 40. Fenotipo en el sistema nervioso periférico de embriones Syx1A $-/-$. Embriones teñidos a estadio diecisiete con anti-Futsch para marcar los nervios periféricos. Imágenes en perspectiva ventral, A-C, y lateral, B-C. A-B, embriones control (*yw*). C-D embriones nulos para la proteína Syx1A con defectos en la guía axonal (flecha figura C: defectos en las terminaciones de los haces nerviosos. Flecha izquierda figura D: alteraciones en el *terminal sencilla scolipidial*. Flecha derecha figura D: defectos en las fascículas nerviosas).

3.- Los mutantes para Syx1A presentan los fenotipos más severos de todas las SNARE analizadas.

En todos los casos estudiados por nosotros, los mutantes para Syx1A fueron los que presentaron fenotipos más acentuados.

En el VNC, la proporción de embriones que no desarrolla defectos de guía axonal es tres veces menor que en los casos controles (21% frente un 58% en los controles) (figura 3B). Además, la cantidad de defectos es mayor en todas las fascículas

y llega a ser llegando siete veces superior en la fascícula medial si comparamos con los datos control (figura 3A).

En los nervios motores, el porcentaje de laterales embrionarios que no presentan defectos en los nervios motores es 0% (Syx1A), frente un 21% (control) (figura 5B). Además, la cantidad de nervios afectados es superior en todos los casos, llegando a ser cuatro veces superior al control en el SNa (figura 39A).

Otro rasgo interesante en estos mutantes que desarrollan es el desarrollo de problemas en la guía axonal que no se dan en condiciones normales. Este es el caso de los cruces a través de la línea media de axones positivos para FasciclinaII. Este hecho, que nunca se da en los controles, aparece en un 5% de los mutantes para nSyb y en un 13% de los mutantes para Syx1A. Ante todos estos resultados decidimos estudiar en detalle el fenotipo presente en los mutantes para Syx1A.

En un primer lugar definimos detalladamente ejemplos de los fenotipos presentes en los mutantes para Syx1A y los agrupamos según su severidad (figura 41). Un segundo paso fue determinar el patrón de expresión de Syx1A en el VNC utilizando anticuerpos contra Syx1A. Detectamos Syx1A a bajos niveles en estadios tempranos (datos no mostrados) y su expresión aumenta notablemente durante el desarrollo hasta alcanzar su máximo a estadio 16-17. En ese momento se expresa con intensidad en las fascículas longitudinales y con unos niveles algo menores en las fascículas comisurales y los nervios motores

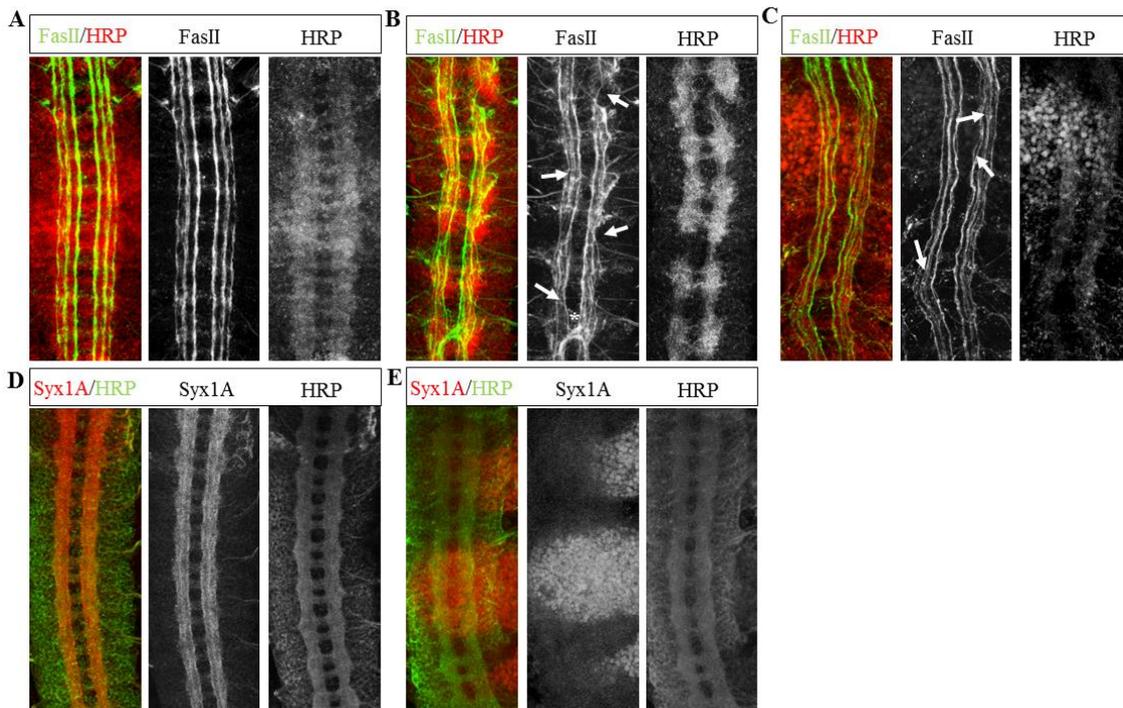


Figura 41. Fenotipos de guía axonal en el VNC de embriones mutantes para Syx1A y patrón de expresión de Syx1A en el VNC. A-C, embriones a estadio 17 teñidos con el anticuerpo contra FasciclinaII que marca sólo los axones positivos para FasciclinaII y tinción contra HRP, que muestra todos los axones del sistema nervioso. A, embrión control que muestra los axones longitudinales positivos para FasciclinaII. B, embrión mutante para Syx1A ejemplo del grupos fenotípico más fuerte encontrado; muchos de los axones longitudinales están colapsados o rotos, alteraciones en los axones comisurales (flechas) y se detectan cruces a través de la línea media (asterisco). C, embrión mutante para Syx1A ejemplo del grupos fenotípico intermedios; los axones comisurales generalmente no están afectados y únicamente se encuentran defectos en los axones longitudinales (flechas). D-E, embriones a estadio 17 teñidos con anti-Syx1A para determinar la localización de Sintaxina1A y HRP para visualizar todo el sistema nervioso. D, embrión control donde se puede apreciar Syx1A en los axones comisurales y los axones longitudinales. E, embriones mutantes para Syx1A donde no es posible detectar Syx1A en este estadio.

4.- Los defectos presentes en mutantes para *Syx1A* son debidos principalmente a problemas en la guía axonal.

En el desarrollo del sistema nervioso existen situaciones en las que problemas en la neurogénesis, el desarrollo glial o la muerte celular generan problemas en la guía axonal sin afectar directamente a las rutas bioquímicas que dirigen el cono de crecimiento, y por lo tanto es necesario evaluar cuál es la posible participación de estos procesos en la generación de los defectos observados en nuestros mutantes SNARE.

Para abordar este problema realizamos una batería de experimentos con el objetivo de verificar que el fenotipo observado se debe principalmente a problemas en la guía axonal. Tomamos como modelo para este trabajo los mutantes de *Syx1A* por ser los que tienen defectos más numerosos y severos en todas las estructuras neuronales.

4.1.- Los defectos observados no se corresponden con problemas en la neurogénesis.

En los mutantes de *Syx1A* no se observan fenotipos, como la ausencia de estructuras neuronales en algunos segmentos, que son propios de fallos en la neurogénesis. Además, la aparición del fenotipo en nuestros mutantes se da en fases tardías cuando ya no tiene lugar la neurogénesis durante el desarrollo embrionario (figura 42). Así mismo, la expresión de *Syx1A* (figura 41 D-E), con niveles bajos a estadios tempranos 12-13 que aumentan hasta un máximo a estadio 16-17, se corresponde temporalmente con los procesos de guía axonal, pero no con los procesos de neurogénesis que se producen en fases más tempranas (estadios 8-12).

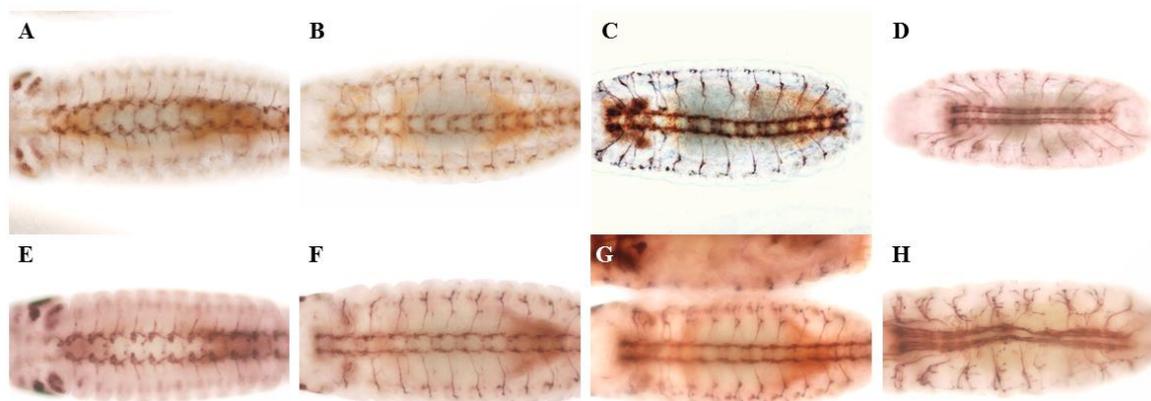


Figura 42. Evolución temporal del fenotipo de Syx1A. Tinción anti-FasciclinaII a estadios trece (A, E), catorce (B, F), quince (C, G) y diecisiete (D, H). Todas las imágenes están en perspectiva ventral. A-D, embriones control (*yw*). E-H, embriones mutantes para *Syx1A*. Hasta el estadio quince ambos *stocks* son indistinguibles pero posteriormente empiezan a aparecer defectos de guía que se agravan con el tiempo.

4.2.- El posicionamiento y número de las células gliales es correcto tanto en el sistema nervioso central como en los nervios motores.

Las neuronas y las células gliales participan conjuntamente en la formación del sistema nervioso. La glía expresa multitud de señales de guía axonal, acompaña a los axones en su crecimiento y señala puntos específicos donde el proceso de guía debe detenerse. La falta de células gliales o una pérdida de función en ellas se puede derivar en problemas que afectan a la guía axonal (Hidalgo et al., 1995). Para descartar que este fuera el origen de los defectos de guía axonal en nuestros mutantes, comprobamos en primer lugar que la expresión de *Syx1A* es específica de neuronas y apenas hay *Syx1A* en las células gliales, tal y como confirmaron las imágenes de las figura 41D-E.

Adicionalmente, utilizamos la tinción anti-Repo (que marca toda la glía en desarrollo y células relacionadas, salvo la glía derivada de mesoectodermo del CNS (glía de la línea media) y tres células gliales del *nerve root*) (Halter et al., 1995) para comprobar el estado de la glía en mutantes de *Syx1A*.

Como resultado observamos que no hay una clara desaparición de células gliales ni en el VNC ni en las zonas periféricas. Además, la posición de las células gliales está conservada en todos los casos salvo en las células cercanas a la línea media, que están levemente desplazadas hacia la línea media. Y este hecho podría ser debido a un posicionamiento erróneo de los axones que generara una alteración en la posición de las células gliales cercanas a la línea media.

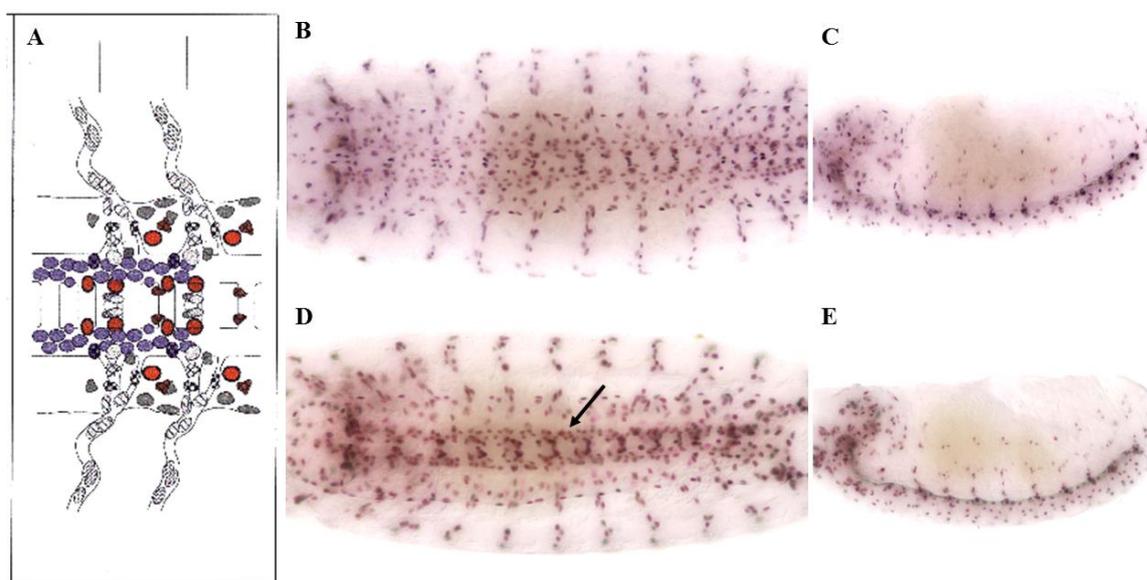


Figura 43. La glía en mutanes para *Syx1A*. A, (Halter et al., 1995) esquema de las posiciones de las células gliales en el VNC. B-C, embriones control a estadio 16 mostrando una posición ventral (B) y otro una perspectiva lateral (C). D-E, embriones *Syx1A* *-/-* a estadio 16 mostrando una posición ventral (D) y otro una perspectiva lateral (E). En D, se puede apreciar una leve alteración de las posiciones de la glía cercana a la línea media que se manifiesta en una mayor concentración de células en esa zona (flecha negra) mientras que la localización del resto de las células gliales no se encuentra alterada.

5.- Estudios adicionales sobre los defectos en la guía axonal de mutantes para *Syx1A*.

5.1.- Los embriones hipomorfos para *Syx1A* presentan un fenotipo con una severidad menor que los alelos nulos.

En los embriones hipomorfos para *Syx1A* ya es posible apreciar problemas de desfasciculación y pequeños colapsos, así como una leve deestructuración en la arquitectura de las fascículas del VNC pero en ningún caso se dan fenómenos de cruces a través de la línea media. Paradójicamente, los nervios motores desarrollan graves problemas de guía axonal con una severidad próxima a la presente en los mutantes nulos para *Syx1A*.

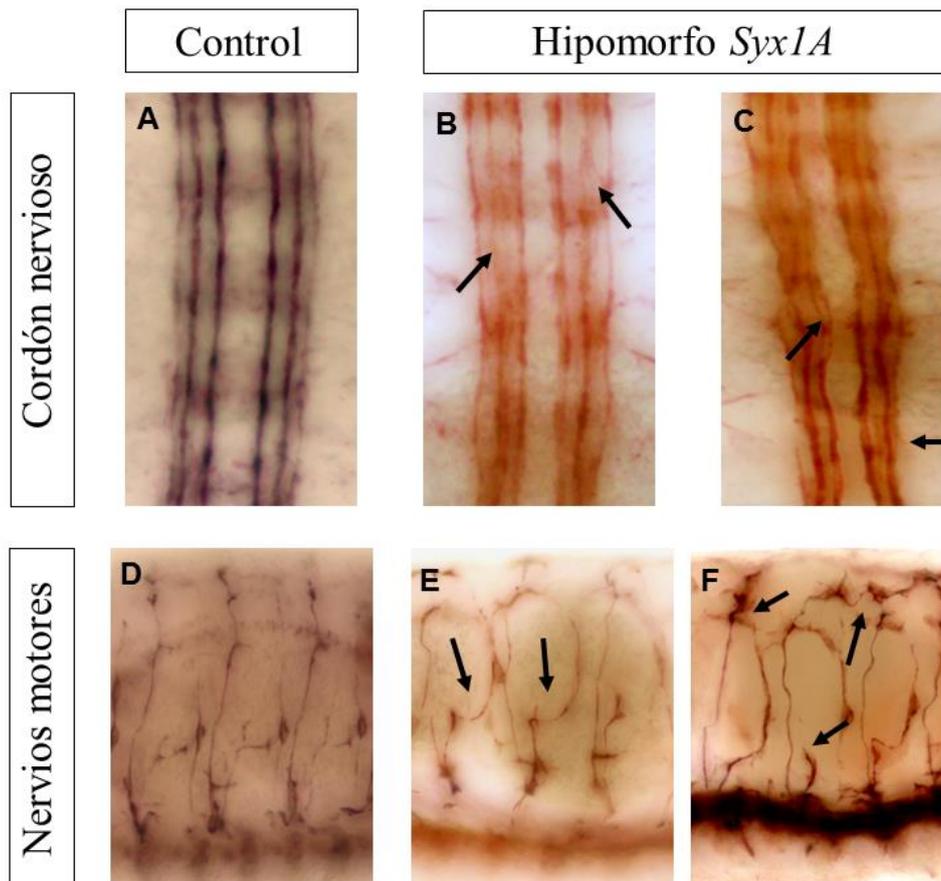


Figura 44. Fenotipo de embriones hipomórficos para *Syx1A*. Embriones a estadio 17 teñidos con anti-FasciclinaII. En las imágenes A-C se muestran las tres fascículas positivas para FasciclinaII del VNC mientras que en las imágenes D-F aparecen los nervios motores ISN, SNa y SNb, así como algunos axones del sistema periférico. A,D, embriones control. B,C y E,F, embriones hipomorfos para *Syx1A* donde se han marcado con flechas negras algunos de los defectos de guía axonal en el cordón nervioso ventral y los nervios periféricos.

5.2.- Los embriones doble mutantes para las proteínas SNARE *Syx1A* y *nSyb*, tienen un fenotipo idéntico a los mutantes de *Syx1A*.

Profundizando en el papel de las proteínas SNARE en los procesos de guía axonal, nos preguntamos si los fenotipos generados en los mutantes eran diferentes entre sí por diferencias en sus funciones, lo cual contradice el modelo básico por el cual las

proteínas SNARE ejercen gran parte de sus funciones en conjunto mediante la formación del complejo SNARE canónico.

Los mutantes para *Syx1A* o *nSyb* tienen un fenotipo en el VNC y son los únicos mutantes de nuestro estudio que desarrollan cruces de axones a través de la línea media, así que quisimos saber si un doble mutante tendría un incremento o disminución del fenotipo en general y/o en los cruces a través de la línea media.

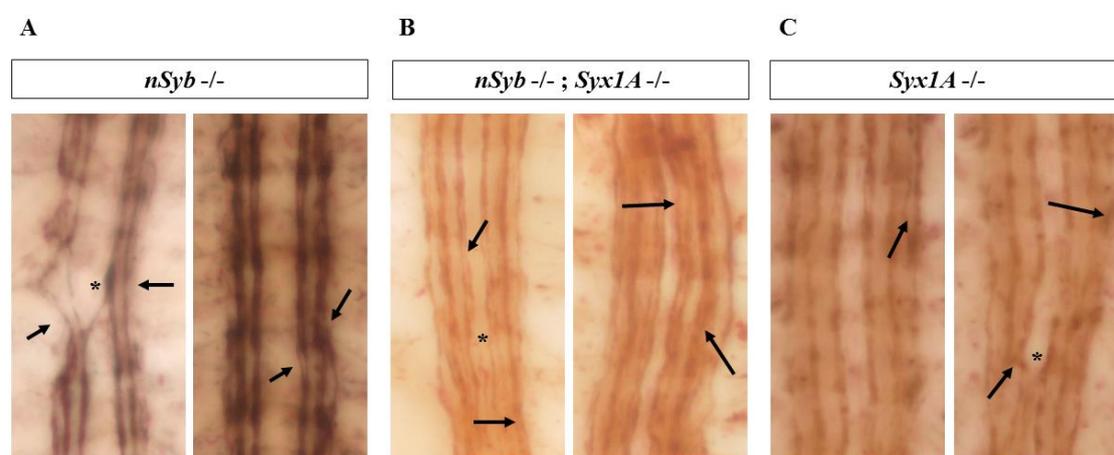


Figura 45. Fenotipo de embriones *nSyb* $-/-$; *Syx1A* $-/-$ en el VNC. VNC de embriones a estadio 16-17 teñido con anti-FasciclinII. Los defectos de guía axonal tales como colapsos, roturas o desfasciculaciones han sido señalados con flechas mientras que los cruces a través de la línea media están marcados con asteriscos. A, embriones *nSyb* $-/-$. B, embriones *nSyb* $-/-$; *Syx1A* $-/-$. C, embriones *Syx1A* $-/-$.

La caracterización inicial del doble mutante *nSyb* $-/-$; *Syx1A* $-/-$ mostró evidentes diferencias fenotípicas entre el doble mutante y mutantes de *nSyb* $-/-$: la frecuencia y severidad de los defectos eran mayores en los doble mutantes, así como el número de embriones afectados por problemas de guía axonal, que era mayor en los dobles mutantes. Por el contrario, el fenotipo del doble mutante es similar al de los embriones *Syx1A* $-/-$.

Para corroborar estas observaciones realizamos un estudio cuantitativo similar a los realizados en la caracterización de los mutantes SNARE (figura 36). Los valores medios de defectos en el VNC en los doble mutantes fueron estadísticamente diferentes a los valores en los mutantes *nSyb* *-/-* en todos los grupos salvo en la fascícula intermedia. Cuando hicimos una idéntica comparación con los embriones *Syx1A* *-/-* no encontramos diferencias significativas en ningún grupo entre los dobles mutantes *nSyb* *-/-*; *Syx1A* *-/-* y los embriones mutantes para *Syx1A*. Asimismo, el patrón de distribución poblacional entre *nSyb* *-/-*; *Syx1A* *-/-* y embriones *Syx1A* *-/-* es casi idéntico. Finalmente comprobamos los valores de embriones libres de defectos en el VNC: *Syx1A* *-/-* (21%), *nSyb* *-/-* (44%) y *nSyb* *-/-*; *Syx1A* *-/-* (22%). Y el número de embriones que presentan cruces a través de la línea media: *Syx1A* *-/-* (13%), *nSyb* *-/-* (5%) y *nSyb* *-/-*; *Syx1A* *-/-* (15%). Ante estos datos asumimos que los fenotipos de embriones *Syx1A* *-/-* y *nSyb* *-/-*; *Syx1A* *-/-* son idénticos.

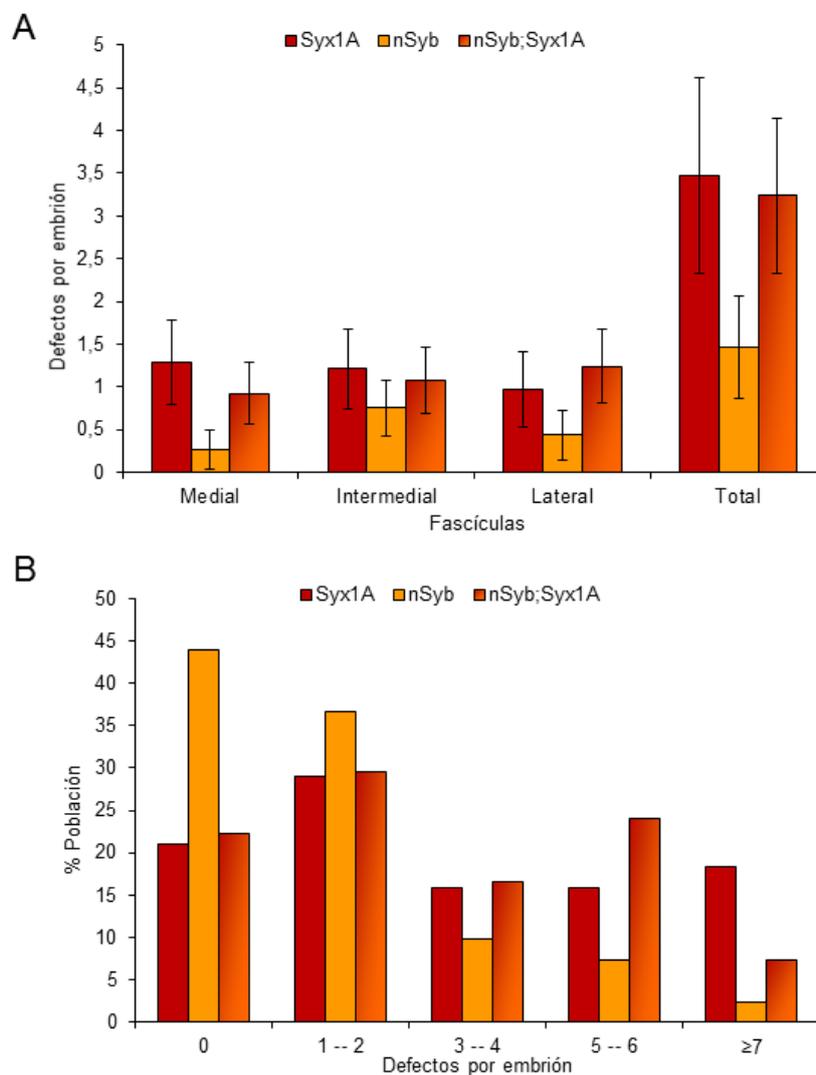


Figura 46. Cuantificación del fenotipo de embriones *nSyb* *-/-*; *Syx1A* *-/-* en el VNC. *Syx1A*, n= 38. *nSyb*, n= 41. *Syx1A*; *nSyb*, n= 54. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre las medias de los grupos. A, cuantificación de los defectos en la guía axonal por embrión distribuidos por fascículas. B, distribución de la población de embriones según el número de problemas de guía axonal que desarrollan.

6.- Mutantes para proteínas SNARE presentan defectos en guía axonal no asociados a Netrina/DCC.

6.1.- Los embriones Syx1A *-/-* no desarrollan una clara interacción génica con la vía Frazzled/DCC.

Ya que *in vitro* se ha documentado que la vía Netrina/DCC es dependiente de Syx1A para mediar procesos de guía axonal (Cotrufo et al., 2011), inicialmente decidimos tratar de reproducir *in vivo* estos resultados utilizando como modelo el desarrollo del VNC en embriones Syx1A *-/-* de *Drosophila melanogaster*.

Nuestros experimentos preliminares dieron en casi todos los grupos resultados negativos. El estudio y cuantificación de los fenotipos de embriones dobles heterocigotos *fra/+; Syx1A/+* (n=16) o dobles mutantes *fra -/-; Syx1A -/-* (n=8) no mostraron alteraciones cuantitativamente significativas en los fenotipos de estos mutantes. Para complementar estos estudios también cuantificamos los fenotipos de otros mutantes para estos genes. El análisis cualitativo y la cuantificación de los fenotipos de embriones *fra/+; Syx1A -/-* (n=16) indicó que no había variaciones significativas entre estos embriones y los embriones Syx1A *-/-*. El único caso que reflejó variaciones significativas fueron los embriones *fra -/-; Syx1A/+* (n=8). Cuando se compararon estos embriones con casos *fra -/-* se vieron diferencias significativas en la media de defectos total y en la fascícula intermedia. Sin embargo, fenotípicamente no se distinguen claramente ambas líneas genéticas.

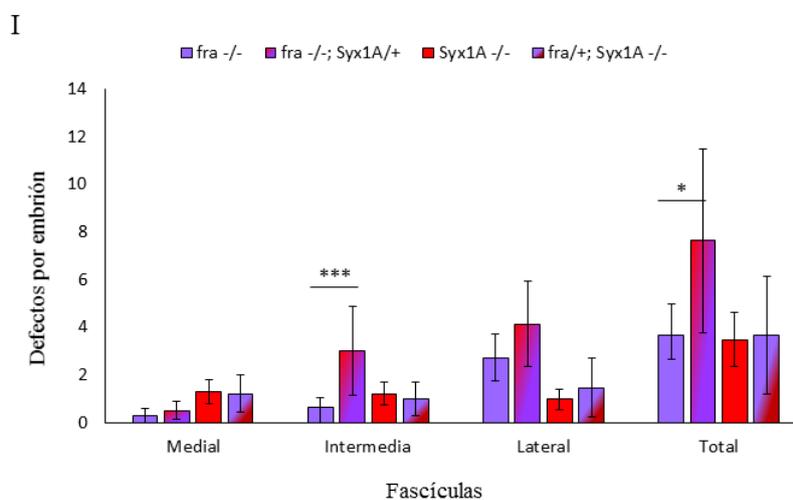
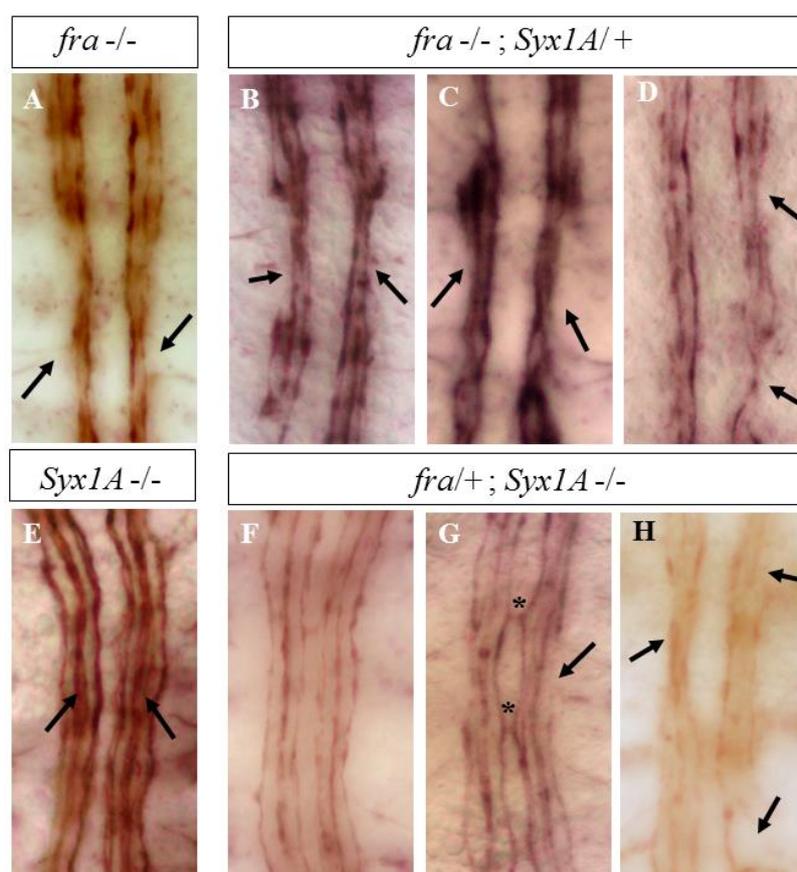


Figura 47. Fenotipo de embriones *fra* -/- ; *Syx1A* -/- o *fra* +/+ ; *Syx1A* -/-. VNC de embriones a estadio 17 teñidos con anti-FasciclinaII. En todos los embriones se han señalado defectos de guía axonal tales como colapsos, rupturas y desfasciaciones (flechas negras), así como cruces a de axones a través de la línea media (asteriscos). A, embrión *fra* -/-. B-D, ejemplos de embriones *fra* -/- ; *Syx1A* +/+. E, embrión *fra* -/-. F-H, ejemplos de embriones *fra* +/+ ; *Syx1A* -/-. I, Cuantificación de los fenotipos presentes en mutantes *robo2* -/-, *Syx1A* -/- y *robo2* -/- ; *Syx1A* -/-. Cantidades de embriones: *fra* -/- n= 37, *fra* -/- ; *Syx1A* +/ n= 8, *Syx1A* -/- n= 31, *fra* +/+ ; *Syx1A* -/- n=15. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre la media entre los grupos control (*fra* -/- y *Syx1A* -/-) y los otros grupos.

6.2.- Los embriones mutantes para las proteínas SNARE nSyb o Syx1A desarrollan cruces de axones positivos para FasciclinaII a través de la línea media.

Al margen de la ruta Netrina/DCC, la otra ruta clave en los procesos de guía axonal es la ruta Slit/Robo. Slit/Robo está descrita como una vía de función repulsiva a corta y a larga distancia (Araújo et al., 2003) (Simpson et al., 2000a, 2000b), teniendo un papel clave en la guía axonal de todos los modelos de la neurobiología básica, incluidos vertebrados. Y en *Drosophila melanogaster* controla, junto con los otros elementos repulsivos y atractivos de guía axonal en la línea media, el cruce de axones a través de la línea media durante el desarrollo embrionario.

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con la ruta Netrina/DCC (homóloga de la ruta Netrina/Frazzled en *Drosophila melanogaster*), que ha sido relacionada con las proteínas SNARE por su dependencia de Stx1 para ejercer su función en la guía axonal (Cotrufo et al., 2011), no existe ninguna relación documentada entre las proteínas SNARE y la ruta Slit/Robo. Utilizando el desarrollo del sistema nervioso en embriones de *Drosophila melanogaster* decidimos estudiar una posible relación entre *Syx1A* y la ruta Slit/Robo.

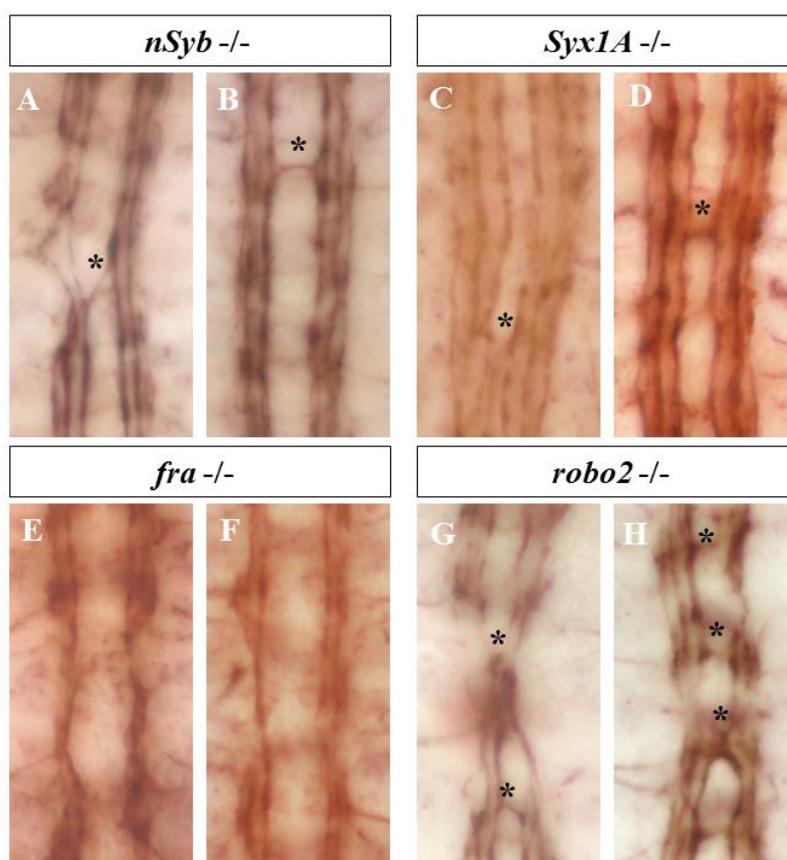


Figura 48. Ejemplos de fenotipos de cruce a través de la línea media. VNC de embriones a estadios 16-17 teñido con anti-FasciclinaII. Los cruces de axones a través de la línea media han sido señalados con asteriscos. A-B, mutantes para *nSyb -/-*. C-D, mutantes *Syx1A -/-*. E-F, embriones mutantes *fra -/-*. G-H, mutantes *robo2 -/-*.

Como ya fue mencionado en apartados anteriores (figura 35-37), los embriones *Syx1A -/-* o *nSyb -/-* presentan en una baja proporción (13% y 5% respectivamente) cruces de axones positivos para FasciclinaII a través de la línea media. Este tipo de defecto está descrito en situaciones donde la vía Slit/Robo se encuentra afectada, aunque los embriones mutantes para esta vía presentan unos valores muy superiores de cruces de axones (por ejemplo, mutantes para *robo2* desarrolla estos problemas en un 79% de los casos). Por el contrario, los mutantes para la vía de Frazzled no presentan nunca este tipo de defectos (por ejemplo, mutantes para *fra* no desarrollan este tipo de defectos).

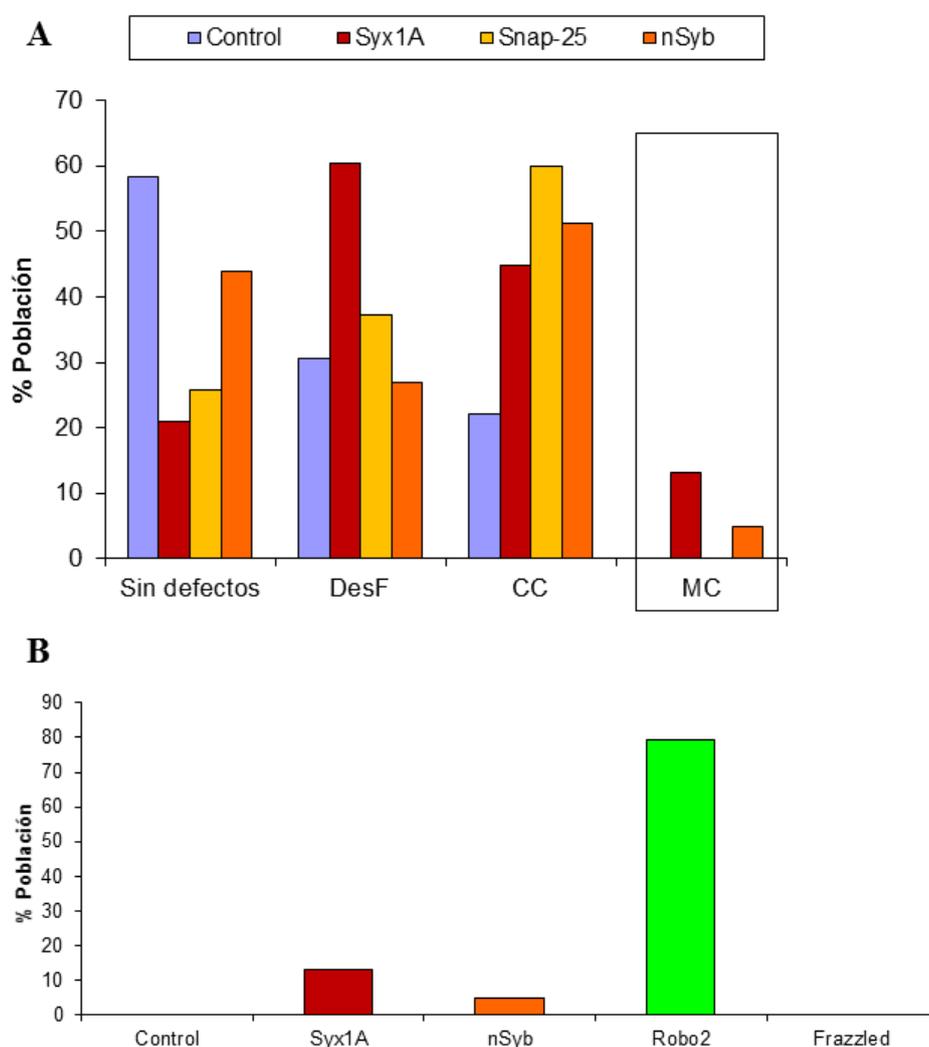


Figura 49. Cuantificación de los cruces a través de la línea media en mutantes para las proteínas SNARE. A, distribución poblacional del tipo de defectos desarrollados en los mutantes para proteínas SNARE en el VNC de embriones teñidos con anti-FasciclinaII. Control, n= 36. Syx1A, n= 38. Snap25, n= 35. nSyb, n= 41. B, cuantificación del porcentaje de embriones que presentan uno o más cruces de axones positivos para FasciclinaII a través de la línea media. En la figura se comparan los valores obtenidos en embriones control (yw), mutantes para las proteínas SNARE: nSyb y Syx1A, y un mutante de la vía Slit/Robo (*robo2*) o un mutante de la vía Netrina/Frazzled (*Frazzled*). Control, n= 36, nSyb, n= 41, Syx1A, n= 38, Robo2 n=39, y Frazzled n=37.

6.3.- El posicionamiento de las fascículas medial e intermedia se encuentra alterado en mutantes de *Syx1A*.

En la literatura está descrito que cuando se disminuye la eficiencia de la vía de Slit/Robo baja el efecto repulsivo generado por Slit en la línea media. Este hecho genera los cruces de axones descritos anteriormente (punto **5.1**) (Simpson et al., 2000a, 2000b). Normalmente, el cruce de axones viene acompañado al menos en algunos segmentos del embrión, por una disminución significativa de la distancia entre las fascículas mediales sin que se llegue a dar necesariamente un colapso entre las fascículas. Asimismo, ha sido descrito un efecto opuesto cuando se altera las señales atractivas generadas por la vía Netrina/Frazzled en la línea media (Bhat et al., 2005).

Decidimos analizar la posición de las tres fascículas que expresan FasciclinII en embriones *Syx1A* *-/-* y usamos mutantes para las vías de Netrina/Frazzled o Slit/Robo como controles junto con la línea control *yw*.

Obtuvimos como resultado que en los mutantes *Syx1A* *-/-* se produce un acortamiento de la distancia que separa las fascículas mediales o las intermedias, mientras que la distancia entre las fascículas laterales es igual que en los controles (*yw*) (figura 50E). La conservación de la distancia entre las fascículas laterales corrobora que la disminución de la distancia en las fascículas mediales e internas no se debe a una disminución del tamaño del embrión o del cordón nervioso ventral, sino a un efecto específico que afecta significativamente al posicionamiento de las fascículas mediales e internas.

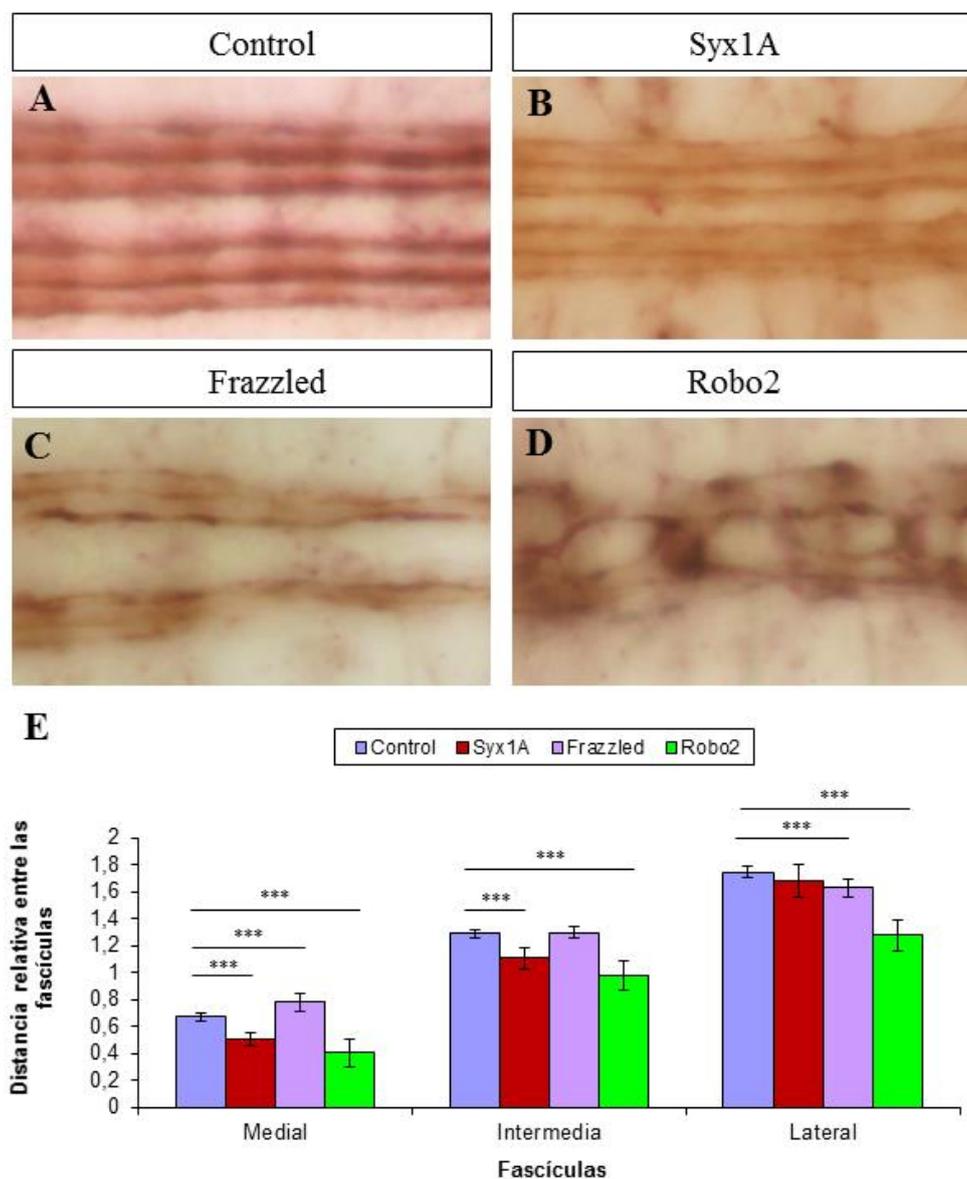


Figura 50. Distancia entre las fascículas positivas para FasciclinII. A-D, VNC de embriones a estadio 17 teñidos con anti-FasciclinII. B, control, C, mutante para Syx1A con un fenotipo leve donde pese a la falta de defectos importantes en la guía axonal se puede observar claramente una alteración en el posicionamiento de las fascículas. D, embrión mutante para Frazzled. E, embrión mutante para Robo2 donde se observan múltiples colapsos y alteraciones en las posiciones entre las fascículas. E, cuantificación de la distancia relativa entre fascículas de igual grupo (medial, intermedia o lateral) en embriones mutantes para Syx1A o rutas de guía axonal a estadios tardíos del desarrollo embrionario. Control n= 20, Syx1A n= 20, Frazzled n=37 y Robo2 n=20. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre las medias de los grupos.

6.4.- En los embriones mutantes para la proteína SNARE Syx1A que tengan problemas adicionales en la vía Slit/Robo se incrementan los fenómenos de cruce a través de la línea media.

6.4.1- Estudio del doble mutante *robo2* *-/-*; *Syx1A* *-/-*.

Robo2 es una proteína directamente implicada en la vía de Slit/Robo pero a diferencia de otras proteínas como el receptor Robo o el ligando Slit, los defectos en *robo2* no generan un colapso total de las fascículas en la línea media. Este colapso parcial nos permite detectar si se produce un incremento en los fenotipos de colapso como producto de una interacción génica.

En nuestro caso, la eliminación de una o ambas copias de *robo2* en mutantes *Syx1A* *-/-* generó un incremento cualitativo en los fenotipos de cruce en embriones *robo2* *-/-* ; *Syx1A*/*+* o embriones *robo2* *-/-*; *Syx1A* *-/-*. Este incremento fue estadísticamente significativo en el número de defectos en la fascícula intermedia y en el número total por embrión en los dobles mutantes *robo2* *-/-* ; *Syx1A* *-/-*.

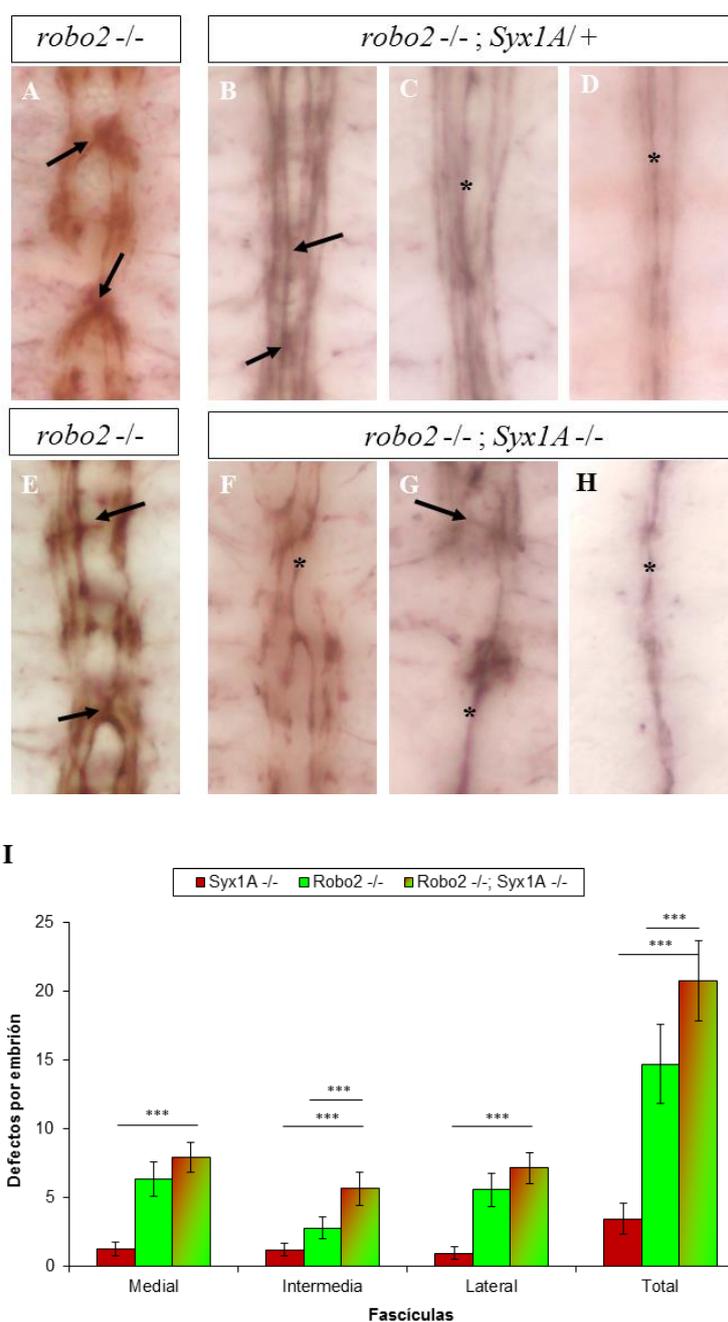


Figura 51. Disminución de los niveles de *Syx1A* en mutantes *robo2* -/-. VNC de embriones a estadio 17 teñidos con anti-FasciclinII. A, E, embriones *robo2* -/- donde se aprecian múltiples defectos y colapsos parciales de las fascículas en la línea media (flechas). B-D, ejemplos de fenotipos de severidad variable en mutantes *robo2* -/- ; *Syx1A* +/. Se ven varios defectos en las fascículas y colapsos parciales (flechas) o totales (asteriscos) de las fascículas en la línea media. F-H, embriones *robo2* -/- ; *Syx1A* -/- donde se aprecia una notable desestructuración de las fascículas así como colapsos parciales (flechas) o totales (asteriscos) de las fascículas en la línea media. I, Cuantificación de los fenotipos presentes en mutantes *robo2* -/-, *Syx1A* -/- y *robo2* -/- ; *Syx1A* -/-. Cantidades de embriones: *robo2* -/- n= 39, *robo2* -/- ; *Syx1A* +/ n= 21, *robo2* -/- ; *Syx1A* -/ n= 31. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre la media de *robo2* -/- ; *Syx1A* -/ y los otros grupos.

Asimismo realizamos la estrategia inversa y disminuimos las cantidades de *robo2* en un contexto de nullos genéticos para *Syx1A*. Aunque no fuimos capaces de detectar cuantitativamente diferencias significativas entre los valores medios del número de defectos, sí que detectamos un incremento en la severidad y la frecuencia de aparición de cruces en la línea media. Un 50% de los casos *robo2/+; Syx1A -/-* presentaron cruces y colapsos a en la línea media frente el 13% en casos de *Syx1A -/-*.

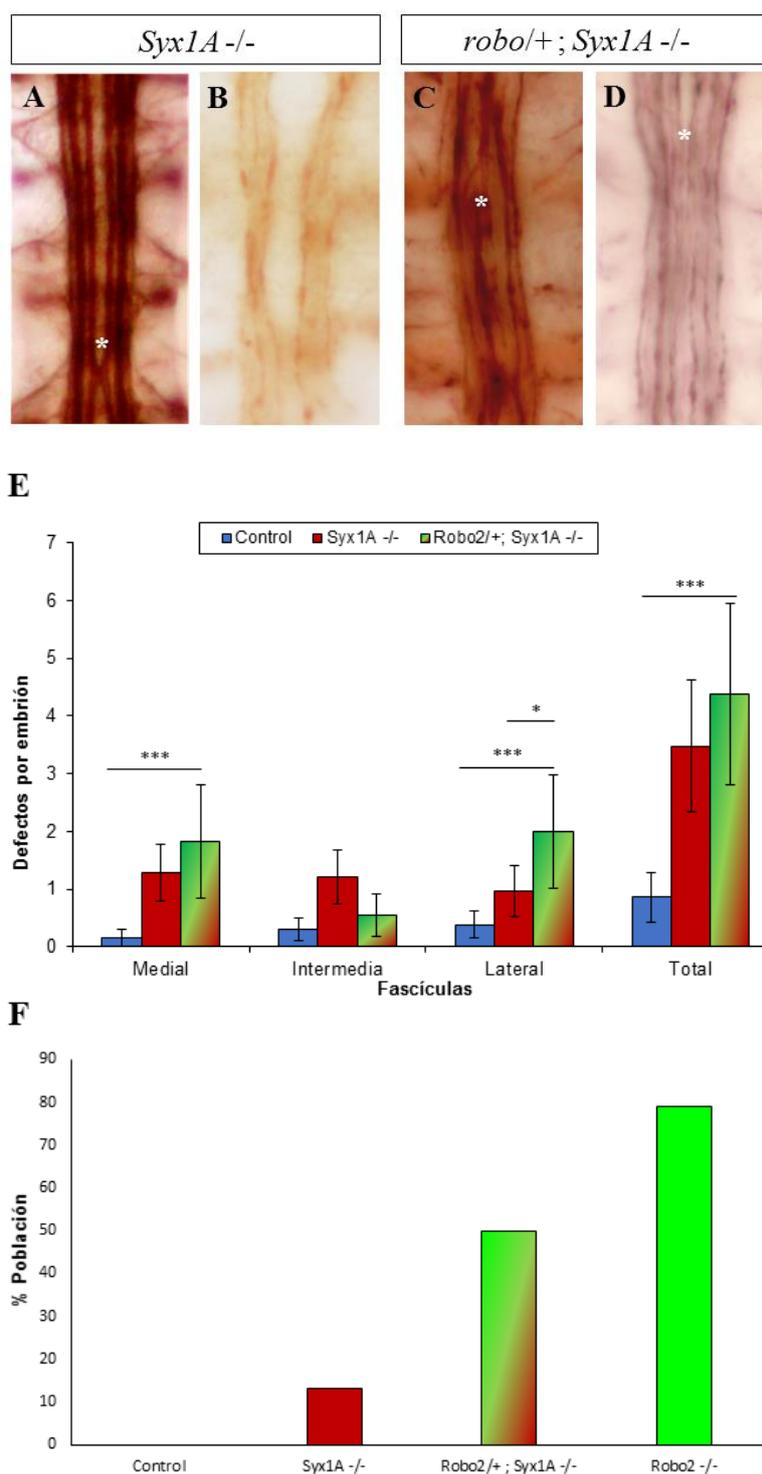


Figura 52. Disminución de los niveles de *robo2* en mutantes *Syx1A* ^{-/-}. VNC de embriones a estadio 17 teñidos con anti-FasciclinII. A-B, embriones *Syx1A* ^{-/-}. C-D, embriones *robo2*/⁺; *Syx1A* ^{-/-}. E, valores medios de defectos en las fascículas. F, frecuencia de cruces a través de la línea media en varias situaciones. *robo2* ^{-/-} n= 39, *robo2*/⁺; *Syx1A* ^{-/-} n= 18, Control (*yw*) n= 36, *Syx1A* ^{-/-} n= 38. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre las medias de *robo2*/⁺; *Syx1A* ^{-/-} y los otros grupos.

6.4.2- Estudio del doble mutante *Sdc*^{-/-}; *Syx1A*^{-/-}.

Los heparán sulfato proteoglicanos (HSPGs) son una familia proteica con múltiples funciones, entre ellas regular parcialmente la función de la vía Slit/Robo (Bernfield et al., 1999) (Couchman et al., 2003) (Smart et al., 2011). De todos los heparán sulfato proteoglicanos, los embriones nulos para Sindecano (*sdc*^{-/-}) son los únicos HSPG que presentan con frecuencia cruces a través de la línea media (Jonson et al., 2004) y su fenotipo tiene ciertas similitudes con el de *Syx1A* (el grado de severidad de los cruces a través de la línea media o la alta incidencia de defectos en la fascícula lateral son similares). Con esta información planteamos como hipótesis la posibilidad de que las mutaciones en *Syx1A* u otras SNARE alteren la función de los HSPGs, lo cual generaría fenotipos de pérdida de función en la vía de Slit/Robo y podría ser una de las causas de los fenotipos en embriones mutantes para proteínas SNARE.

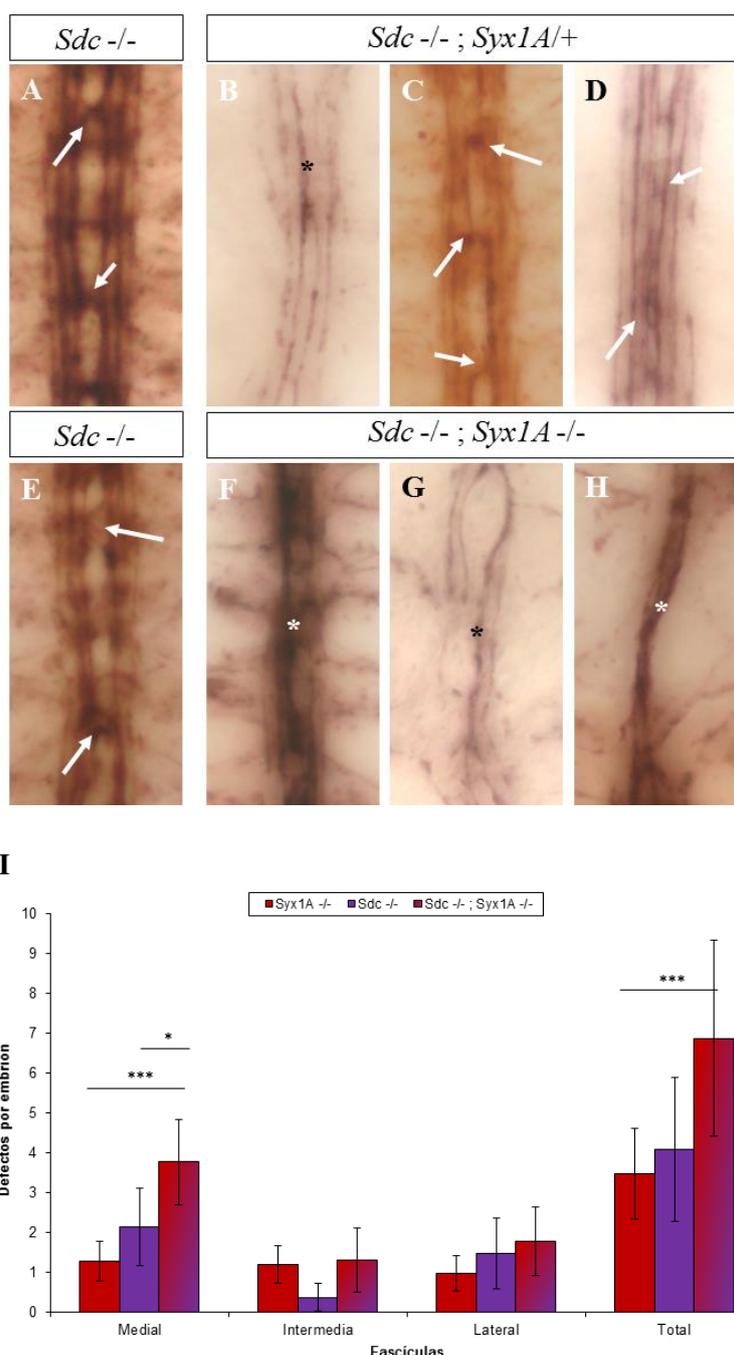


Figura 53. Disminución de los niveles de *Syx1A* en mutantes *Sdc*^{-/-}. VNC de embriones a estadio 17 teñidos con anti-FasciclinII. A, E, embriones *Sdc*^{-/-} donde se aprecian defectos en las fascículas y algunos colapsos parciales a través de la línea media (flechas). B-D, ejemplos de fenotipos de severidad variable en mutantes *Sdc*^{-/-}; *Syx1A*^{+/+}. Se aprecian varios defectos en las fascículas y colapsos parciales (flechas) o totales (asteriscos) de las fascículas en la línea media. F-H, embriones *Sdc*^{-/-}; *Syx1A*^{-/-} donde se aprecia una notable desestructuración de las fascículas así como colapsos parciales (flechas) o totales (asteriscos) de las fascículas en la línea media. I, cuantificación de los fenotipos presentes en mutantes *Sdc*^{-/-}, *Syx1A*^{-/-} y *Sdc*^{-/-}; *Syx1A*^{-/-}. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre la media de *Sdc*^{-/-}; *Syx1A*^{-/-} y los otros grupos. . *Sdc*^{-/-} n= 21, *Sdc*^{-/-}; *Syx1A*^{-/-} n= 32.

En mutantes *Sdc*^{-/-}; *Syx1A*^{/+} apreciamos un incremento de la severidad en los cruces de *Sdc*^{-/-} a través de la línea media, que resultaron en algunos casos en un colapso total de algunas de las fascículas. Sin embargo no observamos un agravamiento claro de otros defectos ya presentes en mutantes *Sdc*^{-/-}. En los dobles mutantes *Sdc*^{-/-}; *Syx1A*^{-/-} esta situación se acenta dando fenotipos con las fascículas muy desestructuradas y completa o parcialmente colapsadas en la línea media.

Simultáneamente realizamos la estrategia inversa y disminuimos las cantidades de *Sdc* en un contexto de nullos genéticos para *Syx1A*. Aunque no fuimos capaces de realizar estudios cuantitativos detallados, cualitativamente observamos un agravamiento de los fenómenos de cruce, tanto en su número como en severidad si los comparamos a los procesos registrados en mutantes *Sdc*^{-/-} o *Syx1A*^{-/-}.

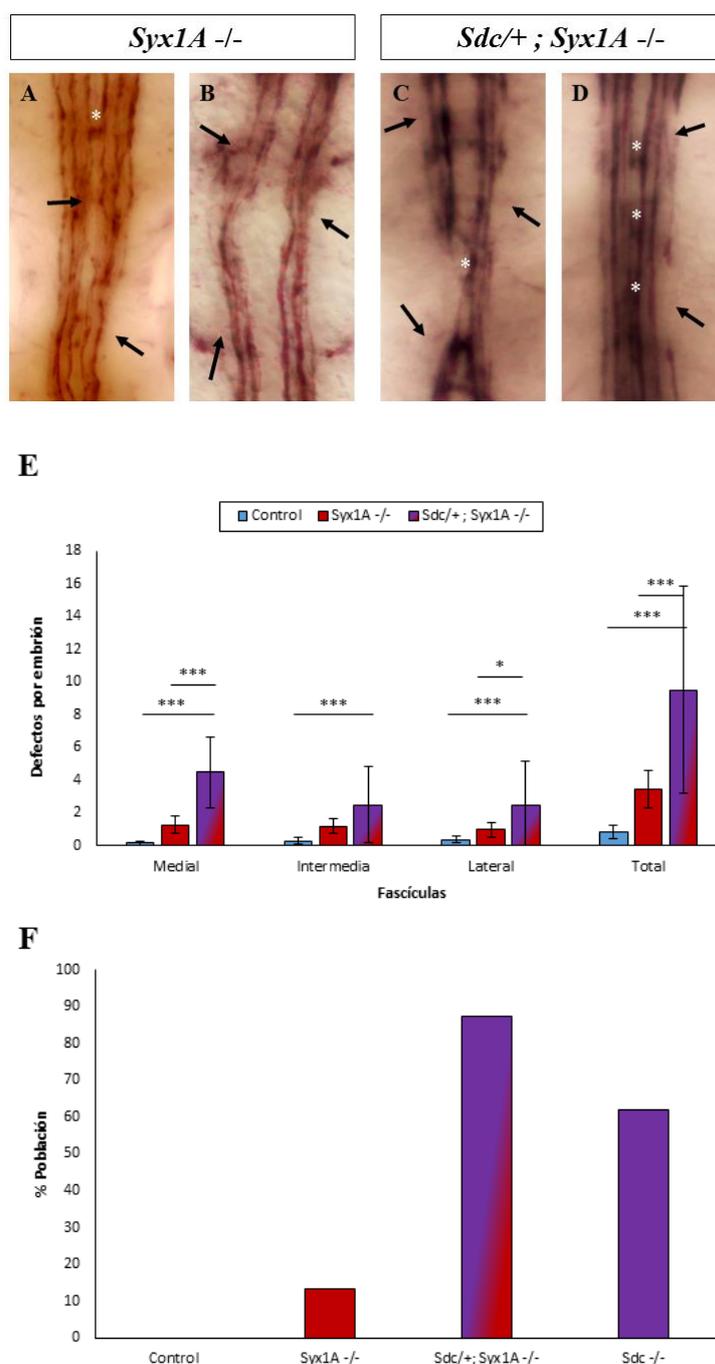


Figura 54. Disminución de los niveles de *Sdc* en mutantes *Syx1A* *-/-*. VNC de embriones a estadio 17 teñidos con anti-FasciclinII. . A-B, embriones *Syx1A* *-/-* donde se pueden observar algunos colapsos y rupturas de las fascículas (flechas negras), así como cruces de axones a través de la línea media (asterisco blanco). C-D, embriones *Sdc* *-/+*; *Syx1A* *-/-* donde se ven colapsos y rupturas de las fascículas (flechas negras), y cruces de axones a través de la línea media (asteriscos blancos). E, cuantificación de los fenotipos presentes en mutantes *Syx1A* *-/-*, *Sdc* *+/-*; *Syx1A* *-/-* y embriones *yw*. Se utilizó el t-TEST para analizar las diferencias estadísticas entre la media de *Sdc* *+/-*; *Syx1A* *-/-* y los otros grupos. F, frecuencia de cruces a través de la línea media en varias situaciones. Control (*yw*) n= 36, *Syx1A* *-/-* n= 38 *Sdc* *-/-* n= 21, *Sdc* *+/-*; *Syx1A* *-/-* n= 8.

7.- En embriones mutantes para la proteína SNARE Syx1A no se observa una alteración en niveles de expresión y localización de varias proteínas vinculadas con la vía Slit/Robo.

Tras los resultados obtenidos en las interacciones génicas decidimos abordar directamente la posibilidad que la vía Slit/Robo se encuentra relacionada con Syx1A y que las mutaciones sobre *Syx1A* deben tener algún efecto en la vía. Como primera aproximación a este estudio decidimos, evaluar dentro de nuestras posibilidades el estado de las principales proteínas de la vía en mutantes *Syx1A* *-/-*.

7.1.- En embriones mutantes para la proteína SNARE Syx1A no se aprecian variaciones en la expresión o la distribución de *Slit*.

Una cuantificación detallada de los niveles de Slit detectados mediante inmunofluorescencia con microscopía confocal a alta resolución (Johnson et al., 2004) (Smart et al., 2010) no detectó cambios en los niveles o en la distribución de la proteína (figura 55).

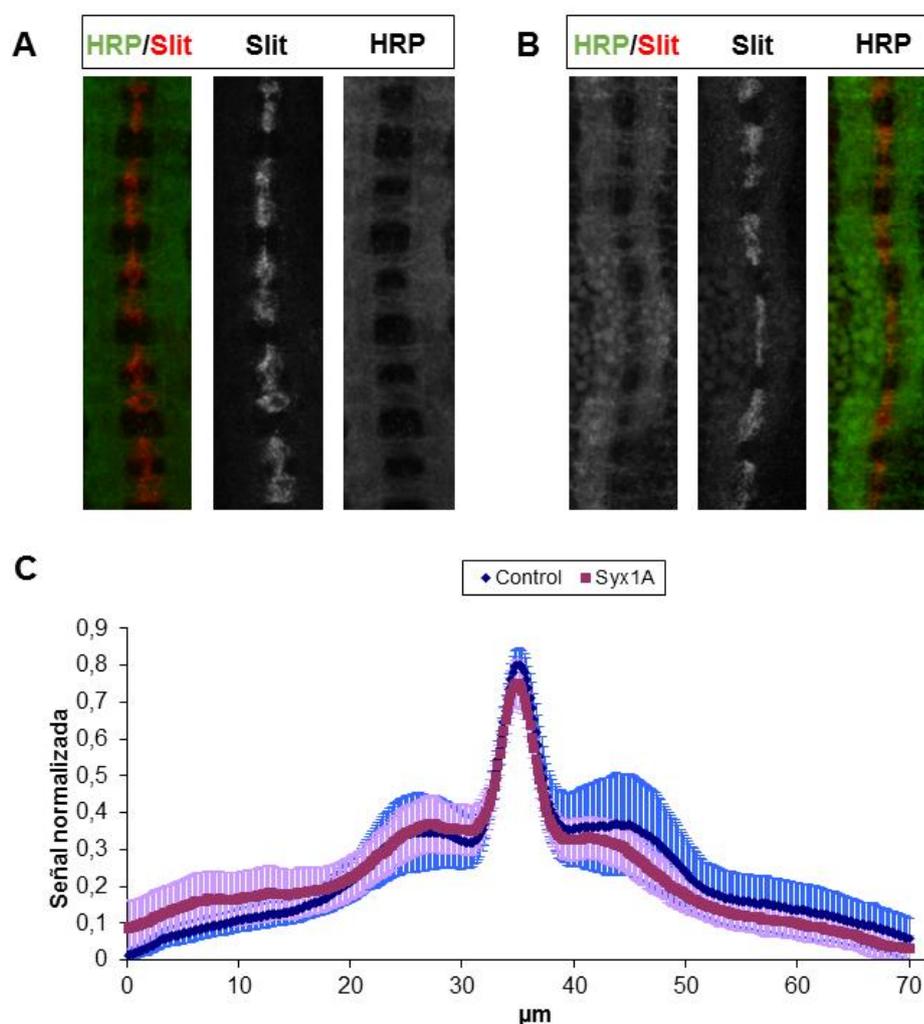


Figura 55. Patrón de expresión de Slit. A-B, embriones a estadio 16-17 teñidos con anti-HRP (verde) y anti-Slit (rojo). A, embriones control (*yw*). B, embriones *Syx1A*^{-/-}. C, cuantificación normalizada de los niveles de expresión de Slit en el cordón nervioso ventral. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre las medias intensidades de los grupos Control n=9, *Syx1A* n=11.

Como el análisis del patrón de difusión de *Slit* presenta tradicionalmente bastante dificultad, decidimos descartar pequeñas alteraciones en la expresión y difusión de Slit que podrían estar por debajo de nuestro umbral de detección y generar, sin embargo, problemas de guía axonal. Para descartar esta situación sobrepresamos *Slit* en mutantes *Syx1A*^{-/-} para rescatar el fenotipo. En los embriones donde realizamos el

rescate, sobre expresamos Slit en las células gliales *single minded* (sim) (Crews et al., 1988) (Thomas et al., 1988) donde originalmente es y difunde generando un gradiente en ambos lados del SNC (Kidd et al., 1999) (Johnson et al., 2004). Dirigimos la expresión de Slit utilizando SimGal4 UAS-Slit en embriones *Syx1A* *-/-*. Los embriones donde se intentó realizar el rescate fueron designados R40 (SimGAL4; *Syx1A/Syx1A_UAS-Slit*).

No observamos rescate a ningún nivel, los valores medios de los defectos en las fascículas no presentaron cambios estadísticamente significativos y otros factores relevantes como el porcentaje de embriones sin defectos: *Syx1A* (21%), R40 (25%), o el porcentaje que desarrollaron cruces a través de la línea media: *Syx1A* (13%), R40 (19%), tampoco tuvieron diferencias estadísticamente significativas.

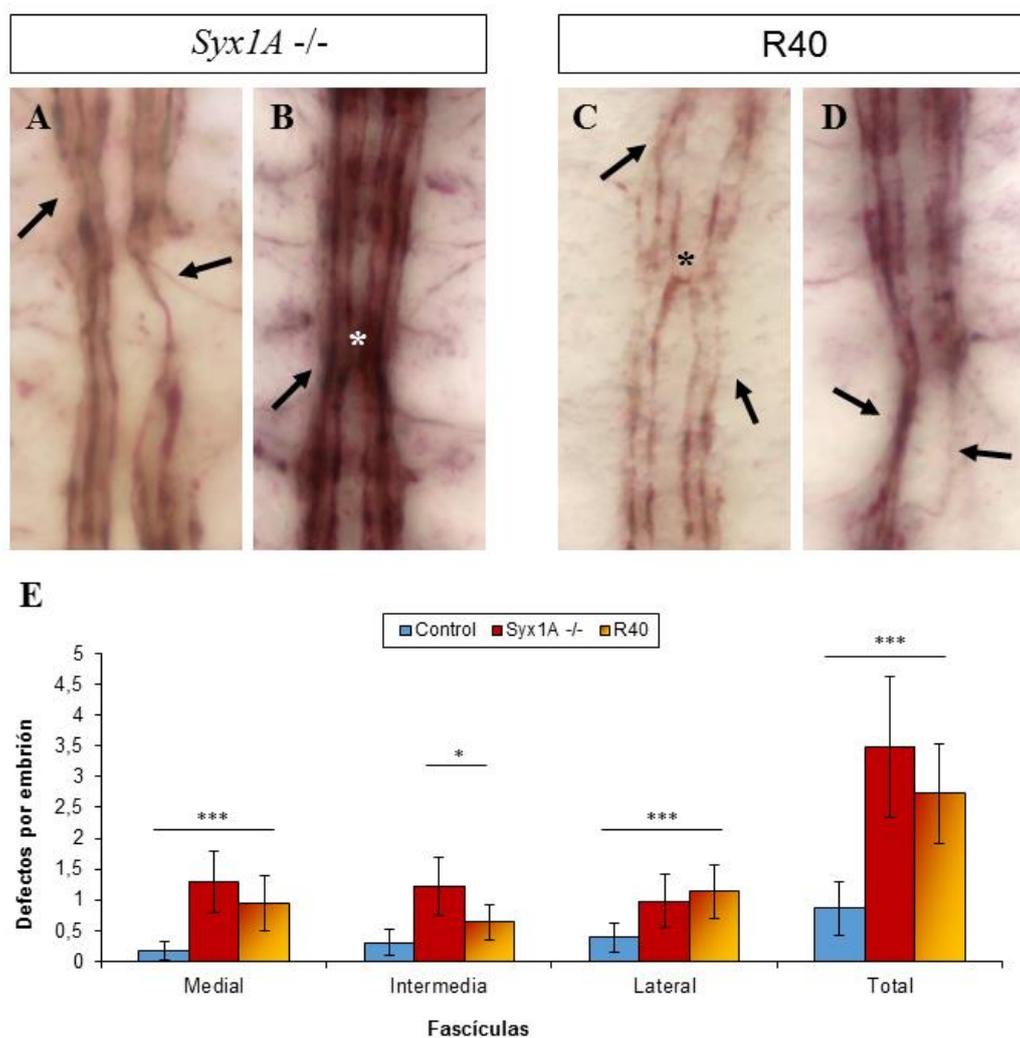


Figura 56. Sobreexpresión de Slit en mutantes *Syx1A* ^{-/-}. VNC de embriones a estadio 17 teñidos con anti-FasciclinaII. A-B, embriones *Syx1A* ^{-/-} donde se pueden observar rupturas y colapsos de la línea media (flechas), así como cruces a través de la línea media (asteriscos). C-D, embriones R40 donde aparecen rupturas y colapsos de la línea media (flechas), así como cruces a través de la línea media (asteriscos). E, cuantificación de los defectos en la guía axonal por embrión distribuidos por fascícula. Control n=36, *Syx1A* ^{-/-}, n= 38, R40 n=36. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre R40 y los demás grupos.

Utilizando una metodología similar a la usada con Slit para estudiar sus niveles proteicos mediante inmunofluorescencia, determinamos el patrón de expresión de los receptores Robo y Robo3, así como del correceptor *Dally-like*. Al ser proteínas transmembrana no-difusibles fue posible caracterizar con mayor precisión el patrón de

expresión y cuantificar sus niveles en el control y los mutantes. Sin embargo, descartamos en esta primera fase experimental los ensayos de sobreexpresión con estas proteínas por las dificultades añadidas que tienen los experimentos de rescate a través de la sobreexpresión de receptores.

7.2.- En embriones mutantes para la proteína SNARE Syx1A no se observan variaciones en la expresión o la distribución de *robo* en mutantes de *Syx1A*.

El análisis en detalle de la expresión del receptor *robo* no detectó diferencias significativas en los niveles de intensidad. Sin embargo, en la representación gráfica observamos una distancia menor entre los máximos en Syx1A. Esto corrobora el acercamiento entre las fascículas cuantificado anteriormente (figura 50E). Además detectamos una acumulación de Robo en la línea media, lo cual se corresponde con un incremento del número de axones cruzando la línea media tal y como hemos documentado anteriormente (figura 35-37).

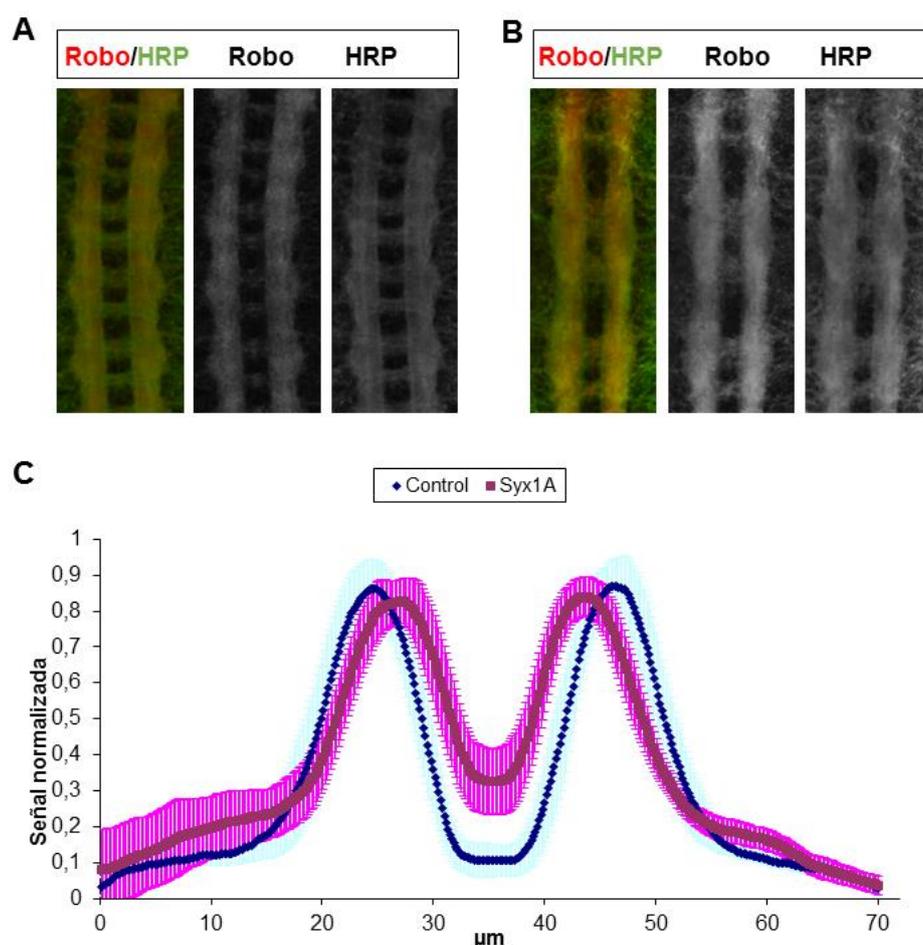


Figura 57. Patrón de expresión de Robo. A-B, embriones a estadio 16-17 teñidos con anti-HRP (verde) y anti-Robo (rojo). A, embriones control. B, embriones *Syx1A*^{-/-}. C, cuantificación normalizada de los niveles de expresión de Robo en el cordón nervioso ventral. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre las medias de intensidad de los grupos. Control n=10, *Syx1A*^{-/-}=11.

7.3.- En embriones mutantes para la proteína SNARE Syx1A no se observan variaciones en la expresión o la distribución de *robo3* en mutantes de *Syx1A*.

El análisis en detalle de la expresión del receptor *robo3* no detectó diferencias significativas en los niveles de intensidad. Sin embargo, en la representación gráfica observamos una distancia menor entre los máximos en Syx1A y una acumulación Robo3 en la línea media. En este caso, tanto la disminución de la distancia como el incremento de señal son menores que los observados en la cuantificación de Robo. Esto

es debido a que los niveles de Robo3 son residuales en los axones que cruzan la línea media y su expresión está concentrada en las fascículas más externas, donde hemos detectado una pequeña disminución entre las fascículas.

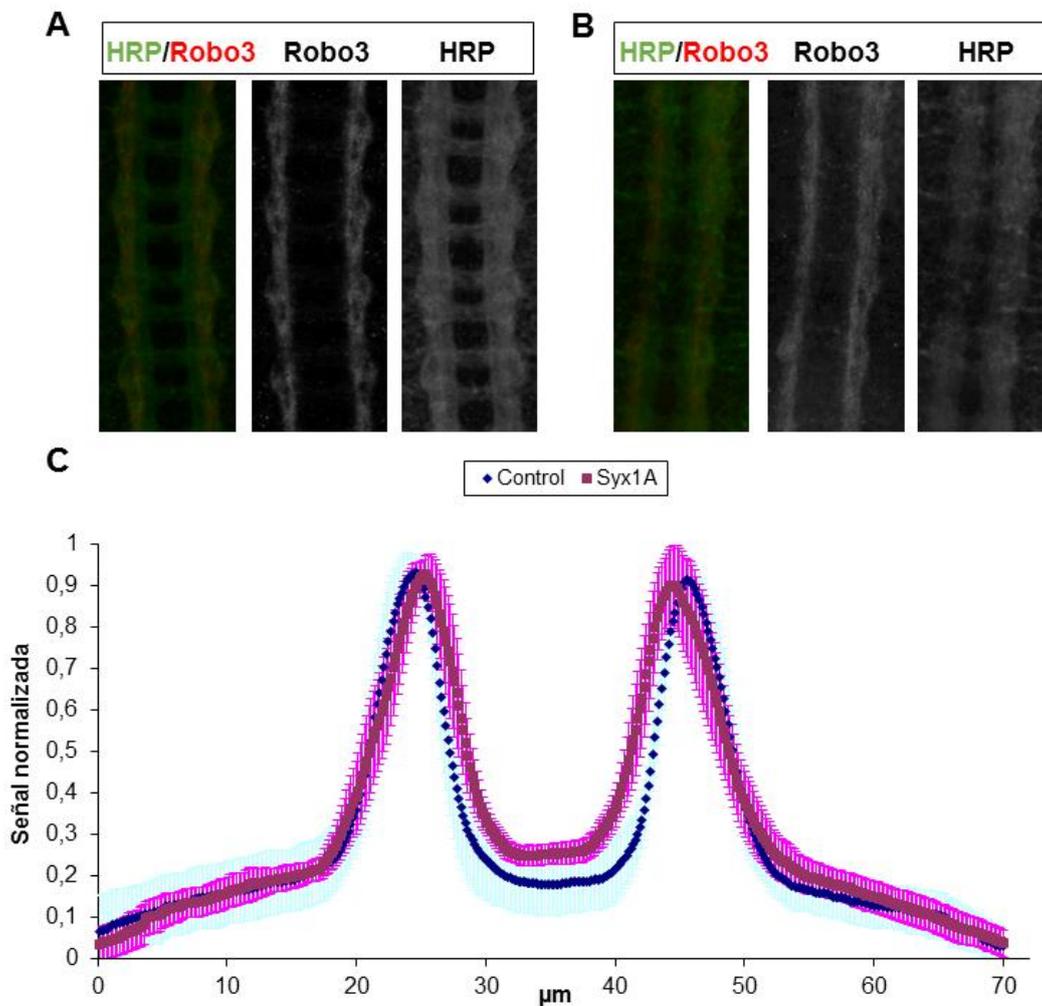


Figura 58. Patrón de expresión de Robo3. A-B, embriones a estadio 16-17 teñidos con anti-HRP (verde) y anti-Robo (rojo). A, embriones control. B, embriones *Syx1A*^{-/-}. C, cuantificación normalizada de los niveles de expresión de Robo en el cordón nervioso ventral. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre las medias de intensidad de los grupos. Control n=8, *Syx1A*^{-/-} n=9.

7.4.- En embriones mutantes para la proteína SNARE Syx1A no se observan variaciones en la expresión o la distribución de *Dally-like* (*dlp*).

Dally-like es un heparán sulfato proteoglicano que afecta indirectamente a la vía de Slit/Robo de un modo similar al realizado por Sdc. El análisis en detalle de la expresión del receptor *Dally-like* no detectó diferencias significativas en los niveles de intensidad. Sin embargo, tal y como había ocurrido en las cuantificaciones de los receptores Robo, en la representación gráfica observamos una reducción en la distancia entre las fascículas.

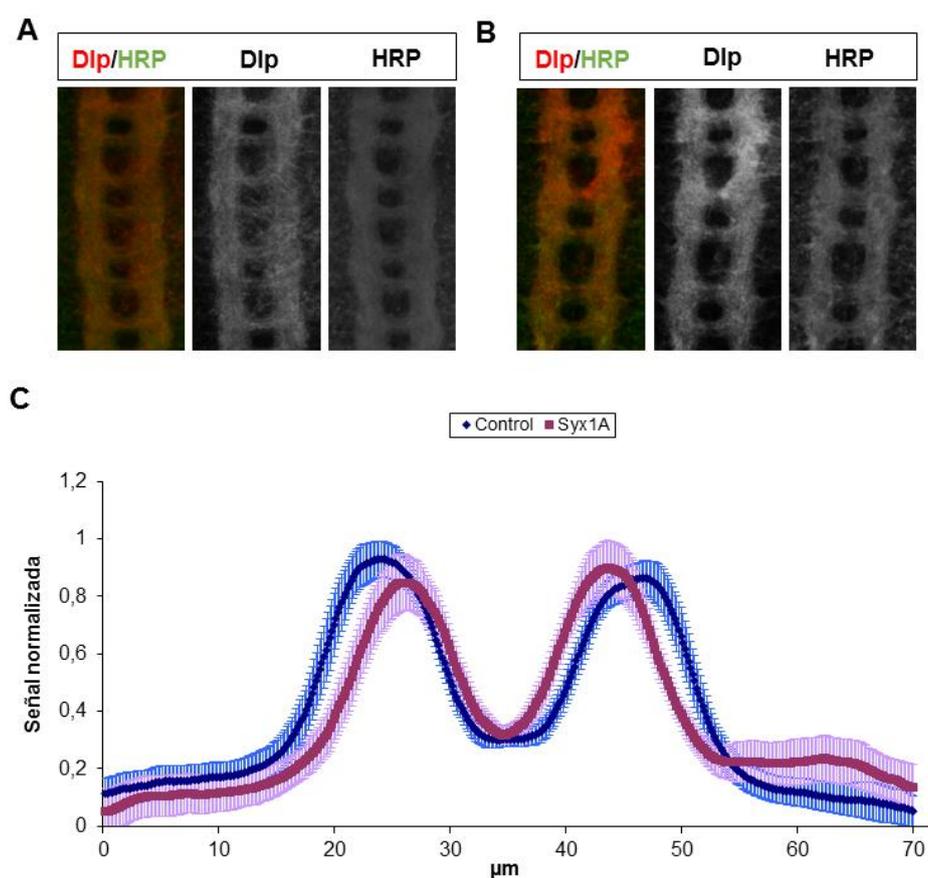


Figura 59. Patrón de expresión de *dlp*. A-B, embriones a estadio 16-17 teñidos con anti-HRP (verde) y anti-Dlp (rojo). A, embriones control. B, embriones *Syx1A*^{-/-}. C, cuantificación normalizada de los niveles de expresión de Robo en el cordón nervioso ventral. Se utilizó el t-TEST (Excel) para analizar las diferencias estadísticas entre las medias de intensidad de los grupos. Control n=12, *Syx1A*^{-/-} n=8.

Parte II: las proteínas SNARE en la progresión tumoral

El segundo objetivo de esta tesis es determinar si las proteínas SNARE tienen algún papel en la progresión tumoral, centrando nuestro estudio en las SNARE expresadas en el sistema nervioso (concretamente Stx1, proteína con la cual nuestro laboratorio tenía experiencia previa por lo que disponíamos del material adecuado para iniciar nuestro trabajo). Y escogimos como modelo tumoral el glioblastoma, que es el caso más común y letal de astrocitoma.

1.- El bloqueo de la función de Stx1 produce *in vitro* una disminución de la proliferación e invasividad de células de glioblastoma.

1.1.- Expresión de proteínas SNARE en líneas establecidas modelo del glioblastoma.

Previamente en el laboratorio, se analizaron mediante *Western blot* varias proteínas SNARE relacionadas con el tráfico de membrana en líneas establecidas de glioblastoma. El análisis de estos resultados indicó que las líneas U87 y U373 eran modelos adecuados para estudiar la relación entre las proteínas SNARE y el glioblastoma:

- A) La línea U87. Estas células han sido utilizadas con anterioridad como modelo *in vitro* de glioblastoma y expresan con normalidad las proteínas SNARE, incluidas las dos isoformas de Syntaxina1, así como proteínas reguladoras de la función SNARE como Munc18 (figura 60).
- B) La línea U373. Al igual que la anterior, esta línea se ha utilizado en otros trabajos como modelo en el desarrollo del glioblastoma, pero tiene una ventaja frente a la línea U87. Esta línea tiene un patrón de crecimiento tumoral similar al desarrollado por los pacientes de glioblastoma. La inoculación *in vivo* de células U373 en ratones inmunodeprimidos genera un núcleo tumoral que se expande mediante la formación de radios migratorios que acaban generando núcleos secundarios tumorales. Este patrón de crecimiento es similar al desarrollado en pacientes y diferente del patrón en forma de un núcleo sólido sin expansión radial que se da cuando se inocula células U87 en ratones inmunodeprimidos.

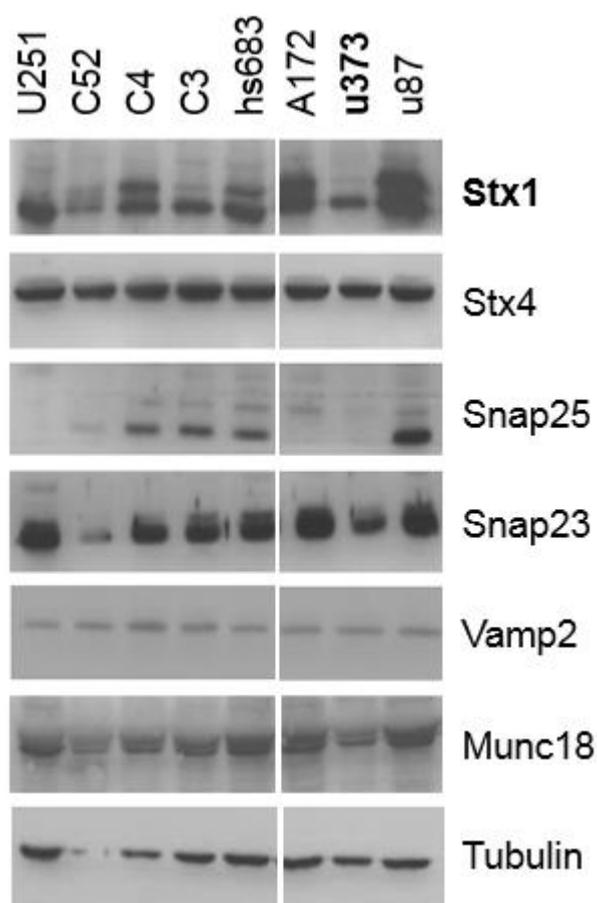


Figura 60. Expresión de proteínas SNARE en poblaciones celulares modelo de glioblastoma. Ejemplo de *Western blot* realizado anteriormente en el laboratorio de Dr. Eduardo Soriano donde se pueden observar los niveles de expresión de varias proteínas SNARE en potenciales líneas modelo del glioblastoma.

Con esta información diseñamos como estrategia en la que bloqueamos específicamente la función de Stx1 sobreexpresando el dominio H3TM de Stx1a, que ha sido descrito una forma dominante negativa (DN) de Stx1 (Cotrufo et al., 2011). Este dominio actuará como DN de todas las isoformas de Stx1 que mantengan el dominio H3TM. En nuestros primeros experimentos utilizamos la expresión transitoria del DN mientras que posteriormente utilizamos líneas estables generadas como se esquematiza en la figura 61.

Generación de las líneas celulares estables

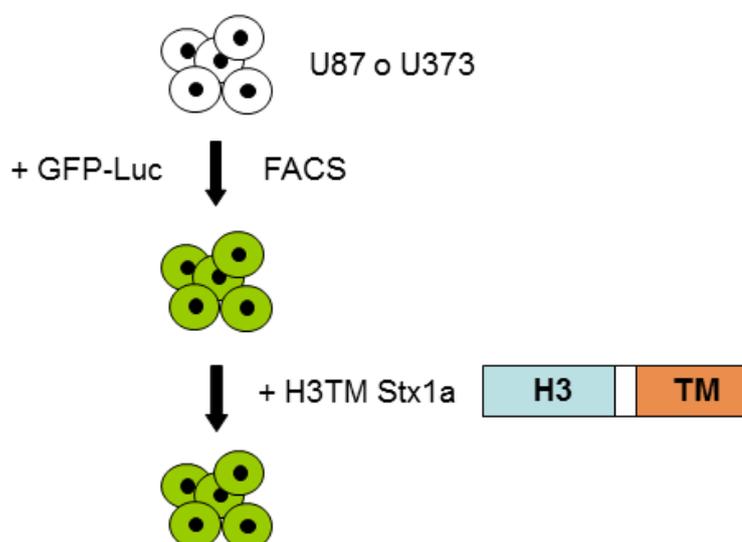


Figura 61. Generación de las líneas celulares estables. En un primer paso las líneas U87 o U373 fueron infectadas con un vector para que expresaran GFP y luciferasa; y seleccionamos las células infectadas por FACS gracias a su expresión de GFP. Luego infectamos las células con un vector con el dominio H3TM de Stx1a (isoforma de Stx1), que ha sido descrito una forma dominante negativa (DN) de Stx1 (Cotrufo et al., 2011) y seleccionamos las células cultivándolas en medios selectivo de antibióticos.

1.2.- El bloqueo de la función de Stx1 a una alta densidad de cultivo celular *in vitro* disminuye la incorporación de BrdU en las líneas de glioblastoma U373 y U87.

Analizamos la capacidad proliferativa de las células con la función de Stx1 alterada mediante la sobreexpresión del dominio SNARE H3TM. Evaluamos la proliferación *in vitro* midiendo la incorporación de BrdU en estas células. El BrdU es un nucleótido sintético análogo a la timidina que se incorpora al DNA durante replicación, lo cual permite determinar las células que se encuentran en proliferación durante la fase S.

En estos experimentos se midió la incorporación de BrdU en las células Control y Stx1-DN de las líneas U87 y U373. Sembramos 50.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos en DMEM 10% FBS. Cinco días después, marcamos las células con BrdU a una concentración final de 0,05 mM, durante 2 horas a 37°C y posteriormente fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Inicialmente transfectamos las líneas U373 y U87 con un vector que permitía la sobreexpresión transitoria de GFP (condición control) o con un vector que permitía la sobreexpresión transitoria del DN fusionado a GFP. Obtuvimos como resultado que la sobreexpresión transitoria del DN induce una reducción del 35,2% ($\pm 4,2\%$) en células U373 mientras que en las células U87 se observa una reducción de la incorporación de BrdU del 70,1% ($\pm 2,9\%$) cuando se sobreexpresa el dominio H3TM.

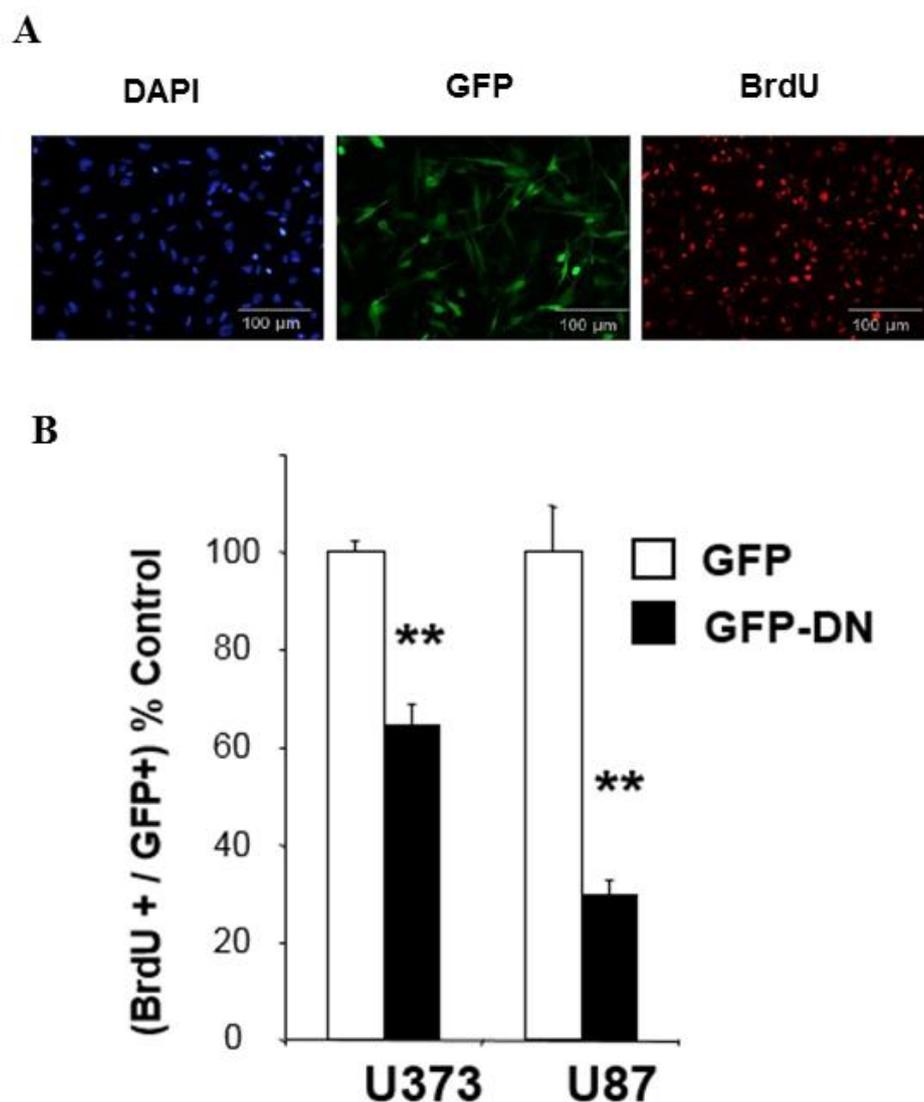


Figura 62. Incorporación de BrdU en células con la función SNARE bloqueada de manera transitoria. A, Ejemplo de imágenes de fluorescencia convencional de células de glioblastoma transfectadas con GFP o el dominio H3TM de Stx1 fusionado a GFP (GFP-DN), el cual actúa como DN de la función de Stx1. En las imágenes pueden verse las células teñidas con DAPI (azul), y anticuerpos que detectan GFP (verde) y BrdU (rojo). B, cuantificación de la incorporación de BrdU en las poblaciones celulares U373 y U87, donde se expresó transitoriamente GFP o el dominio H3TM fusionado a GFP. Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante el t-Test (Excel).

Posteriormente, realizamos los mismos ensayos con poblaciones estables de células U373 que expresaban el dominio H3TM fusionado a GFP y obtuvimos una reducción de la tasa de proliferación: $32,6802\% \pm 2,39\%$, mi similar a los datos obtenidos con la expresión transitoria: $35,2\% \pm 4,2\%$.

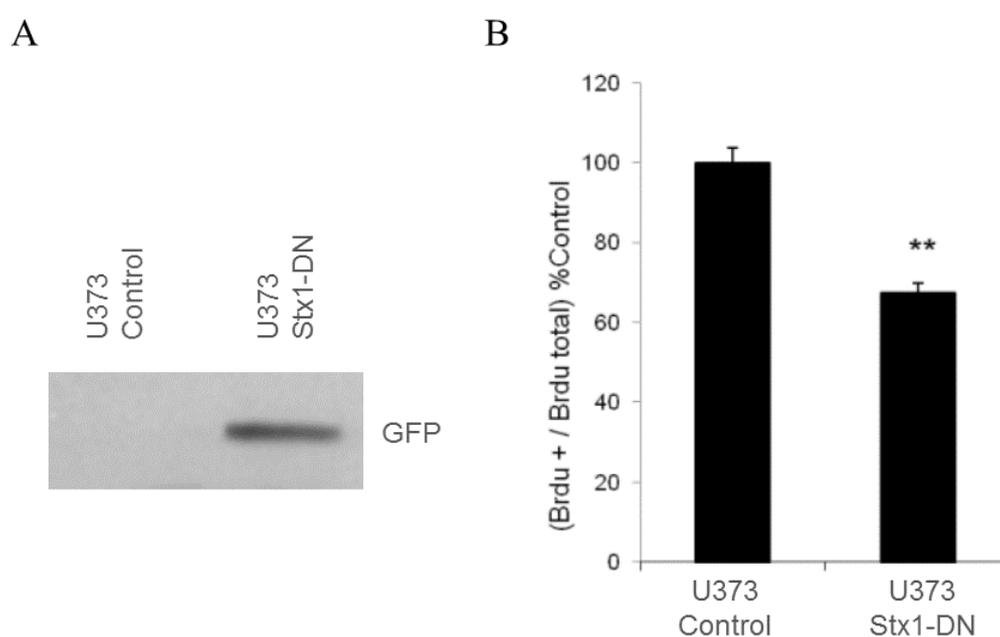


Figura 63. Incorporación de BrdU en células con la función SNARE bloqueada de manera estable.

A, *Western blot* de células U373 donde se confirma la expresión del dominio H3TM fusionado a GFP. B, cuantificación de la incorporación de BrdU en las células U373. Tras cuatro días de cultivo se marcó con BrdU durante 1h30'. La cuantificación de esta tinción indicó una disminución de la proliferación *in vitro* de las líneas U373 Stx1-DN. Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante el t-Test (Excel).

1.3.- La disminución de la proliferación celular *in vitro* al bloquear la función de Stx1 es dependiente de la densidad celular.

Tras los primeros resultados, continuamos nuestro estudio de la proliferación celular utilizando en este caso líneas U373-DN. En este caso sembramos 6000-24000 células en pocillos de 24 y medimos su crecimiento durante 14-18 días hasta que las células se volvían confluentes en los pocillos. Durante todo ese tiempo las líneas crecieron en condiciones estándar (DMEM + 10% FBS, a 37°C y 5% CO₂). Sorprendentemente, no observamos una disminución de crecimiento en las líneas U373 Stx1-DN.

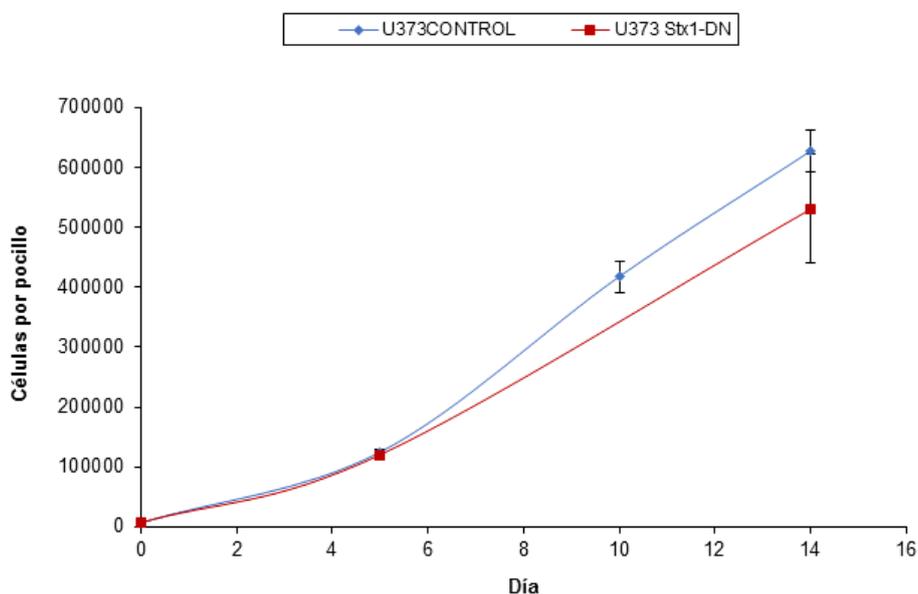


Figura 64. Curvas de crecimiento de las líneas U373 Control y U373 Stx1-DN. Las líneas celulares U373 Control o U373 Stx1-DN fueron cultivadas en condiciones estándar: DMEM + 10% FBS, a 37°C y 5% CO₂ y se mantuvieron en cultivo hasta llegar ser confluentes. Las células fueron contadas manualmente en cada punto utilizando una cámara de Neubauer. Las posibles diferencias estadísticas entre los grupos fueron evaluadas utilizando el t-Test (Excel).

Tras estos resultados decidimos, volver sobre los datos obtenidos sobre la proliferación de las líneas U373 Stx1-DN. Comparando los experimentos de incorporación de BrdU con las curvas de crecimiento determinamos que una de las mayores diferencias entre ambos experimentos es la densidad de cultivo en la que proliferan las células: en las curvas de crecimiento las células son sembradas a bajas densidades y cuantificadas periódicamente su cantidad hasta que llegan a ser confluentes, mientras que en los experimentos de incorporación de BrdU las células eran sembradas a una alta densidad y son marcadas tras cuatro días de cultivo.

En estas circunstancias decidimos evaluar si la disminución de la proliferación cuando se bloquea la función SNARE de Stx1 es dependiente de la densidad celular. Para ello cuantificamos la incorporación de BrdU sembrando las células en placas de 24 pocillos a distintas densidades (baja=10000 células/pocillo, media=30000, alta=75000 y muy alta=150000 células/pocillo) y tras 24 horas se marcó con BrdU durante 1h30'. Como resultado obtuvimos que existe una diferencia, creciente con la densidad, en la incorporación de BrdU entre las células control y las U373 Stx1-DN, y esta diferencia se vuelve significativa a muy altas densidades.

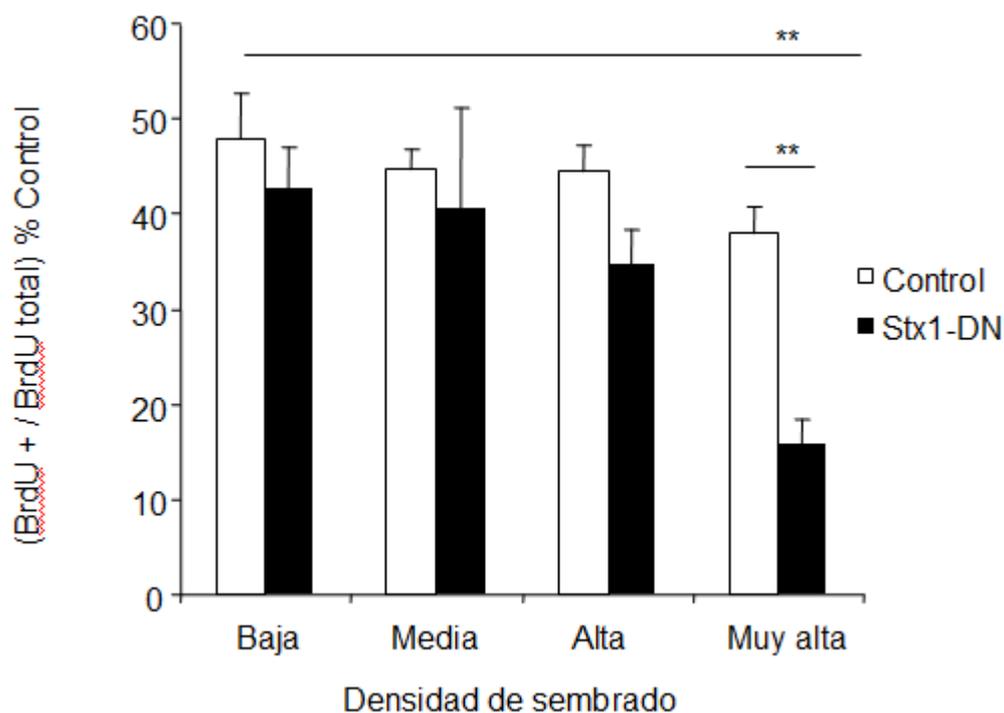


Figura 65. Incorporación de BrdU en función de la densidad celular. Las células U373 Control y U373 Stx1-DN fueron sembradas a distintas densidades (baja=10000 células/pocillo, media=30000, alta=75000 y muy alta=150000 células/pocillo) en placas de 24 pocillos y tras 24 horas se marcó con BrdU durante 1h30'. Posteriormente las células fueron tratadas, fijadas y se tomaron imágenes para cuantificar la incorporación de BrdU en las distintas condiciones. Las posibles diferencias estadísticas entre los grupos fueron evaluadas utilizando el t-Test (Excel).

1.4.- El cultivo de células U373 Stx1-DN en medio condicionado de células U373 control rescata los niveles de incorporación de BrdU a altas densidades

La inhibición por contacto es un proceso biológico que bloquea el crecimiento celular cuando las células crecen a altas densidades. La disminución *in vitro* de la proliferación celular en función de la densidad que se da al bloquear la función de Stx1 nos indujo a relacionar la inhibición por contacto con las proteínas SNARE.

Muchas de las proteínas SNARE están implicadas en los procesos de secreción celular por lo que decidimos estudiar si el bloqueo de estas proteínas altera la secreción de factores que regulan la inhibición por contacto. Para ello diseñamos un experimento donde utilizamos medio condicionado por las células U373 control para rescatar los niveles de incorporación de BrdU de las células U373 Stx1-DN. Cultivamos células U373 Stx1-DN sembradas a muy alta densidad (150000 células/pocillo en placas de 24 pocillos) en medio condicionado por células U373 control y medimos los niveles de incorporación de BrdU. Como resultado observamos un rescate total de la incorporación de BrdU en células U373 Stx1-DN suplementadas con medio condicionado de células U373 control (figura 66).

Estos resultados sugieren que de algún modo Stx1 está relacionada con la secreción de factores implicados en la proliferación de células de glioblastoma a muy alta densidad de cultivo *in vitro*.

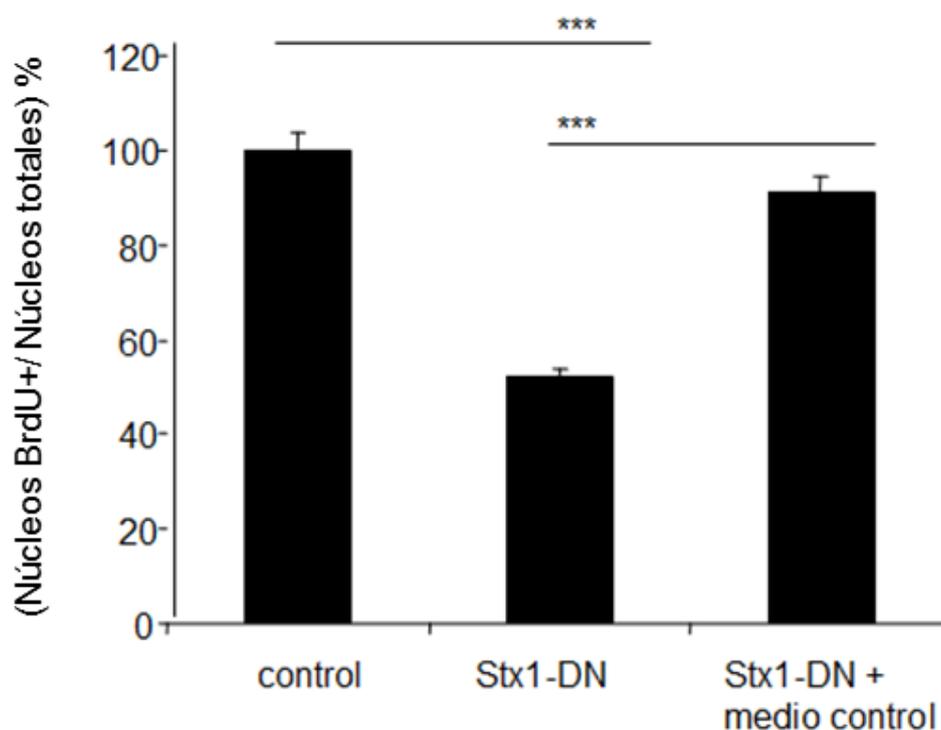


Figura 66. Rescate de los niveles de incorporación de BrdU en células con la función de Stx1 bloqueada. El día después de la siembra se retira el medio de la condición U373 Stx1-DN y se suplementan estas células con medio condicionado por células U373 control (el medio se cambia a primera y última hora del día). El siguiente día se efectúa el marcaje con BrdU durante 1h30' y se cuantifican los niveles de incorporación de BrdU.

1.5- El bloqueo de la función de Stx1 mediante la sobreexpresión del dominio H3TM de Stx1a no modifica la adhesión o la movilidad celular *in vitro*.

Una vez evaluada la proliferación celular *in vitro*, pasamos a estudiar otras capacidades celulares: adhesión celular, invasividad, movilidad. Que podrían estar alteradas en las células U373 Stx1-DN. Es importante recordar que esta línea sobreexpresa luciferasa ya esta proteína se encuentra insertada en el vector que contiene el H3TM-Stx1a.

1.5.1.- Adhesión celular.

Los estudios de adhesión consistieron en la siembra de las líneas celulares en pocillos con el fondo cubierto por las moléculas más frecuentes en la matriz extracelular y la cuantificación del número de células adheridas a la matriz posteriormente (1-2 h). Se evaluó por separado la capacidad de adhesión a matrigel, laminina y fibronectina.

Unicamente observamos diferencias significativas cuando las células eran cultivadas en fibronectina. En este caso se producía un leve incremento del número de células adheridas a la matriz en las células U373 Stx1-DN.

1.5.2.- Movilidad celular.

Se ha demostrado la importancia de moléculas SNARE como VAMP3, SNAP23 (Veale et al., 2010) o Stx1 (Cotrufo et al., 2012) en la migración celular. Ante ausencia de diferencias en la adhesión celular tras el bloqueo de Stx1, decidimos evaluar en conjunto la movilidad celular en vez de estudiar por separado las distintas propiedades celulares participantes en el proceso. Para ello realizamos un experimento de *wound healing in vitro*.

En estos experimentos se utilizan cultivos confluentes a los que se les genera una grieta (circular o linear según el diseño) a través de la cual las células comienzan a moverse. Este tipo de ensayos dan una idea de la movilidad intrínseca de las células ya que permiten el estudio de la migración celular en ausencia de factores como la

migración a través de la matriz extracelular o siguiendo factores de quimioatrativos. Para este estudio utilizamos un modelo de grieta circular que se generaba al retirar una columna circular que ocupaba la parte central de los pocillos, las células migraban durante 24-48 horas en condiciones estándar salvo por una baja cantidad de suero fetal bovino (2%) para limitar la división celular durante el ensayo. Una vez transcurridas 24-48 horas, las células fueron fijadas y teñidas con *CMPX Cell Tracker* (Life Technologies). Posteriormente tomamos imágenes de los pocillos y cuantificamos el número de células que habían migrado al espacio central donde se encontraba la grieta.

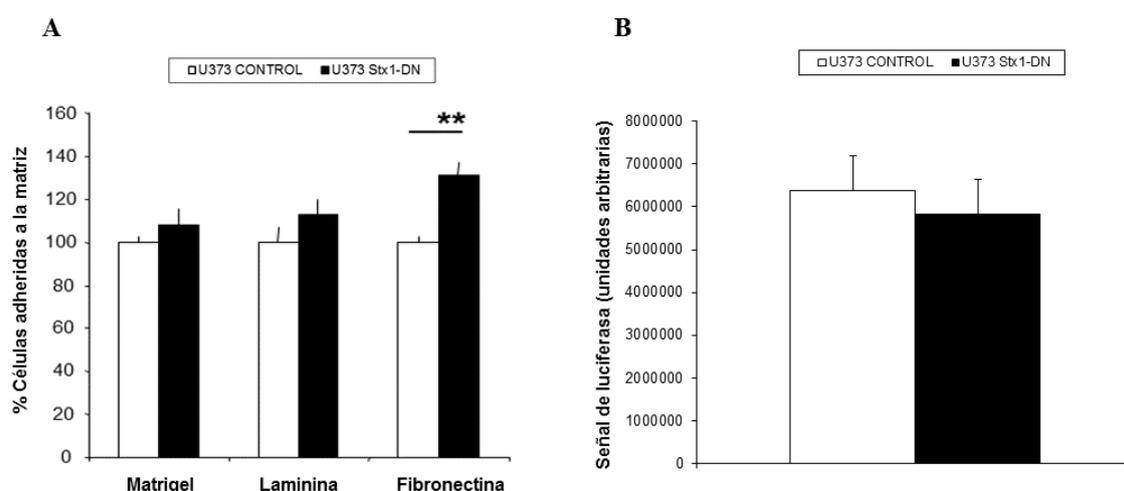


Figura 67. Experimentos *in vitro* para evaluar la adhesión y la movilidad celular de las células U373 DN-Stx1. A, experimento de adhesión celular con células U373 Control y U373 Stx1-DN. Cuantificación del número de células adheridas a la matriz de matrigel, laminina o fibronectina en condiciones estándar. Pasadas 1-2 horas, se limpiaron los pocillos de todas las células no adheridas a las matrices y se lisaron las células que quedaban en los pocillos. Posteriormente se midió la actividad de luciferasa presente en el lisado, que es directamente proporcional a la cantidad de células presentes y se comparó con las cantidades adheridas en la línea U373 Control. B, cuantificación de la capacidad migratoria en células U373 Control y U373 Stx1-DN. La cuantificación fue realizada midiendo la intensidad de señal inmunofluorescente (utilizando ImageJ) proveniente de la zona central del pocillo que había sido bloqueada inicialmente por la columna de plástico. Tanto en A como en B las diferencias estadísticas entre las medias fueron evaluadas utilizando el t-Test (Excel).

1.6.- La capacidad invasiva *in vitro* en células U373 se vé comprometida cuando se sobreexpresa el DN que bloquea la función de Stx1.

En condiciones fisiológicas los gliomas migran por el cerebro siguiendo la parte externa de los vasos sanguíneos. Para ello requieren una compleja organización de los procesos de adhesión celular así como la capacidad de migrar atravesando una densa matriz de proteínas extracelulares (Bellail et al., 2004).

Ya que el bloqueo de Stx1 no genera *in vitro* alteraciones importantes en la adhesión celular, o de migración celular en condiciones que no requieran mecanismos de invasión, decidimos analizar la capacidad invasiva de las células. Se denomina capacidad invasiva a la propiedad celular de migrar atravesando barreras biológicas que suelen estar compuestas por las proteínas extracelulares que secretan otras células. En este contexto, las células migratorias (especialmente las tumorales) tienen que desarrollar estrategias adicionales (tales como la secreción de metaloproteinasas para degradar la matriz extracelular ((Levicar, Nuttall, Lah, & Nutall, 2003)) para ser capaces de migrar.

En los ensayos de invasión *in vitro* hechos en cámaras de Boyden, se genera un gradiente de factores de crecimiento en que promueve la migración celular a través de una matriz proteica (normalmente matrigel). Esta fue la estrategia elegida para evaluar capacidad invasiva de las células U373 Control y U373 Stx1-DN. Observamos que se produce una disminución significativa de la capacidad invasiva de las células cuando la función de Stx1 se encuentra alterada.

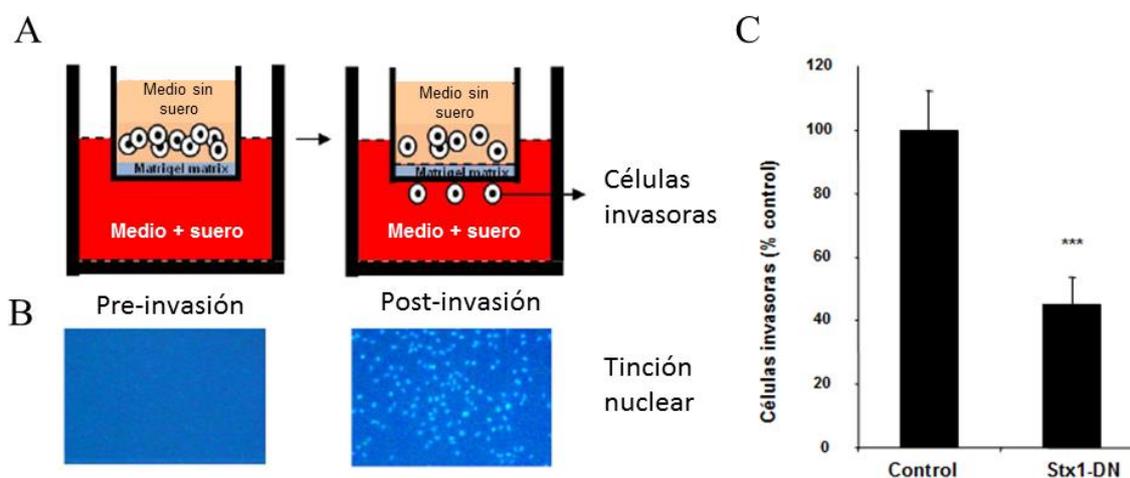


Figura 68. Análisis de la capacidad invasiva *in vitro*. A, esquema general de una cámara Boyden. B, imágenes de fluorescencia de la matriz antes y después de realizar el ensayo. En la imagen de la derecha se puede observar la invasión de células gracias al uso de DAPI para teñir los núcleos celulares. C, Análisis en cámaras de Boyden, de la capacidad invasiva *in vitro* de las poblaciones de células U373 Control y U373 Stx1-DN. Cuantificación del número de células que invaden a través de la matriz de matrigel. Las diferencias estadísticas fueron analizadas utilizando el t-Test (Excel).

Tras estos resultados decidimos analizar la posibilidad de que la función de Stx1 influya en algunas de las proteínas encargadas de degradar la matriz extracelular durante los procesos de invasión. En los gliomas se han descrito altos niveles de expresión de algunas de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), como MMP-2 (Jan et al., 2010) o MMP-9 (cuyos niveles de expresión correlacionan con la progresión de los gliomas (Levicar et al., 2003)). Mediante una zimografía evaluamos si se altera la secreción de galatinasas en células U373 Stx1-DN y no observamos diferencias significativas con la línea U373 Control. Igual resultado obtuvimos con la línea U87 (datos no mostrados).

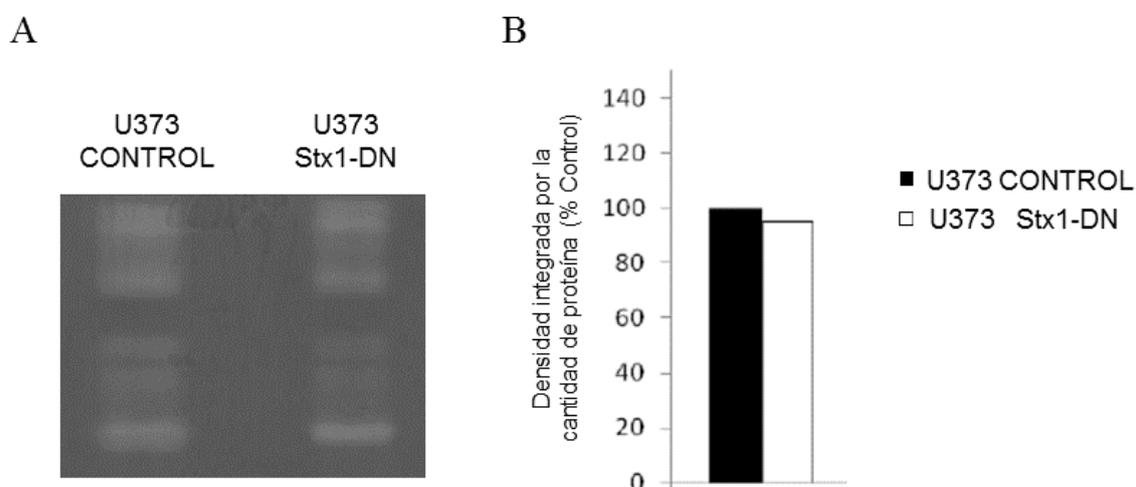


Figura 69. El bloqueo de Stx1 no afecta a la secreción de MMPs con actividad gelatinolítica. A, zimografía en fel de gelatina de las células U373 Control y U373 Stx1-DN. Tras 24 horas de siembra las células se recolectan y concentran. Seguidamente se siembran en el gel de gelatina y se observa como degradan el gel B, cuantificación por densitometría de la actividad gelatinolítica de las células anteriores.

2.- El bloqueo de la función de Stx1 *in vivo* disminuye la progresión del glioblastoma en modelos murínicos.

En paralelo a los trabajos *in vitro*, estudiamos la progresión del glioblastoma en modelos murínicos cuando la función SNARE se encuentra bloqueada en el tumor. Para ello utilizamos la inyección estereotáctica e inoculamos las células en el *corpus striatum* del hemisferio derecho del cerebro de ratones inmunodeprimidos.

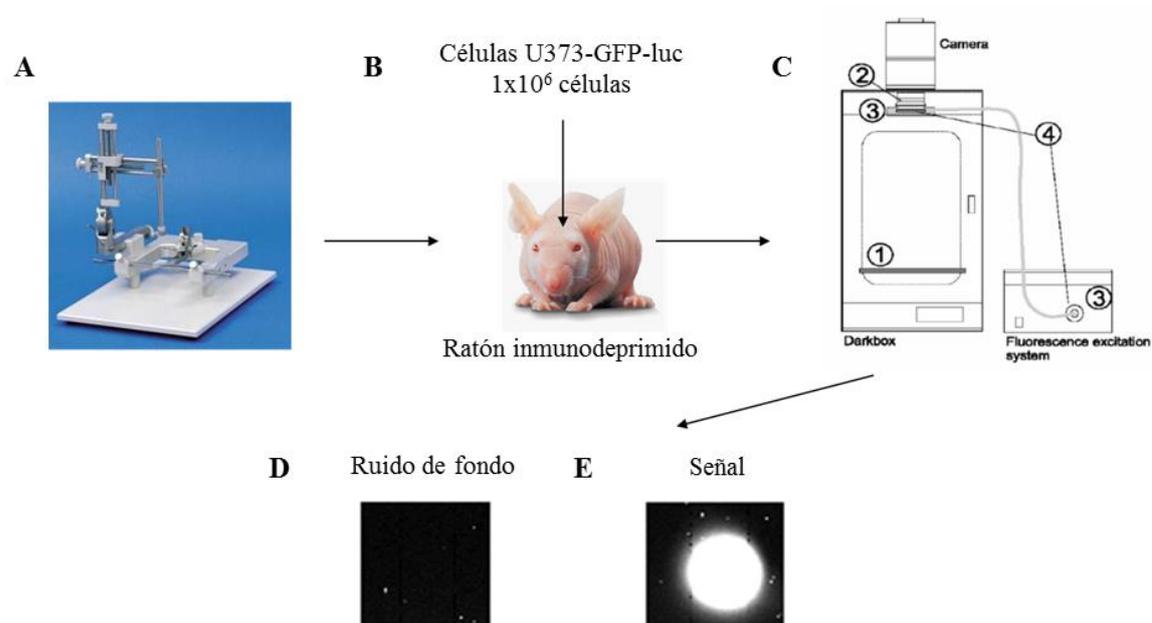


Figura 70. Esquema de inoculación de células tumorales en modelos murínicos. A, imagen de un inyector estereotáctico como el utilizado para inocular las células. En todos los casos estas células expresaban constitutivamente GFP y luciferasa. B, ejemplo de un ratón inmunodeprimido. C, cámara de detección de fluorescencia donde se registraba la señal de luciferasa proveniente de las células tumorales. D-E, ejemplo de la señal obtenida (E), frente la señal de fondo (D). B-C, cortes histológicos de los cerebros inoculados teñidos con anticuerpos contra GFP para visualizar el tumor (todas las líneas utilizadas expresaban GFP).

2.1.- La inoculación de células U373-DN en el cerebro de ratones inmunodeprimidos genera tumores de menor tamaño que los controles.

Para estudiar si la pérdida de función en SNARE afecta a la progresión del glioblastoma *in vivo* realizamos xenotransplantes intracerebrales utilizando líneas U373 GFP-luciferasa que expresaban el dominio H3TM-Stx1a como dominante negativo de Stx1, y cuantificamos el grado de crecimiento tumoral en el tiempo detectando la señal de luciferasa. Los tumores derivados de las líneas U373 control mostraron un crecimiento moderado durante los primeros 30 días post-inoculación

(30DPI), seguido de un crecimiento exponencial hasta el máximo a los 40 días (40DPI), cuando los animales fueron sacrificados. Por el contrario, los tumores provenientes de la línea U373 Stx1-DN tuvieron un crecimiento muy similar a al control durante los primeros 30 días, pero la progresión fue muy inferior desde este punto hasta 40DPI, llegando a tener tumores 3-7 veces más pequeños que en los controles.

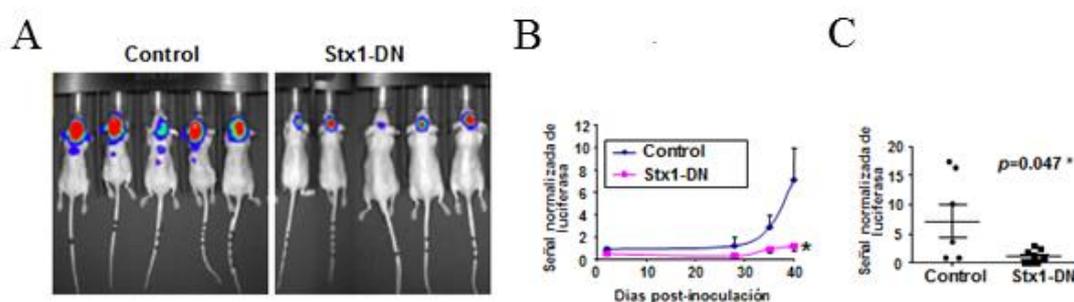


Figura 71. Inoculación en el cerebro de ratones inmunodeprimidos de células tumorales con la función de Stx1 bloqueada. Los ratones inmunodeprimidos fueron inoculados con líneas celulares U373 Control y U373 Stx1-DN. A, imágenes de emisión de luciferasa (emitida por las células inyectadas que estaban transfectadas con un constructo que expresa luciferasa) en ratones inmunodeprimidos inoculados con líneas control y Stx1-DN. B-C, cuantificación de la señal de luciferasa en ambos grupos. La significancia estadística de los resultados fue evaluada utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney (GraphPad Prism 5.03).

2.2.- Los tumores generados por la inoculación de células U373 Stx1-DN en el cerebro de ratones inmunodeprimidos presentan una disminución en los niveles de incorporación de BrdU.

Para determinar si el bloqueo de Stx1 altera la proliferación *in vivo* de un modo similar a lo observado *in vitro*, a los ratones inmunodeprimidos inyectados con las líneas U373 se les inyectó BrdU una hora antes de ser sacrificados a 30DPI y sus cerebros fueron procesados y teñidos contra BrdU mediante inmunohistoquímica.

La cuantificación de la relación entre las células positivas para GFP (todas las células U373 presentes en el tejido) y las células positivas para GFP y marcadas simultáneamente con BrdU reflejaron una reducción -70% (Stx1-DN) comparados con las líneas control. Esta reducción *in vivo* de la proporción de células proliferativas puede ser una de las causas de la diferencia de tamaño entre los tumores pero no hay que descartar que otros procesos que regulan el tamaño de los tumores, como por ejemplo la capacidad invasiva de las células, su movilidad, etc.

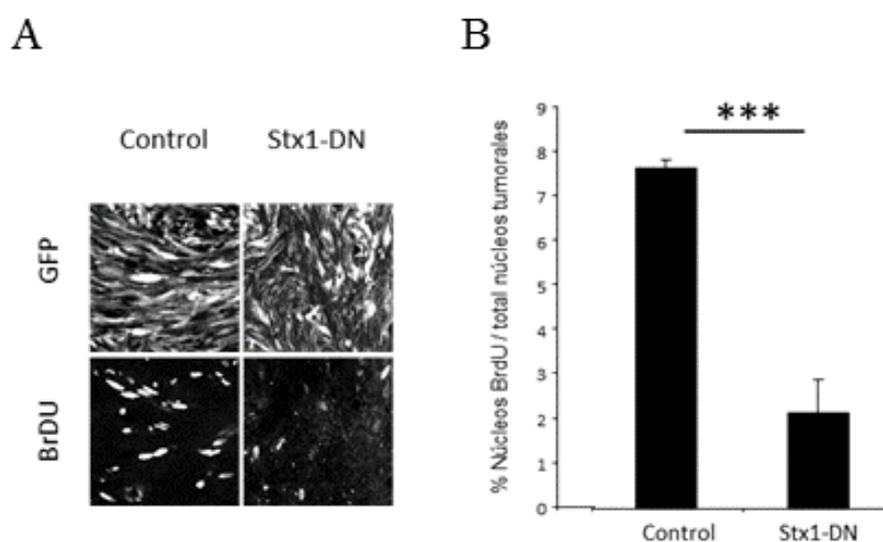


Figura 72. Incorporación de BrdU en cortes histológicos de tumores. A, imágenes histológicas de los tumores formados por las líneas U373 inyectadas en el cerebro de ratones inmunodeprimidos a 30DPI. Las secciones fueron marcadas con GFP para identificar las células tumorales, y BrdU para identificar las células tumorales proliferativas. B, cuantificación de la incorporación de BrdU en las distintas líneas tumorales. Las diferencias estadísticas fueron analizadas utilizando el t-Test (Excel).

DISCUSIÓN

Parte I: las proteínas SNARE en guía axonal

Uno de los objetivos de esta tesis consiste en explorar el papel de las proteínas SNARE en guía axonal. Aunque se ha documentado la función de Syx1A en la sinpatogénesis (Broadie et al., 1995), sólo existe un caso documentado donde embriones mutantes para Syx1A desarrollan problemas en la formación del sistema nervioso (Schulze and Bellen, 1996), y en este trabajo donde se asocian los problemas en el sistema nervioso con problemas en la membrana celular pero no se explora en profundidad ni el fenotipo ni los mecanismos moleculares que lo generan. Igualmente, tampoco existen estudios documentados sobre el papel de otras proteínas SNARE en la construcción del sistema nervioso durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*.

1.- Mutantes para proteínas SNARE en *Drosophila melanogaster* desarrollan problemas de guía axonal.

Como ya comenté en la introducción, las proteínas SNARE se expresan en una multitud de tejidos durante el desarrollo y lo hacen también con diferentes niveles de intensidad según el momento en el que se encuentran los sistemas. La función principal de estas proteínas es controlar el tráfico vesicular regulando la fusión entre membranas, aunque también son capaces de participar en otros procesos como la polimerización de los microtúbulos (Nakayama et al., 2012), el tráfico de los transportadores de glucosa (Nakayama et al., 2003) o la celularización embrionaria (Schulze and Bellen, 1996). La

alteración de alguno de estos múltiples procesos en el sistema nervioso puede generar fenotipos de guía axonal y además, siempre cabe la posibilidad de que alteración de estos procesos en tejidos no neuronales derive en problemas de guía axonal.

1.1.- Los problemas en el desarrollo del sistema nervioso en mutantes de proteínas SNARE se generan principalmente por defectos en las neuronas del sistema nervioso.

En *Drosophila melanogaster*, aunque Syx1A se expresa en las neuronas del sistema nervioso embrionario, se ha documentado que también está presente en otros tejidos en niveles muy inferiores durante la embriogénesis (Schulze et al., 1995a), y su importancia es tal que la ausencia de Syx1A durante las fases tempranas del desarrollo da lugar a problemas en la celularización embrionaria que resultan letales para el individuo (Schulze and Bellen, 1996). En mutantes nulos para Syx1A donde el embrión dispone de una cierta cantidad de Syx1A obtenida a través de la herencia de RNA materno, el embrión es capaz de desarrollarse hasta las fases primeras del estadio larvario aunque desarrolla problemas en la formación de la cutícula debido a fallos en la topología de la membrana apical y la secreción de proteínas extracelulares (Moussian et al., 2007). En nuestro trabajo hemos analizado en detalle los problemas que desarrollan estos embriones en la formación del sistema nervioso, y los hemos comparado con *stocks* control (*yw*) y con los problemas que hemos encontrado en otros mutantes de las proteínas SNARE: Snap25 y nSyb.

En el primer caso documentado donde se muestran defectos en el sistema nervioso de mutantes *Syx1A* *-/-*, se asume que el fenotipo está generado por dificultades en la correcta formación y estabilidad de la membrana (Schulze and Bellen, 1996), pero no se profundiza en las causas que lo originan. En nuestro trabajo, quisimos saber en primer lugar si los defectos son causados por problemas en tejidos no nerviosos que repercuten en el sistema nervioso, o se trata de un fenotipo originado en el sistema nervioso. Tras estudiar nuestros resultados, existen varias razones por las cuales creo que mutaciones en *Syx1A* generan defectos en guía axonal:

A) No se observan alteraciones morfológicas importantes en el embrión que pudieran generar el fenotipo en el sistema nervioso de embriones *Syx1A* *-/-*, *Snap25* *-/-* o *nSyb* *-/-*. En la mayor parte de los casos el tamaño, la forma o la estructura del embrión están poco afectas y sus afectaciones no se pueden correlacionar con los defectos en las estructuras nerviosas.

B) Todas las estructuras nerviosas: sistema nervioso central, nervios motores y los nervios periféricos, se desarrollan anormalmente en los mutantes *Syx1A* *-/-*. Las células que forman estas estructuras están repartidas por casi todo el embrión y no se desarrollan simultáneamente (aunque sí que lo hacen en una ventana temporal similar). Estos hechos limitan los tejidos susceptibles de causar el fenotipo en el sistema nervioso, ya que deberían deber abarcar casi la totalidad del embrión y tener un desarrollo temporal amplio que coincida con todo el sistema nervioso. Esto descarta gran parte de las estructuras embrionarias.

Llegados a este punto asumo que el fenotipo en los mutantes SNARE tiene su origen en el sistema nervioso. Esta estructura se encuentra dividida en dos tipos celulares: las neuronas y las células gliales. Hay varias razones que me llevan a pensar que los defectos en guía axonal son causados por problemas en las neuronas y no en las células gliales: en primer lugar, morfológicamente los problemas que desarrollan nuestros mutantes son distintos a los que aparecen cuando hay problemas en las células gliales (Hidalgo et al., 1995). En segundo lugar, en el caso de Syx1A hemos comprobado que la proteína se detecta específicamente en los axones (figura 41) y asumimos que la cantidad de Syx1A en las células gliales es residual en las etapas del desarrollo estudiadas. Además, para comprobar que la alteración de los niveles de Syx1A no produjo defectos en la glia, observamos que a estadio 17 la glía de los embriones *Syx1A* *-/-* apenas presenta defectos (sólo algunas células se encuentran levemente desplazadas) (figura 43), y además estos defectos pueden ser debidos a un cambio en la posición de los axones.

1.2.- Los defectos observados en el sistema nervioso de mutantes para proteínas SNARE se deben principalmente a problemas de guía axonal.

Los problemas detectados en la formación del VNC encajan morfológicamente con problemas en la guía axonal (Kidd et al., 1998a) (Spitzweck et al., 2010) (Smart et al., 2011) e igual situación encontramos en los nervios motores. Además, el hecho de que los axones motores crezcan adecuadamente (en ninguno de los nervios tiene una extensión menor de la esperada aunque no se desarrollan adecuadamente) (figura 38), a priori descarta que estos mutantes de proteínas SNARE tengan problemas en el crecimiento axonal.

Centrándonos en los mutantes *Syx1A* *-/-*, podemos ver que tanto la aparición cronológica de los defectos como el incremento de la expresión de Syx1A (en los controles) coincide cronológicamente con el final de los procesos de neurogénesis y el inicio y desarrollo de los procesos de guía axonal (figura 42) (Campos-Ortega J. A., Hartenstein V., (1985). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*).

Con todos estos datos asumo que los fenotipos observados se deben a problemas en la guía axonal generados por problemas en los axones. Adicionalmente exploramos preliminarmente la participación de otros procesos biológicos como la neurogénesis, o la muerte celular en los fenotipos de los mutantes de proteínas SNARE. Respecto a la participación de la neurogénesis en nuestros mutantes, aunque no hemos utilizado marcadores específicos para estudiar su efecto tampoco hemos observado los defectos característicos en los nervios cuando hay problemas en la neurogénesis ni vimos una alteración importante de los niveles de apoptosis en todo el sistema nervioso central, lo cual me lleva a pensar que la muerte celular no está alterada en estos casos (datos no mostrados).

2.- Diferencias fenotípicas entre los mutantes para las proteínas SNARE.

Las diferencias entre fenotipos presentes en los mutantes SNARE: distintos grados de severidad, afectación diferencial de unos nervios respecto a otros o el desarrollo de defectos específicos como el cruce a través de la línea media en los mutantes de *Syx1A* y *nSyb*. Pueden tener su origen en las diferencias intrínsecas en los genes o en las funciones de sus proteínas.

Entre las diferencias genéticas que pueden generar las variaciones entre los mutantes SNARE son, por ejemplo, variaciones en los niveles del RNA materno heredado o una distinta eficacia de los mecanismos de compensación génica. Una posibilidad estudiada para eliminar la variable de la cantidad de RNA materno heredado, es realizar clones de la línea germinal para eliminar completamente el RNA materno heredado, que en el caso de *Syx1A* supone un 16% (Schulze et al., 1995a) del total preexistente. Sin embargo, se ha publicado que la ausencia total de *Syx1A* durante el desarrollo genera problemas en la celularización (Schulze and Bellen, 1996) que causan la muerte del embrión mucho antes del desarrollo del sistema nervioso.

Para intentar evitar las diferencias intrínsecas de los distintos mutantes de proteínas SNARE intentamos reproducir nuestros fenotipos expresando RNAs contra las proteínas SNARE. Sin embargo, esta estrategia fue incapaz producir los fenotipos vistos en los mutantes, seguramente debido a que los RNAs no inhibieron con suficiente intensidad las proteínas SNARE. Por lo tanto no pudimos clarificar el efecto de la variabilidad genética en nuestros fenotipos.

Además, las diferencias entre los mutantes también se pueden explicar si algunas de las proteínas SNARE que forman el complejo SNARE tienen funciones independientes de las que tiene el complejo, y estas funciones afectan de algún modo los procesos de guía axonal. Normalmente todas las funciones de las proteínas SNARE están asociadas a la formación del complejo SNARE pero se han documentado casos en los que una proteína SNARE tiene una función que no tienen el resto de proteínas que forman canónicamente el complejo SNARE con ella. Un ejemplo de estas posibles

situaciones es el caso de *Syx1A* en modelos *in vivo* y *ex vivo* en mamíferos, donde Syx1A (y no las otras proteínas que forman el complejo SNARE canónico con ella), es clave con la función de la vía Netrina/DCC en guía axonal (Cotrufo et al., 2011) y o la migración neuronal durante el desarrollo dirigida por la vía Netrina/DCC (Cotrufo et al., 2012).

2.1.- En embriones *Syx1A* *-/-* se ven afectadas las funciones del complejo SNARE canónico.

Aunque los fenotipos de las proteínas SNARE tienen varias similitudes y normalmente estas proteínas actúan generando en conjunto un complejo SNARE, no podemos asumir directamente que fenotipos similares sean generados por mecanismos moleculares comunes.

De los tres mutantes para proteínas SNARE analizados: *Snap25* *-/-*, *nSyb* *-/-* y *Syx1A* *-/-*, los embriones mutantes para Syx1A presentan un fenotipo más severo en todas las estructuras y parámetros de cuantificación utilizados. Sabemos por otros modelos (Cotrufo et al., 2011) (Cotrufo et al., 2012), que la proteína Syx1A es capaz de participar en procesos de guía axonal independientemente de la formación su complejo SNARE canónico, por lo que es posible que el fenotipo observado en los mutantes de Syx1A se genere al afectar funciones no asociadas al complejo SNARE canónico. Esto haría que los fenotipos de *Snap25* *-/-* y *nSyb* *-/-*, fueran mecanísticamente distintos a los de *Syx1A* *-/-*.

Sin embargo, tras estudiar nuestros resultados creo que el fenotipo en los mutantes *Syx1A* *-/-* se produce mayoritariamente al afectar los mismos mecanismos que en los casos de *Snap25* *-/-* y *nSyb* *-/-*, y que las diferencias entre los fenotipos se deben mayoritariamente a los factores mencionados en el punto 2 de la discusión (aunque no puedo descartar que funciones no canónicas de Syx1A puedan tener un efecto en el fenotipo). Estos son algunos de datos que sustentan mi argumentación:

A) Los problemas que se desarrollan en el sistema nervioso los mutantes *Syx1A* *-/-* están presentes en los otros mutantes SNARE. Los mutantes para *Syx1A* tienen los mismos defectos y una distribución similar a la que tienen los otros mutantes SNARE, en concreto los problemas de desfasiculación y/o colapso también aparecen en los otros mutantes y los cruces a través de la línea media (13% de los casos), también se dan en los mutantes para *nSyb* (5%), por lo que no hay una diferencia cualitativa entre los fenotipos de *Syx1A* *-/-*, *Snap25* *-/-* y *nSyb* *-/-* aunque sí que hay una diferencia cuantitativa porque cada SNARE tiene fenotipos con distinta severidad.

B) Los dobles mutantes *nSyb* *-/-*; *Syx1A* *-/-* tienen el mismo fenotipo que mutantes *Syx1A* *-/-*. Esto significa que la adición de una mutación adicional en una proteína SNARE que participa en la formación del complejo canónico de *Syx1A* aparentemente no altera el fenotipo generado por la mutación de *Syx1A* (Figura 45-46). Esto puede ser interpretado como que el fenotipo de los embriones *Syx1A* *-/-* es el fenotipo más severo obtenible alterando la función de las proteínas SNARE canónicas y mutaciones adicionales en el complejo SNARE no pueden agravar el fenotipo. También es posible que el fenotipo de *Syx1A* sea la suma de dos fenotipos en guía axonal

mecanísticamente distintos: un fenotipo que se genera por alterar la formación del complejo SNARE canónico tal y como también pasa en los mutantes *Snap25* *-/-* y *nSyb* *-/-*, y un fenotipo generado por los procesos donde Syx1A actúa independientemente de la formación de este complejo.

Aunque no podemos descartar esta segunda opción donde parte del fenotipo de Syx1A se debe a funciones no canónicas, las similitudes en cualitativas entre los fenotipos de Syx1A *-/-*, *Snap25* *-/-* y *nSyb* *-/-* y los trabajos previos que definen que la función principal de Syx1A es a través de la formación su complejo SNARE canónico, hacen que me incline por la posibilidad de que las funciones de Syx1A independientes de la formación del complejo SNARE canónico no son las principales responsables del fenotipo de guía axonal durante el desarrollo de los embriones.

3.- ¿Qué causas generan las diferencias entre los fenotipos del cordón nervioso central y los nervios motores?

La diferencia en la severidad y penetrancia del fenotipo en el sistema nervioso central y los nervios motores es notable y está reflejada en todos los mutantes de proteínas SNARE analizadas, siendo los nervios motores los que presentan un fenotipo más agravado en todos los casos. Esta diferencia puede tener su origen en causas como una sensibilidad diferente de las estructuras a las mutaciones, o diferencias estructurales que acentúen un fenotipo u otro, pero el caso mejor documentado que puede explicar esta diferencia es la importancia de la sinaptogénesis en los procesos de guía axonal.

Se ha publicado que los nervios motores con problemas de guía axonal desarrollan problemas en la sinaptogénesis que se traducen en malformaciones en la parte cercana a la sinapsis de los nervios motores (Colón-Ramos, 2009). Un ejemplo de estos casos son las mutaciones en la vía Netrina/Frazzled, que no afectan el crecimiento del nervio motor pero hacen que desarrollen defectos en la sinaptogénesis (algunos de estos defectos se asemejan las anomalías que hemos cuantificado en nuestros estudios de los nervios motores). Por lo tanto, aunque otros factores seguramente influyen en la diferencia fenotípica entre el VNC y los nervios motores, creo que la relación de la sinaptogénesis con la guía axonal es uno de los motivos que puede explicar esta diferencia.

4.- Causas mecánísticas de los defectos de guía axonal.

En otros modelos, los defectos de guía axonal generados por problemas en la función SNARE han sido relacionados con problemas en la vía netrina/DCC (Cotrufo et al., 2011). Sin embargo, ya en la primera caracterización de los fenotipos de nuestros mutantes observamos que no todos los defectos en la formación del cordón nervioso estaban directamente asociados con la vía netrina/Frazzled (homóloga de la vía netrina/DCC en vertebrados). Además, nuestros estudios preliminares donde evaluamos una posible interacción génica han resultado en su mayor parte negativos, lo cual resulta sorprendente si el único papel de Syx1A en la guía axonal se produce a través de la vía Netrina/Frazzled.

Aunque no podemos descartar la afectación de la vía netrina/Frazzled en nuestros mutantes, resulta interesante que algunos de los defectos observados pueden ser fácilmente relacionados con problemas en la guía axonal mediada por Slit/Robo. Hasta el momento no existe en bibliografía ninguna relación documentada entre las proteínas SNARE y la vía Slit/Robo.

4.1.- Mutantes para proteínas SNARE desarrollan cruces a través de la línea media en los nervios positivos para FasciclinaII.

El cruce de axones a través de la línea media se desarrolla exclusivamente en mutantes que tienen directa o indirectamente afectada las señales de guía axonal de la vía Slit/Robo (Simpson et al., 2000b) (Spitzweck et al., 2010) (Smart et al., 2011).

En nuestros mutantes observamos cruces de este tipo en los mutantes para *Syx1A* o *nSyb*, pero los cruces aparecen con una frecuencia y severidad inferior a la vista en mutantes que tienen directamente afectada la vía por mutaciones en Slit o los receptores Robo (Figura 49). Además, en los mutantes para *sli* o *robo* suelen verse colapsos completos del cordón nervioso central o al menos una cantidad mayor de axones cruzando la línea media en comparación con los mutantes *Syx1A* *-/-* y *nSyb* *-/-*. Es importante señalar que como el defecto no es exclusivo de los mutantes *Syx1A* *-/-* (también aparece en mutantes *nSyb* *-/-*), creo que una posible relación entre *Syx1A* y la ruta Slit/Robo exclusiva de *Syx1A* también debería ser extrapolable al resto de proteínas que forman el complejo SNARE con *Syx1A*, y no puedo descartar que esto sea extrapolable al resto de proteínas SNARE involucradas en los procesos de guía

axonal. Además, si no apreciamos cruces a través de la línea media en otros miembros del complejo SNARE canónico de Syx1A (los embriones *Snap25* *-/-* no desarrollan cruces a través de la línea media) puede ser debido a que estas proteínas son compensadas genéticamente por otras ya sea por la presencia de proteínas homólogas (Vilinsky et al., 2002) (Bhattacharya et al., 2002) o la herencia de RNA materno (por ejemplo, los mutantes nulos para *Syx1A* presentan todavía un 16% del total de Syx1A expresada en embriones control que los permite desarrollarse hasta fases tardías de la embriogénesis (Schulze et al., 1995b)).

Otra posibilidad que explicaría la severidad de nuestros fenotipos es que directamente la afectación de la vía Slit/Robo sea inferior en los mutantes SNARE frente a los *Slit* *-/-* o *robo* *-/-*. Es posible que este hecho esté generado porque las mutaciones apenas afecten genes a los genes directamente implicados en la vía Slit/Robo (como por ejemplo, *slit*, *robo*, *robo2*, *robo3* o los genes relacionados con los heparán sulfato proteoglicanos: Sindecano (*sdc*) y Dally-like (*dlp*) (Smart et al., 2011)).

4.2.- Mutantes para Syx1A presentan un acortamiento de la distancia entre las fascículas mediales.

Al observar mutantes que presentan cruces de axones a través de la línea media con una tinción FasciclinaII, es frecuente que en muchos segmentos no haya cruces o incluso algunos embriones no tienen ningún cruce (Simpson et al., 2000a, 2000b). Este hecho me hizo suponer que el cruce podría tratarse del efecto final de un fenotipo más amplio pero que mecanísticamente también se deba a un problema en la vía de Slit/Robo. En

nuestro caso postulé que si en los mutantes para proteínas SNARE se afecta la vía Slit/Robo, se debe producir un posicionamiento erróneo de las fascículas (al menos de algunas de ellas) que las sitúa más próximas a la línea media y que en casos extremos (cuando el cono de crecimiento de la fascícula ignora completamente las señales repulsivas de vía Slit/Robo), da como resultado un cruce de las fascículas a través de la línea media (Simpson et al., 2000a, 2000b).

En estudios previos se ha documentado que una alteración en la vía de Netrina/Frazzled genera un aumento de la distancia entre las fascículas mediales (Bhat, 2005a), mientras que fallos en la vía Slit/Robo derivan en un colapso casi completo en muchos casos, de ambas fascículas.

Aunque en nuestro trabajo utilizando embriones *Syx1A* *-/-* hemos medido la distancia entre las tres fascículas del sistema nervioso que expresan FasciclinaII (medial, intermedia y lateral), en la bibliografía se suele estudiar únicamente la posición de las fascículas mediales (Bhat, 2005a). Esto es debido a que es una fascícula de desarrollo más temprano y estable. La fascícula intermedia también tiene un desarrollo muy sólido, no así la fascícula lateral, que no queda bien definida hasta estadios muy tardíos y presenta una variabilidad mayor (por lo tanto las mediciones en esta fascícula tienen un mayor error intrínseco). Como resultado de estas mediciones detectamos un acortamiento de la distancia entre las fascículas mediales y entre las fascículas intermedias. Esto podría ser causado por una disminución del tamaño del embrión o de la línea media, pero como la distancia entre las fascículas laterales (que son las más

externas) estaba conservada en los mutantes, asumo que esta disminución no se debe a cambios morfológicos en el embrión.

Si nos centramos en las fascículas mediales, el acortamiento de la distancia entre ellas en los mutantes de *Syx1A* sugiere un problema en la vía de Slit/Robo, y aparentemente contradice los datos en otros modelos que dan a *Syx1A* un papel en la vía de Netrina/Frazzled (los mutantes con problemas en la vía de Netrina/Frazzled presentan un aumento de la distancia entre las fascículas mediales) (Bhat, 2005a), pero es importante señalar que estos datos no tienen porque ser una contradicción ya que se ha demostrado que las mutaciones en la vía de Slit/Robo son epistáticas sobre las mutaciones de la vía de netrina/Frazzled (Bhat et al., 2007). Así pues, la disminución de la distancia entre las fascículas mediales en mutantes no tiene porque excluir la afectación de la vía Netrina/Frazzled, pero sigue un problema en la vía de Slit/Robo.

5.- Estado de la ruta Slit/Robo en mutantes para *Syx1A*.

Ya que los resultados anteriores sugieren una relación entre las proteínas SNARE y la vía de Slit/Robo, decidimos estudiar el estado de Slit y los receptores Robo en nuestros mutantes. Para este estudio elegimos los mutantes de *Syx1A* porque son los que presentan defectos de guía más severos y un mayor número de eventos asociados a problemas en la vía Slit/Robo.

5.1.- La secreción y difusión de Slit no está alterada en mutantes *Syx1A* *-/-*.

La cuantificación de Slit en el cordón nervioso central de embriones mutantes para *Syx1A* no detectó ninguna diferencia en el patrón normal de expresión y difusión de Slit (Figura 55). Para descartar la posibilidad de que hubiera variaciones en los niveles de Slit por debajo de nuestro umbral de detección, intentamos rescatar el fenotipo de *Syx1A* *-/-* sobreexpresando Slit en la línea media. Como la sobreexpresión no alteró el fenotipo de los embriones *Syx1A* *-/-* asumimos que no había variaciones en los niveles de Slit por debajo de nuestro umbral de detección.

Ya que *Syx1A* no se expresa en altas cantidades en las células gliales secretoras de Slit (Figura 41D) (Kidd et al., 1999) (Steigemann et al., 2004a), era esperable que la secreción de Slit no estuviera alterada. Sin embargo, que la secreción de Slit no esté alterada no significa que su difusión tenga sea correcta ya que está depende de otros elementos como proteínas extracelulares o directamente presentes en la matriz extracelular. Una de las proteínas más importantes que regula la difusión de Slit es Sindecano (Johnson et al., 2004) (Smart et al., 2011), y problemas en Sindecano derivan en una difusión errónea de Slit a lo ancho del VNC. Como se puede ver en la figura 55 la difusión de Slit en mutantes *Syx1A* *-/-* es normal por lo que asumo que no puede haber una gran alteración en la función de Sindecano.

5.2.- La localización y los niveles de los receptores Robo y Robo3, y del heparán sulfato proteoglicano *Dally-like*, no se encuentran alterados en mutantes *Syx1A* *-/-*.

Utilizamos los mismos estudios cuantitativos del apartado anterior para evaluar los niveles y observar la localización de Robo, Robo3 y *Dally-like* en embriones mutantes para *Syx1A* *-/-* (figura) y vimos que estos parámetros no estaban alterados. Desafortunadamente no pudimos realizar un estudio similar con Robo2 o Sindecano ante la falta de anticuerpos específicos contra estas proteínas. Tampoco realizamos experimentos de sobreexpresión con estas Robo, Robo3 y *Dally-like* para descartar pequeñas alteraciones por debajo de nuestro umbral de detección porque la sobreexpresión de un receptor entraña dificultades adicionales a las que tiene la sobreexpresión ligandos difusibles como Slit.

Aunque no hemos observado alteraciones en los niveles y la localización de Robo, Robo3 y *Dally-like*, no podemos descartar que haya defectos por debajo de la resolución de nuestra técnica de cuantificación. Si estos defectos se dan en varias proteínas simultáneamente, como por ejemplo en todos los receptores Robo, tendríamos un daño acumulativo en la ruta Slit/Robo que podría originar el fenotipo de *Syx1A* *-/-*. Además, con nuestro estudio cuantitativo no podemos garantizar si la externalización de los receptores se produce adecuadamente o con la asimetría necesaria para que ejerzan correctamente su función en el cono de crecimiento. Problemas en uno o ambos mecanismos también disminuirían la eficacia de la vía Slit/Robo en los mutantes de *Syx1A* *-/-*.

5.3.- Las interacciones genéticas en los dobles mutantes confirman la relación entre Syx1A y la vía Slit/Robo.

Los resultados negativos en la localización y los niveles de las proteínas principales de la vía Slit/Robo descartaron problemas en la secreción y distribución de Slit, pero no descartaron problemas en otros factores que controlan la eficacia de la vía Slit/Robo, como pueden ser la externalización de los receptores y correceptores, la eficacia de unión entre Slit-Robo o el correcto funcionamiento de los mecanismos intracelulares asociados a la vía Slit/Robo.

Para corroborar la relación entre Syx1A y la vía Slit/Robo, decidimos estudiar si se producen interacciones génicas entre Syx1A y dos de las proteínas directamente implicadas en la vía Slit/Robo que no pudimos estudiar mediante inmunofluorescencia: Robo2 y Sindecano.

El dobles mutante *robo2* *-/-*; *Syx1A* *-/-* incremento en la severidad de los defectos de guía axonal comparados con los mutantes *robo2* *-/-*. Y lo mismo ocurrió con el mutante de *robo2* heterocigoto para *Syx1A* (*robo2* *-/-*; *Syx1A*/*+*). Además, los mutantes para *Syx1A* heterocigotos para *robo2* también presentaron un incremento en la severidad de los defectos de guía axonal cuando fueron comparados con mutantes *Syx1A* *-/-*.

En el caso de Sindecano y *Syx1A*, también el doble mutante *sdc* *-/-*; *Syx1A* *-/-* mostró incremento en la severidad de los defectos de guía axonal al ser comparado con los mutantes *sdc* *-/-*. Y lo mismo ocurrió en el mutante de *sdc* heterocigoto para *Syx1A*

(*sdc* *-/-*; *Syx1A*/*+*). Además, los mutantes para *Syx1A* heterocigotos para *sdc* también presentaron un incremento en la severidad de los defectos de guía axonal cuando fueron comparados con mutantes *Syx1A* *-/-*.

El análisis de estos datos me lleva a varias conclusiones:

- A) Los problemas de guía axonal desarrollados en mutantes *Syx1A* *-/-* no se explican por la pérdida individual de las funciones de *robo2* o *sdc* ya que el fenotipo de *Syx1A* *-/-* se ve agravado cuando se retira una o ambas copias de *robo2* o *sdc* respectivamente. Estos resultados implican que la pérdida de función en los mecanismos activados por Robo2 o Sdc no son los únicos responsables del fenotipo de *Syx1A* *-/-*, aunque no puedo descartar que las función de una u otra proteína estén alteradas en los embriones *Syx1A* *-/-*.
- B) El agravamiento del fenotipo de embriones *Syx1A*/*+* o *Syx1A* *-/-* al retirar una o varias copias de *robo2* o *sdc* (ambos genes están directamente relacionados con la vía de Slit/Robo), sugiere que *Syx1A* (y por derivación todas las proteínas que forman el complejo SNARE canónico con ella) ejerce algún papel en la vía de Slit/Robo. Una de las posibilidades es que *Syx1A*, regule el tráfico vesicular de receptores o correceptores de la vía Slit/Robo a la membrana plasmática aunque no podemos descartar que participe en otros procesos.

6.- ¿Los fenotipos asociados a la vía Slit/Robo podrían aparecer en mutantes de proteínas SNARE si se afectaran otras vías?

Los cruces de axones a través de la línea media o el colapso de las fascículas en esa zona se pueden producir por dos motivos:

A) Una disminución de la señal repulsiva que evita el cruce indiscriminado de axones a través de la línea media durante el desarrollo.

B) Un incremento de la señal atractiva.

6.1.- Disminución de la señal repulsiva.

6.1.1.- Sobreexpresión de *Commisureless*.

Como ya hemos mencionado en el 3.3.2.1 de la introducción, *Commisureless* (*Comm*) es un regulador negativo de Robo, por lo que un incremento de la expresión de *Comm* da fenotipos de pérdida de función en la vía Slit/Robo (Kidd et al., 1998a). Sin embargo, hay dos motivos por los cuales no es probable que en los mutantes de las proteínas SNARE (tomando como ejemplo los mutantes para *Syx1A*), *Comm* se encuentre alterado. El primero es que ni los patrones de expresión ni los fenotipos observados son similares entre *Comm* y *Syx1A*: mientras que *Comm* se concentra únicamente en los axones comisurales que cruzan la línea media, *Syx1A* está expresado en todos los axones longitudinales y en menor medida en los comisurales del VNC. Esto

seguramente explica porqué la sobreexpresión de Comm genera únicamente fenotipos de colapso de los axones en la línea media (Kidd et al., 1998a) mientras que en los mutantes para Syx1A hay una mayor variedad de problemas (colapsos en la línea media, entre las fascículas, desfasciculaciones...). El segundo motivo es que Comm baja los niveles de Robo en los axones comisurales por lo que en nuestras cuantificaciones de los niveles de Robo, si Comm se encontrara sobreexpresado deberíamos haber detectado una disminución de estos niveles en vez de un incremento.

6.1.2.- Una disminución de la señal repulsiva generada mediante el heterodímero Unc5/Frazzled.

Tal y como detallamos en el apartado 3.3.3.1 de la introducción, la Netrina puede ejercer una función repulsiva si se une al heterodímero Unc5/Frazzled. Sin embargo, teniendo en cuenta que Unc5 no se expresa en los nervios comisurales ni en los nervios longitudinales, es muy improbable que está sea la causa de nuestro fenotipo (Keleman and Dickson, 2001).

6.1.3.- Una bajada de la señal repulsiva de otras proteínas que tienen efectos repulsivos sobre el cono de crecimiento.

Algunas familias de proteínas como las Semaforinas, tienen una función repulsiva que podría estar comprometida en nuestros mutantes. Los fenotipos de desfasciculación y colapsos en las fascículas positivas para FasciclinaII en el VNC, así como algunos de

los problemas de guía axonal en los nervios motores de los mutantes para el receptor de Semaforina 2a (Sema-2a), Plexina B, son similares a los fenotipos observados en los

mutantes para proteínas SNARE (Ayoob et al., 2006) (Wu et al., 2011). Esto relaciona la vía de las Semaforinas con nuestros mutantes, pero ya que los mutantes para las Semaforinas no desarrollan problemas de cruces a través de la línea media de axones positivos para FasciclinaII, alteraciones en las vías de las Semaforinas sólo pueden explicar parcialmente los fenotipos de los mutantes de proteínas SNARE en el sistema nervioso.

6.2.- Un incremento de la señal atractiva.

El modo más probable de que se produzca un incremento de la señal atractiva en el sistema nervioso central es mediante un incremento de la expresión de NetA y NetB. Como ambas proteínas se expresan en células gliales de la línea media donde apenas hay Syx1A, es poco probable que se produzca una desregulación de NetA o NetB en embriones *Syx1A*^{-/-}. Además, la disminución de la distancia entre las fascículas mediales (Figura 50), es un fenotipo opuesto al de pérdida de función en la vía netrina/Frazzled (Bhat, 2005b), lo cual reduce las posibilidades de que el fenotipo se deba exclusivamente a problemas en la vía de Frazzled/DCC.

7.- Modelo resumen.

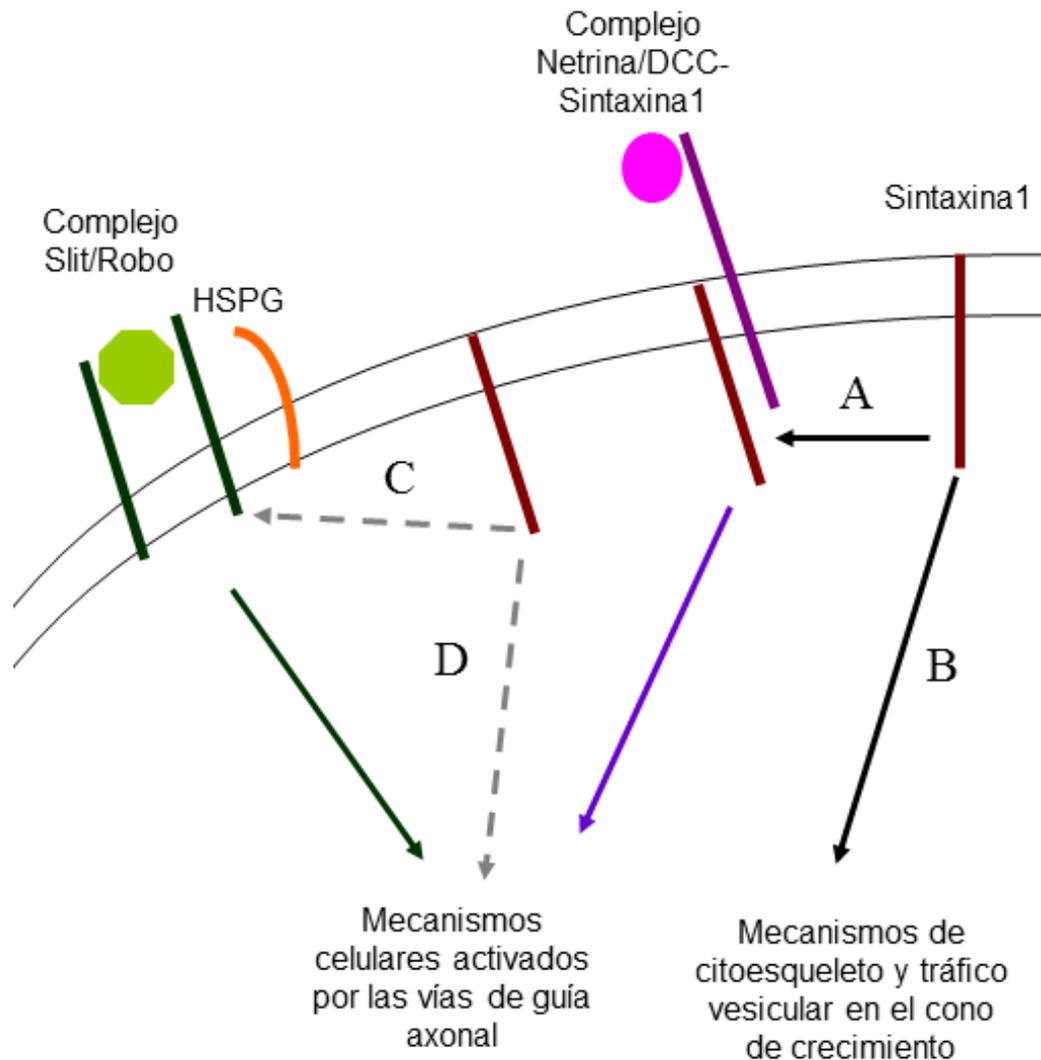


Figura 73. Papel de Stx1 en la guía axonal. Representación esquemática de Syx1 en la guía axonal. Se documentado que Stx1 (barra roja oscura), media en la formación del complejo Netrina/DCC (A) y está involucrada en mecanismos de tráfico del citoesqueleto y vesicular en el cono de crecimiento (B). Basándome en nuestros datos sugiero que Stx1 potencialmente tiene un papel en los mecanismos celulares activados por las vías de guía axonal (D), y es posible que esté involucrada con las proteínas que regulan y modulan la vía de guía Slit/Robo (C). Aunque cabe la posibilidad de que esta influencia sobre la vía Slit/Robo no sea a través de C sino afectando los mecanismos celulares activados por Slit/Robo (D).

Parte II: las proteínas SNARE en la progresión tumoral.

1.- El bloqueo de la función de Stx1 causa una disminución de la capacidad proliferativa de células de glioblastoma *in vitro* e *in vivo*.

Los resultados de este trabajo indican que el bloqueo de Stx1 en células U373 inyectadas en el cerebro de ratones inmunodeprimidos da como resultado el desarrollo de tumores más pequeños que en los casos control (Figura 71). Nuestros análisis demuestran que la pérdida de función de Stx1 disminuye la capacidad proliferativa e invasiva de las células tumorales.

A pesar de que hemos observado una reducción significativa de la tasa de incorporación de BrdU en células de glioblastoma con su función de Stx1 bloqueada *in vivo*, este resultado solo se observa *in vitro* cuando las células se encuentran en condiciones de alta densidad (Figura 65). Este hecho explicaría el por qué no encontramos diferencias en las curvas de crecimiento *in vitro* de células U373 Control y U373 Stx1-DN. En este tipo de análisis, las células son sembradas inicialmente en muy baja densidad y adquieren altas densidades solo en la etapa final del ensayo. En este escenario, es importante recalcar que *in vivo* las células tumorales se encuentran en una situación equivalente a las condiciones de alta densidad *in vitro*.

Nuestros análisis demuestran que medio condicionado proveniente de células control puede rescatar la disminución de incorporación de BrdU causada por el bloqueo de Stx1 (Figura 66). Estos resultados sugieren que de algún modo la función de Stx1 participa en la secreción de algún factor que regula la pérdida de inhibición por contacto

que sufren las células de glioblastoma, un rasgo clave para la progresión de tumores (Schrader et al., 2009). La identidad de este posible factor es todavía desconocida. Se ha descrito que la supresión de la función de MF1 en la recuperación de la inhibición por contacto de las células de glioblastoma. Del mismo modo que ocurre al bloquear la función de Stx1, las células de glioblastoma deficientes para MF1 desarrollan diferencias de proliferación cuando se las compara con sus controles en condiciones de alta densidad(Schrader et al., 2009). Es posible que Stx1 intervenga en el transporte o secreción de MF1 aunque esta posibilidad deberá ser estudiada en el futuro.

Aunque nuestros resultados sugieren una participación crítica de Stx1 en la regulación de la inhibición por contacto de células U373, no se puede descartar que Stx1 juegue un papel esencial en la proliferación de células tumorales a través de otros mecanismos moleculares. Así, junto a otras proteínas SNARE podría formar parte de complejos críticos para la secreción de factores de crecimiento, transporte de receptores u otros procesos como la citoquinesis (proteínas como Stx2 y endobrevin/VAMP8, ha sido descritas como moléculas importantes para la citoquinesis de células epiteliales (Low et al., 2003)).

2.- El bloqueo de la función de Stx1 disminuye la capacidad invasiva celular.

Nuestros estudios realizados *in vitro* cuantificando el número de células U373 Stx1-DN que invaden a través de una matriz de matrigel y los resultados preliminares *in vivo* midiendo el desarrollo radial de glioblastomas generados a partir de células U373 Stx1-DN (datos no mostrados), indican una disminución de la capacidad invasiva celular cuando se bloquea la función de Stx1. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales Stx1 influye en la invasión todavía nos son parcialmente desconocidos, aunque es posible que sean similares al papel que tienen otras SNARE en la invasión celular. Por ejemplo, se ha documentado que otras proteínas SNARE como VAMP3, Sintaxina13 y SNAP-23 están involucradas en la secreción de metaloproteinasas que participan en la invasión celular (Kean et al., 2009). Ya que los procesos de secreción de moléculas que degradan la matriz celular son importantes para la invasión celular, pensé que la secreción de algunas de estas proteínas podría estar alterada en la línea U373 Stx1-DN. Mediante la zimografía en gel de gelatina estudiamos la secreción de la MMP-2 y MMP-9 ya que la sobreexpresión de ambas es crítica para la invasión y progresión de gliomas de grado alto (Jan et al., 2010), pero no detectamos alteraciones en la expresión de estas proteínas en las células U373 Stx1-DN. Sin embargo, ya que existen otras MMPs cuya actividad es importante en los procesos invasivos (Levicar et al., 2003) y que todavía no hemos evaluado, todavía es necesario un estudio más amplio antes de descartar completamente alguna función de Stx1 en la secreción de MMPs.

3.- Modelo resumen.

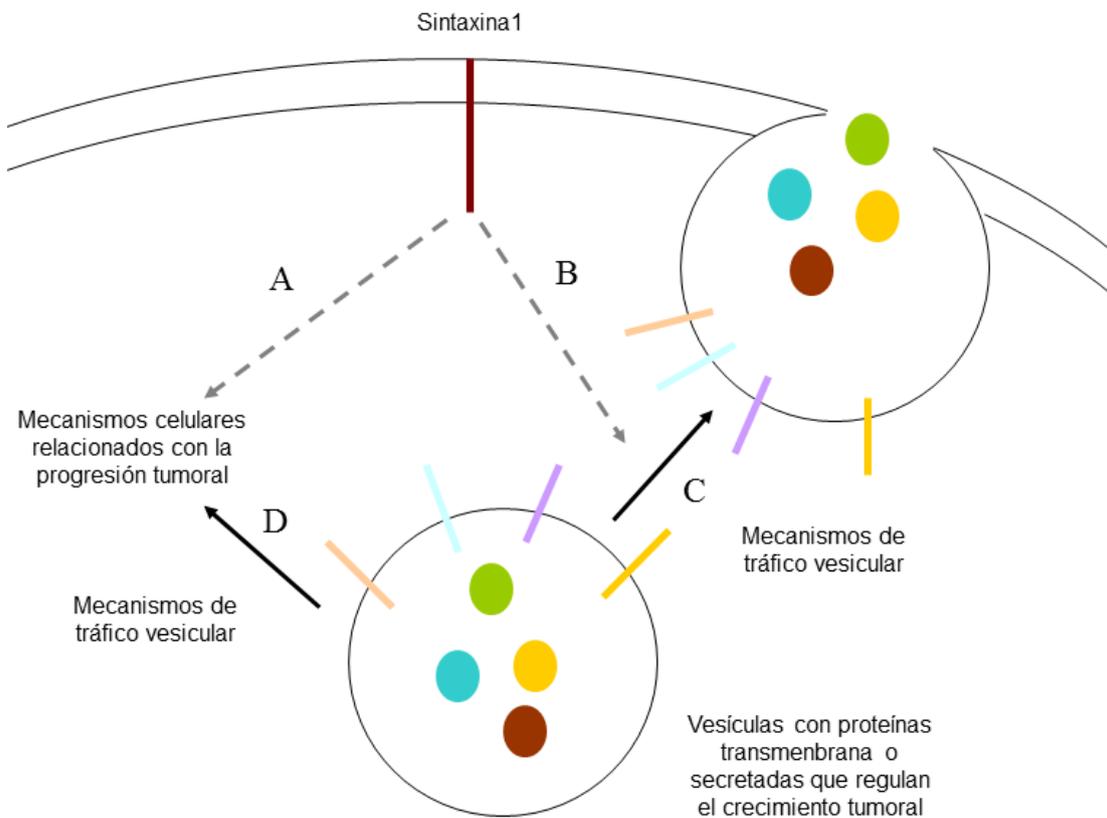


Figura 74. Papel de Stx1 en la progresión tumoral. Representación esquemática de Syx1 en la progresión tumoral. Creemos Stx1 (barra roja oscura), tiene funciones en los mecanismos de progresión tumoral directamente (A) o influyendo en el tráfico vesicular (B). El tráfico vesicular (C) regula los múltiples procesos entre los cuales se encuentran el tráfico de membrana, la externalización de proteínas o la secreción de factores de crecimiento autocrinos, angiogénicos o metaloproteasas. Todos estos mecanismos son importantes en la progresión tumoral (D).

Parte III: El papel de las proteínas SNARE en guía axonal y progresión tumoral.

1.- Modelo final.

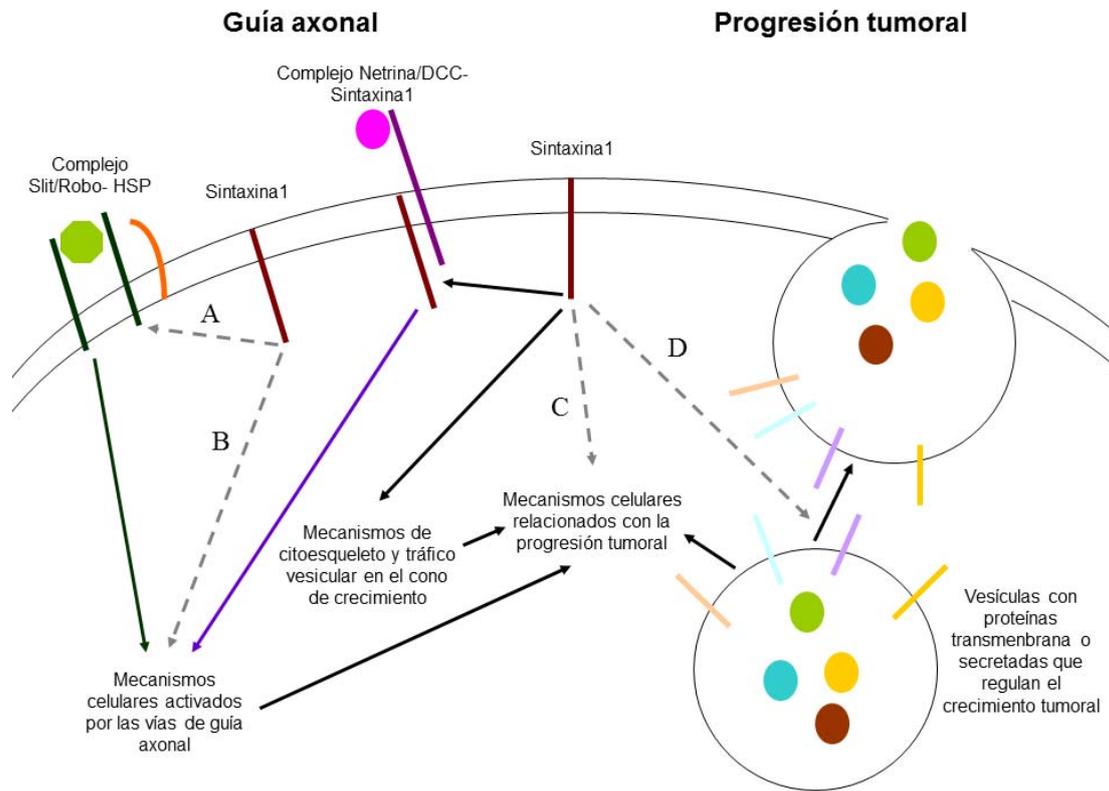


Figura 75. Modelo completo representando esquemática el papel de Stx1 en la guía axonal y la progresión tumoral. En guía axonal Stx1 posiblemente está involucrada con las proteínas que regulan y modulan la vía de guía Slit/Robo (A), y los mecanismos celulares activados por las vías de guía axonal (C). En la progresión tumoral creo que Stx1 actúa directamente sobre los mecanismos de progresión tumoral directamente (C) o en los mecanismos de tráfico vesicular (D) que están relacionados con los mecanismos de progresión tumoral (C).

CONCLUSIONES

Parte I: las proteínas SNARE en la guía axonal

- Stx1 tiene una función conservada durante la evolución en los procesos de guía axonal durante el desarrollo.
- Otros miembros del complejo canónico SNARE de Stx1 tienen una función en los procesos de guía axonal durante el desarrollo.
- En *Drosophila melanogaster*, *Syx1A* tiene un papel en la ruta Slit/Robo.

Parte II: las proteínas SNARE en el crecimiento tumoral.

- El bloqueo de la función de Stx1 reduce la progresión del glioblastoma.
- La función de Stx1 es importante para la proliferación y capacidad invasiva de células de glioblastoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parte I: las proteínas SNARE en la guía axonal.

1.- Líneas genéticas.

En estas listas, todas las líneas genéticas o *stocks* que tienen un número de *stock*, provienen de: (<http://flybase.bio.indiana.edu>). Todos los *stocks* y los cruces fueron mantenidos en condiciones estándar y a 25°C.

1.1.- *Stocks* de proteínas SNAREs:

syx1A^{Δ229} (alelo amórfico de Sintaxina1A, número de *stock* 4379), Syx1A⁰⁶⁷³⁷ (alelo hipomórfico de Sintaxina1A, número de *stock* 11697), Df(3L)1-16 (deficiencia de Snap25, número de *stock* 7002), Syb²¹⁻¹⁵ (alelo de pérdida de función de Sinaptobrevina, número de *stock* 9873), n-syb^{d02894} (inserción de un elemento P en la secuencia de Sinaptobrevina neuronal, número de *stock* 19183), Vamp7^{G7738} , (inserción de un elemento P en la secuencia de Vamp7, número de *stock* 28488) . Utilizamos como control un *stock yw*, salvo cuando otro stock resultaba ser un control más adecuado.

1.2.- *Stocks* relacionados con la guía axonal.

fra³ (alelo amórfico de Frazzled, número de *stock* 8813), robo² (alelo amórfico de robo, número de *stock* 8756), lea¹ (mutante de robo2 generado utilizando etilen metanosulfonato, número de *stock* 34046).

MATERIALES Y MÉTODOS

Stocks mutantes para heparán sulfato proteoglicanos, procedentes del laboratorio del Prof. David Van Vactor: Dlp1 (delección de *Dally-like*, (Smart 2010)), Dlp2 (*Dally-like* alelo EMS, (Rawson 2005)) ubi-Sara_Df48 (delección de Sindecán y Sara junto con el rescate de Sara, (Johnson 2004)).

1.3.- Recombinantes y dobles mutantes generados.

Recombinante de Syx1A con UAS-Slit: syx1A^{Δ229} – UAS-Slit. Recombinante de Syx1A con nSyb: syx1A^{Δ229} – n-syb^{d02894}. Doble mutante de robo2 con Syx1A: lea¹; syx1A^{Δ229}. Doble mutante de Sindecán con Syx1A: ubi-Sara_Df48; syx1A^{Δ229}. Doble mutante de frazzled con Syx1A: fra³; syx1A^{Δ229}.

2.- Tinción de embriones de *Drosophila melanogaster*.

2.1.- Fijación.

Todos los pasos son realizados a temperatura ambiente. Antes de iniciar la fijación se debe decorionar los embriones manteniéndolos en lejía durante 5 minutos. Después se lava la lejía con agua y se sumerge los embriones en una interfase de heptano/PBS - 4% formaldehído (Polysciences, USA), durante 20 minutos. Tras ello, la mezcla de /PBS - 4% formaldehído es sustituida por metanol y se agitan los recipientes durante dos minutos. Los embriones que han sido fijados adecuadamente precipitan en la fase acuosa (metanol), y son recolectados. En este punto se puede optar por hacer tres lavados con metanol y almacenar los embriones a -20°C, o continuar con el proceso de tinción.

2.2.- Tinción.

A temperatura ambiente, las muestras pasan por tres lavados cortos con PBT (PBS-TRITON 0,1 %) y tres lavados largos de 20 minutos antes de usar PBT-BSA 0,5%. Se hacen tres lavados rápidos con PBT-BSA y se incuban los embriones durante toda la noche los embriones 4°C en agitación con el anticuerpo primario en PBT-BSA. Después el proceso vuelve a ser a temperatura ambiente, los embriones pasan por tres lavados cortos con PBT (PBS-TRITON 0,1 %) y tres lavados largos de 20 minutos antes de usar PBT-BSA 0,5%. Se hacen tres lavados rápidos con PBT-BSA y se incuban los embriones en PBT-BSA con el anticuerpo secundario durante dos horas a temperatura ambiente y agitación. Finalmente, las muestras pasan por tres lavados cortos y tres lavados largos de 20 minutos con PBT (PBS-TRITON 0,1 %) antes de retirar todo el PBT y guardar los embriones en glicerol al 70% (si la tinción ha sido inmunológica con DAB) o o montarlos en portas utilizando fluoromount (SouthernBiotech) (si la tinción ha sido inmunofluorescente).

3.- Anticuerpos.

3.1.- Anticuerpos primarios.

α -FasII (1:5) (mAb1D4, DSHB), α -Dlp (1:5) (DSHB), α -BP102 (DSHB), β Gal (1:500) (Promega), α -repo (1:20) (DSHB), α -robo (1:5) (mAb13C9), α -Futsch (1:20) (22C10, DSHB), α -robo3 (1:20) (DSHB), α -slit (1:5) (DSHB), α -Dally-like(1:20) (DSHB). α -GFP (1:500) (Invitrogen).

3.2.- Anticuerpos secundarios y otras tinciones.

Anti-ratón biotinilado (Amersham) o no-biotinilado (GE Healthcare). En las tinciones inmunohistoquímicas en las que utilizamos DAB, en una primera reacción la señal fue amplificada utilizando el kit Vectastain-ABC (Vector Laboratories) y la señal de la reacción DAB fue intensificada utilizando NiCl₂, excepto en las tinciones dobles, donde fue omitido en una de las dos reacciones.

Affinity-Purified Anti-HRP TRITC, Alexa488, Alexa-555 and Alexa-647, Cy2, Cy3 and Cy5 anticuerpos secundarios conjugados (Jackson ImmunoResearch). Todos utilizados a una concentración mínima de 1:500 y máxima de 1:300.

4.- Adquisición de imágenes.

Las imágenes de inmunohistoquímica fueron tomadas utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas usando un microscopio confocal (Leica TCS-SPE-AOBS system). Todas las imágenes son la proyección de secciones Z confocales procesadas con Fiji, (Schindelin J, 2012) y Adobe Photoshop.

5.- Cuantificación de los niveles de proteínas en el cordón nervioso central mediante inmunofluorescencia.

Aplicamos las técnicas detalladas en (Johnson et al., 2004) (Smart et al., 2011) para cuantificar los niveles de proteínas en el cordón nervioso central. En este caso aplicamos la técnica para medir los niveles de expresión de Slit, Robo, Robo3 y Dally-like en el sistema nervioso central de embriones a estadios tardíos 16 o tempranos 17.

Todos los embriones fueron fijados y teñidos aplicando las mismas condiciones. Después, durante la adquisición de imágenes se tomaron secciones ópticas de toda la zona ocupada por el sistema nervioso central (detectado gracias una tinción con HRP) y la separación entre las secciones ópticas fue de 0,35 o 0,5 μm . El zoom fue constante entre las muestras, así como la máxima distancia entre secciones ópticas, que nunca fue superior a 0,5 μm para evitar una pérdida importante de información espacial durante la adquisición, lo cual disminuiría la precisión de la cuantificación. Las imágenes fueron adquiridas en idénticas condiciones de láser y otras variables ópticas y los Z-stacks generados durante las adquisiciones fueron proyectados en una proyección media de la señal recogida utilizando Fiji.

En las proyecciones alineamos el VNC, seleccionamos el punto central del VNC, dibujamos línea transversal de 70 μm y medimos la intensidad de señal producida por la proteína marcada mediante inmunofluorescencia en toda la línea. Estos valores tomaron como valor la intensidad de cada pixel en la línea. Realizamos esta medición a lo largo de todo el VNC y sacamos el valor medio de intensidad. Normalizamos los resultados y obtuvimos una gráfica de los niveles de expresión de las proteínas en la que se aplicó un t-Test (Excel) para buscar diferencias significativas con el control.

6.- Protocolo de cuantificación de los defectos de guía axonal en el cordón nervioso ventral.

Utilizando una tinción contra FasciclinaII cuantificamos los defectos en la formación de las tres fascículas positivas para esta tinción: la fascícula medial, intermedia y lateral. La cuantificación fue realizada una vez las tres fascículas se encuentran completamente desarrolladas (finales del estadio 16 o principios del 17) y se analizaron únicamente los segmentos abdominales A2-A6 ya que segmentos anteriores y posteriores tienen una mayor inestabilidad durante su formación, lo cual incrementa el ruido de fondo de la cuantificación.

Registramos como defecto cualquier evento de desfasciculación, cruce, colapso, ruptura u otra malformación en las fascículas que tuviera un tamaño mínimo de un segmento de longitud. Esta medida fue hecha para descartar gran cantidad de eventos que ocurren normalmente durante el desarrollo de las fascículas y que podrían ser considerados defectos (aunque en fases más tardías esas pequeñas anomalías son corregidas y el embrión es completamente viable). Los datos fueron analizados estadísticamente aplicando el t-Test (Excel).

7.- Protocolo de cuantificación de los defectos de guía axonal en los nervios motores.

Analizamos los nervios motores positivos para FasciclinaII a finales del estadio 16 o principios del 17 de los segmentos abdominales A2-A6. Cuando fue posible, cuantificamos los nervios en ambos laterales del embrión.

Los nervios analizados (aquellos positivos para FasciclinaII), fueron: el nervio intersegmental (ISN), el nervio segmental A (SNa), y el nervio segmental B (SNb). En ellos cuantificamos cualquier ruptura, colapso, cruce, desfasciculación, problemas en la zona cercana a la sinapsis o cualquier otra alteración que pudiera ser producida por defectos en la guía axonal. Los datos fueron analizados estadísticamente aplicando el t-Test (Excel).

Parte II: las proteínas SNARE en la progresión tumoral.

1.- Experimental *in vitro*.

1.1.- Líneas celulares.

Las células de glioblastoma humano U373 y U87 fueron cedidas por el Dr. Joan Seoane (IOVH, Barcelona). Las células U373 y U87 deficientes para la función de Stx1 y sus respectivas líneas control fueron establecidas previamente en el laboratorio.

Las células fueron mantenidas en DMEN suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, glutamato al 1 %, penicilina estreptomycin al 1 %, y los antibióticos de selección G418 (500 µg/ml) y puromicina (4 µg/ml), a 37°C y en una atmosfera de aire al 5% de CO₂. Todos los experimentos realizados se hicieron en ausencia de antibióticos de selección.

A partir de las líneas U87 o U373 generamos las líneas Control y Stx1-DN, que expresaban el dominio H3TM de Stx1a de rata fusionado a GFP (U373 Stx1-DN), o no (U373 control) (Ulloa et al., 2013, datos en revisión para su publicación). En el caso de las líneas en las que se realizaron transfecciones transitorias, estas se realizaron mediante el sistema NEO Transfection System (Invitrogen). Los cDNAs utilizados fueron pEGFP-C1 (Clontech) y Stx1a-H3TM en pEGFP establecidos previamente en nuestro laboratorio (Cotrufo et al., 2011).

En el caso de las poblaciones celulares estables, generamos poblaciones celulares de células U87 o U373 que expresaron establemente la proteína de fusión GFP-firefly luciferasa. Para ello, las células fueron distribuidas en seis platos de 10 cm donde fueron transfectadas con el vector pEGFP-Luc (Promega) utilizando el sistema Lipofectamine Plus (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del proveedor. Las células fueron seleccionadas en medio normal suplementado con 500 ug/ml G418. Las células positivas para GFP fueron aisladas entre las células supervivientes tras dos rondas de FACS. Estas células GFP-luciferasa fueron infectadas con partículas retrovirales codificantes para el dominio H3TM de Stx1a. Previamente a la infección, la secuencia de rata Stx1a del dominio H3TM había sido fusionada con EGFP y subclonada en un vector puro pBabe, y se prepararon las partículas retrovirales. Las células obtenidas tras la infección tenían similares niveles de luciferasa que las líneas control.

Nota: el vector retroviral pBabe y los plásmidos empaquetadores gag/pol y vsvg fueron cedidos por amablemente por el Dr. R Gomis (IRB, Barcelona). Los plásmidos que codifican para GFP o GFP-Stx1A-H3TM en pBabe fueron producidos anteriormente en el laboratorio. Las partículas virales codificantes para turbo-GFP fueron adquiridas a Darmhcom.

1.2- Ensayos de luciferasa.

Como las líneas celulares estables estaban transfectadas con un vector pEGFP-Luciferasa, se pudo medir la cantidad de luciferasa como método indirecto para cuantificar la cantidad de células en una muestra.

Para ello, quitamos en medio de los pocillos donde queremos cuantificar las células (nota: recordamos que todas las líneas utilizadas en esta tesis son adherentes por lo cual al retirar el medio no retiramos las células). Lavamos los pocillos tres veces con PBS y después quitamos todos los restos de PBS. Añadimos 100 μ l de Passive lysis buffer (PLB) disuelto en agua (esta es la cantidad usada si las células están cultivadas en placas de 96 pocillos). Agitamos a temperatura ambiente los pocillos durante 15 minutos. Después, tomamos el lisado de los pocillos (esta solución puede guardarse a -20 °C si es necesario), y lo mezclamos en una proporción 1/1 con el buffer de luciferasa que dispara la reacción de la luciferasa. La señal de luciferasa debe ser medida inmediatamente en un espectrofotómetro.

Composición del buffer de luciferasa: CoA, Gly-Gly, ATP, EGTA 200mM. Todo disuelto en agua.

1.3.- Medición de la incorporación de BrdU.

En los primeros experimentos donde se midió la incorporación de BrdU en las células Control y Stx1-DN de las líneas U87 y U373, se sembraron 50.000 células/pocillo fueron sembradas en placas de 24 pocillos en DMEM 10% FBS. Cinco días después, todas ellas fueron marcadas con BrdU a una concentración final de 0,05 mM, durante 2 horas a 37°C y posteriormente fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para la inmunodetección de las células que incorporaron el BrdU, estas fueron incubadas en HCl 0,1M por 10 minutos en hielo y en HCl 2M por 8 minutos a 37°C para desnaturalizar el DNA y, posteriormente, se llevó a cabo una incubación con tampón borato 0,1M a pH 8,7, por 10 minutos a temperatura ambiente, para neutralizar las muestras. Entonces, las células fueron bloqueadas y permeabilizadas con suero normal de caballo (NHS) al 5% en PBS-Tritón 0,1% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para detectar el BrdU incorporado, se utilizó como anticuerpo primario un anti-BrdU (Acris) (1:200) hecho en rata y, como anticuerpo secundario, un anti-rata de burro (Invitrogen) (1:500). Además, los núcleos fueron marcados con DAPI (1:500). El anticuerpo primario fue incubado durante una noche a 4°C mientras que el secundario lo fue durante una hora a temperatura ambiente.

La adquisición de imágenes de las inmunofluorescencia fueron obtenidas en el microscopio Nikon E800 equipado con la cámara Olympus DP72 y estas fueron utilizadas para determinar el porcentaje de células que incorporaron BrdU.

1.3.1.- Medición de la incorporación de BrdU en función de la densidad celular.

En los experimentos donde se evaluó la capacidad de incorporación de BrdU en función de la densidad de cultivo se utilizaron las mismas condiciones ya mencionadas en el apartado anterior pero con las siguientes excepciones: los trabajos fueron realizados únicamente con las líneas U373 control y U373 Stx1-DN, las densidades de cultivo fueron: baja=10000 células/pocillo, media=30000, alta=75000 y muy alta=150000 células/pocillo, en placas de 24 pocillos. Y las células fueron marcadas con BrdU 24h después de la siembra.

1.3.2.- Medición del rescate de la incorporación de BrdU.

En este caso se utilizaron las mismas condiciones y protocolos mencionados en anteriormente con la salvedad de que tras el primer día de siembra (la siembra es a 150000 células/pocillo en placas de 24 pocillos) se retira el medio de la condición U373 Stx1-DN y se suplementan estas células con medio condicionado por células U373 control (el medio se cambia a primera y última hora del día). El segundo día se efectúa el marcaje con BrdU.

1.4.- Curvas de proliferación.

Las líneas celulares U373 control y U373-Stx1-DN, fueron sembradas en unas densidades de 6000-25000 por pocillo en placas de 24 pocillos y crecieron en DMEN suplementado con 10% FBS a 37°C y 5% CO₂. Mantuvimos estas condiciones hasta que las células fueron totalmente confluentes. El medio fue renovado dos veces a la semana y el crecimiento de las células fue seguido cuantificando la cantidad de células tripsinizando los pocillos y contando manualmente las células utilizando una cámara de Neubauer.

1.5.- Ensayos de movilidad celular.

Siguiendo las instrucciones de fabricante utilizamos el sistema *Oris™ Cell Migration Assay Kit* (Platypus Technologies, Madison, USA). En este sistema se siembran en la placa de cultivo incluida en el kit, $2 \cdot 10^4$ células en DMEN al 10% FBS. Una vez las células se han adherido, se retira el filtro (*stopper*) del centro del pocillo, lo que deja un espacio libre donde las células pueden desplazarse. Se deja las células migrar durante 24h en condiciones de medio sin FBS para evitar que la proliferación celular altere el resultado. Transcurrido el tiempo las células son teñidas con el marcador fluorescente *CMTPX Cell Tracker* (Life Technologies) 5 μ M durante 30 minutos.

Finalmente, se toman imágenes de las células que han migrado al espacio donde se encontraba el *stopper* utilizando un microscopio invertido Olympus DP72+TE200 y cuantificamos el área ocupada por las células migratorias utilizando ImageJ.

1.6.- Ensayos de adhesión.

En estos ensayos todos los pocillos están cubiertos en la parte inferior por una matriz de matrigel, laminina o fibronectina. Para generar estas superficies se siguen los siguientes pasos:

A) En el caso de la laminina, se genera una capa previa de L-Ornitina que permite la fijación de la superficie de laminina. Para ello añadimos 80 μ l de L-Ornitina en cada pocillo de la placa de 96 pocillos e incubamos la placa durante toda la noche a 37°C. Después lavamos el pocillo tres veces con PBS y eliminamos los restos de PBS.

B) Añadimos matrigel o laminina a los pocillos disueltos en PBS en una proporción de 1/50 usando una cantidad total de volumen de 500-600 μ l. Hacemos lo mismo con la fibronectina pero la disolución es en una proporción de 1/100.

C) Incubamos las placas a 37°C durante 1-2 horas en el caso de la laminina, o 3-4 horas en los casos del matrigel y la fibronectina. Una vez las proteínas han polimerizado lavamos los pocillos con PBS para eliminar los restos de la disolución utilizada y las placas ya están listas para ser usadas.

En los ensayos de adhesión las células fueron sembradas a una densidad 6000 células por pocillo en placas de 96 pocillos, y cultivadas con DMEN al 10% FBS. Todas estas placas habían sido tratadas para contener en la parte inferior del pocillo una capa de matrigel, laminina o fibronectina. Tras una hora de plantar las células, el pocillo fue lavado con PBS tres veces, se eliminaron los restos de PBS y realizamos el ensayo de luciferasa (Apartado 1.2) para cuantificar la cantidad de células adheridas en ese espacio de tiempo.

1.7.- Ensayos de invasión.

Para estos ensayos en cámaras de Boyden se utilizó el sistema *BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber* (BD Biosciences). En la parte superior de la cámara se colocaron $2,5 \cdot 10^4$ células en 500 μ l de DMEM con un 0,5% de suero. Como factor quimioatractivo se colocaron 750 μ l de DMEM al 10% FBS en la parte inferior de la cámara. En estas condiciones incubamos las células durante 4h a 37°C, en una atmósfera de aire al 5% de CO₂. Después, fijamos las células en PFA al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación suave, y teñimos los núcleos utilizando DAPI 0'004 mg/ml disuelto en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y agitación suave. Antes de tomar las imágenes eliminamos las células que no habían atravesado la membrana de matrigel de las cámara, para ello limpiamos la matriz con un algodón.

La cantidad de células que migran a través de la matriz fue determinada a partir de las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia NikonE800 equipado con una cámara Olympus DP72. Para normalizar se utilizó el recuento de células del pocillo extra sembrado en cada condición.

1.8.- Zimografía en gel de gelatina

Sembramos $2 \cdot 10^6$ células en placas de 10 cm al 0,5 % FBS e incubamos durante toda la noche a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂. Tras ello, tomamos el medio y lo concentramos con centriconos (*Millipore*) de 30K para una centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos, y a 3K, 13000 rpm, durante 10 minutos, todo realizado a 4°C.

Después, copolimerizamos un gel de SDS-PAGE con gelatina al 0'1 mg/ml y colocamos 5 µl de muestra con un tampón de carga sin agentes desnaturalizantes.

Entonces fraccionamos las proteínas mediante electroforesis durante 1h 30' a 100V. Limpiamos el gel con tampón de limpieza (2'5% Tritón X-100, Tris 50 mM pH=7'4, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 1 µM) durante 1h en agitación e incubamos toda la noche el gel con tampón de incubación (Tris 50 mM pH=7'4, CaCl₂ 50 mM, ZnCl₂ 1 µM). Finalmente, teñimos el gel con 0'5% Coomassie blue G250 y lo desteñimos con una solución de 10% ácido acético y 30% etanol.

Tomamos las imágenes en un transiluminador y cuantificamos el área degradada por la actividad proteolítica utilizando ImageJ. Para normalizar utilizamos la cuantificación proteica del lisado celular de las células sembradas.

1.9.- Inmunofluorescència *in vitro*.

Las células tratados con anticuerpos inmunofluorescentes fueron inicialmente fijadas con paraformaldehido (PFA) al 4% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, bloqueamos y permeabilizamos las células con suero normal de caballo (NHS) al 10% en PBS-Tritón 0,1 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. En la inmunodetección utilizamos como anticuerpos primarios anti-GFP (Invitrogen) (1:1000) hecho en conejo, y como anticuerpos secundarios anti-conejo (Alexa 488) (1:1000) hecho en cabra. Los núcleos fueron marcados con DAPI 0,04 mg/ml. Los anticuerpos primarios se incubaron en agitación a 4°C durante toda la noche mientras

que los secundarios fueron incubados en agitación a temperatura ambiente durante una hora. Las imágenes de inmunofluorescencia se tomaron con un microscopio Nikon E800 equipado con la cámara Olympys DP72.

1.10.- Western Blot.

En el *Western blot* donde confirmamos la expresión del DN: H3TM- GFP (Figura 63A), sembramos 2×10^6 células en placas de 10 cm y las lisamos utilizando el tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tritón 1% i Glicerol 10%, pH 7,3), suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas *Complete*® (Roche). Después desnaturalizamos las muestras con β -mercaptoetanol y las fraccionamos por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 12%. Las proteínas fraccionadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema *Trans Blot Electrophoresis Cell* (Biorad). Para la inmunodetección utilizamos en las células U373 Control y U373 Stx1a-H3TM, los anticuerpos primarios anti-GFP (Invitrogen) (1:1000) de conejo, y el anticuerpo secundario anti-conejo-HRP (Dako) (1:2500).

2.- Experimental *in vivo*.

2.1.- Inoculación de células tumorales en el cerebro de ratones.

La inoculación de células tumorales en el cerebro de ratos inmunodeprimidos fué realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. Joan Seoane en el Instituto de investigación Vall d'Hebron (Barcelona, España). Todos los experimentos fueron aprobados y realizados bajos la regulación del “Comité de trabajo con animales” del instituto de investigación del Vall d'Hebron en acuerdo con las directrices de la Unión Europea.

1·10⁶ células fueron inoculadas estereotácticamente en el *corpus striatum* del hemisferio cerebral derecho de los ratones (1 mm anterior y 1.8 mm lateral respecto al bregma; 2.5 mm intraparenquimal). Los ratones eran ratones atímicos Nude-*Foxn1^{mu}* (Charles River Laboratories) con 9 semanas de edad. Las líneas celulares inyectadas fueron las U373 control y U373-Stx1-DN.

Los ratones fueron sacrificados cuando presentaron síntomas neurológicos o una pérdida significativa de peso. De cara a estimar el tamaño de los tumores, cuantificamos la señal de luciferasa de las células inyectadas utilizando una cámara Xenogen-CCD de IVIS.

2.2.- Experimentos de incorporación de BrdU.

Una única dosis de BrdU (100 mg/Kg in PBS) se les inyectó intraperitonealmente a los animales una hora antes de la perfusión cardíaca. Los animales fueron perfundidos con 4% PFA en PBS. Los cerebros fueron extraídos, fijados de nuevo en 4 % PFA a 4°C durante 24-48 horas y posteriormente crioprotegidos en una solución PBS-30% sacarosa, congelados en metileno butano frío y guardados a -80°C.

Para su estudio histológico los cerebros fueron cortados en criosecciones seriadas de 40 µm. En el caso de los ensayos con BrdU, adicionalmente para que la inmunofluorescencia el antígeno de BrdU fuera expuesta se incubó las secciones en 1N HCl a 45°C durante 30 minutos.

Utilizamos el anticuerpo de rata anti-BrdU (AbD Serotec) y de ratón anti-GFP (Invitrogen) como anticuerpos primarios. Las secciones se incubaron durante 48 horas a 4°C con los anticuerpos primarios en (EN PBS-NHS 5%), y luego incubados con los anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS, las secciones se montaron con Mowiol. Se tomaron imágenes confocales con un microscopio LEICA SP2 y fueron analizadas utilizando ImageJ.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E.L., Li, Y., Burns, D.K., Alvarez-Buylla, A., and Parada, L.F. (2009). Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* *15*, 45–56.
- Andrews, G.L., Tanglao, S., Farmer, W.T., Morin, S., Brotman, S., Berberoglu, M.A., Price, H., Fernandez, G.C., Mastick, G.S., Charron, F., et al. (2008). Dscam guides embryonic axons by Netrin-dependent and -independent functions. *Development* *135*, 3839–3848.
- Anido, J., Sáez-Borderías, A., González-Juncà, A., Rodón, L., Folch, G., Carmona, M.A., Prieto-Sánchez, R.M., Barba, I., Martínez-Sáez, E., Prudkin, L., et al. (2010). TGF- β Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* *18*, 655–668.
- Arakawa, H. (2004). Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 978–987.
- Araujo, S.J., and Tear, G. (2003). Axon guidance mechanisms and molecules: lessons from invertebrates. *Nat Rev Neurosci* *4*, 910–922.
- Ayoob, J.C., Terman, J.R., and Kolodkin, A.L. (2006). *Drosophila* Plexin B is a Sema-2a receptor required for axon guidance. *Development* *133*, 2125–2135.
- Bate, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* *110*, 791–804.
- Bellail, A.C., Hunter, S.B., Brat, D.J., Tan, C., and Van Meir, E.G. (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 1046–1069.
- Bernet, A., Mazelin, L., Coissieux, M.-M., Gadot, N., Ackerman, S.L., Scoazec, J.-Y., and Mehlen, P. (2007). Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* *133*, 1840–1848.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* *68*, 729–777.
- Bhat, K.M. (2005a). Slit-roundabout signaling neutralizes netrin-Frazzled-mediated attractant cue to specify the lateral positioning of longitudinal axon pathways. *Genetics* *170*, 149–159.
- Bhat, K.M. (2005b). Slit-roundabout signaling neutralizes netrin-Frazzled-mediated attractant cue to specify the lateral positioning of longitudinal axon pathways. *Genetics* *170*, 149–159.

- Bhat, K.M., Gaziouva, I., and Krishnan, S. (2007). Regulation of axon guidance by slit and netrin signaling in the *Drosophila* ventral nerve cord. *Genetics* *176*, 2235–2246.
- Bhattacharya, S., Stewart, B. a, Niemeyer, B. a, Burgess, R.W., McCabe, B.D., Lin, P., Boulianne, G., O’Kane, C.J., and Schwarz, T.L. (2002). Members of the synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) family in *Drosophila* are functionally interchangeable in vivo for neurotransmitter release and cell viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 13867–13872.
- Brand, a H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401–415.
- Broadie, K., Prokop, a, Bellen, H.J., O’Kane, C.J., Schulze, K.L., and Sweeney, S.T. (1995). Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in *Drosophila*. *Neuron* *15*, 663–673.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* *96*, 795–806.
- Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev. Cell* *12*, 671–682.
- Campos-Ortega, J. A., Hartenstein, V., (1985). The embrionic development of *Drosophila melanogaster*).
- Central Brain Tumor Registry of the United States (2008). (CBTRUS).
- Chan, S.S., Zheng, H., Su, M.W., Wilk, R., Killeen, M.T., Hedgecock, E.M., and Culotti, J.G. (1996). UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* *87*, 187–195.
- Chédotal, a, Kerjan, G., and Moreau-Fauvarque, C. (2005). The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers. *Cell Death Differ.* *12*, 1044–1056.
- Chen, Y.A., and Scheller, R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 98–106.
- Chilton, J.K. (2006). Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev. Biol.* *292*, 13–24.
- Colón-Ramos, D.A. (2009). Synapse formation in developing neural circuits. *Curr. Top. Dev. Biol.* *87*, 53–79.
- Cotrufo, T., Perez-Branguli, F., Muhaisen, A., Ros, O., Andres, R., Baeriswyl, T., Fuschini, G., Tarrago, T., Pascual, M., Urena, J., et al. (2011). A signaling mechanism coupling netrin-1/deleted in colorectal cancer chemoattraction to SNARE-mediated exocytosis in axonal growth cones. *J Neurosci* *31*, 14463–14480.

Cotrufo, T., Andres, R.M., Ros, O., Perez-Branguli, F., Muhaisen, A., Fuschini, G., Martinez, R., Pascual, M., Comella, J.X., and Soriano, E. (2012). Syntaxin 1 is required for DCC/Netrin-1-dependent chemoattraction of migrating neurons from the lower rhombic lip. *Eur J Neurosci* 36, 3152–3164.

Couchman, J.R. (2003). Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 926–937.

Crews, S.T., Thomas, J.B., and Goodman, C.S. (1988). The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. *Cell* 52, 143–151.

Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.-M., Guenebeaud, C., Pedeux, R., Firlej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., and Bernet, A. (2009a). Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 237–247.

Delloye-Bourgeois, C., Fitamant, J., Paradisi, A., Cappellen, D., Douc-Rasy, S., Raquin, M.-A., Stupack, D., Nakagawara, A., Rousseau, R., Combaret, V., et al. (2009b). Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J. Exp. Med.* 206, 833–847.

Dickinson, R.E., Dallol, A., Bieche, I., Krex, D., Morton, D., Maher, E.R., and Latif, F. (2004). Epigenetic inactivation of SLIT3 and SLIT1 genes in human cancers. *Br. J. Cancer* 91, 2071–2078.

Dickson, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959–1964.

Duffy, J.B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34, 1–15.

Dumartin, L., Quemener, C., Laklai, H., Herbert, J., Bicknell, R., Bousquet, C., Pyronnet, S., Castronovo, V., Schilling, M.K., Bikfalvi, A., et al. (2010). Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. *Gastroenterology* 138, 1595–606, 1606.e1–8.

Dunwell, T.L., Dickinson, R.E., Stankovic, T., Dallol, A., Weston, V., Austen, B., Catchpoole, D., Maher, E.R., and Latif, F. (2009). Frequent epigenetic inactivation of the SLIT2 gene in chronic and acute lymphocytic leukemia. *Epigenetics* 4, 265–269.

Evans, T.A., and Bashaw, G.J. (2010). Functional diversity of Robo receptor immunoglobulin domains promotes distinct axon guidance decisions. *Curr Biol* 20, 567–572.

Evans, A.R., Euteneuer, S., Chavez, E., Mullen, L.M., Hui, E.E., Bhatia, S.N., and Ryan, A.F. (2007). Laminin and fibronectin modulate inner ear spiral ganglion neurite outgrowth in an in vitro alternate choice assay. *Dev. Neurobiol.* 67, 1721–1730.

- Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R. V, Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., et al. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* *386*, 796–804.
- Fearon, E.R., Cho, K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J.W., Ruppert, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Thomas, G., and Kinzler, K.W. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* *247*, 49–56.
- Fitamant, J., Guenebeaud, C., Coissieux, M.-M., Guix, C., Treilleux, I., Scoazec, J.-Y., Bachelot, T., Bernet, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 4850–4855.
- Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E.A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., Ellisman, M.H., and Verma, I.M. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* *338*, 1080–1084.
- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., et al. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* *21*, 2683–2710.
- Germano, I., Swiss, V., and Casaccia, P. (2010). Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: where is the link? *Neuropharmacology* *58*, 903–910.
- Gröne, J., Doeblner, O., Loddenkemper, C., Hotz, B., Buhr, H.-J., and Bhargava, S. (2006). Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* *15*, 1437–1443.
- Halpern, M.E., Chiba, A., Johansen, J., and Keshishian, H. (1991). Growth cone behavior underlying the development of stereotypic synaptic connections in *Drosophila* embryos. *J Neurosci* *11*, 3227–3238.
- Hampel, S., Chung, P., McKellar, C.E., Hall, D., Looger, L.L., and Simpson, J.H. (2011). *Drosophila* Brainbow: a recombinase-based fluorescence labeling technique to subdivide neural expression patterns. *Nat Methods* *8*, 253–259.
- Han, C., Belenkaya, T.Y., Wang, B., and Lin, X. (2004). *Drosophila glypicans* control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process. *Development* *131*, 601–611.
- Harris, R., Sabatelli, L.M., and Seeger, M.A. (1996). Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* *17*, 217–228.
- Hidalgo, a, Urban, J., and Brand, a H. (1995). Targeted ablation of glia disrupts axon tract formation in the *Drosophila* CNS. *Development* *121*, 3703–3712.
- Hoelzinger, D.B., Mariani, L., Weis, J., Woyke, T., Berens, T.J., McDonough, W.S., Sloan, A., Coons, S.W., and Berens, M.E. (2005). Gene expression profile of

glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia* 7, 7–16.

Hu, H. (2001). Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. *Nat. Neurosci.* 4, 695–701.

Hussain, S.A., Piper, M., Fukuhara, N., Strohlic, L., Cho, G., Howitt, J.A., Ahmed, Y., Powell, A.K., Turnbull, J.E., Holt, C.E., et al. (2006). A molecular mechanism for the heparan sulfate dependence of slit-robo signaling. *J Biol Chem* 281, 39693–39698.

Ishii, N., Wadsworth, W.G., Stern, B.D., Culotti, J.G., and Hedgecock, E.M. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9, 873–881.

Jahn, R., and Südhof, T.C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 863–911.

Jan, H.-J., Lee, C.-C., Shih, Y.-L., Hueng, D.-Y., Ma, H.-I., Lai, J.-H., Wei, H.-W., and Lee, H.-M. (2010). Osteopontin regulates human glioma cell invasiveness and tumor growth in mice. *Neuro. Oncol.* 12, 58–70.

Johansen, J., Halpern, M.E., and Keshishian, H. (1989). Axonal guidance and the development of muscle fiber-specific innervation in *Drosophila* embryos. *J Neurosci* 9, 4318–4332.

Johnson, K.G., Ghose, A., Epstein, E., Lincecum, J., O'Connor, M.B., and Van Vactor, D. (2004). Axonal heparan sulfate proteoglycans regulate the distribution and efficiency of the repellent slit during midline axon guidance. *Curr Biol* 14, 499–504.

Kato, H., Zhou, Y., Asanoma, K., Kondo, H., Yoshikawa, Y., Watanabe, K., Matsuda, T., Wake, N., and Barrett, J.C. (2000). Suppressed tumorigenicity of human endometrial cancer cells by the restored expression of the DCC gene. *Br. J. Cancer* 82, 459–466.

Kean, M.J., Williams, K.C., Skalski, M., Myers, D., Burtnik, A., Foster, D., and Coppelino, M.G. (2009). VAMP3, syntaxin-13 and SNAP23 are involved in secretion of matrix metalloproteinases, degradation of the extracellular matrix and cell invasion. *J. Cell Sci.* 122, 4089–4098.

Keleman, K., and Dickson, B.J. (2001). Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron* 32, 605–617.

Kidd, T., Russell, C., Goodman, C.S., and Tear, G. (1998a). Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron* 20, 25–33.

Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Tear, G. (1998b). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92, 205–215.

- Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (1999). Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell* *96*, 785–794.
- Kolodziej, P.A., Timpe, L.C., Mitchell, K.J., Fried, S.R., Goodman, C.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). *frazzled* encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* *87*, 197–204.
- Lai, S.L., and Lee, T. (2006). Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nat Neurosci* *9*, 703–709.
- Lai Wing Sun, K., Correia, J.P., and Kennedy, T.E. (2011). Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* *138*, 2153–2169.
- Latil, A., Chêne, L., Cochant-Priollet, B., Mangin, P., Fournier, G., Berthon, P., and Cussenot, O. (2003). Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. *Int. J. Cancer* *103*, 306–315.
- Lee, T., and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* *22*, 451–461.
- Lerman, J.C., Robblee, J., Fairman, R., and Hughson, F.M. (2000). Structural analysis of the neuronal SNARE protein syntaxin-1A. *Biochemistry* *39*, 8470–8479.
- Levicar, N., Nuttall, R.K., Lah, T.T., and Nutall, R.K. (2003). Proteases in brain tumour progression. *Acta Neurochir. (Wien)*. *145*, 825–838.
- Liu, L., Wu, J., Ying, Z., Chen, B., Han, A., Liang, Y., Song, L., Yuan, J., Li, J., and Li, M. (2010). Astrocyte elevated gene-1 upregulates matrix metalloproteinase-9 and induces human glioma invasion. *Cancer Res.* *70*, 3750–3759.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* *114*, 97–109.
- Low, S.H., Li, X., Miura, M., Kudo, N., Quiñones, B., and Weimbs, T. (2003). Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells. *Dev. Cell* *4*, 753–759.
- Lowery, L.A., and Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 332–343.
- Maness, P.F., and Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* *10*, 19–26.
- Marlow, R., Strickland, P., Lee, J.S., Wu, X., Pebenito, M., Binnewies, M., Le, E.K., Moran, A., Macias, H., Cardiff, R.D., et al. (2008). SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. *Cancer Res.* *68*, 7819–7827.

- Mattson, M.P., Dou, P., and Kater, S.B. (1988). Outgrowth-regulating actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* *8*, 2087–2100.
- Mazelin, L., Bernet, A., Bonod-Bidaud, C., Pays, L., Arnaud, S., Gespach, C., Bredesen, D.E., Scoazec, J.-Y., and Mehlen, P. (2004). Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* *431*, 80–84.
- McIntire, S.L., Garriga, G., White, J., Jacobson, D., and Horvitz, H.R. (1992). Genes necessary for directed axonal elongation or fasciculation in *C. elegans*. *Neuron* *8*, 307–322.
- McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R.J., Paz, K., Paumet, F., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* *407*, 153–159.
- Mehlen, P., and Fearon, E.R. (2004). Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J. Clin. Oncol.* *22*, 3420–3428.
- Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., and Chedotal, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer* *11*, 188–197.
- Ming, G.L., Song, H.J., Berninger, B., Holt, C.E., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M.M. (1997). cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* *19*, 1225–1235.
- Mitchell, K.J., Doyle, J.L., Serafini, T., Kennedy, T.E., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Dickson, B.J. (1996). Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* *17*, 203–215.
- Moussian, B., Veerkamp, J., Müller, U., and Schwarz, H. (2007). Assembly of the *Drosophila* larval exoskeleton requires controlled secretion and shaping of the apical plasma membrane. *Matrix Biol.* *26*, 337–347.
- Nakada, M., Nakada, S., Demuth, T., Tran, N.L., Hoelzinger, D.B., and Berens, M.E. (2007). Molecular targets of glioma invasion. *Cell. Mol. Life Sci.* *64*, 458–478.
- Nakada, M., Anderson, E.M., Demuth, T., Nakada, S., Reavie, L.B., Drake, K.L., Hoelzinger, D.B., and Berens, M.E. (2010). The phosphorylation of ephrin-B2 ligand promotes glioma cell migration and invasion. *Int. J. Cancer* *126*, 1155–1165.
- Nakayama, T., Mikoshiba, K., Yamamori, T., and Akagawa, K. (2003). Expression of syntaxin 1C, an alternative splice variant of HPC-1/syntaxin 1A, is enhanced by phorbol-ester stimulation in astrogloma: participation of the PKC signaling pathway. *FEBS Lett.* *536*, 209–214.
- Nakayama, T., Kamiguchi, H., and Akagawa, K. (2012). Syntaxin 1C, a soluble form of syntaxin, attenuates membrane recycling by destabilizing microtubules. *J. Cell Sci.* *125*, 817–830.
- Narayan, G., Goparaju, C., Arias-Pulido, H., Kaufmann, A.M., Schneider, A., Dürst, M., Mansukhani, M., Pothuri, B., and Murty, V. V. (2006). Promoter hypermethylation-

- mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. *Mol. Cancer* 5, 16.
- Nüsslein-Volhard, C., Wiechaus, E., and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193, 267–283.
- Pasquale, E.B. (2010). Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10, 165–180.
- Peñuelas, S., Anido, J., Prieto-Sánchez, R.M., Folch, G., Barba, I., Cuartas, I., García-Dorado, D., Poca, M.A., Sahuquillo, J., Baselga, J., et al. (2009). TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 15, 315–327.
- Perrimon, N., and Bernfield, M. (2000). Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* 404, 725–728.
- Rajagopalan, S., Nicolas, E., Vivancos, V., Berger, J., and Dickson, B.J. (2000a). Crossing the midline: roles and regulation of Robo receptors. *Neuron* 28, 767–777.
- Rajagopalan, S., Vivancos, V., Nicolas, E., and Dickson, B.J. (2000b). Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell* 103, 1033–1045.
- Ramón y Cajal, S., (1900). La retina de los mamíferos.
- Ramón y Cajal, S., (1905). Estructura de los nervios de las aves.
- Raper, J., and Mason, C. (2010). Cellular strategies of axonal pathfinding. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001933.
- Rawson, J.M., Dimitroff, B., Johnson, K.G., Ge, X., Van Vactor, D., and Selleck, S.B. (2005). The heparan sulfate proteoglycans Dally-like and Syndecan have distinct functions in axon guidance and visual-system assembly in *Drosophila*. *Curr Biol* 15, 833–838.
- Rizo, J., and Südhof, T.C. (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 641–653.
- Rizo, J., and Südhof, T.C. (2012). The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices--guilty as charged?
- Rothberg, J.M., Jacobs, J.R., Goodman, C.S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* 4, 2169–2187.
- Sánchez-Soriano, N., Tear, G., Whittington, P., and Prokop, A. (2007). *Drosophila* as a genetic and cellular model for studies on axonal growth. *Neural Dev.* 2, 9.

- Schrader, J., Deuster, O., Rinn, B., Schulz, M., Kautz, A., Dodel, R., Meyer, B., Al-Abed, Y., Balakrishnan, K., Reese, J.P., et al. (2009). Restoration of contact inhibition in human glioblastoma cell lines after MIF knockdown. *BMC Cancer* 9, 464.
- Schulze, K.L., and Bellen, H.J. (1996). *Drosophila* syntaxin is required for cell viability and may function in membrane formation and stabilization. *Genetics* 144, 1713–1724.
- Schulze, K.L., Broadie, K., Perin, M.S., and Bellen, H.J. (1995a). Genetic and electrophysiological studies of *Drosophila* syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. *Cell* 80, 311–320.
- Schulze, K.L., Broadie, K., Perin, M.S., and Bellen, H.J. (1995b). Genetic and electrophysiological studies of *Drosophila* syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. *Cell* 80, 311–320.
- Schwabiuk, M., Coudiere, L., and Merz, D.C. (2009). SDN-1/syndecan regulates growth factor signaling in distal tip cell migrations in *C. elegans*. *Dev Biol* 334, 235–242.
- Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409–424.
- Shin, S.K., Nagasaka, T., Jung, B.H., Matsubara, N., Kim, W.H., Carethers, J.M., Boland, C.R., and Goel, A. (2007). Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology* 133, 1849–1857.
- Simpson, J.H., Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (2000a). Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28, 753–766.
- Simpson, J.H., Bland, K.S., Fetter, R.D., and Goodman, C.S. (2000b). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* 103, 1019–1032.
- Sink, H., and Whitington, P.M. (1991). Pathfinding in the central nervous system and periphery by identified embryonic *Drosophila* motor axons. *Development* 112, 307–316.
- Smart, A.D., Course, M.M., Rawson, J., Selleck, S., Van Vactor, D., and Johnson, K.G. (2011). Heparan sulfate proteoglycan specificity during axon pathway formation in the *Drosophila* embryo. *Dev Neurobiol* 71, 608–618.
- Smith, S.J. (2007). Circuit reconstruction tools today. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 601–608.
- Song, H., and Poo, M. (2001). The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol* 3, E81–8.

Spitzweck, B., Brankatschk, M., and Dickson, B.J. (2010). Distinct protein domains and expression patterns confer divergent axon guidance functions for *Drosophila* Robo receptors. *Cell* *140*, 409–420.

Steigemann, P., Molitor, A., Fellert, S., Jackle, H., and Vorbruggen, G. (2004a). Heparan sulfate proteoglycan syndecan promotes axonal and myotube guidance by slit/robo signaling. *Curr Biol* *14*, 225–230.

Steigemann, P., Molitor, A., Fellert, S., Jackle, H., and Vorbruggen, G. (2004b). Heparan sulfate proteoglycan syndecan promotes axonal and myotube guidance by slit/robo signaling. *Curr Biol* *14*, 225–230.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 987–996.

Südhof, T.C., and Rothman, J.E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* *323*, 474–477.

Tanikawa, C., Matsuda, K., Fukuda, S., Nakamura, Y., and Arakawa, H. (2003). p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* *5*, 216–223.

Tchaicha, J.H., Reyes, S.B., Shin, J., Hossain, M.G., Lang, F.F., and McCarty, J.H. (2011). Glioblastoma angiogenesis and tumor cell invasiveness are differentially regulated by β 8 integrin. *Cancer Res.* *71*, 6371–6381.

Tear, G., Harris, R., Sutaria, S., Kilomanski, K., Goodman, C.S., and Seeger, M.A. (1996). commissureless controls growth cone guidance across the CNS midline in *Drosophila* and encodes a novel membrane protein. *Neuron* *16*, 501–514.

Teng, F.Y., Wang, Y., and Tang, B.L. (2001). The syntaxins. *Genome Biol* *2*, REVIEWS3012.

Thiagalingam, S., Lengauer, C., Leach, F.S., Schutte, M., Hahn, S.A., Overhauser, J., Willson, J.K., Markowitz, S., Hamilton, S.R., Kern, S.E., et al. (1996). Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat. Genet.* *13*, 343–346.

Thomas, J.B., Crews, S.T., and Goodman, C.S. (1988). Molecular genetics of the single-minded locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* *52*, 133–141.

Toonen, R.F.G., and Verhage, M. (2003). Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol.* *13*, 177–186.

Vactor, D. V, Sink, H., Fambrough, D., Tsoo, R., and Goodman, C.S. (1993). Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell* *73*, 1137–1153.

- Veale, K.J., Offenhäuser, C., Whittaker, S.P., Estrella, R.P., and Murray, R.Z. (2010). Recycling endosome membrane incorporation into the leading edge regulates lamellipodia formation and macrophage migration. *Traffic* *11*, 1370–1379.
- Vilinsky, I., Stewart, B.A., Drummond, J., Robinson, I., and Deitcher, D.L. (2002). A *Drosophila* SNAP-25 null mutant reveals context-dependent redundancy with SNAP-24 in neurotransmission. *Genetics* *162*, 259–271.
- Werbowski-Ogilvie, T.E., Seyed Sadr, M., Jabado, N., Angers-Loustau, A., Agar, N.Y.R., Wu, J., Bjerkgvig, R., Antel, J.P., Faury, D., Rao, Y., et al. (2006). Inhibition of medulloblastoma cell invasion by Slit. *Oncogene* *25*, 5103–5112.
- Wu, Z., Sweeney, L.B., Ayoob, J.C., Chak, K., Andreone, B.J., Ohyama, T., Kerr, R., Luo, L., Zlatic, M., and Kolodkin, A.L. (2011). A combinatorial semaphorin code instructs the initial steps of sensory circuit assembly in the *Drosophila* CNS. *Neuron* *70*, 281–298.
- Xian, J., Clark, K.J., Fordham, R., Pannell, R., Rabbitts, T.H., and Rabbitts, P.H. (2001). Inadequate lung development and bronchial hyperplasia in mice with a targeted deletion in the *Dutt1/Robo1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 15062–15066.
- Yiin, J.-J., Hu, B., Jarzynka, M.J., Feng, H., Liu, K.-W., Wu, J.Y., Ma, H.-I., and Cheng, S.-Y. (2009). Slit2 inhibits glioma cell invasion in the brain by suppression of Cdc42 activity. *Neuro. Oncol.* *11*, 779–789.
- Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Rao, Y., and Wu, J.Y. (2009). Deubiquitinating enzyme USP33/VDU1 is required for Slit signaling in inhibiting breast cancer cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 14530–14535.
- Zou, Y., and Lyuksyutova, A.I. (2007). Morphogens as conserved axon guidance cues. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 22–28.

