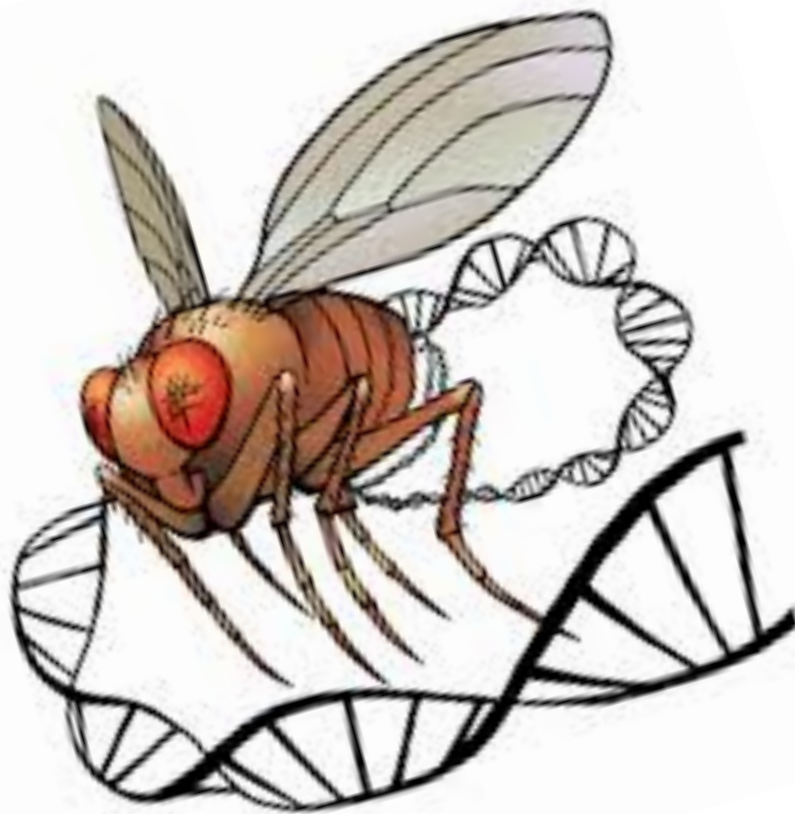


Dues cares de la mateixa moneda

Estudi del rol dual de la via JNK en *Drosophila melanogaster*



Pseudònim: Dr. Emmett Brown

ÍNDEX

0. INTRODUCCIÓ.....	4
1. PART TEÒRICA	6
1.1. Càncer.....	6
1.2. Tumors.....	6
1.3. Característiques distintives del càncer	7
1.3.1. Hallmarks of cancer: the next generation.....	9
1.4. Inestabilitat cromosòmica (CIN)	11
1.5. Senyalització cel·lular	12
1.5.1. Vies de senyalització	13
1.6. Transgènics	15
1.7. Drosophila melanogaster	16
1.7.1. Model genètic.....	16
1.7.2. Disc imaginal d'ala com a model d'epiteli.....	18
1.7.3. Genètica en Drosophila melanogaster.....	20
1.7.3.1. Sistema GAL4/UAS.....	20
1.7.3.2. CIN en Drosophila.....	22
1.7.3.3. Hipomorfs i dominants negatius	23
1.7.3.4. Via JNK.....	23
2. PART EXPERIMENTAL.....	26
2.1. Creuaments	26
2.1.1. Creuament control.....	27
2.1.2. Creuament control per a CIN (amb i sense p35).....	28
2.1.2.1. Bloqueig element positiu via JNK (amb i sense p35)	30
2.1.2.2. Sobre expressió de l'element negatiu via JNK (amb i sense p35)...	33

2.2. Immunotinció	34
2.2.1. Procediment per a la immunotinció	35
2.3. Microscopia	37
3. RESULTATS	39
3.1. Ap-GAL4, UAS-Tom Control 0	39
3.2. L'activació de la via JNK en els models amb CIN provoca l'eliminació de les cèl·lules aberrants	40
3.2.1. Ap-GAL4, UAS-bub3 ^{RNAi} sense p35 Control per a CIN	40
3.2.1.1. Ap-GAL4, UAS-bub3 ^{RNAi} sense p35 amb Hep75	41
3.2.1.2. Ap-GAL4, UAS-bub3 ^{RNAi} sense p35 amb Puc2A	42
3.3. L'activació de la via JNK en els models amb CIN on la mort cel·lular es troba inhibida afavoreix el creixement i la malignitat dels tumors.....	44
3.3.1. Ap-GAL4, UAS-bub3 ^{RNAi} amb p35 (control per a p35)	44
3.3.1.1. Ap-GAL4, UAS-bub3 ^{RNAi} amb p35 amb Hep75	45
3.3.1.2. Ap-GAL4, UAS-bub3 ^{RNAi} amb p35 amb Puc2A	46
4. CONCLUSIONS	48
5. DISCUSSIONS	49
6. AGRAÏMENTS.....	51
7. BIBLIOGRAFIA.....	52

0. INTRODUCCIÓ

Quan vaig començar el treball de recerca no sabia exactament sobre quin tema tractar tot i que tenia clar que aquest havia d'estar relacionat amb les ciències biomèdiques; i és que des de fa temps que tinc gairebé decidit que m'agradaria treballar en un laboratori i fer investigació en l'àmbit de la medicina, ja que m'apassiona poder arribar a comprendre el funcionament del cos humà i de quina manera les malalties afecten a aquest.

Em considero una persona molt afortunada, ja que a finals del 2015 vaig ser seleccionat per a poder formar part del programa "Crazy About Biomedicine", un programa inclòs dins el projecte "Bojos per la ciència" que impulsa la Fundació Catalunya-La Pedrera. Les sessions d'aquest curs es duen a terme en l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB), situat dins el Parc Científic de Barcelona, i consten tant de xerrades a nivell teòric com de sessions pràctiques que permeten conèixer de primera mà com es treballa en un laboratori i aprofundir en el camp de la biomedicina.

Va ser justament des d'aquest programa des d'on se'm va oferir la possibilitat de realitzar el treball de recerca en un laboratori de l'IRB amb un tutor especialitzat en la matèria. Vaig aprofitar l'ocasió, i durant els mesos de juliol i agost vaig dur a terme la part pràctica del meu treball de recerca al laboratori Marco Milán.

Concretament se'm va donar l'oportunitat de treballar en els processos moleculars que afecten al càncer, una malaltia genètica molt complexa i una de les principals malalties pel que fa a mortalitat a nivell mundial, segons dades de la OMS. Aquesta mateixa organització estima que durant l'any 2016, només a Estats Units, 1.685.210 nous casos de càncer seran detectats i que 595.690 persones moriran per culpa d'aquesta malaltia. Una altra dada que fa que el càncer sigui tant important en termes de recerca és la que ens ofereix l'"Instituto Nacional del Cáncer" que ens informa que cada any a 454,8 de cada 100.000 persones, de qualsevol de les edats, els és detectat un càncer a l'estat espanyol.

Dins dels processos que es produeixen en el càncer, vaig tenir la possibilitat de centrar-me en un dels mecanismes involucrats en l'activació tumoral, com és la via que analitzarem, anomenada JNK.

L'objectiu principal del treball és **l'anàlisi del rol dual de la via de senyalització JNK** en la supressió i promoció del desenvolupament de tumors.

Com a objectius específics, la **generació d'un model d'inestabilitat cromosòmica (CIN) amb aneuploïdia** en el que es demostrï que la via de JNK és necessària per a que les cèl·lules aneuploides (aberrants) morin i s'eliminin de l'epiteli. Paral·lelament, també **generar un model de CIN en el que la mort cel·lular s'hi trobi bloquejada** (com

succeeix en les cèl·lules cancerígenes) per a demostrar que aquesta via és essencial pel creixement i la malignitat dels tumors.

A part d'aquests objectius pràctics que es presenten per al treball també en sorgeixen alguns de caràcter personal com **aprendre el màxim possible** sobre aquells temes que més m'apassionen de la biologia molecular, **conèixer les tècniques que s'usen actualment** en laboratoris i permetre'm **endinsar-me** en el món de la **recerca** professional.

Un cop exposats els objectius, el treball planteja la següent hipòtesi a resoldre:

- **L'activació de la via JNK pot tenir un rol anti-tumoral** (mitjançant l'activació de la via apoptòtica) **o pro-tumoral** (a través de l'expressió de gens que promoguin el creixement neoplàstic) **depenent del context cel·lular en que es trobi.**

Per tal d'assolir tant els objectius com la hipòtesi que exposem, el treball consta de dues parts: una part teòrica, que consisteix en la descripció dels conceptes necessaris per a la comprensió dels experiments que es realitzaran, i una part pràctica que consisteix en dur a terme aquests experiments amb un procediment realitzat íntegrament en les instal·lacions de l'IRB.

1. PART TEÒRICA

1.1. Càncer

Càncer és el nom que s'atorga a un conjunt de malalties relacionades i que comparteixen un seguit de característiques anomenades *Hallmarks of cancer* que anunciarem i explicarem posteriorment.

El càncer pot començar gairebé en qualsevol teixit de l'organisme, el qual en l'espècie humana està format per bilions de cèl·lules. En un organisme sa, aquestes creixen i es divideixen per a formar-ne de noves a mesura que el cos les va necessitant. Quan les cèl·lules normals envelleixen o pateixen algun dany, es moren y són substituïdes per altres de noves.

En el càncer però, aquest procés ordenat es descontrola. A mesura que les cèl·lules es fan més i més anormals, les cèl·lules velles o danyades sobreviuen quan haurien de morir i se'n formen de noves quan no són necessàries. Aquestes cèl·lules addicionals poden dividir-se ininterrompudament i formar masses anomenades **tumors**.

1.2. Tumors

Entenem com a tumor, aquella massa anormal de teixit que s'origina quan les cèl·lules sofreixen algun tipus d'alteració i es multipliquen més del compte o no moren quan haurien de fer-ho. Els tumors també poden ser anomenats com a **neoplàsies** i se'n poden distingir de dos tipus:

- **Benignes o hiperplàsies:** Es tracta d'una neoplàsia que no compta amb la mateixa agressivitat que la dels tumors malignes. Això significa que no té la capacitat ni d'envair els teixits més propers ni d'incorporar-se al torrent sanguini i arribar a un òrgan o teixit llunyà provocant metàstasi. A diferència dels malignes tampoc creix tant agressivament.

Majoritàriament, les neoplàsies benignes no acostumen a ser una amenaça per a la vida ja que es poden extirpar i no solen reaparèixer. Això és degut a que les cèl·lules en aquest es troben molt juntes i a que sovint estan envoltades per una membrana que les aïlla.

- **Malignes o cancerosos:** Aquests tenen una velocitat de creixement molt ràpida i ho fan de manera molt agressiva i sense tenir en compte els estímuls que reben del medi que els envolta. Les neoplàsies malignes solen envair tant els

teixits que els són propers com els òrgans i teixits que es troben lluny del càncer ocasionant la metàstasi.

Els tumors malignes són capaços de produir **metàstasi** ja que compten amb la capacitat de passar entre les parets que aguanten les estructures epitelials i introduir-se tant en el sistema circulatori com en el sistema limfàtic, que els permeten viatjar per l'organisme.

1.3. Característiques distintives del càncer

El càncer és una malaltia que durant el temps va desenvolupant un seguit de mutacions genètiques que es van acumulant en les cèl·lules. Les característiques que varien en les que estan sanes durant aquest procés fins a poder ser considerades com a cèl·lules cancerígenes són anomenades característiques distintives del càncer, o més conegudes pel seu nom original en anglès de "Hallmarks of cancer". Per tant aquestes són el conjunt de segells distintius o de diferències entre les cèl·lules normals i les cancerígenes.

Tot i que cadascuna de les "Hallmarks" contribueixi al càncer, no és fins que una cèl·lula exposa el conjunt de característiques que pot ser considerada com a cancerígena. L'any 2000 els científics Douglas Hanahan i Robert Weinberg van publicar que aquestes característiques eren sis i es podien enumerar i explicar de la següent manera:

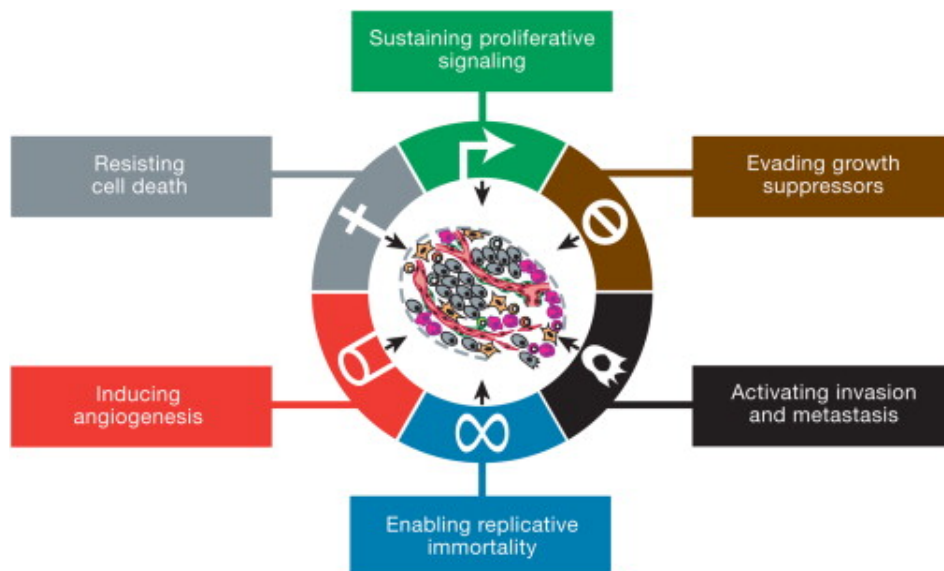


Figura 1. *Hallmarks of cancer* descriu l'any 2000 per Douglas Hanahan i Robert Weinberg. En sentit horari i començant per la Hallmark superior, el seu nom en català és el següent: 1. Regulació de la divisió cel·lular autosuficient, 2. Evasió de senyals supressores pel creixement, 3. Activació de la capacitat d'invasió i metàstasi, 4. Capacitat per a multiplicar-se indefinidament, 5. Inducció de l'angiogènesi, 6. Resistència a la mort cel·lular. FONT: [http://www.cell.com/abstract/S0092-8674\(11\)00127-9](http://www.cell.com/abstract/S0092-8674(11)00127-9)

1. **Regulació de la divisió cel·lular autosuficient:** Les cèl·lules dels diferents teixits necessiten comunicar-se i treballar plegades per a complir amb la seva funció correctament. Quan en aquests teixits és necessari el creixement, de manera col·lectiva, les cèl·lules s'envien senyals per a iniciar la divisió.

De manera contrària, les cèl·lules cancerígenes no compten amb aquest comportament i es controlen la seva pròpia proliferació mitjançant, o bé la producció de senyals de creixement per a elles mateixes, o bé tenint els receptors que capten aquests senyals extremadament actius.

2. **Evasió de senyals supressores pel creixement:** D'igual manera com existeixen senyals que estimulen la proliferació de les cèl·lules, n'hi ha que bloquegen el creixement i la propagació d'aquestes. Les cèl·lules cancerígenes però, són capaces d'interrompre o ignorar aquests missatges d'inhibició.

Habitualment això és degut a la mutació en els gens coneguts com a "gens supressors de tumors", que controlen la resposta que efectua la cèl·lula amb els diferents senyals que rep corresponents al cicle de divisió cel·lular.

3. **Activació de la capacitat d'invasió i metàstasis:** Una altra de les capacitats d'una cèl·lula cancerígena és poder trencar les barreres que separen els teixits i poder travessar les parets dels vasos sanguinis permetent la seva incorporació a la sang i la consegüent proliferació en una altra zona de l'organisme provocant la metàstasis.
4. **Capacitat per a multiplicar-se indefinidament:** En els tumors malignes un dels factors que fa que el nombre de cèl·lules que hi ha sigui tant elevat és la capacitat infinita que tenen per a dividir-se. En més del 90% dels casos, aquesta característica és adquirida quan degut a les mutacions en el DNA, l'enzim telomerasa és activat.

En la divisió d'una cèl·lula normal, una petita porció al final de cada cromosoma, anomenada telòmer, es perd; això significa que en cada còpia una part del DNA desapareix. L'acumulació d'aquestes pèrdues fa arribar a la cèl·lula a un punt crític on perd la capacitat de replicar-se i activa l'apoptosi¹. D'aquesta manera les cèl·lules sanes tenen un nombre determinat de divisions programades, però en les cancerígenes

¹ **Apoptosi:** Mecanisme de suïcidi cel·lular programat en els organismes pluricel·lulars degut a una sèrie de reaccions bioquímiques.

l'enzim telomerasa evita aquesta pèrdua de DNA en els telòmers, pel que les fa "immortals".

5. **Inducció de l'angiogènesi²:** Per a que un tumor creixi i s'expandeixi ràpidament, aquest necessita una gran quantitat de subministrament de sang per tal de poder obtenir tant l'oxigen com els nutrients necessaris per a poder alimentar-se i dividir-se. Una de les capacitats que desenvolupa una cèl·lula cancerígena és l'aptitud per a estimular la formació de vasos sanguinis en el seu entorn més proper.
6. **Resistència a la mort cel·lular:** Quan les cèl·lules normals envelleixen o pateixen un dany, activen el procés d'apoptosi. D'aquesta manera l'organisme és capaç de limitar el creixement i de desfer-se de les cèl·lules amb mutacions al DNA per tal de prevenir tant l'acumulació d'alteracions com la propagació de les que estan malmeses.

Les cèl·lules cancerígenes també són perilloses per la capacitat que tenen d'evitar el cicle normal de mort cel·lular pel que es poden acumular en l'organisme i seguir incrementant el nombre de mutacions. Aquests senyals que indueixen a l'apoptosi poden ser interromputs quan els gens supressors de tumors sofreixen alguna mutació i resulten malmesos.

1.3.1. Hallmarks of cancer: the next generation

Els mateixos autors de l'article *Hallmarks of cancer* van anunciar al 2011 el descobriment de 4 noves *Hallmarks* del càncer en la *review* titulada com a *Hallmarks of cancer: The next generation*. D'aquestes quatre, dos són capacitats que desenvolupa qualsevol cèl·lula cancerígena (com ho eren les anteriors sis) i les altres dues són les característiques necessàries que han de donar-se per a que una cèl·lula pugui adquirir totes les *Hallmarks* i sigui considerada com a cancerígena. Aquestes s'agrupen i s'expliquen de la següent manera:

Noves Hallmarks

7. **Alteració dels processos d'obtenció d'energia:** Fins i tot augmentant el volum de sang que els tumors reben, en moltes ocasions pot haver-hi una carència d'oxigen o nutrients en aquest que n'impedeixi l'obtenció d'energia degut a l'aglomeració de cèl·lules que es formen en les neoplàsies.

² **Angiogènesi:** Procés fisiològic que consisteix en la formació de vasos sanguinis nous a partir de vasos preexistents.

Aquesta falta de components seria fatal per a qualsevol cèl·lula sana, ja que utilitza l'oxigen per a transformar glucosa en energia mitjançant un procés de metabolisme aeròbic. Les cèl·lules cancerígenes però, adquireixen la capacitat de poder canviar de mètode d'obtenció d'energia segons la quantitat de nutrients i oxigen del seu ambient. En condicions on escasseja l'oxigen, aquestes varien d'un mètode aeròbic a un d'anaeròbic (sense oxigen) per a metabolitzar la glucosa i obtenir energia.

8. **Capacitat d'evitar el sistema immunitari:** En un funcionament habitual, el sistema immunitari detecta i destrueix qualsevol element patògen o cèl·lula anormal de l'organisme. Tot i que no s'entén completament el procés que utilitzen les cèl·lules cancerígenes, hi ha evidències que aquestes són capaces d'evitar ser destruïdes pel sistema immune en un cert grau (depenent del càncer), permetent la seva proliferació i la invasió d'altres teixits.

Característiques necessàries

1. **Inestabilitat genòmica:** Els gens són segments de DNA que aporten les instruccions necessàries per a l'activitat dins de la cèl·lula. L'acumulació de canvis en gens específics que promoguin la divisió cel·lular o que facin variar el funcionament dels mecanismes habituals de la cèl·lula poden fer que les no cancerígenes adquireixen les diferents *Hallmarks* degut a aquestes alteracions en el codi genètic i les converteixen en cèl·lules tumorals.
2. **Inflamació:** La inflamació crònica en els teixits és la segona de les característiques que ajuda al desenvolupament de les neoplàsies malignes. Aquesta inflor pot produir condicions favorables que promoguin la proliferació i la supervivència cel·lular i també l'angiogènesi. La inflamació pot augmentar tanmateix la producció de radicals lliures que alterin de manera irreversible el DNA.

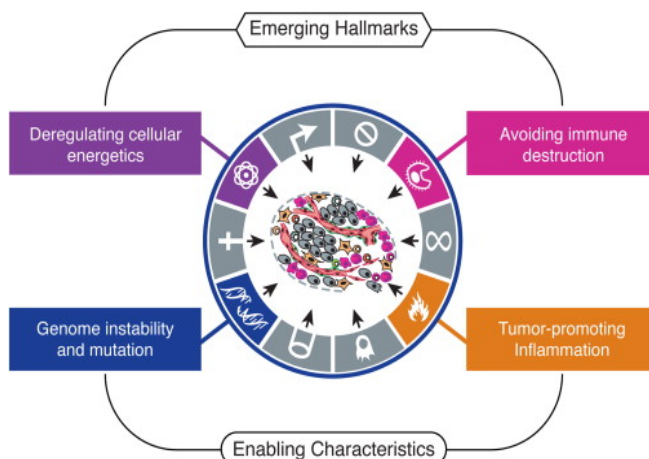


Figura 2. 4 noves Hallmarks descrites l'any 2011 en l'article *Hallmarks of cancer: The next generation*. Les noves hallmarks en la part superior, i les dues característiques necessàries en la part inferior. De color gris les 6 altres hallmarks. FONT: [http://www.cell.com/abstract/S0092-8674\(11\)00127-9](http://www.cell.com/abstract/S0092-8674(11)00127-9)

1.4. Inestabilitat cromosòmica (CIN)

Com hem vist anteriorment, les mutacions i la inestabilitat genòmica són una de les dues característiques que permeten desenvolupar les diferents *Hallmarks* del càncer. Alguns dels diferents tipus de canvis genètics que provoquen aquesta heterogeneïtat en les diferents cèl·lules d'un organisme són: les mutacions espontànies en el DNA, les translocacions cromosòmiques i l'amplificació o la supressió de gens.

Un altre camí que també acaba amb la producció de cèl·lules aberrants genèticament diferents és la segregació o repartiment erroni dels cromosomes durant la mitosi, anomenat generalment pel nom d'inestabilitat cromosòmica (CIN). Al seu torn, la CIN és un factor que també indueix a la tumorigènesi³ i per tant a la formació de les diferents *Hallmarks* del càncer.

La conseqüència directa més freqüent que provoca la CIN és l'aneuploïdia⁴. La inducció de CIN en alguns teixits ha estat una de les tècniques més utilitzades durant dècades en els laboratoris per a provocar la producció de tumors en animals com ara la mosca de la fruita.

Tot i que els termes CIN i aneuploïdia estiguin molt relacionats no són sinònims i per tant no poden ser usats indistintament. Les diferències entre els dos mots són les següents:

- Pot haver **aneuploïdia sense CIN**: En molts casos l'alteració del nombre habitual dels cromosomes o aneuploïdia pot aparèixer independentment de la inestabilitat cromosòmica com a resultat d'un eventual mal repartiment dels cromosomes amb la conseqüent expansió d'aquesta cèl·lula inicial amb aneuploïdia. En aquests casos, els tumors que hi puguin aparèixer comptaran amb un alteració **homogènia** del nombre normal de cromosomes ja que totes les cèl·lules provindran de la mateixa i tindran el mateix nombre anormal de cromosomes.
- La **CIN provoca** en molts casos **aneuploïdia**. D'altra banda, quan un organisme compta amb CIN, en aquest molt probablement hi apareixerà un tumor format majoritàriament per cèl·lules amb aneuploïdies diferents o **heterogènies** degut a que en totes les divisions cel·lulars anirà variant el nombre de cromosomes que tindran les dues cèl·lules descendents per la inestabilitat cromosòmica.

Per a detectar si un teixit o un grup de cèl·lules compta amb inestabilitat cromosòmica i no confondre-ho amb alguna mutació esporàdica o algun altre tipus de mutació genòmica, s'hauran de seguir els criteris següents:

³ **Tumorigènesi**: Procés d'iniciar i promoure un tumor.

⁴ **Aneuploïdia**: Alteració en el nombre normal (generalment dos) d'exemplars d'un o més tipus de cromosomes, sense arribar a afectar al joc complet.

- En la CIN hi ha d'haver sempre un **ritme de modificacions** dels cromosomes o de llargues porcions d'aquests que pot variar en funció de les diferents cèl·lules.
- Ha d'haver-hi comparació entre les cèl·lules o grups d'aquestes afectades per tal de determinar que hi ha CIN **en lloc** de mirar cada **cèl·lula** de manera **individual**.
- Els ritmes de modificació cromosòmica del grup de cèl·lules que s'analitzin han de ser **comparats amb un altre conjunt** d'aquestes que se sàpiga que no tenen inestabilitat cromosòmica, sobretot si comptem amb poques cèl·lules amb potencial CIN.

1.5. Senyalització cel·lular

La senyalització cel·lular és el procés mitjançant el qual les cèl·lules es comuniquen entre elles, produint diferents molècules senyal intermediàries que les cèl·lules diana reconeixen, fet que les permet desenvolupar una resposta específica.

Els senyals són captats per la cèl·lula a través de receptors específics que poden trobar-se tant en la membrana cel·lular com en l'interior d'aquesta (**Figura 3**). Aquestes molècules desencadenen un seguit d'esdeveniments senzills en la cèl·lula, com la síntesi d'una proteïna o l'obertura de canals.

La resposta que tindrà la cèl·lula pot ser de 2 tipus depenent del receptor que capta el senyal extern:

1. **Receptor acoblat a un canal:** Si la molècula s'adhereix a un d'aquests receptors, la resposta automàtica que desencadenarà la cèl·lula és l'obertura del canal permetent l'entrada d'aquesta al citoplasma. En aquest cas, un cop realitzat aquest simple procés no s'activarà cap altra molècula per a la continuació del senyal.
2. **Adheriment a una proteïna de la membra:** En aquest cas, la unió de la molècula senyal amb la membrana cel·lular produirà una segona molècula missatgera per a realitzar la seva funció.

Suposant que l'objectiu sigui la fabricació d'una determinada proteïna, aquesta segona molècula inicia un procés intracel·lular on s'activaran diferents enzims o proteases fins a arribar a la síntesi de la proteïna desitjada. Aquesta relació entre els diferents missatgers fins a la resposta final s'anomena **via de senyalització**.

Aquest segon tipus de transducció del senyal permet millorar la regulació dels efectes que tindrà l'estímul sobre la cèl·lula i també fa possible l'amplificació de la resposta. En el cas de la **Figura 3**, podem observar com un senyal extern estimula la producció de diversos segons missatgers que a la vegada activen a diversos enzims permetent crear una resposta amplificada amb un sol estímul.

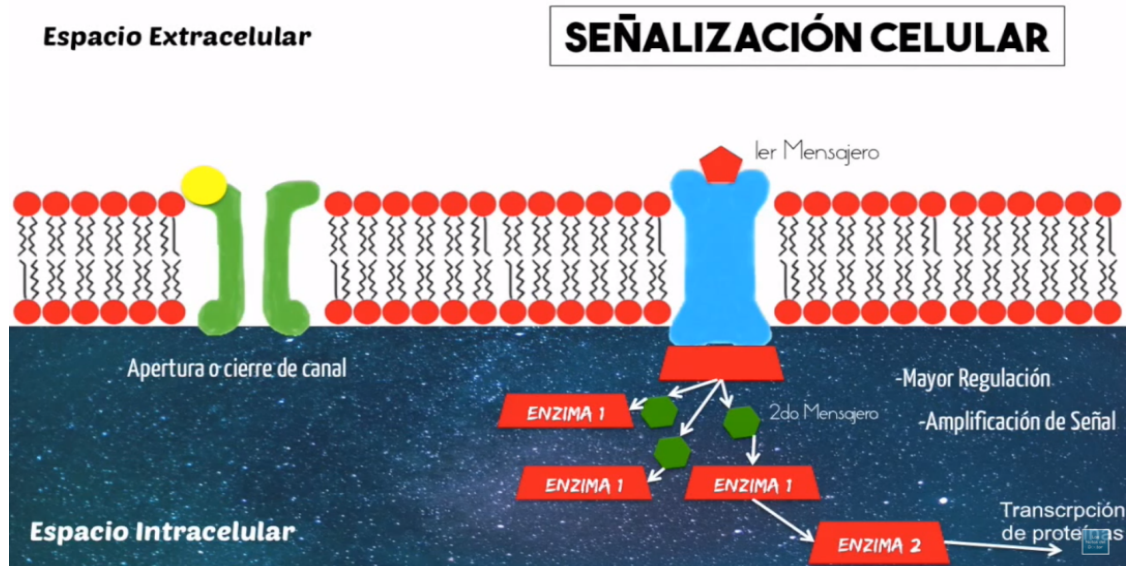


Figura 3. Tipus de senyalització cel·lular. A l'esquerra el receptor acoblat a un canal i a la dreta l'adheriment a una proteïna de membrana. FONT: <https://www.youtube.com/watch?v=ByiTyMLW56k>

1.5.1. Vies de senyalització

També anomenades vies de transducció de senyals, les rutes de senyalització cel·lular són el procés que es dona com a resposta quan una molècula específica s'uneix a un receptor durant la comunicació o senyalització cel·lular. La transmissió del senyal dins la cèl·lula és possible gràcies a l'acció d'uns complexos proteïcs anomenats enzims, que ajuden a que es produeixin les diferents reaccions químiques en les molècules missatgeres durant tot el procés. El senyal pot ser amplificat en qualsevol punt de la via, el que significa que una sola molècula senyal pot produir respostes que impliquin la participació de milers de molècules.

Les vies de senyalització acaben per generar una resposta en la cèl·lula com pot ser alterar el metabolisme, activar l'expressió de gens, iniciar el procés de divisió cel·lular o desencadenar l'apoptosi entre moltes altres. En la **Figura 4** podem observar un esquema amb les vies de senyalització més importants que es donen en els mamífers i les respostes que aquestes produeixen.

Tot i que en la part experimental d'aquest treball prendrem la mosca de la fruita com a animal de referència, cal tenir en compte que totes les rutes les tenim compartides amb aquests insectes (en el cas dels humans, les vies de senyalització són més complexes i redundants) i que fins i tot algunes de es rutes dels mamífers han estat descobertes utilitzant la mosca de la fruita. Concretament la via en la que ens centrarem en aquest treball, la ruta de JNK, té el seu homòleg en els mamífers on té la funció d'activar la regulació gènica d'igual manera que en la mosca de la fruita, tot i que en el cas dels humans aquesta tingui fins a tres rutes, fent-la més complexa i difícil d'estudiar i de comprendre.

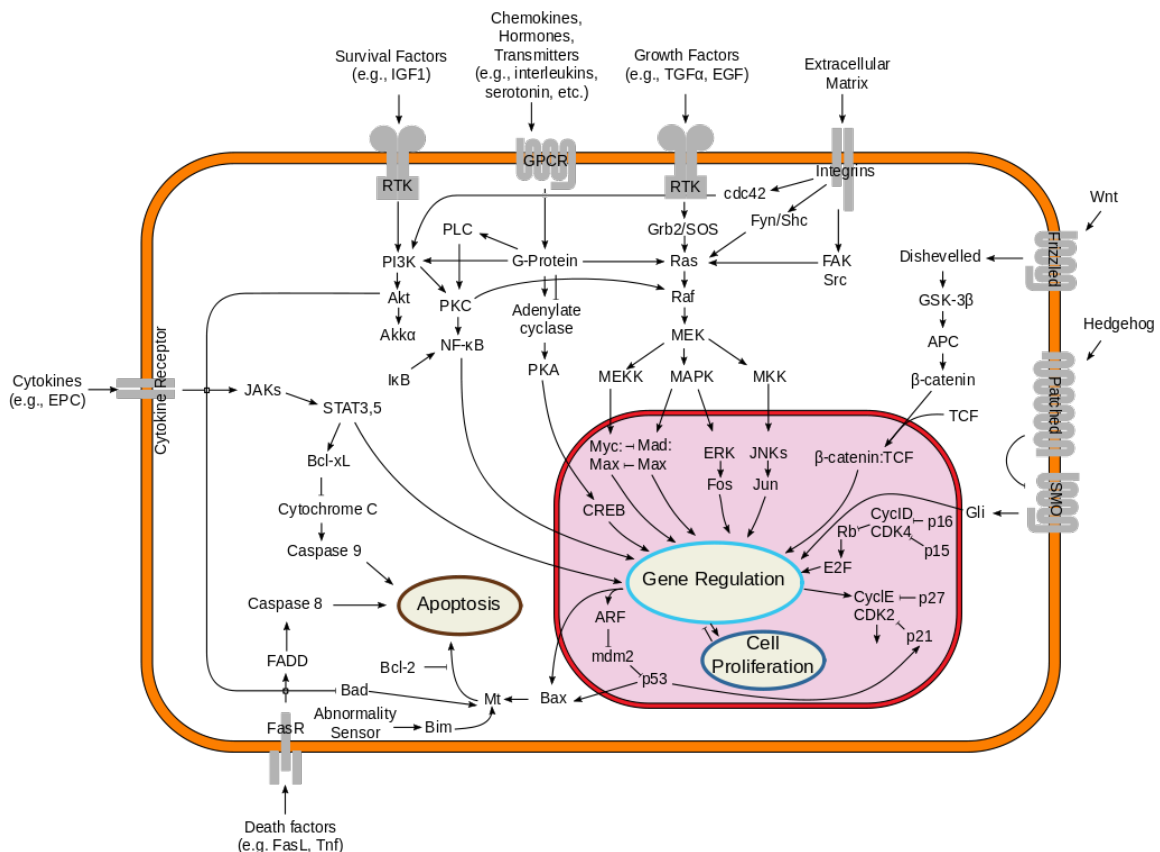


Figura 4. Resum de les vies de senyalització cel·lulars més importants en mamífers. Es poden observar tres de les respostes més importants d'aquestes com l'apoptosi, la regulació gènica i la proliferació cel·lular.

FONT: https://en.wikipedia.org/wiki/Signal_transduction#/media/File:Signal_transduction_pathways.svg

Dins les vies de senyalització cel·lulars hi ha dos noms de conceptes específics que cal saber, per a poder entendre millor la comunicació entre les diferents molècules de la ruta:

- **Quinasa:** Les quinases són el nom que reben els enzims que transmeten grups fosfat a proteïnes específiques i que, com a resultat, causen una alteració en la seva activitat. En les vies de senyalització, alguns dels resultats més comuns són l'activació d'una altra quinasa o l'alteració d'una proteïna que activi algun factor de transcripció.

- **Fosforilació:** S'anomena fosforilació al procés pel qual una quinasa transmet un grup fosfat. Aquest canvi de grup fosfat pot ser capgirat per l'acció d'una fosfatasa, la qual torna aquest grup a la proteïna anteriorment fosforilada. El procés de fosforilació permet l'activació de la transducció de senyals, pel que juga un paper molt important en molts dels processos biològics interns.

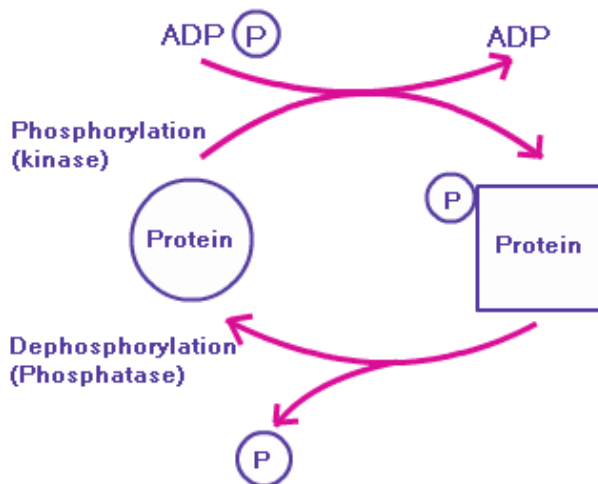


Figura 5. Esquema dels processos de fosforilació (mitjançant una quinasa) i de desfosforilació (amb una fosfatasa). Aquests tenen lloc en proteïnes i requereixen energia per a produir-se (ATP). FONT: <http://chemistry.tutorvista.com/biochemistry/phosphorylation.html>

1.6. Transgènics

S'anomena organisme transgènic o genèticament modificat (OGM) a aquells éssers vius eucariòtics desenvolupats a partir d'una cèl·lula en la qual s'han introduït gens estranys i que no pertanyen a la seva espècie. La introducció de gens en cèl·lules eucariotes resulta molt més complicada de dur a terme que en els bacteris. Això és degut al fet que és més difícil fer permeable la seva membrana.

En els organismes eucariotes com és el cas de les plantes i els animals, per a la inserció dels transgens s'utilitzen tècniques com la microinjecció de bales de metall recobertes de DNA i, en les plantes, els plasmidis d'*Agrobacterium*. En el cas dels bacteris, s'utilitzen vectors, que en la majoria dels casos acostumen a ser virus, per a transportar la seqüència de DNA estranya fins al bacteri. En aquests éssers procariontes el DNA s'unirà amb un fragment de DNA circular anomenat plasmidi.

Els models més utilitzats en els laboratoris per a realitzar aquests experiments són els ratolins, només en fases de l'experiment avançades degut al debat bioètic que provoca i a l'elevat cost d'aquests animals, i l'espècie de la mosca de la fruita, més extensament usada degut als seus molts avantatges. Una de les característiques que influeix en la tria d'aquests models, a part del grau de parentiu genètic amb l'espècie humana, és la facilitat que hi ha alhora de manipular-lo genèticament.

1.7. *Drosophila melanogaster*

1.7.1. Model genètic

L'espècie *Drosophila melanogaster*, popularment coneguda com la “mosca del vinagre” o la “mosca de la fruita”, pertany a l'ordre d'espècies Díptera. Aquesta mosca porta essent estudiada més de 100 anys i a dia d'avui és un dels animals més usats en recerca científica ja que presenta diversos avantatges sobre altres espècies.

- Una de les característiques més interessants d'aquesta espècie és el seu **elevat nombre** pel que fa a la **descendència**, fent que sempre es pugui disposar d'un número considerable de mostres per a l'estudi i per a les seves posteriors rèpliques agafant mostres de la mateixa generació de descendents i per tant amb els mateixos gens d'interès.
- El seu **cost de manteniment** és molt **reduït**. L'únic material que és necessari per al seu bon manteniment són tubs de vidre amb aliment en la seva part inferior i cotó fluix o un altre material que no permeti que les mosques abandonin el tub i que alhora hi deixi entrar aire per a que puguin respirar. A part d'aquests materials necessitarem una càmera on s'hi puguin regular tant la temperatura com les condicions d'humitat. Tot i que aquest últim requisit faci una mica més car el seu manteniment, cal tenir en compte que aquest inconvenient serà present en qualsevol altra espècie.
- Disposa d'un **genoma petit**, si el comparem amb el dels humans, amb tan sols 4 parells de cromosomes i aproximadament 15.500 gens (ja que els humans tenim 23 parells de cromosomes i aproximadament 22.000 gens), fent la manipulació del genoma de la mosca de la fruita una tasca més senzilla que la de moltes altres espècies. El fet de poder manipular el seu genoma amb facilitat ens possibilita la investigació de la funció de gens específics, fent que aquesta sigui una de les característiques més importants a l'hora de considerar aquesta espècie com a model genètic.
- **Té un cicle de vida curt (Figura 6)**, ja que des de la seva etapa d'embrió fins a la d'adult passen aproximadament entre 9 i 15 dies. Aquesta xifra però, varia en funció de la temperatura a la qual s'incuben, essent la temperatura òptima per a la incubació d'aquesta espècie de 25°C, on el cicle de vida de l'insecte fins que arriba a la seva etapa adulta és de 9 dies des de l'eclosió de l'ou. La durada d'aquest cicle augmenta si disminuïm la temperatura, fent que a 20°C el seu cicle vital s'allargui fins als 15 dies. Si s'augmenta la temperatura d'incubació

per sobre els 25°C el cicle també es va allargant fins a una temperatura màxima de 30°C on la mosca comença a presentar dificultats en el seu desenvolupament a causa de l'alta temperatura. Aquesta celeritat en el seu cicle vital fa que es pugui obtenir el model genètic que es desitja en poques setmanes tot i que siguin necessàries diferents generacions.

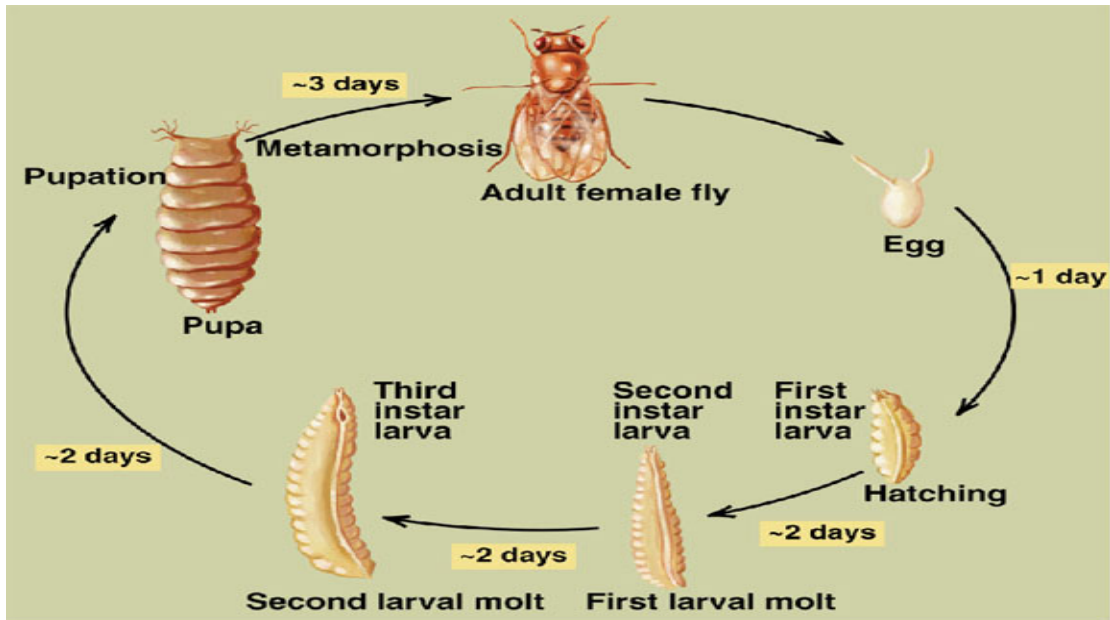


Figura 6. Esquema del cicle de vida de la *Drosophila melanogaster* des de la posta de l'ou fins a l'arribada a la seva etapa adulta. La imatge ens mostra un cicle de vida a una temperatura ideal de 25°C on aquesta triga uns 9 dies a completar aquest cicle. FONT: http://www.zoology.ubc.ca/~bio463/lecture_13.htm

- Tenen **chromosomes balancejadors**. Aquests compten amb les característiques següents:
 - Provoquen **infertilitat en hemizigosi**: Al trobar-se una mosca amb un sol cromosoma X i es tracti d'un cromosoma balancejador, la mosca no serà capaç de produir descendència i per tant ens assegurarem que no continua la línia. Depenent del balancejador, la mosca morirà en diferents estadis de la seva vida.
 - Tenen **inversions, delecions i translocacions**: Això impedeix la recombinació d'aquests amb els seus cromosomes homòlegs.
 - Contenen un **marcador fenotípic dominant**: Cada cromosoma balancejador expressarà un caràcter en el fenotip, ja que aquest és dominant i tot i només trobar-se en un dels dos cromosomes aquest s'expressarà. Aquest marcador ens permetrà reconèixer les mosques que continguin el balancejador únicament mirant-les en una lupa.

La combinació d'aquest sistema amb l'anomenat GAL4/UAS, ens permetrà saber quines de les mosques tenen el genotip que busquem únicament mirant-les a ull nu o amb l'ajuda d'un microscopi de fluorescència. Alguns dels balancejadors més utilitzats i que seran els que usarem en aquest treball són els anomenats *Cyo*, amb un fenotip resultant on la mosca té les ales corbades i la impedirà volar; *TMG*, on les larves són més petites i esfèriques del que és habitual, i *FM7*, on la forma de l'ull de l'insecte pren una forma similar a la d'una barra allargada. En la part experimental del treball aprofundirem en la funció i el fenotip d'aquests.

Aquesta revolució genètica en *Drosophila melanogaster* és possible gràcies a Thomas Hunt Morgan que a principis del segle XX va identificar les primeres mutacions en aquesta espècie. Des de llavors, els científics han desenvolupat una immensa base de dades de mutants genètics d'aquest animal i en les darreres dècades, els investigadors han aconseguit trobar moltes de les eines de manipulació genètica que ens permeten realitzar una gran varietat d'experiments amb aquesta espècie.

L'any 2000 el genoma de *Drosophila melanogaster*, va ser finalment seqüenciat en la seva totalitat. Aproximadament compartim el 60% dels nostres gens amb aquesta espècie animal que tan allunyada sembla de nosaltres. Una dada encara més sorprenent és que més o menys el 75% dels gens que actualment es coneixen involucrats en malalties tenen el seu homòleg en aquesta mosca.

La mosca de la fruita és usada en tots els nivells de la biologia. Particularment, durant els darrers 25 anys, aquesta espècie s'ha convertit en un model vàlid per a aprofundir en la investigació de cadascuna de les *Hallmarks* del càncer.

1.7.2. Disc imaginal d'ala com a model d'epiteli

Els discs imaginals són una espècie de sacs de cèl·lules epitelials que es troben en les larves dels insectes amb metamorfosi completa i representen els primordis d'estructures cuticulars de l'adult que es formaran durant la metamorfosi de la pupa i que inclouen ales, potes, antenes, boca, i genitals; i estan compostos per grups de cèl·lules imaginals, determinades, però indiferenciades.

Drosophila melanogaster és l'espècie on s'han fet els estudis més exhaustius per a conèixer-ne tant la genètica com la morfologia dels discs imaginals. En aquest treball utilitzarem el disc imaginal d'ala com a model epitelial d'estudi al disposar aquest de múltiples eines per a la seva manipulació genètica i la senzillesa alhora de ser extrets de la larva.

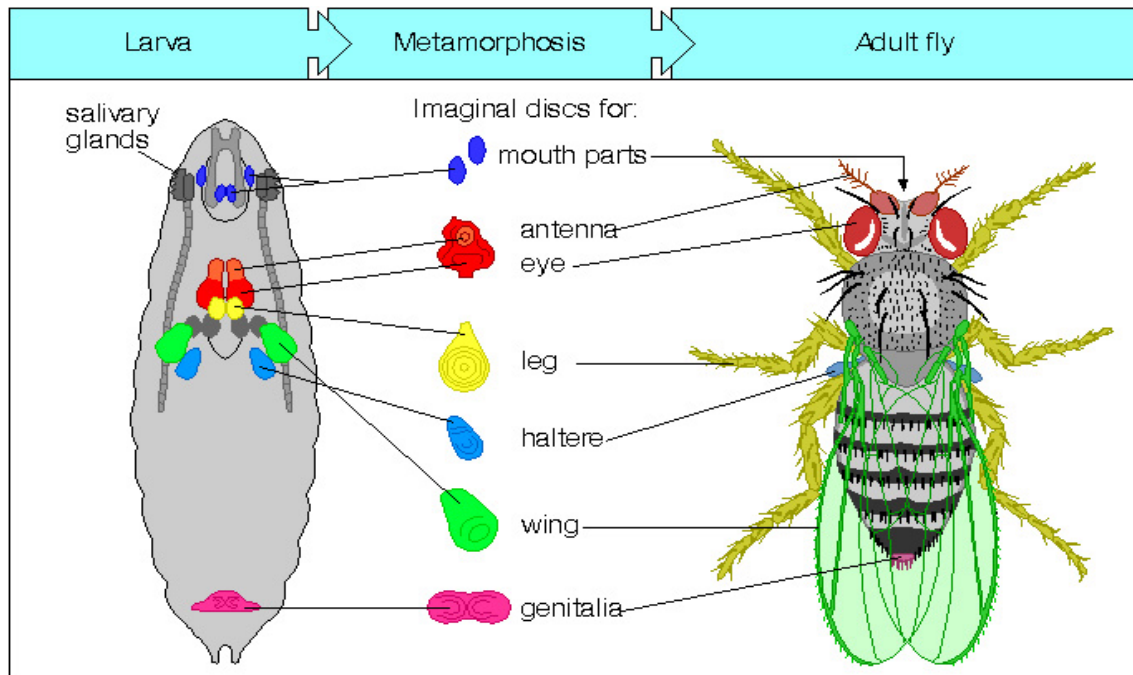


Figura 7. Relació entre la posició i la forma dels discs imaginals de *Drosophila melanogaster* en la larva amb els seus corresponents òrgans en edat adulta un cop transcorreguda l'etapa de metamorfosi. FONT: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_02/DBNDros.html

El disc imaginal d'ala en *Drosophila melanogaster* té una forma irregular semblant a la d'una bombeta, amb la part inferior més arrodonida i la part superior més allargada. El disc es divideix en dues parts, la que correspondrà a la futura part dorsal de l'ala i la que formarà la part inferior d'aquesta. Dins el disc hi ha dues zones que s'han de tenir en compte per a situar-nos i saber distingir les zones del disc imaginal: la primera és la del **Notum**, que un cop la mosca trenqui la pupa correspondrà a la part de l'ala que s'unirà amb el tòrax. La segona és el **Wing pouch** que és la zona més arrodonida de l'ala de blau (unió de blau cel i blau marí) en la **Figura 8** on s'uneixen tant la part dorsal com ventral de l'ala i tant la zona dreta com esquerra. La última a tenir en compte en és la zona de domini d'**Apterous** que és la part del disc imaginal d'ala on hi expressarem la seqüència de bases que acabaran produint els tumors i que correspon a la suma de zones del **Notum**, el **dorsal hinge**, la **dorsal wing surface** i el **wing margin**.

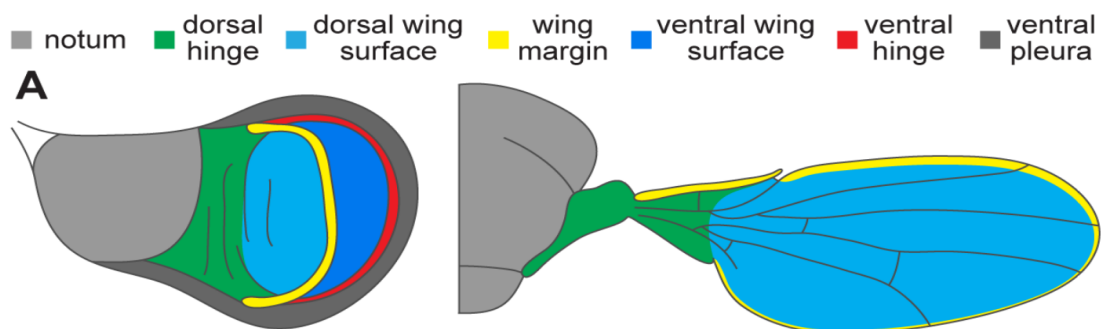


Figura 8. Imatge corresponent als un discs imaginals d'ala de *Drosophila melanogaster* on hi apareixen representades les diferents. També ens fa la comparativa amb la futura ala de la mosca FONT: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002939>

Com tots els epitelis, el disc imaginal d'ala està orientat i ordenat sempre de la mateixa manera presentant una polaritat. Concretament aquest tipus de teixit epitelial compta amb una polaritat apicobasal, el que significa que compten amb una membrana que les separa dels altres teixits per la part de la base, i s'uneixen entre elles mitjançant diverses proteïnes pels costats. La pèrdua d'aquesta polaritat és majoritàriament causada per l'aparició d'un tumor i el creixement incontrolat de les cèl·lules. La pèrdua de l'orientació de les cèl·lules epitelials va acompanyada en diverses ocasions de la producció per part d'aquestes, de proteïnes encarregades de trencar la membrana basal que les separa de la resta de l'organisme i que produeix la invasió del tumor a un altre teixit de l'organisme conegut amb el nom de metàstasi. Una de les proteïnes que duu a terme aquesta funció és la Mmp1, que quantificarem en la part experimental d'aquest treball.

1.7.3. Genètica en *Drosophila melanogaster*

1.7.3.1. Sistema GAL4/UAS

GAL4/UAS és un sistema binari de transcripció que té com a objectiu el control de l'expressió gènica en teixits específics de la mosca de la fruita. Aquest sistema es basa en que la proteïna GAL4 activa a una seqüència UAS (*Upstream Activation System*) col·locada just davant del gen o RNAi d'interès. Aquest sistema és propi de llevats i no existeix en mosques. Això és precisament el que ens permet utilitzar aquest sistema i tenir controlats els gens que s'activen.

- **Línia portadora:** Cada un dels progenitors aporta a la descendència F₁, que és la que comptarà amb el sistema complet, dues de les quatre parts totals del sistema de transcripció, aportant un progenitor el gen per a GAL4 i l'altre la seqüència UAS.

La línia portadora sempre compta amb el promotor de teixit o potenciador genòmic i amb la proteïna GAL4.

- **Promotor de teixit + GAL4:** És la primera part del sistema que es troba just a davant del gen per a GAL4. Aquesta seqüència de DNA és la que marcarà la zona de domini d'expressió de la proteïna GAL4 o el que és el mateix, el teixit o la zona concreta on es produirà GAL4. Al mateix temps aquesta serà la seqüència promotora que iniciarà la transcripció gènica. Pel que fa a GAL4, és la proteïna que s'usa com a factor de transcripció que, per la seva estructura, s'adhereix específicament a les seqüències UAS. Aquesta proteïna prové dels llevats, concretament fou identificada per primer cop en l'espècie *Saccharomyces cerevisiae*.
- **Línia responedora:** Aquesta correspon a l'altre progenitor i és la que aportarà a F₁ la seqüència UAS i el gen o RNAi que es vol activar

- **UAS + GEN/RNAi:** UAS és la seqüència on la proteïna GAL4 s'adhereix per a donar el senyal d'inici de la transcripció del gen o RNAi, que es troba en la zona després a la seqüència UAS.

UAS és troba en un gen diferent a GAL4, fet que fa possible que una mosca pugui contenir un UAS amb gens al darrere que li facin expressar un tumor, i que aquesta no ho faci per falta de la proteïna GAL4. D'igual manera una altra mosca pot contenir GAL4 i no expressar cap caràcter degut a la falta d'un UAS. Això fa possible el manteniment de línies i per tant els creuaments per a l'obtenció d'un genotip amb una mutació, amb l'avantatge que cap mosca anterior a F₁ (Generació *Filial* 1) hagi hagut de patir-la.

Pel que fa al GEN/RNAi, és la seqüència de DNA que és activada degut a la unió de GAL4 amb UAS i que és la que haurem seleccionat i que ens serà d'interès per a l'experiment que estarem realitzant. A part d'activar un gen, també es pot activar un RNAi:

- **RNAi:** Un RNAi o RNA d'interferència, és una seqüència que té com a objectiu adherir-se de manera específica a un RNAm amb l'objectiu de bloquejar-ne la funcionalitat degut a que, igual que les polimerases que s'encarreguen de fer la còpia complementària del DNA, els RNAi actuen com si es tractés d'una cremallera, ja que està format per nucleòtids complementaris al RNAm que volem bloquejar. Els RNAi s'adhereixen de manera permanent als RNAm fins que són reconeguts per una molècula específica la qual acabarà degradant al conjunt.

Aquest serà el sistema que utilitzarem per a expressar tots els gens que produiran els tumors. Degut a les característiques del sistema només s'expressaran en les larves de F₁.

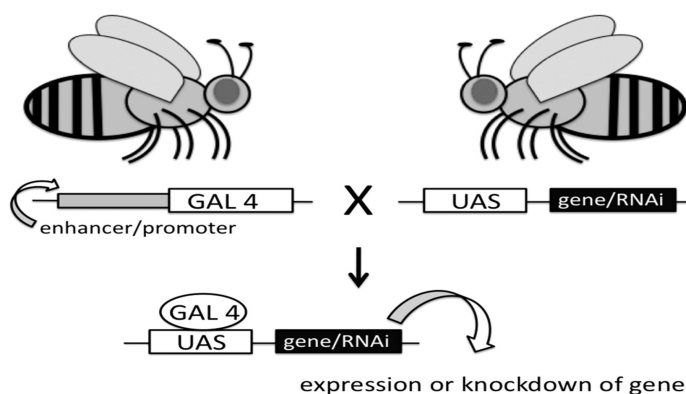


Figura 9. Esquema corresponent al creuament de dues mosques de la fruita. La de l'esquerra correspon a la línia portadora, mentre que la de la dreta a la línia respondora. Podem veure que F₁ expressarà tant la proteïna GAL4 com la seqüència UAS amb el gen o RNAi d'interès. FONT: <http://ajpregu.physiology.org/content/304/3/R177>

Dins aquest sistema també s'hi veu involucrada la proteïna GAL80, la qual té la capacitat d'adherir-se específicament a la proteïna GAL4 aconseguint-ne el seu bloqueig funcional. Això permet que un organisme compti tant amb la proteïna GAL4 com amb una seqüència UAS però que la transcripció gènica no s'activi degut a que la primera és bloquejada per GAL80. Tot i que en aquest treball no s'utilitzi, GAL80 té una variant termosensible (GAL80^{ts}), on quan es troba entre els 18°C i els 29°C és funcional i permet la inhibició de GAL4, i quan es troba per sobre d'aquest interval no és funcional i permet que GAL4 activi a la seqüència UAS.

Quan es treballa amb *Drosophila melanogaster*, el gen que codifica per a GAL80 s'acostuma a trobar en un cromosoma balancejador com TM6, acompanyant algun gen que ens permeti saber a través del fenotip de la mosca, si aquesta expressa la proteïna o no.

1.7.3.2. CIN en *Drosophila*

La inestabilitat cromosòmica (CIN) és una característica que tenen tots els tumors i que, com hem vist anteriorment, provoca diversitat genètica en les neoplàsies. Aquestes desigualtats en les cèl·lules dificulten el poder combatre específicament els tumors al moment de realitzar un tractament, entre d'altres coses. Aquesta és una de les raons per les quals hi ha un interès considerable en entendre com apareix i es desenvolupa la CIN i com aquesta contribueix a la metastasi i ofereix resistència a alguns fàrmacs.

En la última dècada la major part dels models per a CIN s'han desenvolupat en *Drosophila melanogaster* degut als beneficis únics que ofereix per a entendre el funcionament de la CIN en animals vius i també gràcies als múltiples avantatges que ofereix no tan sols per a mantenir, sinó també per totes les raons citades que la fan un animal excel·lent com a model genètic.

Tot i els diversos mecanismes existents per a la inducció de CIN en la mosca de la fruita, un dels sistemes més utilitzats és el ja esmentat GAL4/UAS que permet expressar un gen o RNAi en la generació F₁ sense que cap dels dos progenitors l'expressi. Aquest sistema presenta diferents possibilitats a l'hora de triar tant la zona promotora com la seqüència de bases que UAS activarà fet que dona molt joc i en potencia la seva utilització.

En aquest cas hem optat per elegir la zona de domini d'*Apterous* i un RNAi que bloquejarà la producció de la proteïna Bub3 per a produir la CIN. Aquesta proteïna és una de les encarregades de la formació del fus mitòtic i del correcte repartiment del cromosomes. Posteriorment, quan parlem dels creuaments entre mosques, aprofundirem en la funció que tindrà *bub3*^{RNAi} en aquest treball.

1.7.3.3. Hipomorfs i dominants negatius

Hipomorf: S'anomena així als al·lels mutants que produeixen una resposta d'efecte **menor que** el del gen estàndard. Concretament un hipomorf permet la fabricació de proteïnes però aquestes tenen una funció o transcripció disminuïda. Aquestes mutacions no anul·len completament la producció del factor del que s'estigui parlant, sinó que en fan disminuir notablement els seus efectes respecte al nivell estàndard. S'oposa als al·lels mutants de caràcter hipermorf que tenen com a resultat un efecte superior al del gen estàndard.

En el cas del gen hipomorf que utilitzarem, anomenat *Hep75*, cal esmentar que presenten una alta mortalitat per a les mosques que arriben a l'etapa adulta quan aquest es troba tant en homozigosi com en hemizigosi⁵ (ja que *Hep75* es troba en els cromosomes sexuals). Aquest no presenta una mortalitat tant elevada per a etapes del desenvolupament anteriors com la larvària, on l'utilitzarem.

Dominant negatiu: Consisteix en una mutació de certs gens que codifiquin per a proteïnes de tal manera que expressi un excés una proteïna no funcional que competeixi amb altres que si ho són per tal de, sense minvar la producció de les sí funcionals, disminuir l'eficàcia d'aquestes (menys molècules duren a terme la seva feina). S'anomena dominant negatiu perquè només cal la mutació en un dels al·lels del gen per a que les molècules proteïques no funcionals es comencin a produir. Això aconsegueix un efecte dominant tot i que només tingui mutació en un dels dos gens. Aquestes variacions donen lloc a una pèrdua de la funció de la proteïna si funcional fent-la des de menys funcional fins a no útil per al seu rol original.

1.7.3.4. Via JNK

La via de senyalització cel·lular JNK és una cascada de quinases, que quan és activada en *Drosophila melanogaster*, condueix a la fosforilació de factors de transcripció tals com el dímer⁶ Jun/Fos.

JNK té un rol central en la eliminació de cèl·lules aberrants (que presentin qualsevol anomalia genètica). Per tant aquesta via contribueix a l'eliminació de cèl·lules potencialment perilloses.

- 1. Activació de la via:** La via JNK és activada per un senyal en la cèl·lula. El mecanisme que utilitzarem en aquest treball per a activar aquesta via, serà la CIN que induïrem en les cèl·lules del disc imaginal de la mosca de la fruita. La CIN provocarà un *stress* cel·lular el qual donarà lloc a diferents reaccions químiques que acabaran fosforilant els primers elements de la via.

⁵ **Hemizigosi:** És la condició que presenta un gen que està present en una sola còpia en un individu diploide. Ex: En el cas dels mascles humans, el cromosoma X es troba en hemizigosi.

⁶ **Dímer:** Polímer format per la unió de dues molècules idèntiques.

2. **Cascada de quinases:** Els primers elements de la via són les quinases quinasa quinasa (JNKKK) *Slp*, *Ask* i *Tak* que tenen com a funció fosforilar la següent quinasa que és *Hep* (*Hemipterous*). Aquesta cadena de fosforilacions segueix quan la penúltima quinasa quinasa de la via o JNKK activa a *Bsk*, la última quinasa d'aquesta ruta de senyalització. *Bsk* té com a funció transmetre un grup fosfat a dos proteïnes diferents, de les quals només ens centrarem en el dímer Jun/Fos.

3. **Dímer Jun/Fos:** La quinasa *Bsk* activa al dímer Jun/Fos, que té la funció de factor de transcripció. Aquest polímer va al nucli on activa per una banda l'activació de la mort cel·lular a partir d'altres rutes i la conseqüent producció de *Dcp1* (per part de les vies d'apoptosi) que és un marcador de mort cel·lular. Per altra banda, la producció tant de *Mmp1* com de *Wingless* (*Wg*).

4. **Funció de les proteïnes produïdes per la via:**

- **Dcp1:** Aquesta proteïna no és específicament *target* de JNK, però en aquest treball la seva presència anirà gairebé en totes les ocasions relacionada amb l'activació o no de JNK, ja que aquesta via desencadena una resposta que acaba per a activar el procés d'apoptosi, del qual forma part aquesta proteïna. Com que *Dcp1* intervé en la mort cel·lular en *Drosophila melanogaster*, la quantificació o no d'aquesta proteïna ens pot indicar el grau de mortalitat d'un grup de cèl·lules o teixit.
- **Mmp1** (*Matrix Metaloproteinase 1*): Aquesta proteïna producte de la via JNK provoca el trencament de la membrana basal del teixit i, la unió d'aquest factor amb la prèvia la pèrdua de polaritat de les cèl·lules causada pel tumor, en provoca la delaminació⁷. Això potencia la metastàsis degut a que ajuda a les cèl·lules a que es puguin introduir en el flux sanguini més fàcilment, per on arribaran fins als altres teixits l'organisme.
- **Wingless** (*Wg*): Aquesta és la darrera proteïna produïda per la ruta JNK en *Drosophila melanogaster* que tractarem en el treball (tot i que no depengui exclusivament d'aquesta via). *Wingless* funciona com una molècula de caràcter mitogènic, el que significa que activa el procés de mitosi en la cèl·lula. Degut al seu rol, una alta producció de *Wg* produeix

⁷ **Delaminació:** Procés pel qual les cèl·lules d'un teixit aconsegueixen trencar la capa de cèl·lules que les separa dels altres teixits. La delaminació dels teixits és un dels factors que es dona per a que es produeixi metastasi.

un **creixement notable del teixit** ja que cèl·lules que no s'haurien de reproduir ho fan provocant un creixement superior del teixit.

5. **Inhibició de la via JNK:** Com en moltes altres rutes de senyalització, la via JNK es capaç d'inhibir-se mitjançant un mateix producte produït per aquesta, el que significa que el senyal que activa la ruta acaba també per produir un element negatiu⁸ de JNK que és alhora producte (o *target*) i inhibidor d'aquesta.

A part de la sobre expressió d'un element negatiu de la via, aquesta també es pot inhibir disminuint-ne o anul·lant-ne un dels seus elements positius. Els elements positius són aquells que van a favor de l'activació de la via. Un exemple d'aquests poden ser qualsevol de les quinases de la ruta (*Bsk*, *Hep*...). Per a poder minvar-ne al límit la seva funció, podem utilitzar un dominant negatiu o un hipomorf d'aquests. Concretament, en la part experimental, utilitzarem un hipomorf de l'element positiu *Hep* anomenat *Hep75*.

Tot i que no serà la que utilitzarem, una altra forma d'inhibir aquesta via seria mitjançant un dominant negatiu de *Bsk* anomenat *Bsk^{DN}* amb el que, a priori, hauríem d'obtenir els mateixos resultats que amb *Hep75* ja que duen a terme la mateixa funció.

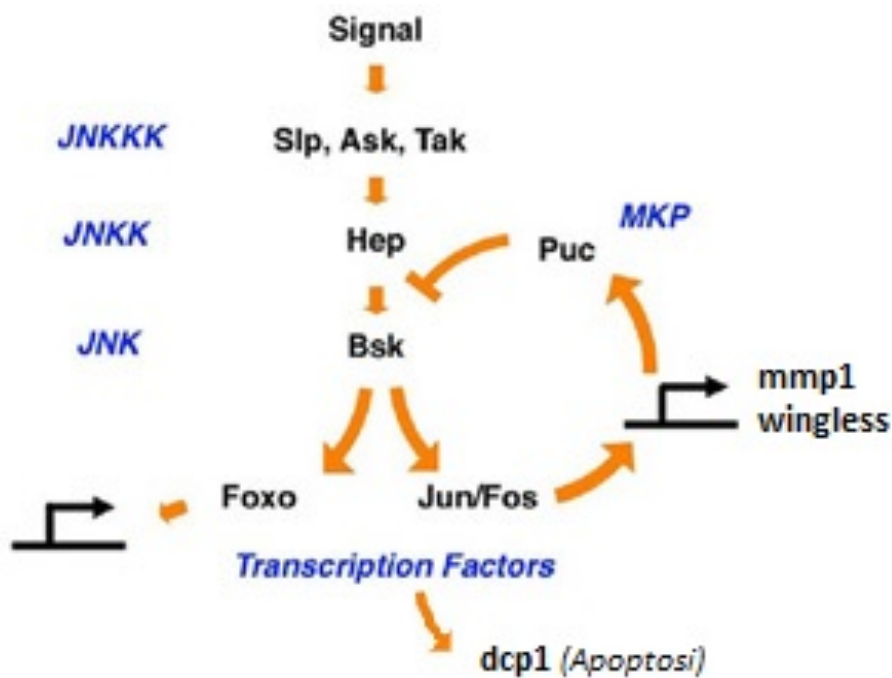


Figura 10. Esquema de la via JNK on es pot veure que l'activació d'aquesta provoca un senyal que activa una cadena de quinases (*Sip*, *Ask*, *Tak*, *Hep* i *Bsk*) i com la última quinasa activa al dímer Jun/Fos que al seu torn és l'encarregat d'activar les diferents proteïnes producte de la via. També hi surt representat el rol que duu a terme Puc com a inhibidor o regulador de la via JNK. FONT: https://www.urmc.rochester.edu/labs/bohmann-lab/projects/jnk_oxidative_stress_and_aging

2. PART EXPERIMENTAL

2.1. Creuaments

Per a poder induir CIN en *Drosophila melanogaster*, amb els transgens que siguin d'interès per a aquest treball, necessitem creuar diferents línies de mosques ja existents.

En els diferents experiments a realitzar, utilitzarem mosques amb manipulacions genètiques en els cromosomes 2 i 3, ja que són els més grans i importants en aquesta espècie (tenint en compte que el quart parell són els cromosomes sexuals, que també haurem d'utilitzar en algun dels creuaments). Pel que fa al cromosoma 4, no el mencionarem ja que no conté cap dels gens amb els que treballarem. Això és degut a la poca probabilitat que hi ha que un gen estigui en aquest cromosoma que és d'una mida molt inferior als 2 i 3. Alhora de creuar les mosques utilitzarem l'esquema següent:

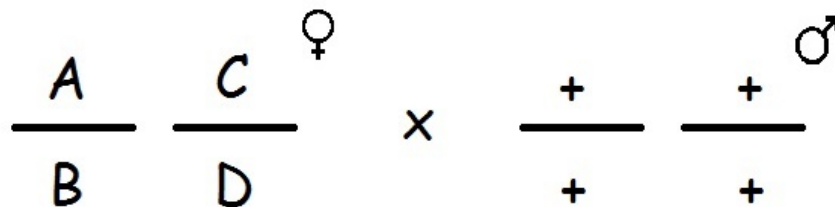


Figura 11. Representació esquemàtica dels cromosomes 2 i 3 en el creuament de dues mosques on cada lletra o símbol de “+” simbolitza un cromosoma. La lletra A i B representen els cromosomes 2 i 2’ de la mosca mentre que C i D són el 3 i el 3’. D’igual manera els dos símbols “+” de l’esquerra (2 i 2’) i de la dreta (3 i 3’) en la mosca mascle.

Aquest és un dels tipus d’esquema més usats alhora de fer creuaments en la mosca de la fruita i serà el que utilitzarem per a explicar els creuaments entre les diferents línies de mosques, on cada lletra o símbol “+” correspon a un cromosoma. S’ha de tenir en compte que parlem d’un animal diploide i que per tant, si treballem amb els cromosomes 2 i 3 en realitat estem treballant amb 4 cromosomes: 2, 2’, 3 i 3’ i quan treballem amb els sexuals treballarem amb dos cromosomes en el cas de les femelles i només amb un (X) en el cas dels mascles, ja que el cromosoma Y gairebé no conté informació.

En la **Figura 11** el parell 2 i 2’ corresponen a les lletres A i B, i el parell 3 i 3’ a les lletres C i D. El símbol “+” significa que la mosca no conté cap transgen en aquell cromosoma (mosca de la dreta de la **Figura 11**). Quan una mosca no conté modificació genètica en els seus cromosomes i que per tant és “+” per a tots ells s’anomena *WT* (de l’anglès *Wild Type*, en català *Tipus Salvatge*).

⁸ **Element negatiu:** Molècula de la via que té com a funció natural el bloqueig d’aquesta. Ex: *Puc* en *JNK*

Haurem de realitzar 7 creuaments paral·lels per a obtenir els diferents els genotips desitjats:

- a) Control (*Ap-GAL4, UAS-Tom*)
- b) Control per a CIN (*Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}*)
 1. Bloqueig element positiu via JNK (*Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}, UAS-Hep75*)
 2. Sobre expressió element negatiu via JNK (*Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}, UAS-Puc2A*)
- c) Control per a CIN + p35 (*Ap-GAL4, UAS-bub3RNAi; p35*)
 1. Bloqueig element positiu via JNK (*Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}, UAS-Hep75; p35*)
 2. Sobre expressió element negatiu via JNK (*Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}, UAS-Puc2A; p35*)

En tots els creuaments caldrà esperar entre 5 i 6 dies per a trobar les mosques en un estadi de larva ja avançat i poder seleccionar les que necessitem.

2.1.1. Creuament control

En aquest primer creuament vam seleccionar les mosques mascle i femella de dues línies anteriors amb la seqüència transgènica que ens era d'interès: *Ap-GAL4, UAS-Tom* que es troba en un únic cromosoma de la mosca. Tota la descendència mantindrà la mutació degut a que els progenitors són homozigòtics per a aquesta informació. El nom de la seqüència està composta per 3 parts:

- **Ap** (*Apterous*): Zona promotora que es troba al principi de la seqüència i que conté la informació per a la zona de domini on s'expressaran els gens que la segueixen, en concret el gen *GAL4*. En aquest cas, els gens que segueixen a aquesta zona promotora s'expressaran en el disc imaginal d'ala de *Drosophila melanogaster*.
- **GAL4**: El gen que transcriurà per a la proteïna *GAL4*, s'activarà en la zona de domini d'*Apterous*, perquè s'hi troba just a darrere. *GAL4* sempre activarà a tots les seqüències *UAS* que contingui la mosca fent-les expressar també únicament en la zona de domini del promotor *Apterous*.
- **UAS-Tom** (*Tomato*): Gen que codifica per a una proteïna anomenada *Tomato* que en un microscopi de fluorescència emet una longitud d'ona corresponent al color vermell. El nom d'aquesta proteïna es degut al característic color de llum que és capaç d'emetre. Aquest gen només

s'activarà en la zona de domini d'*Apterous*, ja que conté una *UAS* que serà activat per la proteïna *GAL4*.

La seqüència *Ap-GAL4*, *UAS-Tom* serà utilitzada en tots els altres experiments i es la que ens servirà per a diferenciar quines mosques contenen les mutacions que desitgem (s'abreviarà com a *Ap-GAL4*), degut a que aquestes expressaran la proteïna *Tomato*, i a més, la seqüència *Ap-GAL4* serà la que activarà totes els altres gens amb un *UAS* de promotor en la zona de domini d'*Apterous* produint CIN en els discs imaginals d'ala.

2.1.2. Creuament control per a CIN (amb i sense p35)

Primer vam haver de seleccionar mosques femella d'una línia genètica ja existent que contingués els gens que ens eren d'interès:

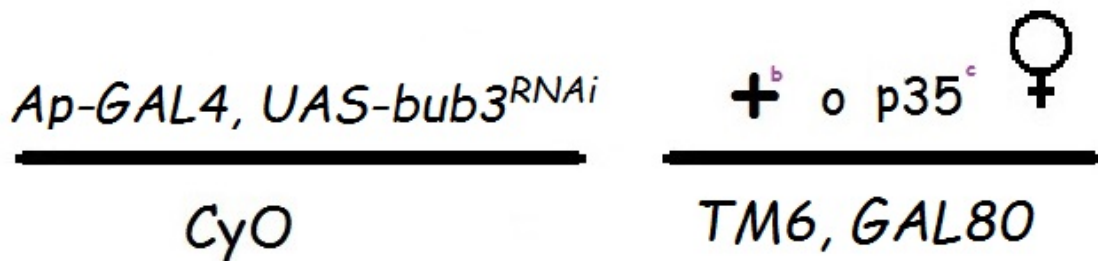


Figura 12. Esquema dels parells de cromosomes 2 i 3 en la mosca femella del creuament control per a CIN (amb i sense p35). El cromosoma de la dreta que compta amb dos possibles opcions corresponen al creuament sense p35 (b) i al creuament amb p35 (c)

- ***Ap-GAL4, UASbub3^{RNAi}***: (*Ap-GAL4, UAS-Tom, UAS-bub3^{RNAi}*) Conté la seqüència del primer control *Ap-GAL4, UAS-Tom* on *Apterous* activarà els gens *Tomato* i *GAL4* i una segona seqüència que és la *UAS-bub3^{RNAi}*. Aquesta última, conté també un *UAS* inicial que serà activat per la proteïna *GAL4* i com a resultat, *UAS-bub3^{RNAi}* serà funcional.

bub3RNAi serà l'encarregat de provocar CIN ja que produirà un RNA interferent que s'adherirà al RNA^m encarregat per a la producció proteïna de Bub3 formant un complex RNA^m+RNAⁱ que serà degradat sense que es pugui arribar a produir Bub3 amb els RNA^m on s'hi adhereixi els RNAⁱ. Aquesta proteïna té una funció molt important en un dels punts de control de la mitosi de la cèl·lula. Concretament és una de les encarregades de la formació del fus mitòtic (**Figura 13**) i per tant de la correcta distribució dels cromosomes en el procés de replicació cel·lular. Quan aquesta proteïna és inexistent, la cèl·lula es incapaç de distribuir correctament els cromosomes en la mitosi, fet que provoca

CIN i indueix a la formació de tumors en tot el disc imaginal d'ala de la mosca.

Aquest RNAi només s'activarà en la zona de domini d'*Apterous* degut a que és activat únicament on la proteïna *GAL4* és produïda.

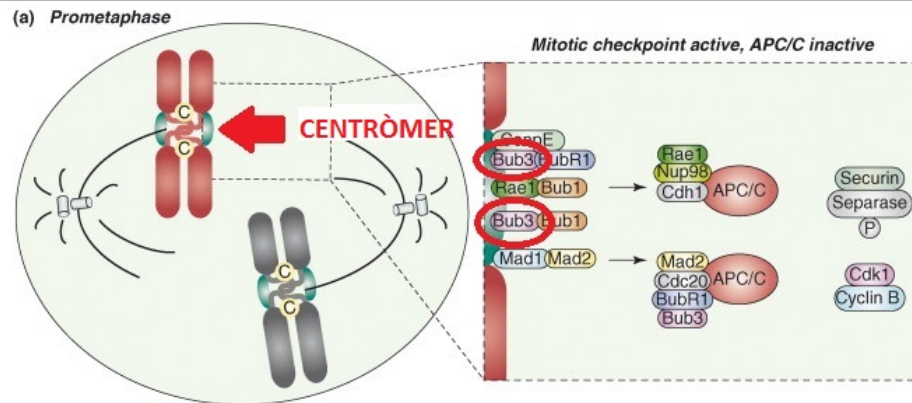


Figura 13. Representació de la funció que duu a terme la proteïna produïda per la via JNK *Bub3* en la correcta formació del fus mitòtic en el moment en que s'adhereix al centròmer dels cromosomes. FONT: <http://www.pnas.org/content/109/17/6549/F7.expansion.html>

- **CyO**: Aquest és un balancejador de *Drosophila melanogaster*, que fenotípicament és fàcil de reconèixer en adults per la característica curvatura que tenen a les ales. Apareix en els creuaments perquè les mosques seleccionades provenen de línies ja existents tot i que en aquest experiment no és de cap utilitat.
- **TM6, GAL80**: (*TM6 + GAL80*) En aquesta seqüència hi trobem dos gens diferents. Per una banda hi ha el balancejador *TM6* que conté el marcador fenotípic *Tubby*, en català "*rabassut*" degut a la característica forma arrodonida i més petita del que és habitual de les larves. Per altra banda també disposa del gen que produirà la proteïna *GAL80*, inhibidora de *GAL4*.

Al contenir dos gens, el *TM6GAL80* té dues funcions:

- **TM6**: Ajudar-nos a distingir mitjançant el fenotip quines larves no contenen els gens que ens interessin i que per tant no causaran CIN.
- **GAL80**: Permet mantenir la línia, ja que si la descendència no pogués produir aquesta proteïna, la CIN s'hagués format en F_1 , perquè el *GAL4* de la seqüència *Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}* no hagués estat inhibit.

- **P35**: Aquesta és una proteïna amb funció inhibidora del procés d'apoptosi, el qual està directament relacionada amb la via JNK en *Drosophila melanogaster*.

Tant en l'experiment sense p35 com amb p35, aquestes femelles es creuaran amb mascles *WT* per a tots els gens, pel que la descendència pot sortir amb 4 genotips en els dos casos. Els 4 possibles genotips són:

- **CyO;(p35)** entenen que tots els cromosomes que no s'indiquen són "+"
- **CyO; TM6, GAL80**
- **Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; TM6GAL80**
- **Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; (p35)**

D'aquests, per al control sense p35, només ens interessa *Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}* al ser l'únic que comptarà amb CIN i per tant amb un tumor al disc imaginal d'ala. En el cas d'*Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; TM6, GAL80* no hi haurà tumor per la funció que duu a terme *GAL80* bloquejant a *GAL4* i conseqüentment bloquejant a tots els *UAS* i a l'RNAi als que activa.

Tenint en compte que treballem amb larves de *Drosophila melanogaster*, per a descartar els 3 possibles genotips que no ens interessin haurem de mirar en una lupa quines larves són més petites i arrodonides del que és habitual, i que per tant contenen el balancer *TM6 (Tubby)*, descartant així a 2 dels possibles genotips.

Pel que fa a l'altra opció que no desitgem, necessitarem un microscopi de fluorescència per a observar quines són les larves que emeten llum vermella, descartant les que no n'emeten (*CyO*) i que per tant no contenen el gen *Tomato*.

Pel que fa al control amb p35, només ens interessarà *Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; (p35)* ja que en aquests individus hi haurà tant CIN com bloqueig de l'apoptosi. El procés per a la correcta selecció d'aquestes larves serà el mateix que en el control sense aquesta proteïna.

2.1.2.1. Bloqueig element positiu via JNK (amb i sense p35)

En aquest cas vam haver de seleccionar mosques mascle de la mateixa línia genètica que en els anteriors creuaments, tot i que enlloc de femelles en aquesta ocasió només ens interessaven els mascles. A diferència dels altres experiments, en aquest ens haurem de fixar fins a en 3 parells de cromosomes, i és que el transgen d'interès que incorporen les mosques femella en F₁ es troba en un dels cromosomes X sexual.

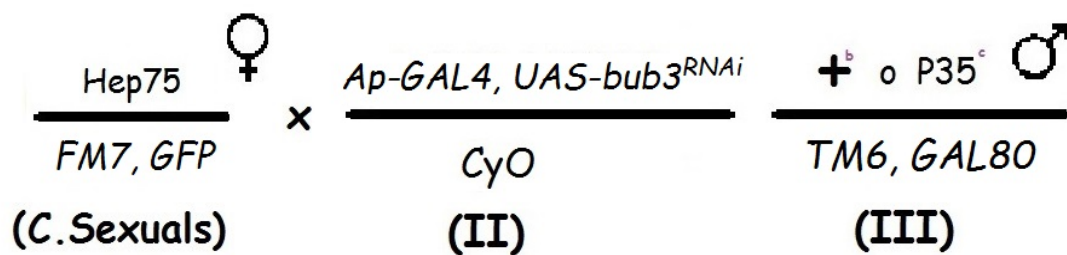


Figura 14. Esquema del creuament per al bloqueig de l'element positiu de JNK. En aquesta ocasió a l'esquerra trobem la mosca femella i a la dreta la mosca mascle amb els mateixos gens que la de la **Figura 12**. En aquest cas cal indicar de quins cromosomes estem parlant per a poder saber quins seran els possibles genotips de la descendència.

- **Hep75^(Hip)**: *Hep75* és un gen amb una mutació de caràcter **hipomòrfic** (hip) que produeix la proteïna *Hep* que forma part de la via JNK en *Drosophila melanogaster*.

Aquesta mutació en els gens afectarà a tots els teixits de la mosca i no només la zona de domini *Apterous*, però només se'n veurà afectada la via en els llocs on JNK es trobi activa i per tant únicament en la zona en hi ha un creixement tumoral (*Apterous*).

Aquest és un dels dos mètodes que utilitzarem per a bloquejar la via JNK. En aquest cas, sí fem variar l'estructura de la proteïna i per tant la funció, pel que aquesta no fosforilarà a la següent proteïna de la cascada (*Bsk*) i la cadena s'interromprà.

Una de les característiques d'*Hep75* és la letalitat que té tant en homozigosi com en hemizigosi. Diem que un gen es troba en hemizigosi quan aquest està en un cromosoma que no té homòleg com és el cas dels mascles amb el seu únic cromosoma X, on es troba la mutació *Hep75*. La letalitat d'aquest gen només es dona en l'etapa adulta i no en l'etapa de larva de *Drosophila melanogaster*.

- **FM7, GFP**: (*FM7* + *GFP*) En aquesta seqüència hi trobem dos gens diferents. Per una banda hi ha el balancejador *FM7*, que conté el marcador fenotípic conegut com a *Bar-eyed*, en català "ull en forma de barra" degut a la característica forma allargada i estreta en l'ull de les mosques adult. Per altra banda també conté el gen que produirà la proteïna fluorescent *GFP* o *Green Fluorescent Protein* "proteïna fluorescent verda".

Al contenir dos gens, el *FM7, GFP* té dues funcions:

- FM7: Ens ajuda a mantenir la línia fent que tant els mascles que compten amb aquest gen com les femelles que el tenen en homozigosis siguin estèrils.
- GFP: Ens permet distingir, en un microscopi de fluorescència, quines mosques expressen aquesta proteïna i per tant no duen la seqüència *Hep75*.

En aquest creuament hi ha 8 possibles genotips en F₁ tant en el creuament amb p35 com sense aquest gen. A més, un cop tinguem les mosques amb el genotip que ens interessa, haurem de descartar les femelles (cromosomes sexuals *Hep75*, +) degut a que no bloquejaran JNK i ens quedarem només amb els mascles (*Hep75*, Y=∅).

Els possibles genotips són:

- *CyO; (p35); Hep75*
- *CyO; (p35); FM7GFP*
- *CyO; TM6GAL80; Hep75*
- *CyO; TM6GAL80; FM7GFP*
- *Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; TM6GAL80; Hep75*
- *Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; TM6GAL80; FM7GFP*
- *Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; (p35); Hep75*
- *Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; (p35); FM7GFP*

D'aquests només ens interessa el genotip *Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; (p35); Hep75*.

Per a trobar-lo, primer haurem de seguir els mateixos passos que en el creuament anterior i descartar totes les larves amb fenotip *Tubby* que per tant contenen el balancejador *TM6, GAL80*. Un cop eliminades, haurem de mirar en un microscopi amb fluorescència i descartar totes aquelles que no es veuen vermelles i que no contenen *Tomato* (no *Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}*).

A més, en aquest creuament haurem de descartar les larves tenint en compte dos característiques més:

- La primera és que **no emetin llum verda** en el microscopi de fluorescència i que per tant **no continguin GFP** (*FM7, GFP*) permetent-nos descartar un genotip que no desitgem.
- La segona característica és el **sexe** de les larves, **descartant totes les femelles**. És possible diferenciar entre mascles i femelles segons la forma dels discs imaginal que formaran els diferents aparells reproductors.

2.1.2.2. Sobre expressió de l'element negatiu via JNK (amb i sense p35)

Primer vam haver de seleccionar mosques femella de la mateixa línia genètica que en els experiments anteriors. A diferència de quan bloquegem l'element positiu de JNK, en aquest cas el que varia són les mosques mascle que creuem i no les femelles.

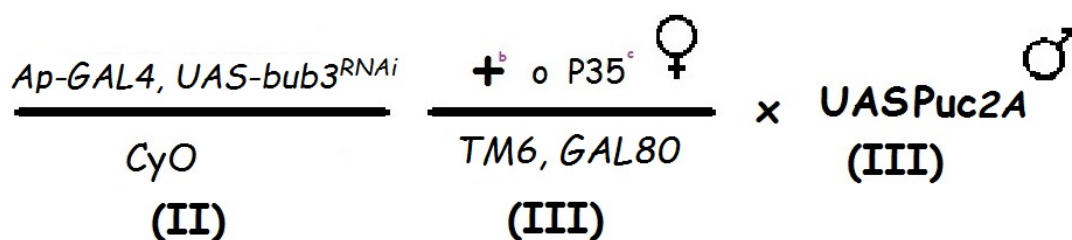


Figura 15. Esquema del creuament per a la sobre expressió de l'element negatiu i *target* de JNK. En aquest cas la mosca amb més transegens presenta el mateix genotip que el de la **Figura 14** però enlloc de ser mascle en aquest cas és femella, ja que no es necessiten els cromosomes sexuals per a obtenir la descendència esperada: només treballarem amb els cromosomes 2 i 3.

- **UAS-Puc2A:** *Puc* és un inhibidor i *target* de la via JNK que funciona com a element negatiu d'aquesta, fet que fa que una sobre expressió d'aquest provoqui el bloqueig d'aquesta. El gen que transcriu per a aquesta proteïna es troba darrere d'una seqüència UAS, pel que només s'activarà quan GAL4 sigui funcional (*Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}*).

UAS-Puc2A es troba en el cromosoma 3 de la *Drosophila melanogaster* i en el cas de la línia de mascles que hem seleccionat s'hi troba en homozigosi, pel que la informació de *Puc* es troba tant en el cromosoma 3 com en el 3'.

Tant en el creuament sense p35 com amb p35 la descendència pot sortir amb 4 genotips diferents. Aquests són:

- ***CyO; (p35); UAS-Puc2A***
- ***CyO; TM6GAL80; UAS-Puc2A***
- ***Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; TM6, GAL80; UAS-Puc2A***
- ***Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; (p35); UAS-Puc2A***

Com en les experiències anteriors hem de descartar les larves amb el fenotip *Tubby* (TM6GAL80) i també aquelles que no emeten llum vermella en el microscopi de fluorescència. Un cop eliminades no hem de mirar cap altra característica en les larves, ja que totes elles portaran informació per a *Puc2A* degut a que els dos cromosomes 3 de la mosca mascle progenitor contenen aquest gen, fet que assegura que les mosques de F₁ tinguin un cromosoma 3 amb informació per a aquest caràcter.

El genotip de les mosques resultant serà *Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}; (p35); UAS-Puc2A* pel que les mosques presentaran CIN, proteïna P35 en un dels dos casos, i d'igual manera que en el creuament anterior tindran la via JNK bloquejada, aquest cop a causa de la sobre expressió d'un element negatiu com n'és *Puc*.

El fet de treballar amb dos inhibidors oposats pel que fa a funció de la via JNK fa que els resultats obtinguts al final dels experiments siguin més contrastats i vàlids.

Tots aquests creuaments s'aniran mantenint i repetint al llarg de les setmanes per a possibles rèpliques futures.

2.2. Immunotinció

Un cop seleccionats els discs imaginals de les larves dels diferents creuaments, els dissecionarem i els col·locarem en 7 tubs Eppendorf en funció dels diferents genotips. En tots els tubs aplicarem el mateix procediment i hi acabarem afegint els mateixos anticossos.

El procés d'immunotinció es fonamenta en l'especificitat que tenen els anticossos per a reconèixer i adherir-se a una proteïna concreta. En una immunotinció hi ha 3 elements destacats (**Figura 16**):

1. Proteïna objectiu: És l'element que volem analitzar i quantificar. Una de les proteïnes objectiu és Mmp1, una proteïna que provoca el trencament de la membrana basal del teixit epitelial.
2. Anticòs primari: Aquest és produït en un animal (en aquest cas el ratolí) degut a la resposta que té el seu sistema immunitari quan se li injecta intencionadament una proteïna determinada en reconèixer-la com un agent patògen i perjudicial per a l'organisme.

L'anticòs produït en el ratolí s'adhereix específicament amb Mmp1. Degut a la alta especificitat que tenen els anticossos, se n'ha d'utilitzar de diferents depenent de la proteïna que vulguem detectar. Aquest és el mateix sistema que utilitza el cos humà com a recurs per a combatre les infeccions, on els anticossos s'uneixen a les proteïnes que envolten els diferents tipus de patògens.

3. Anticòs secundari: El segon anticòs consta de dues parts:
 - a. Anticòs: Reconeixen una part comú de l'anticòs primari depenent on aquest va ser produït. Aquest acostuma a ser produït per bacteris que produeixen una resposta com la que produeix el ratolí quan se l'exposa a Mmp1. Aquest anticòs és anomenat secundari, ja que s'uneix específicament amb l'anomenat primari. La producció en bacteris té els següents avantatges sobre la producció en animals:

- Menor cost econòmic.
- Producció aproximadament 4 vegades més ràpida.
- No és necessari treballar amb animals ni el sacrifici d'aquests.

b. Fluoròfor: Molècula fluorescent que es conjuga a l'anticòs secundari i que al ser excitada amb llum es pot veure en el microscopi de fluorescència. És el que realment observarem en el microscopi i ens permetrà saber on estan les proteïnes objectiu, degut a la cadena que hauran format amb els altres dos anticòsos.

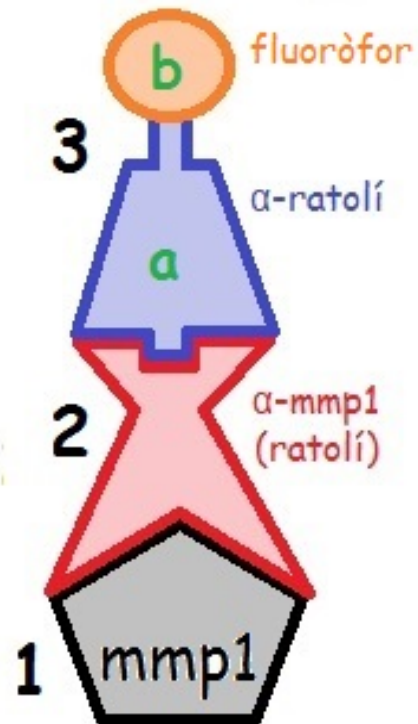


Figura 16. Representació gràfica del resultat final d'una immunotinció sobre una proteïna, amb els tres elements necessaris per que es pugui dur a terme (marcats amb els números). També hi apareix sobre que és específic cada anticòs i en quin organisme ha estat produït el primari.

2.2.1. Procediment per a la immunotinció

El procediment utilitzat es divideix en dos dies: en el primer dia l'objectiu és afegir l'anticòs primari, mentre que en el segon dia l'objectiu és l'addició de l'anticòs secundari.

Durant aquest, s'utilitzaran solucions per a fer les neteges dels les immunotincions i productes per a realitzar el muntatge final dels anticòsos amb els noms i la composició següents:

- **PBS**: Dissolució amortidora que permet mantenir estable el pH. Està formada per la mescla d'aigua amb les diferents sals:

Sal	Concentració (g/L)
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,42
KH ₂ PO ₄	0,24

Figura 17. Taula amb la concentració en g/L dels diferents components de la dissolució de PBS

- **PBT:** Solució composta de PBS (99%) i detergent (1%) que s'utilitza per a realitzar els rentats.
- **Formaldehid:** Molècula orgànica tòxica de fórmula CH_2O i que té una funció, en el preparats, de fixar els teixits donant-los-hi rigidesa per a que no es trenquin amb tanta facilitat.
- **BSA:** *Bovine Serum Albumin*, en català *albúmina de sèrum boví*. Proteïna que s'utilitza com a bloquejador en les solucions. Al actuar com a bloquejant, s'uneix inespecíficament a diferents teixits i molècules, fet que permetrà una tinció més neta, ja que hi ha molècules que no desitgem que podrien adherir-se als anticossos primaris. Aquestes molècules seran retirades de la solució un cop s'empeguin al BSA i es realitzin els corresponents rentats.
- **BBT:** Solució que s'utilitza per a bloquejar formada pels productes següents:
 - 5 ml NaCl (5M)
 - 300 µl BSA 30%
 - 1 ml detergent 20%
 - 94ml PBS
- **Medi de muntatge:** Mescla utilitzada per a conservar tant fluoròfors com teixits de les larves de la composició següent:
 - 40 ml glicerol
 - 5 ml 10X PBS
 - 400 µl nPG (neopentil glicol) al 50% en etanol
 - 50 ml ddH₂O (aigua doble destil·lada)

DIA 1

1. Farem la dissecció dels discs de les larves i els afegirem a 7 tubs Eppendorf diferents en funció del seu genotip.
2. En cada tub Eppendorf hi afegirem 1ml de PBS (4% formaldehid).
3. Rentar 3 vegades amb intervals de 10 minuts amb 1ml de PBT per cada tub.
4. Bloquejar 3 cops amb BBT deixant passar intervals de 10 minuts entre els rentats.
5. Preparar la solució que contindrà els anticossos primaris de volum final 350 µl. Amb una pipeta electrònica introduïrem i barrejarem els següents productes en un Eppendorf:
 - 330 µl BBT
 - 17,5 µl α -Mmp1 (relació 1/20)
 - 3,5 µl α -Dcp1 (relació 1/100)

Sempre que utilitzem productes diferents canviarem la punta de la micropipeta que estiguem usant per a no barrejar diferents productes.

Un cop preparada la solució amb els anticossos primaris afegirem a cada tub amb larves, 50 µl d'aquesta.

6. Deixar reposar tota la nit a una temperatura de 4°C fent que no li toqui la llum.

DIA 2

1. Rentar 3 cops amb BBT en intervals de 10 minuts els diferents Eppendorf on hi ha la solució amb els anticossos primaris per a d'eliminar els anticossos sobrants que no s'han unit a cap proteïna. Això permetrà que els secundaris només s'adhereixin a zones on realment hi ha les proteïnes objectiu.
2. Preparar la solució de volum final $\approx 430 \mu\text{l}$ que contindrà els anticossos secundaris. Amb una pipeta electrònica introduïrem i barrejarem els següents productes en un Eppendorf.
 - 420 μl BBT
 - 2,8 μl α -ratolí (relació $\approx 1/150$) + fluoròfor CY5 (color roig llunyà de longitud d'ona 665 nm que en el microscopi de fluorescència veiem blau cel)
 - 2,8 μl α -conill (relació $\approx 1/150$) + fluoròfor CY2 (color verd de longitud d'ona 506 nm)
 - 4,2 μl dapi (marcador nucli) (relació $\approx 1/100$)
3. Un cop preparada la solució cal afegir 60 μl d'aquesta en cadascun dels 7 tubs Eppendorf amb les diferents mostres de larves.
4. Deixar incubar 90 minuts a temperatura constant i sense llum.
5. Passat el temps caldrà extreure la solució d'anticòs secundari de tots els tubs.
6. Netejar 3 cops amb PBT deixant intervals de 10 minuts per a eliminar tots els anticossos secundaris que no corresponguin a cap proteïna objectiu (en anglès anomenat *background*) per a així observar correctament les que tenen correspondència en el microscopi de fluorescència.
7. Agregar 50 μl de glicerol (medi de muntatge) a cada Eppendorf per a la correcta conservació dels fluoròfors (o proteïnes amb fluorescència) i dels teixits de les larves, fins al moment de l'observació d'aquestes.
8. Deixar aquesta preparació amb les larves dins dels tubs en la foscor i a una temperatura de 4°C, també per a la correcta conservació de teixits i proteïnes.

2.3. Microscopia

Abans d'anar al microscopi a observar les diferents mostres hem d'extreure els discs imaginals d'ala de les diferents larves que teníem en els tubs. Un cop extrets, els col·locarem en 7 portaobjectes diferents, i en cadascun d'aquests hi marcarem amb un retolador permanent el genotip que té el disc que observarem.

Realitzat aquest pas previ, anirem al microscopi amb focal ZEISS on observarem els discs. L'augment de l'ocular amb el qual els mirarem és de X10 i en el revòlver d'objectius triarem el de X25 aconseguint un augment total de X250. Per tal de no fer

variar en excés l'índex de refracció entre els diferents medis de la preparació utilitzarem glicerol al 70% com a líquid d'immersió entre l'ocular i els discs.

En tots els experiments observarem 4 colors diferents amb el significat i la correspondència següent:

- **Vermell** → Marca la proteïna *Tomato* que ens permetrà localitzar la zona de domini d'*Apterous* dins del disc imaginal d'ala.
- **Blau marí** → Correspon al dapi que és un colorant amb una estructura que el fa intercalar entre els nucleòtids i emetre fluorescència. Al marcar DNA ens permet veure tan els nuclis cel·lulars com els mitocondris.
- **Blau cel** → Marcarà a la proteïna Mmp1, producte de la via JNK, capaç de trencar les membranes extracel·lulars dels teixits.
- **Verd** → Color que tindrà la proteïna Dcp1 vista en el microscopi de fluorescència. Aquesta és un marcador de mort cel·lular i tot i que no depèn exclusivament de la via JNK, la seva presència indicarà l'activació de la via, ja que en aquelles zones on hi hagi tumor la mortalitat cel·lular creixerà.

De totes les mostres observarem 3 imatges:

- Esquerra: Corresponent a la fluorescència que emet el fluoròfor CY2 que marca la presència de la proteïna Dcp1.
- Centre: Imatge que indica la fluorescència que emet el fluoròfor CY5 marcador de la proteïna Mmp1.
- Dreta: Superposició de les dues imatges anteriors més dos imatges noves. La primera marca la zona de domini d'*Apterous*, i per tant, on és d'esperar que es produeixi tumor en alguns dels experiments, i la segona ens mostra totes les cèl·lules del disc imaginal d'ala per tal d'observar-ne la morfologia i veure l'expressió real que tenen les proteïnes Mmp1 i Dcp1.

3. RESULTATS

Per a exposar els resultats del treball ens centrarem en analitzar i comparar les imatges obtingudes en el microscopi de fluorescència dels diferents experiments.

3.1. Ap-GAL4, UAS-Tom Control 0

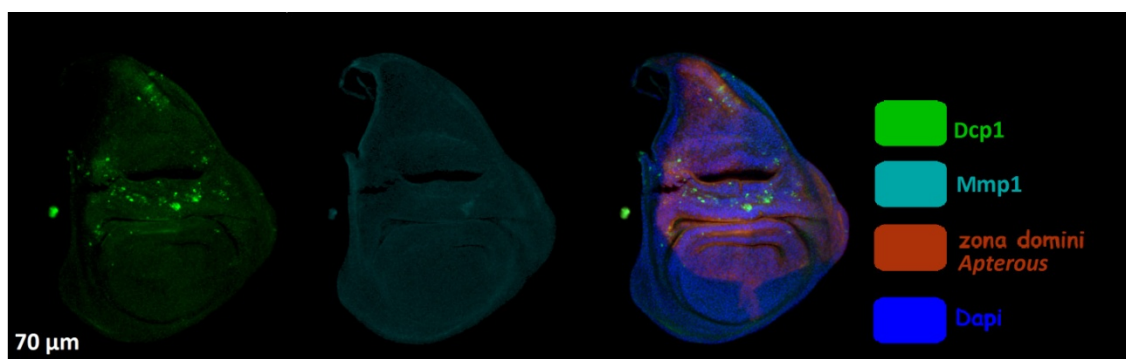
Aquest control té una gran importància ja que és sobre aquest on posteriorment contrastarem els resultats que obtindrem en les altres mostres. Si comparéssim la fluorescència obtinguda en els experiments amb una mosca *WT* cometriem un error, ja que s'ha de tenir en compte que la línia *ApTom* presenta de per si un nombre més elevat de mort cel·lular que una mosca de tipus *salvatge*, al tractar-se de transgènics en heterozigosi d'un gen *Apterous* amb diverses mutacions.

La diferent fluorescència que emetin les proteïnes en les posteriors mostres seran contrastades amb aquest experiment control. En els experiments on no s'espera presència de Mmp1 i de Dcp1 el valor que prendrem com a referència de baixa quantitat d'aquestes serà el que obtenim en aquesta mostra. D'igual manera quan esperem una sobre expressió d'aquestes.

Pel que fa la morfologia del disc imaginal d'ala, també hem de prendre com punt de partida els resultats obtinguts en aquest primer experiment i comparar tant la mida com la forma dels discs dels resultats posteriors amb el control.

En els discs imaginals analitzarem sempre tres característiques:

- Expressió de Dcp1
- Expressió de Mmp1
- Morfologia del disc



Dcp1: Està present en alguns punts concrets del disc imaginal d'ala degut a que en tots els teixits hi ha una petita proporció de cèl·lules que moren per factors com l'envelliment o algun senyal extern i també perquè la línia que estem utilitzats compta amb gens que no són propis d'aquesta espècie, el que causa que morin més cèl·lules del que és habitual.

Mmp1: Observem que aquesta té uns nivells de fluorescència molt baixos i que aquests són els mateixos tant en la zona de domini d'*Apterous* com en la zona

Figura 18. Fluorescència emesa pels discs imaginals d'ala en el control 0 de genotip *Ap-GAL4, UAS-Tom*. A la dreta es observa la llegenda de la fotografia que ens informa sobre la correspondència dels colors amb les proteïnes que serà vàlida tant en aquest experiment com en les 6 següents.

superior del *Wing Pouch*. Aquest repartiment homogeni de la proteïna ens permet comprovar que la via JNK no es troba activada i, al no haver cap tipus de correspondència entre els punts de Dcp1 amb els de Mmp1, imaginem que el marcador d'apoptosi pot provenir d'altres vies o es pot haver quedat acumulat en aquests punts.

Morfologia: És gairebé idèntica a la d'una mosca de *Tipus Salvatge* amb l'única diferència que la zona inferior al *Notum* ha patit un petit trencament sense cap mena de conseqüència alhora de poder extreure'n resultats vàlids.

3.2. L'activació de la via JNK en els models amb CIN provoca l'eliminació de les cèl·lules aberrants

3.2.1. *Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}* sense p35 Control per a CIN

Aquest experiment serà un dels dos controls suplementaris que realitzarem. Concretament, aquest ens servirà com a referència per a comparar les posteriors mostres amb el gen *bub3^{RNAi}* i sense *p35*.

Tot i portar el nom de control, aquest s'ha de contrastar amb el principal, també anomenat control 0, explicat anteriorment degut a que el 0 no conté CIN i per tant no hi ha activació de la via JNK a diferència d'en aquest. Cal destacar que a partir d'aquest experiment, tots els següents comptaran amb un tumor en el disc imaginal.

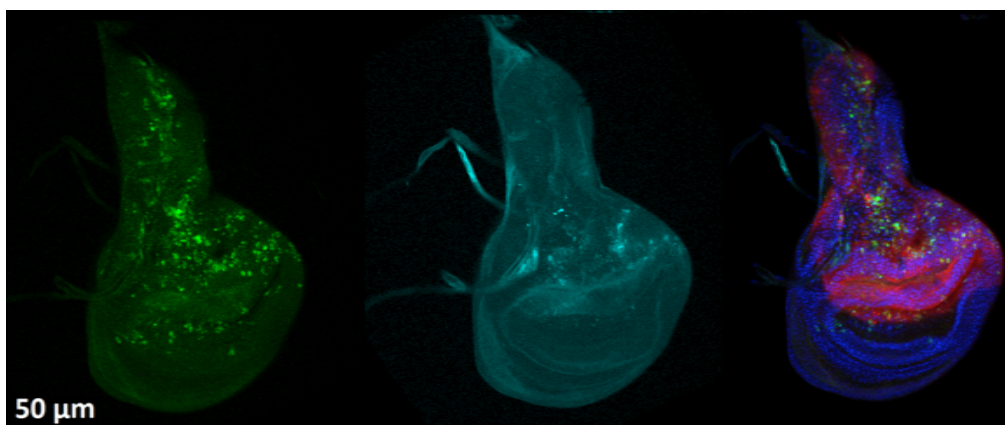


Figura 19. Imatge corresponent a la fluorescència emesa pels discs imaginals d'ala amb el genotip *Ap-GAL4, UASbub3^{RNAi}* sense p35

Dcp1: Observem com aquesta s'expressa a uns nivells molt superiors als vistos en el control 0, degut a l'activació de la via JNK per la presència d'estrès cel·lular provocat per la CIN. També veiem de manera clara com l'augment dels nivells d'apoptosi només es donen en la zona de domini d'*Apterous* on s'hi expressen els gens dependents de la proteïna *GAL4*, com el causant de la CIN: *UAS-bub3^{RNAi}*.

Mmp1: Podem comprovar com aquesta proteïna s'expressa en major quantitat que en el control 0 degut a que també és producte de la via JNK, d'igual manera que Dcp1. Com en el cas anterior veiem que només es sobre expressa en la zona de domini d'*Apterous* i que hi ha correspondència entre ambdues permetent-nos veure experimentalment que les dues són producte de la mateixa via de senyalització cel·lular.

La menor abundància de Mmp1 sobre Dcp1 és deguda a que les cèl·lules que expressen la primera acaben morint ràpidament. Això fa que el temps de vida útil de la proteïna sigui molt inferior al de Dcp1, que pot romandre en els teixits més temps que Mmp1 ja que les cèl·lules mortes sovint contenen restes de proteïnes marcadores d'apoptosi.

Morfologia: L'augment de la mort cel·lular en aquest control per a CIN fa minvar considerablement la part del disc corresponent a la zona de domini d'*Apterous* respecte al control 0. La resta dels teixits segueixen amb unes dimensions similars a les que presenta tant el primer control com les de *WT*.

3.2.1.1. Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi} sense p35 amb Hep75

Dins la línia experimental sense p35 aquesta serà una de les dues mostres que ens permetran inhibir la via JNK d'igual manera que la pròxima experiència, on comptarem amb *Puc2A*.

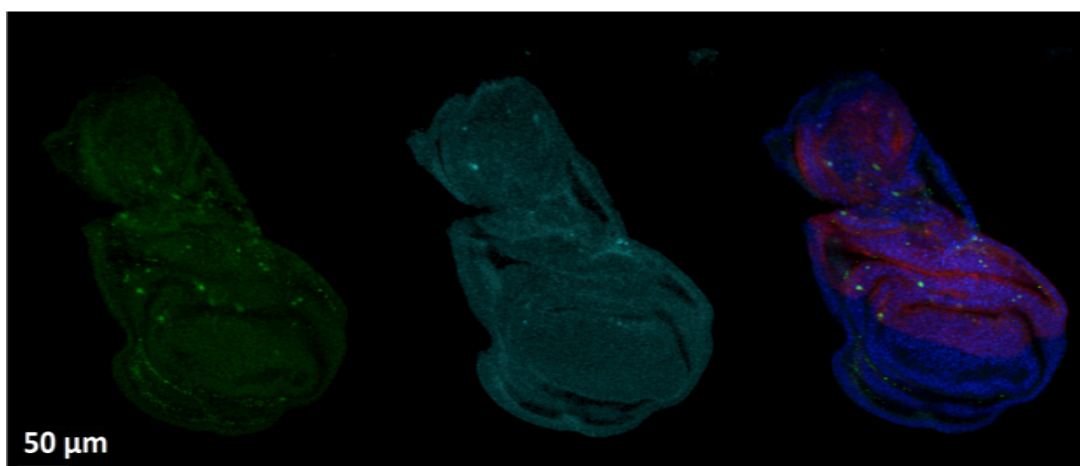


Figura 20. Imatge corresponent a la fluorescència emesa pels discs imaginals d'ala amb el genotip *Ap-GAL4, UASbub3^{RNAi}* sense p35 amb el dominant negatiu d'*Hep75*.

Dcp1: La quantitat apreciable d'aquesta proteïna és molt baixa i es situa en nivells una mica inferiors als del control 0. Cal recordar que en aquest experiment estem alterant un element positiu de la via JNK, el que la bloqueja gairebé per complet. En el control primer, aquesta via molt probablement està mínimament activada degut a l'estrès cel·lular que produeixen els transgens: fet que causa aquesta diferència de lluminositat.

Mmp1: En aquest cas ens trobem en una situació similar a la de la proteïna Dcp1, tot i que en aquesta, la quantitat que n'hi trobem és molt semblant a la del control 0. Al no haver correspondència entre les dues proteïnes *target* de JNK veiem que la via ha estat bloquejada satisfactòriament.

Morfologia: Les dimensions d'aquest disc són superiors a les del control per a CIN sense p35, ja que no s'hi produeix tanta mort cel·lular com en el cas anterior. Per altra banda les dimensions no són tan diferents ja que quan JNK està activa produeix *Wg* que en facilita el creixement.

Els plecs del disc són d'una forma molt diferent a les del control 0 degut a que en aquest cas hi estem produint un tumor i no hi ha cap factor que ens ajudi a eliminar-lo, el que fa acumular les cèl·lules de manera no organitzada.

3.2.1.2. Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi} sense p35 amb Puc2A

Aquesta serà l'altra de les mostres que ens permetran inhibir la via JNK dins la línia sense p35, juntament amb l'anterior *Hep75*. Tot i que a priori els resultats a esperar siguin els mateixos, s'haurà de veure quin dels dos actuen millor com a bloquejant d'aquesta via de senyalització cel·lular.

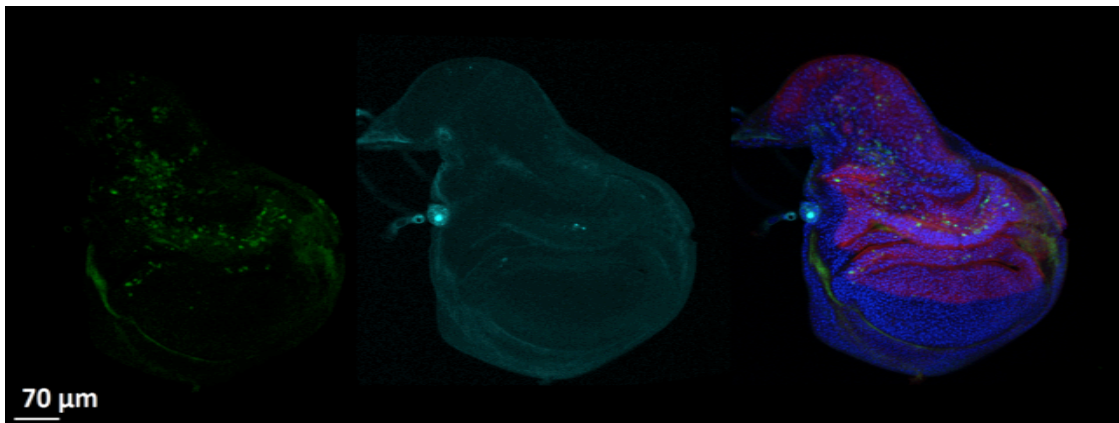


Figura 21. Imatge corresponent a la fluorescència emesa pels discs imaginis d'ala amb el genotip *Ap-GAL4, UASbub3^{RNAi}* sense p35 amb la sobreexpressió de l'inhibidor de JNK *Puc2A*.

Dcp1: Es pot observar com les quantitats expressades d'aquesta proteïna són les mínimes vistes fins al moment. La menor expressió d'aquesta proteïna respecte a l'experiment anterior pot ser deguda a les diferents efectivitats que presenten cadascun dels inhibidors de JNK.

Mmp1: Els nivells que presenta Mmp1 són similars als obtinguts en els anteriors discs amb *Hep75* i també als del control 0. En aquesta imatge podem observar un punt amb molta concentració d'aquesta proteïna fora de la zona de domini d'*Apterous* corresponent a la tràquea del disc.

Aquesta zona mostra de manera natural alts continguts de Mmp1, fet que ens permet comparar els nivells de proteïna sense la via activa i amb JNK activada.

Morfologia: Tot i que *Wg* no és produïda degut a la inhibició de JNK, les dimensions d'aquest disc imaginal d'ala són més grans que en la prova anterior probablement degut a tres factors:

- Disc amb **tumor**: La CIN induïda en la zona d'*Apterous* provoca els tumors que donen ordres incontrolades per a la replicació.
- Els nivells de **mort cel·lular** són molt **baixos**. Això no en provoca un creixement directe, però ajuda a que aquest conservi les seves dimensions normals.
- És possible que hi hagi hores de diferència en l'hora de posta dels ous. Tenint en compte el curt cicle de vida de la *Drosophila melanogaster* i de la celeritat en el seu creixement, unes poques hores poden fer variar les dimensions que presenten els seus teixits.

La forma que presenta el disc és molt similar a la del control 0, tot i que les cèl·lules que conté en la zona de domini d'*Apterous* siguin tumorals. Tot i aquesta igualtat amb el control 0, si observem la zona de color vermell de la imatge de la dreta de la **Figura 21** comprovarem com la conformació dels plecs en aquest espai és molt més irregulars que en el control sense CIN.

La repetició de l'experiment és necessari, ja que d'aquesta manera en fem rèpliques i es poden aconseguir uns resultats més contrastats. Tot i ser els experiments 3.2.1.1 i 3.2.1.2 inhibidors de JNK, aquests aconseguen realitzar la seva funció de maneres oposades. El fet de voler provar el mateix utilitzant diferents recursos i mètodes dóna més fiabilitat als resultats que se'n pugui obtenir.

Pel que es pot observar en aquests dos darrers experiments, l'inhibidor de la via JNK que més bé funciona sense p35 és la sobre expressió de l'element negatiu *Puc* per sobre de l'hipomorf de l'element positiu *Hemipterous*. Cap la possibilitat que *Hep75* no

hagi estat tan eficaç com *Puc2A* degut a algun altre factor que no hem tingut en compte o que senzillament, el fet que *Hep75* sigui un mutant hipomorf faci que aquest no bloquegi per complet JNK com hem explicat anteriorment.

Per tant, a partir d'aquests anàlisis i la comparació entre ells, podem afirmar que l'activació de JNK en casos amb inestabilitat cromosòmica on la mort cel·lular no es trobi inhibida, causa la mort de les cèl·lules aneuploides i la seva corresponent eliminació dels teixits degut a unes proteïnes o bé producte de la mateixa via (*Mmp1*) o directament relacionades amb aquesta (*Dcp1*). La relacionada amb la mort cel·lular és *Dcp1* i la que produeix l'eliminació de les cèl·lules dels teixits és *Mmp1*. Això produeix que, en un context amb CIN, la via JNK tingui un rol d'eliminació de tumors o anti-tumoral.

3.3. L'activació de la via JNK en els models amb CIN on la mort cel·lular es troba inhibida afavoreix el creixement i la malignitat dels tumors

3.3.1. Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi} amb p35 (control per a p35)

Aquest experiment serà l'altre control suplementari que realitzarem a part de l'*Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi}* sense p35. Concretament, aquest ens servirà com a referència per a comparar les posteriors mostres amb el gen *bub3^{RNAi}* amb el gen *p35*. Tot i portar el nom de control, aquest també s'ha de contrastar amb el principal d'igual manera que el control suplementari anterior.

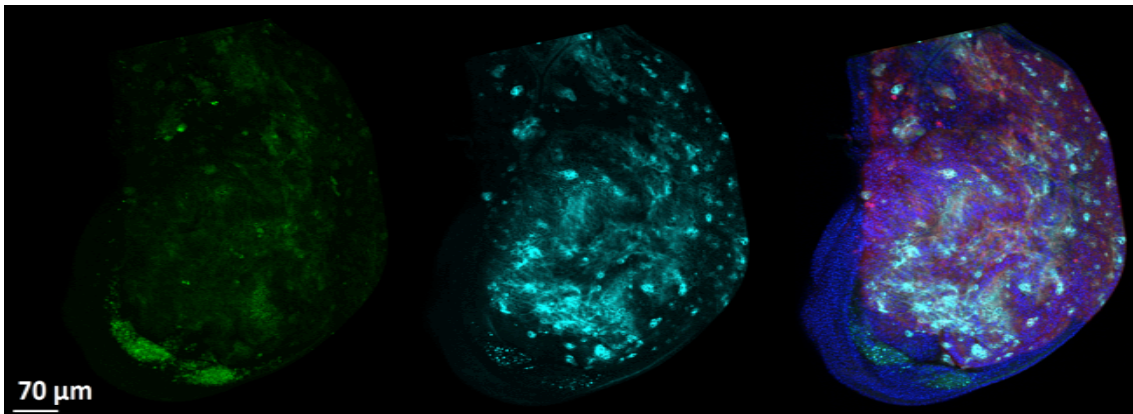


Figura 22. Imatge corresponent a la fluorescència emesa pels discs imaginals d'ala amb el genotip *Ap-GAL4, UASbub3^{RNAi}* amb p35

Dcp1: Els nivells d'aquesta proteïna són similars als observats en el control 0. Tot i l'aparició del tumor i la conseqüent activació de JNK, la mort cel·lular queda inhibida degut a que P35 s'adhereix específicament a un dels precursors de la proteïna *Dcp1* anomenat *DrICE* inhabilitant així la producció de *Dcp1*.

L'única zona del disc on *Dcp1* s'expressa a uns nivells més alts és a la part inferior del *Wing Pouch* ja que tot i que no hi hagi CIN, la pressió que el tumor hi causa, provoca un alt nivell d'apoptosi.

Mmp1: Els alts nivells observats de Mmp1 ens fan constatar que la via JNK segueix activada tot i que la quantitat de Dcp1 hagi minvat considerablement i ens permet veure que P35 desenvolupa el rol que se n'esperava.

Morfologia: El disc ha variat la seva forma natural i ha augmentat molt la seva mida de tal manera que hem hagut de tallar la part superior del *Notum* per tal que hi cabés en la imatge. Les causes d'aquest creixement tant elevat són les següents:

- La **CIN** induïda en aquest. La inestabilitat cromosòmica provoca el tumor i el creixement incontrolat de les cèl·lules.
- **JNK activa.** Aquesta via produirà *Wg* la qual té un rol mitogènic, pel que accelera la velocitat de reproducció de les cèl·lules del teixit.
- **Inhibició de l'apoptosi.** La manca de mort cel·lular no provoca un creixement directe, però ajuda a que el disc no redueixi les seves dimensions i beneficia indirectament a l'expansió dels teixits del disc.

També cal destacar que degut al tumor induït en aquest teixit, el disc ha perdut completament les formes característiques dels plecs interiors, mostrant-se simplement com un cúmulo desordenat de cèl·lules.

3.3.1.1. Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi} amb p35 amb Hep75

Dins la línia experimental amb p35 aquesta serà una de les dues mostres que ens permetran inhibir la via JNK d'igual manera que la pròxima experiència on comptarem amb *Puc2A*.

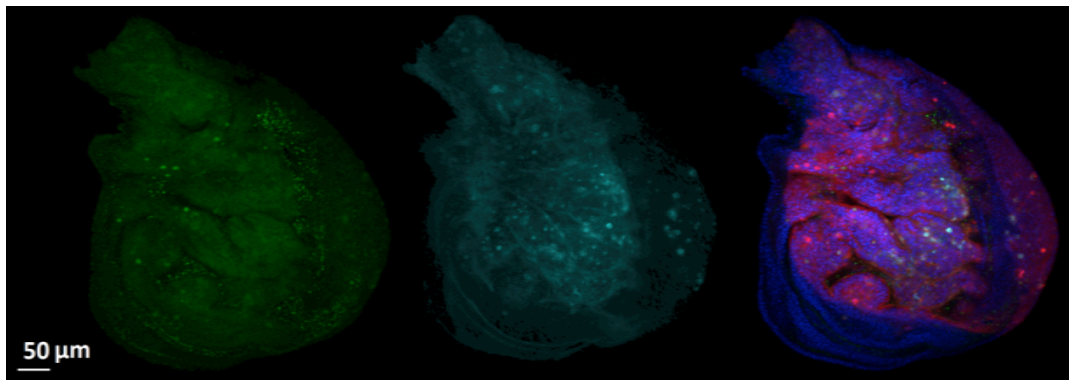


Figura 23. Imatge corresponent a la fluorescència emesa pels discs imaginals d'ala amb el genotip *Ap-GAL4, UASbub3^{RNAi}* amb p35 amb el dominant negatiu d'*Hep*.

Dcp1: Tot i que a simple vista sembli que Mmp1 es troba expressada de forma molt més elevada que en la prova control per a p35, si ens hi fixem observarem que els únics punts que realment ressalten i, per tant, expressen Dcp1 són fins i tot inferiors als de l'experiment anterior. Molt possiblement aquesta acumulació de color de fons és deguda a que durant els rentats amb PBT no es va eliminar per complet tot *background* del disc.

Mmp1: En el cas d'aquesta proteïna succeeix una cosa similar que amb Dcp1, i és que tot i el color uniforme que s'hi observa, els punts més lluminosos i corresponents a les proteïnes reals són ben pocs.

La diferència de fluorescència de Mmp1 entre el control amb p35 i aquest experiment és la prova que JNK queda inhibida gairebé per complet (degut a que un mutant hipomorf no podrà mai bloquejar-la per complet).

Per a poder veure les diferents expressions de les proteïnes correctament i sense aquest color de rerefons, el millor és observar la imatge de la dreta i comparar amb els diferents controls. D'aquesta manera sabrem si tenen una quantitat superior o inferior d'aquestes proteïnes *target* JNK per a veure que realment és així i no hi ha hagut un error durant l'experiment.

Morfologia: Només que ens fixem en l'escala gràfica de la **Figura 23** respecte a la de la **Figura 22** podem comprovar com la mida del disc ha minvat molt, ja que en el control per a p35 aquest no arribava a cabre dins dels marges de la fotografia. Aquesta semblança pel que fa a grandària amb el control 0 és deguda a que en aquesta línia, la producció del factor mitogènic *Wg* ha quedat inhibida degut al bloqueig de JNK.

Pel que fa a la forma del disc, aquesta està alterada pels tumors induïts per la inestabilitat cromosòmica. En aquest disc imaginal d'ala, no es poden distingir ni el *Wing Pouch* ni el *Notum* degut a aquesta proliferació incontrolada de cèl·lules.

3.3.1.2. Ap-GAL4, UAS-bub3^{RNAi} amb p35 amb Puc2A

Aquesta serà l'altra de les mostres que ens permetran inhibir la via JNK dins la línia amb P35. Anteriorment aquest ha estat el millor mètode com a bloquejant de la via JNK, però caldrà veure si amb l'entrada en escena de p35, *Puc2A* manté el paper de millor bloquejant d'aquesta via de senyalització cel·lular.

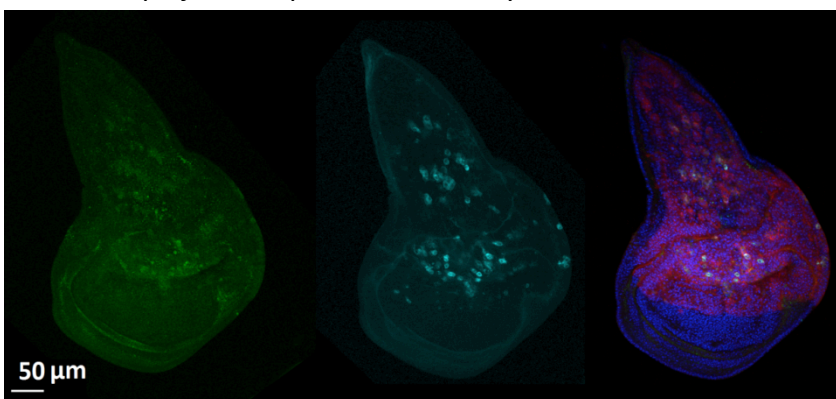


Figura 24. Imatge corresponent a la fluorescència emesa pels discs imaginals d'ala amb el genotip *Ap-GAL4, UASbub3^{RNAi}* sense p35 amb la sobreexpressió de l'inhibidor de JNK *Puc2A*.

Dcp1: El color que mostra la imatge presa del microscopi està repartit de manera bastant homogènia només amb alguns punts més lluminosos que la

resta pel que observem que la mort continua majoritàriament inhibida tant pel rol que té P35 com per la inhibició de JNK.

Mmp1: Podem observar com la quantitat de Mmp1 és molt inferior a la mostrada en la imatge corresponent al control per a p35 i per tant fent valer a Puc2A com a bon bloquejant de la via. La quantitat de proteïna expressada és lleugerament superior amb *Hep75* que amb *Puc2A*.

Morfologia: La mida d'aquest disc és més peita respecte a l'anterior inhibidor de la via degut a que es repeteix la idea vista anteriorment que *Puc2A* és millor bloquejant de JNK que el mutant hipomorf d'*Hemipterous*. Aquesta idea es reforça si ens fixem en la diferència de plecs entre els dos experiments, obtenint en aquest una quantitat menor (també afectada pel rol de *Wg*).

Aquest experiment guarda un alt grau de semblança en relació a la morfologia del disc, amb el control per a CIN sense p35 ja que en els dos podem observar la part de dalt més estreta tot i ser la forma dels plecs no tant semblant.

Per tant, a partir d'aquests resultats podem verificar el plantejament inicial que esmentava que l'activació de JNK en casos amb inestabilitat cromosòmica on la mort cel·lular es troba inhibida produeix un augment en la malignitat i el creixement neoplàstic degut a les proteïnes producte que genera o estan relacionades amb la via. Dcp1, causant de mort cel·lular, queda inhibida per l'acció de P35. Pel que fa a dues altres proteïnes de la via: *Wg* i *mmp1*, la primera provoca un efecte mitogènic sobre les cèl·lules veïnes, el que en fa augmentar la població considerablement i causa el creixement del tumor, i la segona n'augmenta la malignitat, ja que provoca el trencament de la membrana basal de les cèl·lules (pas previ a la metastasi). Això produeix que un context amb CIN on els processos apoptòtics es trobin inhibits, la via JNK tingui un rol de promoció de tumors o pro-tumoral.

		Nivell Dcp1	Nivell Mmp1	Creixement tumor
<i>Ap-GAL4, UAS-Tom</i>		↓	↓	∅ No hi ha tumor
<i>UAS-bub3^{RNAi}</i>	Control	↑	↑	↘
	<i>Hep75</i>	↓	↓	↗
	<i>Puc2A</i>	↓	↓	↗
<i>UAS-bub3^{RNAi}</i> + <i>p35</i>	Control	↓	↑↑	↑
	<i>Hep75</i>	↓	↓	→
	<i>Puc2A</i>	↓	↓	↓

Figura 25.Taula on es resumeixen els nivell expressat de les proteïnes producte de JNK en cada genotip, i on observem que JNK té un rol anti-tumoral en condicions de CIN on la mort cel·lular no està bloquejada, i que la mateixa té un caràcter pro-tumoral quan l'apoptosi es veu bloquejada.

4. CONCLUSIONS

En aquest treball s'ha pogut confirmar que JNK es troba activada en cèl·lules amb inestabilitat cromosòmica aneuploides en les quals hi provoca la iniciació del programa de mort cel·lular i l'eliminació d'aquestes cèl·lules aberrants de l'epiteli, pel que podem afirmar que en aquest context biològic JNK manté un paper clau en l'eliminació de tumors o un rol anti-tumoral mitjançant l'eliminació de cèl·lules aberrants.

També queda corroborat que quan JNK es troba activada, degut a la CIN induïda, i la mort cel·lular es troba bloquejada (d'igual manera com es dona en les cèl·lules tumorals malignes) aquesta via passa a tenir un paper completament oposat, on els productes de JNK afavoreixen la proliferació del tumor i n'augmenten la seva malignitat, pel que en aquest altre context la via JNK té un rol pro-tumoral.

Per tant, s'ha complert l'objectiu d'analitzar el rol dual de la via JNK i, més concretament, de veure ens quins contextos aquesta pren un paper o un altre en el desenvolupament tumoral. També s'ha pogut generar satisfactòriament un model de CIN amb aneuploidia (on per tant s'hi indueixi la tumorigènesi) tant amb la mort cel·lular activada com bloquejada, en l'animal model *Drosophila melanogaster*, necessari per a dur a terme els diferents experiments.

Pel que fa als meus objectius personals, s'han complert les expectatives que tenia al principi del treball, i he après molt sobre temes que m'apassionen relacionats amb la biomedicina. No només he guanyat en coneixements teòrics sinó que també he pogut endinsar-me en el món de la recerca i aprendre com funciona un laboratori professional i algunes de les tècniques i línies d'investigació que s'utilitzen actualment.

Considero que ha estat una experiència molt enriquidora i que finalment m'ha permès acabar de decidir-me sobre el grau universitari que m'agradaria cursar: les ciències biomèdiques.

5. DISCUSSIONS

Com hem confirmat amb els experiments realitzats, la via de senyalització cel·lular JNK pot jugar dos papers completament oposats en el desenvolupament tumoral: la progressió o regressió de tumors. S'ha pogut verificar que aquesta via té un rol com a supressora de cèl·lules aberrants, mitjançant l'activació del procés d'apoptosi en aquestes, pel que afavoreix l'eliminació dels possibles tumors. Però al mateix temps, esta via té una funció que afavoreix al creixement i malignitat del tumor quan en les cèl·lules anormals no s'hi pot activar l'apoptosi degut, per exemple, a l'acció d'un oncogen (con succeeix en la majoria de carcinomes).

Es evident que descobrir com la cèl·lula duu a terme tots els processos per a la regulació de les seves vies internes i la funció que aquestes desencadenen en els diferents contextos biològics en que es poden trobar són unes eines clau per a poder entendre millor el complex mecanisme que és el funcionament de la nostra unitat bàsica. La idea d'aquest treball és veure que a partir de la investigació bàsica podem trobar els mecanismes cel·lulars involucrats en l'activació tumoral. Això s'aconsegueix a través del disseny experimental adequat.

Una millor comprensió d'aquests processos faciliten saber com actuarà la cèl·lula en els diferents escenaris i ens permetrà poder buscar una resposta a problemes que es puguin plantejar que sense una anterior entesa de les bases moleculars no podria existir. Pel que conèixer aquestes bases és un factor molt important en recerca biomèdica, concretament en el càncer, que hauria de ser sempre tingut en compte.

L'ús de *Drosophila melanogaster* com a model genètic permet experimentar i avançar de forma ràpida gràcies al seu curt cicle de vida i a que tant el genoma com els mecanismes cel·lulars entre humans i aquesta espècie estan altament conservats. Els resultats obtinguts en models genètics (com els d'aquest treball) han de ser analitzats en organismes superiors per a veure si els mecanismes estan realment conservats, tot i que gran part de la feina ja estigui feta. A més, *Drosophila* permet crear grans poblacions genètiques, utilitzar mutants, etc., que ajuden enormement a la comprensió de la biologia.

Per tal de confirmar els resultats obtinguts en aquesta pràctica, s'haurien de realitzar més vegades per obtenir resultats més robustos i, de ser necessari, es podria fer un anàlisi estadístic per a veure si realment els resultats són vàlids.

Partint de la base que en mamífers hi ha 3 JNK diferents, cada una amb un rol determinat, i que aquesta també participa en processos necessaris per a la vida cel·lular (el que fa que no la puguem bloquejar en tot l'organisme perquè produiríem un dany), les possibles futures vies d'investigació realitzables a partir dels resultats d'aquest treball, serien, per exemple, aconseguir trobar elements específics que ens

permetin bloquejar aquesta via només en cèl·lules aberrants o de la manera més específica possible.

La ciència bàsica obre un immens camí al futur, perquè tota aquesta informació que es va acumulant serveix per a **seguir avançant** en múltiples malalties i també per a entendre com funcionen les cèl·lules, els òrgans i els organismes.

Tot i que no fos un dels objectius plantejats inicialment, en aquest treball hem observat la diferència de comportament que mantenen els dos potencials bloquejadors de la via de JNK: l'element negatiu *Puc2A* i l'hipomorf *Hep75*. Encara que a priori havien de dur a terme la mateixa funció, en els resultats comprovem que, tot i que els dos han funcionat per a bloquejar la via de JNK, la sobre expressió de l'element negatiu de JNK *Puc2A* inhibeix millor la via que l'hipomorf *Hep75* de l'element positiu *Hep*. Per a corroborar aquests resultats seria necessari repetir l'experiència per tal de fer més sòlids els resultats obtinguts.

6. AGRAÏMENTS

La realització d'aquest treball no hagués estat possible sense l'ajuda de moltes persones i institucions.

Primerament, agrair a l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona per haver-me donat la possibilitat de realitzar la part pràctica en els seus laboratoris i oferir-me un tutor de manera individualitzada. Concretament de donar-me l'oportunitat de treballar al costat de la meva tutora en l'IRB, una investigadora professional que ha publicat diversos articles relacionats amb l'iniciació tumoral en *Drosophila melanogaster*, qui m'ha ajudat en el plantejament del treball i m'ha supervisat tota la part experimental d'aquest i amb qui he compartit moltes hores de laboratori aquest darrer estiu.

També donar les gràcies a la meva tutora del treball a l'institut, qui m'ha orientat en aquells moments on era més necessari i a la meva família, per estar sempre allí i acompanyar-me en aquest llarg camí. Sense ells tot això no hagués estat mai possible.

7. BIBLIOGRAFIA

INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Naturaleza del cáncer [en línia] Disponible a <<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>> [consulta: 25 d'agost de 2016]

VIQUIPÈDIA. Tumor [en línia] Disponible a <<https://es.wikipedia.org/wiki/Tumor>> [consulta: 2 de setembre de 2016]

INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Diccionario de cáncer [en línia] Disponible a <<http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=45301>> [consulta: 2 de setembre de 2016]

PUBMED.gov. The hallmarks of cancer [en línia] Disponible a <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>> [consulta: 10 de setembre de 2016]

VIQUIPÈDIA. The hallmarks of cancer [en línia] Disponible a <https://en.wikipedia.org/wiki/The_Hallmarks_of_Cancer> [consulta: 10 de setembre de 2016]

EWG. Rethinking carcinogens: "Hallmarks of cancer." How normal cells turn into death cells [en línia] Disponible a <<http://www.ewg.org/research/rethinking-carcinogens/hallmarks-cancer-how-normal-cells-turn-cancer-cells>> [consulta: 10 de setembre de 2016]

VIQUIPÈDIA. Angiogènesi [en línia] Disponible a <<https://ca.wikipedia.org/wiki/Angiog%C3%A8nesi>> [consulta: 10 de setembre de 2016]

PUBMED.gov. The hallmarks of cancer: the next generation [en línia] Disponible a <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>> [consulta: 10 de setembre de 2016]

VIQUIPÈDIA. Chromosome instability [en línia] Disponible a <https://en.wikipedia.org/wiki/Chromosome_instability> [consulta: 30 d'agost de 2016]

VIQUIPÈDIA. Signal transduction [en línia] Disponible a <https://en.wikipedia.org/wiki/Signal_transduction> [consulta: 16 de setembre de 2016]

TUTORVISTA. Phosphorylation [en línia] Disponible a <<http://chemistry.tutorvista.com/biochemistry/phosphorylation.html>> [consulta: 17 de setembre de 2016]

GENECARDS. Bub3 Gene (Protein Coding) [en línia] Disponible a <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BUB3>> [consulta: 30 d'agost de 2016]

YOUTUBE. Proteína G y señalización celular básica [en línia] Disponible a <<https://www.youtube.com/watch?v=ByiTyMLW56k>> [consulta: 19 d'abril de 2016]

DROSOPHILA AS A MODEL FOR CHROMOSOMAL INSTABILITY. Dawei Liu, Zeeshan Shaukat, Rashid Hussain, Mahwish Khan and Stephen L. Gregory [en línia] Disponible a <<http://www.aimspress.com/fileOther/PDF/Genetics/20150101.pdf>> [consulta: 17 de setembre de 2016]

UNIVERSITY OF ROCHESTER MEDICAL CENTER. JNK, Oxidative Stress and Aging [en línia] Disponible a <https://www.urmc.rochester.edu/labs/bohmann-lab/projects/jnk_oxidative_stress_and_aging> [consulta: 24 de setembre de 2016]

RESEARCHGATE. JNK pathway [en línia] Disponible a <https://www.researchgate.net/figure/223961225_fig9_The-JNK-pathway-is-a-kinase-cascade-that-when-activated-in-Drosophila-leads-to> [consulta: 24 de setembre de 2016]

VIQUIPÈDIA Early 35 kDa protein [en línia] Disponible a <https://en.wikipedia.org/wiki/Early_35_kDa_protein> [consulta: 16 d'agost de 2016]

YOUTUBE. Mutaciones con efecto dominante negativo [en línia] Disponible a <https://www.youtube.com/watch?v=qquh_O7mrdY> [consulta: 9 d'agost de 2016]

THE ARROGANT SCIENTIST. Balancer chromosomes [en línia] Disponible a <<https://arrogantscientist.wordpress.com/2009/01/12/balancer-chromosomes/>> [consulta: 9 d'agost de 2016]

UNIVERSIDAD DE NAVARRA. Haploinsuficiencia y efecto dominante-negativo [en línia] Disponible a <<http://www.unav.es/ocw/genetica/tema8-4.html>> [consulta: 9 d'agost de 2016]

BIODIC. Hipomorfo [en línia] Disponible a <http://www.biodic.net/palabra/hipomorfo/#.V-gIG_mLSM8> [consulta: 25 de setembre de 2016]

YOUTUBE. Producción de anticuerpos secundarios anti IgG de conejo fusionados a GFP en Escherichia coli [en línia] Disponible a <<https://www.youtube.com/watch?v=Nn0r6NpQpec>> [consulta: 11 d'agost de 2016]

VIQUIPÈDIA. Phosphate-buffered saline [en línia] Disponible a <https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate-buffered_saline> [consulta: 11 d'agost de 2016]

UNIPROT. Mitotic checkpoint protein Bub3 [en línia] Disponible a <<http://www.uniprot.org/uniprot/O43684>> [consulta: 7 de juliol de 2016]

INDIANA UNIVESITY. An Introduction to Balancers [en línia] Disponible a <http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/balancers/balancer_intro.htm> [consulta: 17 d'agost de 2016]

CUREFFI.org. Introduction to Drosophila: genotypes, recombination and balancer chromosomes [en línia] Disponible a <<http://www.cureffi.org/2014/10/27/genetics-16/>> [consulta: 17 d'agost de 2016]

BOSTON UNIVERSITY. Fluorochromes table [en línia] Disponible a <<http://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/Fluorochromes-Table.pdf>> [consulta: 17 d'agost de 2016]

THERMOFISHER. Dapi [en línia] Disponible a <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1306>> [consulta: 17 d'agost de 2016]

INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Estadísticas del cáncer [en línia] Disponible a <<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas>> [consulta: 29 d'octubre de 2016]

PUBMED.org. Aneuploidy and tumorigenesis in Drosophila <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24641887>> [consulta: 20 de maig de 2016]