UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

THIAGO RONCINI GOMES DA COSTA

**A família IRM de moléculas de adesão celular durante a histólise da glândula salivar
larval de *Drosophila melanogaster***

RIBEIRÃO PRETO

2017

THIAGO RONCINI GOMES DA COSTA

A família IRM de moléculas de adesão celular durante a histólise da glândula salivar larval de
Drosophila melanogaster

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo como pré-requisito para a obtenção
do título de Mestre em Biologia Celular e
Molecular.

Orientador: Ricardo G.P. Ramos

Ribeirão Preto

2017

Nome: COSTA, Thiago Roncini Gomes da

Título: A família IRM de moléculas de adesão celular durante a histólise da glândula salivar larval de *Drosophila melanogaster*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a).

Instituição

Julgamento

Prof(a). Dr(a).

Instituição

Julgamento

Prof(a). Dr(a).

Instituição

Julgamento

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo G.P. Ramos por ter me acolhido em seu laboratório e pela orientação concedida.

À minha família por todo o apoio oferecido.

Ao Carlos Couto, Mara S.A. Costa e Maiaro C.R. Machado por toda a ajuda com experimentos, ensinamentos e a vivência diária no laboratório. Ao Valdir, sem o qual nada neste trabalho teria sido feito.

À Vani, pela presteza em seu auxílio com os experimentos de persistência por histologia normal.

Ao André C. Silva, por tantas histórias divertidas e excelente companhia; Rafael M. de Oliveira, pelas longas e longas conversas sempre muito produtivas e ao Rafael Pessoa, que me suportou e auxiliou em diversos momentos.

À Vanessa C. Arfelli e Fernanda M. Rey, pelo apoio e companheirismo.

À Roberta R.C. Rosales pelo auxílio que transcendeu aspectos técnicos de obtenção e análise de imagens, pela amizade incrível e personalidade admirável.

Aos amigos e companheiros descobertos no departamento; Camila, Cibele, Felipe, H. Frank, Giovana, Luana, Luísa, Marina, Mário e, em especial, Gerardo R. Amores (a.k.a. Mexicano, Chicharito...) por todas as conversas no Marcão e outras expedições.

À Camila e Gabriela pela paciência e eficiência em seus trabalhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e ao Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos pela disponibilização de recursos, equipamentos e estrutura.

“[...] any man could, if he were so inclined, be the sculptor of his own brain [...]”

Ramón y Cajal

A família IRM de moléculas de adesão celular durante a histólise da glândula salivar larval de *Drosophila melanogaster*

COSTA, T.R.G.

RESUMO: O complexo Irre Recognition Module (IRM) é um importante subgrupo de proteínas transmembranares da superfamília das imunoglobulinas que desempenham função de adesão celular e participam de diversos processos do desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*, tais como: direcionamento axonal, fusão de mioblastos, espaçamento dos órgãos sensoriais, autofagia das glândulas salivares, eliminação de células suplementares e especificação de destino celular na retina pupal. A família IRM é composta por quatro membros bem caracterizados: *roughest* (*rst*; *irregular-chiasmC*); *kin-of-irre* (*kirre*); *hibris* (*hbs*) e *sticks-and-stones* (*sns*). Uma característica marcante entre dois membros deste grupo, *kirre* e *rst*, é a ocorrência de redundância funcional durante o processo de fusão de mioblastos na musculatura somática embrionária e na fase de “cell sorting” das células interomatióidais na etapa final de padronização da retina pupal de *Drosophila*. Neste contexto, foi observado que *kirre* pode suprir a ausência ou diminuição nos níveis de expressão de mRNA de *rst* para manter o fenótipo selvagem destes tecidos. Em glândulas salivares larvais de *Drosophila*, modelo amplamente utilizado para estudo da morte celular programada (MCP), mutantes *rst^D*, um alelo semidominante de *rst*, apresentaram fenótipo de persistência deste tecido mesmo após 12 horas à sua eliminação observada em animais selvagens. Considerando o importante processo de redundância funcional promovido por membros do grupo IRM, durante o desenvolvimento de tecidos de *Drosophila melanogaster*, avaliamos a correlação entre os 4 membros deste grupo durante o processo de autofagia da glândula salivar larval. Para tanto, os níveis de transcrição de genes do complexo foram analisados por RT-qPCR após a formação do pupário até o desfecho do processo de histólise. Verificamos uma diminuição a nível transcripcional de *rst* após o pico no título de ecdisona que leva a histólise da glândula em animais selvagens, e níveis alterados dos mRNAs dos membros do complexo em animais mutantes *rst^D*. Contudo, a superexpressão de *rst* não foi suficiente para gerar glândulas persistentes. Além disso, descrevemos a localização espacial, por imunohistoquímica, dos membros do complexo, enfatizando a colocalização de *rst* e *kirre*, contrariamente aos membros *sns* e *hbs*.

Palavras-chave; glândula salivar. IRM. *Roughest*. *Drosophila*. MCP.

IRM family of cell adhesion molecules during larval salivary gland
histolysis of *Drosophila melanogaster*

COSTA, T.R.G

ABSTRACT: The complex Irre Recognition Module (IRM) is an important subgroup of transmembrane proteins of the immunoglobulin superfamily that play a role in cell adhesion and participates in several processes of development of *Drosophila melanogaster*, such as: axonal targeting, fusion of myoblasts, spacing of sensory organs , autophagy of the salivary glands, elimination of supplementary cells and specification of cellular target in the pupal retina. The IRM family is composed of four well-characterized members: *roughest* (*rst*; *irregular-chiasmC*); *kin-of-irre* (*kirre*); *hibris* (*hbs*) and *sticks-and-stones* (*sns*). A striking feature of this group is the occurrence of functional redundancy during the process of fusion of myoblasts in the embryonic somatic musculature and in the phase of cell sorting of the interomatid cells in the final step of standardization of the pupal retina of *Drosophila*. In this context, it can be concluded that it can not provide an absence or decrease the mRNA expression levels of maintaining the wild tissue phenotype. In larval salivary glands of *Drosophila*, a widely used model for the study of programmed cell death (MCP), *rst*^D mutants, a semidominant *rst* allele, showed persistence phenotype of this tissue after 12 hours for its observed elimination in wild animals. During the development of *Drosophila melanogaster* tissues, we evaluated a correlation between the 4 members of this group during the autophagy process of the salivary gland. To that end, transcription levels of complex genes were analyzed by RT-qPCR after patient formation until the end of the histolysis process. We have seen a transcriptional decrease in the first unpronounced postdoc peak of ecdysone leading to histolysis of the gland in wild animals, and altered levels of mRNAs of the complex members in *rst*^D mutant animals. However, a first overexpression was not enough to generate persistent glands. In addition, we describe a spatial location, by immunohistochemistry, of two members of the complex, emphasizing a first and second hand colocalization, unlike the *sns* and *hbs* members.

Key words; Salivary gland. IRM. Roughest. *Drosophila*. MCP.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
1.1.A Biologia do Desenvolvimento e <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1.2.O gene <i>rst</i>.....	13
1.3.Morte celular programada	17
1.4.A glândula salivar larval.....	18
2.OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1.Materiais	24
3.2.Métodos	27
4.RESULTADOS.....	30
4.1.Localização subcelular das IRM's	30
4.2.Ativação temporal dos elementos regulatórios de <i>rst</i>.....	35
4.3.Quantificação dos níveis de mRNA das IRM's.....	39
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1.Introdução

1.INTRODUÇÃO

1.1.A Biologia do Desenvolvimento e *Drosophila melanogaster*

O advento da microscopia de luz, com o desenvolvimento de lentes e sistemas mais refinados em microscópios possibilitou a rápida expansão dos estudos morfológicos em seres vivos. Deste modo, essas descrições visuais deram origem a áreas como a citologia, histologia e embriologia, tendo como seus objetos células, tecidos e embriões, respectivamente.

Em 1910, o embriologista Thomas Hunt Morgan estabeleceu uma série de linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*. Suas contribuições, além de apresentarem a base biológica da hereditariedade fundamentaram o uso de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo. As contribuições do laboratório de Morgan se somaram a de outros, constituindo aquilo que se denominou como a Síntese Moderna da Biologia, levando a uma redefinição do paradigma da embriologia, que passou a adotar uma visão dinâmica a nível de evolução de espécies, mas também quanto a eventos moleculares. Assim, fundamentou-se a Biologia do Desenvolvimento.

A experimentação com *D.melanogaster* é facilitada por seu curto ciclo de vida, fácil discriminação sexual, baixos custos de manutenção, possibilidade de manutenção de grandes quantidades de indivíduos e variantes genéticas, estabilidade de linhagens pelo uso de cromossomos balanceadores e outros.

Drosophila se tornou um dos modelos mais amplamente utilizados, sendo um dos primeiros eucariotos a ter seu genoma completamente sequenciado. As contribuições do estudo deste organismo foram inúmeras, passando desde aquelas mais classicamente descritas como redes gênicas que regulam a formação de eixos corporais, desenvolvimento do sistema nervoso até, recentemente, em seu uso como modelo de estudo para doenças neurodegenerativas, tais como Parkinson e Alzheimer, vias de crescimento e do sistema imunológico.

Em 1992, Ricardo Ramos, em seu trabalho de pós-doutorado com o grupo de Karl Fischbach relacionou o *locus roughest*, ligado a ocorrência de rugosidade no olho composto, ao desenvolvimento incorreto da trajetória de fibras axonais do quiasma óptico (*Irregular chiasm-C*). Descreveram esse locus, *IrreC-rst*, a nível molecular, tendo sequenciado seu cDNA, identificado a natureza de seu produto e a expressão por northern blot em diferentes tecidos e fases do desenvolvimento de *Drosophila* (RAMOS, 1993).

1.2.O gene *rst*

As descrições da morfologia normal do lobo e quiasma ópticos, padronizadas pela técnica de colarinho para histologia normal, possibilitaram a identificação de diversos genes afetando estes tecidos, pela inserção de elementos P, dentre estes genes estava *Irregular-chiasmC* (FISCHBACH et al, 1989; BOSCHERT et al, 1990).

O locus foi rastreado na região 3C5-C6 do cromossomo X, tendo seu transcrito 23 kb, 8 éxons, e seu mRNA 5 kb. Além disso, apresenta seis repetições ATTTA na região 3' não traduzida (figura 1). O produto protéico de 764 aminoácidos apresenta uma região transmembrana de 509 na porção extracelular e 208 na porção carboxi-terminal. Cinco domínios imunoglobulinas são preditos em sua região extracelular, com alto nível de similaridade com proteínas de vertebrados. Tem uma região rica em glutaminas na porção intracelular (“opa-like”), e resíduos de serina e treonina fosforiláveis e uma sequência reconhecida por proteínas com domínio PDZ (PONTING et al, 1997).

Uma série de mutantes deste gene já foi descrita tais como *rst*^{UB883}, que apresenta um elemento P inserido em seu início de transcrição; *rst*^{1R34}, com uma inversão cujo ponto de quebra proximal está dentro do segundo intron; *rst*^{CT}, contendo uma deleção de 98 pb na região codificadora do gene, tendo um produto proteico com porção intracelular truncada; *rst*^D, que tem um rearranjo cromossômico na região regulatória do gene.

A proteína Rst está envolvida em vários eventos no desenvolvimento de *D. melanogaster*, tais como a fusão de mioblastos durante a diferenciação da musculatura somática embrionária (STRÜNKELNBERG et al, 2001); o direcionamento axonal do lobo óptico (BOSCHERT et al, 1990; SCHNEIDER, 1995); a morfogênese de células precursoras interomatifidiais (REITER et al 1996; ARAÚJO et al., 2003; BAO; CAGAN, 2005), a padronização dos órgãos sensoriais da antena (REDDY et al, 1999); diferenciação das células pigmentares do olho composto (ARAÚJO et al, 2003) e a morte celular programada no mesmo (WOLF; READY, 1991; RAMOS et al, 1993; REITER et al, 1996; ARAÚJO et al 2003); além da autofagia da glândula salivar larval (SIMON et al, 2009); foi também demonstrado que quando a porção extracelular desta proteína é superexpressa, ocorre uma interferência na celularização do blastoderma (MODA et al, 2000).

Simon et al. (2009) observaram que pupas portadoras de uma mutação dominante na região regulatória do gene *roughest* (*rst*^D) apresentaram suas glândulas larvais em períodos superiores a 16 horas após a formação do pupário, chegando até mesmo 24 horas após a formação do mesmo. O rearranjo no DNA em *rst*^D foi mapeado em uma região de 556 pb

HpaI-XhoI localizada aproximadamente 18 kb *upstream* do sitio de inicio do cDNA de *rst*. Este rearranjo pode, portanto, ser responsável pelo fenótipo de *rst*^D pela interrupção física da sequência regulatória ou de algum modo pela interferência na sua especificidade transcricional no espaço e tempo (ARAÚJO et al., 2003).

Em oposição, mutantes com perda de função de *rst* apresentaram fenótipo similar aos indivíduos controle. Em selvagens, ao término do terceiro estágio larval, ocorre um pulso do hormônio esteroide 20-hidroxiecdisona (aumento no título do hormônio na hemolinfa) que inicia o estágio pré-pupal, através da formação de um pupário. Dez horas após a formação deste pupário, um novo pulso do hormônio ocorre, levando ao evento de eversão da cabeça do adulto e a transição do estágio pré-pupal para o pupal. Os tecidos desnecessários durante o novo estágio são removidos rapidamente através da morte celular programada, e são, então, substituídos por estruturas adultas, diferenciadas de células presuntivas pré-determinadas, os discos imaginais. Uma hora após o pico de ecdisona, ao redor de 13 horas após a formação do pupário (AFP), as células da glândula salivar assumem um formato arredondado, com o aparecimento de grandes vacúolos citoplasmáticos e alguns destes associados às membranas celulares. Cerca de 14 horas após a formação do pupário, vacúolos autofágicos contendo organelas, especialmente mitocôndrias, podem ser visualizados (SIMON et al., 2009).

Pupas com a construção pCa18D3.1, provenientes de nosso laboratório, também apresentaram persistência da glândula salivar. pCa18D3.1 é uma das cinco construções de *rst* contendo deleções crescentes na porção intracelular. Foi introduzida na linhagem germinativa de *Drosophila* e uma linhagem transgênica estável foi obtida, na qual o transgene estava inserido no cromossomo X. Esta construção codifica apenas o domínio extracelular da proteína (EcdRst), e está sob o controle de um promotor de choque térmico *hsp 70* (LIS et al, 1983), que estimula a expressão generalizada e em altos níveis quando embriões de *Drosophila* são submetidos a altas temperaturas (por exemplo, 33°C por 2 horas ou 37°C por 30 minutos). A marcação do citoesqueleto de actina com faloidina em glândulas persistentes mostrou que este também persistia intacto, diferentemente, do fenótipo selvagem, que apresenta uma desestruturação prévia a autofagia da glândula (SIMON et al., 2009).

Machado et al. (2011) observaram que mutantes *rst*^D apresentam fenótipos de olhos rugosos com coloração vermelho escuro, diferente da tonalidade brilhante selvagem. Neste caso, ocorre um atraso nos eventos precedentes à especificação do destino celular das células intermatidiais (IOCs), em relação ao fenótipo selvagem. O atraso se evidencia com o recrutamento das células pigmentares primárias (PC1) e durante o processo de reorganização celular ("*cell sorting*"), após o qual as IOCs em excesso sofreriam MCP. Neste mutante

frequentemente ocorre uma falha das IOCs em seguir um destino celular, permanecendo aparentemente indiferenciadas até a fase adulta, mesmo se a MCP é artificialmente bloqueada (ARAÚJO et al, 2003). Um atraso na morte celular programada nestes mutantes corresponderia ao atraso no padrão de expressão da proteína Rst. Análises moleculares confirmaram a existência de um rearranjo localizado cerca de 19kb à montante do provável início de transcrição de *rst*, dentro de uma região de 556 pares de base definida pelas enzimas Hpa I e Xho I. Tais resultados reforçam a hipótese de que as diferenças fenotípicas do mutante *rst^D* sejam causadas por defeitos relacionados com sua regulação transcricional (ARAÚJO et al., 2003). A interferência causada pelo rearranjo molecular mapeado dentro da região reguladora de *rst* levaria a um atraso ou diminuição dos níveis transcricionais máximos de seu mRNA e à conseqüente defasagem temporal observada na dinâmica de sua expressão protéica.

Análises do perfil de expressão de *rst* através de qRT-PCR mostraram que nos mutantes *rst^D* a queda nos níveis de RNAm da proteína no período de 34 % após a formação do pupário ocorria de modo mais lento que o observado para selvagens. A análise de dois revertentes para o fenótipo selvagem, RWT8 e RWT6, mostraram padrões de expressão de *rst* diferentes do selvagem, sendo que no último sequer foi detectada expressão. Deste modo, em algumas circunstâncias a expressão de *rst* parece ser dispensável para a formação de um padrão omatidial correto. Isto parece ser possibilitado pela atuação do parálogo de *rst*, *kirre*, redundância também descrita para a fusão de mioblastos em embriões. A dinâmica do RNAm de *kirre* no revertente RWT6 se mostrou quase indistinguível do padrão de *rst* em selvagens. O uso de RNAi para *kirre* neste revertente, corroborou esta redundância funcional, levando à severidade no fenótipo mutante. Entretanto, a redução na expressão de *kirre* não apresentou o mesmo efeito na concentração de RNAm de *rst* neste tecido (Machado, FAPESP 2007/55984-4).

Os parálogos Neph1 e Nefrina interagem fisicamente nas membranas dos podócitos renais formando um complexo que transduz sinais, coordenando a dinâmica do citoesqueleto durante o desenvolvimento do podócito e após a ocorrência de injúrias no mesmo. A fosforilação de tirosina dependente de Fyn, o subsequente recrutamento de Grb2 e indução da polimerização de actina foram relatados para Neph1, de modo similar a nefrina (GARG *et al.*, 2007). Todos os dados sugerem, então, que a atuação coordenada, seja pela redundância ou formação de complexos, das proteínas IRM modula a integridade do citoesqueleto.

Apitz et al. (2004) identificaram regiões cis regulatórias deste gene participando destes distintos processos e, posteriormente, através do sistema UAS-Gal4 descreveram fatores trans ativadores como Single-Minded, dmef2, Pointed.P1 e Su(H)-VP16 (APITZ et al., 2005).

Roughest pertence a um subgrupo da superfamília das imunoglobulinas denominado “IRM” (“Irre recognition module”), que inclui os produtos dos genes *kirre*, *hibris* (*hbs*) e *stick-and-stones* (*sns*) de *Drosophila melanogaster*; e as proteínas SYG-1 de *C. elegans*; Neph1, Neph2/mKirre, Kirrel2 de *Mus musculus* e *Homo sapiens*, bem como homólogos menos caracterizados em *D. virilis* e *Anopheles* sp.

1.3.Morte celular programada

A morte celular programada é um processo conservado filogeneticamente que ocorre durante o desenvolvimento embrionário e sucedente a este, participando da modelagem tecidual, organogênese e desempenhando funções de proteção à integridade do organismo (BAEHRECKE, 2002; JACOBSON et al., 1997). Assim, esse processo promove a eliminação de células excedentes e/ou não diferenciadas, como durante a formação do sistema nervoso e dos dígitos das mãos de primatas, e tem papel fundamental na metamorfose, cujos expoentes mais conhecidos são insetos holometábolos e anfíbios anuros. Atuando na regulação temporal desse processo está a ativação de ampla maquinaria celular e uma subsequente série estereotipada de sinais (BAEHRECKE, 2003). A reabsorção da cauda de girinos, por exemplo, está relacionada ao título do hormônio tireoidiano enquanto que a metamorfose de insetos vincula-se ao hormônio esteroide 20-hidroxiecdisona (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011). Embora seja conservada, diferentes mecanismos respondem pela eliminação regulada das células.

O processo mais comum e bem conhecido de morte celular programa é a do tipo I, ou apoptose. Neste caso, danos ao DNA, ausência de nutrientes, oxigênio, fatores de sobrevivência ou como resposta a ligantes específicos ativa-se uma via intrínseca ou extrínseca de apoptose. No primeiro caso a liberação de componentes normalmente presentes na mitocôndria é responsável pela formação do complexo inicial enquanto no segundo o processo é iniciado por receptores de membrana. As vias podem funcionar conjuntamente, e ambas atuam através de proteases denominadas caspases. Estas se ativam em cascata e promovem também a liberação de endonucleases, a fosforilação das laminas nucleares, componentes do citoesqueleto e proteínas de adesão celular, levando a perda da organização nuclear, formato e adesão da célula. Ao término, não há reposta inflamatória, pois o conteúdo celular foi fagocitado, uma vez que o fosfolípídeo fosfatidilserina, presente normalmente no folheto interno da membrana plasmática é exposto no folheto externo, marcando a célula para fagocitose. (ALBERTS et al., 2008).

Já a morte celular programada do tipo II ocorre por autofagia e também não libera conteúdo celular no meio externo, porém não requer a presença de fagócitos (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011). A autofagia se relaciona à carência de nutrientes, fatores de crescimento, oxigênio, e energia (HE; KLIONSKY, 2009; KROEMER et al., 2010) e leva a um aumento na produção de aminoácidos pela reabsorção do material celular por atividade lisossomal (VABULAS; HARTL, 2005), atuando também no controle de qualidade das organelas (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011). Existem três classes de autofagia: macroautofagia, na qual uma membrana isola parte do material citoplasmático e se funde ao lisossomo; microautofagia, na qual o lisossomo engolfa parte do material celular, e autofagia mediada por chaperona, que não envolve reorganização de membrana. A restauração de níveis celulares ou locais de aminoácidos reativa a proteína quinase serina/treonina mTORC1 e encerra a autofagia (YU et al., 2010). Esse tipo de morte celular programada tem grande relevância em células de ciclo de vida longo, tendo sido associado a doenças degenerativas.

A morte celular por autofagia tem destaque na eliminação de órgãos completos, como ocorre na metamorfose de insetos. A fase larval de insetos holometábolos, que passam por metamorfose completa, usualmente vive e desempenha funções biológicas distintas da fase adulta, estando principalmente relacionada a alimentação e aquisição de reserva energética para a posterior fase reprodutiva adulta. Portanto, a transição de fases implica no desenvolvimento de outros sistemas que serão requeridos e a eliminação de órgãos não mais necessários.

1.4.A glândula salivar larval

A glândula salivar larval apresenta células gigantes com conteúdo nuclear euploide, isso se deve a sua alta atividade secretória. Durante o fim do estágio larval (13) as glândulas secretam uma substância adesiva que permite a larva se fixar a um substrato e, após a formação de um pupário, seguir pela metamorfose até a idade adulta.

A queda dos níveis de hormônios juvenis e o aumento da ecdisona secretada pela glândula do anel em resposta ao hormônio protoracicotrópico, levam ao início da metamorfose, com o chamado período pre-pupal, e a reabsorção do intestino larval. O segundo pico de ecdisona ocorre, então, 12 horas depois, levando a eversão da cabeça e degradação da glândula salivar larval, por um processo que combina autofagia e apoptose.

Drosophila é utilizada na compreensão das vias que respondem à hormônios esteroides, especialmente através da eliminação autofágica das glândulas salivares condicionada pelo

hormônio esteroide 20-hidroxiecdisona (ecdisona) (JIANG et al., 1997). A elevação do título de ecdisona 12 horas após a formação do pupário (AFP) leva a morte por autofagia na glândula salivar, e este tecido é completamente destruído cerca de 16 horas AFP (figura 1). A ecdisona é ligada em seu receptor heterodimérico codificado por *EcR* e *usp*, e atua em combinação com o fator de competência *bFTZ-F1* para regular a transcrição de genes de resposta primária *E93*, *BR-C*, e *E74* (BROADUS et al., 1999; WOODARD et al., 1994). Esta maquinaria leva a ativação de caspases, que fosforilam componentes celulares, culminando em alterações morfológicas e reabsorção autofágica de todo o órgão (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011).

Figura 2 – Respostas celulares à ecdisona durante a metamorfose de *Drosophila*. Caixas verdes indicam pulsos de ecdisona. O primeiro pulso dispara a formação do pupário, definindo a transição larva-pré-pupa. O segundo, dez horas depois, dispara a eversão da cabeça do adulto e a transformação da pré-pupa em pupa. O intestino larval começa a sofrer morte celular em resposta ao primeiro pulso de ecdisona. Enquanto que as glândulas salivares larvais morrem em resposta ao segundo pulso de ecdisona (**Figura modificada de Thummel, 2001**).

A localização de α -tubulina e actina filamentosa se altera de uma rede difusa pelo citoplasma nas células da glândula salivar 8 horas AFP para uma maneira menos distribuída e relativamente concentrada no caso da actina filamentosa 10 horas AFP. Cerca de 12 AFP, α -tubulina é difícil de ser detectada e actina filamentosa é extremamente concentrada no citoplasma e distribuída ao longo da região cortical da célula. Cerca de 14 horas, α -tubulina está ausente e actina filamentosa é difícil de ser detectada. Mesmo que α -espectrina permaneça presente e associada ao córtex, seu nível parece cair entre 12 e 14 horas AFP em algumas células da glândula salivar em morte. Laminas nucleares também estão presentes 8 horas AFP e diminuem em expressão 10 a 12 horas AFP em glândulas salivares sendo difíceis de serem detectadas 14 horas AFP (MARTIN; BAEHRECKE, 2004).

Moscas portadoras de mutações em *BFTZ-F1* apresentam glândulas salivares persistentes ao processo autofágico em comparação aos indivíduos selvagens. Isso ocorre pelo padrão irregular da expressão da ecdisona. Takemoto et al. (2007) demonstraram que a persistência que ocorre também para mutações em *E93*, deve-se a não ativação da resposta de caspases, bloqueando a ativação de genes tardios. Em nosso laboratório, a persistência de glândula salivar também foi encontrada em pupas com mutações na região regulatória do locus *roughest*, pertencente à superfamília das imunoglobulinas. *Roughest* pertence a um grupo de moléculas de adesão com as quais compartilha similaridade estrutural e redundância funcional, o complexo IRM.

2.Objetivos

2.OBJETIVOS

Considerando-se a importância do processo de morte celular programada no contexto da biologia do desenvolvimento e o alto grau de conservação evolutiva do processo e sua maquinaria de execução, visamos verificar a correlação de proteínas do complexo IRM nas alterações celulares que constituem o processo autofágico. Tivemos como objetivo geral descrever comparativamente a dinâmica das IRMs em animais selvagens e *rst^D*.

Para isso, os objetivos específicos foram:

- Analisar através de imunohistoquímica para microscopia confocal a dinâmica das proteínas do complexo;
- Analisar os níveis de expressão das proteínas IRMs em glândulas salivares larvais.

3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Linhagens de *Drosophila melanogaster* utilizadas

Utilizamos larvas, pupas e adultos de *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae), mantidas em cultura no Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

- Canton-Special: linhagem selvagem;
- RstD: mutação dominante em região não codificante do alelo rst;
- UAS-HB3: cDNA completo de rst integrado sob o controle do promotor UAS, possibilitando expressão tecido específico, quando acoplado a Gal4;
- Sgs3-Gal4: expressa Gal4 sob o controle do gene Salivary Gland Glue 3;
- RR2b: revertante de rst^D, que possui olhos vermelhos, mas aparência rugosa;
- 1R34: linhagem mutante de *roughest* associada a uma inversão cujo ponto de quebra proximal foi mapeado dentro do segundo íntron do gene.

Meio de cultivo de *Drosophila melanogaster*

Meio Padrão

Fubá de milho 181,8 g

Dextrose 105g

Sacarose 52,4g

Levedura 31,8g

Agar 20g

Nipagin em etanol 95% 11,5ml

Mistura de ácidos propiônico e fosfórico 85% 20,2ml

Água destilada para 2000ml

A dextrose, a sacarose, a levedura, o fubá de milho e o ágar são misturados e dissolvidos em água. Em seguida, essa mistura é levada ao fogo, deixando-se ferver por, aproximadamente, 10 minutos com agitação periódica. O meio é então esterilizado em autoclave vertical por 30 minutos. Após esse período, o meio é retirado da autoclave e resfriado a temperatura de, aproximadamente, 60°C e adiciona-se lentamente a mistura de ácidos e o Nipagin. Finalmente, distribui-se o meio em tubos de cultura ou em garrafas de 250ml.

Fixador para imunohistoquímica

Pipes 20 mmol/L

Sacarose 60 mmol/L

EGTA 1 mmol/L

MgCl₂ 5 mmol/L

Paraformaldeído 4%

pH 7,2

Solução de Ringer

CaCl ₂ •2H ₂ O	0,33 g	3 mM
KCl	13,6 g	182 mM
NaCl	2,7 g	46 mM
Tris base	1,21 g	10 mM
HCl (1 N)	pH 7.2	

Combinar os primeiro quatro ingredientes em menos de um litro de água até dissolver.

Ajustar o pH para 7,2 com HCl 1N e completar o volume de 1 L com água. Filtrar em filtro de 0,47 µm e esterilizar em auto-clave. Solução 1x.

FAAG

Álcool etílico Abs. 8,5 mL

Formaldeído 37% 1 mL

Ácido acético glacial 500 uL

Glutaraldeído 70% 143 uL

Anticorpos**Anticorpo primário**

- Anticorpo monoclonal mAb 24A5.1; IgG camundongo – anti-Roughes (Laboratório Dr. Karl Fischbach). Diluição: 1:20
- Anticorpo policlonal; IgG coelho; anti-Kirre; diluição 1:200
- Anticorpo policlonal; IgG coelho; anti-Hibris; diluição 1:200
- Anticorpo policlonal; IgG coelho; anti-Sns; diluição 1:20

Anticorpos secundários

- Alexa-488 conjugado goat anti-mouse IgG, diluição 1:200.
- Alexa-633 conjugado goat anti-rabbit IgG, diluição 1:200.
- Rhodamine-Phalloidin (Jackson Immuno Research), diluição 1:200.
- DAPI, diluição 1:8000.

Hematoxilina

Solução A

Cloreto de ferro 0,6 g

Água destilada 100 mL

Ácido clorídrico 0,75 mL

Solução B

Hematoxilina 1g

Etanol 95% 100 mL

Filtrar e misturar na proporção 1:1 imediatamente ao uso.

Tricrômio de Pollak

Solução A

Orange G 0,25 g

Ponceau 2R 0,33 g

Fucsina ácida 0,17 g

Verde Brilhante SF 0,15 g

Ácido fosfotungstico 0,5 g

Ácido fosfomolibídico 0,5 g

Ácido acético glacial 1 mL

Etanol 95% 50 mL

Água destilada 50 mL

Solução B

Ácido acético glacial 0,2 mL

Água destilada 100 mL

Imergir os cortes na solução A por 3-7 minutos e Solução B até diferenciar.

PBS

NaCl 8 g 137 mM
 KCl 0,2 g 2.7 mM
 Na₂HPO₄ 1,44 g 10 mM
 KH₂PO₄ 0,24 g 1.8 mM
 pH 7,4

PBST 0,3%

KCl 30 mM
 KH₂PO₄ 15 mM
 NaCl 1,4 M
 Na₂HPO₄ 80 mM
 Triton X-100 0.3%

3.2.Métodos

Condições de Cultura de *Drosophila melanogaster*

Os estoques de moscas necessários foram mantidos a 25°C em recipientes de vidro contendo 10 ml de meio padrão para cultura em pequena escala. As culturas em grande escala foram feitas em recipientes contendo 100 mL de meio padrão. A manipulação de indivíduos adultos foi realizada com animais anestesiados com CO₂ ou éter etílico.

Cruzamentos e suas condições

Fêmeas virgens do genótipo desejado foram coletadas sob anestesia, identificadas pela presença de mecônio e/ou asas ainda não estendidas. Após isso foram colocadas junto a machos do genótipo desejado em frascos de cultura de 10 mL e deixados, por 6 dias, quando foram passados pra novo frasco. Os indivíduos, no estagio de pupa branca (0 hora após a formação do pupario, AFP) foram então coletados e deixados em câmara úmida a 25°C até o estágio desejado, quando foram dissecados ou coletados para processamento histológico normal.

Imunohistoquímica

Os animais coletados foram dissecados em solução de Ringer gelada em estereomicroscópio e deixados sob agitação em fixador a temperatura ambiente por 20 minutos. Após isso foram feitas 5 lavagens de 5 minutos com PBT 0,3% e deixados em bloqueio por 1h (BSA + soro de cabra). A incubação com anticorpo primário era feita overnight a 4°C sob agitação. Após isso eram feitas novas lavagens (5x de 5' cada) e adicionado o anticorpo secundário por 2h a temperatura ambiente. Após novas lavagens, era feita a incubação com rodamina-faloidina e DAPI por 20'. O tecido era então montado em glicerol em lâminas e analisados sob Microscópio Multifotón.

Histologia Normal para microscopia de luz

Retirava-se parte do envoltório pupal (região anterior) sem danificar os tecidos da pupa, e esta era então colocada em fixador FAAG overnight a 4°C. Após isso, eram feitas lavagens com álcool 70% e seguia-se o seguinte protocolo:

Extração de RNA

A extração era feita em Trizol (300 uL), após isso os tubos contendo os tecidos eram vortexados por 2', deixados a temperatura ambiente por 5', adicionados 60 uL de clorofórmio, centrifugados a 11200 rpm, 18' a 4°C; o sobrenadante era removido e adicionado em novo tubo com igual volume de isopropanol 70% gelado e 2 uL de glicogênio.

Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita com o kit GoTaq qPCR MasterMix, conforme instruções do fabricante.

4.Resultados

4.RESULTADOS

4.1.Localização subcelular das IRM's

A distribuição de Rst e Kirre em animais selvagens durante o período pré-pupal parece seguir um padrão muito similar. Nos estágios iniciais de L3 e 0 h AFP, a proteína encontra-se amplamente distribuída pelo tecido, tendo um padrão de fluorescência difuso, não associado a focos ou pontos específicos. O citoesqueleto de actina nesses mesmos períodos é muito bem definido, especialmente na superfície luminal das células, mas também no córtex das mesmas, definindo claramente as membranas plasmáticas individuais.

Entretanto, nos horários de 3 e 6 h AFP as proteínas são encontradas mais intimamente associadas ao citoesqueleto de actina, do ponto de vista visual, e também se encontram distribuídas pela superfície das células voltada para o ducto secretor.

A nítida desestruturação do citoesqueleto de actina que acontece rapidamente após o pulso de ecdisona das 12 h AFP, é acompanhada pela perda dos focos de fluorescência das proteínas do complexo. O padrão de difusão da localidade das proteínas pode ser visto novamente durante esse horário de início da desintegração tecidual.

A distribuição de Sns parece coincidir com a actina cortical apenas nos estágios de L3 e pré-pupas 0h AFP, após isso ocorre um aumento da difusão da fluorescência, até a culminância da desorganização no período de 13 horas. Entretanto, é possível visualizar uma marcação na membrana nuclear, a partir das 3 h AFP. Este mesmo padrão de distribuição foi encontrado nos animais rst^D.

A localização de hibris em animais rst dominantes, parece ser difusa, em nenhum dos períodos analisados parece haver uma reação específica.

Figura 3- Localização de Rst (B; E; H; K; N) e Kirre (A; D; G; J; M), núcleo e actina marcados com DAPI e Faloidina (C; F; I; L; O). L3 (A; B; C), 0h AFP (D; E; F), 3h AFP (G; H; I), 6h AFP (J; K; L), 13h AFP (M, N, O).

Figura 4 – Imunomarcção contra Sns em animais rst dominantes. A-B: L3; C-D 0h; E-F: 3h; G-H: 6h; I-J: 13h AFP.

v

Figura 5 – Imunomarcacão contra Hbs em animais rs1 dominantes. A-B: L3; C-D 0h; E-F: 3h; G-H: 6h; I-J, 13h AFP.

Figura 6 – Imunomarcção contra Sns em animais rst dominantes. A-B: L3; C-D 0h; E-F: 3h; G-H: 6h; I-J: 13h AFP.

4.2. Ativação temporal dos elementos regulatórios de *rst*

A construção 107 se mostrou ativa nos períodos de L3, 0h AFP, 3h AFP e 13h AFP, embora apresente um cromossomo balanceador, verificamos um maior numero de animais.

A construção 108 se mostrou ativa em L3, 0 e 6h AFP, porém não as 13h AFP.

A construção 112 estava ativa em todos os períodos analisados (L3- 13h AFP).

Figura 7 – Expressão de GFP mediada pela construção 107 em L3 (A), 0 (B), 3 (C), 13h AFP (D).

Figura 8 – Expressão de GFP mediada pela construção 108 em L3 (A), 0 (B), 6 (C), 13h AFP (D).

Figura 9 – Expressão de GFP mediada pela construção 112 em L3 (A), 0 (B), 3 (C), 6 (D), 13h AFP (E).

4.3.Quantificação dos níveis de mRNA das IRM's

As quantificações relativas dos mRNAs das IRMs mostram que em CS os níveis de sns sobem lentamente de 0 ate 12 horas AFP. Hbs tem um pico a 6h e cai novamente as 12 h AFP, como ocorre com kirre. Já rst apresenta um acentuado aumento depois de 0h atingindo um pico neste período ate 12 horas, período após o qual tem uma queda acentuada.

No caso do dominante, de 0 a 6 horas a expressão de todas as IRMs parece ser aumentada.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

O padrão de localização de *kirre* é similar ao de *rst*, já anteriormente descrito por Simon et al. (2009). *Kirre* poderia atuar de modo redundante a *rst* em suas funções. A diminuição de *rst* vista a nível proteico pode ser vista também a nível de mRNA. O pico de ecdisona que ocorre em 12h AFP leva a ativação de cascatas de morte celular, e de algum modo a redução na expressão de *Rst*. Um micro-RNA, parece estar envolvido no caso de glândula salivar com a ativação da via de liberação de cálcio, antagonizando os efeitos da IP3K, e assim levando a progressão da autofagia.

Em retinas, análises do perfil de expressão de *rst* através de qRT-PCR mostraram que nos mutantes *rst^D* a queda nos níveis de RNAm da proteína no período de 34 % após a formação do pupário ocorria de modo mais lento que o observado para selvagens. A análise de dois revertentes para o fenótipo selvagem, RWT8 e RWT6, mostraram padrões de expressão de *rst* diferentes do selvagem, sendo que no último sequer foi detectada expressão. Deste modo, em algumas circunstâncias a expressão de *rst* parece ser dispensável para a formação de um padrão omatidial correto. Isto parece ser possibilitado pela atuação do parálogo de *rst*, *kirre*, redundância também descrita para a fusão de mioblastos em embriões. A dinâmica do RNAm de *kirre* no revertente RWT6 se mostrou quase indistinguível do padrão de *rst* em selvagens. O uso de RNAi para *kirre* neste revertente, corroborou esta redundância funcional, levando à severidade no fenótipo mutante. Entretanto, a redução na expressão de *kirre* não apresentou o mesmo efeito na concentração de RNAm de *rst* neste tecido (Machado, FAPESP 2007/55984-4).

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

1. A localização de *rst* e *kirre* em glândulas salivares larvais é similar, e ambas se relacionam a própria estrutura do citoesqueleto cortical de actina, especialmente nos estágios anteriores ao pico de ecdisona;
2. A expressão de *rst* e *kirre* cai após o pico de ecdisona que condiciona a degradação tecidual da glândula salivar;
3. Todas as construções analisadas no experimento de enhancer trap são ativas em glândula salivar de *D.melanogaster*;

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M. D. et al (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287 (5461): 2185-2195.

Araújo, H.; Machado, L. C. H.; Octacílio-Silva, S.; Mizutani, M.; Silva, M. J. F.; Ramos, R. G. P. (2003). Requirement of the roughest gene for differentiation and time of death of interommatidial cells during pupal stages of *Drosophila* compound eye development. Mechanisms of development 120: 537-547.

Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K., Steller, H. (1998). The *Drosophila* gene hid is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. Cell 95: 331-41.

Bolker, J. A.; Raff, R. A. (1996). Developmental genetics and traditional homology. Bioessays 18: 489-494.

Bonini, N. M., Fortini, M. E. (1999). Surviving *Drosophila* eye development: integrating cell death with differentiation during formation of a neural structure. BioEssays 21: 991-1003.

Boschert, U.; Ramos, R. G. P.; Tix, S.; Technau, G.; Fischbach, K-F. (1990). Genetic and Developmental Analysis of irreC, a genetic function required for optic Chiasm Formation in *Drosophila*. Journal of Neurogenetics 6: 153-171.

Bour, B. A.; Chakravarti, M.; West, J. M.; Abmayr, S. M. (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. Genes & Development 14: 1498-1511.

Brachmann, C. B.; Cagan, R. L. (2003). Patterning the fly eye: the role of

apoptosis. Trends in Genetics 19(2): 91-96.

Campos-Ortega, J.A.; Hartenstein, V. (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. II ed. Germany. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Cuthforth & Gaul (1997). The genetics of visual system development in *Drosophila*: specification, connectivity, and asymmetry. Current Opinion in Neurobiology 7: 48-54.

Donoviel, D. B.; Freed, D. D.; Vogel, H.; Potter, D. G.; Hawkins, E.; Barrish, J. P.; Mathur, B. N.; Turner, C. A.; Geske, R.; Montgomery, C. A.; Starbuck, M.; Brandt, M.; Gupta, A.; Ramirez-Solis, R.; Zambrowicz, B. P.; Powell, D. R. (2001). Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. Molecular Cell Biology 21(14): 4829-4836.

Dworak, H. A.; Charles, M. A.; Pellerano, L. B.; Sink, H. (2001). Characterization of *Drosophila* hibris, a gene related to human nephrin. Development 128: 4265-4276.

Ellis, M. C.; O'Neill, E. M.; Rubin, G. M. (1993). Expression of *Drosophila* glass protein and evidence for negative regulation of its activity in non-neuronal cells by another DNA-binding protein. Development 119: 855-865.

Fischbach, K-F; Barleben, F.; Boschert, U.; Dittrich, A. P. M.; Gschwander, B.; Hoube, B.; Jader, R.; Kaltenbach, E.; Ramos, R. G. P.; Schlosser, G. (1989). Developmental studies on the optic lobe of *Drosophila* using structural Brain mutants. In: Neurobiology of sensory systems. (R. N. Singh and N. J. Strausfeld Eds) pp. 171-194. Plenum Press New York.

Flores, G.V., Duan, H., Yan, H., Nagaraj, R. et al (2000). Combinatorial signaling in the specification of unique cell fates. *Cell* 103: 75-85.

Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 87: 651-660.

Gerke, P.; Huber, T. B.; Sellin, L.; Benzing, T.; Walz, G. (2003). Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *Journal of American Society of Nephrology* 14(4): 918-926.

Gilbert, S. F.; Opitz, J. M.; Raff, R. A. (1996). Resynthesizing evolutionary and developmental biology. *Developmental Biology* 173: 357-372.

Gray, M., Charpentier, A., Walsh, K., Wu, P., E Bender, W. (1991). Mapping point mutations in the *Drosophila* rosy locus using denaturing gradient gel blots. *Genetics* 127: 139-149.

Grzeschik, N. A.; Knust, E. (2005). IrreC/rst-mediated cell sorting during *Drosophila* pupal eye development depends on proper localization of DE cadherin. *Development* 132:2035-2045.

Harris, B. Z.; Lim, W. A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complexes assembly. *J. Cell Sci.* 114: 3219-3231.

Hay, B. A.; Rubin, G. M. (1994). Expression of baculovirus p35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* 120: 2121-2129.

Huber, T. B. , Kottgen, M., Schilling, B., Walz†, G., Benzing, T (2001).

Interaction with Podocin Facilitates Nephrin Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, (45):41543–41546.

Kestilä, M.; Lenkkeri, U.; Maennikkö, M.; Lamerdin, J.; McCready, P.; Putaala, H.; Ruotsalainen, V.; Morita, T.; Nissinen, M.; Herva, R.; Kashtan, C. E.; Peltonen, L.; Holmberg, C.; Olsen, A.; Tryggvason, K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular Cell* 1: 575-582.

Klemenz, R.; Weber, U.; Gehring, W. (1987). The white gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 15: 3947-3959.

Knust, E.; Bossinger, O. (2002). Composition and formation of intracellular junctions in epithelial cells. *Science*. 298: 1955-1959.

Kornberg, T. B.; Krasnow, M. A. (2000). The *Drosophila* genome sequence: implications for biology and medicine. *Science* 287: 2218-2220.

Lehtonen, S.; Lehtonen, E.; Kudlicka, K.; Holthöfer, H.; Farquhar, M. G. (2004). Nephrin forms a complex with adherens junction proteins and CASK in podocytes and in Madin-Darby Canine Kidney cells expressing nephrin. *American Journal of Pathology* 165: 923-936.

Lindsley, D. L.; Zimm, G. G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.

Lis, J. T.; Simon, J. A.; Sutton, C. A. (1993). New heat shock puffs and β galactosidase activity resulting from transformation of *Drosophila* with an hsp70-lacZ hybrid gene. *Cell*, 35: 403-410.

Machado, R. C., Pereira, R. N. R., Costa, M. S. A. And Ramos, R. G. P. (2002).

‘In vivo’ Toxicity of a Truncated Version of the *Drosophila* Rst-IrreC Protein is Dependent on the Presence of a Glutamine-Rich Region in its Intracellular Domain. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 74: 285-295.

Machado, R.C.; (1997). “Análise funcional “in vivo” do locus irreC-rst de *Drosophila melanogaster*. Dissertação de mestrado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ, Rio de Janeiro.

Mathieson, P. W. (2003). Nephrin sends us signals. *Kidney Int.* 64(2): 756-757.

Miller, D. T.; Cagan, R. L. (1998). Local induction of patterning and programmed cell death in the developing *Drosophila* retina. *Development* 125: 2327-2335.

Moda, L.M. (2003). Análise funcional da molécula de adesão celular Roughest durante o desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*. Ribeirão Preto – SP. 79 p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Moda, L.M.; Machado, R.C.; Ramos, R.G.P. (2000). Ubiquitous overexpression of a transgene encoding the extracellular portion of the *Drosophila* Roughest Irregular Chiasm C protein induces early embryonic lethality. *An. Acad. Bras. Ci.* 72(3):381-388.

Ponting, C. P.; Phillips, C.; Davies, K. E.; Blake, D. J. (1997). PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *BioEssays* 19: 469-479.

Potter, C. J.; Turenchalk, G. S.; Xu, T. (2000). *Drosophila* in cancer research: and expanding role. *Trends in Genetics* 16(1): 33-39.

Ramos, R. G. P. (1995). When neurobiology and genetics meet: the study of visual system development. *Rev. Bras. Biol.* 55 (supl.1): 11-24

Ramos, R. G. P.; Igloi, G. L.; Baumann, U.; Maier, D.; Lichte, B.; Schneider, T.; Brandstatt, J. H.; Frohlich, A.; Fischbach, K-F. (1993). The irregular chiasm C roughest locus of *Drosophila* which affects axonal projections and programmed cell death encodes, a novel immunoglobulin-like protein. *Genes and Development* 7: 2533-2547.

Ramos, R.G.P. (1988). Análise funcional do locus Notch de *D. melanogaster* através de transformação mediada por elementos P. Tese submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Reddy, G. V.; Reiter, C.; Shanbhag, S.; Fischbach, K-F.; Rodrigues, V. (1999). Irregular chiasm-C-roughest, a member of the immunoglobulin superfamily, affects sense organ spacing on the *Drosophila* antenna by influencing the positioning of founder cells on the disc ectoderm. *Dev. Genes Evol.* 209: 581-591.

Reiter, C.; Schimansky, T.; Nie, Z.; Fischbach, K-F. (1996). Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: The role of IrreC-rst protein. *Development* 122: 1931-1940.

Rubin, G. M.; Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218(4570): 348-53.

Rubin, G.M; Yandell, M.D.; Wortman, J.R.; Miklos, G.L.G.; Nelson, C.R. (2000). Comparative Genomics of the Eukaryotes. *Science* 287: 2204-2215.

Ruiz-Gómez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M. V., Bate, M. (2000).

Drosophila dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* 102: 189-198.

Saleem, M. A.; Ni, L.; Witherden, I.; Tryggvason, K.; Ruotsalainen, V.; Mundel, P.; Mathieson, P. W. (2002). Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *American Journal of Pathology* 161(4): 1459-1466.

Sambrook, J.; Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rdth. V. 1, 2, 3. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schneider, T.; Reiter, C.; Lichte, B. Nie, Z.; Eule, E.; Bader, B.; Schimansky, T.; Ramos, R. G. P.; Fischbach, K-F. (1995). Neural recognition in the optic lobe of *Drosophila*: restricted expression of the cell adhesion molecule IrreCrist is required for normal axonal projections of columnar neurons. *Neuron* 15: 259-271.

Schneuwly, S.; Klemenz, R.; Gehring, W. J. (1987). Resdesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. *Nature*, 325: 816-818.

Sellin, L.; Huber, T. B.; Gerke, P.; Quack, I.; Pavenstadt, H.; Walz, G. (2003). NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB Journal* 17(1): 115-117.

Shen, K.; Bragmann, C. I. (2003). The immunoglobulin superfamily protein SYG-1 determines the location of specific synapses in *C. elegans*. *Cell* 112: 619-630.

Shih, N-Y; Li, J.; Cotran, R.; Mundel, P.; Miner, J. H.; Shaw, A. S. (2001). CD2AP localizes to the Slit Diaphragm and binds to Nephrin via a novel C terminal domain. *American Journal of Pathology* 159(6): 2303-2308.

Simon, C. R.; Machado, L. C. H.; Octacílio-Silva, S.; Moda, L. M. R. The locus *rst* plays a role in the programmed cell death in *Drosophila melanogaster* salivary gland. Em preparação.

Spradling, A. C.; Rubin, G. M. (1982). Transposition of clones P elements into *Drosophila* germ lines chromosomes. *Science* 218: 341-347.

Spradling, C. (1986). P element mediated transformation. In: *Drosophila, A Practical Approach*. p.175-197. IRL Press, Oxford.

Strükelberg, M.; Bonengel, B.; Moda, L. M.; Hertenstein, A.; Couet, H. G.; Ramos, R. G. P.; Fischbach, K-F. (2001). *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* 128: 4229-4239.

Sun, C.; Kilburn, D.; Lukashin, A.; Crowell, T.; Gardner, H.; Brundiers, R.; Diefenbach, B.; Carulli, J. P. (2003). *Kirrel2*, a novel immunoglobulin superfamily gene expressed primarily in cells of the pancreatic islets. *Genomics* 82: 130-142.

Thomas, B. J.; Wassarman, D. A. (1999). A fly's eye view of biology. *Trends in Genetics* 15: 184-190.

Thummel, C.S.; Pirrota, V. (1991). Technical notes: New pCaSpeR P-element vectors. *Drosophila Inform. Newsletter* 2.

Wolff, T.; Ready, D. F. (1991). Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development* 113: 825-839.

Wolff, T.; Ready, D. F. Pattern formation in the *Drosophila* retina. Bate, M. and Arias, A. M. The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1993. Volume II. Chapter 22: 1277-1326.

Yu, S., Yoo, S. J., Yang, L., Zapata, C., Srinivasan, A., Hay, B. A.,; Baker, N. E. (2002). A pathway of signals regulating effector and initiator caspases in the developing *Drosophila* eye. *Development* 129: 3269-3278.