

**ESTUDIO DEL ESTABLECIMIENTO DE
LA POLARIDAD EPITELIAL:
BÚSQUEDA DE NUEVAS PROTEÍNAS
QUE INTERACCIONAN CON α PKC**

**Francisco Javier Calero Cuenca
TESIS DOCTORAL
Sevilla, 2015**

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

**DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA, INGENIERÍA Y
TECNOLOGÍA QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD EPITELIAL:
BÚSQUEDA DE NUEVAS PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON aPKC**

TESIS DOCTORAL

Francisco Javier Calero Cuenca, 2015

Foto de portada: Imagen de confocal de un disco de ala teñido con aPKC (azul), que marca la membrana subapical y sobreexpresando Nuf S155A en la región posterior con la línea HhG4 (naranja y blanco en las zonas de mayor expresión).

Imagen de contraportada: Composición con las 50 palabras más repetidas en esta tesis formando la silueta de *Drosophila*. El tamaño de las palabras está en relación con el número de veces que aparece la palabra en el texto de esta tesis.



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

Proyecto del Plan Nacional I+D de investigación con título “Estudio del establecimiento de la polaridad epitelial: Búsqueda de nuevas proteínas que interaccionan con aPKC”, con referencia: BFU2010-15851 y con la Ayuda de Formación de Personal Investigador asociada: BES-2011-043430. Ministerio de Economía y Competitividad. Gobierno de España.

La doctora Sol Sotillos Martín, investigadora asociada en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD) de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, como directora de la Tesis Doctoral

CERTIFICA

Que el trabajo presentado por el licenciado Francisco Javier Calero Cuenca titulado “Estudio del establecimiento de la polaridad epitelial: búsqueda de nuevas proteínas que interaccionan con aPKC” ha sido realizado bajo su dirección y supervisión, y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y calidad necesarias para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Y para que así conste, expide el presente certificado.

Directora:

Doctorando:

Sol Sotillos Martín

Francisco J. Calero Cuenca

Agradecimientos

Después de tanto esfuerzo, es un placer llegar a este momento y poder agradecer a todas las personas que han ayudado a la realización de esta tesis. Han sido muchos los momentos vividos, buenos y no tan buenos, pero en todos ellos he tenido la suerte de contar con grandes personas que me han ayudado siempre. A todos y todas, muchas gracias.

Gracias a Sol, por apostar por mí para llevar a cabo tu proyecto e involucrarte de lleno en él durante toda la tesis. Por tu paciencia mientras daba mis primeros pasos en el laboratorio y por inculcarme el orden y la disciplina necesarios para desarrollar un trabajo científico. Hemos trabajado codo con codo para sacar adelante esta tesis y aunque no siempre ha sido fácil, creo que hemos hecho un buen equipo.

Gracias también a Jaime Hombría y Juan Ramón Martínez por vuestro apoyo constante. Vuestros consejos y aportaciones me han sido de gran ayuda tanto a nivel profesional como personal. Y especialmente a Joaquín Cullí, tus ideas, recomendaciones y consejos han sido esenciales para este proyecto y para mi formación.

A Jorge Moscat y María Teresa Díaz Mecó por acogerme unos meses en su laboratorio y por hacerme sentir como en casa a pesar de estar tan lejos de ella. Gracias por colaborar en el proyecto y por permitirme vivir una experiencia que no olvidaré. Gracias también a Miguel Reina por tu ayuda con los experimentos y por hacer de anfitrión en San Diego, buena suerte con tu tesis.

A todas y cada una de las personas que han pasado por el laboratorio 143 durante estos casi 5 años. Gracias a Silvia, Jose, Marisa, Carlos, M^a Carmen, Patri, Pedro y Sara. Gracias por vuestros consejos, por hacer que las infinitas horas pasadas en el laboratorio parezcan menos y por vuestro apoyo con los experimentos, especialmente a Jose por tu siempre disposición. Gracias también a Pako y Mario, ambos merecen mención especial. Gracias Pako por tus sabios consejos, nuestras largas conversaciones y tu confianza. Me has sido de gran ayuda tanto en el aspecto experimental de la tesis como en otros aspectos fundamentales para el día a día del becario, sin olvidar los milagros y casos paranormales de los que hemos sido partícipes. Contigo era muy fácil hablar de cualquier cosa e incluso confesar las mayores pifias en el laboratorio con total tranquilidad. A Mario gracias por ayudarme y aconsejarme desde el primer día que llegué al laboratorio. Muchas han sido las risas y confesiones en la sala de moscas y recogiendo embriones al final de la tarde. Rápidamente pasamos de compañeros a grandes amigos, como hermanos. Ahora son muchos más los recuerdos de fuera que de dentro del laboratorio. Me alegra saber que hacer esta tesis me ha servido para encontrar un amigo de los de verdad y para toda la vida.

Gracias a Sofi, Elena, Ana, David, Helena, Kathy, Juan y Miriam, compañeros y amigos del *Coffee Time*. Gracias por esas charlas de desconexión en los sofás y por vuestra amistad fuera de ellos. En mi memoria quedarán grabadas las navidades adelantadas, la visita a Casariche o las cervecitas con David, un tío de bien, después de “machacarnos” en el gimnasio. A Kathy gracias también por tu ayuda con los microscopios, siempre dispuesta a resolver problemas,

es una tranquilidad tenerte cerca. Gracias especiales a Miriam, la vecina del 142. Desde Ibiza hasta Los Ángeles, pasando por Isla Cristina y dejando algún hueco para hacer una tesis, has sido una compañera fantástica de este emocionante viaje.

Gracias a Marta, Diana y M^a Ángeles, las chicas del ocelo y ojo compuesto. A los bioinformáticos Ibai, David y Juan Carlos. A John, María, Juanjo, Bea, Alfonsa, Blanca y Carlos, compañeros del día a día en el CABD. A Laura “Proteómica”, consejera del Camino, gracias por tu ayuda y tu alegría eterna. Sabes sacar una sonrisa cuando parece imposible y eso se agradece. A todos gracias por hacerme sentir a gusto en el trabajo y compartir buenos momentos conmigo dentro y fuera del CABD.

Gracias a las chicas millonarias, M^a Carmen, Corín, Machupi, Fátima y Sandra. Igual no nos toca ningún premio, pero al menos nos hemos echado unas risas. Gracias por preocuparos por mí y apoyarme sobre todo en los últimos meses de tesis.

Gracias a todo el personal que forma parte del CABD, desde administración hasta cocinas y conserjería. Gracias por facilitarme el trabajo durante todos estos años. Especialmente a Carmen, por su eficacia y buen hacer. Te he puesto en algún que otro aprieto administrativo y siempre me has ayudado a resolverlo.

A Eloy, Damián y especialmente a Carlos, amigos “biotec”. Gracias por acompañarme durante todo este tiempo y ser uno de mis chalecos salvavidas para desconectar del mundo tesis. Vamos sumando anécdotas y las que quedan por venir. Aunque a veces reneguemos de la biotecnología, le estaré eternamente agradecido por haber hecho posible nuestra amistad.

Gracias también a Mel, Malín, Primo e Inma. Gracias a vosotros los fines de semana en Villa son mejores. Estos años han hecho que de lo bueno, me vaya quedando con lo mejor, y con vosotros me quedo.

A María, Encarna y especialmente a Andrea, habitantes de Orientfell. Gracias por hacer que llegar a casa cada día sea una total desconexión. Gracias por soportarme en mis momentos de estrés, por las cenas en la terraza, las sesiones de cine en la zona *chill out* y sobre todo por el “peregrinismo” que reina en el 606.

Y gracias por supuesto a mi familia. Gracias a mis padres, mi hermano y mi hermana. Siempre estáis ahí, aconsejándome y ayudándome. Gracias por educarme, enseñarme la importancia del esfuerzo y apoyarme en cada decisión que he tomado. Aunque tenga un espíritu independiente y aventurero, sé que con vosotros, siempre tengo una red bajo los pies ante cualquier caída. Gracias mamá, por tu apoyo constante e incondicional; no dudes que sin ti no habría llegado hasta aquí.

Abreviaturas

AEE	Apical Early Endosomes (Endosomas Tempranos Apicales)
aPKC	atypical Protein Kinase C (Proteína Quinasa atípica C)
ARE	Apical Recycling Endosomes (Endosomas de Reciclaje Apicales)
ATP	Adenosine Triphosphate (Adenosín Trifosfato)
Baz	Bazooka
BEE	Basolateral Early Endosomes (Endosomas Tempranos Basolaterales)
BSA	Bovine Serum Albumine (Albúmina de Suero Bovina)
CBP	Calmodulin Binding Protein (Proteína de Unión a Calmodulina)
CoIP	Co-Immunoprecipitación
Cora	Coracle
Crb	Crumbs
DAG	Diacilglicerol
Dlg	Discs large
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
DQuin	Dominio Quinasa
DReg	Dominio Regulador
DTT	Dithiothreitol (Ditiotreitol)
Ecad	E-Cadherin (Cadherina E)
Ed	Echinoid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (Ácido etildiaminotetraacético)
en	<i>engrailed</i>
FIP	Family Interacting Protein (Familia de Proteínas de Interacción)
for	forward
GFP	Green Fluorescence Protein (Proteína Fluorescente Verde)
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase 3 β (Quinasa Glucógeno Sintasa 3 β)
Hh	Hedgehog
HTT	Huntingtina
IGg	Inmunoglobulina G
Lam0	Lámina 0
LE	Late Endosomes (Endosomas Tardíos)
Lgl	Lethal giant larvae
M	Molar
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mM	miliMolar

MMP1	Matrix Metalloproteinase-1 (Metaloproteínasa de Matriz 1)
MTOC	Microtubule-Organizing Center (Centro Organizador de Microtúbulos)
Npl4	Nuclear protein localización 4 (proteína de localización nuclear 4)
Nuf	Nuclear fallout
PBS	Phosphatase Buffer Saline (Tampón Fosfatasa Alcalino)
PBT	PBS Tween
PD	Pull Down
PNBM	p-Nitrobenzyl Mesylate (Mesilato de p-Nitrobencilo)
PS	Pseudosubstrato
RBD	Rab Binding Domain (Dominio de Unión a Rab)
RE	Recycling Endosomes (Endosomas de Reciclaje)
rev	reverse
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
RNAi	interference RNA (RNA de interferencia)
Sal	Spalt
Scrib	Scribble
Sdt	Stardust
SOP	Sensory Organ Precursors (Precusores del Órgano Sensorial)
Syx	Syntaxina
TA	Temperatura Ambiente
TAP	Tandem Affinity Purification (Purificación por Afinidad en Tándem)
TEV	Tobacco Etch Virus (Virus del Mosaico del Tabaco)
TGN	Trans-Golgi Network (Red del trans-Golgi)
TNFα	Tumor Necrosis Factor α (Factor de Necrosis Tumoral α)
TT	TetraTag
U	Unidad
VAC	Vacuolar Apical Cluster (Agrupación Vacuolar Apical)
VTC	Vesicular Tubular Clusters (Agrupaciones Vesiculares Tubulares)
β-Coat	β -Coatómero
μg	microgramo
μl	microlitro
μm	micrómetro

Índice

RESUMEN/SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	7
1. Polaridad Celular Epitelial	9
<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio de la polaridad epitelial	9
Establecimiento de la polaridad apico-basolateral epitelial	12
2. Tráfico Vesicular Intracelular	17
Tráfico polarizado	17
Rab11 y los Endosomas de Reciclaje (RE)	19
Nuclear fallout (Nuf)	22
3. aPKC	24
Estructura molecular de aPKC	24
Versatilidad funcional de aPKC	25
Tráfico intracelular, polaridad epitelial y aPKC	27
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Cepas de <i>Drosophila</i>	37
Líneas UAS/Gal4	37
Cepas mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i>	38
Otras cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	39
Generación de clones de falta de función	39
Generación de clones de expresión (Clones <i>flp-out</i>)	40
2. Inmunohistoquímica	41
Tinción de embriones y discos imaginales	41
Tinción de células humanas	42
Cuantificación de la tinción de anticuerpo	42
3. Biología Molecular	42
Construcciones de plásmidos de sobreexpresión	42
Construcciones UAS	44
4. Bioquímica	45
Preparación de extractos	45
Preparación de Dynabeads® recubiertas con Inmunoglobulina G (IgG)	45
Purificación por afinidad	46
Ensayos de afinidad dominios quinasa de aPKC y GST-Nuf	47
Preparación de esferas GST	48
Producción de anticuerpo contra Nuf	49
Ensayos de afinidad proteína-proteína (Pull Down)	50
Pull Down (PD) in vitro	51
Co-inmunoprecipitación	51
Ensayos de fosforilación	52
Identificación de los residuos de fosforilación de Nuf por aPKC	52
5. Tampones	53

6. Anticuerpos	56
7. Cebadores	57
RESULTADOS	59
1. Búsqueda de Proteínas que Interaccionan con aPKC.	61
2. Análisis de los Candidatos	70
Análisis de la interacción entre Npl4 y Lam0 con aPKC	73
Análisis de la interacción entre β -Coatómero y aPKC	75
Análisis de la interacción entre Syx y aPKC	76
Análisis de la interacción entre Nuf y aPKC	78
Resumen del análisis de los candidatos	79
3. Análisis de la Interacción aPKC-Nuf	81
Estudio de la interacción física entre aPKC y las proteínas Nuf y Rip11	81
<i>aPKC y Nuf interaccionan directamente a través del dominio quinasa de aPKC y la mitad NH de Nuf</i>	81
<i>Nuf interacciona con aPKC solo en su estado activo</i>	83
<i>La fosforilación de aPKC se produce en una serina de la mitad N-terminal de Nuf</i>	84
<i>Análisis de la interacción entre aPKC y Rip11</i>	86
Estudio genético y funcional de la interacción de aPKC con Nuf y Rip11	87
<i>La falta de aPKC y de Rip11 produce un fenotipo similar a la falta de función de Nuf durante la celularización del embrión</i>	87
<i>aPKC regula la localización subcelular de Nuf y Rip11</i>	89
<i>La falta de Nuf reduce los niveles de aPKC en la membrana</i>	90
<i>La acumulación de Nuf en el disco imaginal de ala es específica de aPKC</i>	91
<i>La fosforilación de Nuf por aPKC en la Ser155 evita la localización de Nuf en la membrana subapical</i>	95
<i>La unión de Nuf con sus principales interactores es independiente de la fosforilación por aPKC</i>	99
<i>La versión no fosforilable de Nuf aumenta los niveles de aPKC en la membrana apical</i>	101
<i>aPKC es reciclada vía Nuf en el disco imaginal de ala</i>	106
4. Conservación Evolutiva de la Interacción aPKC-Nuf	109
FIP3 interacciona físicamente con aPKC y es fosforilado por aPKC	109
Estudio de la interacción FIP3-aPKC en células humanas	110
DISCUSIÓN	113
1. Purificación por afinidad en condiciones nativas	115
2. aPKC interacciona con Nuf y Rip11, proteínas adaptadoras de Rab11 en <i>Drosophila</i>	116
3. aPKC regula la localización subcelular de Nuf a través de su fosforilación	117
4. Nuf/Rip11 o cómo diferenciar el transporte apical del lateral	118
5. aPKC es reciclada vía Nuf-Rab11 en el disco imaginal de ala	121
6. La interacción aPKC-Nuf establece un ciclo de retroalimentación para mantener los niveles adecuados de aPKC en la membrana	122
7. Interacción aPKC-FIP3 y conservación evolutiva	125
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131

RESUMEN/SUMMARY

Las células eucarióticas presentan una distribución asimétrica de moléculas y orgánulos que genera diferentes regiones funcionales necesarias para la fisiología celular. La maquinaria de tráfico vesicular tiene un papel esencial en la formación de esta polaridad celular, estando ambos procesos regulados mutuamente para llevar a cabo los cambios en la morfología celular necesarios durante el desarrollo de un organismo. Dentro de la maquinaria de la polaridad celular, destaca la Proteína Quinasa C atípica (aPKC), una de las pocas quinasas implicada en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular. aPKC participa en procesos como migración, división celular, supervivencia o proliferación; estando implicada además en diversos tipos de cáncer. La actividad de aPKC está regulada por interacción con otras proteínas que modifican su localización y/o regulan su actividad quinasa. Además, aPKC fosforila a multitud de substratos modificando su compartimiento. Estos interactores de aPKC son diferentes dependiendo del proceso celular, de modo que encontrar nuevas proteínas que interactúen con aPKC resulta fundamental para entender mejor cómo funciona esta quinasa.

En este trabajo he realizado una búsqueda bioquímica de nuevas proteínas que interactúan con aPKC. Para ello he sobreexpresado en embriones de *Drosophila* la proteína aPKC fusionada a una serie de epítomos que me han permitido purificar complejos proteicos en condiciones nativas en los que aPKC participa. Usando esta metodología he aislado la proteína Nuclear fallout (Nuf) como un nuevo interactor de aPKC. Nuf es homólogo a Rab11-FIP3 de vertebrados y participa en el transporte de los endosomas de reciclaje (RE) a través de su interacción con Rab11 y las proteínas motoras Dineína y Kinesina. En esta tesis he demostrado que aPKC se une a Nuf directamente. Esta unión se produce entre la mitad N-terminal de Nuf y el dominio quinasa de aPKC, solo cuando está activa (autofosforilada). He identificado a Nuf como un nuevo substrato de aPKC. Dicha fosforilación se produce en la serina 155 y elimina la unión aPKC-Nuf, ya que la versión fosfomimética de Nuf (Nuf S155D) es incapaz de unirse a aPKC. En el disco imaginal de ala, cuyas células están altamente polarizadas en un eje apico-basal, he descubierto que la falta de función de aPKC produce una acumulación de Nuf y Rab11 en el córtex subapical, sugiriendo que aPKC afecta el tráfico de RE. Esto se debe al efecto de la fosforilación de aPKC en la localización subcelular de Nuf. La versión no fosforilable de Nuf (Nuf S155A) se acumula en la región subapical co-localizando con aPKC en la membrana plasmática, mientras que la versión fosfomimética Nuf S155D aparece en la región subapical pero evita el contacto con la membrana. También he observado que la sobreexpresión de Nuf S155A aumenta los niveles de aPKC en la membrana subapical, mientras que la falta de función de *nuf* produce una disminución de aPKC en la membrana, lo que sugiere un transporte de aPKC vía Nuf. Esto lo he corroborado al eliminar la función de Sec5, Sec6 o Rab11, componentes de la ruta de reciclaje. En estas condiciones, aPKC se acumula intracelularmente y desaparece de las uniones celulares.

Los resultados de este trabajo muestran la existencia de un reciclaje de aPKC en un tejido maduro, en el que aPKC es transportada hacia la membrana subapical vía Rab11-Nuf. Este reciclaje estaría regulado en una retroalimentación negativa por la propia aPKC, que fosforila a Nuf evitando su unión a la membrana.

Eukaryotic cells are polarized with an asymmetric distribution of molecules and organelles resulting in different functional regions required for cell physiology. The vesicle transport machinery has an important role regulating this polarity. Both processes are mutually regulated to achieve the morphological cell changes during organism development. Among cell polarity machinery, the atypical Protein Kinase C (aPKC), one of the few enzymes implicated in polarity establishment and maintenance, is highlighted. aPKC participates in processes such as migration, cell division, survival and cell proliferation. In addition, it is implicated in several human cancers. aPKC activity is regulated by interaction with other proteins that modify aPKC localization or kinase activity. Moreover, aPKC phosphorylates several substrates modifying their behaviour. Depending on the process, these aPKC interactors are quite different. Therefore, to find new proteins that interact with aPKC is essential to understand how this kinase works.

In this work I have performed a biochemical screen in order to discover new proteins that interact with aPKC. To do that I have overexpressed in *Drosophila* embryos a tagged version of aPKC allowing the purification of protein complexes in which aPKC participates. Using this technique I have identified Nuclear fallout (Nuf) as a new aPKC interactor. Nuf is homolog to Rab11-FIP3 in vertebrates and participates transporting recycling endosomes (RE) through interaction with Rab11 and the motor proteins Dynein and Kinesin. I have demonstrated aPKC interacts directly with Nuf. This interaction is between the N-terminal part of Nuf and the kinase domain of aPKC and occurs when it is active (autophosphorylated) only. I have identified Nuf as a substrate for aPKC, which phosphorylates serine 155. This phosphorylation abolishes aPKC-Nuf interaction, as a phosphomimetic version of Nuf (Nuf S155D) does not bind to aPKC. In the wing imaginal disc, which cells are polarized in an apical-basal axis, I have observed cells without aPKC accumulate Nuf and Rab11 in the subapical cortex, suggesting aPKC can affect RE trafficking. This is due to the phosphorylation effect of aPKC in Nuf subcellular distribution. The non-phosphorylatable version of Nuf (Nuf S155A) accumulates in the subapical region colocalizing with aPKC in the plasmatic membrane, whereas the phosphomimetic version Nuf S155D also appears in the subapical region but avoiding the membrane. I have also observed overexpression of Nuf S155A increases aPKC levels in the subapical membrane. However, *nuf* lack of function decreases aPKC levels in the membrane. This suggests an aPKC transport mediated by Nuf. I have corroborated this hypothesis affecting other recycling components, such as Sec5, Sec6 or Rab11. In these conditions, aPKC accumulates in the cytoplasm and it is lost from the cell junctions.

The results from this work show the existence of an aPKC recycling in an adult tissue. aPKC is transported to the subapical membrane via Rab11-Nuf. This recycling is regulated in a negative feedback loop by aPKC that phosphorylates Nuf avoiding its membrane binding.

INTRODUCCIÓN

1. Polaridad Celular Epitelial

Los seres vivos se caracterizan por realizar las funciones básicas de nutrición y crecimiento, relación con el medio y reproducción. La célula constituye la unidad básica de todos los seres vivos, siendo las responsables de ejercer dichas funciones. El número y variedad de células depende de la complejidad del organismo. En un organismo multicelular, las diferentes células que lo componen deben actuar tanto de manera independiente como en conjunto, interaccionando con el medio así como con otras células para generar y llevar a cabo las funciones de los diferentes tejidos y órganos.

Cada célula debe ser un engranaje perfecto en la que todos sus componentes actúen e interactúen de manera adecuada para poder llevar a cabo los procesos celulares que suceden en un organismo. Para ello, las células se encuentran altamente organizadas respecto a su composición intracelular y de su membrana plasmática, con una distribución asimétrica de orgánulos, proteínas, lípidos y otros componentes celulares que posibilita el correcto funcionamiento celular. Esta distribución asimétrica se denomina polaridad celular y durante las últimas décadas ha sido un foco importante de estudio debido a que se trata de un aspecto fundamental necesario para el correcto desarrollo de los organismos, estando además relacionada con diversas enfermedades humanas.

Uno de los ejemplos de polaridad celular más estudiados es el que presentan las células epiteliales, las cuales se organizan en un eje apico-basal. Esta distribución es esencial para las características y funciones propias de éstas células, tales como formar barreras entre compartimentos del organismo y el medio o el espacio interno, controlar la arquitectura tisular o la de generar conductos y canales esenciales para la función de ciertos órganos.

Drosophila melanogaster como modelo de estudio de la polaridad epitelial

Drosophila melanogaster presenta diversas ventajas que han hecho de este animal un organismo modelo utilizado en investigación desde principios del siglo XX. Por un lado, se trata de un animal pequeño, lo que ayuda a su mantenimiento en el laboratorio, con un ciclo de vida corto (aproximadamente 10 días a 25 °C, Fig. 1) y una abundante progenie, facilitando ambos la realización de estudios genéticos. Por otra parte, este animal resulta muy atractivo desde el punto de vista de la investigación debido a sus características genéticas. Presenta cuatro pares de cromosomas con apenas redundancia génica si comparamos con vertebrados, simplificando el estudio de la función de sus genes y además no se produce recombinación meiótica en machos. Asimismo, el 70% de los genes responsables de enfermedades humanas conocidas tienen ortólogos en *Drosophila*, haciendo posible la aplicación médica de resultados obtenidos en este organismo [1-3]. Por último, tantos años de uso de este animal en el laboratorio han proporcionado una gran cantidad de herramientas genéticas que permiten

fácilmente controlar y analizar la expresión y función de los genes de *Drosophila*.

Diversas búsquedas genéticas realizadas en *Drosophila melanogaster* han permitido identificar numerosos genes implicados en polaridad celular. Gran parte de esta maquinaria se ha conservado durante la evolución (revisado en [4-7]), lo que hace posible extrapolar los datos obtenidos en este organismo a vertebrados y humanos. Asimismo, *Drosophila melanogaster* se usa ampliamente en el estudio de la polaridad epitelial ya que presenta diferentes tejidos idóneos para ello como por ejemplo el tejido ectodérmico embrionario, el tejido epitelial folicular del ovario y el disco imaginal de ala (Fig. 1).

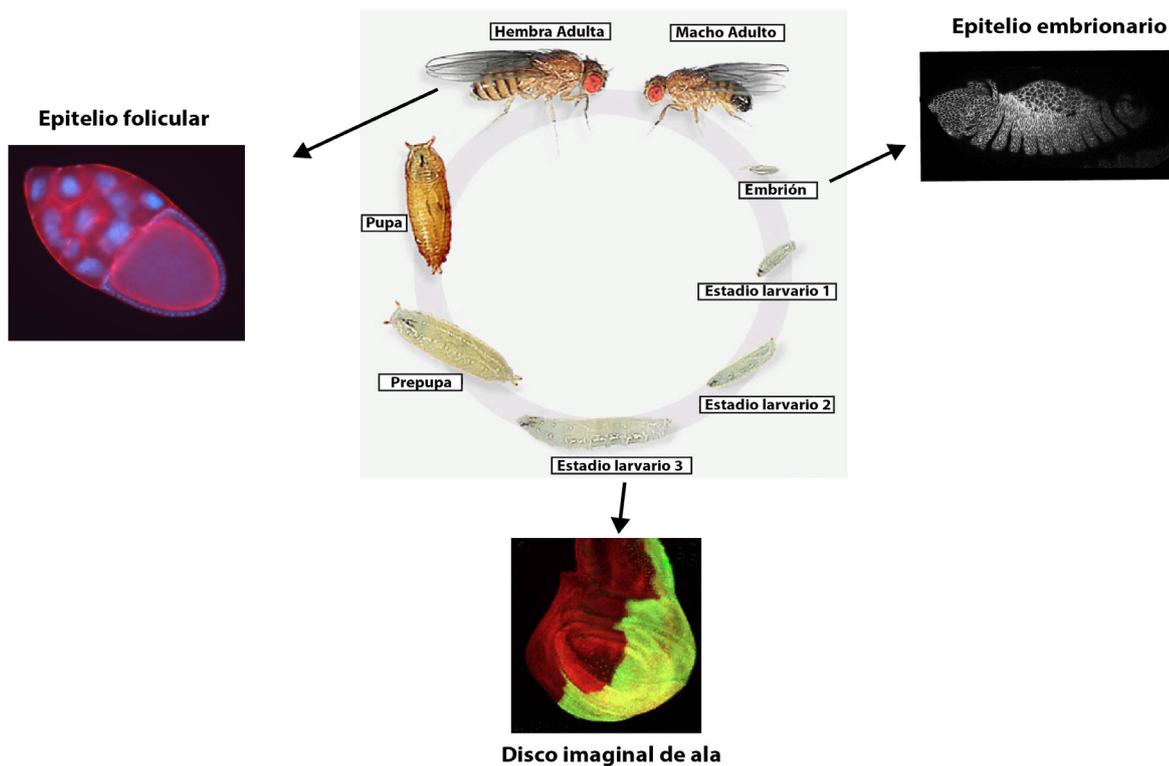


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* y tejidos epiteliales modelo. El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* consta de diversas etapas: embrión, larva 1, larva 2, larva 3, prepupa, pupa y adulto. Los tejidos más utilizados para el estudio de la polaridad epitelial son: el epitelio ectodérmico embrionario, el disco imaginal de ala (de larva 3) y el tejido folicular del ovario de la hembra adulta. Imagen del ciclo modificada de <http://flymove.uni-muenster.de>. Imagen del epitelio folicular del ovario modificada de [8].

Al inicio del desarrollo embrionario de *Drosophila*, el embrión sufre trece divisiones nucleares sincronizadas, sin producirse citoquinesis, lo cual genera una única célula con numerosos núcleos (embrión sincitial). De estas trece divisiones, las nueve primeras ocurren en el interior del embrión. Sin embargo, las cuatro siguientes suceden justo debajo de la membrana plasmática, para lo cual los núcleos migran hacia la periferia del embrión. Posteriormente, mediante un proceso de invaginación de la membrana plasmática, cada uno de estos núcleos forma una célula individual dando lugar a un blastodermo epitelial, primer tejido que se forma en el desarrollo y que dará lugar a los diferentes tejidos y órganos del embrión de

Drosophila [9].

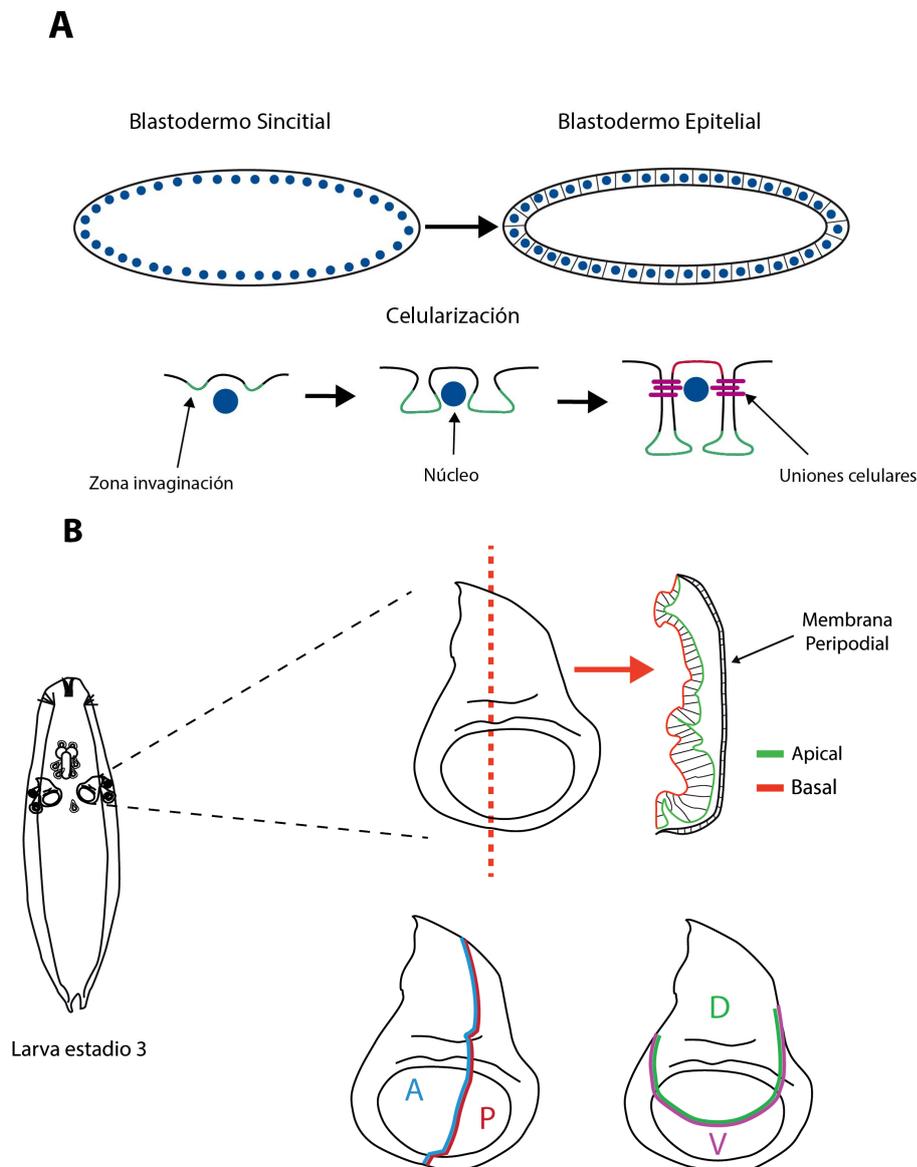


Figura 2. Representación esquemática del proceso de celularización y del disco imaginal de ala. A) En las primeras etapas del desarrollo embrionario de *Drosophila* el blastodermo sincitial pasa a formar un blastodermo epitelial por el proceso denominado celularización, donde cada núcleo genera una célula individual gracias a la invaginación de la membrana plasmática. Cada una de estas células presenta polaridad apico-basolateral una vez concluida la celularización. B) El disco imaginal de ala presente en larva 3 consiste en una monocapa pseudoestratificada de tejido epitelial y un epitelio peripodial. En el estadio 3 del desarrollo larvario el disco imaginal de ala se encuentra dividido en compartimentos (anterior, posterior, dorsal y ventral) debido a la expresión de genes específicos para cada uno de ellos.

Este proceso de celularización (Fig. 2, A) supone un modelo para el estudio del establecimiento de la polaridad epitelial, ya que se forma *de novo* un tejido donde se establece una polaridad en el eje apico-basal. Esta polaridad se mantendrá en el tejido

ectodérmico del embrión y deberá ser regulada para formar los tejidos mesodérmico y endodérmico así como los diferentes órganos.

Otro tejido epitelial de *Drosophila* modelo de polaridad epitelial y que he utilizado ampliamente en esta tesis es el disco imaginal de ala (Fig. 2, B). Durante el proceso de pupación y metamorfosis en el desarrollo de *Drosophila*, la mayoría de tejidos larvarios se destruyen mientras que se desarrollan nuevos órganos para el animal adulto. Éstos se producen a partir de grupos de células denominadas células imaginales presentes en la larva que forman los discos imaginales y los nidos de histoblastos abdominales y que darán lugar a las estructuras externas del adulto [10]. El embrión presenta los primordios de estos discos imaginales, los cuales crecerán principalmente durante la fase larvaria para formar el disco imaginal completo. Cada disco imaginal está formado por dos capas de células epiteliales enfrentadas por la cara apical, quedando un lumen entre ambas. Una de las capas, la que forma el disco propiamente y que dará lugar a las estructuras adultas, tiene forma de epitelio pseudoestratificado columnar. La otra se trata de un epitelio plano (epitelio peripodial) que ejerce una función más estructural. Uno de los discos imaginales más utilizados en estudios de polaridad es el disco imaginal de ala (Fig. 2, B), debido a que es el disco de mayor tamaño y a su simplicidad estructural. Durante el desarrollo del disco de ala, la expresión de diversos genes en momentos y regiones determinadas establece diferentes dominios celulares o compartimentos dentro del disco (dorsal, ventral, anterior y posterior, Fig. 2, B). Esta expresión diferencial desencadena una cascada génica específica para cada compartimento, activando e inhibiendo diferentes rutas de señalización que hacen que cada célula se diferencie de manera adecuada. Las células de cada compartimento presentan unas características de afinidad que les hacen minimizar sus contactos con células del compartimento adyacente [11] mientras que los bordes entre compartimentos se comportan como organizadores territoriales dirigiendo la formación de patrón y el crecimiento del disco imaginal [12].

Establecimiento de la polaridad apico-basolateral epitelial

La formación de capas epiteliales con polaridad apico-basolateral es un proceso fundamental en el desarrollo de los organismos multicelulares. De hecho, las células epiteliales son el tipo celular más abundante en estos organismos. Estas capas epiteliales subdividen el cuerpo en diferentes compartimentos morfológica y fisiológicamente, creando barreras entre regiones del cuerpo y el ambiente o el espacio interno.

La capacidad de las células epiteliales para formar tejidos viene dada por su polarización en el eje apico-basal y por su plasticidad a la hora de regular dicha polaridad, pudiendo perder o adquirir las características propias del tejido epitelial en lo que se denomina transición epitelio-mesénquima y mesénquima-epitelio respectivamente. Esta característica favorece el plegamiento de los tejidos epiteliales para la formación de diferentes estructuras (conductos, canales, vellosidades). Además, las células epiteliales pueden orientar el huso mitótico para producir divisiones asimétricas o simétricas que son fundamentales para la homeostasis de los tejidos. Ambas características hacen que las células epiteliales sean fundamentales durante la

embriogénesis para la generación de los diferentes órganos.

La polaridad apico-basolateral de las células epiteliales se puede observar por la presencia de un dominio apical, en contacto con el lumen o el exterior y un dominio basolateral, en contacto con las células vecinas y la membrana basal. Ambos dominios se encuentran separados por una región de uniones específicas responsable de mantener unidas las células del tejido (Uniones Adherentes). Además, dichas células presentan una zona sellante para separar el dominio interno del externo que les permite controlar la difusión de moléculas en el tejido (denominadas Uniones Estrechas en vertebrados y Uniones Septadas en invertebrados). Para la generación de los diferentes dominios, las células epiteliales disponen de una maquinaria de tráfico polarizado formada por diferentes orgánulos secretores, como el retículo endoplasmático y el Golgi, así como numerosos compartimentos endosomales y vesiculares encargados de transportar distintos componentes a regiones específicas de la célula. De este modo se genera una distribución asimétrica de lípidos y proteínas en la membrana plasmática, de componentes del citoesqueleto y de orgánulos celulares a lo largo del eje apico-basal. Asimismo, existe una retroalimentación positiva de manera que la formación de los dominios apical y basolateral son necesarios a su vez para regular dicho tráfico polarizado en la célula. La polaridad epitelial por tanto, tiene una gran influencia en numerosos procesos celulares a través del control de vías de señalización y del tráfico vesicular, por lo que una regulación incorrecta de la polaridad epitelial está relacionada con diferentes enfermedades, como ocurre con el cáncer, donde diversas proteínas de polaridad han sido descritas como oncogenes y genes supresores de tumores (revisado en [13-15]).

A través de diferentes estudios genéticos realizados en *S. cerevisiae*, *C. elegans* y *D. melanogaster* se han podido identificar numerosas proteínas cuya correcta distribución en los diferentes dominios de la membrana plasmática es esencial para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad epitelial (conocidas como determinantes de polaridad [16,17] y revisado en [5]). Más recientemente, el uso de las células de mamífero MDCK ha sido esencial para conocer como se establece la polaridad en vertebrados así como identificar nuevos actores en este proceso (revisado en [18]). Pese a la gran diversidad de epitelios observados tanto dentro de un mismo organismo como entre diferentes especies, existe una maquinaria de polaridad que se ha conservado a lo largo de la evolución y que está compuesta principalmente por tres complejos (Fig. 3):

- **Complejo Crumbs/PATJ/PALS1**, formado por la proteína transmembrana Crumbs (Crb), Stardust (Sdt, PALS1 en mamíferos), dPatj (PATJ y MUPP1 en mamíferos) y Lin7. Este complejo se localiza justo por encima de las Uniones Adherentes (región subapical de invertebrados y Uniones Estrechas en vertebrados), proporcionando identidad apical. La falta de función de Crb provoca diversos efectos en polaridad epitelial y también en las Uniones Adherentes (revisado en [19] [20]). Por ejemplo, la falta de Crb en los fotorreceptores desestabiliza las Uniones Adherentes afectando a la formación de la Capa Limitante Externa. Esto conlleva muerte neuronal y delaminación de partes de la retina [21]. Sin embargo, en algunos tejidos la función de la proteína Crb no es esencial para mantener la polaridad epitelial, siendo su función redundante con otros determinantes

de polaridad. En el embrión de *Drosophila* la función de Crb es esencial durante la gastrulación, sin embargo parece ser redundante para la polaridad epitelial durante y después de la organogénesis [22].

- **Complejo Par3/Par6/aPKC**, formado por las proteínas estructurales Par3/ Bazooka (Baz, *Drosophila*) y Par6, una serín-treonín quinasa, aPKC y la Rho-GTPasa, Cdc42. Este complejo está implicado en la identidad apical y en el establecimiento y mantenimiento de las Uniones Adherentes. Par6, aPKC y Cdc42 co-localizan con el complejo Crb en la región subapical, mientras que Baz se localiza en las Uniones Adherentes. El complejo Par3/Par6/aPKC es una pieza clave en la regulación de la polaridad que se ha conservado desde gusanos hasta vertebrados. Además, no solo está implicado en polaridad epitelial, sino que participa en otros contextos celulares tales como migración celular, tráfico vesicular, crecimiento celular, supervivencia o diferenciación celular (revisado en [4,5,23,24]).
- **Complejo Lgl/Dlg/Scrib**, encargado de la identidad basolateral de la célula. Está formado por las proteínas Lethal Giant Larvae (Lgl), Scribble (Scrib) y Discs Large (Dlg). Scrib y Dlg son proteínas estructurales, siendo Lgl una proteína cortical. Diversos trabajos, principalmente en *Drosophila*, han establecido estos genes como genes supresores de tumores debido a su implicación en la regulación de la polaridad y la proliferación celular (revisado en [25]).

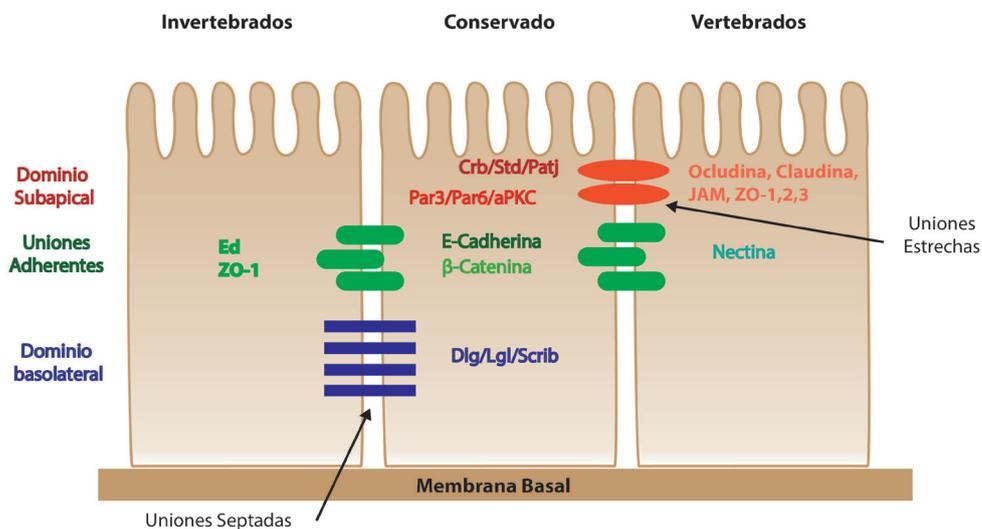


Figura 3. Conservación de los complejos de polaridad epitelial. La maquinaria encargada del establecimiento y mantenimiento de la polaridad epitelial se encuentra conservada entre invertebrados y vertebrados. Existen tres grandes complejos: Complejo Crb/PATJ/PALS1, complejo Par3/Par6/aPKC y complejo Dlg/Lgl/Scrib. Las uniones adherentes mantienen a las células unidas en el tejido y las uniones septadas (invertebrados) y estrechas (vertebrados) realizan la función sellante para regular intercambio entre el medio externo y el tejido.

Además de estos tres complejos que forman el núcleo central de la polaridad epitelial, se

han identificado diferentes proteínas que actúan conjuntamente con estos complejos para establecer y mantener la polaridad epitelial. Este es el caso de la serín-treonín quinasa Par1, la proteína citoplasmática Par5 (también llamada 14-3-3) y las proteínas Cadherina E (Ecad) y β -Catenina (Armadillo en *Drosophila*). Por un lado, Par1 se localiza en el dominio basolateral y una de sus funciones es fosforilar a Par3 evitando la formación del complejo Par3/Par6/aPKC en esta región de la célula [26]. Por su parte Par5 es capaz de unirse a diferentes determinantes de polaridad cuando son fosforilados, regulando su localización y por tanto su función [26,27]. Por su parte, Ecad y β -Catenina se localizan en las uniones adherentes participando en la unión célula-célula, esencial para la arquitectura epitelial [28,29]. En las células epiteliales se han establecido los contactos célula-célula como una señal esencial para iniciar la polarización, que continúa con la función de los complejos de polaridad. No obstante, para la especificación de la orientación del eje apico-basal se necesita una interacción adicional que normalmente procede de la matriz extracelular.

Para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad epitelial son fundamentales las interacciones que se producen entre los determinantes de polaridad. Éstas pueden ser de carácter atractivo, como las que se producen entre determinantes del mismo dominio; o de carácter repulsivo, entre determinantes de dominios diferentes (Fig. 4). De este modo, en el complejo Par3/Par6/aPKC, tanto Par3 como Cdc42 son necesarias para la localización apical del complejo mientras que la actividad quinasa de aPKC se encuentra regulada por Par6 y Cdc42 [30]. Par6 se localiza en el córtex apical a través de la interacción con Cdc42. Esta interacción elimina la inhibición de la actividad quinasa de aPKC ejercida por Par6. Cuando aPKC está activa es capaz de fosforilar a Par3, reduciendo la afinidad de éste por aPKC. De este modo Par3 se restringe a las Uniones Adherentes donde tiene un papel esencial en la formación de este dominio [31-33]. La fosforilación de Par3 por aPKC también permite al complejo Par6/aPKC reclutar y asociarse al complejo Crb, aunque el mecanismo por el cual se produce no está claro. Algunos trabajos indican que la liberación de Par3 del complejo Par3/Par6/aPKC permite a aPKC asociarse a Crb y PALS1 a través de Par6. Sin embargo se ha descrito otro mecanismo en el cual la fosforilación de Par3 por aPKC evita la interacción Par3-Std, pudiendo este último unirse entonces a Crb y reclutar a Par6 [34,35]. Una vez situados los complejos Par6/aPKC y Crb en el dominio apical, la fosforilación de Crb por aPKC es fundamental para mantener la polaridad [36].

Por otro lado, para el mantenimiento de los dominios apical y basolateral es necesaria la exclusión mutua entre determinantes de estos dominios (Fig. 4). Este aspecto se hace evidente al sobreexpresar o eliminar ciertos determinantes de polaridad, lo que provoca cambios en la extensión de los dominios de membrana. Tanto la sobreexpresión de la proteína Crb como la eliminación de Scrib producen una extensión del dominio apical [37,38]. Resultados similares pueden obtenerse con diferentes componentes de la maquinaria de polaridad [22,39]. Para conseguir esta exclusión entre los dominios apical y basolateral, la actividad quinasa de Par1 y aPKC es fundamental. aPKC fosforila a Lgl y Par1 evitando su localización en la membrana apical y por tanto que ejerzan su función en dicho dominio donde aPKC está activa [40-42]. Por el contrario, Par1 fosforila a Par3 impidiendo la formación del complejo Par3/Par6/aPKC en el dominio basolateral, ya que esta fosforilación favorece la unión de Par3 a Par5

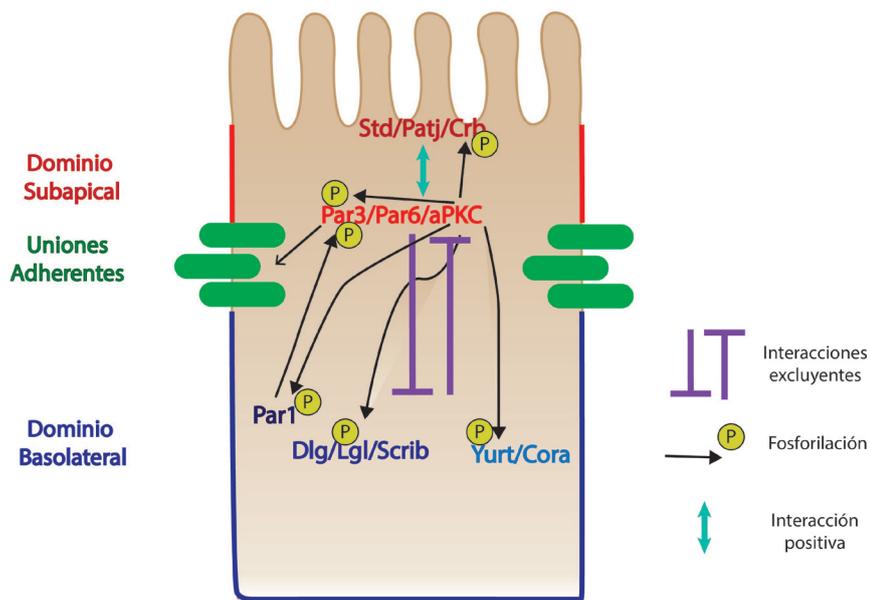


Figura 4. Interacciones entre complejos de polaridad. En el mantenimiento de la polaridad epitelial, las interacciones entre determinantes de polaridad son esenciales. Los complejos apicales cooperan entre ellos para mantener el dominio apical. Además existe una regulación excluyente entre determinantes basolaterales y apicales. Las uniones adherentes también participan en la formación de los diferentes dominios. Las fosforilaciones de las dos quinasas que forman parte de esta maquinaria (aPKC y Par1) son fundamentales para conseguir esta regulación.

evitando la oligomerización de Par3 y por tanto su unión a la membrana y a aPKC [26].

Recientemente se han descrito nuevos componentes de la maquinaria de polaridad. Por un lado encontramos el complejo Yurt/Coracle, identificado en *Drosophila* y con homólogo en mamíferos. Este complejo está implicado en el mantenimiento de la polaridad apico-basolateral en etapas tardías del desarrollo embrionario de *Drosophila*, donde se ha observado que presenta una regulación mutua con aPKC. aPKC es capaz de fosforilar a Yurt evitando su localización en la membrana apical mientras que Yurt contrarresta la función de aPKC para evitar la apicalización de toda la membrana plasmática [43,44].

Además de proteínas también existen lípidos implicados en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular. Entre ellos se encuentran los fosfoinosítidos PtdIns(3,4,5)P3 y PtdIns(4,5)P2, productos de la actividad enzimática de la quinasa PI3K y la fosfatasa PTEN respectivamente. Estos fosfolípidos son importantes para la polaridad de células MDCK (mamíferos) y de las células de *Drosophila* [45-48]. PTEN se localiza en el dominio apical mientras que la PI3K lo hace en las uniones adherentes. De este modo, PtdIns(4,5)P2 proporciona identidad apical mientras que PtdIns(3,4,5)P3, basolateral; aunque existen algunas diferencias entre tejidos y especies. La relación entre los fosfoinosítidos y los determinantes de polaridad clásicos aún está por determinar. En *Drosophila*, Par3 se une a PTEN ayudando a la localización de la fosfatasa en las uniones adherentes [47], aunque en células MDCK, PTEN

también se localiza en la membrana apical. En éstas células el enriquecimiento de PtdIns(4,5)P2 en la zona apical produce un reclutamiento de Anexina 2, que a su vez se une a Cdc42. De este modo, Cdc42 recluta a aPKC formándose así el dominio apical [49]. Además, la actividad quinasa de aPKC es necesaria para restringir PtdIns(3,4,5)P3 a la región basolateral [50], de modo que PtdIns(4,5)P2 actúa en la formación de la polaridad apico-basolateral de manera directa, reclutando determinantes apicales, así como indirecta, a través la exclusión de PtdIns(3,4,5)P3 por parte de aPKC.

Es probable que en los próximos años aparezcan nuevos datos que ayuden a elucidar el papel de estos nuevos actores en la polaridad y su relación con los complejos clásicos. Asimismo, a pesar del conocimiento de los diversos complejos de polaridad y de muchas de sus interacciones que regulan su función, aún quedan numerosos aspectos por aclarar para poder llegar a conocer en profundidad cómo los determinantes de polaridad se establecen en los diferentes dominios.

2. Tráfico Vesicular Intracelular

Para la formación y regulación de la distribución apico-basolateral en las células epiteliales, éstas disponen de una maquinaria de tráfico intracelular altamente organizada que les permite distribuir diferentes cargos (proteínas, lípidos, RNA) hacia los dominios adecuados. No obstante, la relación existente entre polaridad y tráfico se basa en una regulación mutua entre ambos procesos, siendo uno necesario para el otro. Esto hace que el correcto funcionamiento de las diferentes vías de tráfico vesicular no solo sea esencial para el mantenimiento de la polaridad, si no también para diversos procesos como migración, regulación de vías de señalización o destino celular (revisado en [51-53]). Es importante mencionar que aunque ha sido en las células epiteliales donde más estudios se han realizado acerca del tráfico vesicular, por su alta relevancia en este tipo celular; la maquinaria de tráfico es fundamental para todas las células eucarióticas, actuando por tanto en todos los contextos celulares. La regulación mutua entre la maquinaria de tráfico intracelular y la polaridad ha emergido como una importante herramienta en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular, así como para la regulación de procesos celulares controlados vía tráfico vesicular polarizado.

Tráfico polarizado

Existen diferentes rutas con las que las células epiteliales transportan proteínas y lípidos hacia los diferentes dominios de membrana (revisado en [53-56]). Por un lado encontramos la ruta biosintética, donde las proteínas pasan del Retículo Endoplasmático al Aparato de Golgi y de éste a la región *Trans*-Golgi (TGN, de sus siglas en inglés). Desde el TGN son clasificadas en distintos transportadores para su entrega al dominio de membrana correcto. Este transporte puede ser directo entre el TGN y la membrana (Fig. 5, 1a y 1b) o puede tener un paso intermedio en los Endosomas de Reciclaje (RE, siglas en inglés, fig. 5, 5). La función de esta etapa intermedia no está clara, aunque podría modular la función de los

cargos antes de llegar a la membrana. Por otro lado, una vez localizados en los dominios de membrana, proteínas y lípidos pueden ser internalizados nuevamente y redistribuidos hacia cualquier parte de la célula en lo que se llama ruta de reciclaje. La internalización de los cargos se lleva a cabo con la endocitosis y las principales proteínas implicadas en ella son la proteína de envuelta vesicular Clatrina, la GTPasa deformadora de membrana Dinamina y el complejo adaptador heterotetramérico AP2. Una vez endocitados, los cargos pasan a los denominados Endosomas Tempranos Apicales (AEE, de sus siglas en inglés) o Endosomas Tempranos Basolaterales (BEE, de sus siglas en inglés), dependiendo del lugar de la endocitosis. Desde este punto se pueden seguir diferentes rutas: 1) vuelta a la membrana a través de reciclaje rápido (Fig. 5, 2a y 2b); 2) pueden pasar a los Endosomas Tardíos (LE, siglas en inglés) que se fusionan con lisosomas para la degradación de los cargos (Fig. 5, 3a y 3b) o 3) pueden dirigirse a los Endosomas de Reciclaje (RE, Fig. 5, 4a y 4b) desde los cuales son nuevamente distribuidos hacia la membrana basolateral (Fig. 5, 6a) o apical (Fig. 5, 6a). Las proteínas apicales lo hacen a través de los Endosomas de Reciclaje Apicales (ARE, siglas en inglés, fig. 5, 7), aunque no está claro si estos endosomas son diferentes a los RE o se trata de un subdominio de éstos.

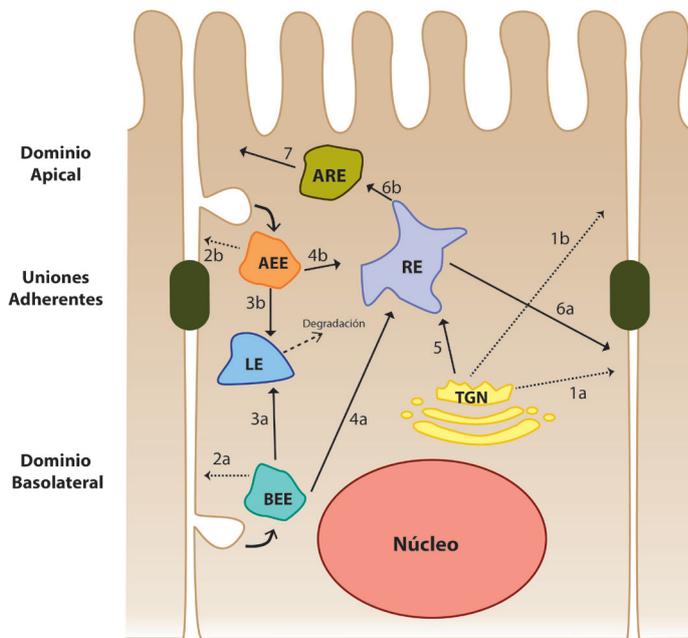


Figura 5. Rutas del tráfico intracelular en células epiteliales. Las proteínas de la ruta biosintética procedentes del TGN pueden dirigirse directamente a la membrana basolateral (1a) o apicolateral (1b), pero también pueden pasar a los RE (5) antes de llegar a la membrana. Proteínas, lípidos y membrana son internalizados generando los BEE en la superficie basolateral y los AEE en la apical. Los cargos pueden volver a la membrana en un reciclaje rápido (2a y 2b), pueden dirigirse hacia los LE para su degradación por la acción de los lisosomas o pueden transportarse hasta los RE (4a y 4b), desde donde son nuevamente distribuidos hacia la membrana basolateral (6a) o hacia la membrana apical (7) a través de los ARE (6b).

La complejidad de todas estas rutas hace necesaria la existencia de diversos mecanismos que regulen el tráfico de los cargos entre las diferentes estaciones del entramado vesicular de transporte. Los principales reguladores del tráfico vesicular en la célula son las GTPasas de pequeño tamaño, Rab. Las proteínas Rabs se encargan de la selección de cargos así como del desensamblaje, movimiento, maduración, anclaje y fusión de las vesículas con sus membranas diana (revisado en [57]).

Por otra parte, el movimiento polarizado de vesículas necesita también la participación del citoesqueleto, que actúa como autopistas en la célula, así como de las moléculas motoras que se encargan de mover los diferentes endosomas a lo largo del citoesqueleto. Las principales moléculas motoras son los complejos de la Kinesina y de la Dineína, para los microtúbulos; y

la Miosina V para los filamentos de actina (revisado en [58]). Los microtúbulos se encuentran polarizados en las células epiteliales, disponiendo los extremos + hacia la membrana basolateral y los – hacia la apical. La Kinesina se desplaza hacia el extremo +, mientras que la Dineína lo hace hacia el –, facilitando la especificidad de cada uno de los tipos de transporte (revisado en [59]).

Una vez los diferentes cargos han sido distribuidos a la membrana, las vesículas que los contienen deben anclarse a la zona de la membrana plasmática correcta y fusionarse con ella, proceso denominado exocitosis. El complejo del exocisto es clave en este proceso. Se trata de un complejo proteico octamérico conservado a lo largo de la evolución. Está formado por las proteínas Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84 (Fig. 6, revisado en [60,61]) y se encarga del reconocimiento inicial y el posterior acoplamiento de las vesículas a la zona de la membrana diana. Existe una estrecha relación entre el exocisto y algunas proteínas Rab, como es el caso de Rab11 y Sec15 que interaccionan físicamente estableciendo la unión entre el reciclaje y la exocitosis (Fig. 6, [62,63]). A la hora de la fusión de las vesículas con la membrana plasmática interviene la familia de proteínas SNARE (v-SNARE y t-SNARE), entre las que encontramos proteínas como las Sintaxina-1, 2, 3 y 4, cada una de ellas con especificidad para transporte apical o basolateral (revisado en [64]). La relación entre polaridad y tráfico se hace evidente con la función de las sintaxinas, ya que la localización errónea de estas proteínas produce defectos en la polaridad apico-basolateral [65,66]. Por ejemplo, al eliminar la señal que localiza la Sintaxina 4 en la región basolateral en células MDCK, ésta se encuentra deslocalizada y las células son incapaces de formar un tejido polarizado [65].

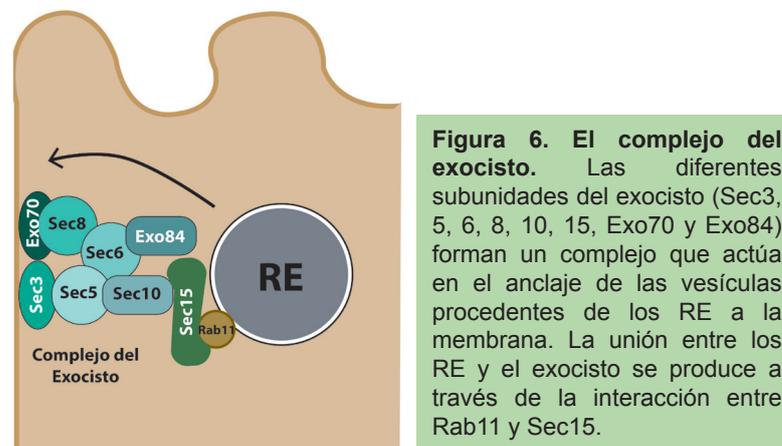


Figura 6. El complejo del exocisto. Las diferentes subunidades del exocisto (Sec3, 5, 6, 8, 10, 15, Exo70 y Exo84) forman un complejo que actúa en el anclaje de las vesículas procedentes de los RE a la membrana. La unión entre los RE y el exocisto se produce a través de la interacción entre Rab11 y Sec15.

Rab11 y los Endosomas de Reciclaje (RE)

Los RE constituyen una pieza fundamental en el transporte vesicular de las células eucarióticas. Estas estructuras túbulo-vesiculares se encuentran localizadas en las proximidades del Centro Organizador de Microtúbulos (MTOC, en inglés) y tienen un papel central en la coordinación del tráfico celular (revisado en [52]). Por un lado, a ellos llegan multitud de cargos procedentes del TGN en la ruta biosintética y de los Endosomas Tempranos en la ruta de reciclaje. Por

otro lado, desde los RE se distribuyen estos cargos hacia los diferentes dominios de membrana haciendo posible la relocalización de proteínas y lípidos desde el dominio basolateral al apical y viceversa, lo que se denomina transcitosis (revisado en [54,56]). El reciclaje de membrana a través de los RE puede regular por ejemplo la distribución de receptores de superficie y canales de iones, siendo también fundamentales en la regulación de las adhesiones celulares y en el mantenimiento de la polaridad apico-basolateral en las células epiteliales ([52,67-69])

En este proceso, la GTPasa de pequeño tamaño Rab11 se erige como un regulador clave en el reciclaje y exocitosis de multitud de cargos. Rab11 puede encontrarse localizada en el TGN y en las vesículas post-Golgi de la ruta secretora, sin embargo aparece enriquecida en los RE y en los AREs, donde ejerce una función determinante en la distribución de proteínas y membranas a la superficie celular (revisado en [70]). En mamíferos, la familia de las proteínas Rab11 presenta tres miembros: Rab11a, Rab11b y Rab11c (conocido como Rab25). *Drosophila melanogaster* por el contrario solo presenta una proteína denominada Rab11.

Debido a la implicación de Rab11 en la correcta formación y funcionamiento de los RE y al papel central de éstos en el tráfico vesicular, es lógico pensar que esta GTPasa actúe en el transporte de numerosas proteínas. De este modo, Rab11 y los RE han sido relacionados con el transporte de diferentes receptores y moléculas de adhesión, como por ejemplo el receptor AMPA en la neurotransmisión de las células dendríticas [71]; el receptor EGF regulando proliferación y movilidad en células de cáncer de pecho [72]; los receptores *Toll-like* durante la respuesta inmune producida por fagosomas [73], la β -Integrina para regular la migración celular [74] o la Ecad para regular las Uniones Adherentes durante diferentes etapas de la polaridad celular [69,75] y participando así en procesos de migración celular colectiva y comunicación célula-célula [76] [77].

Pero, ¿Cómo consigue una sola proteína regular la distribución de los diferentes cargos en el laberinto que supone la red de tráfico intracelular? La versatilidad de Rab11 viene dada por su capacidad para interactuar con diferentes proteínas adaptadoras (revisado en [70]). De esta modo, Rab11 forma diversos complejos proteicos que permiten el transporte bidireccional a lo largo de los microtúbulos y los filamentos de actina. Las proteínas pertenecientes a la familia Rab11-FIPs (*Family Interacting Protein*) constituyen los principales efectores de Rab11. Estas proteínas establecen un puente entre Rab11 y los complejos motores de microtúbulos y filamentos de actina (Kinesina, Dineína y Miosina V) posibilitando las diferentes rutas de transporte de los RE (revisado en [68,70,78]). Las proteínas Rab11-FIPs se caracterizan por presentar un dominio *coiled-coil* seguido de un motivo altamente conservado de 20 aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína por el cual se unen a Rab11 y que se denomina Dominio de Unión a Rab11 (RBD, de sus siglas en inglés). En vertebrados se han descrito cinco Rab11-FIPs diferentes que se pueden clasificar en dos clases (Fig. 7, A):

- **Clase I:** donde encontramos a las proteínas **Rab11-FIP1/RCP**, **Rab11FIP2** y **Rab11FIP5/Rip11**, caracterizadas por presentar un dominio C2 de localización de membrana similar al de las proteínas PKCs y situado en el extremo N-terminal.

- **Clase II:** a la que pertenecen las proteínas **Rab11-FIP3** y **Rab11-FIP4**. Carecen de dominio C2 pero presentan dos dominios *EF-hands* en el extremo N-terminal. Rab11-FIP3 además presenta una región rica en prolina.

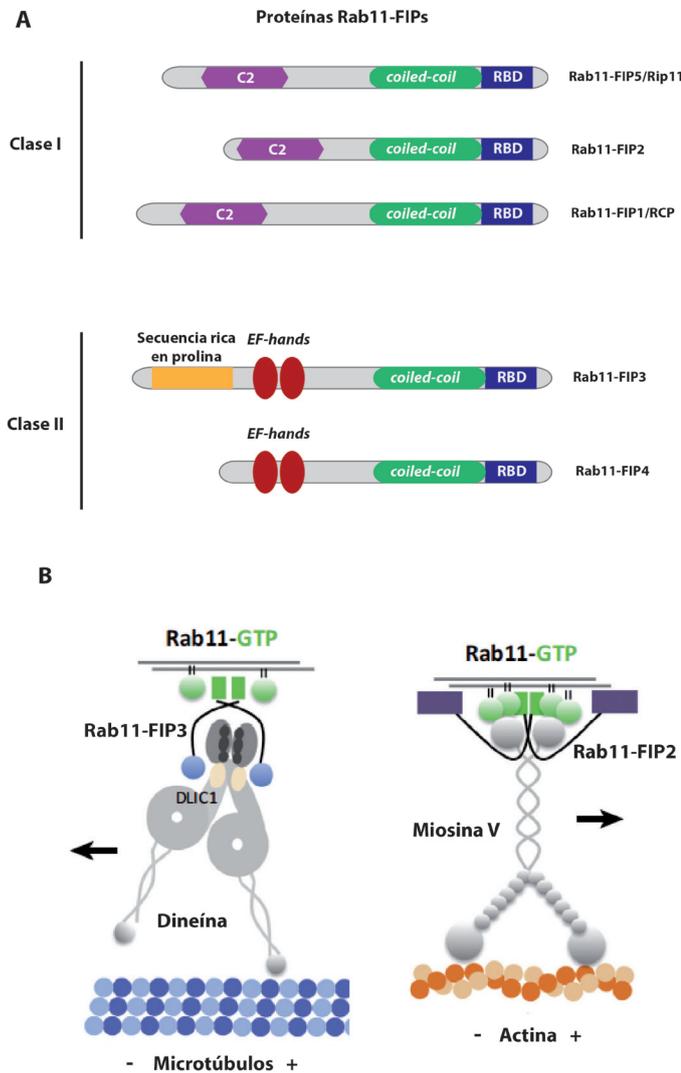


Figura 7. Las proteínas adaptadoras Rab11-FIPs. A) Representación esquemática de las proteínas Rab11-FIPs de clase I y clase II. Todas presentan un Dominio de Unión a Rab11 (RBD, azul) y un dominio *coiled-coil* (verde) en la parte C-terminal. El extremo N-terminal es diferente para cada clase, presentando un dominio C2 (violeta) las Rab11-FIPs de clase I y dominios *EF-hands* (rojo) las de clase II. B) Las diferentes Rab11-FIPs unen a Rab11 con el citoesqueleto a través de su interacción con las proteínas motoras. De este modo, FIP3 es capaz de unirse a Dineína y transportando las vesículas hacia el extremo -, por su parte, FIP2 se une a Myo V para transportar las vesículas a través de los filamentos de actina (Imagen adaptada de [70]).

La afinidad de cada una de estas moléculas adaptadoras por diferentes moléculas motoras posibilita el transporte de los RE (Fig. 7, B). Así por ejemplo, se ha establecido la unión entre Rab11-FIP2 y Miosina V en el transporte de IgA en células MDCK y transferrina en células HeLa [79] o la unión de Rab11-FIP5 a la Kinesina II [80]. Por su parte Rab11-FIP3 es capaz de unirse tanto a Dineína como a Kinesina, teniendo un papel clave en el transporte de membrana plasmática durante la citoquinesis [81-83].

En *Drosophila melanogaster* se han descrito hasta la fecha dos proteínas homólogas a las Rab-FIPs de vertebrados. Por un lado encontramos a la proteína *Rab11 Interacting Protein 11* (Rip11), que formaría parte de la clase I. Rip11 participa en el proceso de intercalación celular durante el

desarrollo de las tráqueas [84] y junto a Miosina V se encarga del transporte de Rodopsina en el desarrollo de los fotorreceptores [85]. Por otro lado se encuentra la proteína Nuclear Fallout (Nuf), perteneciente a la clase II. Nuf es capaz de unirse a Dineína [86] y probablemente también lo haga a Kinesina tal y como lo hace su homólogo en vertebrados, Rab11-FIP3. Nuf tiene un papel fundamental en el transporte de membrana plasmática y polimerización de actina durante la celularización del embrión de *Drosophila* y en el crecimiento de las quetas [87-90].

A pesar del avance realizado en los últimos años, aún es necesario aumentar la comprensión acerca de la relación entre las proteínas adaptadoras, las proteínas motoras del citoesqueleto, Rab11 y los RE. Mejorar el conocimiento acerca de cómo se regulan cada uno de estos actores, qué uniones específicas se forman entre ellos, cuáles son los cargos que transportan y en qué procesos lo hacen, ayudará a entender el mapa del tráfico intracelular y sus implicaciones en procesos tales como el establecimiento de la polaridad celular, la regulación de vías de señalización, migración o división celular, entre otros.

Nuclear fallout (Nuf)

Nuclear Fallout (Nuf, homólogo a la proteína Rab11-FIP3 de vertebrados) es una proteína adaptadora de la GTPasa Rab11 a Dineína uniendo, por tanto, los RE a los microtúbulos [86,88]. Nuf es una proteína de 502 aminoácidos que presenta una región C-terminal con un dominio *coiled-coil* y un dominio RBD (Fig. 8, A). Su homología con las proteínas Rab11-FIPs radica en la parte C-terminal, mientras que el extremo N-terminal es más variable no habiéndose identificado dominios descritos.

El trabajo del laboratorio del Dr. W. Sullivan ha sido fundamental para la caracterización de esta proteína y su papel durante la celularización del embrión de *Drosophila*, proceso en el que es fundamental la participación de la maquinaria de transporte para formar las nuevas membranas plasmáticas. Nuf es una proteína pericentrosomal, altamente fosforilable y cuya localización varía con el ciclo celular [88,91]. Nuf co-localiza extensamente con Rab11 de forma interdependiente [88]. Por tanto, la función de Nuf va ligada a la de Rab11 y a los RE, siendo esenciales para el transporte de membrana plasmática y para promover la polimerización de actina en el surco citoquinético de los embriones sincitiales [86,88,89]. Teniendo en cuenta que Nuf es un regulador de Rab11 y sabiendo la versatilidad de los RE a la hora de regular diferentes procesos celulares, sería lógico pensar que Nuf participe en diversos contextos celulares, lo que parece ser el caso.

Durante el crecimiento de las quetas, estructura formada por una única célula y que forma parte de los órganos sensoriales en el organismo adulto de *Drosophila*, se requiere un transporte activo de múltiples proteínas hacia la zona de crecimiento. En este proceso, Nuf, Rab11 y Dineína son esenciales para controlar el flujo de los RE que transportan cargos hacia el extremo de las quetas. Este flujo está regulado por la fosforilación de Nuf por parte de la quinasa IKKε, fosforilación que ocurre en el extremo de la queta (donde IKKε está activa) y permite

el retorno de la maquinaria de los RE (Fig. 8. B [90]). De esta forma, en mutantes *ikke*, Nuf no puede ser fosforilado y se bloquea el transporte de RE produciéndose una acumulación de vesículas Rab11 en el extremo de la queta. Por otro lado, la función de Nuf sobre los RE regula rutas de señalización, como ocurre en los precursores de los órganos sensoriales de *Drosophila* (SOP, en inglés). Los SOP realizan una división asimétrica generando dos células hijas, pIIa y pIIb, las cuales desarrollan un destino celular diferente debido a una activación asimétrica de la vía de Notch. En la célula pIIb, Delta, el ligando de la vía de Notch, es reciclado a través de Rab11 y los RE. Sin embargo, en la célula pIIa Nuf no se recluta en los centrosomas y no se forman los RE cargados con Delta. De este modo, solo la célula pIIb presenta Delta en la membrana activando la vía de Notch en la célula pIIa [92] y por tanto ambas células siguen destinos distintos: epidérmico (pIIa) y neural (pIIb). Teniendo en cuenta la función de Nuf en el tráfico de los RE, es natural pensar que Nuf debe ser finamente regulado. Por tanto, conocer las proteínas que regulan la función, distribución y unión de Nuf a sus interactores es fundamental para entender el proceso de reciclaje intracelular y sus implicaciones.

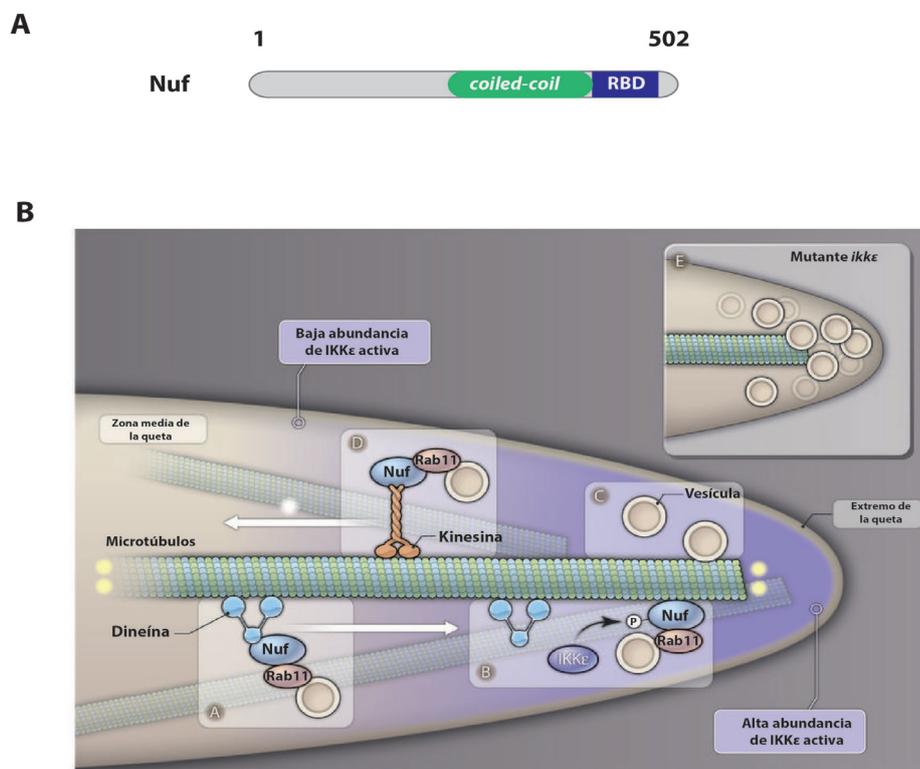


Figura 8. Nuf y su papel en el transporte de RE en las quetas de *Drosophila*. A) Representación esquemática de la proteína Nuf y sus dominios de Unión a Rab11 (RBD, morado) y *coiled-coil*. (verde). B) Tráfico vesicular controlado por IKKε y Nuf. Las vesículas de los RE y marcadas con Rab11 son transportadas hasta el extremo de la queta a través de Nuf y Dineína (A). La presencia de alta cantidad de IKKε activa en el extremo hace que Nuf sea fosforilado (B) permitiendo la liberación de las vesículas (C). El retorno de las vesículas podría producirse por el transporte de estas a través de Nuf y Kinesina (D). En mutantes *ikke*, la no fosforilación de Nuf produce una acumulación de vesículas en el extremo de la queta (Imagen adaptada de [90]).

3. aPKC

Uno de los principales reguladores de la polaridad celular es la Proteína Quinasa C atípica (aPKC por sus siglas en inglés). aPKC se trata de una serín-treonín quinasa de la superfamilia de las proteínas quinasas C (PKC), que se encuentra conservada en eucariotas. En esta superfamilia se agrupan tres clases de proteínas quinasas C: las PKC clásicas, las nuevas y las atípicas. Dentro del grupo de las PKC atípicas, en vertebrados encontramos dos isoformas, PKC ζ y PKC λ/ι , mientras que en *Drosophila melanogaster* solo existe una, aPKC, que mantiene todos los dominios y funciones de PKC λ/ι . Esta subfamilia de proteínas quinasas C se denomina atípica debido que no se activan a través de Ca²⁺, diacilglicerol (DAG) o ésteres de forbol como las proteínas quinasas C clásicas y nuevas, sino que se regulan vía interacción con otras proteínas (revisado en [93-96]). aPKC está implicada en la señalización de los receptores tirosina-quinasa a través de los cuales regula el crecimiento celular y la apoptosis ([95,97-99]). Además, en los últimos años se ha relacionado a esta quinasa en multitud de procesos celulares, siendo una proteína clave en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular (revisado en [23,24]). Todo esto, junto con la conexión entre aPKC y enfermedades humanas como el cáncer (revisado en [14]), ha hecho de esta quinasa una importante diana de interés en investigación. Por todo esto, uno de los objetivos de esta tesis ha sido encontrar nuevas proteínas que interaccionen con aPKC.

Estructura molecular de aPKC

La proteína aPKC puede ser dividida en dos dominios: el dominio regulador y el dominio quinasa (Fig. 9). El dominio regulador se sitúa en la parte N-terminal de la proteína y consta a su vez de un dominio de interacción proteína-proteína PB1, un dominio de pseudosustrato (PS), el cual puede unirse al dominio quinasa de aPKC e inhibir su actividad, y un dominio C1 responsable de la localización en membrana, con un único motivo rico en dedos de zinc, lo que la diferencia del resto de proteínas quinasa C (revisado en [96]). A través del dominio PB1, aPKC interacciona con proteínas tales como Par6, regulando así la actividad de aPKC en procesos de polaridad o p62, la cual actúa como puente entre aPKC y el Factor α de Necrosis Tumoral (TNF α , por sus siglas en inglés) participando en la respuesta inflamatoria activada por citoquinas (revisado en [97]). En la parte C-terminal de la proteína encontramos el dominio quinasa, que incluye el sitio de unión a ATP y el dominio de actividad quinasa propiamente, responsable último de la fosforilación de los sustratos.

La actividad de aPKC está regulada tanto por interacción con otras proteínas como por la fosforilación dependiente de PDK1 [100]. Asimismo, la propia aPKC es capaz de autofosforilarse en el dominio quinasa, siendo esta fosforilación esencial para mantener la proteína en una conformación activa enzimáticamente (revisado en [96,101]). La actividad quinasa de aPKC es fundamental para numerosos procesos celulares en los que regula la localización y/o función de sus sustratos (algunos de los cuales se muestran en la figura 9, [27,34,36,44,102-104]).

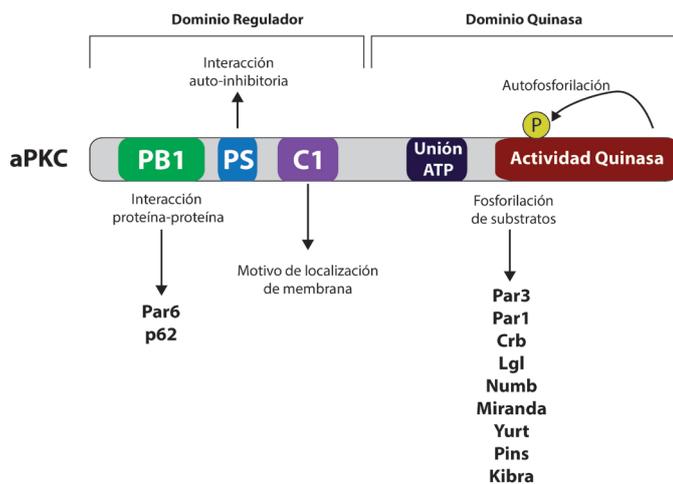


Figura 9. Representación esquemática de la proteína aPKC. aPKC presenta un dominio regulador, con los dominios PB1, pseudosubstrato (PS) y C1; y un dominio quinasa con el sitio de unión a ATP y el de actividad enzimática. A través del dominio PB1 interacciona con proteínas, como Par6 o p62, que regulan la actividad de aPKC. También se muestran algunas de las proteínas dianas de fosforilación de aPKC.

Versatilidad funcional de aPKC

Una de las principales características de aPKC que la hace tremendamente interesante es su gran versatilidad en cuanto a procesos celulares en los que participa y a proteínas con las que puede interactuar en cada uno de estos procesos. aPKC actúa en la activación mitogénica de la vía de señalización de Ras, siendo una diana aguas abajo de Ras, controlando crecimiento y supervivencia celular [105-107]. De hecho, Ras interacciona físicamente con el dominio regulador de aPKC modulando su actividad en células humanas [108]. Tanto Ras como aPKC son fundamentales para la activación del factor de transcripción NF- κ B, activación que depende también de los complejos de receptores de señalización de TNF α y la Interleucina-1 (IL-1), mediadores de la respuesta inflamatoria activada por citoquinas. En este caso, p62 actúa como un puente de unión de aPKC con TNF α e IL-1 (revisado en [97]). Asimismo, aPKC regula también la actividad de quinasas MAP (MAPK), las cuales son dianas aguas abajo de la vía de señalización Ras [98].

Por otra parte, aPKC tiene un papel fundamental en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular. El complejo formado por aPKC/Par6/Par3 es uno de los complejos proteicos conservados responsables de la polaridad epitelial, aunque su función no se limita a las células epiteliales, expresándose de forma ubicua y regulando polaridad en una gran cantidad de contextos. En el tejido epitelial, la función quinasa de aPKC es fundamental para establecer y mantener la distribución apico-basolateral. De este modo se encarga de fosforilar a otros determinantes de polaridad como Crb y Par3 para favorecer la formación del dominio apical y de las uniones adherentes [34,36]; así como Lgl, Par1 o Yurt para restringir su acción al dominio basolateral [40,41,44].

No obstante, aPKC no solo regula polaridad en el tejido epitelial, lo hace también en otros contextos, como es el caso de células en migración. Para la migración celular deben generarse dos zonas diferenciadas en la célula. Por una lado se encuentra el frente de migración que

marca la dirección en la que la célula se desplaza. En esta zona Cdc42 y Rac1 regulan el citoesqueleto de actina para formar filopodios y lamelipodios generando nuevos puntos de anclaje entre la membrana plasmática y el sustrato por el que la célula se desplaza. En el lado opuesto se encuentra el frente de retracción, en el que RhoA controla la formación de fibras de actomiosina haciendo que en esta zona la célula se separe del sustrato. RhoA también participa en la formación de las uniones focales en la zona intermedia entre ambos frentes para anclar la célula al sustrato. Entre las proteínas que participan en estas uniones se encuentran las integrinas. aPKC puede regular la migración celular actuando a diferentes niveles en este proceso. Por ejemplo, en astrocitos de rata, aPKC fosforila a la Glucógeno Sintasa Quinasa-3 β (GSK-3 β) inactivándola en el frente de migración, lo que permite reorientar el centrosoma y controlar la dirección de desplazamiento [109]. aPKC también regula la migración celular a través de la E3 ligasa Smurf1, que se encarga de ubiquitinar diferentes proteínas para su degradación, entre ellas la GTPasa RhoA. aPKC es capaz de reclutar Smurf1 en el córtex celular en filopodios y lamelipodios, destruyendo por tanto RhoA en el frente de migración y su capacidad para controlar el citoesqueleto retráctil de actomiosina [110]. Por otra parte, aPKC fosforila a Numb, una proteína adaptadora requerida para la endocitosis de las integrinas, excluyéndola del córtex celular. En las células en migración, la integrina debe ser endocitada y transportada desde el frente de retracción hacia el frente de migración. aPKC excluye a Numb del frente de migración, quedando restringida su actividad al frente de retracción donde se encarga de endocitar integrina [111].

Otro aspecto importante en el que participa aPKC es la división celular. La orientación del plano de división celular es esencial para mantener la estructura del tejido epitelial. Para ello se debe orientar el huso mitótico en el plano correcto para que la célula se divida manteniendo la capa epitelial. El huso mitótico se orienta gracias al anclaje de los microtúbulos astrales al córtex celular. aPKC evita el anclaje de estos microtúbulos a la superficie apical de las células epiteliales, facilitando la división en el plano horizontal del tejido. Para ello aPKC fosforila a Pins, una proteína implicada en el anclaje de los microtúbulos al córtex celular. Cuando Pins es fosforilado, se une a Par5 lo que evita su unión a la membrana y por tanto su función de anclaje [104]. Asimismo, aPKC también participa en la división asimétrica de neuroblastos y de las células precursoras de los órganos sensoriales en *Drosophila*. En estas divisiones, una de las células hijas tiene activa la vía de Notch mientras que la otra la tiene reprimida, lo que hace que sigan destinos celulares diferentes. Un modo de conseguir esto es a través de la regulación de Numb. Numb actúa como represor de la vía de Notch solo en la célula hija basal, ya que aPKC lo fosforila excluyéndolo del dominio apical [103].

aPKC participa también en la regulación del ciclo celular. En neuroblastos de *Drosophila*, la proteína Dap160 se une al dominio regulador de aPKC e incrementa su actividad quinasa, favoreciendo la progresión del ciclo celular y ayudando a mantener el número de neuroblastos en proliferación [112], aunque el mecanismo por el que lo lleva a cabo se desconoce. Asimismo, en *Xenopus laevis*, aPKC fosforila a p27Xic1, un inhibidor del ciclo celular que promueve la diferenciación neuronal. La fosforilación de p27Xic1 reduce su habilidad para bloquear a Cdk2, lo que provoca un acortamiento de las fases G1 y S del ciclo celular [113].

Muchas de las funciones de aPKC dependen de su localización en la membrana o en el córtex apical. Este hecho se hace más evidente en procesos de polaridad, donde proteínas como Par3, Par6 y Cdc42 son responsables de la localización y activación de aPKC en la membrana plasmática subapical. Sin embargo, recientemente se ha descrito una nueva función de aPKC como proteína nuclear regulando la proliferación y destino celular en *Xenopus* [114]. En este trabajo se describe la existencia de una fracción de aPKC que se localiza en el núcleo y que es fundamental para la neurogénesis primaria de este organismo. Este hecho abre un nuevo modo de actuación de aPKC a través de su localización nuclear

Una de las principales razones por las que aPKC ha sido una diana de investigación en los últimos años es su implicación en cáncer. Por un lado, aPKC está sobreexpresada en una gran variedad de cánceres humanos (ovario, pulmón y páncreas son algunos ejemplos, [14]) y actúa a través de su papel en la vía de señalización Ras en el desarrollo de los tumores [115-117]. Por otra parte, el papel clave de aPKC en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad epitelial, así como su implicación en la división celular hace que su regulación sea crítica para mantener la estructura tisular y evitar el desarrollo de tumores. La pérdida de polaridad celular es una característica clave del cáncer, de modo que la desregulación en el equilibrio entre los complejos de polaridad puede favorecer el desarrollo de tumores, al igual que la orientación errónea del huso mitótico en la división celular. En cánceres de mama y ovario aPKC se encuentra deslocalizada de la membrana subapical, mientras que la pérdida de aPKC de la membrana subapical perturba la arquitectura epitelial y es señal de identidad de los adenomas preinvasivos ([118,119] y revisado en [120,121]).

aPKC también juega un papel importante en la regulación mutua que existe entre polaridad y tráfico vesicular, participando tanto en procesos de endocitosis como de exocitosis. Estos aspectos se describen en el siguiente apartado.

Tráfico intracelular, polaridad epitelial y aPKC

La maquinaria de tráfico polarizado y la formación del eje apico-basolateral son fundamentales para el correcto funcionamiento de las células epiteliales. Ambos procesos deben estar mutuamente regulados, siendo esta conexión un foco de estudio actualmente.

Como ejemplo para ilustrar esta conexión, encontramos la función de Rab11 y el transporte a través de los RE en el reciclaje de Ecad, proteína fundamental para el establecimiento de las Uniones Adherentes y de la polaridad epitelial. En células epiteliales de *Drosophila*, la falta de función de componentes del exocisto provoca una acumulación de Ecad en vesículas Rab11 positivas, mientras que sus niveles en la membrana lateral se ven reducidos. Esto indica la existencia de un reciclaje de Ecad en estas células [63]. En células humanas no polarizadas la Ecad es transportada desde el TGN hacia la membrana plasmática a través de los RE y Rab11 [75]. De igual modo, existe un transporte de Crb mediado por Rab11 en la formación del lumen en células MDCK. Durante la primera división celular, las células MDCK internalizan Crb3 desde la membrana plasmática hacia la zona de división donde

se formará el lumen. En este proceso, Crb3 co-localiza con Rab11 en los RE siendo éstos fundamentales para transportar Crb3 a la zona de división. Además, en condiciones de ausencia de Crb3, la localización de PKC ζ en la membrana del lumen en formación está comprometida, quedando localizada en zonas residuales. Esto sugiere que Crb3 a su vez favorece el reclutamiento de PKC ζ en la membrana apical del lumen [122].

Algunos trabajos han implicado a aPKC en la regulación del tráfico vesicular intracelular tanto con los procesos de endocitosis como de exocitosis. Por ejemplo, Rosse et al. demuestran la función de aPKC en la exocitosis de la metaloproteasa MMP1, encargada de degradar la matriz extracelular. Este control del tráfico de MMP1 es clave para la invasividad de las células cancerígenas, como se ha demostrado en el cáncer de pecho [123] y pone de manifiesto la conexión entre polaridad, tráfico y cáncer a través de aPKC.

En otro trabajo se ha visto que la falta de función del complejo Cdc42/aPKC/Par6 produce una acumulación intracelular de Ecad en grandes vesículas que emanan de las Uniones Adherentes y que no consiguen separarse de la membrana plasmática. Un fenotipo similar se observa con el mutante de la Dinamina, encargada de la escisión de vesículas de la membrana plasmática durante la endocitosis. En mutantes *aPKC*, *par6* y *cdc42* la proteína Cip4 (efector de Cdc42 que recluta Dinamina) se encuentra deslocalizada en el citoplasma. Cip4 promueve además la endocitosis mediada por actina, por lo que al bloquear la función de Cdc42/aPKC/Par6 se bloquea también la endocitosis [124,125]. En el neuroectodermo de *Drosophila* Cdc42 regula la endocitosis de proteínas apicales. Embriones mutantes *cdc42* además de presentar niveles reducidos en la membrana de determinantes de polaridad tales como Ecad, Echinoid, Crb o Patj debido a una mayor tasa de endocitosis de proteínas apicales; muestran endosomas de mayor tamaño con altos niveles de Crb debido a un fallo en el paso de los endosomas tempranos a los tardíos. Este fenotipo es rescatado con la sobreexpresión de una versión constitutivamente activa de aPKC, indicando que la actividad quinasa de aPKC es un efector de Cdc42 en este proceso [126].

Por otro lado, se ha establecido una relación entre la quinasa Kibra (un regulador aguas abajo de la ruta de señalización Hippo) y aPKC en la regulación de la exocitosis. En células MDCK, Kibra es necesaria para la formación del Compartimento Vacuolar Apical (VAC, siglas en inglés) donde las proteínas apicales de nueva síntesis o endocitadas se acumulan. En células MDCK mutantes para *kibra* no se forma VAC y se produce un aumento de la exocitosis de proteínas apicales con una expansión del dominio apical. Kibra es un substrato de aPKC [127] y es capaz de inhibir la actividad quinasa de aPKC. El fenotipo obtenido en los mutantes *kibra* es rescatado por la inhibición de aPKC, indicando que Kibra regula la exocitosis apical mediante el bloqueo de aPKC [128].

En la formación del lumen en cistos de células MDCK, se ha relacionado la función de aPKC con el transporte vesicular mediado por Rab11. El transporte de la proteína Podocalixina hacia el sitio de iniciación de la membrana apical es fundamental para la formación del lumen. La Podocalixina se encuentra en la matriz extracelular cuando las células MDCK forman agregados celulares. Cuando se inicia la formación de los cistos, la podocalixina es

internalizada y transportada hacia la zona de formación del lumen en vesículas Rab11/Rab8. Estas vesículas además se encargan de transportar determinantes de polaridad como Par3. Por otra parte, tanto aPKC como Par3 participan en la exocitosis de las vesículas Rab11/Rab8 marcando la zona de la membrana donde deben anclarse estas vesículas. Tanto la falta de función de Par3 como la inhibición de aPKC producen acumulación de Podocalixina en vesículas intracelulares junto con Rab11, así como defectos en la formación del lumen. Además, la inhibición de aPKC reduce la internalización de Podocalixina en algunas células, indicando un papel adicional de aPKC en el proceso de endocitosis [129].

El tráfico intracelular puede regular polaridad y en concreto aPKC, aunque aún queda también mucho por investigar en esta dirección. Se ha descrito un tráfico vesicular vía Rab11 para localizar aPKC en la membrana plasmática apical en el lumen en formación. En las células luminales del tejido mamario de ratón, la proteína Huntingtina (HTT) es necesaria para la localización apical de Par3 y aPKC. HTT forma un complejo con Rab11, Par3 y aPKC participando en el transporte apical de estos determinantes de polaridad. Tanto la sobreexpresión de una versión de Rab11 dominante negativa como la eliminación de HTT con RNAi producen una deslocalización de Par3 y aPKC de la membrana apical. El fenotipo en ambos casos se rescata con la sobreexpresión de una versión constitutivamente activa de Rab11 [130], lo que sugiere un transporte de estos determinantes de polaridad vía Rab11.

Los diferentes trabajos realizados en modelos de formación de tejido epitelial polarizado, como las células MDCK de vertebrados o como puede ser la celularización en *Drosophila*, son fundamentales para entender la relación entre tráfico intracelular y el establecimiento de la polaridad epitelial. Sin embargo, poco se conoce de esta relación en un tejido maduro y ya polarizado, así como del posible papel de aPKC en esta regulación.

La gran versatilidad de aPKC, actuando a diferentes niveles en diversos procesos tales como crecimiento celular, polaridad o tráfico se lleva a cabo gracias a su interacción con diferentes proteínas que regulan su actividad y localización, así como con substratos a los que es capaz de regular. Este hecho indica la importancia de descubrir nuevos interactores de aPKC, no solo para conocer nuevas funciones en las que participe esta quinasa sino también para resolver interrogantes que aún existen en procesos ya conocidos, como puede ser la conexión polaridad-tráfico.

OBJETIVOS

1. Búsqueda de nuevas proteínas que interactúen con aPKC en condiciones nativas.
2. Análisis de la interacción física, genética y fosforilación de los candidatos obtenidos para seleccionar las proteínas más prometedoras.
3. Análisis en profundidad de la interacción entre aPKC y las proteínas más prometedoras, mapeando los dominios de interacción y residuos de fosforilación, así como estudiando la función y relevancia biológica de dichas interacciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de *Drosophila*

Líneas UAS/Gal4

En este trabajo hemos utilizado el sistema UAS/Gal4 [131]. Esta técnica se basa en el uso del factor de transcripción Gal4 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que reconoce y se une directamente a la secuencia reguladora UAS. Esta secuencia no une ningún factor de transcripción de *Drosophila*, ni hay en *Drosophila* secuencias reconocidas por la proteína Gal4. Este sistema permite la regulación temporal y espacial de la expresión de un gen de interés, ya que existen gran variedad de líneas transgénicas que expresan la proteína gal4 en distintos patrones espaciales y temporales durante el desarrollo de *Drosophila*. Así se puede inducir la expresión del gen de interés generando líneas transgénicas que lo contengan junto con secuencias UAS (Fig. 10). Del mismo modo se puede utilizar este sistema para la expresión de RNAs de doble cadena de genes dianas, controlando así el silenciamiento de dichos genes [132,133].

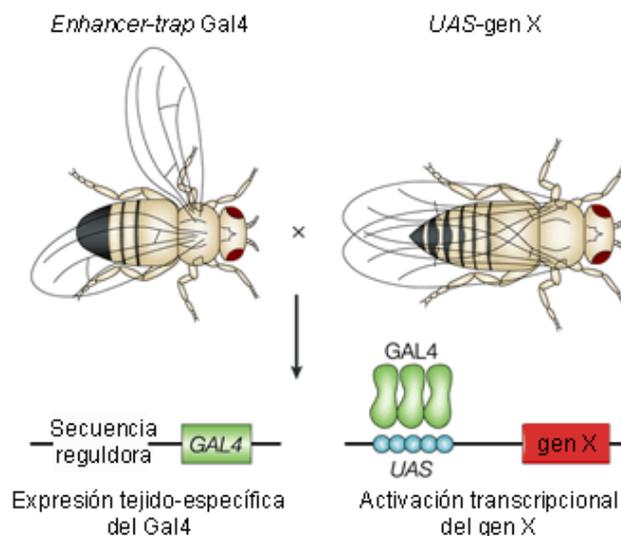


Figura 10. Representación del sistema UAS/Gal4. La técnica UAS/Gal4 permite la transcripción de un gen de interés (gen X) bajo la secuencia UAS, en las células que expresen la proteína Gal4. Imagen modificada de [134].

Las cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en esta tesis se mantuvieron en medio de cultivo estándar y a 25 °C en condiciones normales. Para ciertos experimentos de generación de clones de falta de función y de expresión se utilizaron diferentes temperaturas que se indican en los siguientes apartados.

Las diferentes líneas UAS utilizadas en esta tesis son las siguientes:

- *UAS-TT_aPKC* (Sotillos, S., previo a esta tesis)
- *UAS-TT_aPKC-CAAX* (Sotillos, S., previo a esta tesis)
- *UAS-TT_aPKC** (Esta tesis)
- *UAS-TT_aPKC*-CAAX* (Esta tesis)
- *UAS-TT_aPKC^{DQ_{in}}* (Sotillos, S., previo a esta tesis)

- *UAS-TT_aPKC^{D^{Qim}}-CAAX* (Sotillos, S., previo a esta tesis)
- *UAS-TT_aPKC^{D^{Qim}*}* (Esta tesis)
- *UAS-TT_aPKC*-CAAX* (Esta tesis)
- *UAS-TT_aPKC^{D^{reg}}* (Sotillos, S., previo a esta tesis)
- *UAS-TT_aPKC^{D^{reg}-CAAX}* (Sotillos, S., previo a esta tesis)
- *UAS-TT_aPKC^{D^{Qim}T^{422A}}* (Esta tesis)
- *UAS-TT_aPKC^{D^{Qim}T^{422D}}* (Esta tesis)
- *UAS-aPKC_RNAi* (Sotillos, no publicado)
- *UAS-Nuf_GFP* ([90])
- *UAS-Nuf_RNAi* (VDRC Stock Center)
- *UAS-Myc-Nuf Silvestre* (Esta tesis)
- *UAS-Myc-Nuf S155A* (Esta tesis)
- *UAS-Myc-Nuf S155D* (Esta tesis)
- *UAS-Rab11-RNAi* (VDRC Stock Center).

En cuanto a las líneas Gal4, en esta tesis he utilizado (Fig. 11):

- *69B-Gal4*: expresión ubicua en el ectodermo embrionario.
- *24B-Gal4*: expresión ubicua en el mesodermo embrionario.
- *salPE-Gal4*: expresión en el centro de la región presuntiva de ala [135]
- *en-Gal4*: expresión en el compartimento posterior de los discos imaginales [131].
- *hh-Gal4*: expresión en el compartimento posterior de los discos imaginales [136].

Cepas mutantes de Drosophila melanogaster

Se utilizaron las siguientes cepas mutantes:

- *aPKC^{K06403}* (Bloomington-Drosophila Stock Center)
- *nuf^d* [139]
- *nuf^{KG00314}* (Bloomington-Drosophila Stock Center)

- *shⁱts* (Bloomington-Drosophila Stock Center)
- *crb^{11A22}* (E. Knust)
- *baz⁴* (Bloomington-Drosophila Stock Center)
- *sec6^{A20}* (Bloomington-Drosophila Stock Center)
- *sec5^{E10}* (Bloomington-Drosophila Stock Center)
- *rip1^{KG02485}* [85]
- *lgl⁴* (Bloomington-Drosophila Stock Center)
- *npl4^{M101244}* (Bloomington-Drosophila Stock Center)
- *lam0⁰⁴⁶⁴³* (Bloomington-Drosophila Stock Center)
- *lam^{k2}* (Bloomington-Drosophila Stock Center)
- *syx5^{AR}* (Bloomington-Drosophila Stock Center)
- *γcop¹⁰* (Bloomington-Drosophila Stock Center)

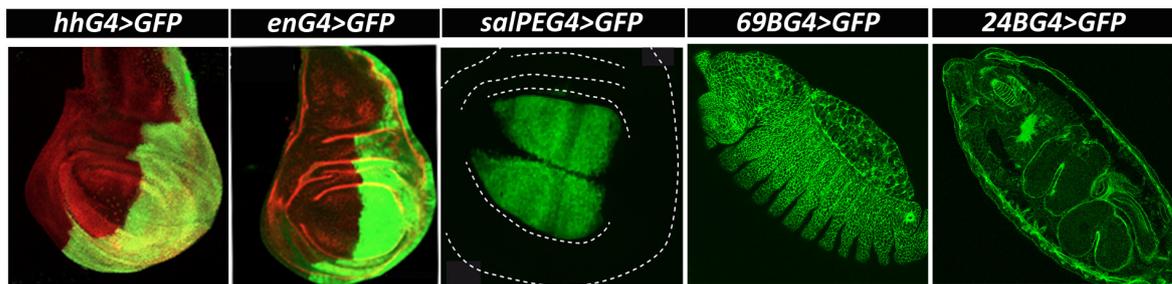


Figura 11. Patrón de expresión líneas Gal4. Expresión de GFP con las líneas Gal4 usadas en esta tesis: *hh-G4* (imagen modificada de [137]) y *en-G4* (imagen modificada de [138]) dirigen la expresión en el compartimento posterior del disco de ala; *salEPv-G4* lo hace en la región presuntiva de ala del disco imaginal de ala (imagen modificada de [135]; *69B-G4* y *24B-G4* dirigen la expresión en el ectodermo y mesodermo del embrión respectivamente. La línea blanca discontinua marca el contorno y pliegues del disco.

Otras cepas de *Drosophila melanogaster*

Para algunos de los experimentos realizados se ha utilizado como cepa control la línea silvestre Oregon R (OR).

Generación de clones de falta de función

Para la inducción de clones de falta de función se empleó el sistema FRT/FLP [140,141], que consiste en activar la recombinación mitótica entre cromátidas de cromosomas homólogos a

través de secuencias de reconocimiento de flipasa (secuencias FRT) y mediada por la enzima recombinasa flipasa (FLP) de levadura. La regulación del gen de la flipasa (*flp*) se realiza mediante el promotor termosensible del gen *hsp70* de *Drosophila* [140,142]. De esta manera tras producirse un choque térmico la flipasa se expresa y cataliza la reacción de recombinación de las secuencias FRT generando células homocigóticas para la mutación de interés.

Los clones en el disco imaginal de ala fueron generados mediante choque térmico (1 hora a 37°C) a 48-72, 72-96 y 96-120 horas después de la deposición de los huevos de los siguientes genotipos:

- *hsFLP* / + ; *FRTG13::aPKC^{K06403}* / *FRTG13::Ubi-GFP*
- *baz⁴::FRT19A* / *FRT19A::armLacZ*; *HSFlip* / +
- *hsFlip* / + ; *FRT82B::crb^{1A22}* / *FRT82B::Ubi.GFP*
- *hsFLP* / + ; *sec5^{E-0}::FRT40A* / *FRT40A::armLZ*
- *hsFLP* / + ; *sec6^{Δ20}::FRTG13* / *FRTG13::Ubi-GFP*; *hsFLP* / +
- *nuf¹::FRT80B* / *armLZ::FRT80B*
- *nuf^{KG00314}::FRT80B* / *armLZ::FRT80B*
- *shi^{ts}FRT9.2* / *FRT9.2::UbiGFP*; *hsFLP38*
- *hsFLP* / *rip11^{KG02485}::FRT19A*; *FRT19A::armLacZ*

En el caso de los clones *shi^{ts}*, las larvas se mantuvieron a 18 °C justo después del choque térmico para evitar la expresión de la proteína mutante y en el momento en el que las larvas alcanzaron el estadio larvario 3, se incubaron 3 horas a 33 °C para producir la expresión de la proteína, para posteriormente realizar la inmunohistoquímica.

Para generar embriones nulos para aPKC, indujimos clones en la línea germinal en hembras *hsFLP/+;FRTG13::aPKC^{K06403}/FRTG13::ovo^{D1-18}* mediante choque térmico (1 hora a 37°C) a partir de estadio 2 hasta la pupación en días consecutivos (48, 72 y 96 horas aproximadamente). Estas hembras se cruzaron con machos *aPKC^{K06403}/Cy0* y con los embriones generados en el cruce se realizó la inmunohistoquímica.

Generación de clones de expresión (Clones flp-out)

Este método combina el sistema FLP/FRT con el sistema Gal4/UAS (ambos mencionados anteriormente). Se trata de combinar los genes *gal4* junto con el gen de la proteína GFP bajo la secuencia UAS, con el promotor constitutivo del gen *Actin5C*, pero separados por una región de DNA que codifica para el gen *yellow* (produce un color amarillo en la mosca) y que está flanqueada por secuencias FRT [143]. Además contiene señales de parada de la transcripción, de manera que la transcripción de Gal4 no se produce hasta que en presencia de FLP las secuencias FRT se alinean y por recombinación se escinde la región en cuestión.

De este modo al combinar moscas con esta construcción, con otras que contengan el gen *hs-flp* (activación de la flipasa por choque térmico) y el gen de interés bajo la secuencia UAS, podemos generar clones de manera que las células en las que se ha producido la recombinación expresarán la proteína Gal4 y por tanto, el gen de interés. Además, estarán marcados por la expresión de GFP.

Este sistema se ha utilizado para generar clones que expresen un RNAi específico de Rab11, para eliminar la función de esta proteína, así como para expresar las versiones mutantes de Nuf. Para ello, los clones se generaron mediante choque térmico (1 hora a 37°C) a 48-72 y 72-96 horas después de la deposición de los huevos de los genotipos:

- *ywFlip ; act-G4::GFP>UAS-Rab11-RNAi*
- *ywFlip ; act-G4::GFP>UAS-Myc-Nuf S155A*
- *ywFlip ; act-G4::GFP>UAS-Myc-Nuf S155D*

2. Inmunohistoquímica

Tinción de embriones y discos imaginales

Para la tinción de embriones se utilizaron huevos depositados durante 8 horas, los cuales fueron decorionados en lejía comercial diluida al 50% en agua. Posteriormente fueron fijados a temperatura ambiente en una mezcla 1:1 de formaldehído al 4% en PBS y n-heptano durante 20 minutos en agitación. Después de la fijación, se retiró el formaldehído y se añadió un volumen de metanol para desvitelinizar los embriones por agitación. Posteriormente se lavaron los embriones 3 veces con metanol y 2 veces con PBT (PBS Tween-20 al 0,1%).

En el caso de la tinción de discos imaginales de ala, se diseccionaron larvas de estadio 3 y se fijaron los discos en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos en agitación, con una segunda fijación en paraformaldehído al 4% y Tritón X-100 al 0,1% durante 20 minutos en agitación. Para las tinciones de clones *shⁱ*, el proceso de disección y la primera fijación se realizaron en hielo.

Embriones y discos se bloquearon y se tiñeron en PBT-BSA al 1% para embriones y PBTr-BSA al 1% (PBS Tritón X-100 al 0,1%) para discos. Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo aparecen en el apartado 7 de materiales y métodos. Para el revelado empleamos anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor-488, -555 y -647 de *Invitrogen*, a una concentración 1/200 en PBT-BSA 1% o PBTr-BSA 1% para embriones o discos respectivamente. Para la tinción de núcleos se utilizó DAPI (*Molecular Probes*, 1/500) y para la tinción de actina, faloidina conjugada con rodamina (1/100). Los embriones se montaron en *Vectashield* (*Vector Lab*) y los discos imaginales en glicerol al 80%. Las imágenes fueron tomadas en los microscopios Leica SP2 DME y Leica TCS SPE y se trataron con el programa ImageJ para realizar proyecciones y secciones en el eje Z.

Tinción de células humanas

Para las tinciones de células humanas se utilizó la línea celular H226 (células epiteliales derivadas de pulmón) y, tanto la cepa silvestre como la shPKCi (con el RNAi de PKCi), se generaron en el laboratorio de Jorge Moscat.

Para la tinción se cultivaron dichas células en cubiertas de vidrio estériles colocadas en pocillos de placas de cultivo (p100) también estériles, a una concentración de 20.000 células por pocillo. Una vez el cultivo celular ha crecido cubriendo toda la superficie de vidrio (aproximadamente 2 días), se lavaron las células 2 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% y previamente calentado a 37°C, durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se realizó un lavado con PBS y se incubaron las células con NH₄Cl durante 10 min a TA. Se realizó un lavado con PBS y se permeabilizaron las células incubándolas durante 15 min con Tritón X-100 al 3% (en PBS) a TA. Se volvieron a lavar las células con PBS y se bloqueó la peroxidasa endógena incubando 5 min con H₂O₂ al 3% en metanol. Se rehidrataron las células incubando 5 min con PBS (2 veces) y posteriormente se bloquearon durante 30 min con tampón TNB.

Posteriormente se incubaron con anticuerpo Rab11FIP3 (*ThermoFisher*) a 1/100 en TNB durante toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente se lavaron las células varias veces con TNT (ver composición de tampones, apartado 5) y se incubaron con anticuerpo Rabbit-Biotinilado (*Dako*) a 1/500 en TNB durante 1 hora a TA. Posteriormente se lavaron varias veces con TNT y se incubaron con Streptavidine-Peroxidase (*Invitrogen*) a 1/300 en TNB durante 30 minutos a TA. Se lavaron las células varias veces en TNT y se incubaron con Tiramida 488 a 1/300 en tampón de amplificación durante 10 minutos a TA. Se realizaron varios lavados con TNT y se incubaron las células con DAPI (*Molecular Probes*) a 1/500 durante 5 minutos a TA. Se lavaron las células varias veces con TNT y se montaron las preparaciones en portaobjetos con el medio de montaje Moviol (*Calbiochem*). El tampón TNB y la Tiramida 488 forman parte de un *kit* comercial (*Molecular Probes, Life Technologies*). Las imágenes se obtuvieron en el microscopio Leica TCS SPE y fueron analizadas con el programa de imagen ImageJ.

Cuantificación de la tinción de anticuerpo

Se proyectaron 15 imágenes de confocal de 0.16 µm de grosor usando el algoritmo de intensidad media (ImageJ). Posteriormente se seleccionaron 5 células al azar tanto en el compartimento posterior como en el anterior del disco de ala. La intensidad de fluorescencia (intensidad de pixel gris mostrada en unidades arbitrarias) fue medida a lo largo de una línea de 3 µm de longitud que incluía en el centro la zona de contacto celular. Se midieron 5 muestras diferentes para cada genotipo. De forma similar se realizó para el análisis de la localización de las versiones mutantes de Nuf.

3. Biología Molecular

Construcciones de plásmidos de sobreexpresión

- pGEX-6P-1-Nuf_{FL} (proteína completa) de [90].
- pGEX-2T-Nuf_{NH} y pGEX-2T-Nuf_{CO}: a partir del cDNA de *nuf* (clon RE46851) se amplificaron fragmentos codificantes para la región amino-terminal de Nuf (Nuf_{NH}) o la región carboxi-terminal (Nuf_{CO}) usando los cebadores Nuf_{NH} for (BamHI), Nuf_{NH} rev (BamHI), Nuf_{CO} for (BamHI) y Nuf_{CO} rev (BamHI). Después de secuenciar los fragmentos, fueron subclonados en pGEX-2T (*GE-Healthcare*) dentro de la diana BamHI.
- Mutantes pGEX-2T-Nuf_{NH}: La mutagénesis de Nuf_{NH} fue realizada con el sistema *Site Directed Quick-Change (Stratagene)* usando pGEMt-easy-Nuf_{NH} silvestre como molde y las parejas de cebadores: Nuf S155A for y Nuf S155A rev; Nuf S155D for y Nuf S155D rev; Nuf S180-2A for y Nuf S180-2A rev; Nuf S175A for y Nuf S175A rev; Nuf T159A for y Nuf T159A rev. La mutagénesis se confirmó por secuenciación. Los fragmentos mutados fueron clonados en pGEX-2T dentro de la diana BamHI.
- Mutantes pGEX-2T-Nuf: Los fragmentos (BamHI/BamHI) de las construcciones pUASp-Nuf conteniendo las mutaciones S155A o S155D (descritos en el siguiente apartado) se usaron para sustituirlos en pGEX-2T como BamHI/BamHI.
- Mutantes pGEX-6P-1-Nuf: Los fragmentos (BamHI/HindIII) conteniendo las mutaciones S155A or S155D de las construcciones pGEX-2T-Nuf se usaron para sustituirlos como BamHI/HindIII en pGEX-6P-1-Nuf_{FL}.
- pGEX-6P-1-14-3-3: Se extrajo la región codificante para 14-3-3 del plásmido pMAL-c::14-3-3 (cortesía del laboratorio de Daniel St. Johnston) utilizando las dianas de restricción BamHI y NotI, para posteriormente clonarlo en el pGEX-6P1 en las mismas dianas, quedando en fase con la GST.
- pGEX-2T-Rab11: Se utilizó el cDNA de *rab11* (clon RE11886) para amplificar un fragmento usando los cebadores Rab11Bam5' y Rab11Bam3'. Después de secuenciar el fragmento, se subclonó en pGEX-2T en la diana BamHI.
- pGEX-2T-Syx1: Se amplificó el fragmento a partir del cDNA de *syx1* (clon LD43943) con la pareja de cebadores Syx1-Bam5' y Syx1-Bam3'. Tras secuenciar el fragmento, se subclonó en pGEX-2T en la diana BamHI.
- pGEX-2T-Syx4: Se amplificó el fragmento a partir del cDNA de *syx4* (clon RE02884) con la pareja de cebadores Syx4-Bam5' y Syx4-Bam3'. Tras secuenciar el fragmento, se subclonó en pGEX-2T en la diana BamHI.
- pGEX-2T-βCoat_{NH} y pGEX-2T-βCoat_{CO}: Se amplificaron los fragmentos a partir del cDNA de *βCoat* (clon GH09317) con las parejas de cebadores Bcoat-Bam5' y Bcoat-Bam3' para la mitad NH y Bcoat-EcoRI5' y Bcoat-EcoRI3' para la mitad CO. Tras secuenciar el fragmento, se subclonó en pGEX-2T en la dianas BamHI (mitad

NH) y EcoRI (mitad CO).

- pGEX-3X-Rip11 y pGEX-2T-Rip11NH: Para la construcción pGEX-3X-Rip11 Se amplificó un fragmento desde el plásmido pOT2-Rip11 (clon #1644005, *Gold Collection*) usando la pareja de cebadores Rip11 BamHI y Rip11 RI. Posteriormente fue digerido con BamHI y EcoRI y clonado en pGEX-3x como BamHI/EcoRI. La construcción con solo el fragmento Rip11NH se obtuvo debido a que uno de los clones amplificados para la proteína completa Rip11 sufrió una mutación espontánea en R172 que generó un codón de terminación.
- pGEX-3X-Rab11-FIP3 and pGEX-3X-Rab11 Nt de [144]
- pGEX-3X-Rab11-FIP3 Ct: Para esta construcción se digirió el plásmido pGEX-3X-Rab11-FIP3 con BamHI y posteriormente se rellenó con la enzima Klenow y se religó. Se secuenciaron para comprobar que se había eliminando la parte Nt y manteniendo la pauta de lectura con la GST.

Construcciones UAS

- pUASp-6xmyc-Nuf: Se obtuvieron los fragmentos mediante digestión NotI/HindIII de los plásmidos pGEM-easy-NufNH silvestre y mutantes. Estos fragmentos se clonaron en pFLC-I-*nuf* (clon RE46851) para obtener las versiones silvestre y mutantes de Nuf sin la secuencia 5'UTR y con un sitio de BamHI antes del primer ATG. Posteriormente, se realizó una digestión BamHI/BamHI de estos plásmidos generados (pFLC-I-NufFL, pFLC-I-NufFL S155A y pFLC-I-Nuf S155D) y los fragmentos fueron clonados en el vector pUASp. El fragmento con 6 secuencias consenso Myc se clonó en fase en la parte 5' mediante el sitio de restricción SpeI.
- Construcciones pUASp-TT: Las versiones con el dominio quinasa mutado han sido generadas por mutagénesis dirigida (K293W) usando la pareja de cebadores aPKC mut for y aPKC mut rev, usando como molde los plásmidos pGEMt-easy-aPKC y aPKC^{D^{Quin}}. La mutación se confirmó por secuenciación y se subclonaron los fragmentos en pUASp-TT como NotI/NotI (aPKC*) y NotI/XbaI (aPKC^{D^{Quin}*}).

El resto de construcciones TT utilizadas en esta tesis ya habían sido generadas en el laboratorio previamente, de la siguiente forma: el fragmentos EcoRI/NotI del plásmido pCASPER-TT [145] conteniendo el *TetraTag* (TT) fue clonado en pUASp como EcoRI/NotI. Por otro lado los fragmentos aPKC, aPKC^{D^{Quin}} y aPKC^{D^{Reg}} se amplificaron usando el cDNA de *aPKC* (clon AY118402) como molde y las siguientes parejas de cebadores: NotI-aPKC 5', XbaI-aPKC 3', NotI-aPKC^{D^{Quin}} 5' and XbaI-aPKC^{D^{Reg}} 3'. Posteriormente fueron clonados en pGEMt-easy y secuenciados. Los fragmentos NotI-NoI fueron clonados en pUASp-TT manteniendo la pauta de lectura con el TT.

4. Bioquímica

Preparación de extractos

Embriones de *Drosophila* decorionados en lejía comercial diluida al 50% en agua destilada fueron recogidos en n-heptano y congelados a -80°C (previa eliminación del n-heptano) hasta recoger la cantidad necesaria para el experimento. Para los ensayos de búsqueda de interactuantes de aPKC se utilizaron 5 ml de embriones para cada condición. Para los ensayos de *Pull Down* y los ensayos de purificación para ver interacciones específicas, se usaron entre 100 y 500 μl .

Se colocaron los embriones en un homogenizador o tubo de 1,5 ml y se lavaron dos veces con tampón de lavado de embriones para eliminar los restos de heptano. Se retiró el tampón de lavado y se añadió un volumen de tampón de lisis equivalente al volumen de embriones. Se lisaron y homogenizaron los embriones dando varios pases con el émbolo hasta obtener un extracto homogéneo. Se incubó este extracto en hielo durante 30 min y se centrifugó posteriormente a 13000 rpm y 4°C durante 30 min. Se recogió el sobrenadante evitando la capa superior de lípidos. Se cuantificó la concentración de proteínas del extracto usando el reactivo Bradford.

Para los extractos de células 293T, las células se resuspendieron en tampón $\sigma 3$, se incubaron en hielo durante 30 min y se centrifugaron a 13000 rpm y 4°C durante 30 min.

Preparación de Dynabeads® recubiertas con Inmunoglobulina G (IgG)

Se resuspendieron 150 mg de esferas magnéticas (*Dynabeads*®) en 10 ml de tampón 0,1M NaPO_4 pH 7,4. Se agitó la mezcla durante al menos 10 min.

Mientras, se preparó la mezcla de IgG resuspendiendo 25 mg de IgG procedente de conejo en 4 ml de H_2O miliQ. Se disolvió bien agitando en vórtex y posteriormente se centrifugó a 4°C y 13000 rpm durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se preparó una mezcla con:

- 3,525 ml de las IgG
- 9,850 ml de tampón 0,1M NaPO_4 pH 7,4.
- 6,650 ml de Sulfato de Amonio 3M, añadiéndolo lentamente.

Se centrifugó la mezcla a 4500 rpm y 22°C durante 20 min.

Se lavaron las *Dynabeads*® con 4 ml de tampón 0,1M NaPO_4 pH 7,4 agitando con el vórtex 15 segundos. Se retiró el tampón y se añadieron 10 ml de la mezcla con las IgG. Se incubó a 30°C y en agitación (noria) entre 18 y 24 horas.

Después de la incubación se lavaron las esferas magnéticas con 6 ml de HCl Glicina pH 2,5 100mM, retirándolo lo más rápido posible. Se realizó un lavado con Tris HCl 10 mM pH 8,8 y a continuación se realizó otro lavado rápido con Trietilamina 100mM preparada en

el momento de usarla. Se lavaron 4 veces con 10 ml de PBS 1X durante 5 min en agitación (noria). Se lavaron nuevamente con PBS 1X suplementado con 0,5% de Tritón X-100 durante 5 min en agitación (noria). Se realizó un último lavado con PBS 1X suplementado con 0,5% de Tritón X-100 durante 15 min en agitación (noria).

Finalmente se resuspendieron las *Dynabeads*[®] en 2 ml de PBS 1X suplementado con 0,02% de Azida Sódica y conservándose a 4°C hasta su uso.

Purificación por afinidad

Para la purificación por afinidad utilizada para la búsqueda de proteínas que interactúan con aPKC (Fig. 12) se usaron esferas magnéticas, denominadas *Dynabeads*[®], recubiertas de Inmunoglobulina G (ver punto anterior). Se equilibraron 200 µl de bolas magnéticas por ensayo, lavándolas 3 veces con tampón de lisis. El tampón de lisis se retiró con ayuda de una placa magnética. Una vez equilibradas, se incubaron las *Dynabeads*[®] con los extractos (5 ml de embriones) durante 1 hora, a 4°C y en agitación utilizando para ello una noria.

A continuación se recogió el sobrenadante (sobrenadante después de *Dynabeads*[®]) y se lavaron las esferas 4 veces con el tampón IP1500. Dichos lavados se conservaron para comprobar el proceso de purificación. A cada muestra se añadió 300 µl de tampón IP1500 suplementado con DTT 1mM y 20 µl de proteasa TEV (Tobacco Etch Virus). Se incubó durante 4 horas, a 4°C y en agitación utilizando un rotor acoplado a un vórtex.

Se recogió el sobrenadante (sobrenadante después de TEV) y se lavaron las esferas magnéticas con 150 µl de IP1500. Se volvió a recoger el sobrenadante y se añadió al sobrenadante después de TEV. Finalmente se resuspendieron las esferas en 450 µl de tampón IP1500.

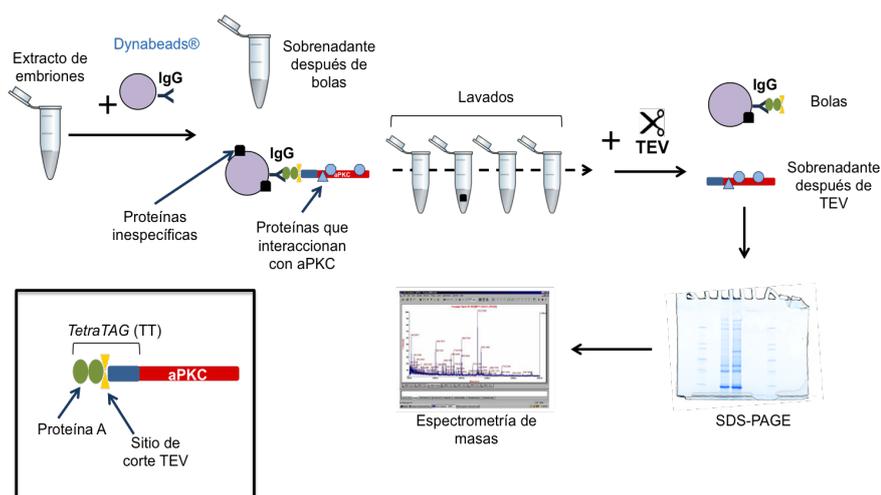


Figura 12. Representación esquemática del proceso de purificación por afinidad. Diferentes pasos de la purificación por afinidad realizada en esta tesis, desde la obtención del extracto de embriones hasta la identificación por espectrometría de masas. En el cuadrado negro se muestra un esquema de las construcciones de aPKC fusionadas al TetraTAG (TT).

Por *western blot* se analizaron las muestras: extracto inicial, sobrenadante después de *Dynabeads*[®], lavados de IP1500, sobrenadante después de TEV y *Dynabeads*[®]. Con ello se comprobó el contenido de la proteína a purificar en cada una de las muestras con el objetivo de conocer si el proceso de purificación había sido correcto.

Posteriormente se precipitó el sobrenadante después de TEV utilizando el protocolo de *2-D Clean-Up Kit* (*GE Healthcare*), de modo que se concentró la mezcla de proteínas presentes en la muestra. Para separar dichas proteínas, se corrió el eluido concentrado en un gel *SDS-Page* en gradiente (4-15%) y se compararon las bandas que aparecían en los experimentos y en el control. Aquellas bandas que solo aparecían en los experimentos se recortaron del gel y se identificaron las proteínas presentes en la banda, en nuestro caso por espectrometría de masas del Servicio de Proteómica del Parque Científico de la Universidad Autónoma de Madrid.

Esta técnica también se ha usado para estudiar interacciones de los dominios regulador, quinasa de aPKC con la proteína Nuf. En estos casos se procedió de igual manera que la descrita anteriormente, ajustando los volúmenes: 150 μ l de embriones, 40 μ l de esferas magnéticas por experimento, 150 μ l de tampón IP1500 y 5 μ l de TEV para la elución. Las esferas se resuspendieron en 150 μ l de tampón IP1500.

Ensayos de afinidad dominios quinasa de aPKC y GST-Nuf

Para los experimentos de interacción entre los dominios quinasa silvestre y mutados de aPKC con Nuf, se generaron esferas magnéticas cubiertas del dominio quinasa silvestre y del dominio quinasa mutado en el sitio de unión de ATP [36] de aPKC (Fig. 13). Estas esferas se generaron siguiendo el protocolo establecido para la purificación por afinidad, usando 150 μ l de embriones por experimento y omitiendo el paso de elución con TEV.

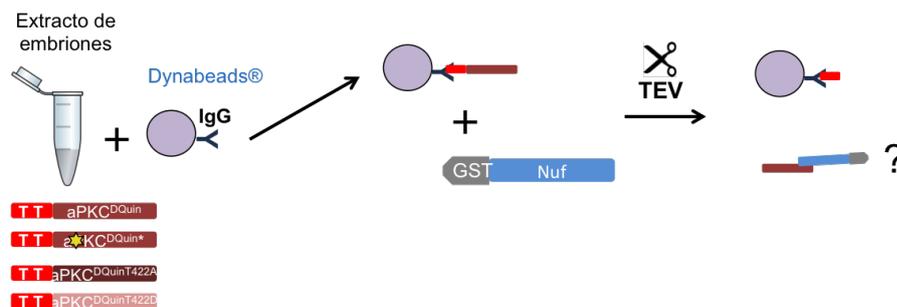


Figura 13. Representación esquemática de los ensayos de afinidad con el dominio quinasa de aPKC y Nuf. Extractos de embriones sobre-expresando las diferentes versiones del dominio quinasa de aPKC con el TT se incuban con esferas magnéticas recubiertas de IgG. Después de varios lavados se obtienen los dominios quinasa unidos a las esferas, las cuales se incuban con GST-Nuf recombinante purificado. Finalmente, se eluye con TEV y analizamos el sobrenadante para comprobar si hay unión entre Nuf y aPKC.

Se equilibraron 20 μ l por experimento de las esferas con tampón de lisis, lavándolas dos veces. Posteriormente se añadieron a las esferas 400 μ l de tampón de lisis con 20 μ g de GST-Nuf purificado (siguiendo el método de producción de anticuerpo). Se incubó durante 3 horas a

4 °C y en agitación.

A continuación se lavaron las esferas 4 veces con tampón IP1500 y un último lavado con Tris 50 mM pH 6,8. Las bolas se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga 2X y se hirvieron para ser analizadas por *western blot*.

En los experimentos en los que se trataba de eliminar la autofosforilación de aPKC en su dominio quinasa, se eliminó el ortovanadato del tampón de lisis ya que inhibe la actividad fosfatasa. Se preparó una mezcla con 260 µl de tampón de lisis y 30 µl de tampón de fosfatasa alcalina (Promega, 10X) y se incubó a 30 °C durante 10 minutos. Posteriormente se añadió 30 µl de fosfatasa alcalina (Promega, *Alkaline Phosphatase Calf Intestinal* 20 U/µl) y esta mezcla se incubó con las esferas durante 15 minutos a 30 °C. A continuación se lavaron las esferas 3 veces con tampón de lisis sin ortovanadato y se incubaron con 400 µl de tampón de lisis con 20 µg de GST-Nuf purificado. Posteriormente se procedió de forma similar a lo expuesto anteriormente.

Preparación de esferas GST

Para la elaboración de esferas de agarosa unidas a las construcciones GST utilizadas en esta tesis, partimos de 1 litro de cultivo bacteriano (cepa de *E. Coli* BL21(DE3)pLysS) transformado con la construcción de interés. La inducción se realizó con IPTG y las condiciones varían dependiendo de la construcción. En la tabla 1 se resumen las condiciones de inducción de las diferentes construcciones.

Construcción	Tª de inducción (°C)	D.O. (600nm)	Concentración IPTG (mM)	Tiempo de inducción (horas)
pGEX 6P1 – Nuf FL	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 2T – Nuf CO	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 2T – Nuf NH	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 2T – Nuf NH S155A	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 2T – Nuf NH T159A	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 2T – Nuf NH S175A	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 2T – Nuf NH S180A	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 2T – Nuf FL S155A	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 2T – Nuf FL S155D	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 3X – Rab11-FIP3 wt	20	1-2	0,25	12-16
pGEX 3X – Rab11-FIP3Nterm	20	1-2	0,25	12-16
pGEX 3X–Rab11-FIP3 Ct	20	1-2	0,25	12-16
pGEX 2T – Rab11	37	0,6	0,5	3
pGEX 3X – Rip11	20	1-2	0,25	12-16
pGEX 3X – Rip11NH	37	0,6	0,1	1
pGEX 2T – βCoatómero NH	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 2T – βCoatómero CO	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 2T – Sintaxina 1	20	0,6	0,1	16-20
pGEX 2T – Sintaxina 4	20	0,6	0,1	16-20

Tabla 1. Relación de construcciones utilizadas para sobreexpresión de proteínas y sus condiciones de sobreexpresión. D.O. hace referencia a la densidad óptica del cultivo al inicio de la inducción. El tiempo de inducción indica el número de horas que dura la inducción. Aquellas construcciones cuyo tiempo de inducción son dos valores, éstos indica el número mínimo y máximo de horas durante las cuales se produce la inducción.

Una vez realizada la inducción, se recogió el cultivo por centrifugación a 5000 rpm y 4°C durante 15 min. Se retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 40 ml de PBS suplementado con DTT 1mM e inhibidores de proteasas (*Complete Roche*) por cada 500 ml de cultivo.

A continuación se lisaron las células por sonicación (sonicador *Branson Digital Sonifier*). El programa de sonicación consta de 6 min de tiempo total en funcionamiento, en intervalos de 2 segundos en funcionamiento y 3 segundos en parada, con una amplitud del 30%. Después de la sonicación se añadió Tritón X100 hasta 1% y se incubó en hielo durante 30 min.

Posteriormente se centrifugó durante 30 min a 15000 rpm y 4°C. Se recogió el sobrenadante y se incubó con 75 mg de esferas de agarosa-glutación previamente lavadas 3 veces con PBS suplementado con DTT 1mM e inhibidores de proteasas. Se incubó durante 4 horas a 4°C con agitación.

Después de la incubación se centrifugó a 3000 rpm y 4°C durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavaron las esferas 3 veces con PBS y 1mM de DTT. Se lavaron 2 veces más con PBS, 1mM de DTT y 1M de NaCl. Finalmente se guardaron las esferas a -80°C en PBS, DTT 1mM y glicerol al 40%.

Para cuantificar la cantidad de proteína unida a las esferas se corrió un gel de acrilamida con diferentes volúmenes de las esferas y en paralelo con cantidades crecientes de BSA. El gel se reveló con el colorante *EZ-Blue (Sigma)*.

Producción de anticuerpo contra Nuf

Para la producción de anticuerpo contra la proteína Nuf, se partió de un pre-inóculo de 300 ml de medio LB (Tryptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1% y Agar 1,5%) con ampicilina y cloranfenicol de bacterias BL21(DES)pLysS transformadas con la construcción pGEX-6P-1 GST-Nuf, crecido durante toda la noche a 37 °C y en agitación.

El día siguiente se establecieron 3 cultivos de 1 l de medio LB con ampicilina y cloranfenicol a los que se añadió a cada uno 100 ml del pre-inóculo de la noche anterior. Estos cultivos se crecieron a 37 °C y en agitación hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm de 0,3. En este punto, se bajó la temperatura a 20 °C. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,6 (medida a 600 nm), se indujo la expresión de la proteína. Posteriormente se realizó la inducción y obtención de extracto siguiendo el método utilizado para la elaboración de esferas GST-Nuf (apartado anterior).

Se guardó 0,5 ml de este punto para su análisis posterior (Fig. 14, Extracto) y se incubó el resto durante 4 horas a 4°C y en agitación con 240 mg de esferas de agarosa-glutación previamente equilibradas (3 lavados con PBS suplementado con 1mM de DTT e inhibidores de proteasas).

A continuación, se pasó el extracto con las esferas por una columna de cristal y se recogió el sobrenadante (Figura 14, Sobrenadante). Este proceso se realizó a 4 °C. Se lavó la columna 2 veces con 6 ml en cada lavado con PBS 1X y DTT 1mM. Se recogieron los lavados para su

posterior análisis (Figura 14, Lavados 1.X). Se realizaron 2 lavados más con PBS 1X, 1mM de DTT y 1M de NaCl. Al igual que en el paso anterior, se recogieron los lavados (Figura M5, Lavados 2.X). Los últimos 2 lavados fueron con PBS 1X y 1mM de DTT (Figura 14, Lavados 3.X).

Finalmente, se eluyó la proteína unida a las esferas con 4 ml del tampón de elución. Se recogió este eluido como Eluido 1 (Fig. 14). Se realizó una segunda elución con 4 ml del tampón de elución. A este eluido se le denominó Eluido 2 (Fig. 14). Se calculó la concentración de proteína de los eluidos midiendo la absorbancia de los mismos a 280 nm usando para ello un *nanodrop*. El Eluido 1 estaba a una concentración de 6,37 mg/ml.

Se cargaron muestras de cada paso en un gel de acrilamida que posteriormente se tiñó con *EZ-Blue* (Sigma) para comprobar el proceso de purificación (Fig. 14). De los 4 ml del Eluido 1, se liofilizaron 2 ml. Dicho liofilizado se usó para generar un anticuerpo policlonal a través de la empresa *Genosphere Biotech*. Al resto de Eluido 1 y el Eluido 2 se le añadió glicerol al 20 % y se guardó a -80 °C para usos posteriores.

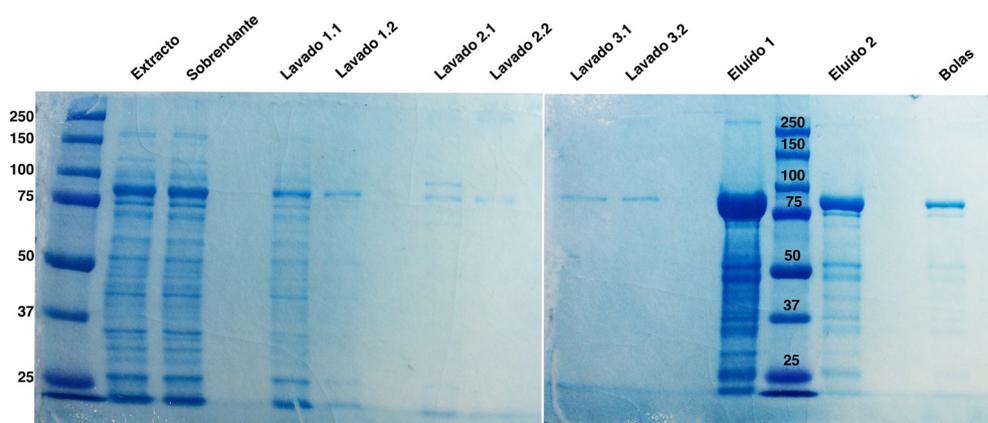


Figura 14. Purificación GST-Nuf. Tinción de *EZ-Blue* de muestras de los diferentes pasos de la purificación de GST-Nuf.

Ensayos de afinidad proteína-proteína (Pull Down)

Para los ensayos de afinidad proteína-proteína o *Pull Down* (PD), usamos esferas de agarosa recubiertas de proteína GST para el control y de las proteínas del experimento fusionadas a GST (ver apartado construcciones GST). Los extractos de embriones o células usados se diluyeron en tampón de lisis hasta conseguir un extracto de 500 µl con 400 µg de proteína total por experimento. Dichos extractos se incubaron con esferas de agarosa durante 1 hora a 4°C y en agitación (noria). Dicho proceso se conoce como pre-adsorción. Después de la pre-adsorción, se centrifugaron los extractos a 13000 rpm y 4°C durante 5 minutos. Se recogió el sobrenadante y se reservó a 4°C.

Para cada experimento y control se prepararon 30 µg de proteína unida a esferas de agarosa.

Si para conseguir 30 µg de proteína no se alcanzaban 30 µl de esferas, se completaba el volumen con esferas de agarosa-glutatinación vacías (sin ninguna proteína unida).

A continuación, se incubaron los extractos pre-adsorbidos con las esferas lavadas previamente en tampón de lisis durante 4 horas a 4 °C y en agitación (balancín). Después de esta incubación, se lavaron las esferas 3 veces con tampón IP1500 y se realizó un último lavado con Tris 50mM pH 6,8. Se retiró todo el sobrenadante y se añadieron 20 µl de tampón de carga 2X. Antes de cargar las muestras en un gel de acrilamida, se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron posteriormente a 13000 rpm durante 10 segundos.

Pull Down (PD) in vitro

Para los *pull down in vitro* se incubaron 20 µg de proteínas de fusión GST (GST-Nuf, GST-Rip11) unidas a esferas de agarosa con 0,25 µg de proteína PKCz comercial (*PRKCz Recombinant Human Protein, Life Technologies*) en tampón de lisis durante 2 horas a 4 °C y en agitación (balancín). Para el PD *in vitro* entre GST-Rab11 y los mutantes Nuf, se incubaron 20 µg de proteína de fusión GST-Rab11 con 200 ng de los diferentes mutantes Nuf a los que se les cortó la GST usando la proteasa *Prescission (GE Healthcare)* en PBS, 2 mM DTT, 1mM PMSE, 1 mM de Ortovanadato Sódico e Inhibidor *Complete 1X (Roche)*. Las esferas se equilibraron previamente con el tampón de incubación en cada caso, haciendo varios lavados y añadiéndose 30 µg de BSA después del último lavado. Como control negativo se usó proteína GST. Después de la incubación se lavaron las esferas 3 veces con PBS suplementado con 0,5 M de NaCl.

Para el PD *in vitro* entre GST-Nuf y 14-3-3, se incubaron 20 µg de proteína GST-Nuf en Tampón de Fosforilación con 500 µg de PKCz comercial (solo una de las muestras) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las esferas se lavaron con Tampón de interacción 14-3-3 tres veces y después se incubaron con 500 ng de proteína 14-3-3 purificada a la que se le cortó la GST usando la proteasa *Prescission* en el Tampón de Interacción 14-3-3. Después se lavaron tres veces con Tampón de Lavado 14-3-3.

En todos los casos se hizo un último lavado con Tris 50 mM pH 6,8. Una vez eliminado el último lavado, las esferas se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga 2X y se hirvieron para su posterior análisis por *western blot*.

Co-inmunoprecipitación

Para hacer los ensayos de co-inmunoprecipitación se incubaron 30 µl (al 50%) de esferas de agarosa y proteína G/A con 1-2 µg del anticuerpo elegido para el ensayo en 0,5 ml de PBS-0,01% de Tritón X-100. Como control se usó un anticuerpo contra β-Gal generado en la misma especie que el anticuerpo usado en el ensayo. La incubación se realizó a 4°C y en agitación (noria) durante toda la noche.

Después se realizaron 3 lavados a las esferas de agarosa con tampón de lisis centrifugando 3

minutos a 3000 rpm y 4°C. Se añadieron 10 µl de BSA (10 µg/µl) después del último lavado.

2 mg de proteína total de los extractos (de embriones o discos imaginales) se pre-adsorbieron diluyéndolos hasta un volumen de 500 µl e incubándolos con 30 µl de esferas con proteína A durante 30 minutos a 4°C y en agitación (noria). Posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C y 13000 rpm para recoger el sobrenadante.

El sobrenadante de los extractos se mezcló con las esferas de agarosa y se incubaron en agitación (balancín) y a 4°C durante 4 horas. Después de la incubación se lavaron las esferas 4 veces con tampón de lavado CoIP. Por último, se realizó un lavado con PBS frío que se retiró completamente.

La resina se resuspendió en 25 µl tampón de carga y se hirvió durante 5 minutos para poder ser cargada en un gel de acrilamida y realizar el análisis por *western blot*.

Ensayos de fosforilación

Para los ensayos de fosforilación con aPKC, se realizaron ensayos quinasa *in vitro* usando la técnica desarrollada por A. Koch et al [146] y puesta a punto para aPKC por el laboratorio de Jorge Moscat, laboratorio en el que realicé una estancia para aprender la técnica. Para la reacción de fosforilación se usó entre 100 y 200 ng del sustrato a fosforilar y 140 ng de PKC₁ota producida en el laboratorio de Jorge Moscat o de PKC_z (*PRKCz Recombinant Human Protein, Life Technologies*) dependiendo del experimento. Todos los sustratos usados en esta tesis para los ensayos de fosforilación han sido construcciones GST unidas a esferas de agarosa-glutatin. No fue necesario eluir las proteínas de las esferas para hacer los ensayos. La reacción se llevó a cabo en el tampón de fosforilación suplementado con 1mM DTT y 0,1mM ATP γ S (*Biolog*) durante 1 hora a 30 °C; en un volumen final de 20µl. Posteriormente se añadió EDTA a 20mM y PNMB a 2,5mM, incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se añadió tampón de carga (5 µl de tampón 5X) y se hirvieron las muestras para ser cargadas en un gel de acrilamida. Se usa la mitad de cada muestra para la detección de la fosforilación mediante *western blot* usando un anticuerpo contra tio-fosfato y la otra mitad para control de carga tanto de sustrato como de enzima haciendo un *western blot* contra GST y aPKC.

Es importante indicar que todos los ensayos de fosforilación se realizaron con los respectivos controles, usando controles positivos con sustratos cuya fosforilación por aPKC era conocida así como controles negativos realizando fosforilaciones sin añadir sustrato o sin añadir enzima.

Identificación de los residuos de fosforilación de Nuf por aPKC

Para identificar los aminoácidos fosforilados por aPKC en la proteína Nuf, realizamos una fosforilación *in vitro* siguiendo el mismo protocolo que en el apartado anterior pero aumentando las cantidades de sustrato y enzima. Se usaron entre 7 y 10 µg de proteína GST-

Nuf unidas a esferas de agarosa y 10 µg de enzima (PKC α) en un volumen de reacción de 140 µl. Como control negativo se realizó una reacción con sustrato y sin añadir enzima. Después de la reacción se añadieron 35 µl de tampón de carga 5X sin bromofenol, ya que este compuesto afecta a la identificación. Se hirvieron las muestras y se centrifugaron para recoger el sobrenadante y descartar las esferas. Se realizó un análisis de fosforilación en el servicio de proteómica del *Sanford-Burnham Medical Research Institute* usando la técnica LS-MS/MS. La identificación de fosfopéptidos se realizó con y sin enriquecimiento previo de fosfopéptidos para comparar resultados (Fig. 15).

Residuo	Fosfopéptido	Enriquecida CONTROL	Total CONTROL	Enriquecida NUF	Total NUF
155	DNWARRS(1)LR	0	0	413840	122160
175	QISSNALAS(1)QLYR	0	0	102890	0
181	S(0.004)S(0.863)S(0.134)FNSSGR	0	0	350850	0
159;163	S(1)LRRT(0.861)PT(0.138)S(0.001)SGR	0	0	189610	0

Figura 15. Resultados de la identificación de fosfopéptidos de Nuf. Esta tabla muestra la intensidad de los péptidos analizados tanto de las muestras totales así como tras un enriquecimiento en fosfopéptidos. Se analizaron dos muestras: CONTROL (solo Nuf) y NUF (con aPKC y Nuf). Solo la fosforilación en S155 se detectó tanto en la muestra total como en la enriquecida en fosfopéptidos, mientras que el resto de fosforilaciones solo se observaron tras el enriquecimiento. Dado que el sistema de espectrometría de masas proporciona una sensibilidad de attomoles, es muy probable que la estequiometría de estos fosfopéptidos sea extremadamente baja.

5. Tampones

Tampón de Lavado de Embriones

Reactivo	Concentración
NaCl	120 mM
Tritón X-100	0,1%

Tampón IP1500

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	50 mM
Tritón X-100	0,1%

Tampón de Lisis

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EGTA	1 mM
EDTA	2 mM
Tritón X-100	1%
Inhibidores (añadir antes de usar):	
DTT	5 mM
Inhibidor <i>Complete</i> (Roche)	1X
PMSF	1 mM
Ortovanadato	1 mM
β-Glicerol fosfato	10 mM

Tampón $\sigma 3$

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 8	25 mM
NaCl	100 mM
Tritón X-100	1%
Glicerol	10%

Tampón de Carga 2X

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 6,8	100 mM
SDS	4%
Bromofenol	0,2%
Glicerol	20%
β -mercaptoetanol	200 mM

Tampón de Elución

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 8	50 mM
Tritón X-100	0,1%
NaCl	100 mM
DTT	1 mM
Glutación	20 mM

Tampón de Lavado con Sal

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH7,5	50 mM
Tritón X-100	1%
NaCl	500 mM
EDTA	5 mM
EGTA	1 mM

Tampón de Lavado CoIP

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH7,5	50 mM
Tritón X-100	0,1%
NaCl	300 mM
EDTA	5 mM

Tampón de Fosforilación

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH7,5	35 mM
MgCl ₂	10 mM
CaCl ₂	0,1 mM
EGTA	0,5 mM

Tampón TNT

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH7,5	0,1 M
NaCl	0,15 M
Tween-20	0,05%

Tampón de Lavado 14-3-3

Reactivo	Concentración
HEPES pH 7,5	25 mM
MgCl ₂	12,5 mM
Glicerol	20%
NP-40	0,1%
KCl	150 mM
DTT	1 mM

Tampón de Interacción 14-3-3

Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 8	20 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
NP-40	0,5%

6. Anticuerpos

Anticuerpo (α -)	Concentración Inmunofluorescencia	Concentración <i>Western</i>	Especie	Procedencia
aPKC (PKCζ C-20)	1/500	1/5000	Conejo	<i>Sta. Cruz Biotechnology</i>
aPKC (PKCζ H-1)	1/100	-	Ratón	<i>Sta. Cruz Biotechnology</i>
β-Gal	1/10000	-	Conejo	<i>Promega</i>
β-Gal	1/10000	-	Ratón	<i>Promega</i>
β-Integrina	1/100	-	Ratón	<i>Hybridoma-Bank</i>
Bazooka	1/500	-	Conejo	Producido en el laboratorio
Crumbs Cq4	1/100	-	Ratón	<i>Hybridoma-Bank</i>
Dinactina	-	1/2000	Ratón	[147]
Dineína	1/500	1/3000	Ratón	[148]
DEcad	1/50	-		<i>Hybridoma-Bank</i>
Flag M2	-	1/1000	Ratón	<i>Sigma</i>
Fosfo-aPKC	1/100	-	Ratón	<i>Abcam</i>
Fosfo-Serina	-	1/500	Conejo	<i>Cell Signalling</i>
GFP	1/300	-	Conejo	<i>Invitrogen</i>
GST	-	1/3000	Ratón	<i>Sta. Cruz Biotechnology</i>
Kinesina	-	1/3000	Conejo	<i>Cytoskeleton</i>
Myc tag 9B11	1/500	-	Ratón	<i>Cell Signalling</i>
c-Myc A-14	1/250	-	Conejo	<i>Sta. Cruz Biotechnology</i>
Nuf	1/500	1/5000	Cobaya	Esta tesis
Rab5	1/100		Conejo	Labotratorio González Gaitán
Rab11	1/100	-	Ratón	<i>BD Biosciences</i>
Rab11FIP3	1/100	-	Conejo	<i>TermoFisher</i>
Rabbit Biotinilado	1/500		Cabra	<i>Dako</i>
Rip11	1/200		Conejo	[84, 85]
TioFosfato	-	1/5000	Conejo	<i>Abcam</i>
Tubulina	1/50	1/10000	Ratón	<i>Sigma</i>
pan 14-3-3 K-19	-	1/500	Conejo	<i>Sta. Cruz Biotechnology</i>

7. Cebadores

Nombre del cebador	Secuencia
aPKC mut for	CGCATCTACGCCATGTGGGTGATCAAGAAGG
aPKC mut rev	CCTTCTTGATCACCCACATGGCGTAGATGCG
NotI-aPKC 5'	TAGCGGCCGCATGCAGAAAATGCCC
XbaI-aPKC 3'	CGTCTAGATCAGACGCAATCCTCC
NotI-aPKC ^{D^{Quin}} 5'	TAGCGGCCGCATGAGCGGCGGAGC
XbaI-aPKC ^{DR^{eg}} 3'	CGTCTAGATCAGTCGGTGCAGTGC
NufNH for	TTGGATCCATGGCACCATGCCC
NufNH rev	TTGGATCCTTCGGTCTTGGTGCG
NufCO for	TTGGATCCTATGCAGTCCTTCAGGCG
NufCO rev	TTGGATCCCTACTTTTCGCTCCATGGG
Nuf S155A for	GGGCCAGGCGCGCTCTGCGACGAACTCC
Nuf S155A rev	GGAGTTCGTGCGAGAGCGCGCCTGGCCC
Nuf S155D for	GGGCCAGGCGCGATCTCCGACGAACTCC
Nuf S155D rev	GGAGTTCGTGCGAGATCGCGCCTGGCCC
Nuf T159A for	CTGCGACGAGCTCCCACCAGTCCG
Nuf T159A rev	AACTGGTGGGAGCTCGTGCAGACTGC
Nuf S175A for	GCCTTAGCCGCCCAACTCTATAGATCATCGAGC
Nuf S175A rev	GCTCGATGATCTATAGAGTTGGGCGGCTAAGGC
Nuf S180 for	GCCAACTCTATAGAGCAGCGGCCTTTAACTCATCGGG
Nuf S180 rev	CCCGATGAGTTAAAGGCCGCTGCTCTATAGAGTTGGC
Rab11Bam5'	AAGGATCCATGGGTGCAAGAGAAGACG
Rab11Bam3'	AAGGATCCTCACTGACAGCACTGTTTGCGC
Syx1-Bam5'	TTGGATCCATGACTAAAGACAGATTAGCCG
Syx1-Bam3'	TTGGATCCTTACATGAAATAACTGC
Syx4-Bam5'	TTGGATCCATGGGTAAAGATCGACTGCCCG
Syx4-Bam3'	TTGGATCCTCACAATAAATACCAACAAGG
Bcoat-Bam5'	TTGGATCCATGACGTGCGAAGTGCCG
Bcoat-Bam3'	GCCGCCTGCGGATCCCTGCTGCTGC
Bcoat-EcoRI5'	TTGAATTCGCATGGCAGCTGGATCCG
Bcoat-EcoRI3'	TTGAATTCCTAGGCCGCCCTGCACCG
Rip11 BamHI	TTGGATCCCCATGTGGAGTCCG
Rip11-RI	TTGAATTCGCCGCTCTTGGCCG

RESULTADOS

1. Búsqueda de Proteínas que Interaccionan con aPKC.

La Proteína Quinasa C atípica (aPKC) es una serín-treonín quinasa con un papel fundamental en diversos procesos celulares [23,99,114,128,149-152]. A diferencia de otras proteínas quinasa C no se activa por DAG o Ca^{2+} , si no que lo hace a través de la interacción con otras proteínas, las cuales regulan su actividad. aPKC por tanto, es activada o reprimida por diferentes proteínas y puede fosforilar a diferentes sustratos dependiendo del proceso y tipo celular [27,30,34,36,42,44,102,103]. De este modo, dada la gran versatilidad de esta quinasa en cuanto a procesos celulares en los que participa y a su gran número de sustratos y reguladores, la búsqueda de nuevas proteínas que interaccionen con ella se presenta como un reto atractivo y fundamental para mejorar el conocimiento acerca de su funcionamiento.

Por ello nos planteamos aislar bioquímicamente por afinidad proteínas que interaccionen con aPKC usando el sistema *Tandem Affinity Purification* (TAP). Este método permite aislar complejos proteicos con la proteína diana en condiciones nativas mediante dos pasos sucesivos de purificación [153,154]. Para realizar esta técnica se necesita fusionar la proteína de interés a un grupo de epítomos denominados en su conjunto *TetraTag* (TT, Fig. 16). El TT está formado por dos módulos de proteína A que permiten la unión a la inmunoglobulina G (IgG), un sitio de corte de la proteasa TEV, un módulo CBP (*Calmodulin Binding Protein*) de unión a calmodulin, los epítomos Flag e Histidina y un sitio de corte para Trombina, en este orden desde el extremo amino al C-terminal.

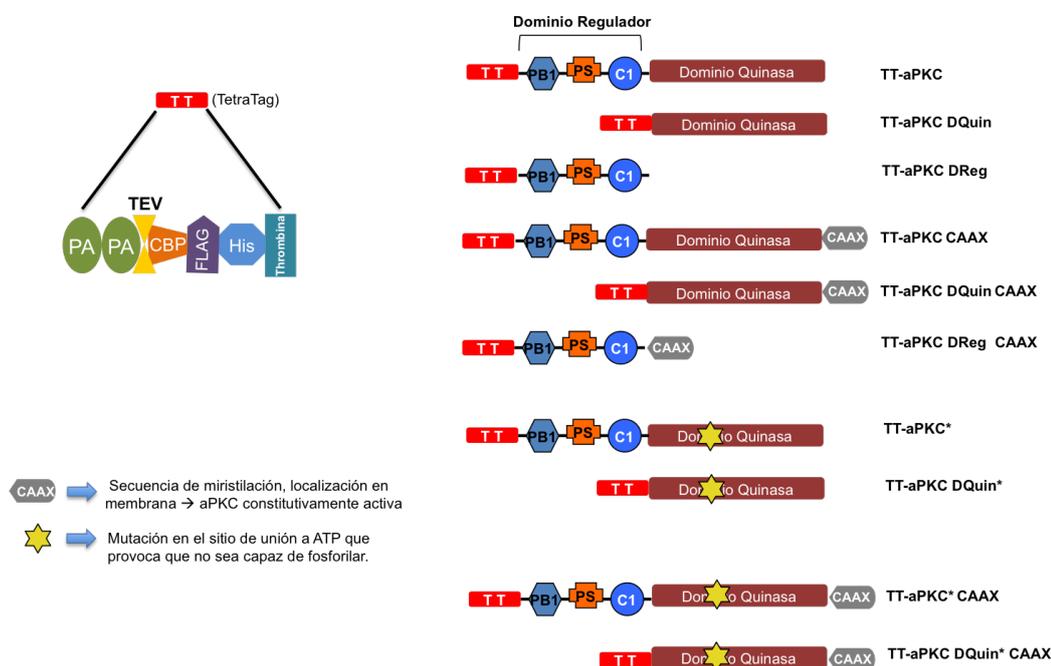


Figura 16. Representación esquemática de las construcciones generadas para la purificación por afinidad. Representación esquemática del dominio *TetraTag* (TT, izquierda, arriba) con sus diferentes módulos: proteína A (verde), sitio de corte TEV (amarillo), sitio de unión a calmodulina (CBP, naranja), epítomo Flag (violeta), epítomo His (azul) y sitio de corte para Trombina (turquesa). Derecha: Representación de las distintas construcciones de aPKC fusionadas al dominio TT.

La sobreexpresión de la construcción TT-aPKC mediante el sistema UAS-Gal4 [131] permite la expresión controlada de aPKC *in vivo* y el aislamiento de los complejos formados por la proteína de fusión. En el momento del comienzo de esta tesis en el laboratorio se disponía de construcciones TT para la proteína completa de aPKC así como para los dominios regulador (DReg) y quinasa (DQuin) por separado, todas ellas con y sin la secuencia de miristoilización (CAAX) en el extremo C-terminal (Fig. 16). Esta secuencia de miristoilización fuerza la unión de aPKC a la membrana (Fig. 17, D-D', F-F') en su conformación activa, generando una forma constitutivamente activa de aPKC [36] ya que para procesos de polaridad epitelial aPKC necesita localizarse en la membrana apical para ser activa. Con todas estas versiones pretendía aislar sustratos y reguladores de aPKC dependiendo del dominio con el que interaccionen. Asimismo, durante el desarrollo de esta tesis he realizado nuevas construcciones TT de la proteína aPKC completa y del dominio quinasa ambas con una mutación (K293W) en el sitio de unión a ATP [36], de manera que estas versiones de aPKC no son capaces de fosforilar a los sustratos (Fig. 16).

Los trabajos previos de purificación de los complejos proteicos unidos a aPKC a partir de extractos embrionarios utilizaron el sistema de dos columnas: en primer lugar una columna con una matriz unida a IgG, donde TT-aPKC y las proteínas asociadas se unen; posteriormente el tratamiento con la proteasa TEV permite la elución de aPKC con sus interactores. La segunda purificación se realiza con una columna con matriz de calmodulina, cuyo objetivo es enriquecer la muestra en la proteína aPKC y las proteínas que realmente interaccionan con ella. El eluido final es analizado mediante *SDS-Page* y espectrometría de masas para identificar las proteínas presentes.

En las diversas pruebas realizadas se pudo comprobar que el sistema no era tan eficiente como se esperaba. Durante la primera purificación se unían gran cantidad de proteínas a la columna de manera inespecífica y en la segunda purificación se perdía gran cantidad de proteína, haciendo muy difícil la identificación final. Por estos motivos se optó por un método alternativo que es el que he realizado en esta tesis y en el cual he usado una matriz formada por esferas magnéticas (*Dynabeads*[®]) recubiertas con IgG. Con este tipo de matriz se obtienen mejores resultados ya que el número de uniones inespecíficas es mucho menor y por tanto no es necesario hacer un segundo paso de purificación, siendo el proceso más rápido y recuperándose suficiente cantidad de proteína para realizar la identificación.

La purificación por afinidad la he realizado sobreexpresando las diversas construcciones de TT-aPKC bajo el control de secuencias reguladoras UAS usando las líneas Gal4: *69B-Gal4*, que dirige la expresión en el ectodermo del embrión y *24B-Gal4*, que lo hace en el mesodermo (Fig. 17, A-A', B-B'). De esta forma pretendía diferenciar los interactores de aPKC relacionados con procesos de polaridad epitelial con aquellos relacionados con procesos más generales tales como crecimiento o supervivencia.

Tras realizar varias pruebas para comprobar que el sistema de *Dynabeads*[®] funcionaba y que se purificaba aPKC en el eluido final (Fig. 18), realicé un primer experimento con 500 μ l de embriones sobreexpresando la construcción *UAS-TT-aPKC* con las líneas *69B-Gal4* y *24B-Gal4*, usando como control extractos de embriones de estas mismas líneas Gal4. En todos los experimentos de purificación por afinidad he comprobado la eficiencia del proceso

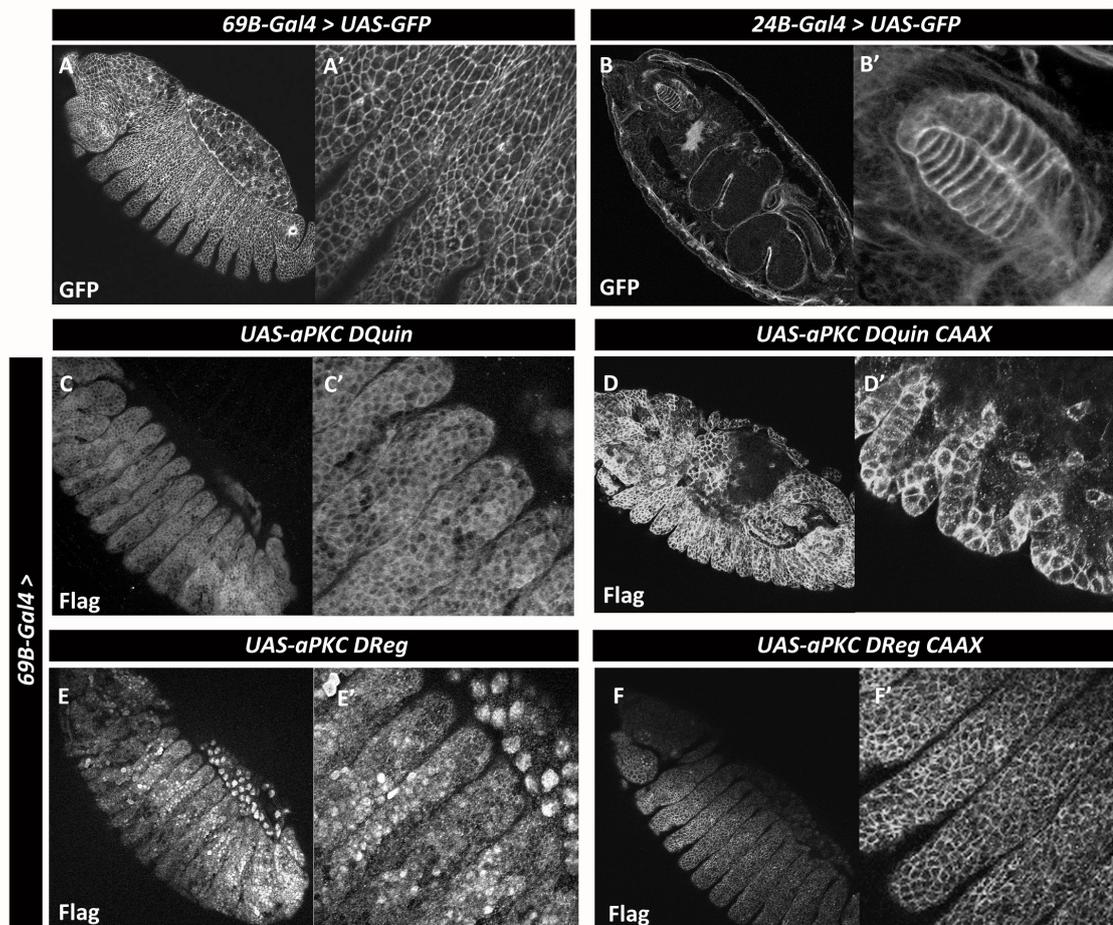


Figura 17. Patrones de expresión de 69B, 24B y localización en membrana de la secuencia CAAX. Expresión de la proteína GFP en el ectodermo y mesodermo embrionarios utilizando las líneas 69B (A-A') y 24B (B-B') respectivamente. C-F': Expresión de las líneas UAS-aPKC DQuin en el ectodermo embrionario con y sin la secuencia CAAX. El dominio quinasa de aPKC se localiza en el citoplasma (C-C') mientras que cuando se añade la secuencia CAAX se localiza principalmente en la membrana plasmática (D-D'). El dominio regulador de aPKC presenta localización nuclear y parte en membrana (E-E'), mientras que con la secuencia CAAX se localiza en la membrana plasmática (F-F'). A la derecha se muestran imágenes ampliadas de los embriones mostrados a la izquierda y teñidos con anti-GFP (A-B) o anti-Flag (C-F).

mediante *western blot*. Las bandas presentes en los eluidos finales de los experimentos y no presentes en los controles fueron identificadas por espectrometría de masas. Entre las bandas identificadas encontré la propia aPKC sobreexpresada, diversas proteínas ribosomales que se asumieron como inespecíficas por estar sobreexpresando y la proteína Lethal giant larvae (Lgl), cuya interacción con aPKC ya está descrita [42] y que me sirvió como control interno de que el sistema experimental estaba funcionando.

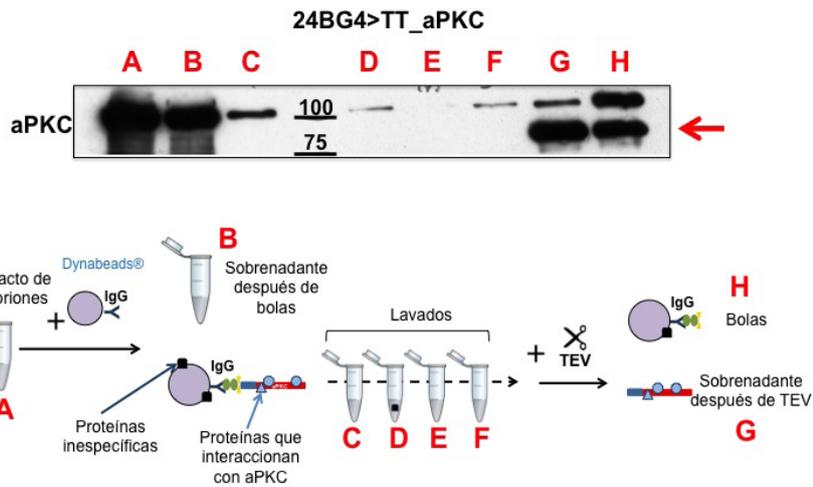


Figura 18. Prueba de la purificación por afinidad. Arriba, *western blot* contra aPKC presente en cada uno de los pasos de la purificación realizada con embriones sobreexpresando TT_aPKC en el mesodermo. Se puede observar la diferencia de tamaño de la banda de aPKC después de cortar el TT con la proteasa TEV (flecha roja). Abajo, esquema de la purificación por afinidad. Cada una de las letras en rojo se corresponde con una etapa del proceso: A, extracto inicial; B, sobrenadante después de añadir la resina; C-F, lavados; G, sobrenadantes después de cortar con TEV; H, resina después de cortar con TEV. del proceso: A, extracto inicial; B, sobrenadante después de añadir la resina; C-F, lavados; G, sobrenadantes después de cortar con TEV; H, resina después de cortar con TEV.

Dado que no encontré ninguna proteína nueva candidata a interactuar con aPKC, decidí repetir el experimento con mayor cantidad de extracto inicial (5 ml de embriones) para poder obtener mayor cantidad de proteína en el eluido y optimizar la identificación de las bandas. Con estas modificaciones obtuve nuevas bandas que se analizaron por espectrometría de masas (Fig. 19).

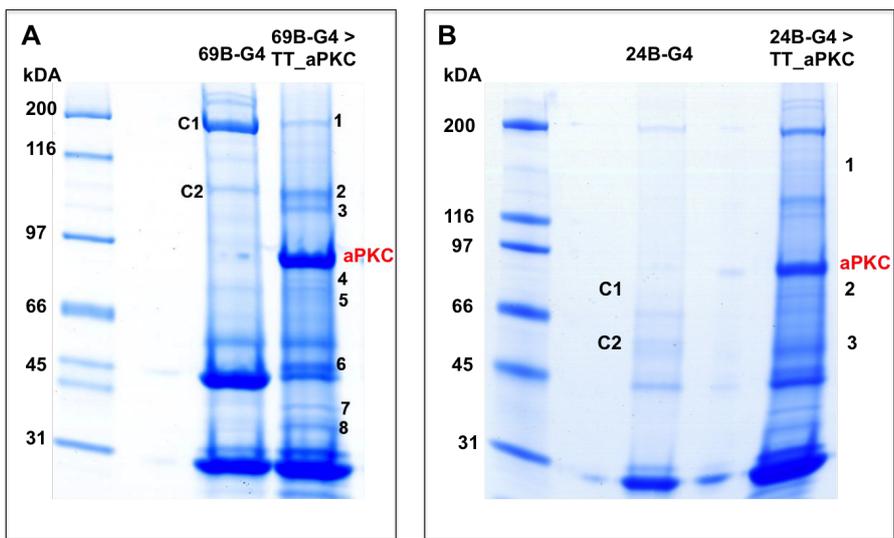


Figura 19. Geles SDS-Page resultantes de la purificación por afinidad con aPKC. Tanto en el experimento en tejido ectodérmico (A) como en mesodérmico (B) se puede observar una banda de gran intensidad correspondiente a aPKC. Los números se corresponden con las bandas seleccionadas para identificar por espectrometría de masas.

Para el experimento con la línea ectodérmica *69B-Gal4* se identificaron las siguientes proteínas en las bandas indicadas:

- **1 y C1:** *Zipper* (Miosina II)
- **2:** Lgl
- **C2:** Jaguar (Miosina VI)
- **3:** Par1
- **4:** *Nuclear fallout* (Nuf) y *Heat shock protein cognate 4*
- **C3:** *Heat shock protein cognate 4*
- **5:** *Yolk* y Par6
- **6:** Proteína ribosomal L22
- **8:** Proteína ribosomal S3A

El experimento con la línea mesodérmica *24B-Gal4* lo realicé posteriormente y mandé a identificar las bandas que no aparecieron en el control ni en el experimento previo con *69B*. Los resultados fueron:

- **1, C1 y C2:** No identificación, poca cantidad de proteína
- **2:** *Nuclear fallout* (Nuf)
- **4:** β -tubulina isoforma B

Es de destacar en estos resultados la identificación de proteínas como Lgl, Par1 y Par6 que son interactores de aPKC ya descritos [27,40,155] y que es una prueba de que el sistema es válido para nuestro objetivo. Las proteínas que aparecen también en el experimento control las descarté. La proteína Yolk también la descarté ya que es muy abundante en el embrión de *Drosophila* y es probable que sea una unión inespecífica. La proteína Nuf, que apareció en ambos experimentos (ectodermo y mesodermo) y que no aparecía en los controles es una proteína candidata a interactuar físicamente con aPKC.

La sobreexpresión de las líneas *TT-aPKC-CAAX* en el embrión produce graves consecuencias en la morfología del mismo ya que la localización de aPKC activa en toda la membrana plasmática (no solo en la membrana apical) cambia la polaridad celular. Por este motivo opté por no realizar la purificación por afinidad con estas líneas a la espera de los resultados obtenidos con el resto de líneas.

Con el fin de encontrar sustratos de aPKC realicé el mismo procedimiento, en este caso, con la línea *TT-aPKC^{D^{Quin}}-CAAX* también en ectodermo y mesodermo embrionarios (Fig. 20). Elegí esta línea con la secuencia CAAX para forzar su unión a membrana ya que la localización del dominio quinasa es citoplasmática (Fig 17, comparar C-C' con D-D').

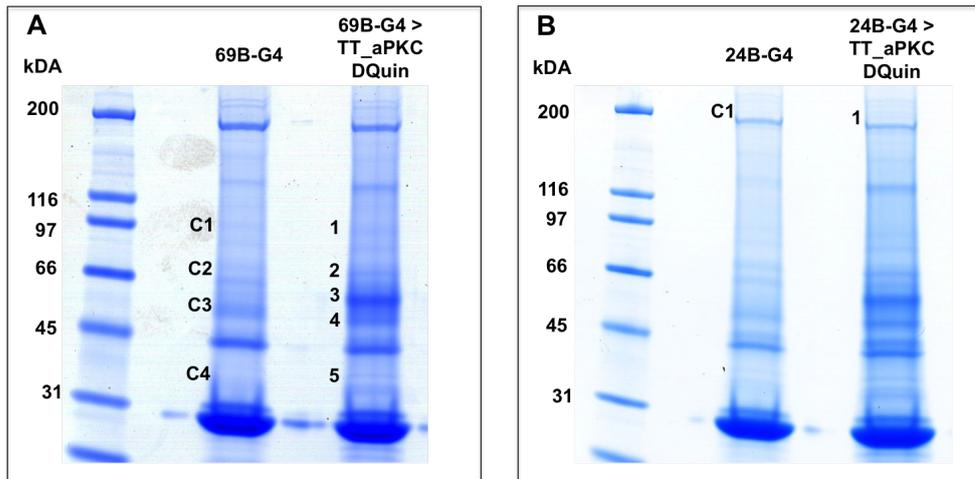


Figura 20. Geles SDS-Page resultantes de la purificación por afinidad con el dominio quinasa de aPKC. Tanto en el experimento en tejido ectodérmico (A) como en mesodérmico (B) se observa una banda del tamaño correspondiente a TT_aPKCDQuin (pero menos intensa que en el experimento con la proteína completa, por lo que se mandó a identificar). Las bandas seleccionadas para identificar por espectrometría de masas aparecen marcadas con números.

En el experimento con la línea ectodérmica se identificaron las siguientes proteínas:

- **1:** No identificación, poca cantidad de proteína
- **2:** Nuf y *Heat shock protein cognate 4*
- **3:** aPKC
- **4:** α y β Tubulina
- **5:** Proteína ribosomal S3
- **C1, C2 y C4:** No identificación, poca cantidad de proteína
- **C3:** β Tubulina

En el experimento con la línea mesodérmica (24B), el perfil de bandas era bastante similar al encontrado con la línea ectodérmica (69B), diferenciándose en una única banda que no se pudo identificar debido a la poca cantidad de muestra y a que se trataba de una mezcla de varias proteínas.

A la hora de buscar posibles reguladores de aPKC, realicé la purificación por afinidad solo con el dominio regulador de aPKC y en este caso con y sin la secuencia CAAX. La actividad de aPKC se regula por interacción con otras proteínas capaces de activar su función quinasa o afectar a la localización de aPKC. Estas proteínas interaccionan generalmente con el dominio regulador de aPKC y suelen ser diferentes a las proteínas que son sustrato de fosforilación. De este modo, realizando este experimento esperaba identificar nuevas proteínas que regulasen la función de aPKC (Fig. 21).

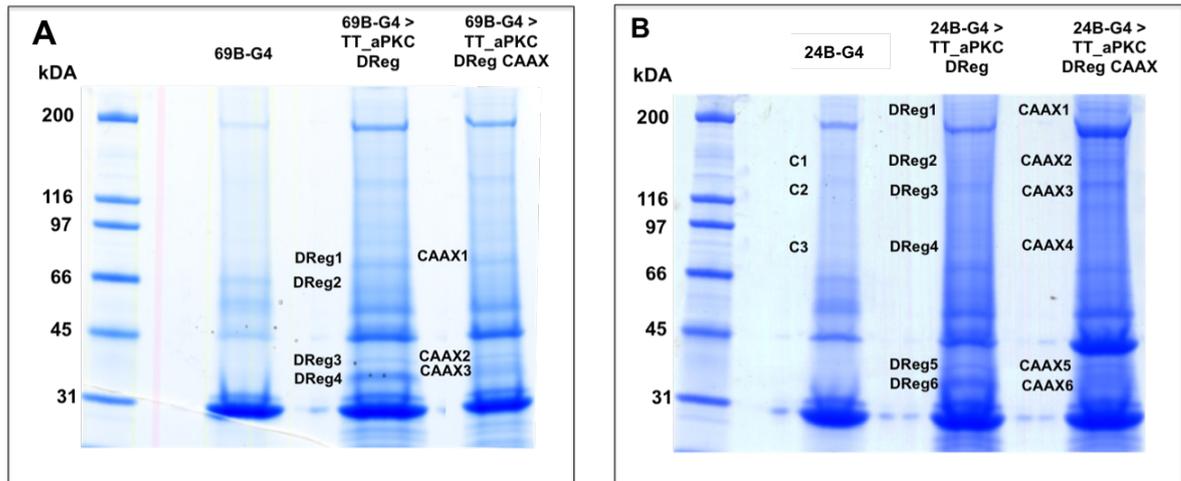


Figura 21. Geles SDS-Page resultantes de la purificación por afinidad con el dominio regulador de aPKC con y sin CAAX. Las bandas seleccionadas para identificar por espectrometría de masas aparecen marcadas con números a la izquierda.

Las proteínas identificadas en el experimento con la línea *69B* se muestran a continuación. Algunas de las bandas presentaban más de una proteína identificada, bien debido a que hubiera una mezcla de proteínas o a que la identificación no fuese concluyente para una única proteína. En estos casos, las proteínas aparecen ordenadas de mayor a menor puntuación en la identificación (mayor número de péptidos iguales entre los analizados en la banda y la proteína identificada):

- **DReg1:** *Heat shock protein cognate 4*
- **DReg2:** Vitelogenina, Proteína de localización nuclear proteína 4
- **DReg3:** Proteína ribosomal 60s L22; Proteína ribosomal 40s SA; Syntaxina 4
- **DReg4:** Proteína ribosomal 40s S3a; Flap endonucleasa 1; Inexina 1
- **CAAX1:** *Heat shock protein cognate 4*; Proteína de localización nuclear proteína 4; Calpaína-C, Fenoloxidasa subunidad A3
- **CAAX2:** Proteína ribosomal 60s L22; Actina
- **CAAX3:** Proteína ribosomal 40s S3a

Para el experimento con la línea *24B*, las bandas identificadas fueron las siguientes:

- **DReg1:** No identificación, poca cantidad de proteína
- **DRegCAAX1:** Miosina, cadena pesada (no muscular)
- **DReg2 y C1:** *Zipper* (Miosina II)
- **DRegCAAX2:** Miosina, cadena pesada (no muscular)

No observé grandes diferencias en el patrón de bandas obtenido con respecto a los experimentos anteriores así como entre la versión mutante y silvestre del dominio quinasa de aPKC. Aún así se identificaron algunas de las bandas:

- **DQuin*1:** *Receptor Odorant 47a*; *Heat shock protein 83*; Receptor Quinasa 1 acoplado a proteína G
- **DQuin1:** Regulador de la elongación del telómero homólogo a Helicasa 1; Prolina deshidrogenasa 1; Óxido-reductasa NADH-Ubiquinona (subunidad de 75 kDa); Klp10A (*Kinesin-like protein*)
- **DQuin*2:** *Heat shock protein cognate 4*
- **DQuin2:** Dimetiladenosina transferasa 1; Kibra; *Heat shock protein cognate 1*; Calpaína-C
- **DQuin*3:** α y β Tubulina
- **DQuin3:** α Tubulina
- **DQuin*4:** *Heat shock protein cognate 4*
- **DQuin4:** *Heat shock protein cognate 4*

Dado que en los resultados con el dominio quinasa mutante de ATP no identifiqué proteínas con buena puntuación e interesantes a la hora de establecer una relación con aPKC, decidí no seguir realizando purificaciones por afinidad con estas líneas mutantes y opté por elaborar una lista de candidatos más prometedores a interactuar con aPKC atendiendo a las identificaciones obtenidas en todos los experimentos y al posible interés científico de esta supuesta interacción (Tabla 2). Cabe destacar la identificación de numerosas proteínas relacionadas con tráfico vesicular, lo cual está en concordancia con el actual interés sobre la relación entre polaridad y tráfico celular. El análisis del resto de los candidatos no lo he abordado en esta tesis, por lo tanto no se presentan datos sobre ellos.

	Ectodermo (69B-G4)		Mesodermo (24B-G4)
<i>TT_ aPKC</i>	Nuf		Nuf
<i>TT_ aPKC DQuin CAAX</i>	Nuf		Nuf
<i>TT_ aPKC DReg</i>	Sintaxina-4	Proteína de localización nuclear 4	Proteína de localización nuclear 4 Lam Dm0
<i>TT_ aPKC DReg CAAX</i>	-	Proteína de localización nuclear 4	β -Coatómero

Tabla 2. Relación de candidatos seleccionados a partir de los experimentos de purificación por afinidad. Estos candidatos han sido clasificados según en qué experimentos han sido identificados, dependiendo de la construcción y el tejido utilizados para la purificación.

2. Análisis de los Candidatos

Con los resultados obtenidos en la purificación por afinidad descrita en el apartado anterior elaboré una lista con los candidatos a testar. He utilizado diferentes aproximaciones con el objetivo de comprobar y confirmar la interacción entre aPKC y los distintos candidatos.

Por un lado, he analizado la interacción genética entre aPKC y los candidatos usando el fenotipo provocado por la falta de función de aPKC en el disco imaginal de ala, el cual es sensible a cambios en genes que interaccionan con aPKC. La sobreexpresión de una línea *UAS-aPKC_RNAi* (S. Sotillos, datos no publicados) en la región presuntiva de ala usando la línea *salPE-Gal4* [135] genera un fenotipo característico en el que la región entre la vena 2 y la 3 se reduce considerablemente, llegando en algunos casos a fusionarse dichas venas (Fig. 23, A'-A''). Este fenotipo es heterogéneo, de manera que existen diferencias entre machos y hembras (los machos presentan un fenotipo más fuerte) así como entre alas de diferentes individuos, pudiéndose clasificar en tres tipos diferentes: venas fusionadas (Fig. 23, A''), venas muy próximas (Fig. 23, A') y silvestres (que incluyen las alas con fenotipo silvestre o cuya región 2 y 3 apenas se ve reducida, Fig. 23 B').

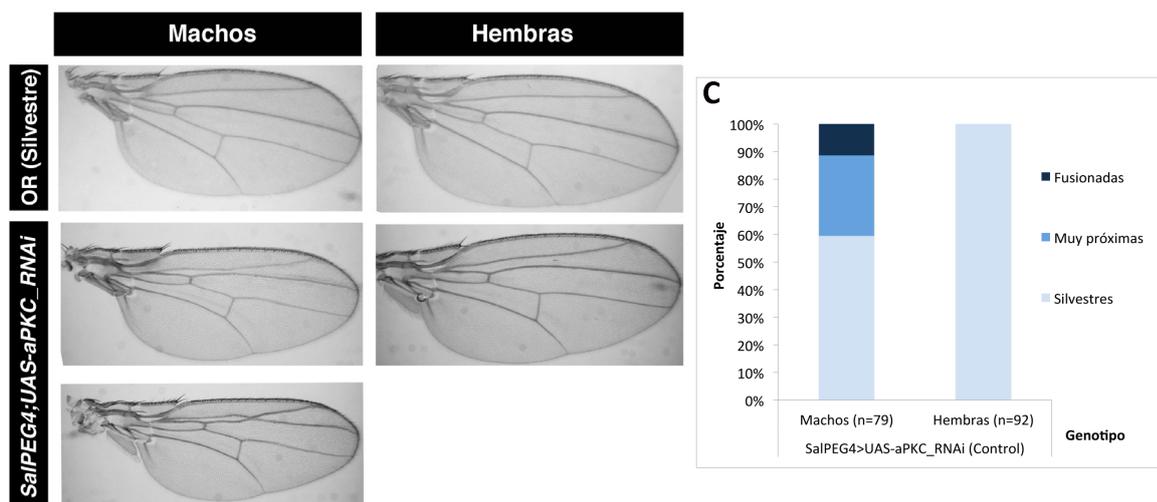


Figura 23. Fenotipo del RNAi de aPKC en ala utilizado para el análisis de la interacción genética entre aPKC y los candidatos. A la izquierda, imágenes de alas de machos y hembras silvestres (A-B) y sobreexpresando el RNAi de aPKC (A', B' y A''). El fenotipo de venas 2 y 3 fusionadas se observa en A'' mientras que el de venas 2 y 3 muy próximas se observa en A'. (C) Gráfica con la cuantificación del fenotipo.

De este modo el fenotipo puede ser cuantificado atendiendo al número de alas con las venas 2 y 3 fusionadas o muy próximas (Fig. 23, C). Una de las ventajas de este fenotipo es que es sensible a cambios en genes relacionados con aPKC. Si combinamos la sobreexpresión del RNAi de aPKC con mutantes heterocigóticos para genes de polaridad, el fenotipo aumenta (mayor número de alas con las venas fusionadas y/o mayor región de vena fusionada) o disminuye (la mayoría de alas tienen fenotipo silvestre) dependiendo de la relación de dicho gen con aPKC (Fig. 24). Es decir, para genes que actúen positivamente de manera conjunta a aPKC, como es el caso de *Crb*, el fenotipo se ve aumentado (Fig. 24, D-D'), mientras que

para aquellos genes que actúen de manera antagónica a aPKC, hay un rescate del fenotipo (Fig. 24, E-E').

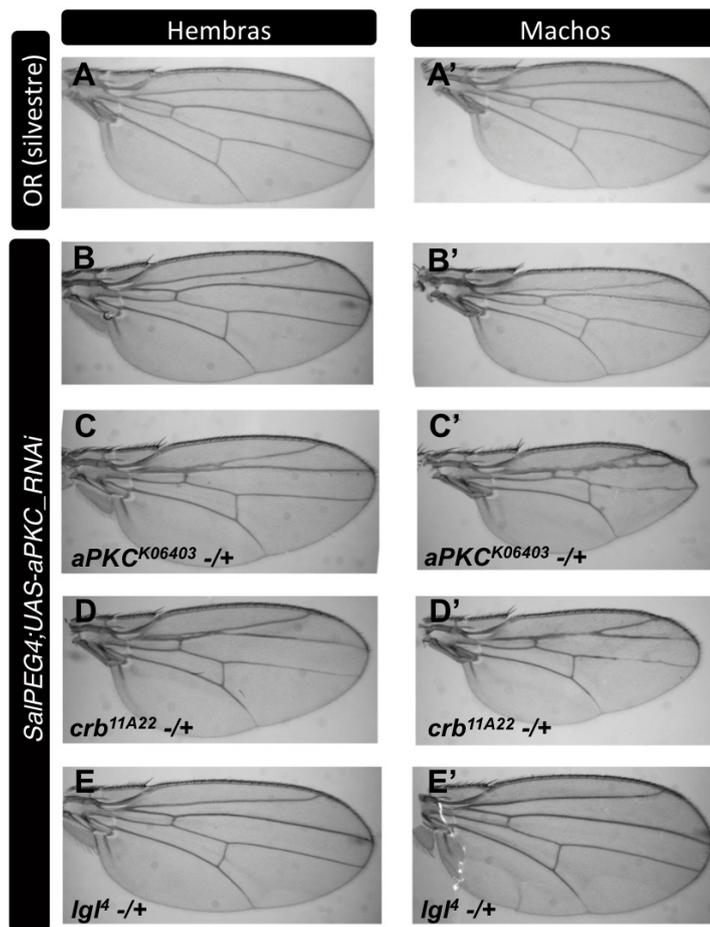


Figura 24. Modificación del fenotipo del RNAi de aPKC en el ala al combinarlo con mutantes de genes de polaridad. Alas de machos y hembras silvestres (A,A') sobreexpresando el RNAi de aPKC (B-B') y combinando este RNAi con genes relacionados con aPKC (C-E'). Para genes que actúan conjuntamente con aPKC de manera positiva, el fenotipo de fusión de venas 2 y 3 se incrementa (aPKC y crb, C-D') mientras que para genes que actúan de manera opuesta a aPKC el fenotipo se rescata (Igl, E-E').

La sensibilidad del método así como que pueda ser analizado fácilmente con una lupa estereoscópica, hace de este fondo genético una poderosa herramienta para analizar interacciones genéticas entre aPKC y cualquier otro gen.

Realicé una búsqueda de líneas de *Drosophila* tanto mutantes como líneas UAS (RNAi y/o versiones silvestres marcadas con epítomos) que afectarían a los genes candidatos y seleccioné algunas de ellas (Tabla 3) que combiné con la línea *SalPE-G4>UAS-aPKC_RNAi*. Analicé las alas adultas de las diferentes combinaciones y cuantifiqué el fenotipo clasificándolo en los tres tipos posibles descritos anteriormente. Es importante mencionar que todas las líneas mutantes de los candidatos usadas presentaban alas silvestres antes de combinarlas, de manera que al observarse alguna diferencia en el fenotipo del RNAi de aPKC sería debida a su interacción con el candidato. En el caso de líneas UAS crucé independientemente estas líneas con *SalPE-G4* como control.

Por otro lado, he verificado la interacción física realizando ensayos de Co-Inmunoprecipitación y *Pull Down* (PD) entre los candidatos y aPKC. para lo cual he generado construcciones GST para aquellos candidatos de los que había cDNA disponible y he realizado ensayos de Co-

inmunoprecipitación para aquellos de los que había anticuerpo disponible.

Candidatos Purificación	Mutantes Testados	Líneas UAS Testadas	Referencias
Nuclear fallout (Nuf)	<i>nuf^f</i>	Nuf_GFP Nuf_RNAi	[90, 139] VDRC (#104172)
Sintaxina-4 (Syx4)	<i>syx5^{AR}</i>	-	[156]
Proteína de localización nuclear 4 (Npl4)	<i>npl4^{M101244}</i>	-	[157]
Lámina0 (Lam0)	<i>lam⁰⁴⁶⁴³, lam^{K2}</i>	-	[158, 159]
β-Coatómero (β-Coat)	<i>γCop¹⁰</i>	-	[160]

Tabla 3. Lista de líneas de los candidatos utilizadas para el análisis genético de su interacción con aPKC. Tabla que recopila las diferentes líneas de mutantes y UAS utilizadas para testar la interacción de los candidatos con aPKC y referencias donde encontrar información de las líneas.

De este modo he utilizado construcciones GST para Nuf así como para Syx4 y Syx1, dos de los miembros de la familia de las Sintaxinas [64]. En el caso del β-Coatómero, por ser una proteína de más de 900 aminoácidos, la he dividido en dos mitades: β-Coatómero NH (β-Coat NH) y β-Coatómero CO (β-Coat CO). Para la Lámina 0 (Lam0) realicé una Co-Immunoprecipitación. Las construcciones GST permiten purificar las proteínas mediante su unión a una resina de agarosa-glutatin. Los ensayos de Co-precipitación se han realizado incubando extracto de embriones silvestres con las diferentes proteínas purificadas así como con GST como control negativo (ver materiales y métodos). Todos los experimentos realizados llevan un control de carga tanto de los extractos de partida para comprobar que hay la misma cantidad de proteína total, así como de la cantidad de proteína presente en la resina.

Por último, comprobé si existe fosforilación de los candidatos por aPKC utilizando las construcciones GST e incubando las proteínas purificadas con aPKCζ o aPKCλ/ι (protocolo detallado en materiales y métodos). Para todos los ensayos de fosforilación realicé controles positivos (con sustratos de aPKC conocidos) y controles negativos (realizando experimentos sin añadir sustrato, sin añadir enzima o sin añadir ATP).

El objetivo era descartar aquellos candidatos que no presentasen interacción física ni genética con aPKC, mientras que aquellos que presentaran interacción (física, genética o ambas) los consideraría candidatos para un análisis más profundo de su relación con aPKC, presentando especial atención aquellos que además fueran fosforilados.

Análisis de la interacción de Npl4 y Lam0 con aPKC

La Proteína de localización nuclear 4 (Npl4) forma parte del complejo proteico p97/Npl4/Ufd1 que se encarga de desplazar hacia el citoplasma las proteínas que no pasan el control de calidad en el retículo endoplasmático. En el citoplasma, dichas proteínas son objeto de degradación por el sistema ubiquitina/proteasoma [161].

Por su parte, Lámina 0 (Lam0) forma parte de la lámina nuclear, uno de los componentes de la membrana nuclear. Las láminas son filamentos intermedios de tipo V específicos del núcleo y actúan manteniendo las propiedades mecánicas del núcleo y de la célula completa ya que pueden interactuar con el citoesqueleto [162]. De hecho, Lam0 ha sido implicada en la migración nuclear en los fotorreceptores durante el desarrollo del ojo de *Drosophila* [159] así como en la organización citoplásmica y la polaridad en el huevo de *Drosophila* [163].

Los resultados del análisis de la interacción genética entre aPKC y Npl4 mostraron que el mutante *npl4^{M101244}* no modifica el fenotipo de la línea *SalPE-G4>UAS-aPKC_RNAi*, tal y como se puede observar en la Fig. 25 (comparar con el control). La modificación del fenotipo podría ser debida a que la línea *npl4^{M101244}* se trate de un mutante hipomorfo y haya parte de función de la proteína. Sin embargo, debido a la poca información y estudios disponibles acerca de esta proteína no pude saber que tipo de alelo era y por tanto decidí descartar este candidato y no testar la interacción física ni su posible fosforilación por aPKC.

En el caso de Lámina0, para el mutante *lam⁰⁴⁶⁴³*, una mutación letal en homocigosis de pérdida de función provocada por la inserción de un elemento P [158,159,164] el número de alas con venas fusionadas aumentaba claramente en machos y ligeramente en hembras (Fig. 25). Sin embargo el mutante *lam^{K2}* no modificaba el fenotipo de fusión de venas, aunque observé nuevos fenotipos como venas muy delgadas que incluso desaparecían en algunas partes. Estos datos pueden ser debidos a que el mutante *lam^{K2}* es semi-viable en homocigosis [159], siendo una mutación más débil que la mutación *lam⁰⁴⁶⁴³*.

Para examinar la unión entre Lam0 y aPKC opté por realizar una CoIP ya que disponía de anticuerpo contra Lam0. Como control usé un anticuerpo contra β Gal de la misma especie que el anticuerpo contra Lam0 (ratón). En la figura 26 A se muestra dicha CoIP realizada con extracto de embriones OR donde se puede observar que a pesar que con el anticuerpo de Lam0 conseguí precipitar gran cantidad de proteína Lámina 0, no observé banda para aPKC en la co-precipitación, sugiriendo que no existe interacción física entre ambas proteínas. Para descartar que solo una pequeña parte de la aPKC presente en el embrión sea la que interactúe con Lam0 y que por este motivo no fuese capaz de observar banda en la CoIP, realicé una segunda CoIP esta vez usando embriones que sobreexpresaban una versión de aPKC con el epítipo myc usando la línea *24B-G4* que dirige la expresión en mesodermo. En este caso tampoco observé banda para aPKC en el experimento de CoIP a pesar de que conseguí precipitar gran cantidad de Lam0 (Fig. 26, B). Estos experimentos sugieren que no hay unión entre aPKC y Lam0 o al menos en estas condiciones experimentales.

En cuanto al análisis de fosforilación de Lam0, dado que no había interacción física, decidí no realizarlo.

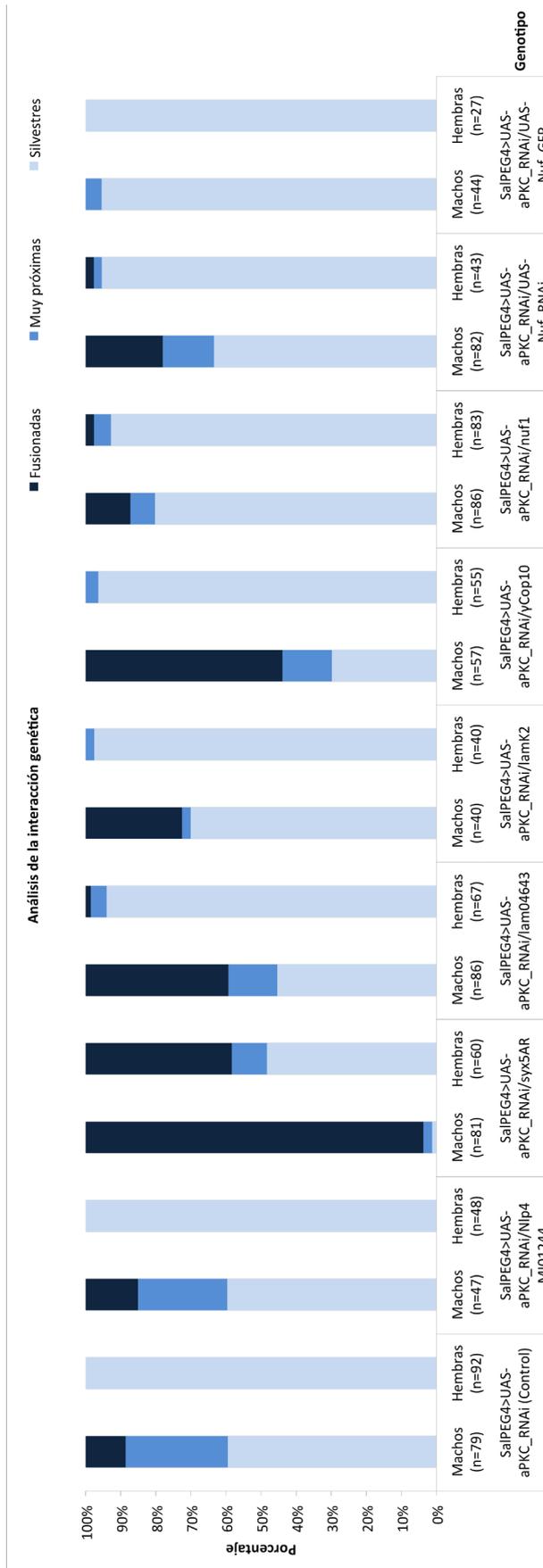


Figura 25. Análisis de la interacción genética entre aPKC y los candidatos de la purificación por afinidad. Representación gráfica del fenotipo en ala generado por la sobre-expresión del RNAi de aPKC (control) y la combinación de este RNAi con las diferentes líneas UAS y mutantes de los candidatos. El valor de n hace referencia al número de alas analizadas en la cuantificación. En azul oscuro se representa el porcentaje de venas 2 y 3 fusionadas, en azul el número de venas 2 y 3 muy próximas y en azul claro las alas silvestres.

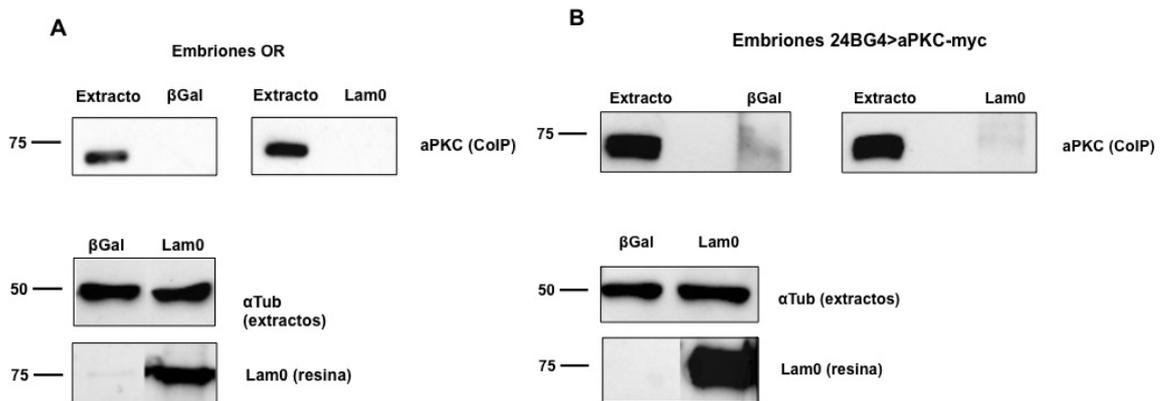


Figura 26. Ensayos de co-inmunoprecipitación entre Lam0 y aPKC. Co-IP de aPKC a partir de extracto de embriones silvestres (A) y extracto de embriones sobre-expresando aPKC-myc (B) utilizando un anticuerpo específico para Lam0. Los paneles superiores muestran el revelado con aPKC de la Co-IP no observándose ninguna banda en el experimento con Lam0. Los paneles inferiores muestran un 5% de los extractos iniciales como control de carga (anti- α Tub) y un 10% de las bolas como control de carga de la resina (anti-Lam0).

Análisis de la interacción entre β -Coatómero y aPKC

La proteína β -Coatómero es una de las subunidades del Complejo Proteico del Coatómero I (COPI, por su siglas en inglés). El complejo COPI se encuentra recubriendo las membranas de las vesículas que son transportadas desde la parte *cis* del Aparato de Golgi hacia el Retículo Endoplasmático [165] y está implicado en la formación y mantenimiento del Aparato de Golgi [166]. En *Drosophila* el complejo del coatómero se ha involucrado en la regulación de la homeostasis de lípidos [167], en la formación de las tráqueas [168] y en la citoquinesis de las divisiones meióticas masculinas [169]. Por otro lado, se ha establecido una relación entre aPKC y β -Coatómero en vertebrados en cuanto a la función del Aparato de Golgi. La GTPasa de pequeño tamaño Rab2 actúa reclutando PKC $\lambda/1$ y COPI en los Clusters Tubulares Vesiculares (VTCs, siglas en inglés), responsables del transporte retrógrado-directo entre el Retículo Endoplasmático y el Aparato de Golgi [170].

A la hora de realizar el análisis genético de interacción entre aPKC y el Complejo del Coatómero, observé que la combinación de una copia mutante para la subunidad gamma, γ Cop¹⁰, aumentaba el porcentaje de venas fusionadas en machos siendo mayor del 50%, mientras que en hembras apenas aumentaba el fenotipo (Fig. 25).

En cuanto a la interacción física, los resultados de los PD demostraron que no existe interacción entre aPKC y β -Coatómero (Fig. 27, A). Sin embargo, había sido aislado en la purificación por afinidad, por tanto, o era un falso positivo o bien las condiciones de PD no eran las adecuadas. Para ayudar a descartar una de estas posibilidades realicé ensayos de fosforilación con cada una de las mitades de la proteína β -Coatómero purificadas (GST- β -CoatNH y GST- β -CoatCO). Los resultados del ensayo de fosforilación no mostraron señal de Tio-Fosfato para ninguna de las dos partes de la proteína, indicando que no hay fosforilación (Fig. 27, B) y sugiriendo que no hay interacción entre aPKC y β -Coatómero.

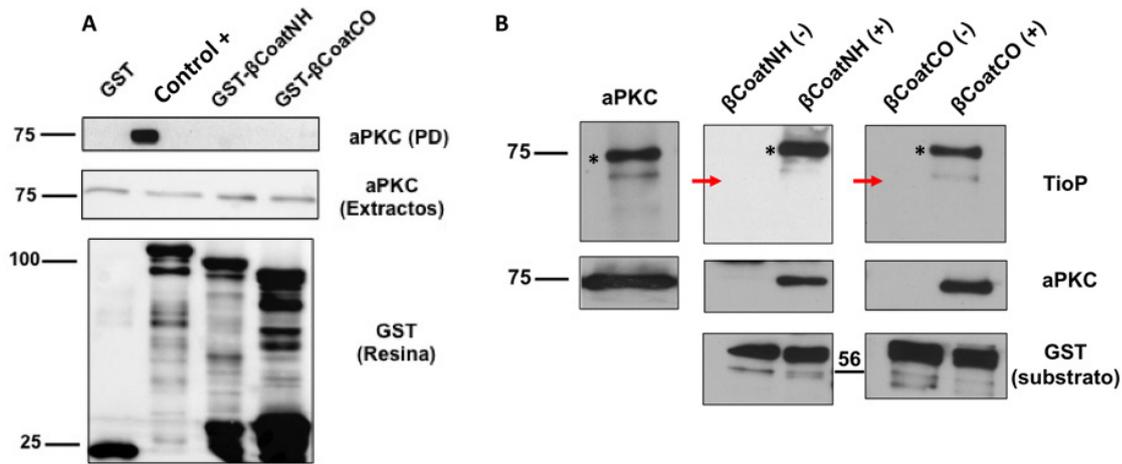


Figura 27. Análisis de la interacción física y fosforilación entre aPKC y β-Coatómero. A) *Pull Down* entre aPKC β-Coatómero. En el papel superior se muestra el revelado con aPKC observándose banda solo para el control positivo. En los paneles inferiores se cargó un 5% de los extractos iniciales como control de carga de proteína inicial (aPKC) y un 10% de las bolas como control de carga de la resina. B) Ensayos de fosforilación para β-CoatNH y β-CoatCO . Las flechas rojas indican donde debe aparecer la banda de fosforilación del sustrato. Los asteriscos indican la autofosforilación de aPKC. Los *westerns* anti-aPKC muestran el control de cantidad de enzima y los de GST el control de cantidad de sustrato.

Análisis de la interacción entre Syx y aPKC

Las sintaxinas son componentes fundamentales del complejo SNARE, un componente esencial en el transporte celular en eucariotas, especialmente para la fusión de membranas, incluida la exocitosis (revisado en [64,171-173]) Las sintaxinas tienen un papel importante en la liberación de vesículas sinápticas en el sistema nervioso, lo que constituye un tipo especial de exocitosis, aunque diferentes sintaxinas pueden desempeñar funciones distintas. Por ejemplo, la Sintaxina-1 se localiza en la membrana plasmática del terminal presináptico en células neuronales, mientras que la Sintaxina-4 lo hace en la membrana plasmática cerca de la región perisináptica en células astrogiales [174]. La Sintaxina-4 también ha sido implicada en la exocitosis de insulina en las células β pancreáticas, indicando una función más general de estas proteínas en la exocitosis [175] y la Sintaxina-1 también ha sido implicada en el transporte vesicular durante la celularización del embrión de *Drosophila* [176].

Para analizar la interacción genética, utilicé el mutante *syx5^{AR}* ya que no había mutantes para la Sintaxina 4 disponibles en las colecciones públicas. La combinación de este mutante con el RNAi de aPKC produjo la interacción más fuerte de todos los candidatos testados en cuanto al fenotipo del ala. Más del 90% de las alas de los machos presentaban las venas 2 y 3 fusionadas y lo que fue más determinante: el 40% de alas de las hembras presentaban fusión de venas, mientras que con la expresión del RNAi de aPKC en solitario ningún ala presentaba fusión de venas en hembras (Fig. 25).

Para el análisis de la interacción física realicé construcciones GST para Syx4 y también para Syx1 (para comprobar si la interacción con aPKC era específica para la Syx4 o se trataba de una interacción más general con las Sintaxinas), para las cuales estaba disponible el cDNA. A pesar de la fuerte interacción genética entre aPKC y *syx5^{AR}*, en los ensayos de PD pude

comprobar que tanto Syx1 como Syx4 no interaccionaban físicamente con aPKC (Fig. 28). Hay que destacar que aunque para Syx4 no se detectaba banda de aPKC que indicase que hay unión entre ambas proteínas, la cantidad de Syx4 en la resina era mucho menor que para el control positivo, por lo que no pude descartar totalmente que exista interacción.

Para ayudar a comprobar si existía interacción o no entre estas proteínas, realicé ensayos de fosforilación para Syx1 y Syx4. Los resultados mostraron que no existía fosforilación de Syx4 por parte de aPKC (Fig. 28). Para Syx1 por el contrario, aparecía una banda débil a la altura que correspondía por tamaño y que podría indicar fosforilación (Fig. 28).

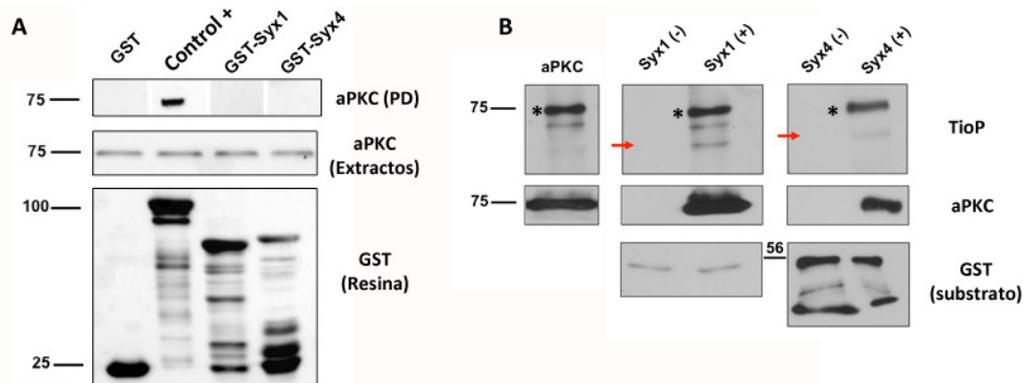


Figura 28. Análisis de la interacción física y fosforilación entre aPKC, Syx1 y Syx4. A) *Pull Down* entre aPKC y Syx1 y Syx4. En el papel superior se muestra el revelado con aPKC y solo se observa banda para el control positivo. En los paneles inferiores se cargó un 5% de los extractos iniciales como control de carga de proteína inicial (anti-aPKC) y un 10% de las bolas como control de carga de la resina (anti-GST). B) Ensayos de fosforilación para Syx1 y Syx4. Las flechas rojas indican donde debe aparecer la banda de fosforilación del sustrato. Los asteriscos indican la autofosforilación de aPKC. Los paneles de tinción de aPKC muestran el control de cantidad de enzima (anti-aPKC) y los de anti-GST el control de cantidad de sustrato.

Como método alternativo para comprobar la fosforilación de Syx1, realicé un segundo ensayo de fosforilación pero en este caso utilicé un anticuerpo contra serinas fosforiladas para sustratos de PKCs (cPKC, nPKC, aPKC). Este anticuerpo detecta Serinas fosforiladas y rodeadas de Arginina o Lisina en las posiciones -2 y +2 así como de un residuo hidrofóbico en la posición +1. Si bien un resultado negativo en este experimento no descartaría la fosforilación, un resultado positivo si la confirmaría. En la figura 29 se observa el resultado de este ensayo mostrando que no obtuve señal de fosforilación por el anticuerpo contra Serinas fosforiladas, por tanto no pude confirmar ni descartar que aPKC fosforile a Syx1.

Debido a la utilización de diferentes tipos de Sintaxinas para los análisis de interacción genética y física con aPKC, así como a los diferentes datos obtenidos para cada una de ellas, no pude llegar a resultados concluyentes que determinasen el tipo de interacción existente entre estas proteínas.

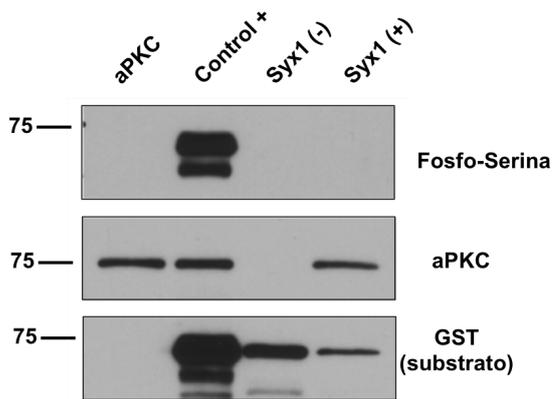


Figura 29. Ensayo de fosforilacion de Syx1 revelado con Fosfo-Serina. El carril de aPKC se trata de un control negativo con solo enzima y en el control positivo se utilizó una proteína cuya fosforilación por aPKC estaba demostrada. Los paneles inferiores muestran el control de cantidad de enzima (aPKC) y de Substrato (GST). No se aprecia banda de Fosfo-Serina para Syx1.

Análisis de la interacción entre Nuf y aPKC

Nuclear fallout (Nuf), es homólogo a la Arfofilina-2 (Factor de ribosilación ADP), cuyo homólogo en vertebrados es Rab11-FIP3 (*Rab11-Family Interacting Protein 3*) [88,177]. Nuf funciona como adaptador de Rab11, un miembro de la familia de las pequeñas GTPasas específico de los endosomas de reciclaje (ER), con las proteínas motoras de microtúbulos (complejos de dineína y kinesina, [82,86]). Por tanto Nuf actúa regulando el tráfico de ER a través de su interacción con Rab11 [88,89,178] transportando de este modo diferentes cargos hacia la parte apical de las células epiteliales. En *Drosophila melanogaster* el complejo Nuf-Rab11 se ha involucrado en el transporte de actina en la formación de la membrana plásmatica durante la celularización del blastodermo [86,89,91] así como en la formación de las quetas adultas [90]. Por otra lado, también se ha involucrado en la señalización de la vía de Notch a través del reciclaje del ligando Delta en los precursores del sistema nervioso adulto de *Drosophila* [92].

Para el análisis genético de la interacción entre Nuf y aPKC usé el mutante *nuf^f* y las líneas *UAS-RNAi-Nuf* y *UAS-Nuf-GFP*. Tanto el mutante *nuf^f* como la expresión del RNAi producían un ligero aumento del número de alas con venas fusionadas en hembras, aunque en machos no se modifica el fenotipo. Por el contrario, con la expresión de la línea *UAS-Nuf-GFP* se rescataba el fenotipo, no encontrándose ningún ala con venas fusionadas en machos ni en hembras (Fig. 25).

El análisis de la interacción física lo realicé a través de un ensayo de PD utilizando proteína purificada GST-Nuf e incubándola con extracto de embriones silvestres. Este ensayo demostró que aPKC se une físicamente a Nuf, tal y como puede observarse en la figura 30 (A).

Cuando realicé el ensayo de fosforilación por aPKC de Nuf pude comprobar que Nuf se fosforilaba indicando que es un substrato de aPKC (Fig. 30, B).

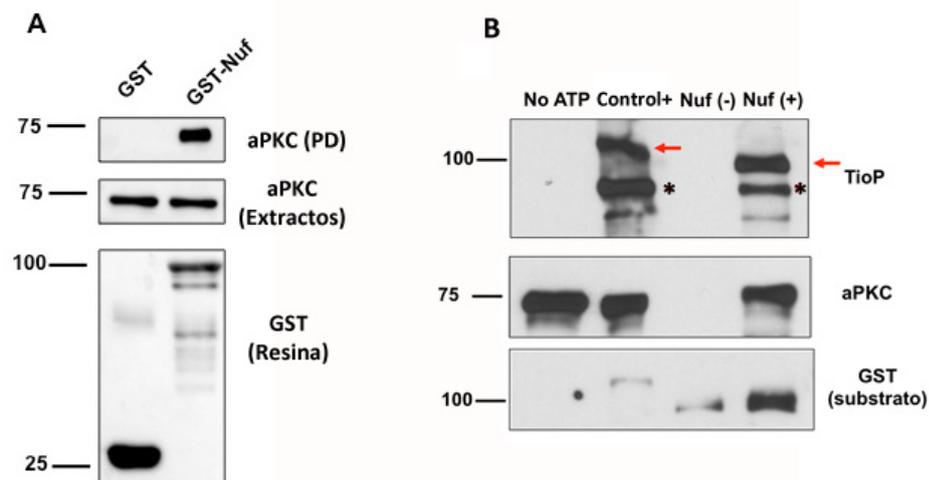


Figura 30. Análisis de la interacción física y fosforilación entre aPKC y Nuf. A) *Pull Down* entre aPKC y Nuf. En el papel superior se muestra el revelado con aPKC, observándose banda en el carril de Nuf, lo que indica interacción. En los paneles inferiores se cargó un 5% de los extractos iniciales como control de carga de proteína inicial (anti-aPKC) y un 10% de las bolas como control de carga de la resina (anti-GST). B) Ensayo de fosforilación para Nuf. Las flechas rojas indican donde debe aparecer la banda de fosforilación del sustrato. Los asteriscos indican la autofosforilación de aPKC. Los paneles de tinción de aPKC muestran el control de cantidad de enzima y los de GST el control de cantidad de sustrato.

Resumen del análisis de los candidatos

Después de estudiar la interacción genética y física entre aPKC y los candidatos así como su fosforilación pude llegar a diversas conclusiones. Los candidatos que presentaban mayor interacción genética como Syx y β -Coat no se unen a aPKC ni tampoco se fosforilan en nuestras condiciones experimentales. En el caso de Syx1 no podemos descartar completamente la existencia de fosforilación. A pesar de que en el análisis genético Nuf no mostró interacción fuerte con aPKC, posteriormente demostré que la interacción física descubierta con la purificación por afinidad entre ambas proteínas es real y que además Nuf es un sustrato de aPKC (Tabla 4).

Estos datos establecen a Nuf como el candidato adecuado con el cual seguir analizando su interacción con aPKC. De este modo, el trabajo de esta tesis se centró en el estudio de la interacción aPKC-Nuf tratando de conocer cuales son las características bioquímicas de ésta así como su relevancia biológica.

RESULTADOS

Candidato	Interacción Genética	Interacción Física	Fosforilación
Nuclear fallout (Nuf)	+	✓	✓
Sintaxina-4 (Syx4)	+++	✗	✗
Proteína de localización nuclear 4 (Npl4)	-	No testada	No testada
Lámina0 (Lam0)	++	✗	No testada
β-Coatómero	++	✗	✗

Tabla 4. Resumen del análisis de la interacción entre aPKC y los candidatos. La interacción se muestra con signos + cuando existe interacción (a más interacción, más signos +) y con un signo - cuando no existe interacción. Solo se ha demostrado interacción física y fosforilación con Nuf.

3. Análisis de la Interacción aPKC-Nuf

Después de analizar la interacción física y genética entre aPKC y los candidatos obtenidos en la purificación por afinidad, escogí la proteína Nuclear fallout (Nuf), proteína adaptadora de Rab11, como el mejor candidato para estudiar en mayor profundidad su interacción con aPKC, ya que como he mostrado existe interacción física entre ambas proteínas y Nuf es un sustrato de aPKC.

En vertebrados se han descrito cinco proteínas miembros de la familia Rab11-FIP (*Family Interacting Protein*), proteínas adaptadoras de Rab11. Estas proteínas se caracterizan por poseer un Dominio de Unión a Rab11 (RBD) y se clasifican en dos clases diferentes, clase I y clase II, atendiendo a sus dominios en la parte N-terminal. Las diferentes Rab11-FIPs son capaces de unirse a diferentes proteínas motoras (Dineína, Kinesina y Miosina V) haciendo posible el transporte de los RE por las diferentes rutas de transporte intracelular.

En *Drosophila* se han descrito hasta este momento dos proteínas homólogas a las Rab11-FIPs. La proteína Nuclear Fallout (Nuf), que pertenece a la clase II, es homóloga a Rab11-FIP3 e interacciona con Dineína permitiendo el transporte vesicular a través de los microtúbulos [86,88,177]. La proteína Rip11, que pertenece a la clase I y es homóloga a Rab11-FIP2 y en *Drosophila*, se ha descrito su unión a la Miosina V para regular el transporte de vesículas Rab11 a través de los filamentos de actina [85].

Teniendo en cuenta que Nuf y Rip11 pertenecen a la familia de las Rab11-FIPs y habiendo identificado a Nuf como un sustrato de aPKC, decidí analizar en paralelo si había también interacción aPKC-Rip11 y comprobar si aPKC afectaba de forma general al transporte de los RE o si por el contrario afectaba específicamente a Nuf. A continuación describiré en paralelo los experimentos y resultados de este estudio.

Estudio de la interacción física entre aPKC y las proteínas Nuf y Rip11

Como punto de partida para el estudio de la interacción aPKC-Nuf he caracterizado cómo es esta interacción a nivel bioquímico; cuáles son los dominios responsables de la interacción y si dicha interacción es directa o indirecta. Asimismo, dado que Nuf es sustrato de aPKC he mapeado los residuos fosforilados por aPKC. Por otra parte, he analizado si existe interacción física entre aPKC y Rip11 así como si Rip11 es sustrato de aPKC.

aPKC y Nuf interaccionan directamente a través del dominio quinasa de aPKC y la mitad NH de Nuf.

Para comprobar la interacción física entre aPKC y Nuf realicé un experimento de *Pull Down* (PD) que demostró que existe interacción física entre ambas proteínas. Sin embargo, al estar realizado con extracto de embriones silvestres no es posible determinar si dicha interacción es directa o existe alguna otra proteína que actúe como intermediario. Por ello realicé un PD *in vitro* usando proteína recombinante GST-Nuf unida a esferas de agarosa, la cual incubé

RESULTADOS

con proteína recombinante aPKC purificada. Como puede observarse en la figura 31, aPKC co-precipita con Nuf usando tanto extracto de embriones (Fig. 31, A) como aPKC purificada (Fig. 31, B), indicando que la interacción es directa.

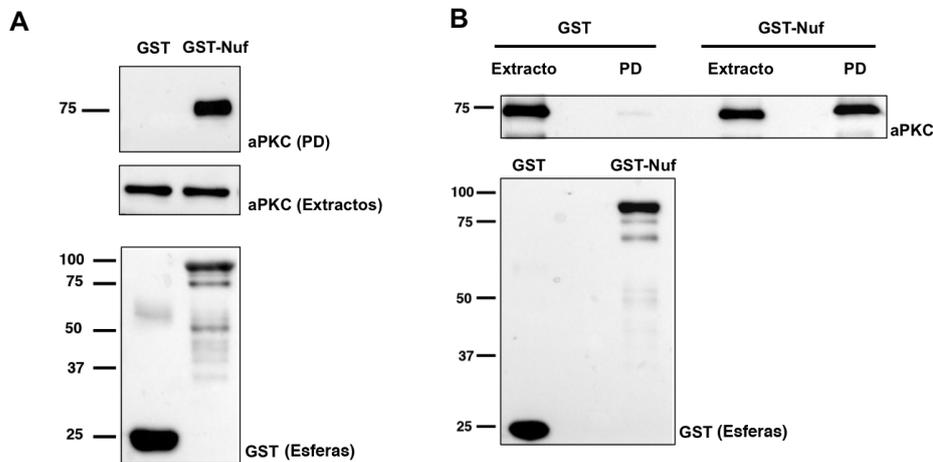


Figura 31. aPKC interacciona físicamente con Nuf, siendo esta interacción directa. A) Ensayo de PD incubando GST-Nuf y GST como control negativo con extracto de embriones silvestres. El panel superior muestra la co-precipitación entre aPKC y Nuf. B) PD *in vitro* incubando GST-Nuf y GST como control negativo con proteína aPKC purificada. El panel superior muestra la cantidad de aPKC inicial y la que co-precipita. Ambos experimentos presentan un control de carga de la resina (10% de la resina utilizada, panel GST Esferas) y de los extractos iniciales (5% extracto utilizado, panel aPKC extractos).

aPKC presenta dos dominios: el dominio quinasa, responsable de su actividad enzimática y el dominio regulador, que actúa regulando su actividad [97]. Con el objetivo de conocer el dominio responsable de la interacción con Nuf, utilicé la metodología de la purificación por afinidad (apartado 1 de resultados) para realizar ensayos de afinidad entre los dominios de aPKC y la proteína Nuf (Fig. 32, A). Utilicé las construcciones *UAS-TT_aPKC^{Dquin}* y *UAS-TT_aPKC^{Dreg}* para realizar la purificación por afinidad a partir de extractos embrionarios. Los resultados de estos experimentos determinaron que era el dominio quinasa de aPKC el único capaz de interactuar con Nuf (Fig. 32, B) lo cual está en concordancia con el hecho de que aPKC fosforile a Nuf. Por otro lado, para mapear el dominio de interacción de Nuf, dividí la proteína en dos mitades: la mitad CO que contiene los dominios *coiled-coil* y de unión a Rab11, y la mitad NH, cuya secuencia no presenta homología con otras proteínas relacionadas y carece de dominios conocidos (Fig. 32, A). Realicé ensayos de PD incubando cada una de las dos mitades de Nuf con extracto de embriones silvestres y analizando posteriormente la presencia de aPKC acomplejada con los distintos dominios de Nuf. De este modo determiné que solo la mitad NH es capaz de co-precipitar con aPKC (Fig. 32, C).

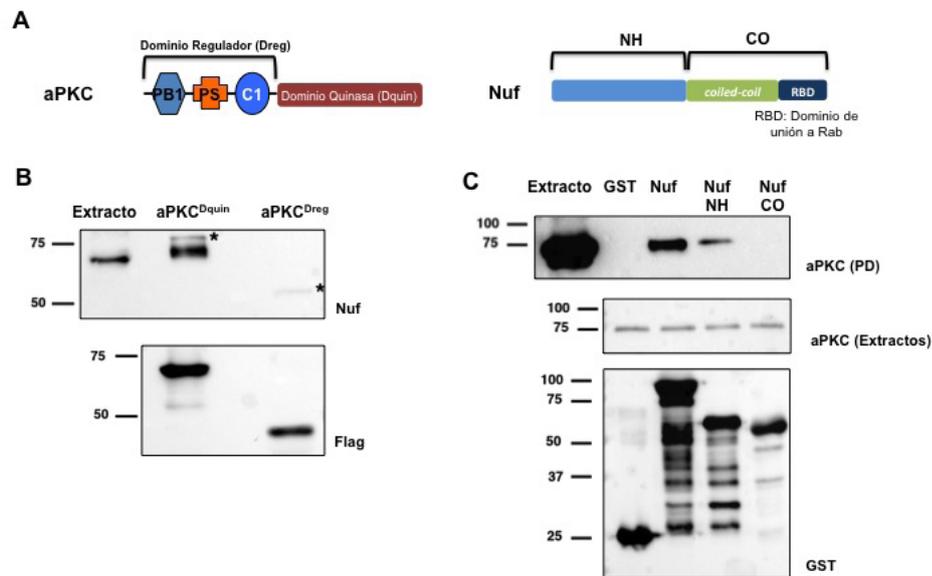


Figura 32. La interacción entre aPKC y Nuf ocurre a través del dominio quinasa de aPKC y la mitad NH de Nuf. A) Representación esquemática de las proteínas aPKC y Nuf con los dominios que presentan. B) Esferas magnéticas con el dominio quinasa y el regulador de aPKC incubadas con extracto de embriones silvestres. Solo se observa co-precipitación entre Nuf y el dominio quinasa de aPKC. Los asteriscos indican la señal del TT presente en las construcciones de aPKC y que produce reacción cruzada con el anticuerpo secundario utilizado. El panel Flag muestra la cantidad de aPKC presente en las esferas magnéticas (10% de las esferas utilizadas). C) PD con las dos mitades de Nuf incubadas con extracto de embriones silvestres. Solo la proteína completa Nuf y la mitad NH son capaces de co-precipitar con aPKC. Los paneles inferiores son controles de carga de los extractos iniciales (5% de los extractos iniciales) y de las resinas (10% de las resinas utilizadas).

Nuf interacciona con aPKC solo en su estado activo.

Como muestro en el apartado anterior la interacción entre aPKC y Nuf se produce por el dominio quinasa de aPKC, lo cual sugiere que la actividad quinasa puede ser relevante para la interacción. Para profundizar más en este aspecto realicé un ensayo de afinidad *in vitro* usando esferas magnéticas recubiertas del dominio quinasa de aPKC mutado en el sitio de unión de ATP y que carece de actividad quinasa (aPKC DQuin*; [36]). Estas esferas se incubaron con GST-Nuf purificado usando como control esferas con el dominio quinasa silvestre de aPKC (aPKC DQuin). Al realizar este experimento observé que la versión mutada de aPKC (aPKC DQuin*) era incapaz de interaccionar con Nuf (fig. 33, A), indicando la necesidad de la actividad quinasa de aPKC para dicha interacción.

Uno de los primeros momentos en los que la actividad quinasa de aPKC se requiere es para su propia autofosforilación que es fundamental para su activación [96,101]. Para determinar si dicha autofosforilación y activación de aPKC era importante para la interacción con Nuf, realicé un nuevo ensayo de afinidad *in vitro* usando el dominio quinasa silvestre de aPKC esta vez tratado con fosfatasa alcalina para eliminar los fosfatos y por tanto la autofosforilación. Cuando eliminé la autofosforilación de aPKC también se eliminó la unión de aPKC con Nuf

(Fig. 33, B), lo que indicaba que esta autofosforilación era esencial para la interacción aPKC-Nuf.

La autofosforilación de aPKC sucede en el dominio quinasa, en la Treonina 422 en *Drosophila* [179] por lo que generé versiones mutantes del dominio quinasa para este aminoácido, mutando la Treonina a Alanina (aminoácido que no puede ser fosforilado por aPKC, T422A) y a Glutamato (actúa como un fosfomimético, T422D) para confirmar que esta autofosforilación era fundamental para la interacción física entre aPKC y Nuf. Realicé un ensayo de afinidad *in vitro* con esferas unidas a estas versiones mutantes de aPKC (T422A y T422D) y con GST-Nuf purificado. Con este experimento observé que tanto la versión no fosforilable (T422A) como la fosfomimética (T422D) de aPKC no interaccionaban con Nuf (Fig. 33, C), indicando que dicho aminoácido era fundamental para la unión aPKC-Nuf y que el fosfomimético no llegaba a ser exactamente igual que la versión silvestre.

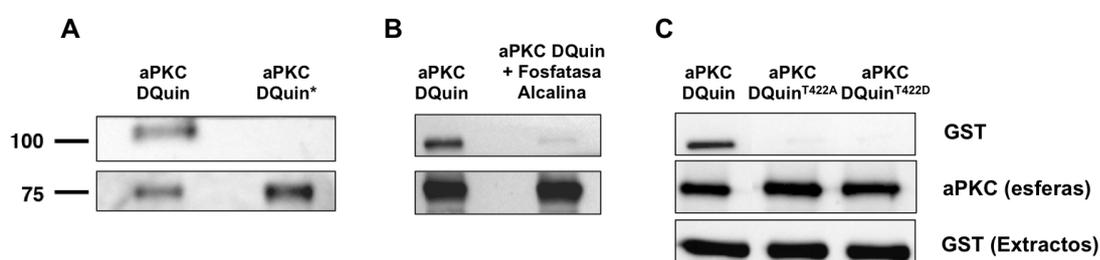


Figura 33. aPKC activa (autofosforilada) se une a Nuf. Ensayos de co-precipitación con diferentes versiones del dominio quinasa de aPKC incubadas con GST-Nuf purificado. En cada experimento se compara el dominio quinasa silvestre con el dominio quinasa mutado de forma que no puede fosforilar (A), el dominio quinasa tratado con fosfatasa alcalina para eliminar la autofosforilación de aPKC (B) y el dominio quinasa no autofosforilable (T422A) y autofosfomimético (T422D, C). El panel de GST muestra co-precipitación solo entre GST-Nuf y el dominio quinasa silvestre. Los paneles inferiores muestran el control de cantidad de aPKC en la resina (10% de las esferas utilizadas, panel aPKC esferas) y la cantidad de GST-Nuf utilizada en los extractos (5% extractos iniciales, panel GST extractos). Para los experimentos A y B se utilizaron controles similares a los del experimento C.

La fosforilación de aPKC se produce en una serina de la mitad N-terminal de Nuf

Como mostré en el apartado 2 de resultados, Nuf es un sustrato de aPKC. El siguiente objetivo fue localizar donde se producía esta fosforilación. Con este fin, realicé diferentes ensayos de fosforilación usando aPKC purificada, las diferentes proteínas sustratos (proteínas recombinantes GST purificadas) y ATP γ S, un análogo del ATP que al usarse por la quinasa incorpora un grupo tiofosfato al sustrato que puede ser detectado posteriormente por *Western Blot* usando un anticuerpo específico [146]. Dicha técnica ha sido puesta a punto para aPKC en el laboratorio de Jorge Moscat y María Díaz-Meco (*Sanford-Burnham Medical Research Institute*, California), laboratorio en el cual he aprendido la técnica.

En primer lugar realicé un ensayo de fosforilación tanto con la proteína Nuf completa como con cada una de sus mitades (NH y CO), de esta manera comprobé que la fosforilación

se produce en la proteína completa y en la mitad NH de Nuf (Fig. 34, A). Posteriormente llevé a cabo un ensayo de fosforilación con la mitad NH de Nuf y realicé un *Western Blot* con un anticuerpo anti-Fosfo-(Ser) para sustratos de PKC, el cual detecta la fosforilación en Serinas rodeadas de Arginina (R) o Lisina (K) en las posiciones -2 y +2 así como de un residuo hidrofóbico en la posición +1. Sin embargo, la secuencia consenso de fosforilación por PKCs tiene ciertas variaciones entre las diferentes isoformas y no todas las fosforilaciones se producen en secuencias que siguen este consenso (Fig. 34, B). De este modo, el uso de este anticuerpo es útil pero no determinante, ya que un resultado negativo no descartaría que hubiera fosforilación. En este caso el anticuerpo anti-Fosfo-(Ser) para sustratos de PKC detectaba fosforilación en Nuf-NH (Fig. 34, C), indicando que al menos existe una Serina que es fosforilada por aPKC en la parte N-terminal de Nuf.

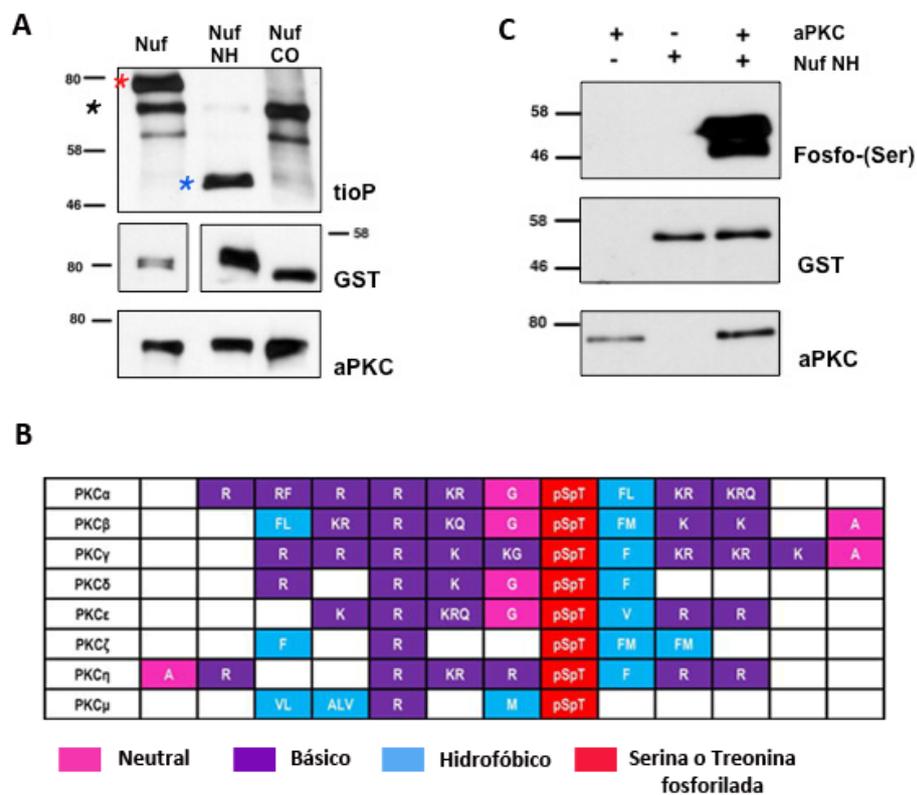


Figura 34. Nuf es fosforilado por aPKC en una serina de la parte N-terminal. A) Ensayo de fosforilación de Nuf, Nuf NH y Nuf CO. La señal del tiosulfato (fosforilación, panel superior) solo se observa para Nuf y Nuf NH. Los asteriscos negro, rojo y azul indican la señal de autofosforilación de aPKC, la de Nuf y la altura a la que deben aparecer las dos mitades de Nuf, respectivamente. B) Secuencias consenso para sustratos de las diferentes isoformas de PKCs con la serina o treonina fosforilada (pS o pT, rojo) y los diferentes aminoácidos adyacentes indicando si son neutrales (rosa), básicos (morado) o hidrofóbicos (azul). Imagen modificada de [180]. C) Ensayo de fosforilación de Nuf NH revelado con el anticuerpo contra serinas fosforiladas (panel superior). El panel GST se corresponde al control de cantidad de sustrato. El panel aPKC se corresponde al control de cantidad de enzima.

Análisis de la interacción entre aPKC y Rip11.

Para llevar a cabo este análisis realicé experimentos de PD con extracto de embriones silvestres generando las construcciones GST-Rip11 y GST-Rip11 NH, con el extremo amino terminal de la proteína para comprobar si había interacción y si se producía por esta región al igual que ocurre con Nuf (Fig. 35, A).

Para la mitad NH de Rip11 no aparecía banda de aPKC que indicase interacción, sin embargo para la proteína completa Rip11 aparecía una débil banda de aPKC pero en una posición mayor a la que le correspondería por tamaño (Fig. 35, B). Esto puede deberse a la gran cantidad de proteína GST-Rip11 (cuyo tamaño es similar a aPKC) presente en la muestra que puede impedir la correcta migración de aPKC durante la electroforesis.

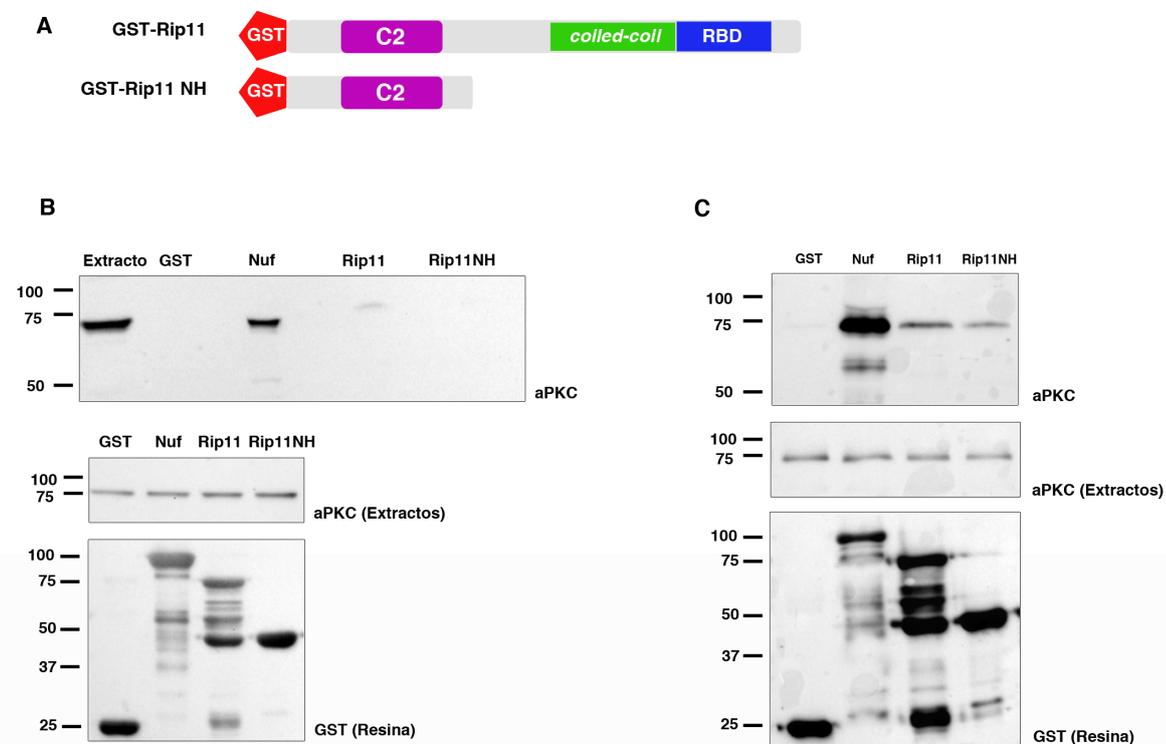


Figura 35. Rip11 interacta físicamente con aPKC. A) Representación esquemática de la proteína Rip11 completa (arriba) o el dominio N terminal (abajo) utilizadas en los ensayos de PD con sus distintos dominios. B-C) PD incubando GST-Rip11, GST-Rip11 NH, GST-Nuf (control positivo) y GST (control negativo) con extracto de embriones silvestres (B) o aPKC purificada (C). El panel superior de aPKC muestra la co-precipitación entre aPKC y las diferentes proteínas GST. Los paneles inferiores muestran controles de cantidad de proteína inicial en un 5% del extracto utilizado (aPKC extractos) y cantidad de proteína de las proteínas GST en un 10% de la resina utilizada (GST resina).

Decidí realizar un PD *in vitro* incubando las proteínas GST-Rip11 y GST-Rip11 NH con aPKC comercial purificada. Como control positivo utilicé GST-Nuf. Los resultados de este PD *in vitro* demostraron que existía interacción entre aPKC y Rip11, tanto para la proteína completa como, aunque más débil, para la mitad NH (Fig. 35, C) y en ambos casos menos fuerte que para Nuf.

La existencia de interacción física abrió la posibilidad de que Rip11 también fuese un sustrato de aPKC. Por tanto analicé la fosforilación de Rip11 por aPKC. Los resultados de estos experimentos mostraron que tanto para Rip11 como para Rip11 NH se producía fosforilación (Fig. 36, A). Repetí el ensayo de fosforilación revelando con un anticuerpo contra serinas fosforiladas por quinasas PKC. En este caso no se vio señal alguna tanto para Rip11 como para Rip11 NH (Fig. 36, B).

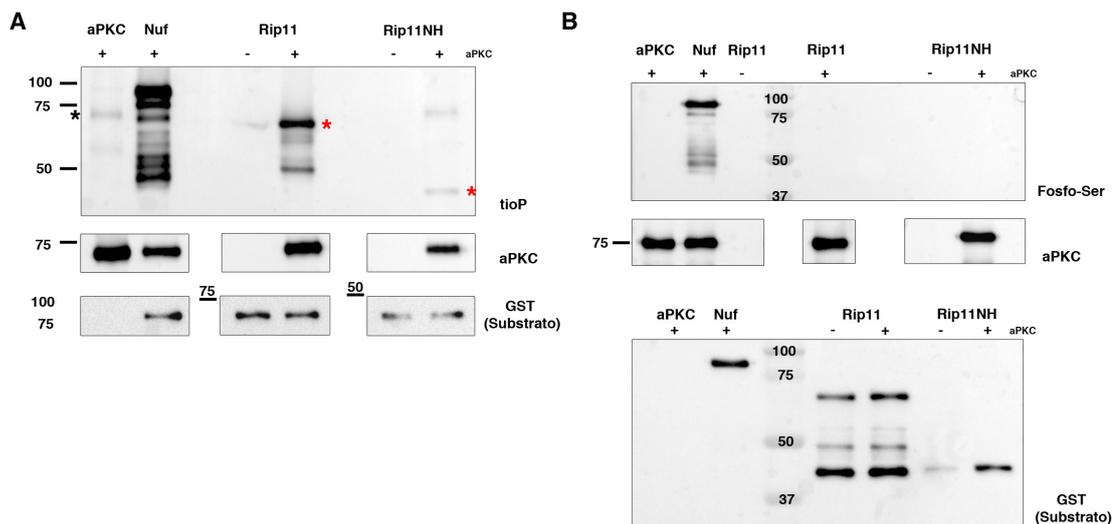


Figura 36. aPKC fosforila a Rip11. Ensayos de fosforilación *in vitro* entre aPKC y GST-Rip11, GST-Rip11 NH y GST-Nuf (control positivo) como sustratos. Para detectar la fosforilación se ha utilizado un anticuerpo anti-tioFosfato (A) y anti-FosfoSerina (B). El panel aPKC muestra el control de cantidad de enzima y el panel de GST el de cantidad de sustrato. En ambos se ha cargado el 50% del ensayo de fosforilación. El asterisco negro marca la autofosforilación de aPKC y los asteriscos rojos la fosforilación de Rip11 y Rip11NH

Estudio genético y funcional de la interacción de aPKC con Nuf y Rip11

Una vez corroborada bioquímicamente la interacción entre aPKC y Nuf, quise abordar la relevancia biológica de esta interacción. Decidí realizar en paralelo el análisis de Rip11, debido a que también existe interacción y fosforilación con aPKC. De este modo realicé diferentes experimentos genéticos y de inmunohistoquímica tanto en embriones como en disco imaginal de ala, con el objetivo de entender las interacciones aPKC-Nuf y aPKC-Rip11 en un contexto celular y de tejido que me ayudara a conocer la función de estas uniones.

La falta de aPKC y de Rip11 produce un fenotipo similar a la falta de función de Nuf durante la celularización del embrión.

Como ya mencioné en la introducción, Nuf tiene un papel fundamental durante la celularización del embrión de *Drosophila*, momento en el cual en el blastodermo sincitial cada núcleo migra hacia la periferia del embrión y forma una célula individual gracias a

la invaginación de la membrana plasmática entre los núcleos. Tanto la reorganización del citoesqueleto como la adición de membrana son claves en este proceso. En embriones mutantes *nuf^l*, el proceso de celularización no ocurre de manera adecuada, produciéndose fallos en la polimerización de actina y en el transporte de membrana [88,89]. Como consecuencia se pueden observar núcleos localizados en el interior del embrión en lugar de en la periferia (Fig. 37, B), a los cuales denominaremos “núcleos caídos”.

Teniendo en cuenta que no han sido descritos defectos en la posición nuclear en los mutantes de *aPKC* ni en los de *rip11*, me propuse analizar el papel de ambos durante la celularización. Para ello generé clones mutantes *aPKC^{k06403}* y *rip11^{KG02485}* en la línea germinal, de manera que eliminaran los componentes materno y cigótico de estos genes. Cuando analicé el proceso de celularización en estos mutantes observé que en torno al 75% de los embriones mutantes para *aPKC* presentaban fenotipo de núcleos caídos (Fig. 37, C) siendo este porcentaje del 40% en el caso de los mutantes *rip11^{KG02485}* (Fig. 37, D). No obstante, al cuantificar el número de núcleos caídos por embrión pude observar que el fenotipo era más fuerte (mayor número de núcleos caídos por embrión de media) en el caso del mutante *nuf^l* que para los mutantes *aPKC^{k06403}* y *rip11^{KG02485}* (Fig. 37, E). Esto sugiere la participación de *aPKC* y *Rip11* en el proceso de celularización.

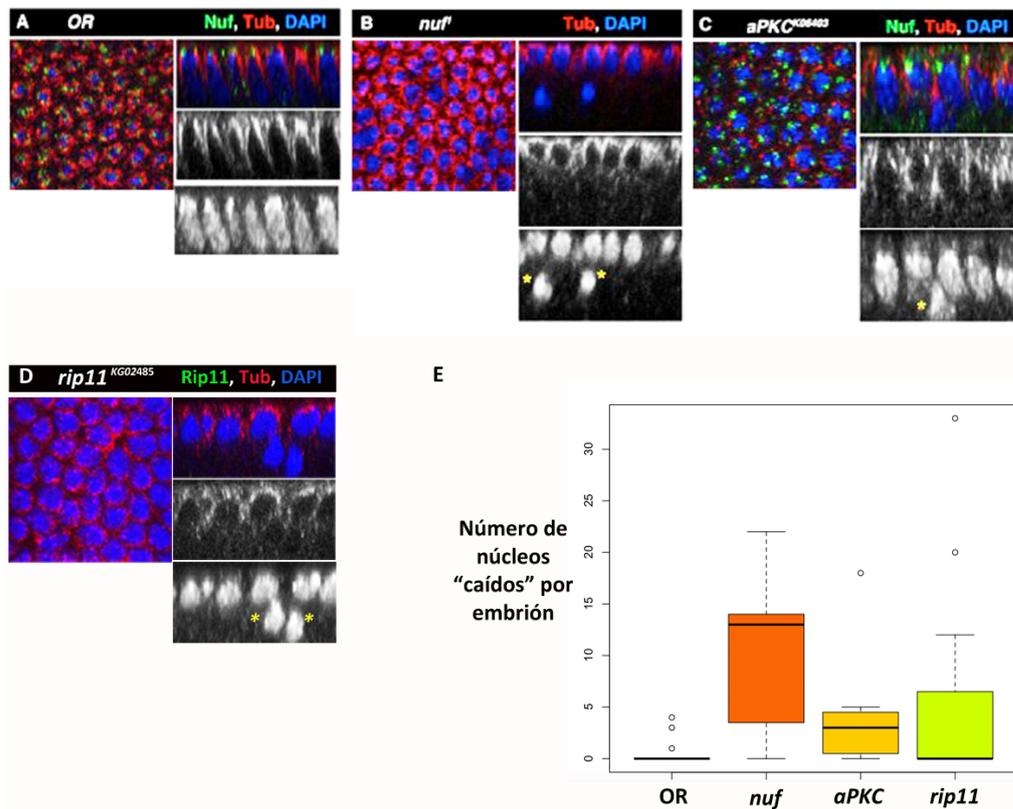


Figura 37. La falta de función de *aPKC* y *Rip11* durante la celularización produce un fenotipo similar al mutante *nuf^l*. Tinciones Nuf y Rip11 (verde), Tubulina (rojo) y DAPI (azul) de embriones silvestres (A), mutantes *nuf^l* (B), mutantes *aPKC^{k06403}* (materno y cigótico, C) y mutantes *rip11^{KG02485}* (materno y cigótico, D) en la etapa de celularización. A la izquierda se observa un plano apical y a la derecha planos sagitales. Los asteriscos amarillos marcan los núcleos mal localizados basalmente. E) Cuantificación del número de núcleos caídos por embrión para cada fenotipo.

aPKC regula la localización subcelular de Nuf y Rip11.

aPKC es una quinasa con una función fundamental en procesos relacionados con la polaridad celular donde actúa fosforilando a un gran número de proteínas diana claves regulando su localización subcelular [34,103,181,182]. Puesto que mis resultados previos demostraron que Nuf y Rip11 son sustratos de aPKC, investigué la posibilidad de que aPKC pudiera estar regulando la localización de estas proteínas.

Para resolver esta cuestión he utilizado el disco imaginal de ala como tejido modelo. El disco imaginal de ala es un tejido epitelial pseudoestratificado donde las células forman una monocapa, lo cual lo hace un tejido muy útil para estudiar la polaridad apico-basal en la célula (ver Introducción Fig. 2, B). En condiciones silvestres, tanto Nuf como Rip11, se observan como un punteado distribuido uniformemente por todo el disco, mientras que aPKC se acumula principalmente en la membrana apico-lateral (Fig. 38, ver células silvestres con tinción aPKC verde). Para examinar el posible efecto de aPKC sobre la localización de Nuf y Rip11 he generado clones de recombinación mitótica para mutantes *aPKC^{k06403}* lo cual permite comparar las células a las que les falta aPKC de las células silvestres vecinas. Tanto para Nuf (Fig. 38, A'', B'' y C'') como para Rip11 (Fig. 38, C'') se puede observar una acumulación en la región subapical en las células mutantes *aPKC^{k06403}*.

La mayoría de los procesos en los que hasta ahora se ha involucrado a Nuf y Rip11 están relacionados con la regulación de los endosomas de reciclaje, papel que realizan a través de su unión a Rab11 y a proteínas motoras del citoesqueleto. Cuando analicé la distribución de Rab11 en clones mutantes *aPKC^{k06403}* observé también su acumulación en la región subapical junto con Nuf, al igual que ocurre con la proteína motora Dineína (Fig. 38, A-B, A''-B''). Estos datos sugieren que el tráfico de RE mediado por Rab11, Nuf y Rip11 se encuentra afectado en ausencia de aPKC.

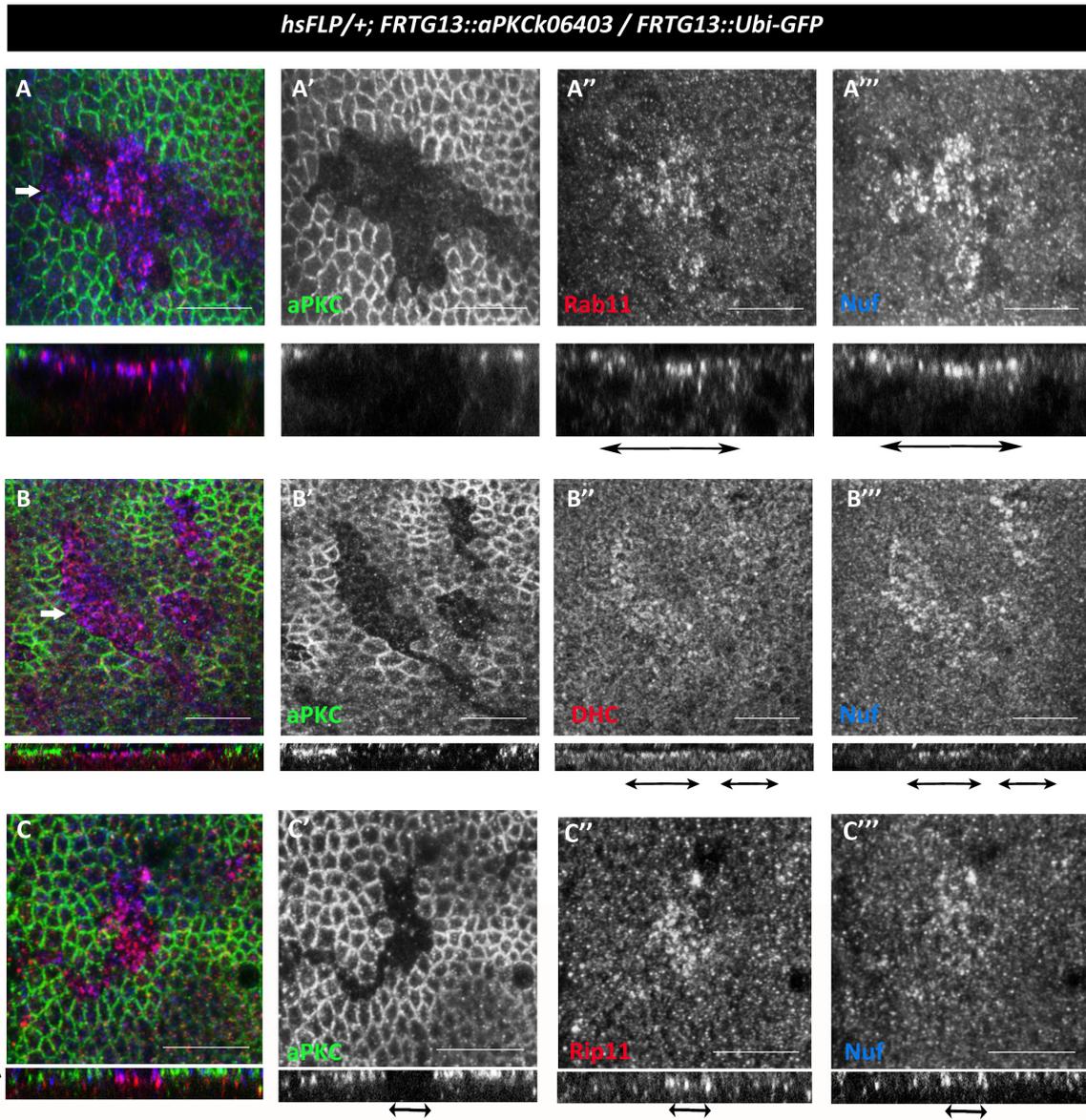


Figura 38. Nuf, Rip11, Rab11 y Dineína se acumulan en células mutantes para *aPKC*. Imágenes de confocal de clones de *aPKC* en discos imaginales de ala. *aPKC* en verde (A-C', A'-C'), Rab11 en rojo (A y A''), Dineína en rojo (DHC, *Dinein Heavy Chain*, B y B''), Rip11 en rojo (C-C'') y Nuf en azul (A-C, A''-C'''). En la parte superior se muestran vistas apicales y en la inferior planos sagitales de cortes en las zonas indicadas por las flechas blancas. La zona apical y basal está marcada con las letras A y B en negro respectivamente. Las flechas negras indican la extensión del clon de *aPKC*. Rab11, Nuf y Dineína se acumulan en la parte apical de las células que no tienen *aPKC* (ausencia de tinción verde). Barra de escala: 10 μ m.

La falta de Nuf reduce los niveles de *aPKC* en la membrana.

Puesto que la localización subcelular de Nuf y Rip11 se ve afectada por la falta de función de *aPKC*, decidí investigar si Nuf y/o Rip11 podrían a su vez afectar los niveles o la distribución de *aPKC*. Por un lado generé clones de falta de función por recombinación de *rip11*^{KG02485} en el disco imaginal de ala. Como puede verse en la figura 39 (A-A'') la falta de Rip11 no

modificaba la localización subcelular de aPKC ni sus niveles en la membrana subapical.

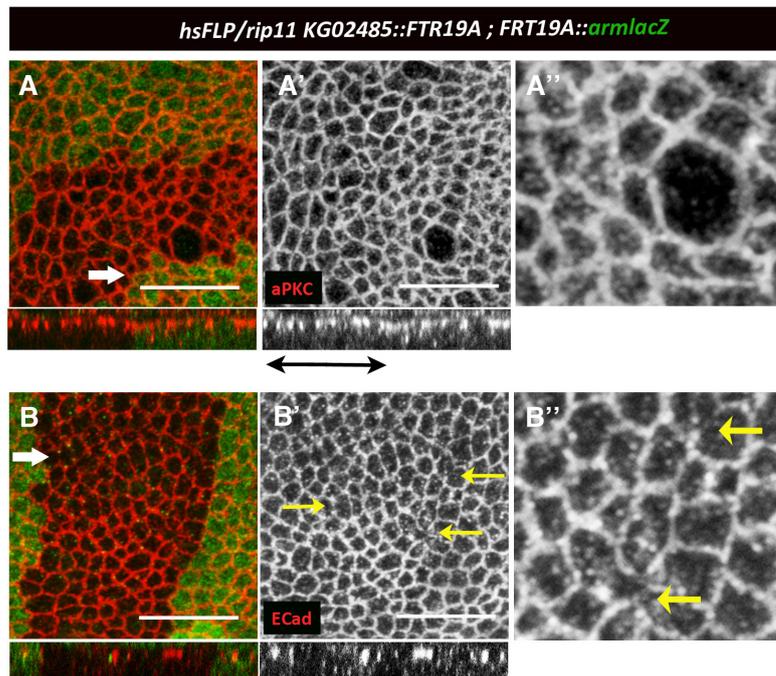


Figura 39. La falta de función de Rip11 no afecta ni a la localización ni a los niveles de aPKC. Clones de *rip11* en discos imaginales de ala. LacZ en verde (A, B) y cuya ausencia marca el clon mutante para Rip11, aPKC (A, A') y Ecad (B, B') en rojo, con imágenes aumentadas de ambas en A'' y B''. Arriba se muestran vistas apicales y abajo planos sagitales de la zona indicada por la flecha blanca. Las flechas negras indican la extensión del clon de Rip11. Las flechas amarillas indican algunas de las zonas de rotura donde no se detecta Ecad en la membrana plasmática. Barra de escala: 10 μ m.

Por el contrario, cuando analicé Ecad en estos mismos clones de *rip11* pude observar roturas en el patrón de tinción de Ecad (figura 39, B-B'', flechas amarillas), lo que podría sugerir que hay un fallo en el transporte de Ecad hacia la zona de las Uniones Adherentes similar a lo que ocurre en la formación de las tráqueas durante la embriogénesis [84].

Por otro lado, generé también clones mutantes por recombinación para Nuf (con dos alelos diferentes, *nuf^f* y *nuf^{KG00314}*) en los que observé una disminución de los niveles de aPKC en la membrana subapical (figura 40, A-A'' y C-C''). Esto podría ser un efecto general por afectar el tráfico de los RE, sin embargo no parece ser el caso ya que ni los niveles ni el patrón de tinción de Ecad se veían afectados (figura 40, B-B'' y D-D''), ni tampoco los de Delta (no mostrado) aunque para ambas proteínas se ha descrito un reciclaje vía Rab11 [75,92].

Debido a la fuerte interacción física entre aPKC y Nuf, así como la existencia de una regulación recíproca entre ambas proteínas, decidí investigar en mayor profundidad dicha interacción, dejando fuera la relación entre aPKC y Rip11.

La acumulación de Nuf en el disco imaginal de ala es específica de aPKC.

Diversos trabajos han demostrado que afectar la función de aPKC produce pérdida de polaridad celular apico-basal en embriones y discos imaginales [36,150,183]. Por tanto, es posible que la acumulación de Nuf que se observa en clones de células mutantes *aPKC^{K06403}* sea debido a un fallo generalizado en la polaridad apico-basal que afecte también al tráfico intracelular a pesar de que la acumulación de Nuf y Rab11 en la región subapical indiquen

RESULTADOS

cierta polaridad en estas células.

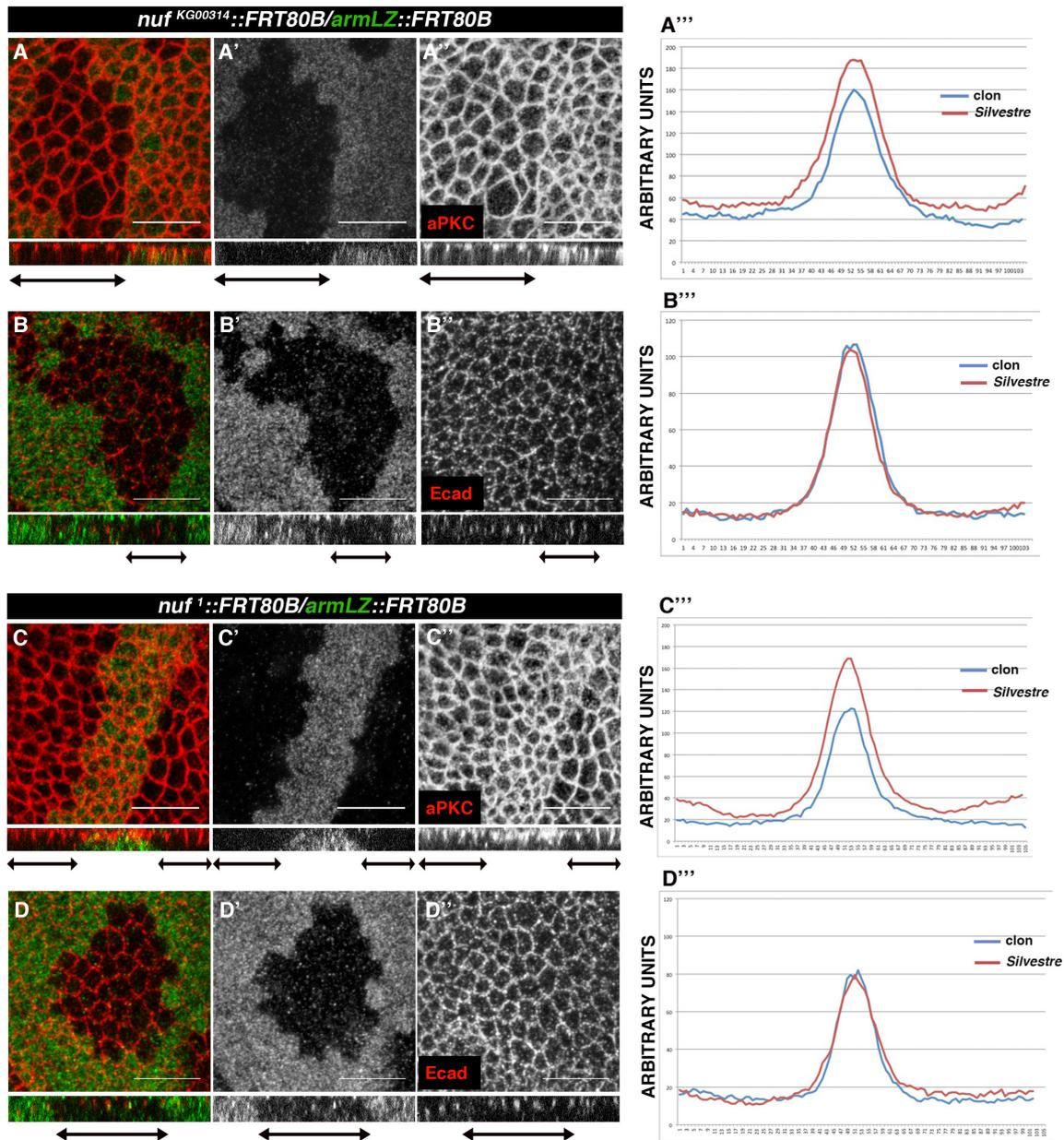


Figura 40. La ausencia de Nuf reduce los niveles de aPKC en la membrana subapical. En clones $nuf^{KG00314}$ (A y B) y nuf^1 (C y D), los niveles de aPKC (rojo, A, A', C y C'') muestran una disminución, mientras que Ecad (rojo, B, B', D, D'') no se ve afectada. Las gráficas muestran la cuantificación de los niveles de fluorescencia de aPKC a lo largo de la membrana celular en unidades arbitrarias comparando las células silvestres (línea roja) con las células del clon (línea azul).

Para comprobar si se mantenía la polaridad en células mutantes $aPKC^{*06403}$ examiné la localización y distribución de diferentes determinantes de polaridad. Para la región de las Uniones Adherentes analicé la distribución de las proteínas Bazooka (Baz/Par-3) y Ecad. Ambas proteínas aparecían localizadas en la misma región que en las células silvestres (Fig.

41, A, A'' y B,B''). Para el caso de la región subapical, analicé la distribución de la proteína Crumbs (Crb). Como se puede observar, aunque la distribución de Crb se veía afectada, apareciendo un punteado en la región subapical, seguía estando localizado parcialmente en la membrana apico-lateral (Fig. 41, C, C''). Por tanto, la polaridad apico-lateral en las células mutantes *aPKC^{k06403}* no estaba fuertemente afectada.

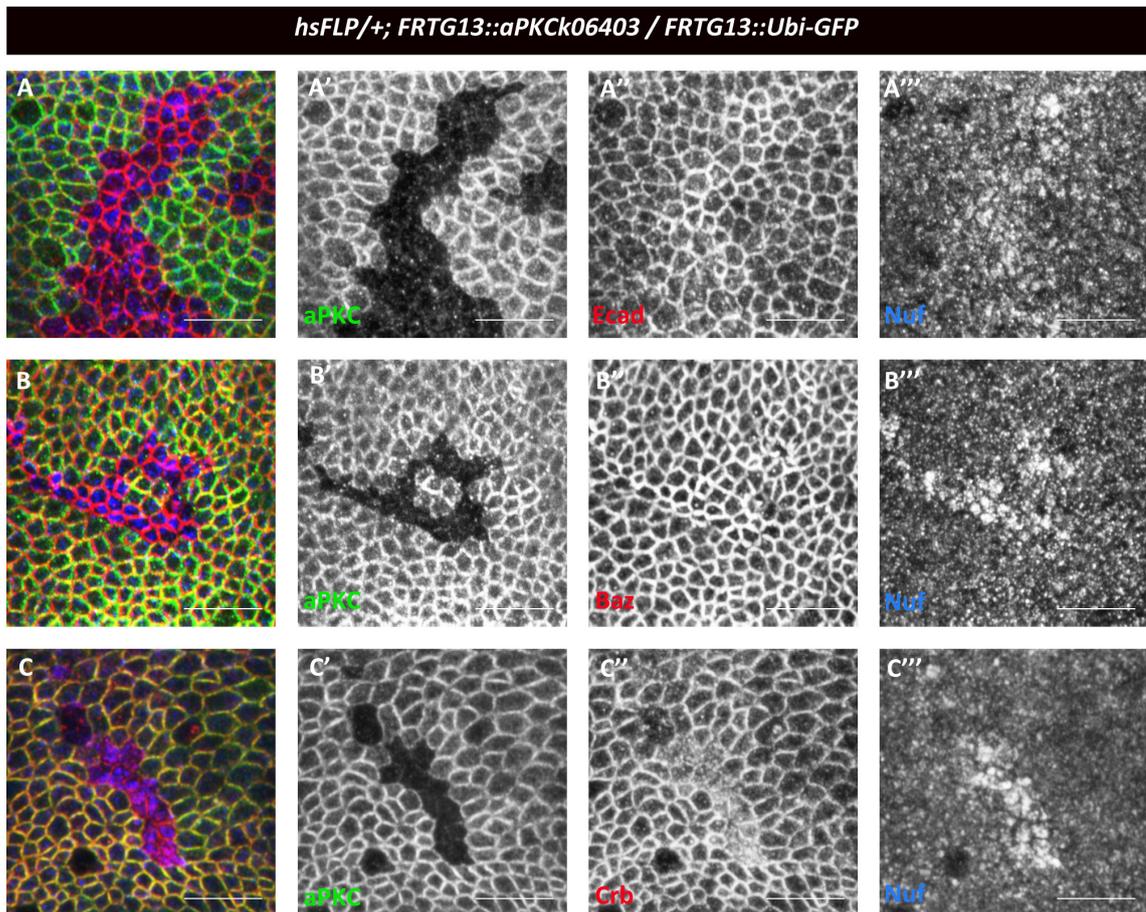


Figura 41. La polaridad celular no está seriamente afectada en clones mutantes para aPKC. Imágenes de confocal con vistas apicales de clones de *aPKC* generados en discos imaginales de ala. *aPKC* se observa en verde (A-C y A'-C'), Nuf en azul (A-C y A'''-C'''), Ecad, Baz y Crb en rojo (A'', B'' y C'' respectivamente). Todos los determinantes de polaridad analizados mantienen su localización en membrana en ausencia de *aPKC*, aunque Crb lo hace solo parcialmente. Barra de escala: 10 μ m.

En los últimos años diferentes trabajos han implicado a *aPKC* junto con Cdc42 y Par6 en la regulación de la endocitosis. El complejo *aPKC/Par6/Cdc42* es capaz de regular la endocitosis de proteínas de polaridad como Crb y Ecad regulando así la dinámica de las Uniones Adherentes [124-126]. Por tanto, cabría la posibilidad de que la acumulación de Nuf observada en los clones mutantes *aPKC^{k06403}* fuese un efecto secundario de afectar la endocitosis y por ello el tráfico de RE. Para examinar esta posibilidad, generé clones de células que sobreexpresaban una versión mutante termosensible de la proteína Dinamina

(Shibire, *shi*, en *Drosophila*), proteína responsable de la escisión de las vesículas formadas en la membrana plasmática durante el proceso de endocitosis (revisado en [184]). De este modo, los mutantes *shi^{ts}* son incapaces de separar las vesículas endocíticas de la membrana plasmática y por tanto la endocitosis queda bloqueada.

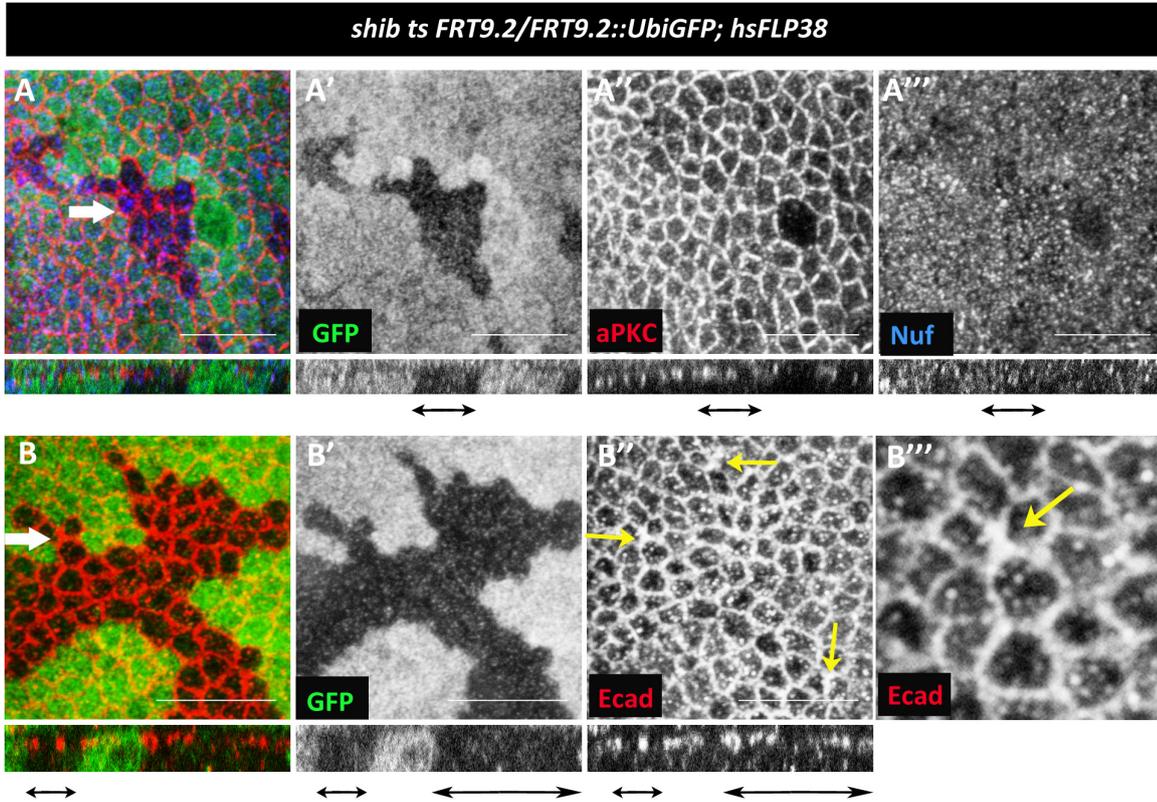


Figura 42. El bloqueo de la endocitosis no afecta a la distribución subcelular de Nuf. Imágenes de confocal de clones *shi* generados en discos de ala y teñidos con aPKC (rojo, A y A''), Nuf (azul, A y A''') y Ecad (rojo, B y B''). En B''' se muestra una imagen aumentada de la tinción. Los clones están marcados con la ausencia de GFP (A-A', B-B'). En el panel superior se muestran vistas apicales y en el inferior, cortes sagitales de la zona indicada por las flechas blancas. Las flechas negras indican la localización del clon y las flechas amarillas muestran los engrosamientos de Ecad en la membrana en la parte del clon *shi*. Barra de escala: 10 μm.

Analiqué la distribución de Nuf en estos clones y no observé acumulación subapical, (Fig. 42, A-A''') lo que indica que el fenotipo de acumulación apical de Nuf es independiente del papel que pueda tener aPKC en la endocitosis. Como control de que en los clones *shi^{ts}* se estaba bloqueando la endocitosis analicé la distribución celular de Ecad, que presenta un fenotipo característico en estos clones *shi^{ts}*: aparecen estructuras ectópicas de Ecad y se produce un engrosamiento de la zona de Ecad en la membrana como consecuencia de la formación de vesículas de Ecad que no se liberan de la membrana plasmática [124] (Fig. 42, B, B'',B''').

Por otro lado, para corroborar la especificidad del fenotipo de acumulación de Nuf generé clones mutantes para los determinantes de polaridad Baz y Crb. En estos clones mutantes la localización de aPKC no estaba seriamente afectada y la distribución de Nuf era similar a las células silvestres, así como la distribución de Rab11 (Fig. 43). Todos estos resultados

indicaban que la acumulación apical de Nuf es consecuencia directa de la ausencia de aPKC.

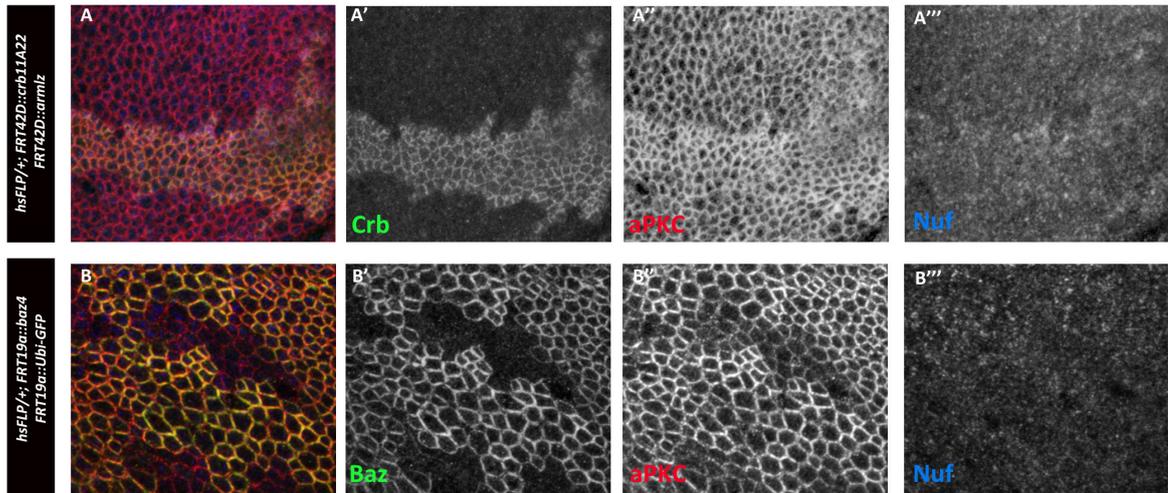


Figura 43. La acumulación de Nuf es específica para clones mutantes de aPKC. Imágenes de confocal con vistas apicales de clones *crb* y *baz* teñidos con Crb y Baz (verde, A-A' y B-B' respectivamente), aPKC (rojo, A, A'', B, B'') y Nuf (azul, A, A'', B, B''). No se observa acumulación apical de Nuf en ausencia de Crb o Baz.

La fosforilación de Nuf por aPKC en la Ser155 evita la localización de Nuf en la membrana subapical.

Con el objetivo de estudiar en mayor profundidad cómo podía afectar la fosforilación por aPKC en la distribución subcelular de Nuf, decidí identificar el/los residuo/s donde se producía dicha fosforilación, para poder analizar posteriormente su efecto en un contexto celular. Para ello realicé un ensayo de fosforilación con la proteína Nuf completa y analicé los fosfopéptidos obtenidos mediante espectrometría de masas. Con esta técnica identifiqué cuatro aminoácidos candidatos de ser fosforilados: S155, T159, S175 y S181 (Fig. 44, A), todos ellos situados en la mitad NH de Nuf. Hay que destacar que en todos los péptidos analizados

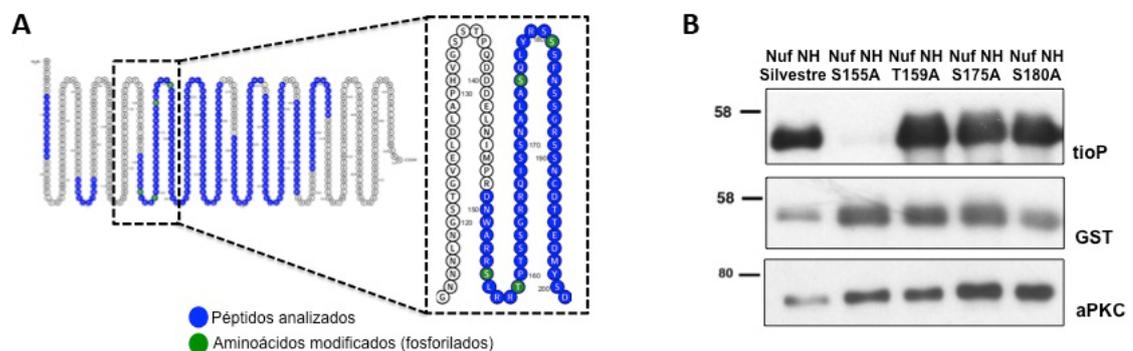


Figura 44. Nuf es fosforilado por aPKC en la Serina 155. A) resultado de la identificación de fosfopéptidos en la fosforilación de Nuf. En azul los péptidos que fueron analizados y en verde los aminoácidos detectados como susceptibles de fosforilación. B) Ensayo de fosforilación con las versiones no fosforilables de los aminoácidos detectados en la identificación. Solo cuando se muta la S155 a alanina se pierde la fosforilación (panel tiofosfato). En todos los ensayos se han realizado controles de carga del sustrato (anti-GST) y de quinasa (anti-aPKC) con la mitad de la muestra del ensayo de fosforilación.

RESULTADOS

que contenían la S155, ésta siempre se encontraba fosforilada, hecho que no ocurría con el resto de candidatos.

Posteriormente, muté separadamente cada uno de los aminoácidos candidatos a Alanina (A) y comprobé que la mutación S155 era la única que evitaba la fosforilación de Nuf, indicando que la fosforilación de aPKC se producía en esta serina (Fig. 44, B).

Una vez identificado el residuo, decidí testar si dicha fosforilación modificaba la interacción entre ambas proteínas. Para ello utilicé la construcción GST de Nuf silvestre y del mutante no fosforilable de (Nuf S155A) y generé una nueva versión fosfomimética mutando la Serina 155 a Aspartato (Nuf S155D). Con dichas proteínas purificadas realicé un ensayo de PD y analicé su unión a aPKC. En la figura 45 muestro como la versión fosfomimética de Nuf (Nuf S155D) era incapaz de co-precipitar aPKC. Esto está en concordancia con que Nuf sea un sustrato de aPKC y pierda la afinidad por la quinasa cuando es fosforilado, tal y como se ha descrito con otros sustratos de aPKC [181,185].

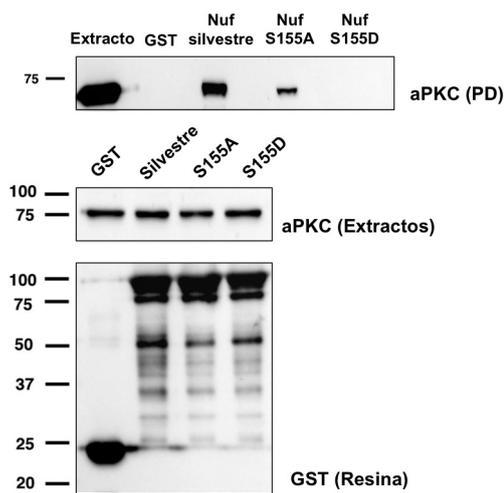


Figura 45. La fosforilación de Nuf por aPKC evita la interacción física entre ambas proteínas. Ensayo de PD con la versión no fosforilable (S155A) y fosfomimética (S155D) de Nuf. Esta última es incapaz de unirse a aPKC. Los paneles inferiores son controles de carga de los extractos iniciales (5% de los extractos, anti-aPKC) y de cantidad de proteína de la resina (10% de la resina, anti-GST).

Con el objetivo de analizar el efecto de la fosforilación de aPKC en la distribución de Nuf en un contexto celular, generé líneas UAS para sobreexpresión en *Drosophila* con la versión silvestre, la no fosforilable (S155A) y la fosfomimética (S155D) de Nuf, todas marcadas con el epítipo myc para poder detectarlas y diferenciarlas de la proteína endógena. Mediante la línea *Hh-G4*, que dirige la expresión en el compartimento posterior del disco de ala, sobreexpresé estas versiones de Nuf y analicé mediante inmunohistoquímica su localización.

Lo que pude observar realizando este experimento es que las tres versiones se acumulaban en la zona subapical de la célula. Sin embargo, una gran parte de Nuf S155A se localizaba próxima a la membrana subapical co-localizando con aPKC (Fig. 46-A, co-localización en blanco) mientras que Nuf S155D evitaba el contacto con dicha membrana (fig. 46-B). Curiosamente, la versión silvestre de Nuf también co-localizaba, aunque en menor proporción

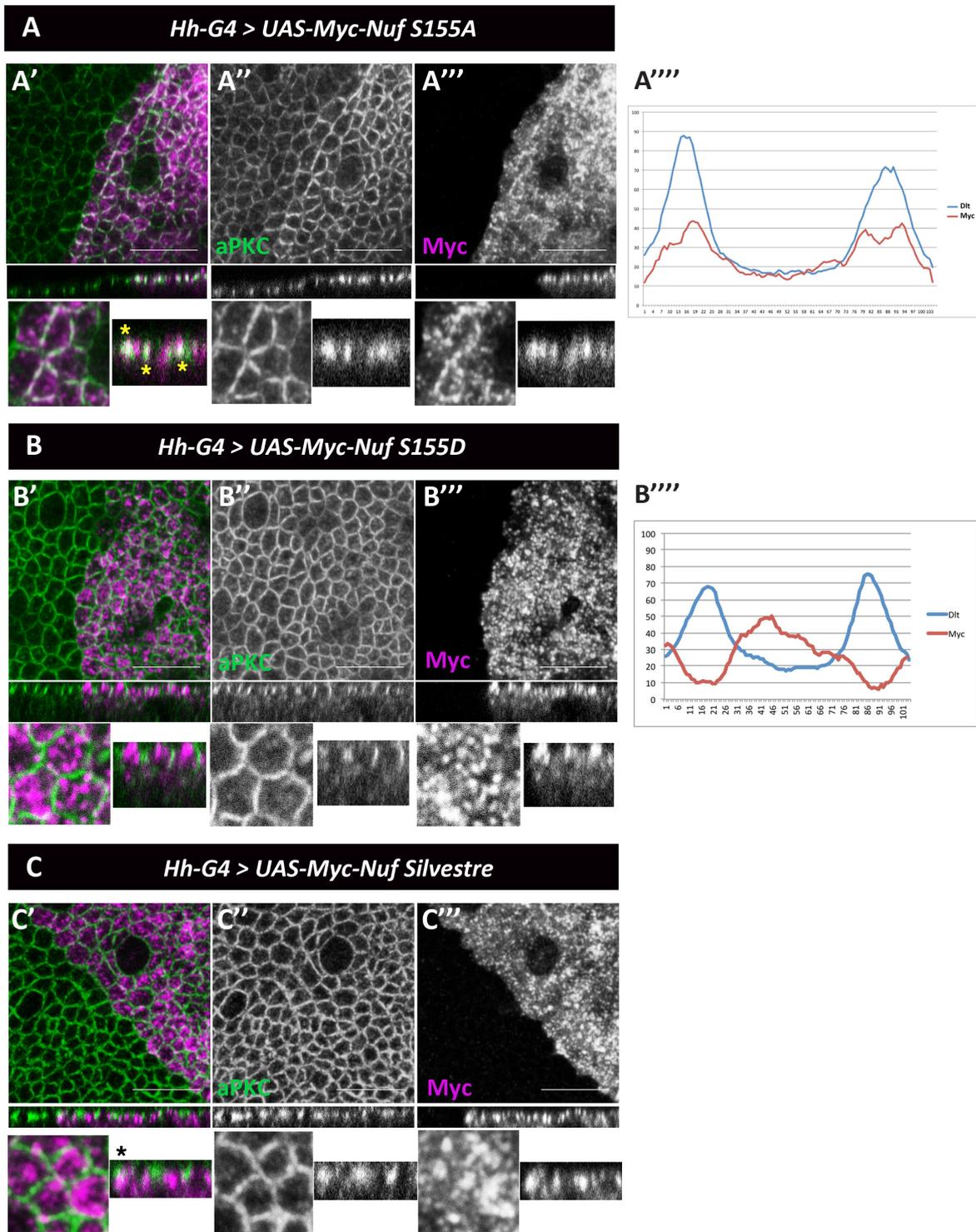


Figura 46. La fosforilación de Nuf por aPKC modifica su localización subcelular. Imágenes de confocal de discos de ala sobreexpresando Myc-Nuf S155A (A), Myc-Nuf S155D (B) y Myc-Nuf silvestre (C) en la parte posterior. En verde se observa aPKC (A'-A'', B'-B'', C', C'') y en magenta Myc (A'-A''', B'-B''', C'-C'''). La colocalización entre ambos se observa en blanco en A', B' y C', y está marcada con los asteriscos. De superior a inferior se muestran vistas apicales, cortes sagitales y ampliaciones de ambas. En las gráficas se muestra la distribución de Myc (rojo) con respecto a Dlt (Patj, azul, marcador de la membrana apical) a lo largo de una célula para Nuf S155A (A''') y Nuf S155D (B'''). Barra de escala: 10 μ m.

que Nuf S155A, con aPKC en la región subapical de la membrana (Fig. 46-C).

Es de destacar que, al analizar la localización de Nuf en clones mutantes para *aPKC*, pude observar que Nuf se localizaba muy próxima a la membrana apical, parcialmente solapando con proteínas localizadas en las Uniones Adherentes como Baz (Fig. 47). Esto indicaba que cuando Nuf se acumulaba en ausencia de aPKC, su comportamiento era similar a la versión no fosforilable de Nuf.

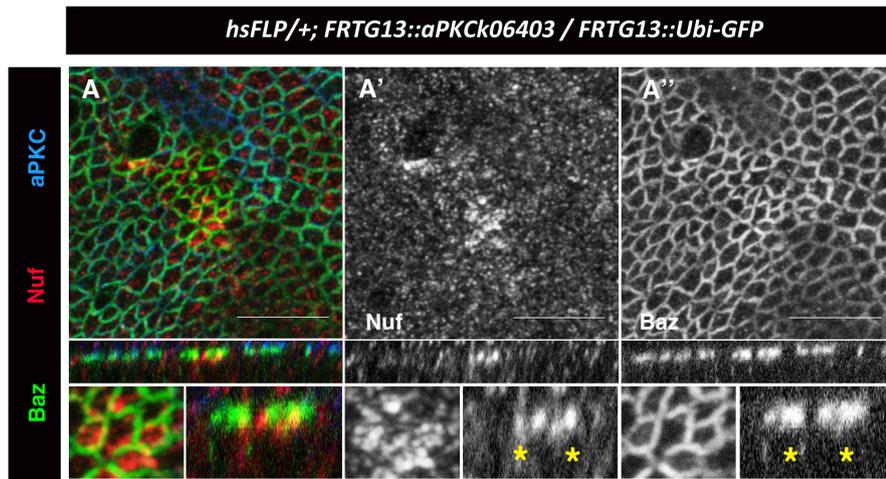


Figura 47. Clones de *aPKC* en discos de ala teñidos con aPKC (azul, A), Nuf (rojo, A, A') y Baz (verde, A''). Los paneles superiores son vistas apicales, los inferiores son planos sagitales y una amplificación de ambas. Los asteriscos muestran la zona de co-localización entre Nuf y Baz (amarillo). Barra de escala: 10 μ m.

Trabajos previos de diversos laboratorios han descrito que para diferentes procesos de polaridad, la fosforilación de ciertas proteínas provoca la unión de éstas a la proteína citoplasmática 14-3-3 (Par5). Cuando esta proteína 14-3-3 se une a otra, mantiene el complejo formado en el citoplasma, secuestrando de esta forma a la otra proteína [26,27,104,186]. Me pregunté si este también era el caso de Nuf. Para resolver esta cuestión realicé un ensayo de PD con las diferentes versiones de Nuf (silvestre, no fosforilable S155A y fosfomimética S155D) las cuales incubé con extracto de embriones silvestres, para ver su unión a la proteína 14-3-3. En la figura 48, se muestra el resultado de este experimento donde se puede observar una banda intensa para Nuf silvestre correspondiente a 14-3-3 y dos bandas tenues para Nuf S155A y Nuf S155D. Para comprobar si la unión de Nuf a 14-3-3 dependía de su estado de fosforilación por aPKC, realicé un PD *in vitro* con Nuf silvestre sin fosforilar y fosforilado por aPKC a los que les añadí proteína 14-3-3 purificada. En este caso, 14-3-3 se une a Nuf en ambas condiciones. Estos datos sugieren que la unión de Nuf a 14-3-3 es independiente de la fosforilación por aPKC.

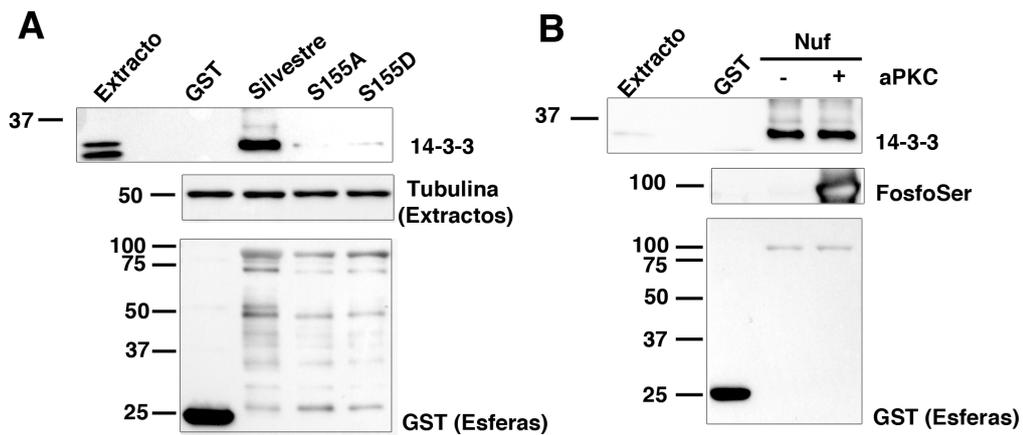


Figura 48: La interacción entre Nuf y 14-3-3 no se ve afectada por la fosforilación de aPKC. A) Ensayo de PD con la versión silvestre, no fosforilable (S155A) y fosfomimética (S155D) de Nuf. Solo para Nuf silvestre se observa una banda intensa para 14-3-3, indicando que existe interacción física. B) PD *in vitro* con Nuf silvestre sin fosforilar y fosforilado incubados con 14-3-3 purificado. Ambas formas de Nuf son capaces de interactuar con 14-3-3. El panel de anti- FosfoSerina indica la fosforilación de Nuf. Los paneles inferiores son controles de carga de los extractos iniciales (5% de los extractos, anti-Tubulina) y de cantidad de proteína de la resina (10% de la resina, anti-GST).

La unión de Nuf con sus principales interactores es independiente de la fosforilación por aPKC.

Los datos anteriores indicaban que la fosforilación de Nuf por aPKC afectaba a la localización subcelular de Nuf, anulaba la interacción física entre ambas proteínas y evitaba la localización de Nuf en la membrana subapical. Un efecto adicional de la fosforilación por aPKC podría ser el cambio de la afinidad de Nuf por sus proteínas asociadas.

Como he mencionado anteriormente, Nuf es uno de los efectores de la GTPasa específica de los RE, Rab11, a la cual se une físicamente [88]. Nuf regula el transporte de los RE gracias a su unión a la proteína motora del citoesqueleto Dineína [86], implicada en el transporte hacia el extremo negativo de los microtúbulos; asimismo, al igual que su homólogo en vertebrados Rab11-FIP3 [82], Nuf podría unirse a la Kinesina y esto completaría su movimiento a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo positivo (Fig. 50, D).

Para analizar si la unión Nuf-Rab11 se ve afectada por la fosforilación de aPKC, he realizado un ensayo de PD *in vitro* en el que he utilizado proteína recombinante GST-Rab11 unida a una resina de glutatión-agarosa. Esta resina la he incubado con proteína recombinante purificada silvestre, S155A y S155D de Nuf para analizar posteriormente su unión. Estas proteínas las he obtenido a partir de las construcciones GST usadas en los ensayos de PD de los apartados anteriores, las cuales he eluído eliminando la GST (ver materiales y métodos para mayor detalle del protocolo). El resultado de este experimento indicó que las tres versiones de Nuf eran capaces de unirse con la misma afinidad a Rab11, demostrando que el estado de fosforilación de Nuf por aPKC no afectaba a dicha unión (Fig. 49, A). Asimismo, cuando

RESULTADOS

sobreexpresé las diferentes versiones de Nuf (silvestre, no fosforilable y fosfomimética) en el disco imaginal de ala, todas ellas eran capaces de reclutar a Rab11 (Fig. 49, B).

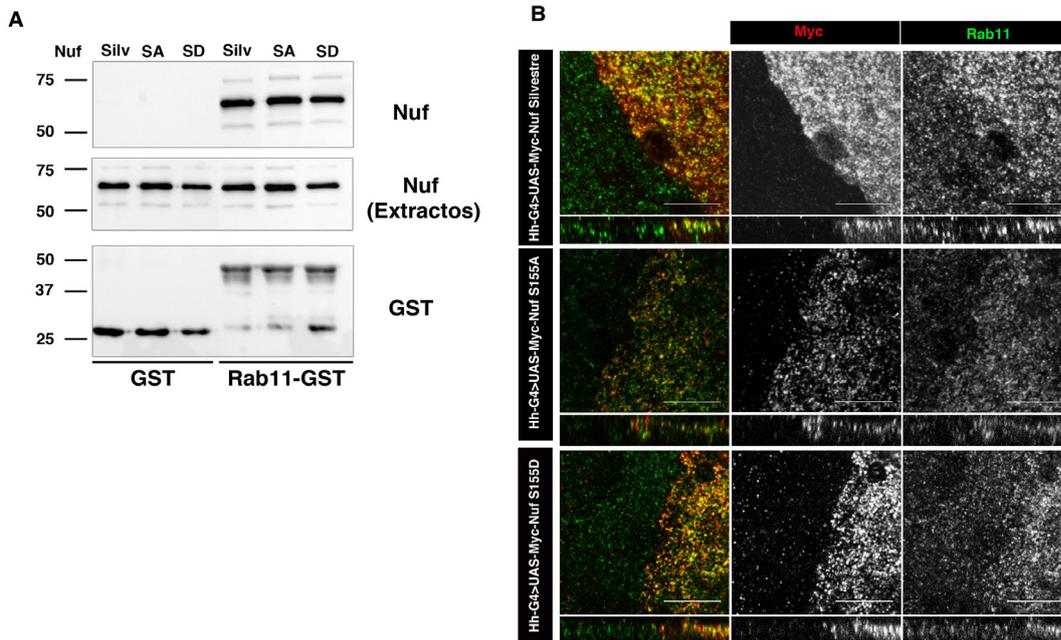


Figura 49. El estado de fosforilación de Nuf no afecta a su unión con Rab11. A) Ensayo de PD *in vitro* con resinas recubiertas de GST y Rab11-GST incubadas con proteína recombinante Nuf Silvestre, S155A y S155D purificadas. El panel superior (anti-Nuf) muestra la cantidad de Nuf que se une a las resinas. Los paneles inferiores son controles de carga de Nuf de los extractos iniciales (anti-Nuf) y de las proteínas GST y Rab11-GST en las resinas (anti-GST). B) Imágenes de confocal con vistas apicales y planos sagitales de discos de ala sobre-expresando Nuf silvestre (panel superior), Nuf S155A (panel central) y Nuf S155D (panel inferior) en la parte posterior con la línea *Hh-G4*. Myc (para detectar las sobre-expresiones de Nuf) aparece en rojo y Rab11 en verde. Barra de escala: 10 μm.

Para las proteínas motoras Dineína y Kinesina, he realizado igualmente ensayos de PD pero en este caso incubando las diferentes versiones de Nuf con extracto de embriones silvestres para posteriormente analizar por *Western Blot* la unión a dichas proteínas. El ensayo demostró que todas las versiones de Nuf eran capaces de co-precipitar con la Kinesina con similar afinidad (Fig. 50, A). Para el caso de la Dineína, no observé co-precipitación con ninguna de las versiones, utilizando distintas aproximaciones (distintos tampones de unión y extractos de distintos estadios de desarrollo según el protocolo descrito en [86], fig. 50, B). Por tanto, como alternativa, decidí realizar un PD analizando la unión a Glued, la subunidad p150 del complejo de la Dinactina. Esta proteína se une a la Dineína directamente y hace de puente entre la Dineína y el cargo [187]. En este caso si había co-precipitación y pude observar una ligera reducción en la unión a Dinactina para Nuf S155A, con respecto a la versión silvestre y S155D de Nuf (Fig. 50, C).

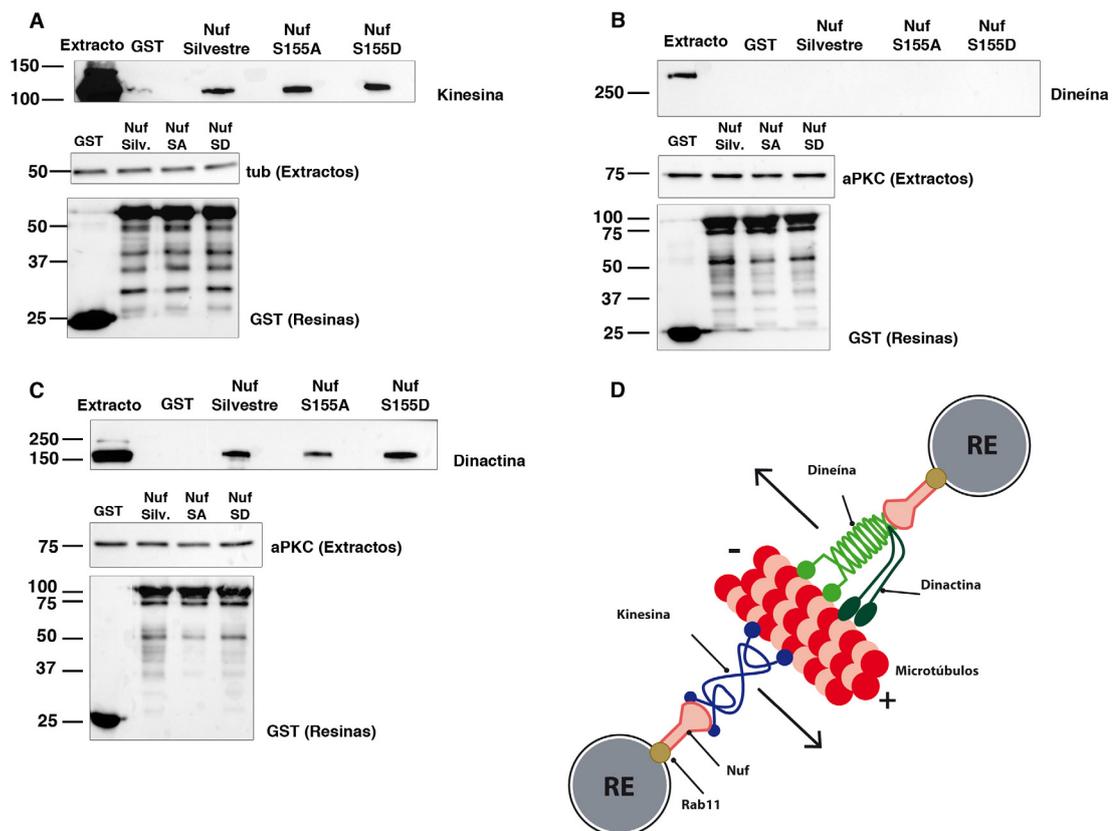


Figura 50. El estado de fosforilación de Nuf no afecta a su unión con la Kinesina y modifica ligeramente su unión a Dinactina. Ensayos de PD con resina unida a proteína GST, Nuf Silvestre, Nuf S155A y Nuf S155D incubadas con extracto de embriones silvestres y analizando la co-precipitación de Kinesina (A), Dineína (B) y Dinactina (C). Los paneles superiores muestran la cantidad de proteína analizada que se une a las diferentes resinas. Kinesina se une con igual afinidad a todas las versiones de Nuf mientras que Dinactina se une con menor afinidad a Nuf S155A. Con Dineína no se observa co-precipitación con ninguna de las versiones de Nuf. En todos los ensayos se ha realizado un control de carga de los extractos iniciales (anti-tub (A) o anti-aPKC (B y C)) y de la cantidad de proteína en las resinas (anti-GST). D) Representación esquemática de las interacciones entre Nuf y los complejos motores de la Dineína, Kinesina y Dinactina en el transporte de RE.

La versión no fosforilable de Nuf aumenta los niveles de aPKC en la membrana apical.

Como ya mencioné anteriormente, la principal función de Nuf es regular el transporte intracelular de Rab11 y por tanto de los RE [88,90]. Sin embargo, hasta ahora solo la proteína Delta (ligando de la vía de Notch) ha sido identificada como un cargo de Nuf, en el sistema nervioso de *Drosophila* [92]. No obstante, Rab11 presenta un papel central en la vía de reciclaje y se han descrito diferentes cargos que son reciclados a través de Rab11 y los RE, como es el caso de las proteínas de polaridad Ecad [69,75], β -Integrina [74] o Crb [122]. Teniendo en cuenta que la fosforilación de Nuf por aPKC no modificaba la unión a sus proteínas asociadas, pero sí que cambiaba la localización subcelular de Nuf, me propuse analizar si aPKC podría estar regulando el tráfico de los RE a través de su interacción con Nuf.

RESULTADOS

Para ello sobreexpresé las líneas Nuf S155A y Nuf S155D en el compartimento posterior del disco de ala y analicé el comportamiento de diferentes cargos de Nuf y Rab11 mediante inmunohistoquímica. De este modo estudié la localización subcelular de Delta, Ecad, β -Integrina y Crb, cargos conocidos de Nuf o Rab11; así como para otros determinantes de polaridad como Baz y aPKC. Además, para evitar que la proteína Nuf endógena pudiera estar enmascarando algún efecto de las versiones mutantes de Nuf, utilicé un fondo mutante heterocigótico *nuf*^f para las sobreexpresiones.

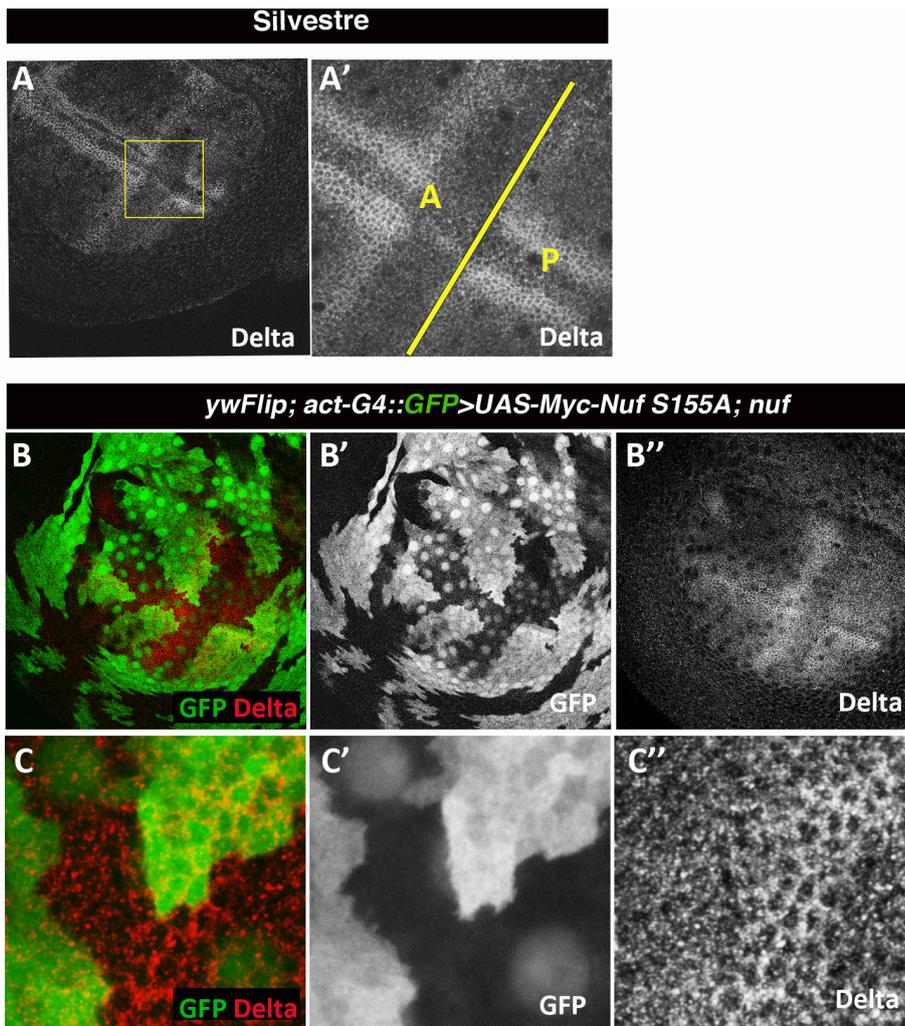


Figura 51. La sobreexpresión de Nuf S155A no afecta a la localización ni a los niveles de Delta. Tinción de Delta en discos silvestres OR (A, A'). En A' se muestra una ampliación de A correspondiente a la zona del recuadro amarillo. La línea amarilla divide los compartimentos anterior (A amarilla) y posterior (P amarilla). Clones de sobreexpresión de Nuf S155A marcados con GFP (verde, B, B', C, C') en disco de ala y teñidos con Delta (rojo, B, B'', C, C''). Las imágenes Cs se corresponden con un mayor aumento.

Para el caso de Delta, el patrón de expresión en el disco de ala dificultaba su estudio debido a que presentaba zonas donde las células tenían mayores niveles de Delta en la membrana. De hecho, la región entre el compartimento posterior y anterior del disco constituía una de las zonas donde se producía este cambio de niveles (Fig. 51, A-A'). Debido a este patrón de Delta, no conseguí llegar a ninguna conclusión utilizando la línea *Hh-G4*. Por ello utilicé otra aproximación generando clones de sobreexpresión de Nuf S155A y Nuf S155D en el disco de ala. En este caso no observé diferencias en la localización o niveles de Delta ni con la versión Nuf S155A (Fig. 51, B-B'') ni con Nuf S155D (datos no mostrados).

El análisis de las proteínas Ecad, Baz y Crb reveló que ninguna de ellas estaba afectada por la expresión de las líneas Nuf S155A y S155D (Fig 52). Todas se encontraban localizadas en los mismo dominios de membrana tanto en la parte posterior como en la anterior del disco. Del mismo modo, los niveles de fluorescencia eran similares en ambos compartimentos, indicando que la cantidad de proteína era similar (Fig 52, derecha).

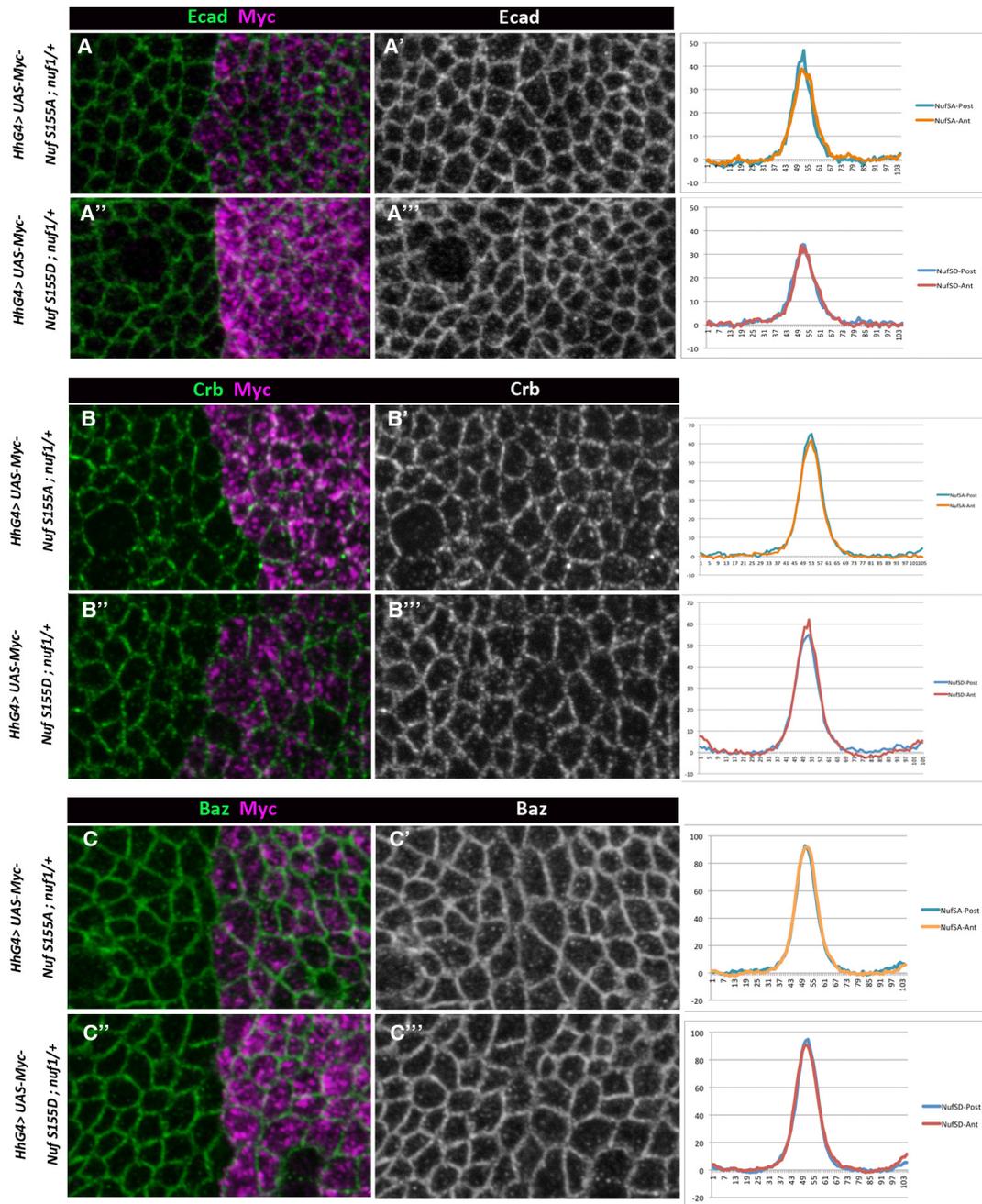


Figura 52. La sobreexpresión de las versiones mutantes de Nuf no afecta al transporte de las proteínas Ecad, Crb y Baz. Imágenes de confocal de sobre-expresiones en fondo mutante *nuf1* de Myc-Nuf S155A (A-A', B-B', C-C') y Myc-Nuf S155D (A''-A'', B''-B'', C''-C'') en la parte posterior del disco imaginal de ala (*Hh-G4*) y teñidos con Myc en violeta y en verde Ecad (A-A''), Crb (B-B'') y Baz (C-C''). A la derecha se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en la membrana para cada una de las proteínas apicales analizadas, comparando la parte posterior (zona de sobre-expresión, línea azul) de la anterior (silvestre, líneas naranja y roja) del disco.

RESULTADOS

Para la β -Integrina, sobreexpresé las versiones mutantes de Nuf en el compartimento posterior utilizando en este caso la línea *engrailed-G4* (*en-G4*). La β -Integrina se localiza mayoritariamente en la membrana basal en células silvestres. En la figura 53 muestro imágenes sagitales de discos de ala donde se observa que la localización de la β -Integrina no se veía afectada por las sobreexpresiones de los mutantes de fosforilación de Nuf.

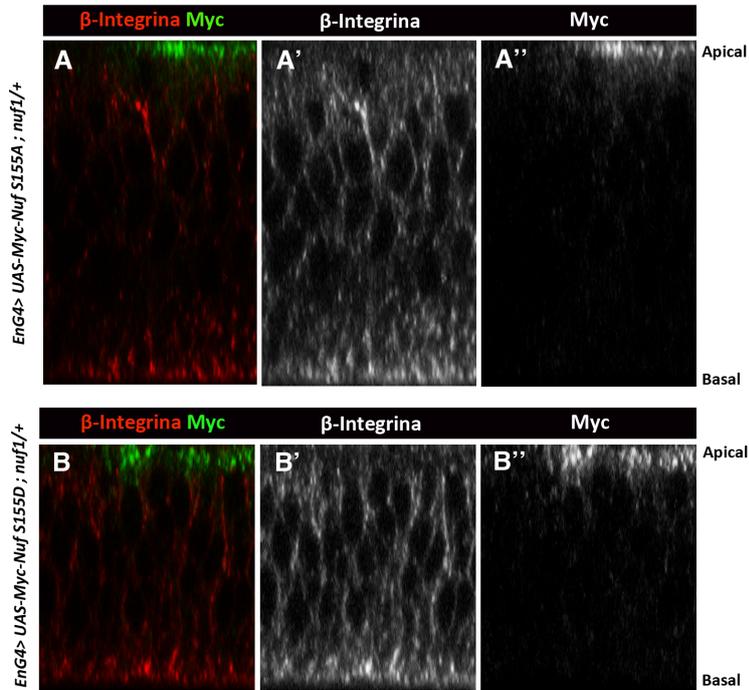


Figura 53. La sobreexpresión de Nuf S155A y Nuf S155D no afecta a la localización subcelular de β -Integrina. Imágenes de confocal de planos sagitales de discos de ala sobreexpresando en fondo mutante *nufl*, *Myc-Nuf S155A* (A-A'') y *Myc-NufS155D* (B-B'') en la parte posterior del disco teñidos con Myc (verde, A, A'', B, B'') y β -Integrina (rojo, A, A', B, B').

Por el contrario, al analizar el comportamiento de aPKC observé que la expresión de Nuf S155A aumentaba los niveles de aPKC en la membrana subapical (Fig. 54, A). Este hecho se ve reflejado al cuantificar la fluorescencia en la membrana de la parte posterior (dominio de expresión de *Hh-G4*) en comparación con la anterior (Fig. 54, C). La versión Nuf S155D sin embargo, no afectaba ni a la localización de aPKC ni a sus niveles en la membrana subapical (Fig. 54, B y C').

Para comprobar si los mayores niveles de aPKC en la membrana se correspondían también con una mayor cantidad de aPKC activa en la membrana, utilicé un anticuerpo contra aPKC autofosforilada que solo detecta aPKC cuando está activa. De este modo pude comprobar que el aumento de aPKC producido por la expresión de Nuf S155A se traducía en un aumento también de aPKC activa en la membrana subapical (Fig. 55).

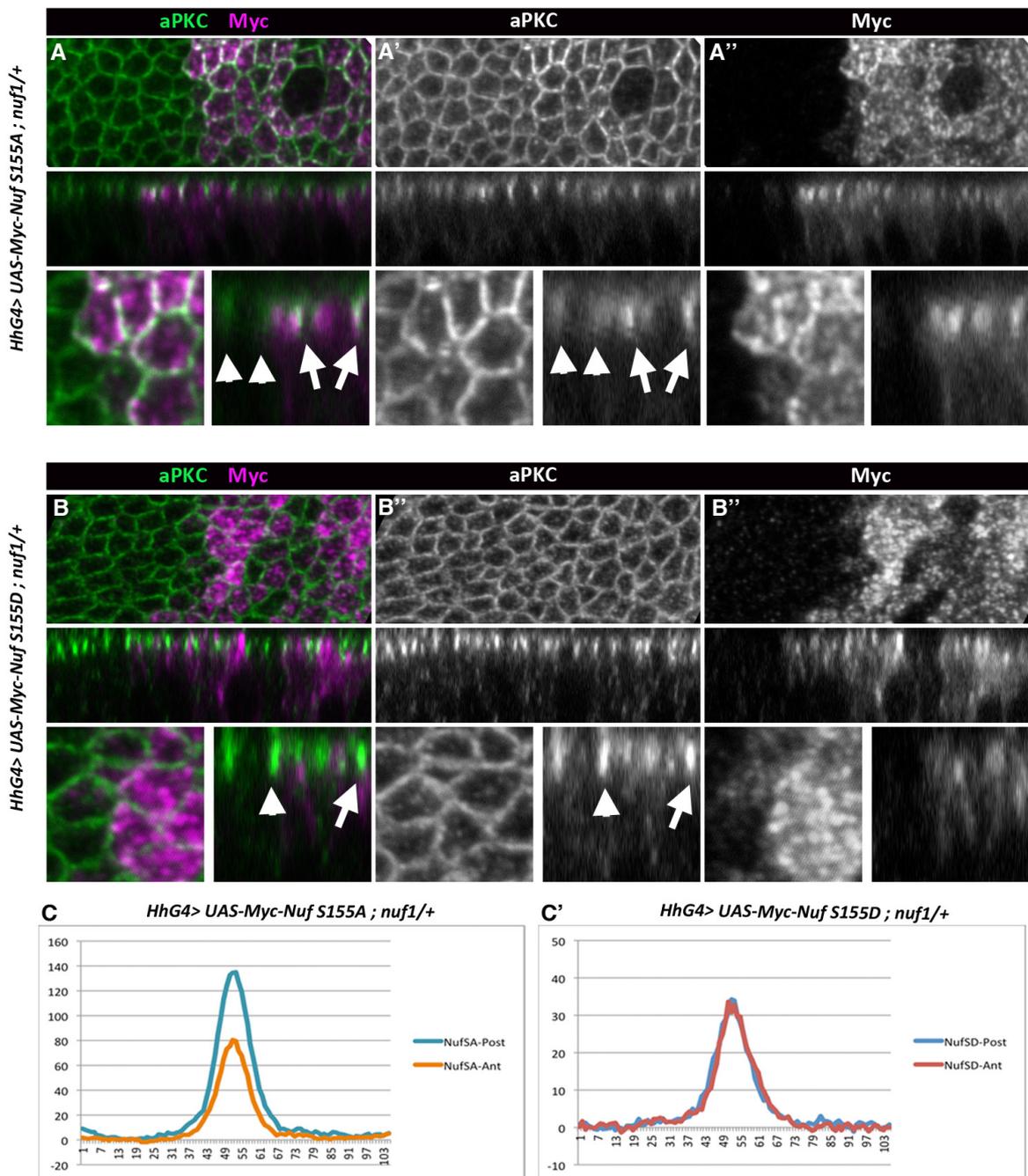


Figura 54. La sobre-expresión de la versión no fosforilable de Nuf aumenta los niveles de aPKC en la membrana subapical. Imágenes de confocal de discos de ala sobre-expresando *Myc-Nuf S155A* (A-A''), *Myc-Nuf S155D* (B-B'') en la parte posterior y en fondo mutante *nuf1*. En verde se observa aPKC y en magenta Myc. De superior a inferior se muestran vistas apicales, cortes sagitales y ampliaciones de ambas. Las flechas y puntas blancas indican aPKC en la parte posterior y anterior respectivamente. En la parte inferior se muestra la cuantificación de los niveles de aPKC para Nuf S155A (C) y Nuf S155D (C') en la parte posterior (línea azul) y en la parte anterior (líneas naranja y roja) del disco. Barra de escala: 10 μ m.

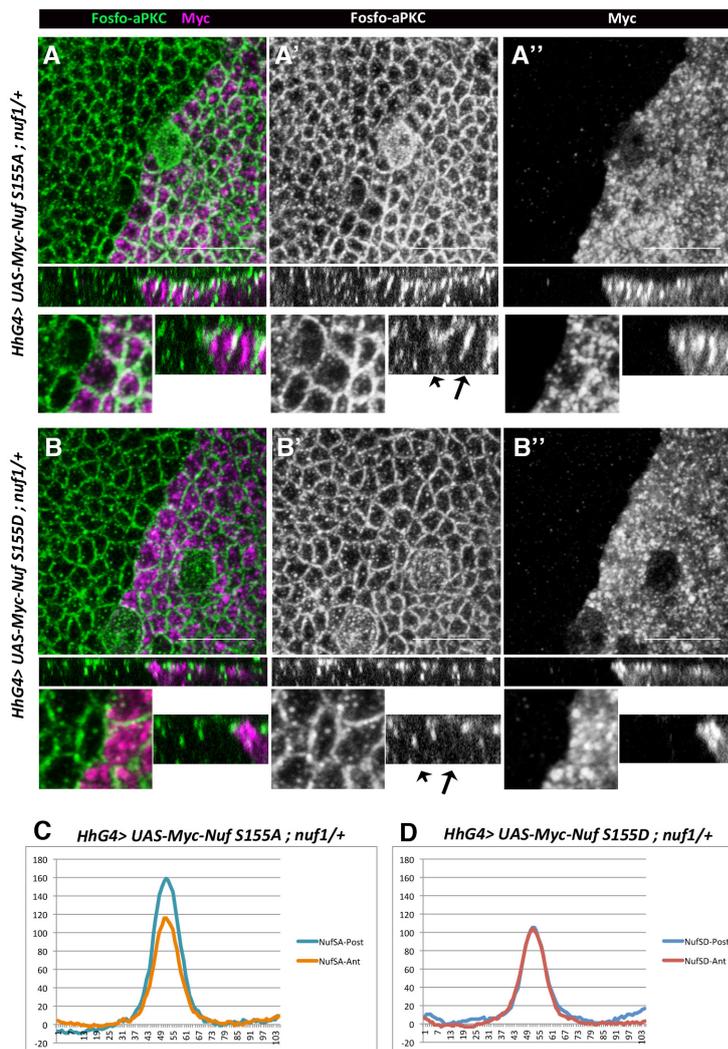


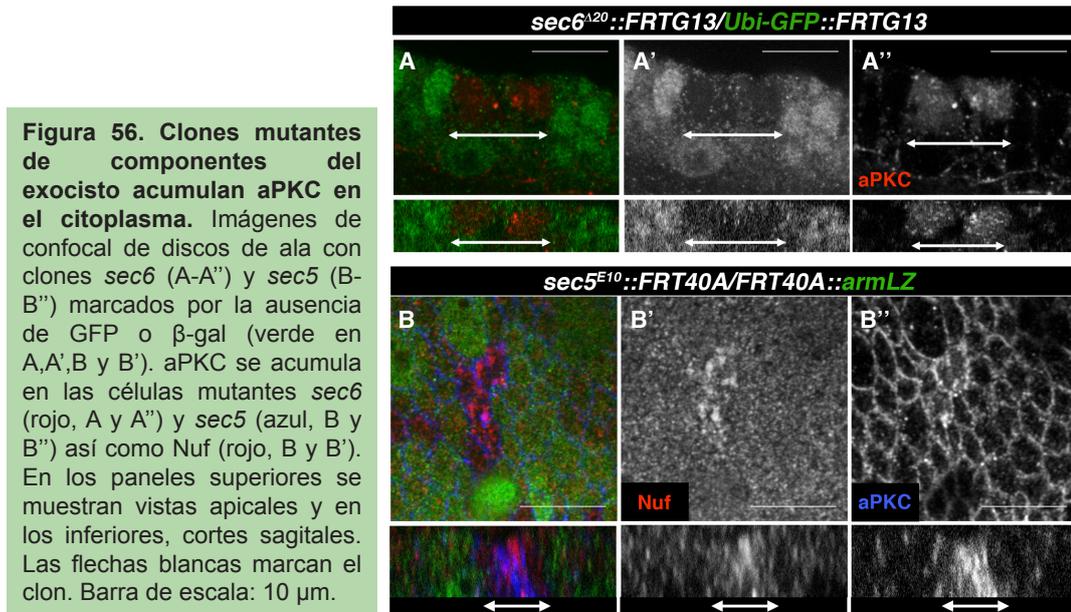
Figura 55. El aumento de los niveles de aPKC provocado por la versión no fosforilable de Nuf conlleva un aumento de aPKC activa. Imágenes de confocal de discos de ala sobre-expresando Myc-Nuf S155A (A-A''), Myc-Nuf S155D (B-B'') en la parte posterior y en fondo mutante *nuf1*. En verde se observa aPKC y en magenta Myc. De superior a inferior se muestran vistas apicales, cortes sagitales y ampliaciones de ambas. Las flechas y puntas negras indican Fosfo-aPKC en la parte posterior y anterior respectivamente. En la parte inferior se muestra la cuantificación de los niveles de Fosfo-aPKC para Nuf S155A (C) y Nuf S155D (D) en la parte posterior (línea azul) y en la parte anterior (líneas naranja y roja) del disco. Barra de escala: 10 μ m.

aPKC es reciclada vía Nuf en el disco imaginal de ala.

Los datos mostrados anteriormente indicaban la posibilidad de que aPKC sufriera un proceso de reciclaje en el disco imaginal de ala. Por un lado, la sobreexpresión de la versión no fosforilable de Nuf provocaba un aumento de los niveles de aPKC en la membrana subapical y por otro lado, clones mutantes de *nuf* mostraban niveles reducidos de aPKC en la membrana subapical. Esto sugiere la existencia de un transporte de aPKC a través de Nuf.

Si este reciclaje existe, las vesículas con aPKC deberían transportarse desde los RE marcados con Rab11 hacia la membrana subapical, donde el complejo del exocisto se encargaría del anclaje de la vesícula a la membrana. Por tanto, una manera de analizar si existe reciclaje de aPKC vía Rab11 en el disco imaginal de ala es afectando a esta ruta y viendo si se acumula intracelularmente aPKC. Para ello, por un lado he generado clones mutantes de dos de los componentes del exocisto, Sec5 y Sec6 para interferir con la exocitosis. Por otro lado, he eliminado la función de Rab11 generando clones de expresión de un RNAi específico para Rab11 en el disco imaginal de ala, de manera que el reciclaje estaría bloqueado.

Los clones mutantes *sec6^{Δ20}*, presentan una baja viabilidad como ya ha sido descrito previamente [188]. Aún así, en las células mutantes *sec6* puede observar un aumento de aPKC en el citoplasma (figura 56, A-A’). De manera similar ocurría con los clones mutantes *sec5^{E10}*, donde también se acumulaba aPKC en el citoplasma de la célula (figura 56, B, B’). En estos clones también puede observar acumulación de Nuf (figura 56, B-B’). Estos datos apoyan la existencia de un reciclaje de aPKC al córtex apical que se ve bloqueado cuando se bloquea la exocitosis.



Asimismo, la sobreexpresión del RNAi de Rab11 provocaba la pérdida de aPKC en las uniones celulares (Figura 57, cabezas de flecha en A’) y además aPKC se acumulaba en el interior de la célula, en una zona basal a la región subapical (Fig. 57, A’). Estos datos apoyan el transporte de aPKC a hacia la membrana subapical vía Rab11-RE.

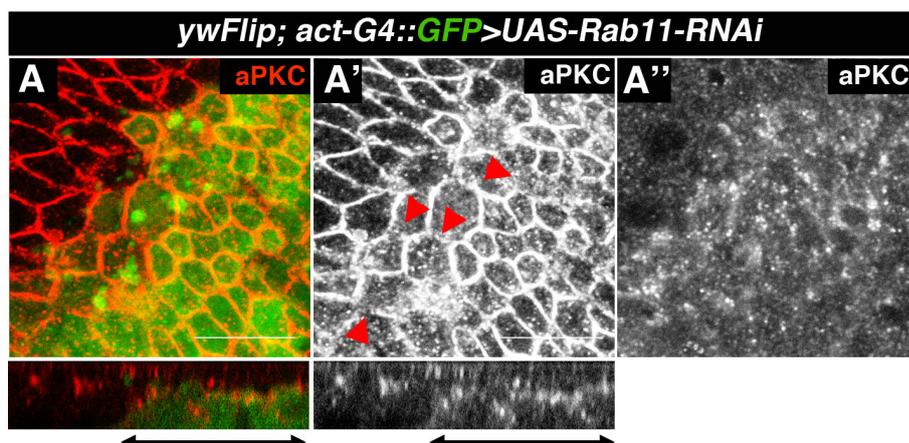


Figura 57. aPKC se pierde de las uniones celulares y se acumula subapicalmente en clones de expresión de Rab11-RNAi. Clones de sobreexpresión de Rab11-RNAi en discos de ala (el clon está marcado con GFP, verde) y teñidos con aPKC (rojo, A-A’). En los paneles superiores se muestra una vista apical del disco (A y A’) así como una vista subapical (A’). Los planes inferiores muestran un corte sagital. Las cabezas de flechas rojas muestran las uniones celulares donde aPKC se pierde. Las flechas negras indican la región del clon. Barra de escala: 10 μm

Por otro lado, al analizar aPKC en clones *shi* pude observar un fenotipo similar al obtenido para la Ecad (ver Fig. 42), con engrosamiento y roturas en el patrón de tinción de aPKC en la membrana (Fig. 58, cabezas de flecha).

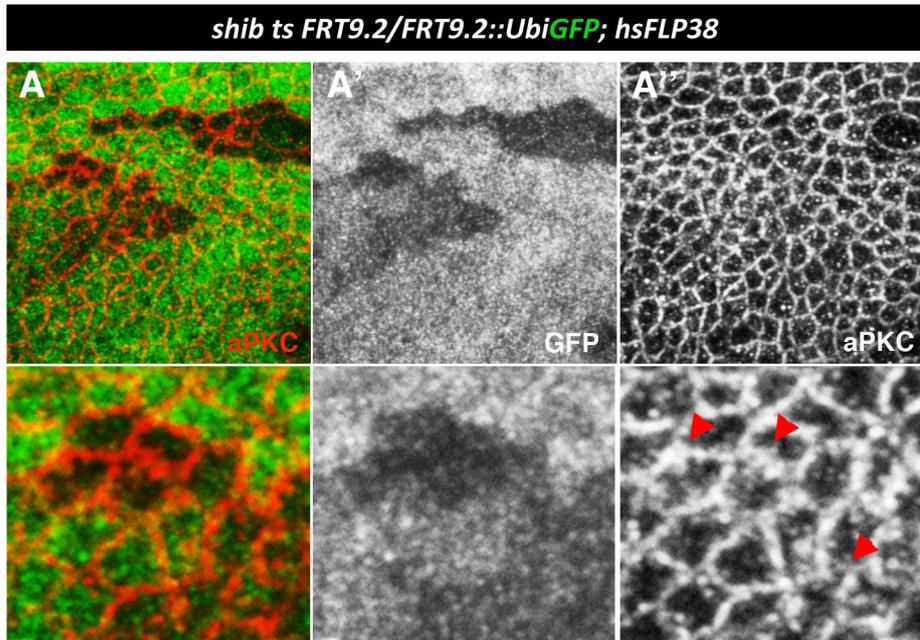


Figura 58. aPKC es endocitada en el disco imaginal de ala. Clones *shi^{ts}* marcados por la ausencia de GFP (verde, A, A') teñidos con aPKC (rojo, A, A''). En el panel inferior se muestra una ampliación de las imágenes del panel superior. En la zona del clon *shi* (no GFP) la endocitosis está bloqueada y aparecen engrosamientos de aPKC en la membrana plasmática así como zonas de rotura de la tinción de aPKC (ambos indicados con cabezas de flecha rojas), sugiriendo la existencia de endocitosis de aPKC.

De acuerdo con esto, en los discos imaginales se pueden ver vesículas de co-expresión de aPKC y la GTPasa Rab5 que marca los endosomas tempranos (Fig. 59). Todos estos resultados indican la existencia de un reciclaje de aPKC, la cual es endocitada y posteriormente transportada hacia la membrana subapical a través de Nuf y Rab11.

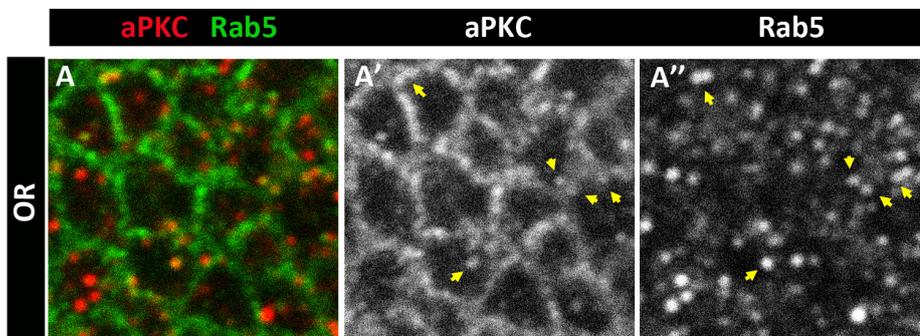


Figura 59. aPKC y Rab5 co-localizan en vesículas. Discos de ala silvestres (OR) teñidos con aPKC (verde, A-A') y Rab5 (rojo, A-A''). Las cabezas de flechas amarillas indican las vesículas que presentan tinción para aPKC y Rab5, indicando co-localización entre ambas proteínas.

4. Conservación Evolutiva de la Interacción aPKC-Nuf.

Estudiar procesos biológicos en *Drosophila* es especialmente útil entre otros aspectos, porque muchos de sus genes están conservados en organismos superiores. Esto hace que gran parte de los resultados y avances que se obtienen en este organismo modelo sean en numerosas ocasiones extrapolables a vertebrados, incluidos humanos. De hecho, la proteína aPKC está altamente conservada entre humanos y *Drosophila* presentando un alto grado de homología. Por su parte, Nuf tiene homólogo en vertebrados, la proteína Rab11-FIP3 (en adelante, FIP3 [177]), la cual contiene un dominio de unión a Rab11 (situado en la parte C-terminal), mientras que la parte N-terminal es más variable entre especies. Me propuse ampliar el estudio a vertebrados y analizar si la interacción aPKC-Nuf descubierta y analizada en esta tesis se ha mantenido durante la evolución.

FIP3 interacciona físicamente con aPKC y es fosforilado por aPKC.

Para comprobar la interacción física entre aPKC y FIP3 realicé un ensayo de PD con GST-FIP3 de humanos (hFIP3) unida a esferas de agarosa las cuales incubé con extracto de la línea celular 293 humana. Con este ensayo he podido determinar que aPKC es capaz de unirse a hFIP3 (Fig. 60). Sin embargo, no sirvió para determinar si existía unión con ambas isoformas de aPKC (PKC ζ y PKC $\lambda/1$) o era específica para una de ellas dado que el anticuerpo detectaba ambas.

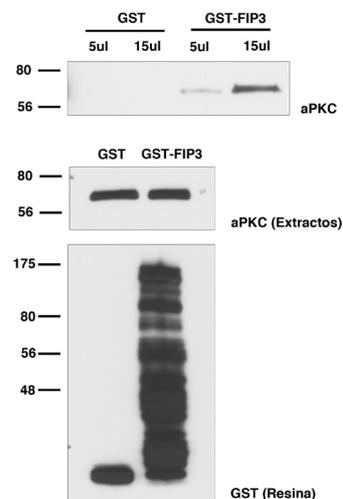


Figura 60. aPKC interacciona físicamente con FIP3. PD incubando GST-FIP3 y GST (control negativo) con extracto de células humanas 293T. El panel de aPKC muestra la co-precipitación de aPKC con FIP3. En el panel anti-aPKC (Extractos) se muestra un 5% del extracto inicial utilizado para cada PD y en el panel anti-GST (Resina) un 10% de las resinas con las proteínas GST utilizadas.

Por otro lado, he analizado la fosforilación de hFIP3 por parte de aPKC. He realizado ensayos de fosforilación con la proteína completa hFIP3 y con las dos isoformas de aPKC presentes en vertebrados. Ambas isoformas fueron capaces de fosforilar a hFIP3 (Fig. 61, B). Para comprobar si la fosforilación se producía en la parte N-terminal de la proteína al igual que ocurre con Nuf, realicé un ensayo de fosforilación con dos versiones truncadas de hFIP3: FIP3 N-terminal, del aminoácido 1 al 246 y FIP3 C-terminal, que incluye del aminoácido 247 al 756 (Fig. 61, A); En la figura 61-C, se observa que ambas partes eran fosforiladas por aPKC (en este caso utilizamos PKC ζ), lo cual sugiere la existencia de más de un sitio de

fosforilación al menos *in vitro*.

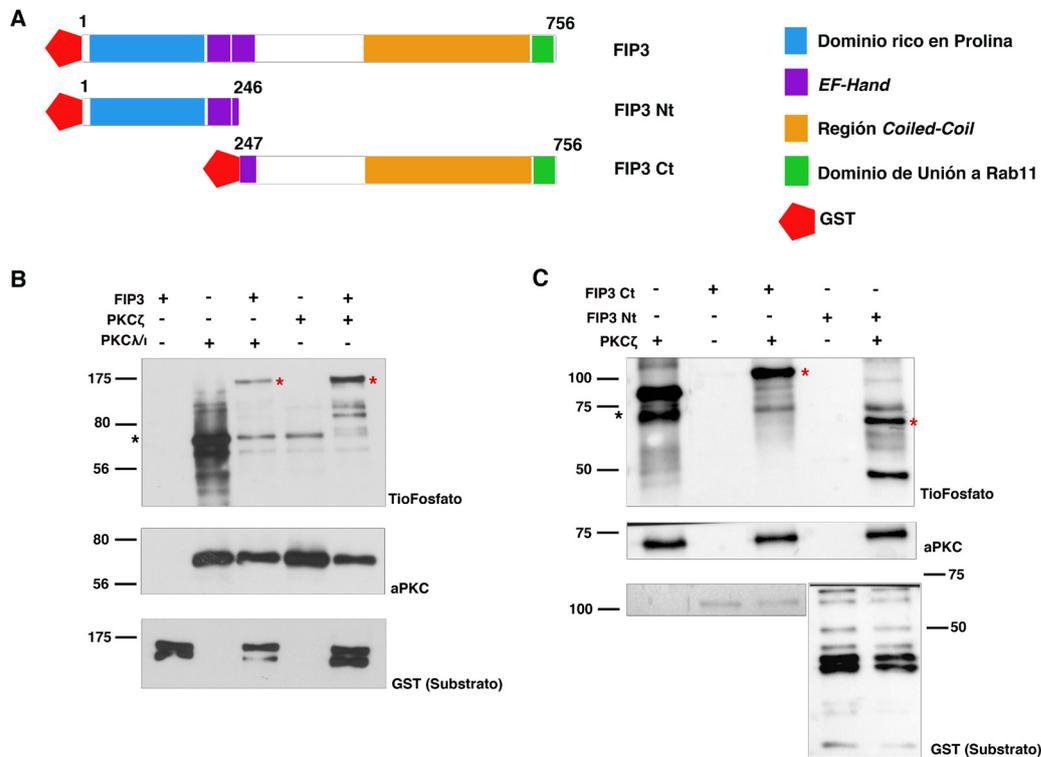


Figura 61. hFIP3 es fosforilado por PKCζ y PKCι. A) Representación esquemática de las diversas construcciones GST utilizadas para los ensayos de fosforilación *in vitro* de FIP3. B) Ensayo de fosforilación de la proteína FIP3 completa con PKCι y PKCζ (las dos isoformas de aPKC en humanos). C) Ensayo de fosforilación de FIP3 Nterminal y FIP3 Cterminal con PKCζ. Los asteriscos negros muestran la altura donde aparece la autofosforilación de aPKC y los asteriscos rojos muestran la altura donde debe aparecer la banda del sustrato si se produce fosforilación. El panel anti-tioFosfato muestra la fosforilación mientras que los paneles anti-aPKC y anti-GST (Substrato) son controles de carga de enzima y sustrato respectivamente.

Estudio de la interacción FIP3-aPKC en células humanas.

Tanto la existencia de interacción física entre aPKC y FIP3 en células humanas como la fosforilación de ésta última por aPKC sugiere que la función de esta interacción está conservada en humanos. Para analizarlo y aprovechando mi estancia en el laboratorio del Dr. Jorge Moscat, utilicé líneas celulares humanas H226 (células epiteliales derivadas de pulmón). A estos cultivos celulares se les eliminó PKCλ/ι mediante RNAi y analicé la distribución de FIP3 comparándolo con células control. Como se puede observar en la figura 62 algunas de las células H226 sin PKCλ/ι mostraban una distribución de FIP3 diferente a las células control observándose zonas de acumulación próximas a la membrana (figura 61, flechas blancas). Este hecho sugiere que aPKC podría estar afectando la distribución de FIP3 en células humanas, al igual que ocurre en el disco imaginal de ala en *Drosophila*. Lamentablemente esta línea de investigación no he podido finalizarla en el laboratorio de Sevilla.

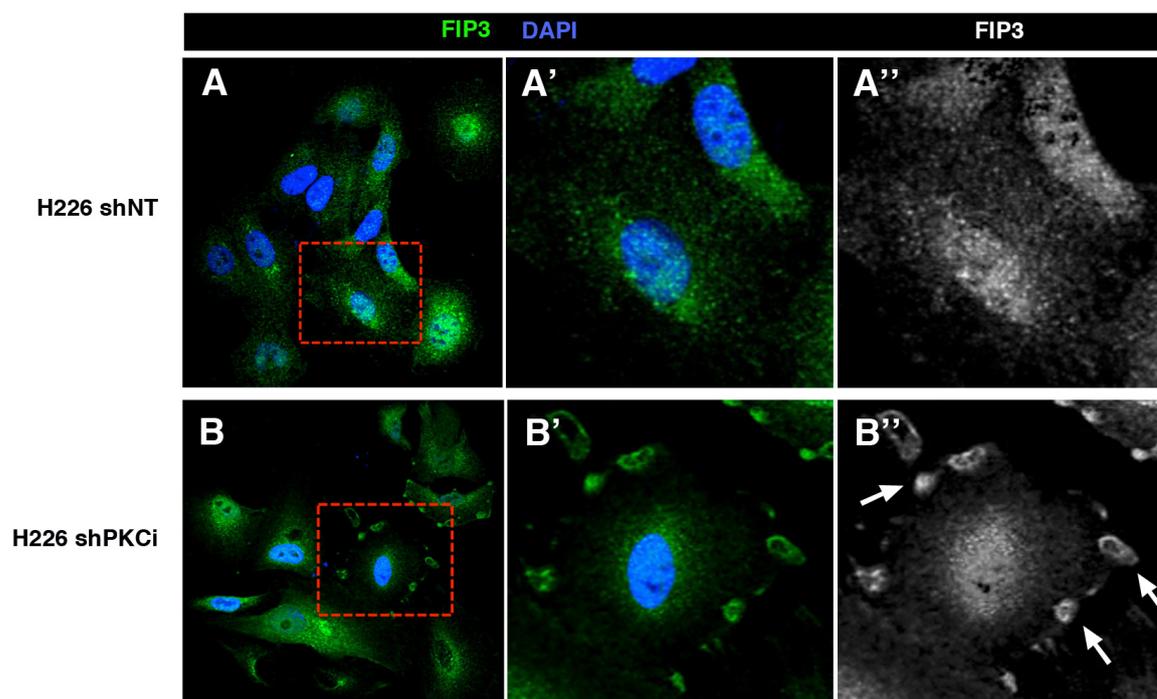


Figura 62. La falta de función de PKCi podría afectar la distribución subcelular de FIP3. Células H226 humanas sin transfectar (control, A-A'') y transfectadas con un ARNi de PKC α 1 (B-B''), teñidas con DAPI en azul para marcar los núcleos (A, A', B, B') y FIP3 en verde (A-B''). Las imágenes A', A'', B', B'' muestran una amplificación de la zona marcada con la línea discontinua roja. Las flechas blancas muestran las zonas de acumulación de FIP3.

DISCUSIÓN

Una de las características más interesantes de aPKC es su promiscuidad a la hora de interactuar con diversas proteínas, lo que posibilita su versatilidad funcional. aPKC tiene un papel central en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular (revisado en [23,24]), tanto en células epiteliales como en otros contextos en los que la regulación de la polaridad es esencial, como por ejemplo la migración [109,110] la división celular [103,104] o la regulación del tráfico intracelular [123,125,128]. La participación de aPKC en cada uno de estos procesos implica su interacción con otras proteínas, bien para regular la función de aPKC a través de su localización o actividad quinasa, o bien para controlar la actividad de sus proteínas sustrato. De este modo, hallar nuevas proteínas que interactúen con aPKC es fundamental para explorar nuevas funciones e implicaciones de esta quinasa.

Este ha sido precisamente el objetivo de esta tesis y para ello he utilizado un sistema de purificación por afinidad con el que he aislado complejos proteicos de aPKC en condiciones nativas. Esto me ha permitido identificar a Nuf como un nuevo sustrato de aPKC. Nuf se encarga del movimiento de los RE a través de los microtúbulos, para lo cual interactúa físicamente con Rab11, Dineína y Kinesina. Por tanto, la interacción aPKC-Nuf establece una conexión directa entre aPKC y el reciclaje intracelular no descrita hasta ahora. En el disco imaginal de ala, aPKC es capaz de fosforilar a Nuf y, de este modo, regular su localización subcelular evitando su unión a la membrana subapical. Por su parte, la falta de Nuf disminuye los niveles de aPKC en la membrana subapical mientras que la versión no fosforilable de Nuf los aumenta. Estos datos apoyan la existencia de un reciclaje de aPKC a través de Nuf y Rab11, corroborado con el aumento de aPKC intracelular cuando se bloquea la exocitosis o la función de Rab11. Este reciclaje está regulado en un ciclo de retroalimentación negativa debido a la fosforilación de Nuf por aPKC, que evita la llegada de más RE y por tanto el reciclaje de aPKC.

1. Purificación por afinidad en condiciones nativas

La mayoría de procesos celulares requiere de interacciones proteína-proteína para la formación y función de complejos proteicos. Este hecho es especialmente importante para las enzimas, cuya interacción con proteínas reguladoras y estructurales es esencial para formar diferentes complejos con funciones dispares. Las técnicas de purificación en condiciones nativas, como la Purificación por Afinidad en Tándem (TAP), junto con las técnicas de identificación por espectrometría de masas, han facilitado el estudio del proteoma de diferentes organismos (revisado en [189]) y han puesto de manifiesto la participación de complejos proteicos en diferentes procesos celulares. Por ejemplo, esta técnica ha sido utilizada para identificar interacciones entre las proteínas Par en mamíferos ayudando a entender mejor el proceso de polarización [190].

En este trabajo he hecho uso de una variación de la técnica TAP para aislar complejos proteicos en los que participara aPKC a partir de embriones de *Drosophila*. He podido comprobar la validez de esta purificación por afinidad al haber aislado proteínas tales como Par6, Lgl y Par1, cuya interacción con aPKC ya estaba descrita, así como Nuf, un nuevo sustrato de aPKC cuya interacción he analizado en esta tesis. Si bien de todos los candidatos seleccionados, solo he podido demostrar interacción y fosforilación con Nuf, la función de muchos de los

candidatos en el tráfico intracelular sugiere la relevancia de aPKC en este proceso. Por ejemplo, se ha descrito la interacción física entre Lgl (substrato de aPKC) y Sintaxina-4 en células MDCK [191] o el reclutamiento por parte de Rab2 de PKC λ/ι y componentes del Complejo del Coatómero, formando parte de las mismas estructuras en el Aparato de Golgi [192]. Estas interacciones que se dan en vertebrados podrían estar ocurriendo también en *Drosophila*, lo cual explicaría co-precipitación de estos candidatos junto a aPKC. Por ello, aunque aPKC sería capaz de formar parte de los mismos complejos, esta interacción no sería directa haciendo el estudio de la relación entre estas proteínas y aPKC más difícil de abordar.

2. aPKC interacciona con Nuf y Rip11, proteínas adaptadoras de Rab11 en *Drosophila*

En *Drosophila* se han descrito dos proteínas homólogas a las Rab11-FIPs (proteínas adaptadoras de Rab11) de vertebrados, Nuf y Rip11. La interacción descubierta entre aPKC y Nuf planteó la posibilidad de si aPKC podría estar regulando el tráfico de Rab11 y los RE de manera general o si por el contrario lo hacía de manera específica para Nuf. Mediante diferentes ensayos de afinidad proteína-proteína, he confirmado la interacción física entre aPKC y ambas moléculas adaptadoras, siendo estas interacciones directas. Además, aPKC es capaz de fosforilar tanto a Nuf como a Rip11, ambas en la parte N-terminal (aunque no he podido comprobar si para Rip11 lo hace también en la parte C-terminal). No obstante, los resultados muestran que tanto la interacción como la fosforilación aPKC-Nuf son considerablemente más fuertes que las producidas entre aPKC y Rip11. La falta de función de aPKC en el disco imaginal de ala produce acumulación tanto de Nuf como de Rip11 en la región subapical, aunque no todas las células *aPKC* mutantes acumulan Rip11. Todos estos datos apuntan a un menor grado de dependencia de aPKC en la regulación de Rip11. Sería interesante analizar si la fosforilación de Rip11 por aPKC tiene un efecto *in vivo*.

Por otro lado, tanto Nuf, como aPKC y Rip11 participan en el proceso de celularización en *Drosophila*. La función de Nuf en el transporte de vesículas durante este proceso estaba descrita previamente, así como el fenotipo de núcleos caídos producido por su falta de función [139]. En este trabajo he demostrado que tanto aPKC como Rip11 producen un fenotipo similar al mutante *nuf*, hecho que no había sido descrito previamente. No obstante, un gran porcentaje de embriones mutantes *rip11* presentaban fenotipo silvestre, que junto con el hecho de que el mutante *nuf* sea viable en homocigosis, abre la posibilidad a que Nuf y Rip11 actúen de manera redundante en este y otros procesos. Si la función de Nuf y Rip11 en la celularización estuviera regulada exclusivamente por aPKC, el fenotipo más fuerte sería el de los embriones mutantes *aPKC*, sin embargo, éste no parece ser el caso. El fenotipo de núcleos caídos más fuerte se obtiene con el mutante *nuf*, lo cual indica que Nuf tiene algún papel durante la celularización que es independiente de aPKC.

3. aPKC regula la localización subcelular de Nuf a través de su fosforilación

aPKC es una quinasa pleiotrópica que fosforila diferentes sustratos en diversos procesos celulares. En numerosos casos, la fosforilación de aPKC modifica la localización subcelular del sustrato excluyéndolo del dominio en el que aPKC se encuentra. Algunos ejemplos son las proteínas de polaridad basolateral Par1 y Lgl, cuya actividad en ese dominio durante el establecimiento de la polaridad viene restringida por su fosforilación por aPKC [40-42], la proteína Pins, cuya fosforilación por aPKC evita el anclaje de los microtúbulos astrales en el dominio de aPKC, facilitando la formación del huso mitótico en el lugar adecuado [104] o las proteínas Miranda y Numb, que son fosforiladas por aPKC en la división asimétrica de neuroblastos [102,103] quedando restringidas a la célula hija basal que de este modo seguirá una vía de diferenciación distinta de la apical. Por otro lado, Nuf ha sido descrita como una proteína hiperfosforilable cuya localización subcelular varía a lo largo del ciclo celular así como en diferentes procesos [86,90,91]. En el trabajo de Otani et al. muestran como la fosforilación de Nuf por la quinasa IKKε controla la localización de Nuf y el transporte de los RE durante el crecimiento de las quetas de *Drosophila* [90].

Los resultados de esta tesis muestran un mecanismo de interacción entre aPKC y Nuf que apoya los trabajos descritos previamente. La fosforilación de Nuf por aPKC en la Ser 155 elimina la interacción física entre ambas proteínas ya que la versión fosfomimética de Nuf (Nuf S155D) es incapaz de co-precipitar con aPKC en ensayos de PD. Además, en condiciones silvestres, no he podido observar co-localización de aPKC y Nuf ni en disco de ala ni en el embrión de *Drosophila*. Además, en el disco imaginal de ojo donde estas proteínas tienen un patrón muy definido se puede ver que la localización de Nuf es opuesta a la de aPKC (Fig. 63). Estos datos indican que aPKC y Nuf no pueden localizarse en el mismo dominio, produciéndose probablemente una interacción rápida quinasa-sustrato. Los resultados obtenidos con las sobreexpresiones de las versiones silvestre, no fosforilable (Nuf S155A) y fosfomimética (Nuf S155D) de Nuf apoyan también este hecho. Nuf S155D localiza en el córtex subapical evitando el contacto con la membrana plasmática donde se encuentra aPKC. Por el contrario, Nuf S155A localiza ampliamente en la membrana subapical junto con aPKC al no poder ser fosforilada y por tanto excluida de este dominio.

En discos imaginales de ala silvestres, Nuf se observa como un punteado uniformemente distribuido por la célula. Sin embargo, todas las versiones de Nuf sobreexpresadas localizan en la región apical de la célula, lo que sugiere la existencia de un transporte activo de Nuf hacia la parte apical, junto con Rab11 y los RE, detectado en este caso en las sobreexpresiones debido a la mayor cantidad de Nuf presente en la célula. Este transporte estaría regulado en último término por aPKC, que evitaría la unión de Nuf a la membrana plasmática, estableciendo un nuevo mecanismo para controlar la distribución subcelular de Nuf en el disco imaginal. No obstante, la interacción aPKC-Nuf fue detectada en embriones (en la purificación por afinidad), por lo que es probable que aPKC también regule la función de Nuf en otros contextos celulares y no solo en el disco imaginal. De hecho, en la división asimétrica de las células SOP en *Drosophila*, solo una de las células hijas acumula Nuf en los centrosomas y coincide con la célula que carece de aPKC. Por tanto, durante la neurogénesis

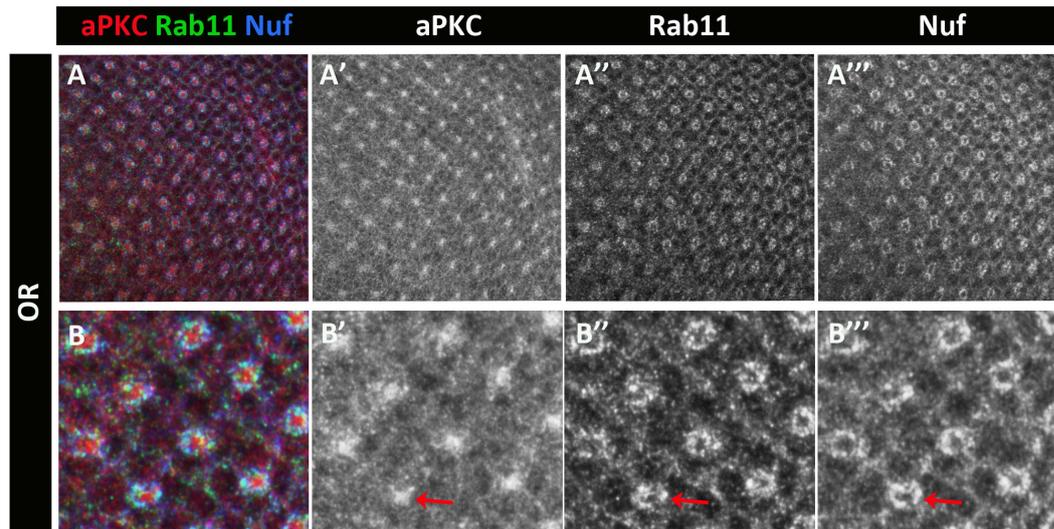


Figura 63. Nuf y aPKC tienen un patrón de localización opuesto en el disco imaginal de ala. Discos imaginales silvestres de ojo (A) teñidos para aPKC (rojo, A'), Rab11 (verde, A'') y Nuf (azul, A'''). El panel inferior muestra una ampliación de la imagen superior (imágenes B). El patrón de localización entre Rab11 y Nuf en los fotorreceptores es similar, formando una circunferencia donde co-localizan ampliamente. Las flechas rojas indican zona donde se observa como aPKC tiene un patrón opuesto a Nuf y Rab11, localizando en la región interior de la circunferencia marcada por ambas proteínas.

embrionaria también podría funcionar un mecanismo en el cual aPKC regule la división asimétrica de las células SOP mediante la fosforilación y posterior exclusión de Nuf, que podría actuar en conjunto al descrito para la exclusión de Numb [103].

En algunos casos en los que aPKC excluye a otras proteínas de su dominio, la participación de la proteína 14-3-3 (Par5) es fundamental. Por ejemplo, la fosforilación de Par1 por aPKC aumenta la afinidad entre Par1 y 14-3-3, secuestrando a la proteína en el citoplasma e impidiendo su unión a la membrana plasmática allí donde aPKC está activa [27]. En esta tesis he demostrado que aunque Nuf se une a 14-3-3, esta unión no se ve afectada por la fosforilación de aPKC. De este modo la diferencia en la localización subcelular entre Nuf S155A y Nuf S155D debe ser independiente de la unión a 14-3-3. Es posible que la localización en la membrana subapical de Nuf S155A se deba simplemente a su unión con aPKC y a que no puede ser fosforilada y por tanto excluida de este dominio. También podría ser que la fosforilación por aPKC afectara a la unión de Nuf con alguna otra proteína que regulase su localización en la membrana, como podría ser algún componente del complejo del exocisto. Analizar si Nuf se une al exocisto y si esta unión se ve afectada por la fosforilación de aPKC así como el comportamiento de las versiones mutantes de Nuf en un fondo mutante para aPKC, ayudaría a esclarecer este aspecto.

4. Nuf/Rip11 o cómo diferenciar el transporte apical del lateral

Rab11 constituye una pieza clave en el transporte intracelular siendo fundamental para la función de los RE. Los RE reciben cargos desde diferentes rutas de tráfico y son esenciales

para el reciclaje, distribuyendo proteínas de un lugar a otro de la célula. La principal función de Nuf es la de controlar el tráfico de los RE a través de su unión a Rab11, Dineína y Kinesina. Los mecanismos por los cuales se regulan estas uniones se desconocen actualmente. Descifrar estos mecanismos sería fundamental para entender el proceso de reciclaje. En este trabajo he demostrado que la fosforilación de Nuf por aPKC no modifica su interacción con Rab11 ni con la Kinesina y afecta de manera débil a la unión con el complejo de la Dineína, por lo que aPKC no actúa a este nivel en el transporte de los RE. Sin embargo, la fosforilación de Nuf afecta a su localización subcelular y por tanto aPKC podría estar afectando de esta manera al transporte de RE. Por ello he analizado diferentes cargos conocidos de Rab11, como Ecad, β -Integrina o Crb; el único cargo descrito para Nuf, Delta; así como otros determinantes de polaridad como Baz y la propia aPKC. Ni los niveles ni la distribución de Ecad, β -Integrina, Crb, Delta o Baz se ven afectados por la sobreexpresión de Nuf S155A o Nuf S155D, sugiriendo que no existe un reciclaje de estas proteínas mediado por Nuf. Por el contrario, los niveles de aPKC aumentan al sobreexpresar Nuf S155A, versión que al no poder ser fosforilada por aPKC, es capaz de localizarse en la membrana subapical. Esto sugiere la existencia un transporte activo de aPKC hacia la membrana mediado por Nuf.

Pero, ¿Por qué el estado de fosforilación de Nuf no afecta a los demás cargos? Para responder a esta pregunta se pueden formular diferentes hipótesis. Delta ha sido establecido como cargo de Rab11 y Nuf en las células SOP. Durante la división asimétrica de estas células, existe un reciclaje de Delta en una de las células hijas a través de Rab11 y los RE que se generan gracias a la presencia de Nuf en dicha célula. Este reciclaje se produce en la célula anterior que no contiene aPKC. Esto indica que una vez separadas aPKC y Nuf en células diferentes, no se necesitaría aPKC para el reciclaje de Delta. Por tanto, puede que exista un mecanismo que regule el movimiento de estos RE independiente de aPKC y que podría ocurrir también en el disco imaginal.

Por otro lado, la β -Integrina debe ser transportada a la región basal de la célula. Teniendo en cuenta que el transporte de los RE hacia la zona apical debe diferenciarse del transporte hacia la región basolateral, una posibilidad sería que Nuf actuase en el transporte apical sin afectar a proteínas basolaterales. Esto explicaría el efecto de Nuf sobre los niveles de aPKC, al ser ésta una proteína apical. En el caso de Crb por el contrario, la falta de fenotipo en los niveles indicaría que su reciclaje es independiente de Nuf y/o Rab11. Aunque Crb es reciclado vía Rab11 en la formación de nueva membrana apical [122], en tejidos adultos lo hace a través del retrómero [193], una vía de reciclaje distinta desde los endosomas tempranos hacia el TGN o la membrana plasmática.

En cuanto a las Uniones Adherentes, he analizado dos de las proteínas implicadas en su formación y mantenimiento, Par3/Baz y Ecad. En células MDCK se ha descrito un transporte de Par3 a través de Rab11 en la formación de membrana apical [129]. Sin embargo, en un tejido establecido no se ha descrito este tipo de reciclaje. Los resultados de este trabajo muestran que Baz tampoco se ve afectado por las versiones mutantes de Nuf, por lo que o bien Baz es muy estable en la membrana y tiene una baja tasa de reciclaje, o lo hace a través de otro mecanismo.

En el caso de Ecad, en vertebrados se ha demostrado que se recicla vía Rab11 [75]. En *Drosophila*, el complejo Cdc42/aPKC/Par6 está implicado en el reciclaje de Ecad a nivel de la endocitosis, mientras que la entrega de Ecad a la membrana parece no verse afectada por la falta de función de este complejo. Mi trabajo muestra que Ecad tampoco se ve afectada por las versiones mutantes de Nuf, pero si por una falta de función de *rip11*; clones *rip11* muestran zonas de la membrana en las que Ecad se pierde, apuntando a un posible fallo en el transporte de esta proteína vía Rip11, de forma similar a lo que ocurre en embriones [84]. Estos datos conducen a la hipótesis de la existencia de dos vías de transporte de RE diferentes. Esto ya se ha postulado en el campo del tráfico celular en vertebrados, donde las proteínas Rab11-FIP especifican diferentes subdominios tanto espacial como temporalmente dentro de la maquinaria de reciclaje. Este hecho se observa por ejemplo en el caso del reciclaje de la Transferrina en células humanas, la cual co-localiza con diferentes Rab11-FIP en compartimentos diferentes a lo largo del tiempo. De este modo estas proteínas adaptadoras de Rab11 participan en diferentes etapas del proceso de reciclaje proporcionando rutas alternativas para diferentes cargos [194].

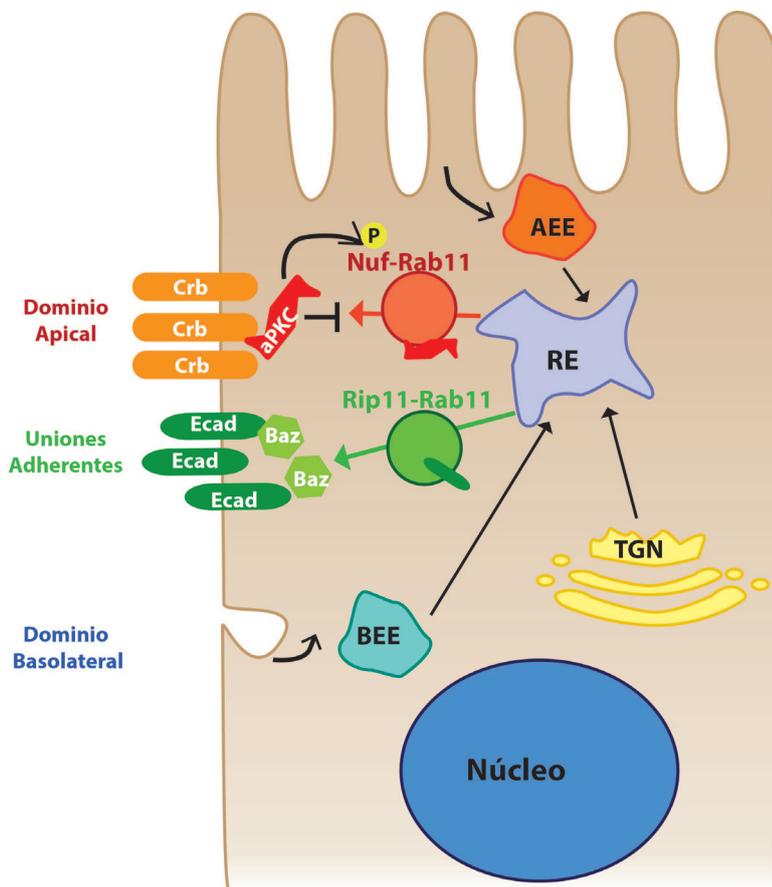


Figura 64. Transporte de RE mediado por Nuf y Rip11. Los RE reciben cargos desde el TGN en la ruta biosintética y desde los endosomas tempranos apicales (AEE) y basolaterales (BEE) en la ruta de reciclaje. Desde los RE existirían dos tipos de transporte diferentes: uno dirigido hacia el dominio apical y mediado por Rab11 y Nuf, por el cual se transporta aPKC y estaría regulado por la fosforilación de Nuf por aPKC, que evita la llegada de Nuf a la membrana subapical; y otro dirigido hacia las Uniones Adherentes, mediado por Rab11 y Rip11 que transportaría Ecad.

En el caso del disco imaginal es posible pensar en un transporte Rab11-Nuf hacia la parte más apical, siendo aPKC uno de los cargos de este transporte y que la propia aPKC regularía negativamente a través de la fosforilación de Nuf; por otro lado existiría un transporte Rab11-Rip11 dirigido hacia la zona de las Uniones Adherentes y con Ecad como uno de sus cargos (Fig. 64). Sería interesante analizar si Baz se ve afectado del mismo modo que Ecad en clones

rip11, lo cual reforzaría la existencia de ambas vías de transporte. A pesar de que en este trabajo aPKC ha sido la única proteína analizada afectada por la sobreexpresión de Nuf S155A, es muy probable que otros cargos aún desconocidos sean transportados vía Rab11-Nuf y regulados por aPKC. Descubrir alguno de estos cargos sería magnífico para corroborar esta hipótesis.

5. aPKC es reciclada vía Nuf-Rab11 en el disco imaginal de ala

En los últimos años, diferentes investigaciones han puesto de manifiesto la conexión entre polaridad y tráfico intracelular. Gracias en gran medida al cultivo en 3D de células MDCK (cultivo en el que se generan cistos con zona apical, basolateral y un lumen) se ha podido analizar en mayor profundidad la participación del tráfico intracelular en la formación de un tejido epitelial polarizado. Durante este proceso, diferentes determinantes de polaridad son transportados hacia los dominios de membrana a través del transporte mediado por Rab11. De este modo, Crb y Par3 son reclutados en RE y transportados hacia la membrana apical del lumen en formación en células MDCK [122,129]. Asimismo, Par3 y aPKC actúan marcando la zona de la membrana a la que deben llegar más vesículas Rab11/Rab8 en la formación del lumen [129]. En tejidos polarizados adultos, se ha demostrado que existe reciclaje de Ecad a través de Rab11 en el nótum de *Drosophila* [63] y se ha propuesto la existencia de un mecanismo de reciclaje que podría ser vía Rab11 para Crb en el ovario de *Drosophila* [195], aunque el único reciclaje de Crb demostrado es vía retrómero [193]. Sin embargo, poco se conoce sobre la dinámica de otros determinantes de polaridad sobre todo en tejidos polarizados maduros. Otra de las aportaciones de este trabajo ha sido la demostración de la existencia de un reciclaje de aPKC en el disco imaginal de ala. Por un lado, la acumulación intracelular de aPKC en células mutantes para componentes del exocisto (Sec5 y Sec6) implica la existencia de vesículas que transportan aPKC hacia la membrana apical y que no pueden depositarla en dicha membrana debido al bloqueo de la exocitosis. Por otro lado, al eliminar la función de Rab11, aPKC también se acumula intracelularmente y se pierde además de las uniones celulares. Este reciclaje de aPKC vía Rab11 está regulado por Nuf. Cuando la exocitosis está bloqueada, Nuf se acumula intracelularmente junto con aPKC. Además, la falta de función de Nuf produce una disminución de los niveles de aPKC de la membrana subapical. La endocitosis también tiene un papel en este reciclaje de aPKC. En los clones *shi* donde está bloqueada la endocitosis, se producen engrosamientos de aPKC en la membrana así como la desaparición de aPKC de las uniones celulares, indicando la existencia de una parte de aPKC que es endocitada y transportada nuevamente hacia la membrana. Este trabajo establece por tanto la existencia de un reciclaje de aPKC en un tejido polarizado maduro, el cual se produce, al menos en parte, vía Rab11-Nuf.

6. La interacción aPKC-Nuf establece un ciclo de retroalimentación para mantener los niveles adecuados de aPKC en la membrana

aPKC presenta un papel central en la regulación de la polaridad participando en multitud de procesos celulares. La actividad quinasa de aPKC es fundamental, por ejemplo, para mantener la distribución apico-basal de las células epiteliales, regular diferentes vías de señalización, dirigir la migración celular o controlar la división y el ciclo celular. Debido a la enorme implicación de aPKC en el adecuado funcionamiento celular, su actividad debe estar delicadamente regulada. La regulación de aPKC se produce a diferentes niveles. aPKC presenta un dominio regulador con un dominio pseudosustrato, el cual inhibe la propia actividad quinasa de aPKC. Su activación requiere de la interacción con otras proteínas, las cuales ayudan a localizarla en los dominios celulares donde ejerce su actividad y modifican la conformación de aPKC a su estado activo. Además, aPKC se autofosforila para completar su activación y también puede ser fosforilada por otras quinasas que mantienen a aPKC activa enzimáticamente.

En el contexto de la polaridad epitelial, aPKC en su conformación quinasa inactiva necesita interactuar con Par6 y Cdc42 para localizarse en el córtex subapical, cambiar su conformación y permitir su autofosforilación, produciendo una forma quinasa activa de aPKC. Cuando esto no ocurre o la activación es errónea, la polaridad celular se afecta con distintas consecuencias dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, en embriones de *Drosophila* encontramos que la sobreexpresión de una forma dominante negativa (inactiva) de aPKC produce la desaparición de Crb y Patj de la membrana, así como una deslocalización de Scrib. Por el contrario, al sobreexpresar una forma constitutivamente activa, Crb, Patj y Baz se encuentran expandidos por toda la membrana plasmática, reduciéndose además los determinantes basolaterales [36]. Todos estos efectos modifican la organización del tejido epitelial, produciendo una disrupción de su estructura. En vertebrados, también se ha observado un efecto similar con las sobreexpresiones de PKC ζ y PKC $\lambda/1$ [196]. Por otro lado, la sobreexpresión en hepatocitos primarios de rata de ambas isoformas de aPKC afecta a la vía de señalización de la insulina y la expresión génica aguas abajo de esta vía, contribuyendo a la resistencia a insulina [197]. Asimismo, numerosos tipos de cánceres humanos presentan altos niveles de aPKC (revisado en [14,198]). En torno al 80% de cánceres de pecho presentan sobreexpresión de aPKC estando relacionada con el tipo patológico de este tumor [119] y la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de PKC $\lambda/1$ aumenta la susceptibilidad de formación de tumores de colon en ratón [115]. Por tanto, mantener los niveles adecuados de aPKC activa es primordial para la función celular. Cómo se consiguen alcanzar estos niveles idóneos de aPKC activa en la célula presenta aún numerosas incógnitas.

En este trabajo he descrito un mecanismo por el cual aPKC es reciclada hacia la membrana subapical; reciclaje que es regulado por la propia aPKC para mantener los niveles adecuados de aPKC activa en la membrana (Fig. 65). En este proceso de reciclaje, aPKC viaja en vesículas a través de la maquinaria de tráfico hasta los RE. Estas vesículas contienen aPKC procedente de la endocitosis de membrana apical o basolateral para su posterior reciclaje, aunque no podemos descartar que también existan vesículas con aPKC procedentes del TGN

en una ruta biosintética (Fig. 65, A). Analizar con mayor detalle el papel de la endocitosis en el reciclaje de aPKC así como un estudio más detallado de las vesículas de aPKC intracelulares observadas en los mutantes *sec5* y *sec6* y en la sobreexpresión de Rab11-RNAi, podría aportar información en este sentido. Las proteínas Rab son marcadores de las diversas estaciones endosomales en la maquinaria del tráfico. De este modo, Rab5 es un marcador de los endosomas tempranos, Rab7 de los endosomas tardíos, Rab1 y Rab2 están implicadas en el transporte entre el Aparato de Golgi y el Retículo endoplasmático, mientras que Rab8, Rab10 y Rab14 están implicadas en la ruta biosintética desde el TGN hacia la membrana (revisado en [57]). Analizar qué marcadores presentan las vesículas intracelulares de aPKC ayudaría a conocer su procedencia. Por ejemplo, en discos silvestres se pueden observar vesículas con tinción para aPKC y para Rab5, lo que sugiere que existe una fracción de aPKC que es endocitada y transita por los endosomas tempranos (Fig. 59).

Una vez estas vesículas llegan a los RE, Rab11 y Nuf se encargan de transportar las vesículas con aPKC hacia la membrana subapical a través de los microtúbulos (Fig. 65, B). Al eliminar este transporte apical bien con la falta de función de Nuf o bien con la de Rab11, los niveles de aPKC en la membrana subapical se ven reducidos apareciendo incluso zonas de la membrana donde se pierde aPKC. La sobreexpresión del RNAi de Rab11 produce un fenotipo más fuerte que el observado en los mutantes *nuf*, con acumulación intracelular de aPKC y zonas en las que desaparece de la membrana. Esto podría indicar la existencia de mecanismos paralelos a Nuf para llevar aPKC a la membrana subapical a través de rutas alternativas y/o redundantes en las que participe Rab11. Esto podría significar de nuevo una redundancia entre el transporte de Nuf y Rip11, de modo que en situaciones de déficit de alguna de ellas, la otra podría cubrir parte de sus funciones. No obstante, tanto en ausencia de Nuf como de Rab11, sigue habiendo aPKC en el córtex subapical, probablemente debido a la perdurancia de la proteína o a una ruta biosintética directa entre el TGN y la membrana plasmática.

El exocisto se encarga de anclar las vesículas a la membrana plasmática (Fig. 65, B(1)). En *Drosophila* se ha descrito la interacción física entre Rab11 y Sec15 [63,199] mientras que en vertebrados Rab11-FIP3 co-precipita con Exo70 [144], indicando que hay una estrecha relación entre el complejo del exocisto y los RE. Sería interesante analizar cual es la relación entre Nuf y el exocisto, si también en *Drosophila* interacciona con Exo70 y/o con otras subunidades del complejo, así como si la fosforilación de aPKC afecta a esta unión.

Una vez aPKC se encuentra en el córtex subapical, puede interactuar con sus proteínas reguladoras, tales como Par6 y Cdc42, que permiten su autofosforilación y activación (Fig. 65, B(2)). Solo cuando aPKC está autofosforilada y por tanto activa, puede interactuar físicamente con Nuf y fosforilarlo (Fig. 65, B(3)), tal y como he demostrado en esta tesis. De este modo la interacción queda limitada a la zona del córtex subapical. Este tipo de regulación en la interacción entre aPKC y sus substratos no ha sido descrita previamente para ningún otro substrato de aPKC.

La fosforilación de Nuf evita su localización en la membrana y bloquea la llegada de más vesículas conteniendo aPKC. De este modo, cuando se alcanzan los niveles adecuados de aPKC, ésta bloquearía la llegada de más vesículas Rab11-Nuf (Fig. 65, B(4)). Se establece por tanto un ciclo de retroalimentación en el cual aPKC regula su propio reciclaje mediado

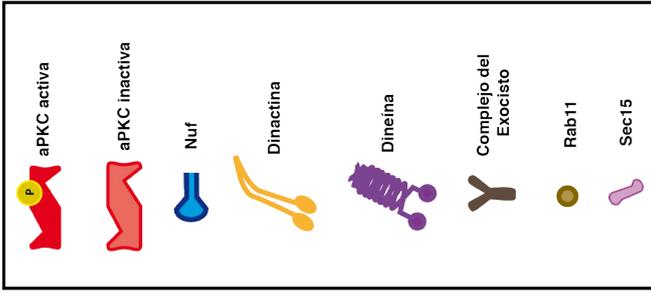
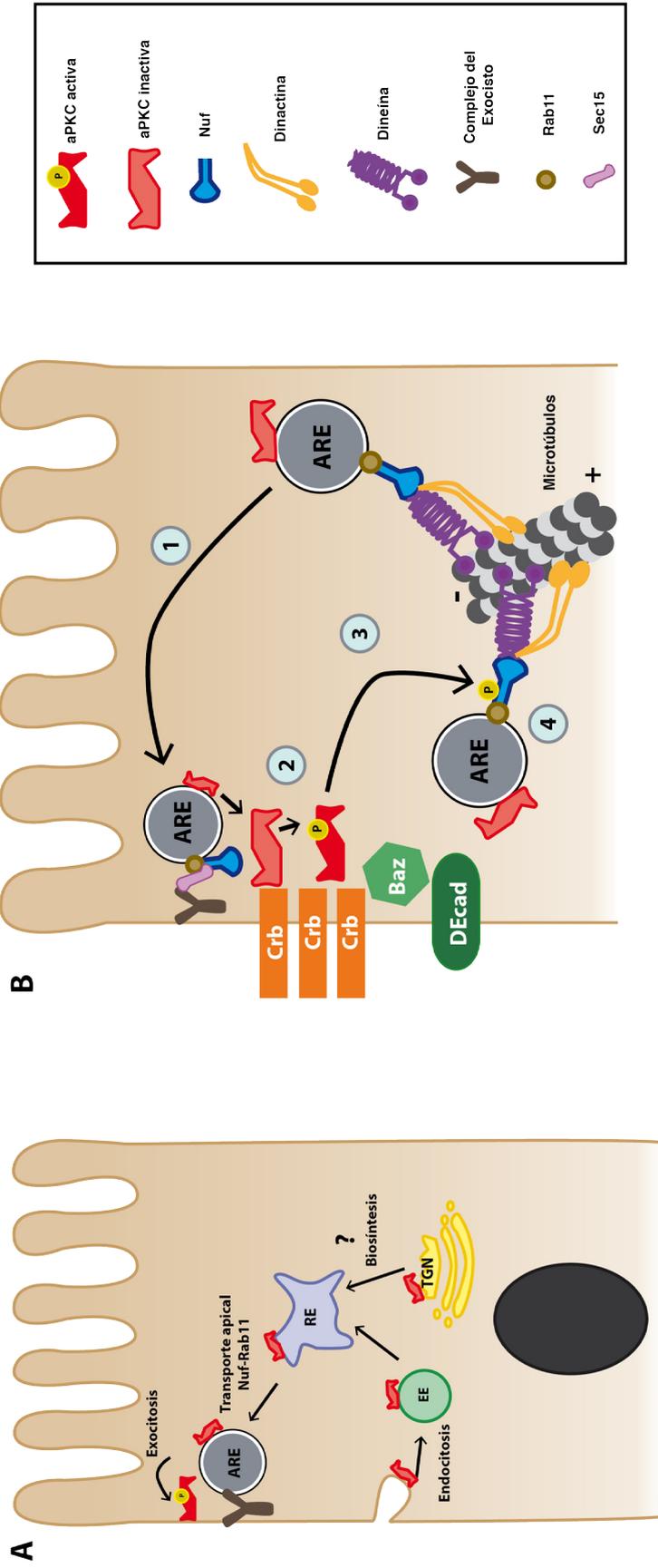


Figura 65. Reciclaje de aPKC via Nuf-Rab11 en el disco imaginal de ala. A) aPKC es transportada hacia los RE bien desde los endosomas tempranos (EE). Desde los RE, Nuf y Rab11 transportan aPKC en los Endosomas de Reciclaje Apicales (ARE) hacia la membrana subapical donde el exocisto se encarga de anclar la vesícula a la membrana, donde aPKC se activa. B) Las vesículas Nuf-Rab11 conteniendo aPKC son transportadas a través de los microtúbulos hasta la región subapical de las células epiteliales. Allí, el complejo del exocisto permite el anclaje de la vesícula (1) a esta zona de la membrana donde aPKC se activa y autofosforila (2). Solo cuando aPKC está activada es capaz de interactuar y fosforilar a Nuf (3). Esta fosforilación evita la unión de Nuf a la membrana plasmática impidiendo la llegada de más vesículas Nuf-Rab11 (4).

por Rab11 y Nuf. Al usar la versión S155A de Nuf (no fosforilable por aPKC), se elimina el control de aPKC sobre las vesículas Rab11-Nuf, las cuales no dejan de llegar a la membrana subapical aumentando así los niveles de aPKC.

7. Interacción aPKC-FIP3 y conservación evolutiva

Las poderosas herramientas genéticas disponibles en *Drosophila* junto con el alto grado de homología con vertebrados en gran parte de los genes, posibilita la aplicación a humanos de los resultados obtenidos en este organismo.

En esta tesis he evaluado la conservación de la interacción aPKC-Nuf en humanos. Rab11-FIP3 (en adelante FIP3), el homólogo de Nuf en vertebrados, ha sido descrito como una fosfoproteína con diferentes dianas de fosforilación y cuya localización subcelular está regulada a lo largo del ciclo celular [200], tal y como ocurre con Nuf. Ambas proteínas interactúan con Rab11, Dineína y Kinesina transportando los RE a través de los microtúbulos. Además, ambas son fundamentales para la integridad estructural de los RE [92,201]. FIP3 participa en el transporte de membrana hacia el surco de división en la citoquinesis [144], al igual que Nuf lo hace durante la celularización (un tipo especial de citoquinesis) del embrión de *Drosophila* [89]. Por otra parte, FIP3 ha sido involucrado en la migración celular. En células MDA-MB-231 de carcinoma de pecho se ha observado la localización de FIP3 junto con los RE en el frente de migración, regulando la dinámica del citoesqueleto de actina dependiente de Rac1. Este hecho involucra a FIP3 en migración y cáncer, procesos en los que aPKC también está implicada. aPKC es capaz de regular la migración bien controlando la dirección de ésta a través de la polarización del centrosoma [109] o bien facilitando la actividad protusiva con la degradación de RhoA o la exclusión de Numb en el frente de migración [110,111]. Estos datos incitan a analizar si existe un nuevo mecanismo en el que aPKC regule la migración a través de FIP3 y cual sería su implicación en cáncer.

Mediante un ensayo de PD con células humanas he podido demostrar que FIP3 interactúa físicamente con aPKC y que ambas isoformas humanas (PKC ζ y PKC $\lambda/1$) son capaces de fosforilarlo *in vitro*. Además, he observado que células humanas con niveles reducidos de PKC $\lambda/1$ muestran acumulación de FIP3 en zonas próximas a la membrana plasmática. Esta distribución no se observa en células silvestres y puede compararse a la acumulación de Nuf en la zona subapical del disco imaginal de ala en células mutantes para *aPKC*. Estos datos indican que la interacción aPKC-Nuf está conservada en la evolución, por lo que aPKC podría regular también el transporte de RE en vertebrados y humanos a través de FIP3. Del mismo modo podría existir también un reciclaje de aPKC a través de Rab11 y FIP3 en células humanas, al igual que he observado en *Drosophila* y que estaría regulado por la propia aPKC.

En el trabajo de Bryant et al. [129] analizan el proceso de formación de cistos en células MDCK donde la proteína Podocalixina, necesaria para la formación del lumen, es internalizada desde la membrana extracelular hacia el sitio de inicio de la membrana apical (AMIS, en inglés), lugar donde se formará el lumen. En esta transcitosis, la Podocalixina viaja en vesículas Rab11/Rab8 hacia la zona subapical donde el exocisto se encarga de anclarlas a la membrana. Interferir con la maquinaria de transporte por ejemplo eliminando la función de Sec15 (componente del exocisto) o de Rab11 genera una acumulación de Podocalixina

en una zona próxima a la superficie celular así como malformaciones en el lumen. Esta acumulación de Podocalixina esta acompañada de una deslocalización de Par3 así como de Cdc42, indicando un transporte de estos determinantes de polaridad hacia la membrana apical a través de Rab11. Además tanto la falta de Par3 y Cdc42 como la inhibición de aPKC producen también acumulación de vesículas Rab11 con Podocalixina, lo cual sugiere una acción conjunta entre el exocisto y el complejo Par3-aPKC para anclar las vesículas a la superficie apical [129]. Este trabajo demuestra por tanto la conexión entre la polaridad celular y el tráfico, dónde los determinantes apicales son transportados hacia la superficie celular y una vez allí pueden regular el tráfico vesicular, de una manera similar al trabajo presentado en esta tesis. Es lógico pensar que aPKC esté participando en este proceso (y en procesos similares) a través de FIP3. La acumulación de vesículas Rab11 cerca de la superficie apical al inhibir aPKC o eliminar Cdc42 (necesaria para activar aPKC) es semejante al fenotipo en el disco imaginal de ala descrito en esta tesis. Las vesículas Rab11/Rab8 con Podocalixina podrían ser transportadas por FIP3 hacia el AMIS y aPKC regularía este transporte a través de la fosforilación de FIP3. Por otra parte, los resultados de esta tesis son compatibles con la posibilidad de que aPKC actúe de manera conjunta con el exocisto en el anclaje de vesículas Rab11/Nuf en la membrana subapical, tal y como se indica en el trabajo de D. Bryant. Posteriormente aPKC excluiría a Nuf de este dominio a través de su fosforilación. Bryant et al. muestran también que bloquear la función de aPKC produce fallos en la internalización de Podocalixina en algunas células, mostrando una función específica de aPKC a nivel de la endocitosis ya que este fenotipo no se obtiene con la falta de función de Par3 ni de Cdc42, indicando el papel de aPKC en diferentes etapas del reciclaje. Tanto el trabajo de Bryant et al. como el que presento en esta tesis establecen al complejo Par3/aPKC/Cdc42 y especialmente aPKC como una plataforma multifuncional en la modulación del tráfico de membrana, constituyendo el punto de unión entre las maquinarias de polaridad y tráfico entre los que se establece un ciclo de retroalimentación. La versatilidad y promiscuidad de aPKC hacen de ella una proteína clave en este proceso, presentando además funciones específicas. Sería interesante analizar la interacción aPKC-FIP3 en otros contextos celulares en los que ambas proteínas participan, como pueden ser migración celular, división celular, polaridad y tráfico intracelular o cáncer, para determinar hasta que punto esta interacción regula de forma general el tráfico intracelular.

La identificación de Nuf como sustrato de aPKC realizada en este trabajo establece la primera conexión directa entre aPKC y el reciclaje a nivel de los RE. Debido al papel central de los RE, a los que llegan diferentes rutas de reciclaje y desde donde se distribuyen multitud de cargos a diferentes dominios celulares, la interacción aPKC-Nuf podría suponer un control fundamental del tráfico intracelular.

CONCLUSIONES

1. La purificación por afinidad utilizada en esta tesis ha permitido aislar complejos proteicos en condiciones nativas en los que aPKC participa e identificar un nuevo substrato de aPKC: Nuclear fallout (Nuf).
2. aPKC interacciona física y directamente con Nuf y Rip11, proteínas efectoras de Rab11. Tanto Nuf como Rip11 son fosforiladas por aPKC.
3. En clones mutantes *aPKC* generados en el disco de ala se produce una acumulación de Nuf, Rab11 y Dineína en la región subapical de la célula. En algunos de estos clones, Rip11 también se acumula aunque su distribución es menos uniforme en las distintas regiones del disco. Esto indica que aPKC es capaz de regular el tráfico de los Endosomas de Reciclaje.
4. La interacción entre aPKC y Nuf sucede solo cuando aPKC está activa (autofosforilada) y se produce entre el extremo N-terminal de Nuf y el dominio quinasa de aPKC.
5. La fosforilación de Nuf por aPKC es en la S155. Esta fosforilación evita la interacción entre ambas proteínas y afecta a la localización subcelular de Nuf. La versión fosfomimética de Nuf localiza en el córtex subcelular evitando la membrana mientras que la versión no fosforilable de Nuf co-localiza con aPKC en la membrana subapical.
6. La fosforilación de Nuf por parte de aPKC no modifica la unión de Nuf con Rab11, Kinesina o Dineína; proteínas a las que se une para transportar los Endosomas de Reciclaje.
7. La sobreexpresión de la versión no fosforilable de Nuf en el disco de ala aumenta los niveles de aPKC en la membrana subapical. Por otro lado, en clones mutantes *nuf* los niveles corticales de aPKC se ven reducidos. Esto indica que Nuf puede regular la cantidad de aPKC presente en el córtex subapical.
8. Tanto la sobreexpresión de un RNAi contra Rab11 como la falta de función de *sec5* y *sec6*, componentes del exocisto, producen un aumento de aPKC intracelular así como eliminación de aPKC de las uniones celulares. Estos datos indican la existencia de un reciclaje de aPKC a través de Rab11.
9. Los datos obtenidos en esta tesis apoyan la existencia de un reciclaje de aPKC en un tejido maduro mediado por Rab11 y Nuf. La propia aPKC regula este reciclaje en un ciclo de retroalimentación negativa. Al fosforilar a Nuf evita la llegada de más vesículas con aPKC manteniendo así los niveles adecuados de aPKC en la membrana.

10. Rab11-FIP3, homólogo de Nuf en vertebrados, interacciona físicamente con aPKC y es fosforilado por aPKC. Además, la falta de función de PKC λ/ι en células humanas produce una acumulación de Rab11-FIP3 próxima a la membrana plasmática, fenotipo similar al observado para Nuf en el disco imaginal. Estos datos indican que la interacción aPKC-Nuf está evolutivamente conservada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fortini ME, Skupski MP, Boguski MS, Hariharan IK (2000) A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol* 150: F23-30.
2. St Johnston D, Ahringer J (2010) Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* 141: 757-774.
3. Bier E (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 6: 9-23.
4. Suzuki A, Ohno S (2006) The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci* 119: 979-987.
5. Goldstein B, Macara IG (2007) The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell* 13: 609-622.
6. Thompson BJ (2013) Cell polarity: models and mechanisms from yeast, worms and flies. *Development* 140: 13-21.
7. Gibson MC, Perrimon N (2003) Apicobasal polarization: epithelial form and function. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 747-752.
8. Bohrmann J, Zimmermann J (2008) Gap junctions in the ovary of *Drosophila melanogaster*: localization of innexins 1, 2, 3 and 4 and evidence for intercellular communication via innexin-2 containing channels. *BMC Dev Biol* 8: 111.
9. Foe VE, Alberts BM (1983) Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci* 61: 31-70.
10. Bate M, Arias AM (1993) The development of *Drosophila melanogaster*. N Y Cold Spring Harbor Laboratory Press.
11. Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G (1973) Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* 245: 251-253.
12. Zecca M, Basler K, Struhl G (1995) Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* 121: 2265-2278.
13. Bilder D (2004) Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev* 18: 1909-1925.
14. Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M (2012) Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 12: 23-38.
15. McCaffrey LM, Macara IG (2011) Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 21: 727-735.
16. Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS (1988) Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52: 311-320.
17. Adams AE, Johnson DI, Longnecker RM, Sloat BF, Pringle JR (1990) CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 111: 131-142.
18. Rodriguez-Boulán E, Macara IG (2014) Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 225-242.
19. Bulgakova NA, Knust E (2009) The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J Cell Sci* 122: 2587-2596.
20. Tepass U, Tanentzapf G, Ward R, Fehon R (2001) Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 35: 747-784.
21. van de Pavert SA, Kantardzhieva A, Malysheva A, Meuleman J, Versteeg I, et al. (2004) Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci* 117: 4169-4177.
22. Tanentzapf G, Tepass U (2003) Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol* 5: 46-52.
23. Chen J, Zhang M (2013) The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. *Exp Cell Res* 319: 1357-1364.
24. Tepass U (2012) The apical polarity protein network in *Drosophila* epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 655-685.
25. Humbert P, Russell S, Richardson H (2003) Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *Bioessays* 25: 542-553.
26. Benton R, St Johnston D (2003) *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 Inhibit Bazooka/PAR-3 to Establish Complementary Cortical Domains in Polarized Cells. *Cell* 115: 691-704.
27. Suzuki A, Hirata M, Kamimura K, Maniwa R, Yamanaka T, et al. (2004) aPKC acts upstream of PAR-1b

- in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr Biol* 14: 1425-1435.
28. Niessen CM, Leckband D, Yap AS (2011) Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev* 91: 691-731.
 29. Harris TJ, Tepass U (2010) Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 502-514.
 30. Yamanaka T, Horikoshi Y, Suzuki A, Sugiyama Y, Kitamura K, et al. (2001) PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells* 6: 721-731.
 31. Harris TJ, Peifer M (2004) Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* 167: 135-147.
 32. Wei SY, Escudero LM, Yu F, Chang LH, Chen LY, et al. (2005) Echinoid is a component of adherens junctions that cooperates with DE-Cadherin to mediate cell adhesion. *Dev Cell* 8: 493-504.
 33. Pilot F, Philippe JM, Lemmers C, Lecuit T (2006) Spatial control of actin organization at adherens junctions by a synaptotagmin-like protein Btsz. *Nature* 442: 580-584.
 34. Morais-de-Sa E, Mirouse V, St Johnston D (2010) aPKC phosphorylation of Bazooka defines the apical/lateral border in *Drosophila* epithelial cells. *Cell* 141: 509-523.
 35. Krahn MP, Buckers J, Kastrop L, Wodarz A (2010) Formation of a Bazooka-Stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia. *J Cell Biol* 190: 751-760.
 36. Sotillos S, Diaz-Meco MT, Caminero E, Moscat J, Campuzano S (2004) DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* 166: 549-557.
 37. Wodarz A, Hinz U, Engelbert M, Knust E (1995) Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* 82: 67-76.
 38. Bilder D, Perrimon N (2000) Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403: 676-680.
 39. Woods DF, Wu JW, Bryant PJ (1997) Localization of proteins to the apico-lateral junctions of *Drosophila* epithelia. *Dev Genet* 20: 111-118.
 40. Hurov JB, Watkins JL, Piwnicka-Worms H (2004) Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr Biol* 14: 736-741.
 41. Plant PJ, Fawcett JP, Lin DC, Holdorf AD, Binns K, et al. (2003) A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol* 5: 301-308.
 42. Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA (2003) The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* 422: 326-330.
 43. Laprise P, Lau KM, Harris KP, Silva-Gagliardi NF, Paul SM, et al. (2009) Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na(+),K(+)-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins. *Nature* 459: 1141-1145.
 44. Gambelin CL, Hardy EJ, Chartier FJ, Bisson N, Laprise P (2014) A bidirectional antagonism between aPKC and Yurt regulates epithelial cell polarity. *J Cell Biol* 204: 487-495.
 45. Gassama-Diagne A, Yu W, ter Beest M, Martin-Belmonte F, Kierbel A, et al. (2006) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat Cell Biol* 8: 963-970.
 46. Martin-Belmonte F, Mostov K (2007) Phosphoinositides control epithelial development. *Cell Cycle* 6: 1957-1961.
 47. von Stein W, Ramrath A, Grimm A, Muller-Borg M, Wodarz A (2005) Direct association of Bazooka/ PAR-3 with the lipid phosphatase PTEN reveals a link between the PAR/aPKC complex and phosphoinositide signaling. *Development* 132: 1675-1686.
 48. Pinal N, Goberdhan DC, Collinson L, Fujita Y, Cox IM, et al. (2006) Regulated and polarized PtdIns(3,4,5)P3 accumulation is essential for apical membrane morphogenesis in photoreceptor epithelial cells. *Curr Biol* 16: 140-149.
 49. Martin-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, et al. (2007) PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* 128: 383-397.
 50. Takahama S, Hirose T, Ohno S (2008) aPKC restricts the basolateral determinant PtdIns(3,4,5)P3 to the basal region. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 249-255.
 51. Mostov KE, Su T, Beest M (2003) Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol* 5.

52. van Ijzendoorn SC (2006) Recycling endosomes. *J Cell Sci* 119: 1679-1681.
53. Ang SF, Folsch H (2012) The role of secretory and endocytic pathways in the maintenance of cell polarity. *Essays Biochem* 53: 29-39.
54. Apodaca G, Gallo LI, Bryant DM (2012) Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry. *Nat Cell Biol* 14: 1235-1243.
55. Mostov KE, Verges M, Altschuler Y (2000) Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 483-490.
56. Rodriguez-Boulán E, Kreitzer G, Musch A (2005) Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 233-247.
57. Hutagalung AH, Novick PJ (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* 91: 119-149.
58. Granger E, McNee G, Allan V, Woodman P (2014) The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. *Semin Cell Dev Biol* 31: 20-29.
59. Allan VJ, Thompson HM, McNiven MA (2002) Motoring around the Golgi. *Nat Cell Biol* 4: E236-242.
60. Heider MR, Munson M (2012) Exorcising the exocyst complex. *Traffic* 13: 898-907.
61. Liu J, Guo W (2012) The exocyst complex in exocytosis and cell migration. *Protoplasma* 249: 587-597.
62. Zhang XM, Ellis S, Sriratana A, Mitchell CA, Rowe T (2004) Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *J Biol Chem* 279: 43027-43034.
63. Langevin J, Morgan MJ, Rossé C, Racine V, Sibarita J-B, et al. (2005) Drosophila Exocyst Components Sec5, Sec6, and Sec15 Regulate DE-Cadherin Trafficking from Recycling Endosomes to the Plasma Membrane. *Developmental Cell* 9: 365-376.
64. Hsuan Teng F, Wang Y, Luen Tang B (2001) The syntaxins. *Genome Biology* 2(11): 3012.3011-3012.3017.
65. Reales E, Sharma N, Low SH, Folsch H, Weimbs T (2011) Basolateral sorting of syntaxin 4 is dependent on its N-terminal domain and the AP1B clathrin adaptor, and required for the epithelial cell polarity. *PLoS One* 6: e21181.
66. Sharma N, Low SH, Misra S, Pallavi B, Weimbs T (2006) Apical targeting of syntaxin 3 is essential for epithelial cell polarity. *J Cell Biol* 173: 937-948.
67. Kelly EE, Horgan CP, McCaffrey MW (2012) Rab11 proteins in health and disease. *Biochem Soc Trans* 40: 1360-1367.
68. Jing J, Prekeris R (2009) Polarized endocytic transport: The roles of Rab11 and Rab11-FIPs in regulating cell polarity. *Histol Histopathol* 24.
69. Desclozeaux M, Venturato J, Wylie FG, Kay JG, Joseph SR, et al. (2008) Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 295.
70. Welz T, Wellbourne-Wood J, Kerkhoff E (2014) Orchestration of cell surface proteins by Rab11. *Trends Cell Biol* 24: 407-415.
71. Kelly EE, Horgan CP, McCaffrey MW, Young P (2011) The role of endosomal-recycling in long-term potentiation. *Cell Mol Life Sci* 68: 185-194.
72. Palmieri D, Bouadis A, Ronchetti R, Merino MJ, Steeg PS (2006) Rab11a differentially modulates epidermal growth factor-induced proliferation and motility in immortal breast cells. *Breast Cancer Res Treat* 100: 127-137.
73. Husebye H, Aune MH, Stenvik J, Samstad E, Skjeldal F, et al. (2010) The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity* 33: 583-596.
74. Powelka AM, Sun J, Li J, Gao M, Shaw LM, et al. (2004) Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic* 5: 20-36.
75. Lock JG, Stow JL (2005) Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 16: 1744-1755.
76. Laflamme C, Assaker G, Ramel D, Dorn JF, She D, et al. (2012) Evi5 promotes collective cell migration through its Rab-GAP activity. *J Cell Biol* 198: 57-67.
77. Ramel D, Wang X, Laflamme C, Montell DJ, Emery G (2013) Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements. *Nat Cell Biol* 15: 317-324.
78. Prekeris R (2003) Rabs, Rips, FIPs, and endocytic membrane traffic. *ScientificWorldJournal* 3: 870-880.

79. Hales CM, Vaerman JP, Goldenring JR (2002) Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. *J Biol Chem* 277: 50415-50421.
80. Schonteich E, Wilson GM, Burden J, Hopkins CR, Anderson K, et al. (2008) The Rip11/Rab11-FIP5 and kinesin II complex regulates endocytic protein recycling. *J Cell Sci* 121: 3824-3833.
81. Horgan CP, Hanscom SR, Jolly RS, Futter CE, McCaffrey MW (2010) Rab11-FIP3 links the Rab11 GTPase and cytoplasmic dynein to mediate transport to the endosomal-recycling compartment. *J Cell Sci* 123: 181-191.
82. Simon GC, Prekeris R (2008) Mechanisms regulating targeting of recycling endosomes to the cleavage furrow during cytokinesis. *Biochem Soc Trans* 36: 391-394.
83. Wilson G, Fielding AB, Simon GC, Yu X, Andrews PD, et al. (2005) The FIP3-Rab11 Protein Complex Regulates Recycling Endosome Targeting to the Cleavage Furrow during Late Cytokinesis. *Mol Biol Cell* 16: 849-860.
84. Shaye DD, Casanova J, Llimargas M (2008) Modulation of intracellular trafficking regulates cell intercalation in the *Drosophila* trachea. *Nat Cell Biol* 10: 964-970.
85. Li BX, Satoh AK, Ready DF (2007) Myosin V, Rab11, and dRip11 direct apical secretion and cellular morphogenesis in developing *Drosophila* photoreceptors. *J Cell Biol* 177: 659-669.
86. Riggs B, Fasulo B, Royou A, Mische S, Cao J, et al. (2007) The concentration of Nuf, a Rab11 effector, at the microtubule-organizing center is cell cycle regulated, dynein-dependent, and coincides with furrow formation. *Mol Biol Cell* 18: 3313-3322.
87. Rothwell WF, Zhang CX, Zelano C, Hsieh T, Sullivan W (1999) The *Drosophila* centrosomal protein Nuf is required for recruiting Dah, a membrane associated protein, to furrows in the early embryo. *Journal of Cell Science*.
88. Riggs B, Rothwell W, Mische S, Hickson GR, Matheson J, et al. (2003) Actin cytoskeleton remodeling during early *Drosophila* furrow formation requires recycling endosomal components Nuclear-fallout and Rab11. *J Cell Biol* 163: 143-154.
89. Cao J, Albertson R, Riggs B, Field CM, Sullivan W (2008) Nuf, a Rab11 effector, maintains cytokinetic furrow integrity by promoting local actin polymerization. *J Cell Biol* 182: 301-313.
90. Otani T, Oshima K, Onishi S, Takeda M, Shinmyozu K, et al. (2011) IKKepsilon regulates cell elongation through recycling endosome shuttling. *Dev Cell* 20: 219-232.
91. Rothwell WF, Fogarty P, Field CM, Sullivan W (1998) Nuclear-fallout, a *Drosophila* protein that cycles from the cytoplasm to the centrosomes, regulates cortical microfilament organization. *Development* 125: 1295-1303.
92. Emery G, Hutterer A, Berdnik D, Mayer B, Wirtz-Peitz F, et al. (2005) Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system. *Cell* 122: 763-773.
93. Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K, et al. (2010) PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 103-112.
94. Xiao H, Liu M (2013) Atypical protein kinase C in cell motility. *Cell Mol Life Sci* 70: 3057-3066.
95. Suzuki A, Akimoto K, Ohno S (2003) Protein kinase C lambda/iota (PKClambda/iota): a PKC isotype essential for the development of multicellular organisms. *J Biochem* 133: 9-16.
96. Newton AC (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9: 161-167.
97. Moscat J, Diaz-Meco M (2000) The atypical protein kinase Cs. *EMBO Rep* 11-51.
98. Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, et al. (1995) Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J* 14: 6157-6163.
99. Warner SJ, Yashiro H, Longmore GD (2010) The Cdc42/Par6/aPKC polarity complex regulates apoptosis-induced compensatory proliferation in epithelia. *Curr Biol* 20: 677-686.
100. Hirai T, Chida K (2003) Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem* 133: 1-7.
101. Newton AC (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101: 2353-2364.
102. Atwood SX, Prehoda KE (2009) aPKC phosphorylates Miranda to polarize fate determinants during neuroblast asymmetric cell division. *Curr Biol* 19: 723-729.
103. Smith CA, Lau KM, Rahmani Z, Dho SE, Brothers G, et al. (2007) aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *The EMBO Journal* 26: 468-480.
104. Hao Y, Du Q, Chen X, Zheng Z, Balsbaugh JL, et al. (2010) Par3 controls epithelial spindle orientation by aPKC-mediated phosphorylation of apical Pins. *Curr Biol* 20: 1809-1818.

105. Berra E, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Municio MM, Sanz L, et al. (1993) Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* 74: 555-563.
106. Bjorkoy G, Perander M, Overvatn A, Johansen T (1997) Reversion of Ras- and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C-mediated transformation of NIH 3T3 cells by a dominant interfering mutant of protein kinase C lambda is accompanied by the loss of constitutive nuclear mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *J Biol Chem* 272: 11557-11565.
107. Wooten MW (1999) Function for NF-kB in neuronal survival: regulation by atypical protein kinase C. *J Neurosci Res* 58: 607-611.
108. Diaz-Meco MT, Lozano J, Municio MM, Berra E, Frutos S, et al. (1994) Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta. *J Biol Chem* 269: 31706-31710.
109. Etienne-Manneville S, Hall A (2003) Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421: 753-756.
110. Wang HR, Zhang Y, Ozdamar B, Ogunjimi AA, Alexandrova E, et al. (2003) Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* 302: 1775-1779.
111. Nishimura T, Kaibuchi K (2007) Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3. *Dev Cell* 13: 15-28.
112. Chabu C, Doe CQ (2008) Dap160/intersectin binds and activates aPKC to regulate cell polarity and cell cycle progression. *Development* 135: 2739-2746.
113. Sabherwal N, Thuret R, Lea R, Stanley P, Papalopulu N (2014) aPKC phosphorylates p27Xic1, providing a mechanistic link between apicobasal polarity and cell-cycle control. *Dev Cell* 31: 559-571.
114. Sabherwal N, Tsutsui A, Hodge S, Wei J, Chalmers AD, et al. (2009) The apicobasal polarity kinase aPKC functions as a nuclear determinant and regulates cell proliferation and fate during *Xenopus* primary neurogenesis. *Development* 136: 2767-2777.
115. Murray NR, Jamieson L, Yu W, Zhang J, Gokmen-Polar Y, et al. (2004) Protein kinase C iota is required for Ras transformation and colon carcinogenesis in vivo. *J Cell Biol* 164: 797-802.
116. Regala RP, Weems C, Jamieson L, Khor A, Edell ES, et al. (2005) Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 65: 8905-8911.
117. Brumby AM, Goulding KR, Schlosser T, Loi S, Galea R, et al. (2011) Identification of novel Ras-cooperating oncogenes in *Drosophila melanogaster*: a RhoGEF/Rho-family/JNK pathway is a central driver of tumorigenesis. *Genetics* 188: 105-125.
118. Eder AM, Sui X, Rosen DG, Nolden LK, Cheng KW, et al. (2005) Atypical PKC*iota* contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12519-12524.
119. Kojima Y, Akimoto K, Nagashima Y, Ishiguro H, Shirai S, et al. (2008) The overexpression and altered localization of the atypical protein kinase C lambda/iota in breast cancer correlates with the pathologic type of these tumors. *Hum Pathol* 39: 824-831.
120. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, et al. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704-715.
121. Vidal M, Salavaggione L, Ylagan L, Wilkins M, Watson M, et al. (2010) A role for the epithelial microenvironment at tumor boundaries: evidence from *Drosophila* and human squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 176: 3007-3014.
122. Schluter MA, Pfarr CS, Pieczynski J, Whiteman EL, Hurd TW, et al. (2009) Trafficking of Crumbs3 during cytokinesis is crucial for lumen formation. *Mol Biol Cell* 20: 4652-4663.
123. Rosse C, Lodillinsky C, Fuhrmann L, Nourieh M, Monteiro P, et al. (2014) Control of MT1-MMP transport by atypical PKC during breast-cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
124. Georgiou M, Marinari E, Burden J, Baum B (2008) Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol* 18: 1631-1638.
125. Leibfried A, Fricke R, Morgan MJ, Bogdan S, Bellaiche Y (2008) *Drosophila* Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis. *Curr Biol* 18: 1639-1648.
126. Harris KP, Tepass U (2008) Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the *Drosophila* neuroectoderm through regulation of apical endocytosis. *J Cell Biol* 183: 1129-1143.
127. Buther K, Plaas C, Barnekow A, Kremerskothen J (2004) KIBRA is a novel substrate for protein kinase C zeta. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 703-707.
128. Yoshihama Y, Sasaki K, Horikoshi Y, Suzuki A, Ohtsuka T, et al. (2011) KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells. *Curr Biol* 21: 705-711.

129. Bryant DM, Datta A, Rodriguez-Fraticelli AE, Peranen J, Martin-Belmonte F, et al. (2010) A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. *Nat Cell Biol* 12: 1035-1045.
130. Elias S, McGuire JR, Yu H, Humbert S (2015) Huntingtin Is Required for Epithelial Polarity through RAB11A-Mediated Apical Trafficking of PAR3-aPKC. *PLoS Biol* 13: e1002142.
131. Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
132. Nagel AC, Maier D, Preiss A (2002) Green fluorescent protein as a convenient and versatile marker for studies on functional genomics in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* 212: 93-98.
133. Lee YS, Carthew RW (2003) Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* 30: 322-329.
134. St Johnston D (2002) The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 3: 176-188.
135. Cruz C, Glavic A, Casado M, de Celis JF (2009) A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics* 183: 1005-1026.
136. Tanimoto H, Itoh S, ten Dijke P, Tabata T (2000) Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol Cell* 5: 59-71.
137. Sansores-Garcia L, Bossuyt W, Wada K, Yonemura S, Tao C, et al. (2011) Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J* 30: 2325-2335.
138. Bunker BD, Nellimoottil TT, Boileau RM, Classen AK, Bilder D (2015) The transcriptional response to tumorigenic polarity loss in *Drosophila*. *Elife* 4.
139. Sullivan W, Fogarty, P. and Theurkauf W. (1993) Mutations affecting the cytoskeletal organization of syncytial *Drosophila* embryos. *Development* 118.
140. Golic KG, Lindquist S (1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59: 499-509.
141. Xu T, Rubin GM (1993) Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117: 1223-1237.
142. Lis JT, Simon JA, Sutton CA (1983) New heat shock puffs and beta-galactosidase activity resulting from transformation of *Drosophila* with an hsp70-lacZ hybrid gene. *Cell* 35: 403-410.
143. Struhl G, Basler K (1993) Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* 72: 527-540.
144. Fielding AB, Schonteich E, Matheson J, Wilson G, Yu X, et al. (2005) Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the Exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *The EMBO Journal* 24: 3389-3399.
145. Yang P, Sampson HM, Krause HM (2006) A modified tandem affinity purification strategy identifies cofactors of the *Drosophila* nuclear receptor dHNF4. *Proteomics* 6: 927-935.
146. Allen JJ, Li M, Brinkworth CS, Paulson JL, Wang D, et al. (2007) A semisynthetic epitope for kinase substrates. *Nat Methods* 4: 511-516.
147. Chang L, Kreko T, Davison H, Cusmano T, Wu Y, et al. (2013) Normal dynactin complex function during synapse growth in *Drosophila* requires membrane binding by Arfaptin. *Mol Biol Cell* 24: 1749-1764, S1741-1745.
148. McGrail M, Gepner J, Silvanovich A, Ludmann S, Serr M, et al. (1995) Regulation of cytoplasmic dynein function in vivo by the *Drosophila* Glued complex. *J Cell Biol* 131: 411-425.
149. Parsons LM, Grzeschik NA, Allot ML, Richardson H (2010) Lgl/aPKC and Crb regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway. *Fly* 4:4: 288-293.
150. Rolls MM, Albertson R, Shih HP, Lee CY, Doe CQ (2003) *Drosophila* aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J Cell Biol* 163: 1089-1098.
151. Guilgur LG, Prudencio P, Ferreira T, Pimenta-Marques AR, Martinho RG (2012) *Drosophila* aPKC is required for mitotic spindle orientation during symmetric division of epithelial cells. *Development* 139: 503-513.
152. Harris TJ, Peifer M (2007) aPKC controls microtubule organization to balance adherens junction symmetry and planar polarity during development. *Dev Cell* 12: 727-738.
153. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, et al. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24: 218-229.
154. Veraksa A, Bauer A, Artavanis-Tsakonas S (2005) Analyzing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Dev Dyn* 232: 827-834.
155. Petronczki M, Knoblich JA (2001) DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division

- of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 3: 43-49.
156. Xu H, Brill JA, Hsien J, McBride R, Boulianne GL, et al. (2002) Syntaxin 5 is required for cytokinesis and spermatid differentiation in *Drosophila*. *Dev Biol* 251: 294-306.
157. Venken KJ, Schulze KL, Haelterman NA, Pan H, He Y, et al. (2011) MiMIC: a highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes. *Nat Methods* 8: 737-743.
158. Spradling AC, Stem DM, Kiss I, Roote J, Lavery T, et al. (1995) Gene disruptions using P transposable elements: An integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10824-10830.
159. Patterson K, Molofsky AB, Robinson C, Acosta S, Cater C, et al. (2004) The functions of Klarsicht and nuclear lamin in developmentally regulated nuclear migrations of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. *Mol Biol Cell* 15: 600-610.
160. Grieder NC, Caussinus E, Parker DS, Cadigan K, Affolter M, et al. (2008) gammaCOP is required for apical protein secretion and epithelial morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 3: e3241.
161. Beskow A, Grimberg KB, Bott LC, Salomons FA, Dantuma NP, et al. (2009) A conserved unfoldase activity for the p97 AAA-ATPase in proteasomal degradation. *J Mol Biol* 394: 732-746.
162. Polychronidou M, Grobhans J (2011) Determining nuclear shape: the role of farnesylated nuclear membrane proteins. *Nucleus* 2: 17-23.
163. Guillemain K, Williams T, Krasnow MA (2001) A nuclear lamin is required for cytoplasmic organization and egg polarity in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 3: 848-851.
164. Spradling AC, Stern D, Beaton A, Rhem EJ, Lavery T, et al. (1999) The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* 153: 135-177.
165. Kondylis V, Rabouille C (2009) The Golgi apparatus: lessons from *Drosophila*. *FEBS Lett* 583: 3827-3838.
166. Lippincott-Schwartz J, Cole NB, Donaldson JG (1998) Building a secretory apparatus: role of ARF1/COPI in Golgi biogenesis and maintenance. *Histochem Cell Biol* 109: 449-462.
167. Beller M, Sztalryd C, Southall N, Bell M, Jackle H, et al. (2008) COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol* 6: e292.
168. Jayaram SA, Senti KA, Tiklova K, Tsarouhas V, Hemphala J, et al. (2008) COPI vesicle transport is a common requirement for tube expansion in *Drosophila*. *PLoS One* 3: e1964.
169. Kitazawa D, Yamaguchi M, Mori H, Inoue YH (2012) COPI-mediated membrane trafficking is required for cytokinesis in *Drosophila* male meiotic divisions. *J Cell Sci* 125: 3649-3660.
170. Tisdale EJ, Jackson MR (1998) Rab2 Protein Enhances Coatamer Recruitment to Pre-Golgi Intermediates. *The Journal of Biological Chemistry* 11.
171. Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 98-106.
172. Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 631-643.
173. Südhof TC, Rothman JE (2009) Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. *Science* 323.
174. Tao-Cheng JH, Pham A, Yang Y, Winters CA, Gallant PE, et al. (2015) Syntaxin 4 is concentrated on plasma membrane of astrocytes. *Neuroscience* 286: 264-271.
175. Xie L, Zhu D, Dolai S, Liang T, Qin T, et al. (2015) Syntaxin-4 mediates exocytosis of pre-docked and newcomer insulin granules underlying biphasic glucose-stimulated insulin secretion in human pancreatic beta cells. *Diabetologia* 58: 1250-1259.
176. Burgess RW, Deitcher DL, Schwarz TL (1997) The synaptic protein syntaxin1 is required for cellularization of *Drosophila* embryos. *J Cell Biol* 138: 861-875.
177. Hickson GR, Matheson J, Riggs B, Maier VH, Fielding AB, et al. (2003) Arfophilins are dual Arf/Rab 11 binding proteins that regulate recycling endosome distribution and are related to *Drosophila* nuclear fallout. *Mol Biol Cell* 14: 2908-2920.
178. Horgan CP, McCaffrey MW (2009) The dynamic Rab11-FIPs. *Biochem Soc Trans* 37: 1032-1036.
179. Kang JH, Toita R, Kim CW, Katayama Y (2012) Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design. *Biotechnol Adv* 30: 1662-1672.
180. Rust HL, Thompson PR (2011) Kinase consensus sequences: a breeding ground for crosstalk. *ACS Chem Biol* 6: 881-892.

181. Nagai-Tamai Y, Mizuno K, Hirose T, Suzuki A, Ohno S (2002) Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes to Cells* 7: 1161-1171.
182. Hutterer A, Betschinger J, Petronczki M, Knoblich JA (2004) Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Cell* 6: 845-854.
183. Wodarz A, Ramrath A, Grimm A, Knust E (2000) *Drosophila* Atypical Protein Kinase C Associates with Bazooka and Controls Polarity of Epithelia and Neuroblasts. *The Journal of Cell Biology* 18: 1361-1374.
184. Sundborger AC, Hinshaw JE (2014) Regulating dynamin dynamics during endocytosis. *F1000Prime Rep* 6: 85.
185. Fujise A, Mizuno K, Ueda Y, Osada S, Hirai S, et al. (1994) Specificity of the high affinity interaction of protein kinase C with a physiological substrate, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate. *J Biol Chem* 269: 31642-31648.
186. Hurd TW, Fan S, Liu C-J, Kweon HK, Hakansson K, et al. (2003) Phosphorylation-Dependent Binding of 14-3-3 to the Polarity Protein Par3 Regulates Cell Polarity in Mammalian Epithelia. *Current Biology* 13: 2082-2090.
187. McGrail M, Gepner J, Silvanovich A, Ludmann S, Serr M, et al. (1995) <J Cell Biol-1995-McGrail-411-25.pdf>. *The Journal of Cell Biology* 131:2: 411-425.
188. Beronja S, Laprise P, Papoulas O, Pellikka M, Sisson J, et al. (2005) Essential function of *Drosophila* Sec6 in apical exocytosis of epithelial photoreceptor cells. *J Cell Biol* 169: 635-646.
189. Bauer A, Kuster B (2003) Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem* 270: 570-578.
190. Brajenovic M, Joberty G, Kuster B, Bouwmeester T, Drewes G (2004) Comprehensive proteomic analysis of human Par protein complexes reveals an interconnected protein network. *J Biol Chem* 279: 12804-12811.
191. Musch A, Cohen D, Yeaman C, Nelson WJ, Rodriguez-Boulan E, et al. (2002) Mammalian homolog of *Drosophila* tumor suppressor lethal (2) giant larvae interacts with basolateral exocytic machinery in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 13: 158-168.
192. Tisdale EJ (2003) Rab2 interacts directly with atypical protein kinase C (aPKC) iota/lambda and inhibits aPKC_{iota/lambda}-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase phosphorylation. *J Biol Chem* 278: 52524-52530.
193. Pocha SM, Wassmer T, Niehage C, Hoflack B, Knust E (2011) Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant Crumbs. *Curr Biol* 21: 1111-1117.
194. Baetz NW, Goldenring JR (2013) Rab11-family interacting proteins define spatially and temporally distinct regions within the dynamic Rab11a-dependent recycling system. *Mol Biol Cell* 24: 643-658.
195. Fletcher GC, Lucas EP, Brain R, Tournier A, Thompson BJ (2012) Positive feedback and mutual antagonism combine to polarize Crumbs in the *Drosophila* follicle cell epithelium. *Curr Biol* 22: 1116-1122.
196. Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, et al. (2001) Atypical Protein Kinase C Is Involved in the Evolutionarily Conserved PAR Protein Complex and Plays a Critical Role in Establishing Epithelia-specific Junctional Structures. *The Journal of Cell Biology* 152:6: 1183-1196.
197. Chen W, Goff MR, Kuang H, Chen G (2015) Higher protein kinase C zeta in fatty rat liver and its effect on insulin actions in primary hepatocytes. *PLoS One* 10: e0121890.
198. Murray NR, Kalari KR, Fields AP (2011) Protein kinase C_{iota} expression and oncogenic signaling mechanisms in cancer. *J Cell Physiol* 226: 879-887.
199. Wu S, Mehta SQ, Pichaud F, Bellen HJ, Quirocho FA (2005) Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 12: 879-885.
200. Louise L Collins GS, Johanne Matheson, Christine Wu, M Clare Miller, Tetsuhisa Otani, Xinzi Yu, Sighe Hayashi, Rytis Prekeris and Gwyn W Gould (2012) Rab11-FIP3 is a cell cycle-regulated phosphoprotein. *BMC Cell Biology* 13.
201. Horgan CP, Oleksy A, Zhdanov AV, Lall PY, White IJ, et al. (2007) Rab11-FIP3 is critical for the structural integrity of the endosomal recycling compartment. *Traffic* 8: 414-430.

