



Programa de Doctorado en Neurociencias

**Análisis funcional
de moléculas de guía axonal
en la división asimétrica de las
células madre neurales del
sistema nervioso central de
*Drosophila***

Ana María de Torres Jurado

**Directora de la tesis
Dra. Dña. Ana Carmena de la Cruz**

Universidad Miguel Hernández de Elche

La imagen usada en la portada ha sido generada y adquirida durante el desarrollo de esta tesis por Ana María de Torres Jurado



La presente Tesis Doctoral, titulada “Análisis funcional de moléculas de guía axonal en la división asimétrica de las células madre neurales del sistema nervioso central de *Drosophila*”,

se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

- de Torres-Jurado, A., Manzanero-Ortiz, S., & Carmena, A. (2022). Glial-secreted Netrins regulate Robo1/Rac1-Cdc42 signaling threshold levels during *Drosophila* asymmetric neural stem/progenitor cell division. *Current Biology*, 32(10), 2174-2188.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.001>



El Dr. D. / La Dra. Dña. “*Ana Carmena de la Cruz*”, director/a, de la tesis doctoral titulada “*Análisis funcional de moléculas de guía axonal en la división asimétrica de las*

células madre neurales del sistema nervioso central de Drosophila”

INFORMA/N:

Que Dña. “*Ana María de Torres Jurado*” ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “*Análisis funcional de moléculas de guía axonal en la división asimétrica de las células madre neurales del sistema nervioso central de Drosophila*” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en a de de 202....

Director/a de la tesis

Dr. D./Dra. Dña. “*Ana Carmena de la Cruz*”



La Dra. Dña. "*Elvira María de la Peña García*", Coordinador/a del Programa de Doctorado en **Neurociencias (Instituto de Neurociencias de Alicante)**

INFORMA:

Que Dña. "*Ana María de Torres Jurado*" ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado "**Análisis funcional de moléculas de guía axonal en la división asimétrica de las células madre neurales del sistema nervioso central de *Drosophila***" conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en a de de 202....

Prof. Dr. D. / Profa. Dra. Dña. "*nombre y apellidos*"

Coordinador/a del Programa de Doctorado en

.....
.....



La tesis doctoral titulada realizada por “*Ana María de Torres Jurado* (DNI 28828679L)” en el Instituto de Neurociencias de Alicante (UMH/CSCIC) ha sido desarrollada con la financiación de Ayudas para la formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (BES-2015-076001).



ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN GLOBAL-----	6
INTRODUCCIÓN.....	10
1. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo biológico.....	10
<i>Ciclo de Vida</i>	11
1.2. Sistema nervioso central de <i>Drosophila</i>	12
1.2.1. Desarrollo del SNC de <i>Drosophila</i>	13
<i>Factores de transcripción</i>	15
1.2.2. Tipos de neuroblastos.....	16
<i>NB de tipo I</i>	17
<i>NB de tipo 0</i>	17
<i>NB de tipo II</i>	17
2. División Celular Asimétrica.....	21
2.1. Mecanismos de regulación.....	22
2.1.1 Mecanismos intrínsecos de DCA en NBs.....	25
<i>Establecimiento de la polaridad apico-basal</i>	25
<i>Regulación del tamaño de las células hijas</i>	32
2.1.2 Mecanismos extrínsecos de DCA.....	33
3. La Glía en <i>Drosophila melanogaster</i>.....	35
3.1. Tipos de glía en <i>Drosophila</i>	35
<i>Glía Superficial</i>	36
<i>Glía Cortical</i>	36
<i>Glía del neuropilo</i>	37
<i>Glía Periférica</i>	37
3.2 Glía & Neuroblastos.....	39
4. Señales de guía axonal.....	41
<i>Slit/Roundabout (Robo)</i>	43
<i>Netrinas (Ntn)/Frazzled (Fra)</i>	44
<i>Semaforinas (Semas), Neuropilinas (Npn) y Plexinas (Plexins)</i>	46
<i>Efrinas /Eph</i>	47

5.División Celular Asimétrica y Cáncer	48
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. Sistema GAL4/UAS.....	53
2. Generación de clones con el sistema FLP/FRT	54
<u>Generación de clones</u>	55
3. Cepas de <i>Drosophila</i> y genética.....	56
4. Histología, inmunofluorescencia y microscopía.....	57
5. Cuantificación y análisis estadístico.....	58
RESULTADOS	59
1. Las señales de guía axonal Slit, NetA, Sema1a, Sema2a se expresan en la glía cortical que rodea los linajes de NBs y los receptores Robo1, Fra, PlexinA y PlexinB dentro del linaje de NBs.....	59
2. Al afectar la señalización de Slit-Robo1 o Netrin-Fra se induce a la formación de NBs ectópicos en los linajes de NBs de tipo II del cerebro larvario.....	62
3. Al disminuir simultáneamente la expresión de <i>robo1</i> y <i>fra</i> se suprime la formación de NBs ectópicos dentro de los linajes de NBs de tipo II.....	69
4. Al comprometer el inhibidor de Robo1 la tirosina quinasa Abl se induce la formación de NBs ectópicos dentro de los linajes de NBs de tipo II.....	75
5. La señalización Slit-Robo1 es necesaria durante la DCA de NBs y mINPs en los linajes de NBs de tipo II	83
6. Al comprometer la señalización Netrin-Fra o la actividad kinasa de Abl se produce un fenotipo similar durante la DCA a la del mutante de <i>robo1</i>	87
7. El efecto de Robo1 durante la DCA es a través de las pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42.....	89
DISCUSIÓN	102
CONCLUSIONES	114
REFERENCIAS	115
ANEXO: ARTÍCULO	139

ABREVIATURAS

α -Ada - α -Adaptin (alfa-adaptina)

Abl - Abelson

Acs - Anticuerpos

aPKC - Atypical protein kinase C (Proteína quinasa atípica C)

Ase - Asense

AurA - Aurora A

Baz - Bazooka

Brat - Brain tumor

CB - Central Brain (Cerebro central)

Dap160 - Dynamin associated protein 160 (proteína 160 asociada a dinamina)

DCA - División celular asimétrica.

DCC - Deleted in colorectal cancer

dILPs - *Drosophila* Insuline-like peptides (Péptidos similares a la Insulina de *Drosophila*)

dInR - *Drosophila* Insuline receptors (Receptores de insulina de *Drosophila*)

Dlg1- Discs large 1

Dpn - Deadpan

EE - Enteroendocrinas

EFG - Epidermal growth factor (Factor de crecimiento epidérmico)

Efn - Efrinas

Erm - Earmuff

E(spl) μ y-HLH - Enhancer of split μ -helix-loop-helix

FDS - Fat-body derived signals (Señales producidas por el cuerpo graso)

FGF - Fibroblast growth factor (Factor de crecimiento de fibroblastos)

FLP - Flippase

FN3 - Fibronectin type III (Fibronectina de tipo III)

Fra – Frazzled

FRT - FLP recombinase target

GC - Glía Cortical

GMC - Ganglion mother cell (Célula madre ganglionar)

GP - Glía Perineural

GPI - Glycosylphosphatidylinositol (glicosilfosfatidilinositol)

GSP - Glía Subperineural

Ig - Inmunoglobulina

iINP - Immature intermediate neural progenitor (Progenitor intermedio neural inmaduro)

INP - Intermediate neural progenitor (Progenitores intermedios neurales)

Insc - Inscuteable

ISCs - Intestinal stem cells (Células madre del intestino)

klu - klumpfuss

L(2)gl - Lethal(2) giant larvae

Loco - Locomotion defects

LRR – Leucin-rich repeats (Repeticiones ricas en leucina)

Mira - Miranda

NB - Neuroblasto

NMII - Non-muscle myosin II (Miosina II no muscular)

Ntn - Netrin

OL - Optic lobe (Lóbulo óptico)

Pon - Partner of Numb

PP2A - Protein phosphatase 2A (Proteína fosfatasa 2A)

Pros – Prospero

Robo – Roundabout

Scrib - Scribble

Semas - Semaforinas

Slif - Slimfast

SNC - Sistema nervioso central

Spdo - Sanpodo

TGF- β - Transforming growth factor- β (Factor de crecimiento transformante β)

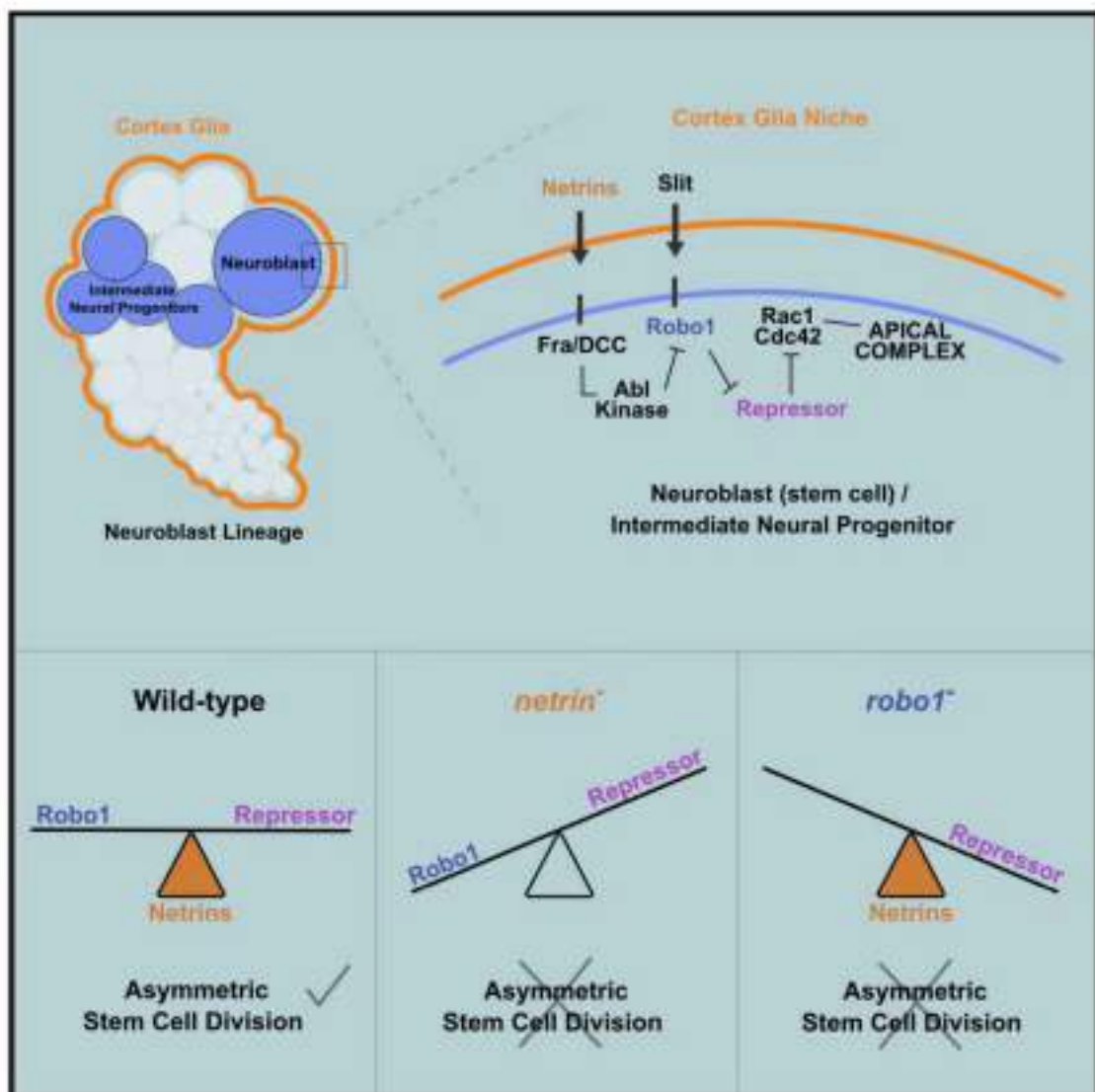
VNC - Ventral nerve cord (Cordón nervioso ventral)

ABSTRACT

Asymmetric cell division (ACD) is a highly conserved and fundamental process, both in development and in the context of stem cell and cancer biology. In an ACD, two different daughter cells are generated, one with the same identity that the mother cell, and thus it will continue dividing, and another daughter cell that will initiate a differentiation process. The mechanisms that regulate an ACD comprise both intrinsic or autonomous factors and extrinsic or non-autonomous factors, all of which maintain the delicate balance between self-renewal and differentiation at each cell division. Disruption of this balance by failure of these regulatory factors can lead to either the loss of cell types or an overproliferation and, ultimately, a tumor formation. *Drosophila* neural stem cells, called neuroblasts (NBs), divide asymmetrically through exclusively intrinsic mechanisms and have been used for decades as an experimental paradigm in the study of the ACD process. The main objective of this PhD thesis has been the analysis of possible non-autonomous signals or extrinsic mechanisms that could be controlling the ACD of *Drosophila* NBs. Our results support the existence of such non-autonomous mechanisms. Specifically, we have determined that the cortex glia surrounding larval brain NB lineages is the niche source of extrinsic signals regulating the ACD of these NBs. We have also shown that Netrins and Slit, proteins known for their roles in axon guidance, are the extrinsic signals secreted by the cortex glia that act through their receptors Frazzled and Robo1, respectively, located at NB lineages. We demonstrate that altered levels, both excessive and defective, of Slit-Robo1 signaling result in the formation of ectopic NBs and progenitor cells. We also unveil that Netrins-Frazzled/DCC signaling is responsible for modulating, through the cytoplasmic kinase Abelson, the threshold levels of Robo1 signaling critical for the proper development of NBs and progenitor cells in type II NB lineages. Finally, we determine that Robo1 signaling impacts on the ACD process by

regulating the localization of key intrinsic factors, such as aPKC, Canoe/Afadin and Numb, through the small GTPases Rac1 and Cdc42. These GTPases ultimately act by localizing apically in mitotic NBs and progenitors Par-6, a central component of the apical Par complex (Par-6-aPKC-Par3/Bazooka) that is critical for the basal localization of cell fate determinants, and, consequently, for a proper ACD process.

Graphical Abstract



RESUMEN

La división celular asimétrica (DCA) es un proceso altamente conservado y fundamental, tanto en desarrollo como en el contexto de la biología de las células madre y del cáncer. En una DCA se generan dos células hijas diferentes, una con la misma identidad de la célula madre, y que por tanto sigue dividiéndose, y otra célula hija que iniciará un proceso de diferenciación. Los mecanismos que regulan la DCA comprenden tanto factores intrínsecos, o autónomos, como factores extrínsecos, o no autónomos, manteniendo todos ellos el delicado equilibrio entre autorrenovación y diferenciación en cada división. La perturbación de dicho equilibrio por fallo en cualquiera de estos factores reguladores puede conllevar tanto la pérdida de tipos celulares como el crecimiento excesivo de éstos y, en última instancia, la formación de tumores. Las células madre neurales de *Drosophila*, llamadas neuroblastos (NBs), se dividen asimétricamente a través de mecanismos exclusivamente intrínsecos y se han usado durante décadas como paradigma experimental en el estudio del proceso de DCA. El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el análisis de posibles señales no autónomas o mecanismos extrínsecos que pudieran estar controlando la DCA de los NBs de *Drosophila*. Nuestros resultados avalan la existencia de tales mecanismos no autónomos. En concreto, hemos determinado que la glía cortical que rodea los linajes de NBs larvarios es el nicho fuente de señales extrínsecas reguladoras de la DCA de estos NBs. Asimismo, hemos determinado que las Netrinas y Slit, proteínas conocidas por sus funciones en la guía axonal, son las señales extrínsecas secretadas por la glía cortical que actúan a través de sus receptores Frazzled y Robo1, respectivamente, localizados en los linajes de NBs. Demostramos que la alteración de los niveles de señalización Slit-Robo1, tanto por exceso como defecto, da lugar a la aparición de NBs y células progenitoras ectópicos. Es la señalización de Netrinas-Frazzled/DCC la responsable de modular, a través de la quinasa citoplasmática

Abelson, los niveles umbrales de señalización de Robo1 críticos para el correcto desarrollo de los NBs y células progenitoras en los linajes de NBs de tipo II. Hemos determinado, asimismo, que la señalización de Robo1 incide en el proceso de DCA regulando la localización de factores intrínsecos clave, tales como aPKC, Canoe/Afadin y Numb, a través de las pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42. Estas actúan, en último término, localizando apicalmente en NBs y progenitores mitóticos a Par-6, componente central del complejo apical Par (Par-6-aPKC-Par3/Bazooka) crítico para la localización basal de los determinantes del destino celular, y, consecuentemente, para una correcta DCA.

INTRODUCCIÓN

1. *Drosophila melanogaster* como modelo biológico

Drosophila melanogaster, también conocida como la mosca de la fruta, ha sido utilizada durante más de un siglo como un excelente organismo modelo para el estudio de una amplia gama de procesos biológicos incluidos en diferentes disciplinas, tales como genética fundamental y herencia, desarrollo (embrionario, de tejidos y órganos), comportamiento (memoria y aprendizaje), neurobiología, envejecimiento, fisiopatologías de enfermedades humanas y cáncer, entre otras. Esto es debido a que *Drosophila* presenta numerosas ventajas técnicas o consideraciones prácticas como modelo que lo hacen adecuado para muchos estudios. Por ejemplo, es un modelo económico y fácil de cultivar en condiciones de laboratorio ya que tienen un ciclo de vida relativamente corto (10 días), pequeño tamaño y producen una gran descendencia. Asimismo, son fácilmente manipulables genéticamente debido al extenso conjunto de herramientas moleculares desarrolladas y a la simplicidad de su genoma (4 parejas de cromosomas frente a las 23 en humanos). Es también destacable la existencia de una amplia colección de mutantes ya generada, así como el hecho de que su genoma está completamente secuenciado.

A pesar de que evolutivamente *Drosophila* y humanos están muy separados, el genoma de *Drosophila* es 60% homólogo al de los humanos, y las comparaciones entre los genomas han revelado que aproximadamente el 75% de los genes responsables de las enfermedades humanas tienen ortólogos funcionales en las moscas (Chien et al., 2002; Chintapalli et al., 2007; Reiter et al., 2001). La identidad a nivel de nucleótidos o de secuencia de proteínas es del 40% entre homólogos; en cambio, en dominios funcionales conservados, puede ser del 80 al 90% o incluso superior. Asimismo, está muy bien establecido que la mayoría de los mecanismos, vías metabólicas y procesos fisiológicos

fundamentales que controlan el desarrollo y la supervivencia se conservan a lo largo de la evolución entre estas especies (Rubin et al., 2000), y muchos descubrimientos en la mosca de la fruta se han trasladado después a los mamíferos, proporcionando importantes conocimientos sobre la biología humana y una amplia variedad de sus enfermedades (Bier, 2005; Bilen & Bonini, 2005; Margulies et al., 2005; Potter et al., 2000).

Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *Drosophila* es corto y tiene la capacidad de dar lugar a un alto número de descendencia (figura 1). El tiempo de generación es de 10 días a 25°C desde que el óvulo es fertilizado hasta la eclosión del adulto. *Drosophila* es un insecto holometábolo, y su ciclo de vida se divide en 4 estadios: embrión, larva, pupa y adulto. La hembra pone unos 100 embriones al día, cuya embriogénesis dura unas 24 horas y tras la cual emergerá una larva. Las larvas de primer y segundo estadio se alimentan y mudan un par de veces la cutícula y mandíbulas; al alcanzar su fase de madurez en el tercer estadio (L3), dejan de comer y buscan un buen lugar para pupar. La pupa sufre metamorfosis completa y finalmente emergerá el adulto.

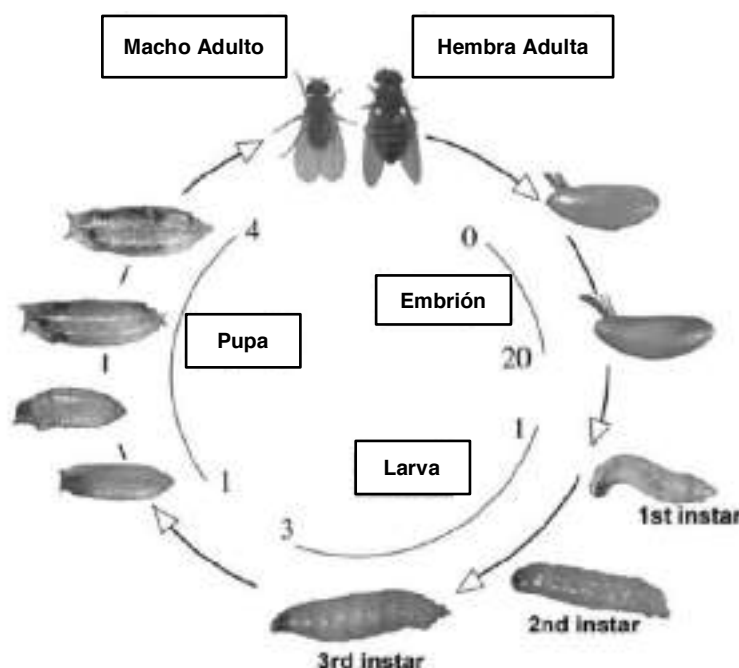


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Fernández-Moreno et al. 2007). Una vez que el huevo ha sido fertilizado entra en embriogénesis, seguida por la etapa larvaria, subdividida en tres fases (L1, L2 y L3) y finalmente la etapa de pupa de la que emergerá el adulto.

Al presentar distintas etapas en su ciclo vital, *Drosophila* se ha considerado como un organismo modelo múltiple, ya que cada estadio presenta sus propias ventajas específicas (Pandey & Nichols, 2011). El embrión ha sido ampliamente utilizado en estudios de desarrollo fundamentales como la formación de patrones, la determinación del destino celular, la organogénesis y el desarrollo neuronal. La larva se ha empleado para estudiar procesos fisiológicos y de desarrollo, así como comportamientos simples (i.e. la búsqueda de alimento). La pupa ha servido para investigar ciertos procesos de desarrollo, como por ejemplo el proceso de desarrollo de los discos imaginales de ojo, alas, patas para dar lugar a las estructuras del adulto. Por último, el adulto ha resultado un modelo excelente en numerosos procesos fisiológicos, al ser un organismo muy sofisticado y complejo que presenta estructuras con funciones equivalentes al corazón, pulmón, riñón, intestino y tracto reproductivo de los mamíferos. Además, el cerebro de la mosca adulta tiene más de 100.000 neuronas que forman circuitos que intervienen en comportamientos complejos, incluidos los ritmos circadianos, el sueño, el aprendizaje y la memoria, el cortejo, la alimentación, la agresión, el aseo, etc. Notablemente, la respuesta de las moscas a muchos fármacos que actúan dentro del sistema nervioso central (SNC) es similar a los efectos observados en mamíferos (Bainton et al., 2000; Mcclung & Hirsh, 1998; *Role of Dopamine in Ethanol-Induced Locomotor Stimulation*, n.d.).

1.2. Sistema nervioso central de *Drosophila*

El SNC de *Drosophila* se origina a partir de células madre neurales, llamadas neuroblastos (NBs) y está formado por el cerebro central (CB, sus siglas en inglés para "central brain"), el cordón nervioso ventral (VNC, "ventral nerve cord") y los lóbulos ópticos (OL, "optic lobes"). Los NBs representan un excelente modelo experimental para

estudiar la biología básica de las células madre neurales dada la simplicidad del desarrollo de *Drosophila* y las sofisticadas herramientas genéticas disponibles. De hecho, el estudio de los NBs de *Drosophila* ha contribuido significativamente a la comprensión de la división celular asimétrica y de la especificación del destino celular, así como al entendimiento de otros procesos fundamentales como la citocinesis (Cabernard, 2012), la polaridad celular (Knoblich, 2010a), la orientación del huso mitótico (M. S. Lu & Johnston, 2013) y al modelaje de la formación de tumores in vivo (Gonzalez, 2013; Homem & Knoblich, 2012a).

1.2.1. Desarrollo del SNC de *Drosophila*

El desarrollo del SNC de *Drosophila* consta de dos fases de neurogénesis separadas por un período de inactividad (figura 2). La primera ola de neurogénesis se produce en la etapa embrionaria (estadios 9-11), cuando los NBs del CB y del VNC delaminan desde el neuroectodermo, ubicado en la región ventrolateral del embrión (Doe & Skeath, 1996). Dichos NBs comienzan a dividirse de forma asimétrica a lo largo del eje de polaridad apico-basal, dando lugar a otro NB y a una célula madre ganglionar más pequeña (GMC), que se divide una vez más de forma asimétrica para producir dos neuronas o células gliales. Los NBs se especifican de entre las células vecinas del neuroectodermo por un mecanismo de inhibición lateral dependiente del receptor transmembrana Notch. En este proceso, la actividad de los genes proneurales queda restringida al presunto NB, mientras que en las células vecinas la inhibición lateral de la vía de señalización de Notch reprime dicha actividad proneural (Campos-Ortega & Wiley, n.d.; *Choosing a Cell Fate- a View From the Notch locus*, n.d.; Hartenstein & Wodarz, 2013). Las divisiones de NBs embrionarios producen todas las neuronas que formarán el SNC de la larva, pero sólo el

10% de las células del SNC adulto. La mayoría de los NBs de la región abdominal del embrión se eliminan mediante muerte celular programada después de completar sus linajes neuronales (Hartenstein & Campos-Ortega, 1984). En cambio, en la región cefálica y torácica los NBs detienen su ciclo celular y entran en un estado inactivo de quiescencia (G_0) (Egger et al., 2008; Truman & Bates, 1988), con la excepción de cuatro NBs, que formarán la región de los "Mushroom bodies" ("*corpora pedunculata*"), que continúan dividiéndose. El proceso de quiescencia está regulado por factores intrínsecos de la célula, genes Hox y los factores de identidad temporal, así como por bajos niveles nucleares del factor de transcripción Prospero (Pros). La segunda ola de neurogénesis empieza durante la etapa tardía del primer estadio larvario (8-10 horas después de la eclosión de la larva), cuando los NBs salen de quiescencia y reanudan proliferación, y continúa hasta la etapa de pupa, momento en el que los NBs salen del ciclo celular y sufren apoptosis. Esta reactivación está mediada por señales extrínsecas nutricionales, tales como los "insuline-like peptides de *Drosophila*" (dILPs), y hormonales (la ecdisona) secretadas por la glía, e implica el crecimiento celular y la entrada en fase de síntesis de ADN (fase S) del ciclo celular (Chell & Brand, 2010a; &ens et al., 1993; Sousa-Nunes et al., 2011a).

Otra fuente de NBs es el lóbulo óptico del cerebro larvario donde las células del neuroepitelio se dividen simétricamente en paralelo a la superficie epitelial (Egger et al., 2007; Hofbauer & Campos-Ortega, 1990); en respuesta a la expresión de genes proneurales, dichas células neuroepiteliales se convierten gradualmente en NBs, perdiendo sus uniones adherentes y comenzando a dividirse perpendicularmente al plano epitelial de forma asimétrica (Egger et al., 2010). Estos NBs darán lugar a las neuronas de los centros de procesamiento visual del cerebro.

El cerebro larvario en particular se ha utilizado para estudiar cómo se regula la progresión de los linajes de NBs ya que, a diferencia de los NBs embrionarios, mantienen su tamaño original después de cada división celular y son capaces de dividirse cientos de veces. Esta segunda ola de neurogénesis es la responsable de la formación del 90% de las neuronas en el SNC adulto.

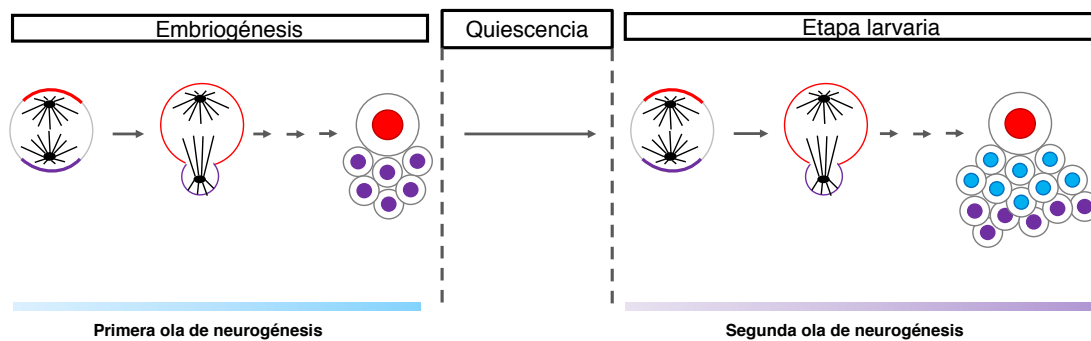


Figura 2. Fases de desarrollo del SNC de *Drosophila melanogaster*. EL SNC de *Drosophila* se produce a partir de dos fases distintas de neurogénesis separadas por un periodo de quiescencia. Una ocurre durante la embriogénesis y la otra en la etapa larvaria (adaptada de E. Gallaud et al. 2017).

Factores de transcripción

Durante el desarrollo del SNC se genera una amplia diversidad de células neurales a partir de los NBs y para ello es requerida una serie de información temporal y posicional (Truman & Bates, 1988). La información posicional es establecida por un patrón de expresión de genes anteroposteriores y dorsoventrales en etapas tempranas de la embriogénesis (Bertrand et al., 2002; Brodya et al., n.d.; *Patterning of the Drosophila nervous System- the Acbaete-Scute Gene Complex*, n.d.); dichos genes hacen que cada NB adquiera una combinación específica de factores de transcripción, los cuales contribuyen a su identidad celular específica e influyen en los tipos de células neurales que generan. La información temporal es importante durante el proceso de proliferación

de los NBs ya que ayuda a la producción de diferentes tipos celulares en su progenie (Baumgardt et al., 2009; Brody & Odenwald, 2000; Hirono et al., 2012; X. Li et al., 2013). Ello implica la expresión de una serie de factores de transcripción durante una ventana de tiempo específica en el NB, progenitores intermedios neurales (INPs) (ver más adelante), célula madre ganglionar (GMC) y en las neuronas generadas, lo cual conduce a la generación de tipos neuronales únicos y específicos (figura 3).

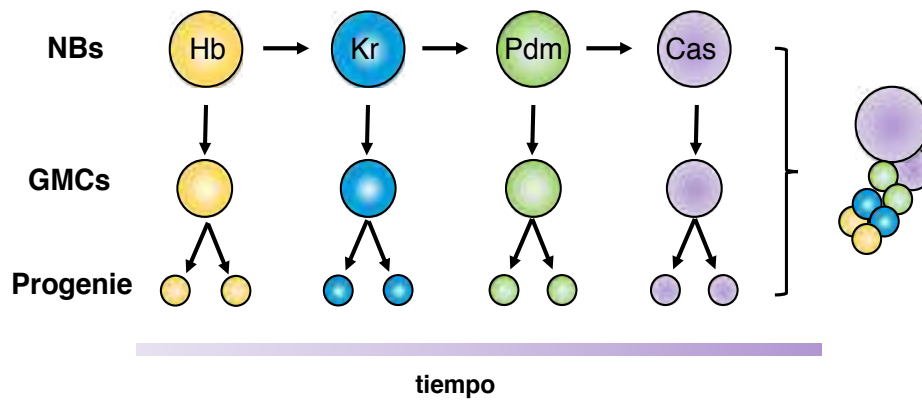


Figura 3. Progresión temporal de los neuroblastos. Los NBs embrionarios expresan secuencialmente los factores de transcripción temporales *Hunchback (Hb)*, *Kruppel (Kr)*, *Pdm* y *Castor (Cas)* y su progenie expresa el factor de transcripción presente en el momento del nacimiento de la GMC. De esta manera se le confiere la identidad celular a la progenie durante el desarrollo. El factor temprano Hb es necesario y suficiente para especificar el destino de las neuronas nacidas tempranamente en múltiples linajes de NBs (adaptada de Isshiki et al. 2001).

1.2.2. Tipos de neuroblastos

En función de las características moleculares y la composición celular de sus linajes, podemos distinguir distintos tipos de NBs en el SNC de *Drosophila* (figura 4).

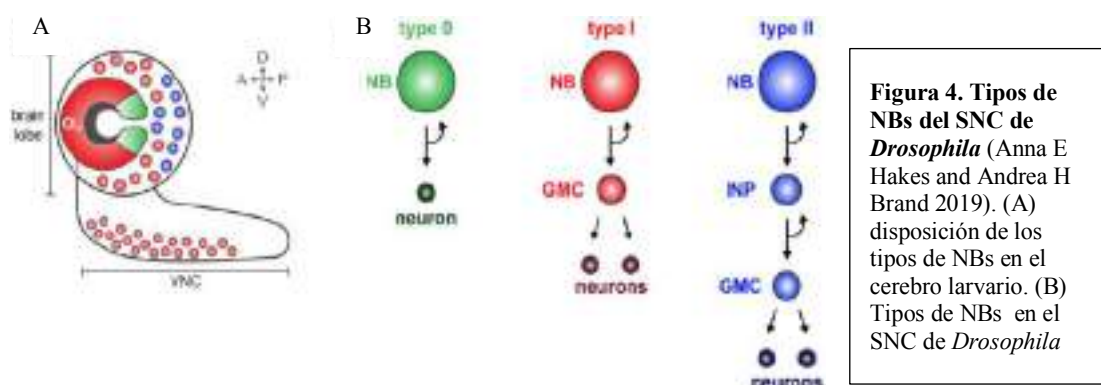


Figura 4. Tipos de NBs del SNC de *Drosophila* (Anna E Hakes and Andrea H Brand 2019). (A) disposición de los tipos de NBs en el cerebro larvario. (B) Tipos de NBs en el SNC de *Drosophila*

NB de tipo I

Los NBs de tipo I fueron identificados por primera vez en el embrión y son los más abundante del SNC embrionario y larvario (figura 5). Se dividen asimétricamente y generan un NB, con capacidad de autorrenovación, y una GMC que sufre una división asimétrica terminal que da lugar a dos neuronas o células gliales (Doe Chris Q., 1992).

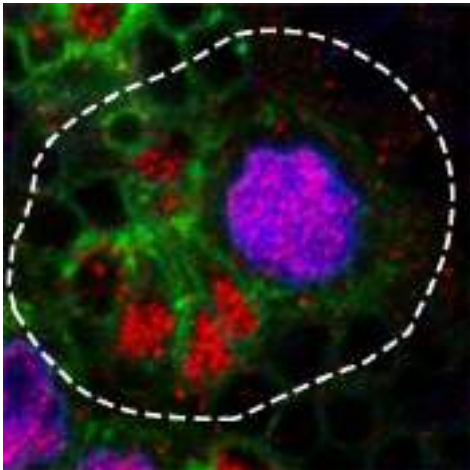


Figura 5. Micrografía confocal que muestra el linaje del NB larvario de tipo I marcado con GFP(verde). El NB del linaje marcado en morado (azul más rojo) y las GMCs marcadas en rojo.

NB de tipo 0

Son NBs de tipo I que cambian su modo de división al final de la embriogénesis para generar otro NB y una célula hija que se diferencia directamente en un destino neuronal (Baumgardt et al., 2014; Monedero Cobeta et al., 2017; Ulvklo et al., 2012).

NB de tipo II

Son las células que presentan mayor capacidad proliferativa del SNC y dan lugar a, aproximadamente, una cuarta parte de las neuronas del cerebro adulto (B. C. Bello et al., 2008; Boone & Doe, n.d.; Bowman et al., 2008). Se identificaron por primera vez en el cerebro larvario, aunque posteriormente se demostró que se originan en el embrión, en tres grupos distintos a partir del protocerebro dorsal durante el estadio 12 de la

embriogénesis (Álvarez & Díaz-Benjumea, 2018). Hay ocho NBs de tipo II en cada hemisferio del cerebro larvario central, seis en la región dorsomedial y dos en la dorsolateral (figura 6). Estos NBs se dividen asimétricamente dando lugar a otro NB y a un progenitor neural intermedio inmaduro (iINP) que sufre un proceso de maduración; el INP maduro vuelve a dividirse asimétricamente generando otro INP y una GMC, la cual se divide una vez más asimétricamente para producir dos neuronas o células gliales. Esta generación de neuronas a través de INPs en un proceso conocido como neurogénesis indirecta. El paso adicional de amplificación de los NB de tipo II da como resultado linajes que son de 4 a 5 veces más grandes que los de tipo I, y contribuyen sustancialmente a la formación de los complejos circuitos del cerebro central (Homem & Knoblich, 2012b; Viktorin et al., 2013; Weng et al., 2010a). La división de este tipo de NBs se asemeja a la de las células gliales radiales en la zona subventricular externa de la corteza cerebral de los mamíferos (Götz & Huttner, 2005; Merkle & Alvarez-Buylla, 2006). Adicionalmente, se han identificado varios genes que participan en el proceso de maduración de los INPs cuya mutación genera tumores malignos en el cerebro de *Drosophila* (Saini & Reichert, 2012). Por lo tanto, el estudio de estos NBs puede contribuir a mejorar nuestra comprensión no sólo de la generación de complejidad celular en la corteza cerebral de los mamíferos, sino también del origen de los tumores cerebrales malignos.



Figura 6. Micrografía dorsal del SNC de *Drosophila*, en cuyo cerebro central se aprecian los 8 linajes de NBs de tipo II, marcados con GFP, existentes en cada hemisferio cerebral

Aunque los NBs utilizan la misma maquinaria molecular en el proceso de división asimétrica, existen varias diferencias entre los NBs embrionarios y los larvarios. A diferencia de los embrionarios, los NBs larvarios tienen una capacidad proliferativa mayor, recuperan su tamaño original entre las rondas de división y no siempre se dividen con una orientación fija (Ito' And & Ho~ta, 1992; White' And & Kankel', 1978). En cuanto a los NBs de tipo II y de tipo I, ambos tipos de NBs exhiben muchísimas similitudes, pero se diferencian en varios aspectos importantes, muchos de los cuales ya se han mencionado anteriormente (figura 7). A nivel molecular, los NBs de tipo II no expresan el factor de transcripción Asense (Ase) ni el determinante de destino celular Pros. En cambio, tanto los NBs de tipo I como los INPs presentan Ase nuclear y Pros citoplasmático; ambos se dividen asimétricamente y expresan todos los marcadores de polaridad apico-basal como los NB de tipo II, pero segregan Pros a la célula hija, la GMC, además de Numb, Brain Tumor (Brat) y Miranda (Mira) (estos sí presentes en los NBs de tipo II) promoviendo la diferenciación neuronal en dicha célula.

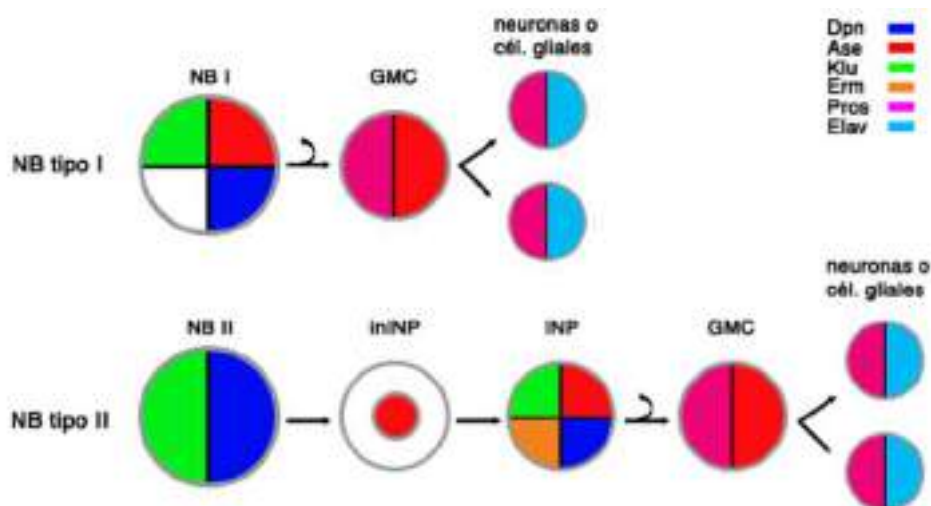


Figura 7. Linajes de NBs del cerebro central y patrones de expresión de factores de transcripción. Esquema que resume la expresión de los marcadores moleculares moleculares en los NB de tipo I y de tipo II (adaptada de Yanrui Jiang)

En los NBs de tipo II, la señalización de Notch actúa a través de sus genes diana *deadpan* (*dpn*), *Enhancer of split my-helix-loop-helix* (*E(spl)my-HLH*) y *klumpfuss* (*klu*), los cuales funcionan como factores de renovación manteniendo a los NBs de tipo II en un estado indiferenciado (figura 8). Los INPs recién nacidos (iINPs) de la división de estos NBs se caracterizan celularmente por su inactividad mitótica y detención en la fase G2, y molecularmente por la ausencia de los factores de transcripción Dpn y Ase. Estos iINPs experimentan un proceso de maduración estereotípico de 4-5 horas de duración donde los determinantes celulares que han sido segregados por la célula madre (NB) desempeñan un papel fundamental en el proceso de restricción de su potencial de desarrollo a través de la inhibición de Notch, y de sus dianas *dpn*, *E(spl)my* y *klu*. Los determinantes Numb y Brat se coordinan proporcionando dos mecanismos paralelos que evitan la reversión de los iINPs recién nacidos a NBs, suprimiendo la acción de los factores de renovación a nivel transcripcional y transduccional. Primero Numb especifica la identidad del INP bloqueando la vía de Notch, y a continuación Brat suprime la acción de Klu a través de la actividad de Armadillo (β -catenina). A continuación, Earmuff (Erm) se expresa en los iINPs para continuar antagonizando la señalización de Notch y evitar que revierta a NB (actúa como un represor transcripcional temporal de los genes diana de Notch), y restringiendo su potencial de desarrollo mediante la activación de Pros. Erm se expresa exclusivamente en iINPs. Una vez que los INPs han madurado y adquirido el potencial de desarrollo restringido, expresan Ase y Dpn y se reactiva la señalización de Notch que promueve su DCA. Los INPs se dividen cinco o seis veces más, y en cada división se renuevan generando finalmente por INP entre 4 y 6 GMC y entre 8 y 12 neuronas o células gliales (Janssens et al., 2014; Weng et al., 2010b).

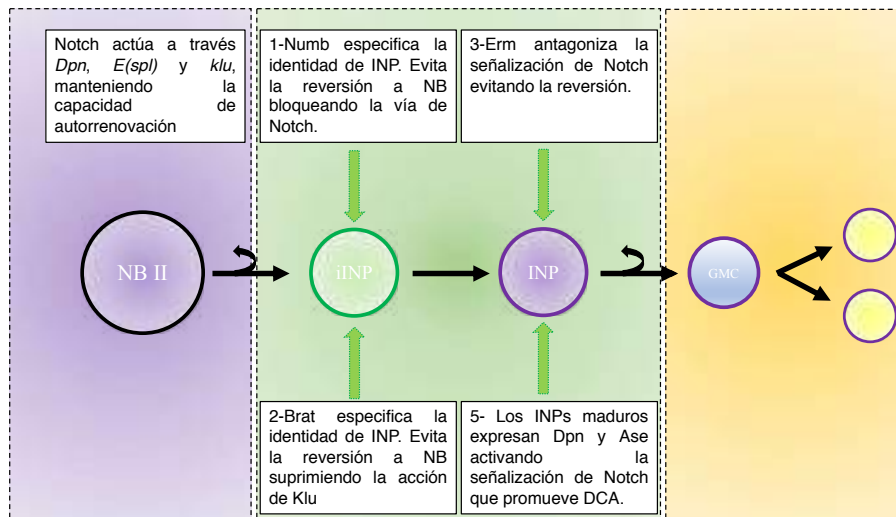


Figura 8. Factores que regulan la progresión del linaje en los neuroblastos de tipo II. Durante la proliferación de los NBs de tipo II varias proteínas, como Brat, Numb y Erm, restringen la capacidad de proliferación de los INPs e inhiben la reversión de los INPs inmaduros durante su proceso de maduración antagonizando la vía de señalización de Notch como la de sus dianas *Dpn*, *E(spl)* y *Klu* que mantienen la capacidad de autorrenovación y promueven DCA (adaptada de Yanrui Jiang)

2. División celular asimétrica

La división celular asimétrica (DCA) es un proceso fundamental, altamente conservado y presente en la mayoría de los organismos (Knoblich Juergen A., 2001; Wodarz & Huttner, 2003; Zhong & Chia, 2008). La DCA es el mecanismo empleado por las células madre/progenitoras para establecer los diferentes destinos celulares durante el desarrollo y, por tanto, para generar diversidad celular. Asimismo, se ha demostrado en los últimos años que la DCA es un proceso muy importante no sólo en el estudio de la biología de las células madre sino también en el contexto del cáncer (Chang et al., 2012; Knoblich, 2010b; Yoo & Kwon, 2015).

En una DCA, una célula madre/progenitora genera dos células hijas distintas, una conserva la identidad de la célula madre (i.e. capacidad de proliferación, mantenimiento del estado indiferenciado y la capacidad de producir células hijas que se diferencian) y la

otra célula hija pierde las características de la célula madre y se especializa (i.e. detiene la proliferación y empieza un proceso de diferenciación) (figura 9).

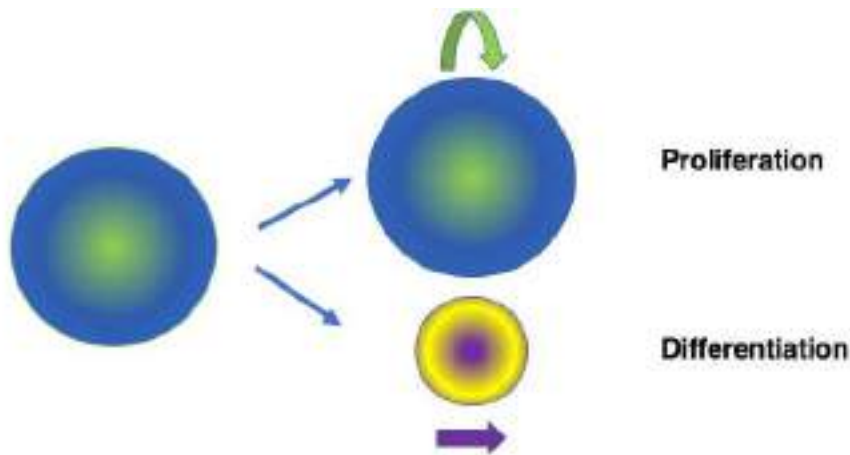


Figura 9. Esquema general de la DCA de una célula madre que da lugar a dos células hijas, una que mantiene su capacidad proliferativa y otra que entra en un programa de diferenciación.

Como se ha mencionado, la DCA es un mecanismo muy conservado en la evolución, observándose en una amplia gama de organismos, desde procariotas a eucariotas y es esencial durante la embriogénesis, determinando la especificación de los distintos tipos e identidades celulares. Asimismo, la DCA es crítica en el proceso de regeneración tisular, permitiendo que las células madre se renueven y manteniendo así la homeostasis tisular en el adulto (Liu & Song, 2016; Spalding et al., 2013).

2.1. Mecanismos de regulación

El proceso de división asimétrica se inicia en interfase, finaliza al producirse la citocinesis y está regulado principalmente por dos mecanismos fundamentales: intrínsecos o autónomos y extrínsecos o no autónomos (Robert Horvitz & Herskowitz, 1992; Yamashita et al., 2010). Los mecanismos intrínsecos se basan en la polarización de la célula durante el ciclo celular, culminando el proceso durante la mitosis (figura 10). La

célula madre se polariza estableciendo un eje de polaridad, sobre el que se distribuirán de forma asimétrica diferentes complejos de proteínas (Betschinger & Knoblich, 2004; Yu et al., 2006). Los NBs del SNC de *Drosophila* se han usado tradicionalmente como sistema modelo para analizar estos mecanismos intrínsecos. En los NBs polarizados, un grupo de proteínas se acumula en el polo apical del NB. Dichos reguladores apicales son los encargados de controlar la correcta distribución en el polo basal del NB de las proteínas determinantes del destino celular; así, la célula hija que herede estos determinantes detendrá la división y empezará el proceso de diferenciación celular, mientras que la célula hija que herede los reguladores apicales adquirirá la identidad de célula madre y continuará dividiéndose.

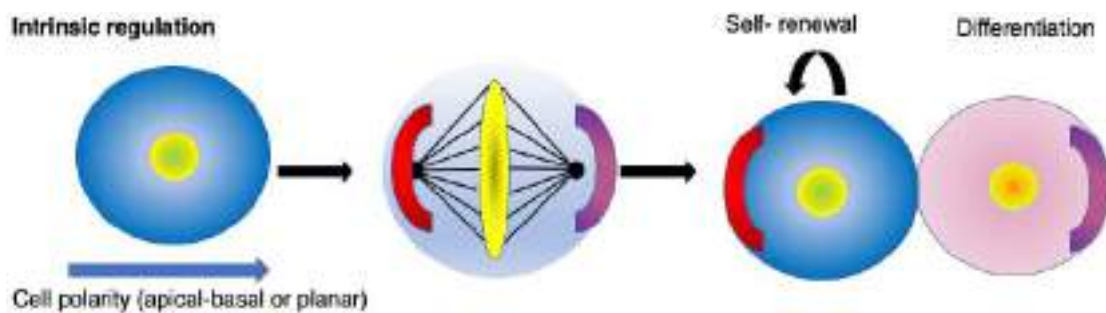


Figura 10. Esquema de los mecanismos de regulación autónomos o intrínsecos durante la DCA de una célula madre (adaptada de Y. Yamashita, Hebao Yuan, Jun Cheng, A. Hunt, 2010)

En la regulación extrínseca, la célula madre está en estrecho contacto con un nicho, un microambiente especializado, que actúa como fuente de señales siendo responsable del mantenimiento del potencial proliferativo de ésta (L. Li & Xie, 2005) (figura 10). Un ejemplo de células madre modelo en el que se ha analizado este tipo de mecanismos extrínsecos profundamente son las células madre germinales (GMCs) de *Drosophila* (Barton et al., 2016; Fuller & Spradling, 2007). Durante la mitosis, la célula madre dispone la orientación del huso mitótico perpendicular a la superficie del nicho, haciendo

que solo una célula hija mantenga el contacto y continúe recibiendo las señales de éste, conservando así la capacidad de proliferación; por el contrario, la otra célula hija que no está en contacto con el nicho y no recibe estas señales empieza un proceso de diferenciación.

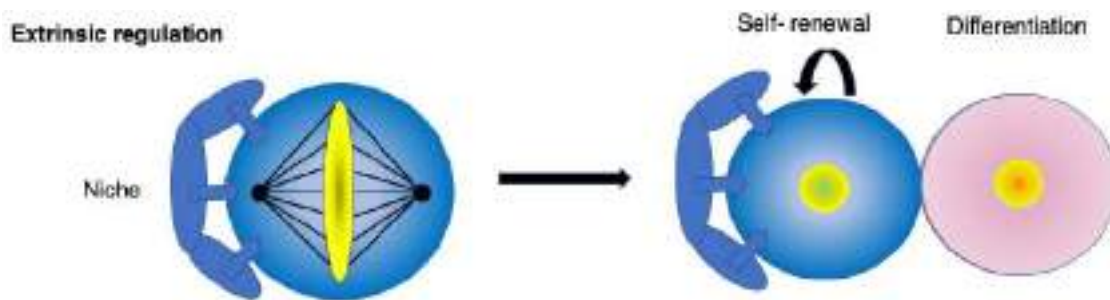


Figura 11. Esquema de los mecanismos de regulación no autónomos o extrínsecos durante la DCA de una célula madre (adaptada de Y. Yamashita, Hebao Yuan, Jun Cheng, A. Hunt, 2010)

Por lo tanto, en la DCA las células madre dependen de su arquitectura celular: asimetría en la distribución de reguladores de polaridad, del citoesqueleto, huso mitótico y centrómeros, así como de su entorno celular. La maquinaria que establece y mantiene la polaridad celular, controla la orientación del huso mitótico y localiza los determinantes del destino celular está altamente conservada evolutivamente. Edwin Conklin fue el primero en demostrar que los embriones de *Styela plicata* (Ascidias) segregaban de forma asimétrica su citoplasma para especificar el destino de las células musculares (Conklin et al., 1905). Desde entonces, la maquinaria que regula DCA se ha estudiado en diferentes organismos modelos muy separados en la escala evolutiva, desde organismos simples y fácilmente manipulables genéticamente (i.e levadura, *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster*) hasta más complejos (vertebrados). Estos estudios embriológicos han demostrado que muchos reguladores están conservados en distintas especies. Por ejemplo, las proteínas que forman el complejo PAR se descubrieron en *C.*

elegans (Kemphues et al., 1988), y actualmente se ha demostrado que actúan como reguladores de la polaridad apico-basal en osteoblastos de ratón (Boxem & van den Heuvel, 2019; van der Horst et al., 2019). La proteína Kar9 se describió por primera vez en la levadura (Liakopoulos Dimistris et al., 2003) y posteriormente se demostró que controla la asimetría de las células madre astrales y de las células madre neurales de ratón (Wang et al., 2009).

2.1.1 Mecanismos intrínsecos de DCA en NBs

Como se ha mencionado previamente, los NBs de *Drosophila* se han utilizado durante décadas como un excelente sistema modelo para estudiar los mecanismos moleculares y bioquímicos que participan y regulan la DCA, fundamentalmente la regulación intrínseca. La comprensión y los conocimientos obtenidos representan uno de los logros y contribuciones más importantes de la investigación de *Drosophila* en el campo de la biología del desarrollo. Para que la DCA se realice con éxito en los NBs es necesario que se produzcan dos eventos fundamentales relacionados entre sí: 1) el establecimiento de la polaridad apico-basal (y la consecuente localización y segregación asimétrica de los determinantes del destino celular, así como la correcta orientación del huso mitótico a lo largo de este eje de polaridad) y 2) la regulación del tamaño de las células hijas (Chia et al., 2008).

Establecimiento de la polaridad apico-basal

Los NBs son células que están muy polarizadas a lo largo de su eje apico-basal, siendo esto fundamental para la correcta orientación del huso y para la localización asimétrica

de los determinantes del destino celular. En el caso de los NBs embrionarios, dicha polaridad la heredan de las células del neuroectodermo del cual se delaminan. En el mantenimiento de esta polarización participan distintos complejos apicales y basales de proteínas que confieren finalmente a las células hijas su identidad celular (figura 12).

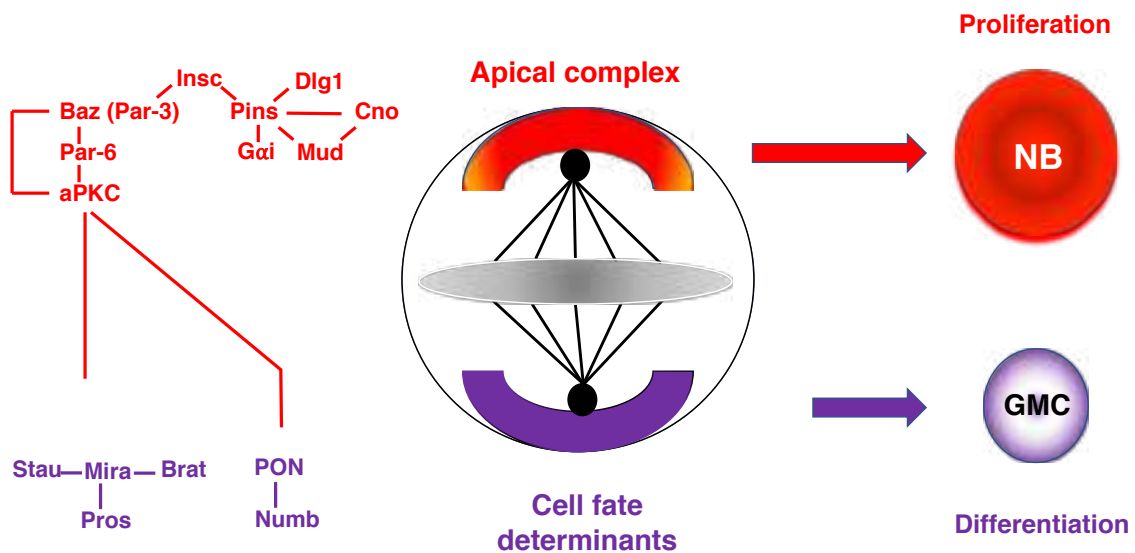


Figura 12. Polarización de complejos durante DCA de NBs. Los NBs de *Drosophila* se dividen asimétricamente a través de mecanismos intrínsecos, dando lugar a otro NB que continúa dividiéndose y una GMC que recibe los determinantes del destino celular y empiezan un proceso de diferenciación. La localización basal de los determinantes celulares está regulada por un grupo de proteínas que se localizan en el polo apical del NB denominado complejo apical (adaptada de Rita Sousa-Nunes and W. Gregory Somers 2013)

Los determinantes del destino celular cambian su distribución de forma dinámica durante el ciclo celular, se localizan en el polo basal durante metafase formando una media luna, y se segregan exclusivamente a la GMC durante la citocinesis, donde actúan promoviendo la diferenciación y especificación celular y suprimiendo la proliferación. Este complejo basal de determinantes de identidad está formado por tres proteínas principales (mencionadas anteriormente), la proteína adaptadora Numb, el factor de transcripción Pros y el regulador traduccional Brat, así como sus dos proteínas adaptadoras, Mira y "Partner of Numb" (Pon).

Numb participa en la especificación del destino de la GMC/ INP mediante la inhibición de Notch (Chia et al., 2008; Guo et al., 1996), al promover su endocitosis y la de la proteína Sanpodo (Spdo) en la GMC/INP a través de la proteína α -Adaptin (α -Ada)(Catherine A. Dye et al., 1998; James B. Skeath & Chris Q. Doe, 1998). La localización asimétrica de Numb en el polo basal del NB requiere de su fosforilación por el regulador apical aPKC, con el consecuente desplazamiento de Numb de la corteza apical a la basal(Andreas Wodarz et al., 1999; Rolls et al., 2003). Además, la proteína adaptadora de Numb, Pon, también contribuye a la localización adecuada de Numb ya que, previa fosforilación por la quinasa Polo, se acumula también en el polo basal y se une directamente a Numb (B. Lu et al., 1998; Wang et al., 2007).

Pros se sintetiza en el NB y se mantiene en el citoplasma hasta que el NB entra en mitosis(Fumio Matsuzaki, 2000), momento en el que cambia su localización al polo basal mediante la unión a su proteína de anclaje, denominada Mira, que es la responsable de su localización asimétrica durante el ciclo celular(Hiroko Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Shen et al., 1997). Pros se segrega junto con Mira a la GMC y una vez completada la división celular, después de la citocinesis, Mira se degrada liberando a Pros, que se transloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción(Atwood & Prehoda, 2009; Choksi et al., 2006; L. Li & Vaessin, 2000). En el núcleo, Pros promueve la transcripción de genes específicos de la GMC y genes implicados en la diferenciación terminal neuronal como *fasciclin II* y *Netrin-B*. Por otra parte, Pros actúa reprimiendo la expresión de genes específicos de NBs y suprimiendo la transcripción de reguladores del ciclo celular como *Cyclin A*, *Cyclin E* y *string*, un homólogo en *Drosophila* de *Cdc25*. Pros también regula positivamente la expresión de *dacapo*, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina.

Brat se segrega en la GMC durante la mitosis y contribuye a su especificación (B. Bello et al., 2006; Betschinger et al., 2006). Inhibe la síntesis de proteínas evitando así la autorrenovación e induciendo la diferenciación. Su proteína adaptadora Mira es fosforilada por aPKC, lo que conlleva a su exclusión del polo apical y su acumulación en el polo basal donde se une a Pros y Brat y localiza a las dos proteínas en la corteza basal (Lee et al., 2006).

El establecimiento y el mantenimiento de la polaridad de los NBs está controlado por el complejo apical, constituido por proteínas que durante la división se localizan en la corteza apical y regulan tanto la localización basal y la segregación de los determinantes del destino celular como la correcta orientación del huso mitótico y la asimetría de tamaño de las células hijas (NB y GMC) (figura 14). El complejo apical está formado a su vez por dos complejos distintos: PAR/aPKC y el complejo formado por Pins/Gai/Canoe(Cno)/Mud que están unidos a través de la proteína Inscuteable (Insc) (figura 13). Insc tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la polaridad ya que es responsable de la coordinación entre la orientación del huso mitótico y la localización de proteínas a lo largo del eje apico-basal (Mauser & Prehoda, 2012; Rachel Kraut & José A. Campos-Ortega, 1996; Siller & Doe, 2009). Por otra parte, la proteína apical Canoe (Cno) (proteína reguladora del proceso de DCA, descrita originalmente en NBs embrionarios) forma un complejo con Pins que modula la localización de Mud contribuyendo al cambio entre Pins/Insc a Pins/Mud, y al reclutamiento de otras proteínas necesarias para la orientación del huso mitótico. También interacciona funcionalmente con Insc, Gai y Mud para generar linajes específicos en el SNC como también participa en la localización basal de los determinantes del destino celular y generación de células hijas de tamaño desigual (Speicher et al., 2008)(Speicher et al., 2008).

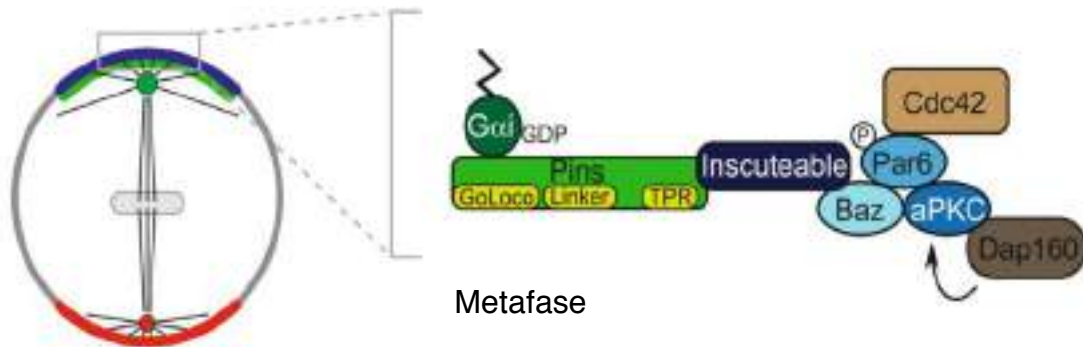


Figura 13. Establecimiento de la polaridad apico-basal en NBS en metafase. El complejo PAR(Par-6/aPKC/Baz), junto con otras proteínas (Cdc42, Daap160) que contribuyen a su localización y activación, se une a través de Baz a la proteína adaptadora Insc, la cual también se une a Pins proporcionando un enlace entre las proteínas de polaridad apical y la maquinaria de orientación del huso. (Figura E. Gallaud et al., 2017)

El complejo PAR/aPKC funcional está formado por tres proteínas, denominadas Bazooka (Baz)/PAR-3, Par-6 y la proteína quinasa atípica C (aPKC), y se encuentra altamente conservado en evolución. La formación y la localización apical del complejo está regulada por Aurora A (AurA) (Wirtz-Peitz et al., 2008a) y otras proteínas, incluidas Cdc42, la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Chabu & Doe, 2009; Krahn et al., 2009; Ogawa et al., 2009) y la proteína adaptadora Dap160 ("Dynamin associated protein 160") (Chabu & Doe, 2008). Hay que resaltar que el citoesqueleto de actina es necesario para la localización asimétrica de los determinantes del destino celular y la GTPasa Cdc42, componente del complejo PAR/aPKC, que se une directamente a Par-6, actúa como regulador de la dinámica de actina (Georgiou et al., 2008; K. P. Harris & Tepass, 2008; Vermeer et al., 2003). De hecho, existe una estrecha conexión entre el complejo apical y el citoesqueleto de actina. El complejo PAR/aPKC es responsable de dirigir la localización basal de los determinantes del destino celular a través de una serie secuencial de eventos de fosforilación (Wirtz-Peitz et al., 2008a). Así, aunque en etapas tempranas de profase el complejo está compuesto por la asociación de Par-6, aPKC y L(2)gl, posteriormente, la quinasa mitótica AurA fosforila a Par-6, conduciendo a la activación

de aPKC que, por una parte, fosforila y libera a L(2)gl del complejo siendo L(2)gl reemplazada por Baz/PAR-3 y, por otra parte, fosforila a Numb y a Mira restringiendo su localización al polo basal durante mitosis .

La fosforilación de L(2)gl por aPKC, que conduce a la inactivación apical de L(2)gl (provoca un cambio conformacional en la proteína y evita su asociación con el citoesqueleto de la corteza apical restringe su actividad a la corteza basal del NB. L(2)gl, a su vez, reprime aPKC en el polo basal. En consecuencia, L(2)gl activo promueve la localización de los determinantes del destino celular sólo en la corteza basal del NB, donde aPKC está ausente. Además, L(2)gl afecta a la actividad asimétrica del citoesqueleto mediante la interacción directa con la miosina II no muscular (NMII), proteína motora de transporte de actina, que contribuye al mantenimiento de la forma celular , polaridad celular y a la división celular, y que es esencial también durante otros procesos como adhesión y migración celular (Cao et al., 2015; Wirtz-Peitz et al., 2008b). L(2)gl activo restringe la actividad de NMII-A e inhibe el ensamblaje de actina y miosina, por el contrario L(2)gl inactivo se disocia del citoesqueleto. También existe un vínculo entre la polaridad del NB y la regulación del ciclo celular. Por ejemplo, la localización de Insc y la de los determinantes del destino celular dependen de la actividad de la quinasa mitótica Cdc2. Asimismo, los reguladores de ciclo celular AurA y Polo (mencionados previamente) también participan en la regulación de la DCA.

El control de la geometría del huso mitótico y de su orientación paralela al eje apico-basal es un proceso crucial, ya que es indispensable para la correcta segregación de los determinantes a una sólo célula hija y, consecuentemente, para que el proceso de división asimétrica sea exitoso (Cabernard & Doe, 2009). La orientación del huso mitótico está principalmente orquestada por el complejo apical de Pins/Gai (Nipper et al., 2007; Schaefer et al., 2000; Yu et al., 2005). Pins actúa como un andamio molecular mediante

la interacción directa con Insc and Gai. Insc unido al complejo Par a través de Baz/PAR-3 interacciona con Pins, cambiando su conformación y permitiendo la unión de Pins con Gai, localizada en la membrana. Entonces, la proteína apical Cno desplaza a Insc (se une a Pins en la misma región que Cno) y promueve la unión a Pins de las proteínas Dlg1 y Mud (que sustituirá a Cno en su unión a Pins). Dlg1, interacciona con una proteína motora, la kinesina Khc-73, de tal manera que el complejo Pins-Dlg1-Khc-73 puede anclar los microtúbulos astrales a la corteza apical (Siller et al., 2006). Por otra parte, Mud interactúa con el complejo Dynein-Dynactin (Carter et al., 2018). La Dynein es una proteína motora asociada a los microtúbulos, así, el complejo Dynein-Dynactin fuerza el movimiento del huso a través de los microtúbulos hacia el lado apical.

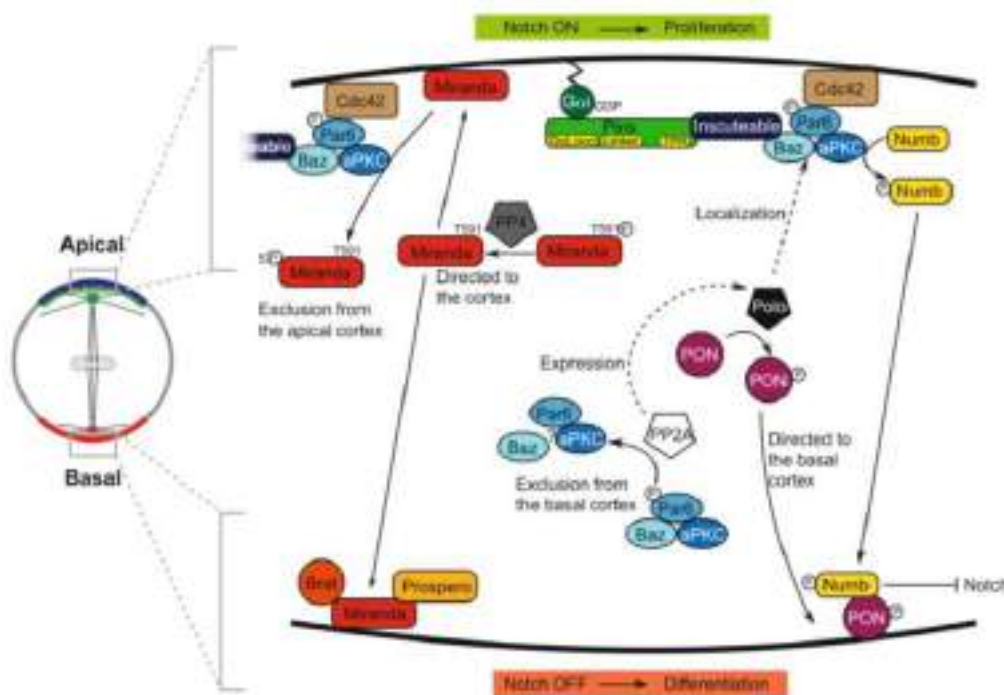


Figura 14. Dinámica del complejo apical en el control de polarización y segregación basal de los determinantes del destino celular. La quinasa Polo participa en la localización apical del complejo Par y fosforila a PON para que se dirija a la corteza basal donde se une a su pareja y determinante celular Numb. La PP2A desfosforila a Par-6 (antagonizando la actividad de la quinasa AurA) y excluye al complejo Par de la corteza basal. Además, la PP2A también regula la expresión de Polo. Mira y Brat, están reguladas por PP4 y aPKC; PP4 desfosforila a Mira contribuyendo a su localización cortical, y en el polo apical aPKC la fosforila, provocando su exclusión de la corteza apical y restringiéndola así a la corteza basal. aPKC también fosforila a Numb, necesario para su localización basal. Numb se segrega en la GMC e inhibe la señalización Notch induciendo diferenciación. La actividad de Notch permanece alta en el NB y promueve la proliferación. Mira Brat y Pros también se segregan en el GMC, induciendo un programa de diferenciación. (Figura E. Gallaud et al., 2017)

Distintos estudios genéticos en *Drosophila* han demostrado que tanto la localización del citoesqueleto, la señalización mediada por las proteínas Gai y la polaridad celular participan en la coordinación entre la localización de los determinantes y la orientación del huso mitótico.

Regulación del tamaño de las células hijas

La asimetría de tamaño de las células hijas es el resultado de las características geométricas o de tamaño del huso mitótico durante la división celular. Concretamente, durante anafase, el huso mitótico se acerca a la corteza basal y se vuelve asimétrico, resultando así que el plano de escisión se descentre respecto a sus dos polos y de lugar a dos células hijas de distinto tamaño. La geometría del huso está regulada por dos vías redundantes mediadas por las proteínas de los complejos PAR/aPKC (Baz/Par-6/aPKC) y Pins/Gai/Loxodrome defects (Loco), que también controlan los diferentes comportamientos y propiedades de los centrosomas (Fuse et al., 2003; Izumi et al., 2004, 2006; Yu Cai et al., 2003). Loco es un regulador de proteínas G que se ha visto implicado directamente en este proceso (Yu et al., 2005). La asimetría de tamaño entre el NB y la GMC es importante para mantener el volumen del NB lo suficientemente grande como para que permita repetidas divisiones sin que se produzca crecimiento celular. Existen pequeñas diferencias respecto al control de la polaridad y de la orientación del huso mitótico en función del tipo de NB. Los NB embrionarios, durante su delaminación, heredan la polaridad apico basal que está establecida por el complejo apical presente en el neuroepitelio. Las uniones de adherencia y el contacto celular entre los NBs y las células epiteliales vecinas actúan junto con el citoesqueleto cortical y el complejo apical en el mantenimiento de la polaridad y de la orientación del huso mitótico en el NB, haciendo que la división siempre se produzca con la misma orientación. En cambio, los

NBs larvarios no están en contacto con ningún epitelio polarizado y las divisiones van cambiando de orientación, aunque siempre coordinadas con la localización del complejo apical gracias a señales intrínsecas proporcionadas por los microtúbulos astrales, así como a otras señales no caracterizadas dependientes de la posición de la GMC (Januschke & Gonzalez, 2010; Loyer & Januschke, 2018).

2.1.2 Mecanismos extrínsecos de DCA

Como se ha descrito anteriormente la DCA de las células madre además de por mecanismo intrínsecos, puede estar regulada por mecanismos no autónomos. Genéricamente, el entorno de las células madre, las células vecinas, controlan el comportamiento de las células madre y ejercen soporte nutricional y físico mediante señales e interacciones intercelulares. Dicho entorno, fundamental para la supervivencia y fisiología de las células madre, se conoce como “nicho”.

Raymond Schofield fue el primero en acuñar el concepto de nicho, hipotetizando sobre la existencia de un microambiente, el nicho, que de forma no autónoma impondría a las células madre su estado celular y regularía su mantenimiento. El concepto actual de nicho no está muy alejado del que propuso Scholfield; así, el nicho se define como un subconjunto de células de tejidos y sustratos extracelulares que pueden albergar indefinidamente una o más células madre, controlando su autorrenovación y producción de progeñe (Scadden, 2014). El nicho funcionaría como un agente de control, informando sobre el estado del tejido y del organismo a las células madre, así como también coordinando diferentes poblaciones de células que interactúan en estrecha proximidad, como por ejemplo el nicho del folículo piloso (células madre y progenitoras de la epidermis, el tejido conectivo y adiposo que interactúan en estrecha proximidad).

Los nichos operan mediante dos vías principales (Allan Spradling et al., 2001):

- 1) A través de un mecanismo de linaje, especificando la división de las células madre y de las células hijas. La célula madre orienta su plano de división de forma que sólo una célula hija hereda su contacto con el nicho. El número de células madre se mantiene constante a lo largo de muchos ciclos de divisiones.
- 2) Mediante un mecanismo de población en el que el tipo de división de las células madre es simétrica por lo que ambas células hijas pueden permanecer como células madre o diferenciarse. El resultado de varios ciclos altera el número de células madre o de células diferenciadas terminando por homogenizar el tejido.

El origen del nicho puede derivar de células de otros linajes o de los propios descendientes de las células madre, y están compuestos sólo por células o por células y matriz extracelular. Los mecanismos que subyacen a la función del nicho son muy variados, llevándose a cabo a través de factores secretados por el nicho o mediante contacto directo entre células del nicho y la(s) célula(s) madre (Lander, 2012). Por ejemplo, factores de células madre o factores de crecimiento de células progenitoras como las citoquinas, miembros de la vía de señalización de Notch, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), epidérmicos (EGF) y transformante β (TGF- β), entre otros, son capaces de regular la renovación, mantenimiento y supervivencia de las células madre. Hay una estrecha comunicación bidireccional entre las células madre y su ambiente. Así, cambios en el nicho pueden permitir que ciertos tipos celulares, más o menos diferenciados, prosperen, y viceversa, el nicho puede estar moldeado por la célula madre.

3. La glía en *Drosophila melanogaster*

Las células gliales tienen un papel fundamental durante el desarrollo del SN de *Drosophila*, asistiendo numerosos procesos biológicos. Por ejemplo, las células gliales participan en el control proliferativo de NBs y en el aislamiento neuronal, favorecen el desarrollo y la supervivencia neuronal proporcionándoles soporte trófico y realizan funciones claves en el posicionamiento neuronal y búsqueda de las rutas axonales. También funcionan regulando el espacio extracelular de neuronas maduras, actuando en la eliminación y el reciclaje de neurotransmisores, así como en la regulación de canales iónicos. Por todo esto, la glía actúa como un nicho en diferentes procesos, tanto durante el desarrollo como en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el adulto (Barres, 2008; Corty & Freeman, 2013; Hidalgo et al., 2011; Oland & Tolbert, 2003).

El número de células gliales en *Drosophila* representa entre el 5-10% del total de la población del SNC (Freeman, 2015a), a diferencia de en vertebrados donde la glía es el tipo celular más abundante del SNC (50% en ratones y 90% en humanos). En *Drosophila*, el número de células gliales se incrementa lentamente durante las primeras etapas del desarrollo, pero aumenta rápidamente en la etapa larvaria, momento en el que se generan de la mitosis de células gliales diferenciadas y, sobre todo, de la proliferación de NBs, que generan neuronas y glía en sus linajes, así como de progenitores gliales.

3.1. Tipos de glía en *Drosophila*

El SNC larvario de *Drosophila* consta de dos hemisferios cerebrales y el cordón ventral nervioso. Los cuerpos de las células neuronales del SNC residen en la región de la glía cortical, mientras que los axones y las dendritas se proyectan hacia el neuropilo. Los tipos de glía se pueden clasificar por su función, ubicación, estructura o patrones de expresión

génica. Atendiendo a su ubicación y/o a la morfología de sus células (Awasaki et al., 2008; Edwards & Meinertzhagen, 2010a; Hartenstein, 2011a), en el SNC de *Drosophila* hay cuatro tipos principales de glía que estructuran el cerebro en capas: superficial, cortical, neuropilo y periférica (figura 15). Éstas exhiben muchas similitudes morfológicas y funcionales con sus equivalentes en mamíferos.

Glía Superficial

La glía superficial forma la capa más exterior que envuelve todo el cerebro y se subdivide en dos capas: Glía Perineural (GP), y Glía Subperineural(GSP). La GP es la capa más externa y discontinua que junto con macrófagos secreta una laminilla de carbohidratos que cubre el SNC, actuando como una barrera física y química, y los nervios periféricos (SNP). La GSP es una monocapa de células aplanadas que cubre toda la superficie del SNC y establece la barrera hematoencefálica al formar uniones septadas entre sus células, barrera cuya función es regular el flujo de sustancias dentro y fuera del cerebro (Auld et al., 1995; Schwabe et al., 2005). Mantiene contacto directo con la capa de glía cortical más superficial.

Glía Cortical

La glía cortical (GC) proporciona una segunda barrera que envuelve y aísla los cuerpos neuronales y los NBs de regiones vecinas y del neuropilo; para ello, extiende sus membranas formando estructuras en forma de panal de abejas. Estructural y funcionalmente, las células de la glía cortical son muy similares a los astrocitos de mamíferos ya que están en estrecho contacto con las neuronas. Las membranas de la glía cortical mantienen contacto físico con la barrera hematoencefálica (GSP), mencionada anteriormente, por donde se produce la transferencia de nutrientes y gases entre hemolinfa

y cuerpos neuronales, actuando como conductos celulares para suministrar gases y nutrientes a las neuronas diana (Pereanu et al., n.d.). La glía cortical también juega un papel muy importante junto con la GSP regulando la proliferación de NBs en la larva en respuesta a factores nutricionales (Chell & Brand, 2010b; Sousa-Nunes et al., 2011b).

Glía del Neuropilo

La glía del neuropilo, compuesto por los axones y dendritas que forman circuitos neuronales, incluye a la glía envolvente y a los astrocitos. La glía del neuropilo promueve la supervivencia neuronal a través de mecanismos de apoyo trófico y está involucrada en la limpieza de neurotransmisores desde el espacio extracelular. La glía envolvente tiene la función de compartimentar el SN, rodea los nervios que se proyectan fuera del SNC y el neuropilo, y los separa de la glía cortical (Hartenstein, 2011b). Dicha glía extiende sus membranas en forma de vaina envolviendo a los axones de las nuevas neuronas que producen los NBs en larva y en pupa, aislándolos en un entorno propicio para la activación neuronal (Dumstrei et al., 2003). La función de la glía envolvente sería similar a la de los oligodendrocitos de mamíferos. Los astrocitos residen en la interfaz de la glía cortical y el neuropilo, pero sus procesos celulares se extienden por el neuropilo donde se ramifican para formar una densa red cercana a las sinapsis que cubre la mayor parte del espacio sináptico del neuropilo (Stork et al., 2014). De esta forma, los astrocitos tienen un papel importante en la remodelación de circuitos neuronales (Truman James W., 1996) y también participan en la limpieza de neurotransmisores desde el espacio sináptico.

Glía Periférica

La glía periférica derivada del SNC envuelve, mantiene y modula el desarrollo y la función de neuronas sensoriales periféricas que contienen axones motores y sensoriales

(Freeman, 2015b; Stork et al., 2012). Los nervios periféricos están cubiertos por GP y GSP (de la glía superficial) y por la glía envolvente, mencionadas anteriormente.

En *Drosophila* no existe la figura de la microglía de mamíferos como tal, con funciones específicas de tipo inmunológico, sino que parece que todas las células gliales son competentes para realizar este tipo de funciones, como por ejemplo la ingestión de restos de neuronas que han sufrido apoptosis o muerte celular durante el desarrollo (Chotard & Salecker, 2007; Edwards & Meinertzhagen, 2010b).

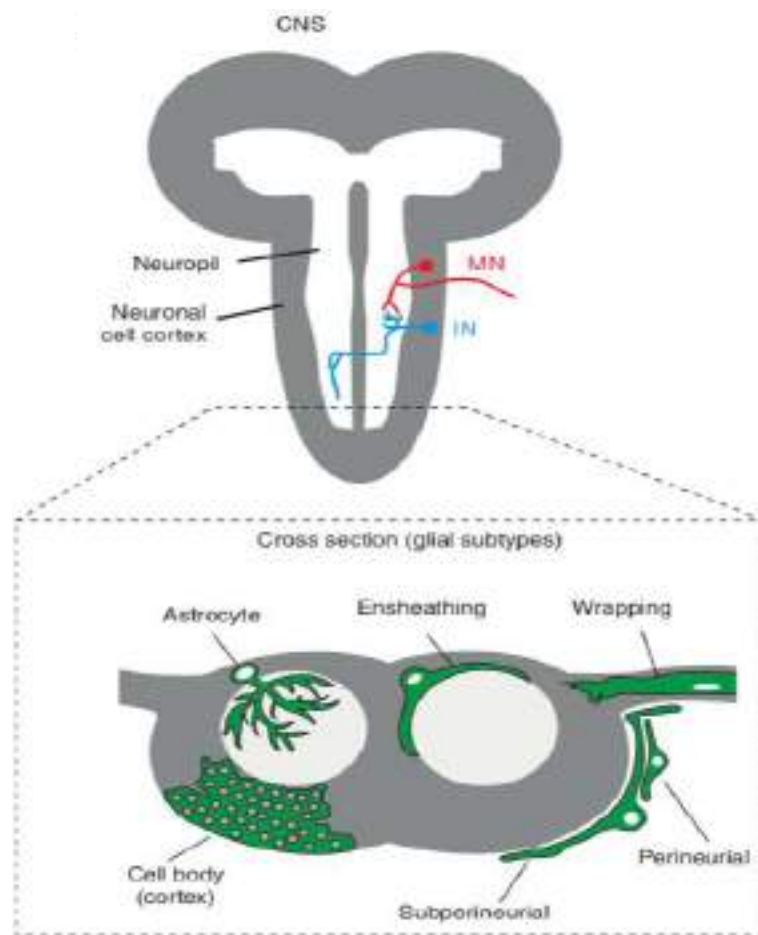


Figura 15. Subtipos, posiciones y morfología de la glía de *Drosophila*. Visión general del sistema nervioso central (SNC) larvario de *Drosophila*. La corteza celular neuronal (gris) alberga todos los cuerpos celulares neuronales y la mayoría de los gliales. Los contactos sinápticos del SNC entre las neuronas se encuentran dentro del neuropilo (blanco). Las interneuronas (IN) (azul) presentan las proyecciones dentro del neuropilo: las motoneuronas (MN) (rojo) extienden los axones hacia el campo muscular periférico. (Abajo) vista transversal de los subtipos gliales (verde). La disposición morfológica en el cerebro adulto es similar. (De Freeman 2012).

3.2 Glía & Neuroblastos

Al final del desarrollo embrionario, las células madre del SNC de *Drosophila*, los NBs, entran en un estado inactivo o de quiescencia a través de factores de transcripción que controlan la identidad temporal (mecanismos intrínsecos), y se reactivan durante el desarrollo larvario (Chell & Brand, 2010b; Jessica S. Britton & Bruce A. Edgar, 1998) (figura16).

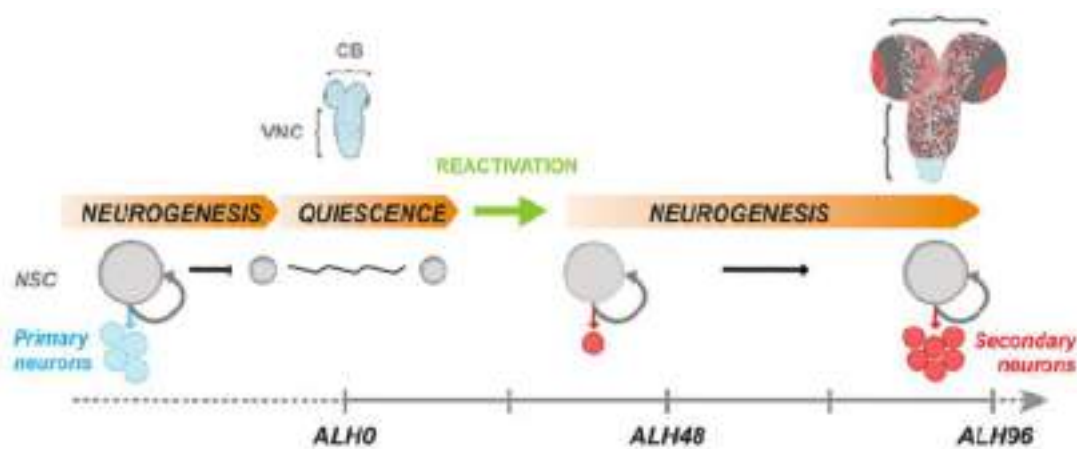


Figura 16. El SNC de *Drosophila* se desarrolla mediante dos oleadas de neurogénesis. Los NBs se dividen asimétricamente durante la embriogénesis para formar el sistema nervioso larvario. A continuación, entran en quiescencia, a partir de la cual se reactivan en los primeros estadios larvarios para generar las neuronas que construyen la mayor parte del sistema nervioso adulto. CB, cerebro central. VNC, cordón nervioso ventral. (Imagen de Pauline Spéder y Andrea H Brand 2018)

Esta transición quiescencia-proliferación del estado de los NBs está fisiológicamente acoplada al crecimiento y al desarrollo de las larvas a través de estímulos nutricionales proporcionados por nichos locales formados por células gliales, en estrecho contacto con los NBs (Tomoatsu Ikeya et al., 2002) (figura 17). Por lo tanto, la glía es fundamental para la reactivación de los NBs. En este proceso de reactivación de los NBs, el cuerpo graso de *Drosophila* (similar funcionalmente al hígado de mamíferos) actúa como sensor de aminoácidos esenciales que provienen de la dieta de las larvas. A través del

transportador catiónico de aminoácidos Slimfast (Slif), el cuerpo graso activa la vía de señalización TOR que desencadena la producción del factor de crecimiento FDS (fat-body derived signals); el FDS induce, a su vez, la secreción local de péptidos similares a la insulina (dILP) por la glía superficial y cortical cercana a los NBs inactivos. Estos dILP se unen a sus receptores de insulina (dInR), que están presentes y muy enriquecidos en los NBs, activando la vía PI3K/Akt responsable del crecimiento, la reactivación y reentrada en el ciclo celular de los NBs en respuesta a los estímulos nutricionales (Sousa-Nunes et al., 2011b). Los componentes de señalización de insulina/ PI3K/TOR están altamente conservados entre insectos y vertebrados.

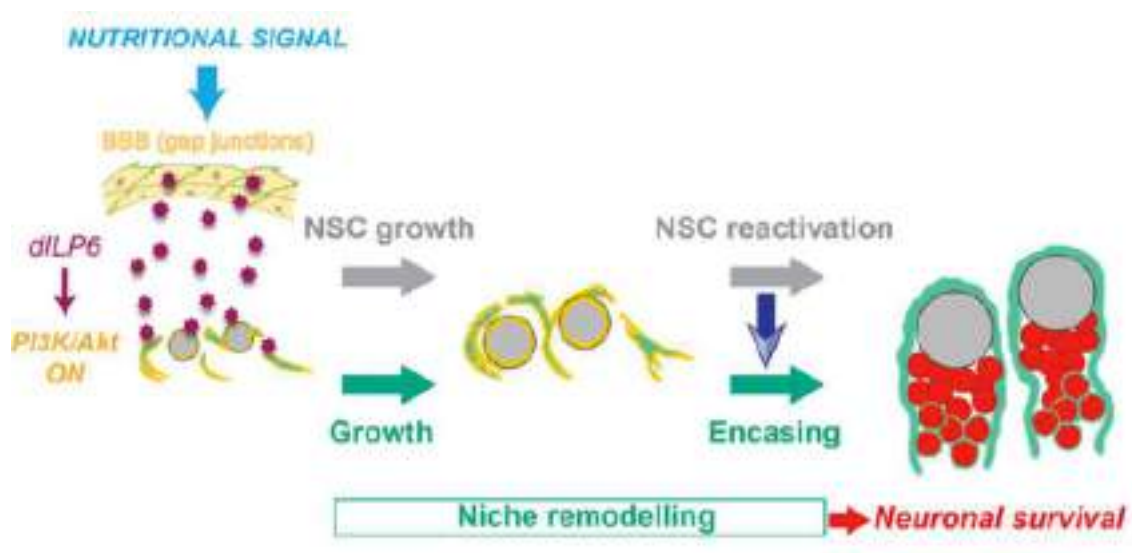


Figura 17. Modelo del desarrollo de la glía cortical durante la etapa larvaria de *Drosophila*. La glía cortical envuelve individualmente cada NB y su progenie organizando los linajes dentro de cámaras. Dicha glía favorece el desarrollo de los linajes y les aporta señales nutricionales, promoviendo también la supervivencia de las neuronas recién nacidas dentro de los linajes. (Imagen de Pauline Spéder y Andrea H Brand 2018)

Este es un claro ejemplo de como el nicho influye en el comportamiento de los NBs. La glía cortical envuelve individualmente cada NB y su progenie, separando y organizando los linajes dentro de una cámara que se forma durante el desarrollo larvario en un proceso que consta de tres fases: expansión, encapsulamiento y extensión (Speder & Brand, n.d.)

(figura 18). La evolución de la formación y morfología de estas cámaras es paralela a la reactivación de los NBs, adaptándose así a las necesidades de los NBs. Por ejemplo, en la primera etapa de la reactivación, la ausencia de las cámaras permite que los dILPs lleguen a los NBs, desencadenando la reactivación del ciclo celular. La formación de las cámaras de glía cortical alrededor de los linajes de NBs dependen pues de un estímulo sistémico externo, la nutrición. Además, la glía cortical protege a los NBs del estrés oxidativo y la restricción nutricional durante las etapas larvarias tardías. Pero esta asociación es de doble sentido ya que la glía cortical es capaz de integrar las señales nutricionales externas y señales derivadas del comportamiento de los NBs, remodelando su estructura para que el nicho se adapte a sus necesidades.

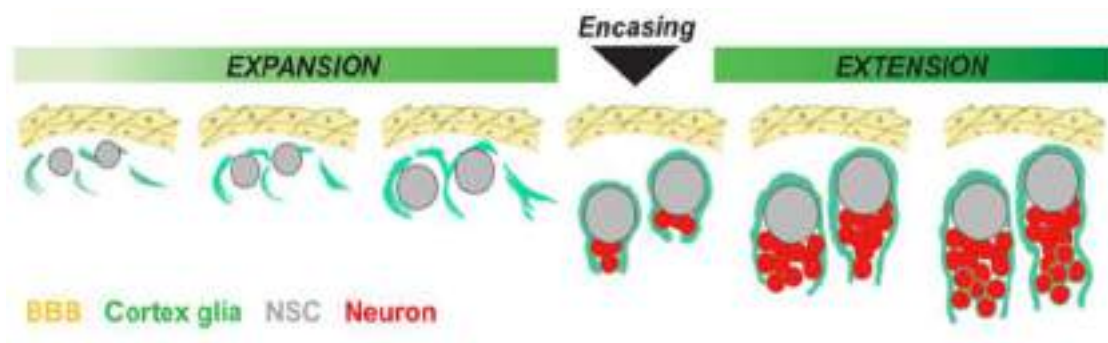


Figura 18. Etapas del desarrollo de la formación de las cámaras de la glía cortical en el cerebro larvario de *Drosophila*. El proceso está dividido en tres fases: expansión, encapsulamiento y extensión. Durante la expansión las membranas de la glía cortical se expanden, en la segunda etapa, encapsulamiento, las membranas envuelven completamente cada linaje de los NBs y en la fase de extensión la glía cortical se adapta a los linajes manteniendo la organización de las cámaras. (Imagen de Pauline Spéder y Andrea H Brand 2018)

4. Señales de guía axonal

Las señales de la guía axonal se caracterizaron originalmente en el SN como proteínas encargadas de controlar el crecimiento y la migración de los axones para alcanzar e inervar a sus células diana durante el desarrollo. Estudios posteriores demostraron que las señales de guía axonal también actúan durante el desarrollo de una gran variedad de

tejidos y órganos fuera del SN, así como en adultos durante la reparación de heridas, las respuestas inmunitarias y la regeneración de tejidos (Friedl & Gilmour, 2009; Jin et al., 2008; Laird et al., 2008). Estas señales influyen en muchas decisiones de polaridad celular, como la orientación del huso mitótico durante la división simétrica en células epiteliales o el establecimiento de la polaridad apicobasal en epitelios mediante la unión a moléculas receptoras específicas.

Las neuronas crecen a partir de estructuras especializadas denominadas conos de crecimiento donde expresan moléculas receptoras específicas que detectan las señales de guía axonal ambientales, dirigiendo así su formación, movimiento y orientación (Friedl & Gilmour, 2009; Sink & Whittington, 1991). La regulación de la expresión de los receptores depende de cambios en la transcripción y en la traducción, así como de interacciones con otras proteínas. La unión señal-receptor genera la activación de cascadas de señalización intracelular a través de la interacción directa o indirecta con proteínas efectoras (por ejemplo, RhoGTPasas) que organizan la respuesta de la célula regulando la estructura y la dinámica del citoesqueleto de actina (Carrier, 1991; Dent & Gertler, 2003; Gungabissoon & Bamberg, 2003; van Pelt et al., n.d.). Los cambios localizados en el citoesqueleto de actina dentro del cono de crecimiento representan la principal fuerza impulsora en la elongación del axón. Dichas vías de señalización intracelulares están bastante conservadas entre diferentes especies, incluidos humanos.

Las familias de proteínas de guía axonal Slit [Slit], Netrin [Ntn]/Netrinas, Semaphorin [Sema]/Semaforinas y Ephrin [Efn]/Efrinas, se han clasificado originalmente en función de su rango y modo de actuación, ya que pueden actuar como señales atractivas o repulsivas, a corto alcance (a través de la unión directa a su receptor) o largo alcance

(secretadas). Así, se distinguirían: 1) Repelentes de corto alcance como Efn y algunos tipos de la familia Sema, ancladas a la membrana por un dominio transmembrana único (Sema 1, Sema 4, Sema 5, Sema 6) o ligadas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Sema 7), 2) repelentes de largo alcance, como Slit y Sema (Semas 2 y Sema 3), y 3) señales bifuncionales, de atracción y repulsión, de largo alcance, como la familia Ntn. A continuación, se resumen las características de estas cuatro familias de señales de guía axonal, así como de sus respectivos receptores.

Slit/Roundabout (Robo)

Las glicoproteínas Slit constituyen una familia de señales de orientación que se secretan y fueron identificadas por primera vez en *Drosophila* (Rothberg et al., 1988), donde sólo hay un gen frente a los tres homólogos: Slit1, Slit2 y Slit3, presentes en mamíferos (Brose et al., 1999; Marillat et al., 2002). Las glicoproteínas Slit contienen varios motivos proteicos: repeticiones ricas en leucina (LRR), repeticiones tipo EGF y un dominio G de laminina (Rothberg et al., 1990) (figura 19). Slit señala a través de la unión a su receptor canónico Robo, aunque también puede unirse a otros receptores, lo cual permite regular la capacidad de respuesta de los axones comisurales a Slit.

Las proteínas transmembrana Robo son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs). Cada receptor Robo presenta una estructura parecida que consta de cinco dominios similares a las inmunoglobulinas (Igs), tres repeticiones de fibronectina tipo III (FN3), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con hasta cuatro motivos conservados (CC0-3) (Thomas Kidd et al., 1998) (figura 19). En *Drosophila* hay 3 genes *robo* (*robo1*, *robo2* y *robo3*) que son homólogos a los de vertebrados donde hay 4 (Robo1, Robo2, Robo3 y Robo4) (Hohenester, 2008).

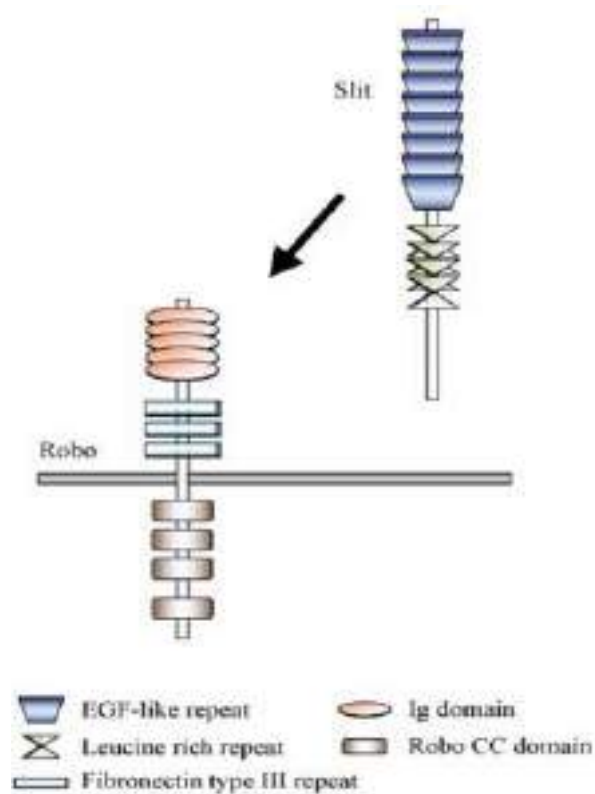


Figura 19. Dominios estructurales de Slit y de su receptor Robo.

Slit contiene varios motivos proteicos: repeticiones ricas en leucina, repeticiones EFG y un dominio G de laminina. Robo contiene cinco repeticiones tipo Ig seguidas de tres repeticiones tipo III de fibronectina, un dominio transmembrana y hasta 4 dominios conservados (CC0-3). (Imagen de Pláchez y Richards 2005).

La principal función de la señalización Slit/Robo, y la primera que fue descrita, es la repulsión de los axones en la línea media del SNC, previniendo el cruce longitudinal de estos. Además, durante los últimos años se ha demostrado que la señalización Slit/Robo participa en la regulación de los procesos relacionados con la organogénesis (de corazón, pulmón, gónadas y ovarios) y también en procesos de angiogénesis. Asimismo, fallos en dicha señalización se han relacionado estrechamente con distintas afecciones patológicas humanas, como el cáncer de pulmón, de mama, angiogénesis tumoral, dislexia y la inflamación (Blockus & Chédotal, 2016).

Netrinas (Ntn)/Frazzled (Fra)

Las Netrinas constituyen una pequeña familia de moléculas secretadas, relacionadas estructuralmente con la laminina, que actúan sobre las células neurales a través de sus receptores transmembrana Frazzled (Fra)/Deleted in Colorectal Cancer (DCC) y UNC-5

(Bányai & Patthy, 1999; Serafini et al., 1994), con funciones duales en la guía del axón, bien como quimioatrayentes o como quimiorrepelentes, dependientes del contexto (figura 20). *Drosophila* presenta dos genes de Netrinas (*NetA* y *NetB*) que se expresan en la línea media e inducen atracción y el cruce de la línea media de los axones a través de la unión a su receptor Fra, y repulsión a través del receptor Unc-5 (R. Harris & Sabatelli, 1996; Mitchell et al., 1996). Las Netrinas no solo están involucradas en la guía o desarrollo de los axones, sino que también juegan un papel central en la migración de neuronas, actúan como factores de crecimiento y son precursores de oligodendrocitos gliales y células mesodérmicas durante la embriogénesis, entre otras funciones (3-Netrin 1 Acts as an Attractive or as a Repulsive Cue for Distinct Migrating Neurons during the Development of the Cerebellar System, n.d.; Bloch-Gallego et al., 1999; Hamasaki et al., 2001; Lim & Wadsworth, 2002). En mamíferos se han identificado Netrin1, Netrin3 y Netrin 4, que son secretadas, y Netrin-G1 y Netrin-G2 que también se secretan, pero se quedan ancladas a la membrana. Estudios recientes han vinculado el papel de las Netrinas con la muerte y el crecimiento de los tejidos, actuando como reguladoras de la apoptosis y pudiendo ser la vía por la que p53 regula el ciclo celular (Arakawa, 2005). Asimismo, se ha demostrado que la Netrin1 se sobreexpresa en varios cánceres humanos, pudiendo utilizarse como biomarcador (Kefeli et al., 2017).

En *Drosophila*, el receptor transmembrana Fra es el homólogo del receptor implicado en el cáncer colorectal (DCC) en humanos. Fra media la señalización atractiva hacia la línea media junto con las Netrinas, y también está involucrado en la morfogénesis y proyección de neuronas (Akin & Lawrence Zipursky, 2016; Kolodziej et al., n.d.). Se expresa en el cono de crecimiento axonal, dendritas y en el cuerpo celular neuronal. Fra también funciona como un activador transcripcional; a través de su proteólisis, activada por la

unión de un ligando específico, libera su dominio intracelular (ICD) que se mueve al núcleo y activa la transcripción de genes que promueven el cruce de la línea media (Neuhaus-Follini & Bashaw, 2015). En vertebrados, DCC también puede regular la transcripción a través de la localización nuclear de su ICD. DCC se descubrió por primera vez en el estudio del cáncer colorrectal en 1990, y desde entonces se ha estudiado como posible gen supresor de tumores (Vanzomeren-Dohm et al., 2011). Además, en ausencia de Netrin1, DCC se ha demostrado que puede inducir muerte celular en células epiteliales.

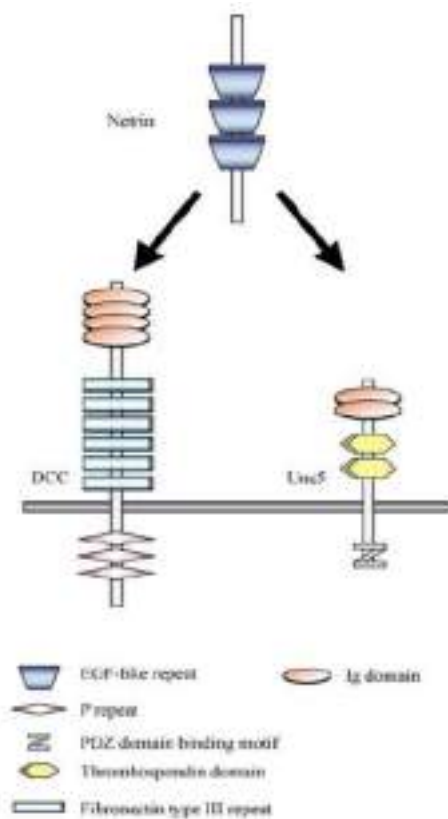


Figura 20. Dominios estructurales de Netrin y de sus receptores DCC y Unc5.

Netrin contiene un dominio similar a la laminina, tres repeticiones EGF y el dominio C-terminal.

DCC contiene cuatro dominios de inmunoglobulina (Ig 1-4), seis dominios de fibronectina tipo III (FN1 - FN6), un dominio transmembrana y tres motivos P (P1 - P3).

Unc5 presenta dos dominios de inmunoglobulina (Ig1 - Ig2), dos dominios de repetición de trombospondina y un motivo de unión a dominios PDZ. (Imagen de Pláchez y Richards 2005).

Semaforinas (Semas), Neuropilinas (Npn) y Plexinas (Plexins)

La familia de las Semas se identificó originalmente en invertebrados como moléculas de guía axonal en el cono de crecimiento (Matthes et al., 1992). La familia de Semas contiene proteínas tanto secretadas como transmembrana, y se dividen en ocho clases (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y V) (Kuwada et al., 1999) (figura 21). Las Semas actúan principalmente como

señales inhibitorias de corto alcance (transmembrana) durante el desarrollo (de Wit & Verhaagen, 2003). Las dos principales familias de proteínas que actúan como receptores de las Semas, y por lo tanto están involucradas en la mediación de las respuestas, son las Plexinas (Plexin A1–4, Plexin B1–3, Plexin C1 y Plexin D1) y la Neuropilinas (Npn1 y Npn2) (Fujisawa & Kitsukawat, 1998). Los cuatro miembros de la subfamilia Plexin-A de receptores pueden también funcionar como transductores de señales.

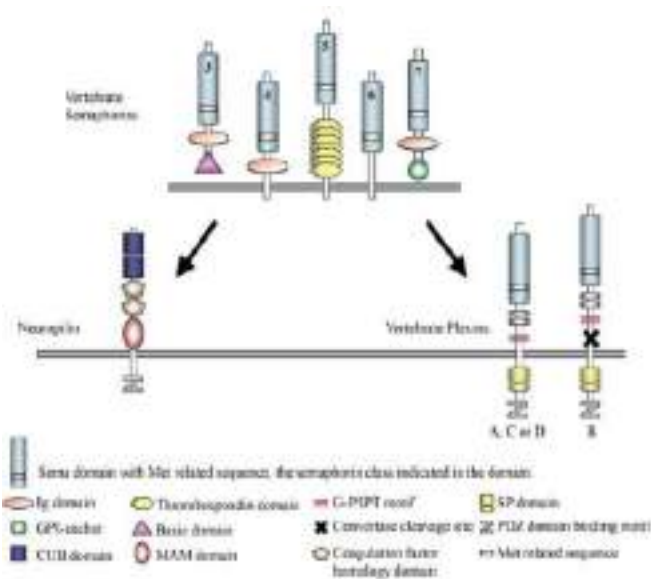


Figura 21. Dominios estructurales de Semaforinas, Neuropilinas y Plexinas. (Imagen de Pláchez y Richards 2005).

Efrinas / Eph

El sistema Efrina-Eph regula una gran variedad de procesos biológicos durante el desarrollo embrionario que dependen de la remodelación del citoesqueleto; por ejemplo, la guía de los conos de crecimiento del axón, la formación de límites o bordes de tejido y la migración. Tanto los ligandos (Efrinas) como los receptores (Eph) son proteínas transmembrana (figura 22), por lo que la interacción de ambos y la activación de las vías de señalización intracelular ocurren a través de interacciones directas célula-célula (Klein, 2012). Además, se ha identificado que esta señalización desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de varios procesos durante la edad adulta, incluida la

diferenciación de células madre y la angiogénesis en condiciones fisiológicas y patológicas (Kuijper et al., 2007). En distintos cánceres humanos (mama, colon e hígado) se han detectado altos niveles de Efrinas y de Eph; curiosamente, bajos niveles de Efrinas y Eph también pueden contribuir a tumorigénesis en diferentes contextos celulares (Merlos-Suárez & Batlle, 2008).

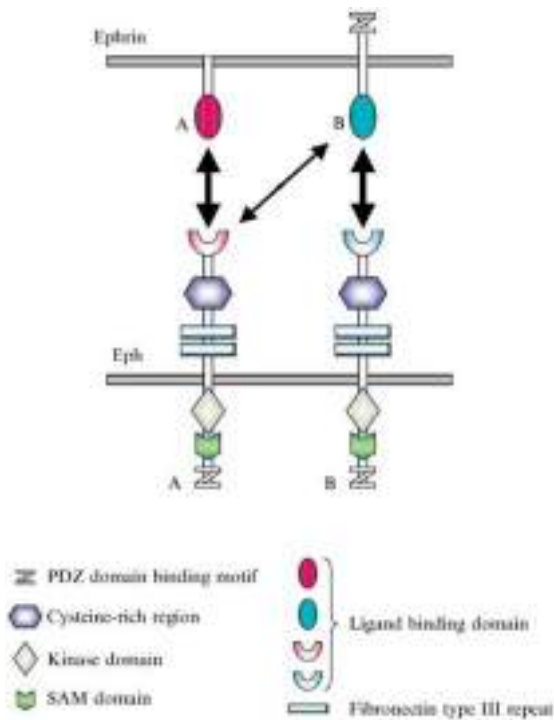


Figura 22. Dominios estructurales de Efrinas y Eph. (Imagen de Pláchez y Richards 2005).

5. DCA y Cáncer

Además de la relevancia de la DCA en el campo de la biología del desarrollo y en el de la biología de las células madre, han emergido importantes y estrechas conexiones entre fallos en la DCA de células madres y el cáncer. Los NBs de *Drosophila* han sido utilizados en distintos estudios como sistema modelo en la transición de una célula madre normal a una célula madre tumoral (Homem & Knoblich, 2012b). Dichos estudios han demostrado cómo defectos genéticos o epigenéticos que alteran los complejos o

mecanismos que regulan la DCA, generan poblaciones altamente proliferativas de NBs tumorales con capacidad limitada para diferenciarse, y que finalmente pueden dar lugar a un crecimiento neoplásico (figura 23). Por ejemplo, mutaciones en genes que codifican los determinantes del destino celular, Pros, Numb y Brat (Betschinger et al., 2006; Bowman et al., 2008), así como en el que codifica la proteína adaptadora Mira, producen sobreproliferación debido a fallos en el proceso de DCA.

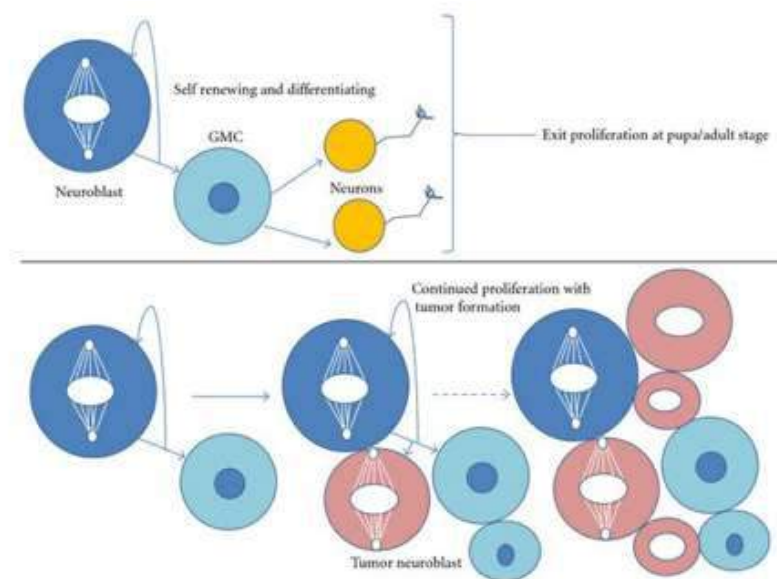


Figura 23. Proliferación anormal de NBs y formación de tumores cerebrales.

Los NBs de *Drosophila* se dividen asimétricamente en un proceso altamente regulado. Al eliminar los determinantes del destino celular en los NBs larvarios del cerebro central se altera el equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación, produciéndose NBs tumorales que proliferan de forma indefinida generando tumores cerebrales. (Imagen de Saini y Reichert 2012)

Los NBs de tipo II son mucho más susceptibles de generar procesos tumorales cuando la DCA falla. Ello es debido a que sus linajes comprenden dos tipos de células con identidad de célula madre o capacidad de autorrenovación, los NBs y los INP, pudiendo ser así mucho más agresivo el crecimiento. Por consiguiente, el estudio o investigación de los

eventos moleculares que conectan los fallos en la DCA con la inmortalización celular podría ser de gran relevancia clínica en humanos. Dichos eventos podrían ser parte de los mecanismos que convierten una célula madre de mamífero normal en una célula madre cancerosa y, así, contribuir a la comprensión del proceso y al establecimiento de nuevas terapias frente al cáncer.

Como se ha descrito anteriormente, los NBs se dividen asimétricamente a través de mecanismos exclusivamente intrínsecos o autónomos y estos han sido ampliamente estudiados y caracterizados. No se conocen ni han sido descritos mecanismos extrínsecos o no autónomos que puedan estar involucrados en este proceso. También se sabía, como se ha explicado, que los NBs larvarios están estrechamente relacionados con la glía cortical que los envuelve, la cual actúa como nicho en distintos contextos nutricionales (figura 24). Con todo, resultaba sugerente que la glía cortical pudiera funcionar también como una potencial fuente de señales durante el proceso de DCA de los NBs larvarios de *Drosophila*.

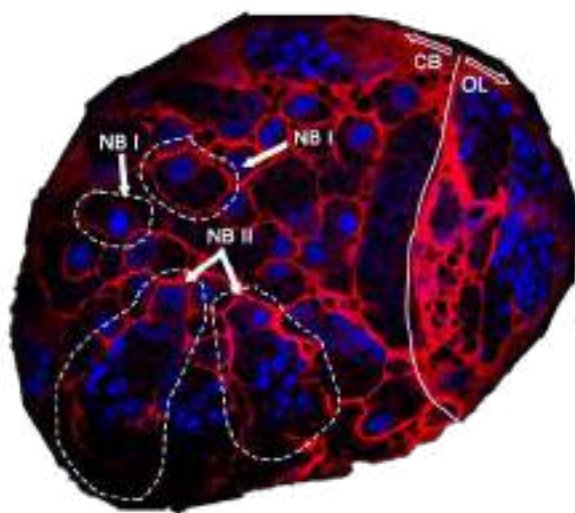


Figura 24. La glía cortical envuelve a los linajes de NBs en el cerebro central larvario de *Drosophila*.

Imagen confocal de un hemisferio cerebral larvario de *Drosophila* en donde se observa la glía cortical (en rojo) rodeando a los linajes de NBs de tipo I y de tipo II (en azul el NB del clon; en los linajes de NBs de tipo II también aparecen marcados en azul los INPs). CB: Central Brain (cerebro central); OL : Optic Lobe (lóbulo óptico).

Además, durante los últimos años, distintos estudios han demostrado el papel de diferentes moléculas de la guía axonal en la regulación del proceso de DCA de células madre:

-La señalización Slit/Robo promueve en el embrión de *Drosophila*, en un linaje específico de un NB (el NB4-2), la división terminal asimétrica de la GMC-1, generando dos neuronas diferentes, RP2 y RP2sib, durante la embriogénesis (Brijesh Mehta & Krishna Moorthi Bhat, 2001) (figura 25).

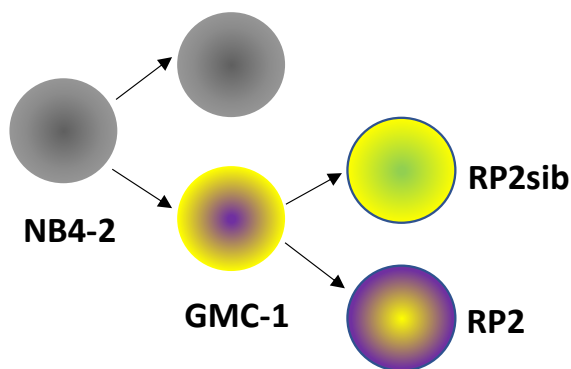


Figura 25. La señalización Slit/Robo promueve la división terminal asimétrica en un linaje específico del embrión de *Drosophila* generando dos células hijas distintas, las neuronas RP2 y RP2sib ("sibling").

- En el embrión de ascidia, la célula madre previa polarización, genera una notocorda y un precursor neural y esta DCA está regulada directamente por la señalización Efrin/Eph que polarizan funcionalmente a la célula madre (Picco et al., 2007)

- En el laboratorio demostramos previamente que el regulador de DCA Cno, está formando un complejo con Robo durante el proceso de guía axonal, lo que nos llevó a hipotetizar que Robo podría estar, a su vez, actuando en el contexto del proceso de DCA junto con Cno (Slováková et al., 2012).

- Por último, y como se ha comentado, distintas moléculas de la guía axonal se han visto implicadas en la formación de tumores. Debido a la conexión entre fallos en DCA y el proceso de tumorigénesis, una posibilidad era que el efecto tumorigénico de dichas moléculas fuera consecuencia parcial de su implicación en la regulación de la DCA (Arakawa, 2004; Duman-Scheel, 2012; Neufeld et al., 2016).

Con todo, el objetivo principal que nos planteamos en esta tesis doctoral fue dilucidar el posible papel regulador extrínseco que podían desempeñar las moléculas de guía axonal en la regulación de la DCA de los NBs larvarios de *Drosophila*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sistema GAL4/UAS

El sistema GAL4 es un método versátil para la manipulación y el análisis de la expresión ectópica de genes, tanto espacial como temporal, que permite la activación selectiva de cualquier gen clonado en una amplia variedad de patrones específicos de tejidos y células.

Consta de dos componentes: el gen *gal4*, que codifica la proteína activadora de la transcripción de levadura GAL4, y la secuencia UAS (secuencia de activación ascendente/ aguas arriba), que es el potenciador al que se une específicamente. Una ventaja clave del sistema es la separación de la proteína GAL4 de su gen diana en distintas líneas transgénicas, lo que garantiza que el gen diana permanece en silencio hasta la introducción de GAL4.

En *Drosophila*, la expresión de GAL4 está bajo el control de un promotor específico y el gen de interés está bajo el control de *UAS*. Cuando una línea conductora de GAL4 se cruza con una línea con el gen diana bajo el control de la *UAS*, la progenie expresa el gen de interés solo en las células en las que está presente GAL4. Los potenciadores ubicuos o específicos de tejido estimulan la expresión de GAL4 que se une a su secuencia *UAS* y activa la expresión del gen de interés.

El sistema GAL4 se ha adaptado para muchos usos experimentales: casetes de interferencia de *ARN* (siglas en inglés RNAi) para bloquear la expresión (eliminación de genes por RNAi), para expresar formas alteradas de proteínas (mutantes dominantes negativos), el etiquetado de células, la sobreexpresión o expresión ectópica de genes de interés y el análisis de interacciones proteína-ADN en todo el genoma. Asimismo, la

expresión de proteínas indicadoras (por ejemplo, la proteína fluorescente verde GFP) permite la visualización de la estructura y función celular en localizaciones específicas siempre determinadas por la línea GAL4 empleada. Además, existen muchas herramientas y métodos alternativos para refinar aún más los patrones de expresión temporal y espacial logrados con el sistema GAL4, como la conducción de la expresión de un gen dado con un promotor de choque térmico (control temporal) o con un promotor endógeno clonado (control espacial).

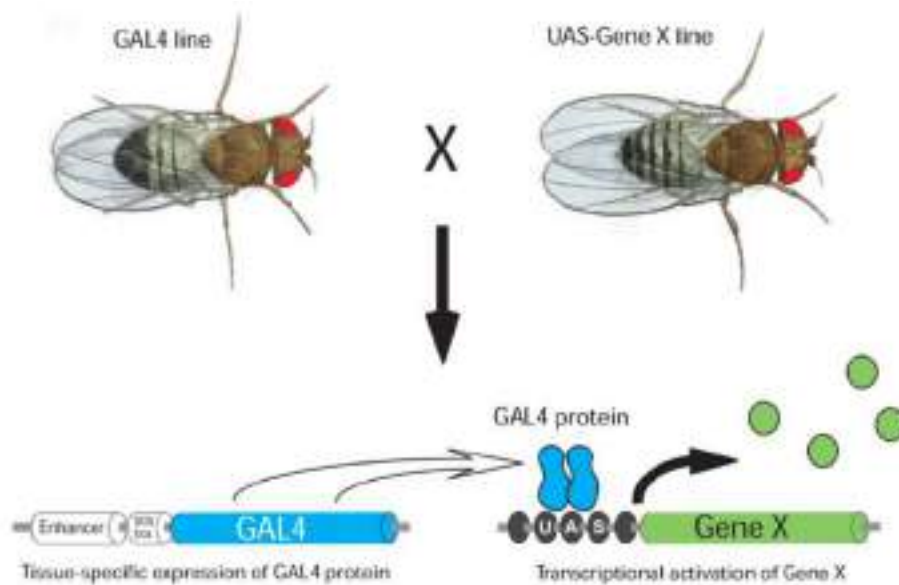


Figura 26. Sistema *UAS-GAL4*. El cruce de una mosca que expresa GAL4 bajo el control de un promotor específico endógeno con una mosca portadora del gen de interés que está bajo el control de *UAS* da lugar a la expresión del gen de interés en la progenie del cruce. En ausencia del GAL4 no hay expresión del gen que está bajo el control del *UAS*. (Imagen tomada y adaptada (Brand & Perrimon, 1993))

2. Generación de clones con el sistema FLP/FRT

La recombinación mitótica mediada por el sistema FLP/FRT utiliza la recombinasa de levaduras "Flippase" (FLP) y las secuencias que dicha recombinasa reconoce, las "FLP recombinase target" (FRT) para generar clones de células hijas homocigóticas a partir de precursores heterocigóticos. El uso de promotores específicos como el de choque térmico

que dirigen la expresión de la recombinasa FLP permite además el control temporal de la inducción de clones en distintas etapas del desarrollo. El análisis de clones mitóticos proporciona información detallada de linajes celulares particulares, de los requisitos genéticos para su desarrollo, así como también permite el análisis funcional de genes que desempeñan múltiples funciones en diferentes lugares y momentos a lo largo del desarrollo. Desde su implantación, esta técnica ha constituido una poderosa herramienta para el análisis genético en *Drosophila melanogaster*. Para la caracterización de los clones generados en este trabajo hemos usado como marcador inverso GFP, resultando así el tejido mutante GFP negativo y el tejido circundante heterocigoto GFP positivo (figura 27).

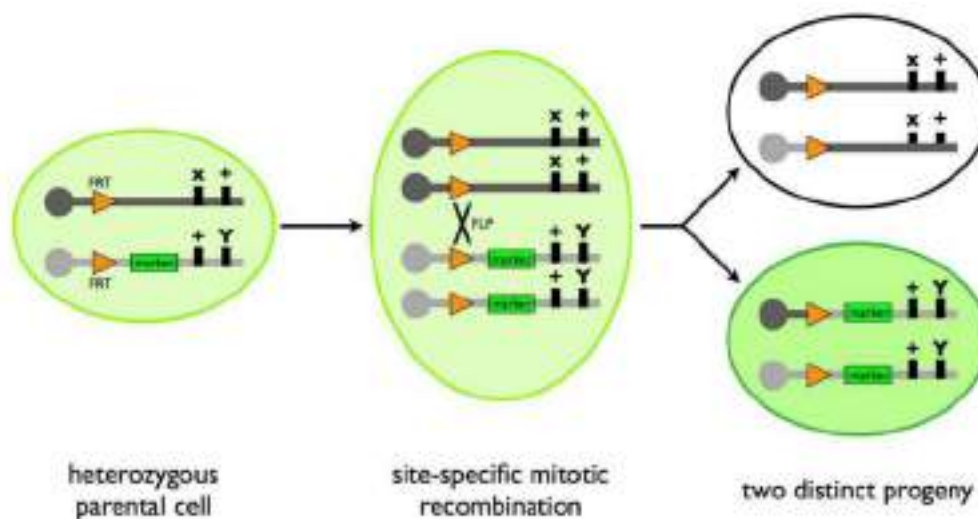


Figura 27. Esquema representativo de la generación de clones con el sistema FLP/FRT. Una célula parental heterocigótica puede dar lugar a dos células hijas distintas, homocigóticas para diferentes alelos de genes y transgenes que residen distalmente al sitio de recombinación mitótica (triángulos naranjas: FRTs; la recombinación entre FRTs requiere FLP). Las células hijas homocigotas resultantes y su descendencia pueden distinguirse de las células heterocigotas circundantes en función del número de copias del transgén marcador (GFP, en verde).

Generación de clones

Los cruces y la puesta de huevos se realizaron a 25C° durante 6 horas. Transcurrido este tiempo las moscas adultas se sacaron de las placas de puestas dejando los huevos con

alimento estándar más levadura donde se desarrollaron durante 48 horas (embriogénesis, y estadios larvarios L1 e inicio de L2). Después de estas 48 horas se indujo un choque térmico de 2 horas a 37C°. Tras el choque térmico, las larvas se pusieron a 25C° para que se desarrollaran durante 72 horas más donde las larvas entraban y finalizaban su última etapa de desarrollo larvario (L3). En este estadio L3 tardío las larvas fueron diseccionadas y fijadas siguiendo el protocolo que se detalla a continuación.

3. Cepas de *Drosophila* y genética

Las cepas de mosca utilizadas proceden de Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC), Kyoto Stock Center y Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC), a menos que se indique lo contrario: *hs-FLP*; *Akap200NP2222-Gal4* (Kyoto: 112830); *Dll-Gal4 UAS-CD8::GFP* (BDSC: 64307); *GMR36G09-Gal4* (BDSC: 49941); *UAS-CD8::GFP* (BDSC: 5137); *cno::GFP*; *repo-Gal4* (BDSC: 7415); *slit-Gal4* (BDSC: 9580); *UAS-robo1^{RNAi}* (VDRC: 42241); *UAS-slit^{RNAi}* (VDRC#20210); *UAS-CD2* (BDSC: 1373); FRTG13 *fra³* (BDSC: 8813); FRTG13 *ubi-GFP* (BDSC: 5826); FRT G13 (BDSC: 1956); FRTG13 *robo1* (realizadas en este trabajo); FRTG13 *fra³ robo1* (realizadas en este trabajo); *UAS-NetA^{RNAi}* (VDRC: 330207); *UAS-NetB^{RNAi}* (BDSC: 34698); *UAS-fra^{RNAi}* (VDRC: 6557 y 29910); *wor-Gal4 ase-Gal80*; *wor-Gal4* (BDSC: 56553); *Abl::GFP* (BDSC: 59761); *UAS-Abl^{RNAi}* (VDRC: 110186); *UAS-AblK^{417N(KD)}* (BDSC: 8566); *UAS-robo1::Myc* (procedente de G. Bashaw); *UAS-Abl::Myc* (BDSC: 65264); *UAS-Rac1^{N17}* (BDSC: 6292); *UAS-Rac1^{L89}* (BDSC: 6290); *UAS-RhoGAP93B* (BDSC: 19720); *UAS-Dock^{RNAi}* (BDSC: 27728); *UAS-Pak^{RNAi}* (BDSC: 41714); *UAS-Sos^{RNAi}* (VDRC: 106925); *UAS-Cdc42^{N17}* (BDSC: 6288); *UAS-robo2^{RNAi}* (BDSC: 27317 y 9286); *UAS-Rac1^{V12}* (BDSC: 6291); *UAS-Cdc42^{V12}* (BDSC: 4854).

4. Histología, inmunofluorescencia y microscopía

Los cerebros de las larvas se diseccionaron en PBS y se fijaron con PFA al 4% en PBT (PBS y Tritón X-100 al 0,1%) durante 20 minutos a temperatura ambiente con una suave agitación. Los cerebros fijados se lavaron 3 veces durante 15 minutos con PBT (PBS y Triton X-100 0,3%) y luego se incubaron en PBT-BSA durante al menos 1h antes de la incubación con el/los anticuerpos primarios correspondientes. En este estudio se han utilizado los siguientes anticuerpos primarios: cobaya anti-Dpn (1:2.000; 97), ratón anti-Robo1 (1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB]), pollo anti GFP (1:3.000; Aves Labs), ratón anti-Slit (1:10; DSHB), ratón anti-CD2 (1:50; Bio-Rad), conejo anti-Fra (1:200; de M. J. Murray), conejo anti-Ase (1:100), conejo anti-Abl (1:1.000; de E. Giniger), conejo anti PKC (1:100; Santa Cruz Biotechnology, sc-216), conejo anti-Insc (1:1.000; de J. Knoblich), cabra anti-Numb (1:200; Santa Cruz Biotechnology, sc-23579), conejo anti-Brat (1:200; de J. Knoblich), conejo anti-Mira (1:1.000; de F. Matsuzaki), conejo/ratón anti-PH3 (Rb1:1.000-1:2.000; Millipore, 06-570/05-806), ratón anti-Tub (1:200; Sigma-Aldrich, T5326), conejo anti Par-6 (1:1.000, de A. Wodarz). Los anticuerpos secundarios conjugados con colorantes fluorescentes se obtuvieron de Molecular Probes y se utilizaron a una dilución de 1:200-1:400. Las muestras se montaron en medio de montaje VECTASHIELD para fluorescencia.

Las imágenes de fluorescencia para la Figura 1, con la excepción de la Figura 1D, se registraron utilizando un microscopio confocal de barrido láser invertido Leica TCS SP2 (Leica). Las imágenes de fluorescencia para el resto de las figuras (incluyendo la Figura 1D) se registraron utilizando un microscopio confocal invertido de superresolución Zeiss LSM 880-Airyscan Elyra PS.1

5. Cuantificación y análisis estadístico

Para el análisis estadístico, los datos se analizaron primero mediante la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si la muestra seguía una distribución normal. Los datos que no seguían una distribución normal se analizaron con una prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas. Se utilizó un programa informático R para representar los diagramas de dispersión, en el que las líneas centrales de las cajas muestran la mediana, la "cruz" representa la media y los límites de las cajas indican los cuartiles inferior y superior. Los datos relacionados con los fallos de localización del regulador ACD se analizaron con una prueba de Chi-cuadrado. La prueba específica utilizada, el tamaño de la muestra (n), la DE de la población y el valor P se indican en la leyenda de cada figura; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$; ns, no significativo.

RESULTADOS

1. Las señales de guía axonal Slit, NetA, Sema1a, Sema2a se expresan en la glía cortical que rodea los linajes de NBs y los receptores Robo1, Fra, PlexinA y PlexinB dentro del linaje de NBs.

Como se describió anteriormente, los linajes de NBs están rodeados por glía cortical que, entre otras funciones, les dan soporte, protección y les aportan nutrientes y señales tróficas. Por lo tanto, hipotetizamos que dicha glía podría actuar como nicho de señales que regularan la DCA de los NBs. Por ello, en primer lugar, analizamos en detalle el patrón de expresión de las señales y receptores de guía axonal Slit- Roundabout (Robo1), Netrinas (Net)-Frazzled (Fra), Semaforinas (Semas)-Plexinas (Plexin) y Efrinas (Efn)-Eph en los linajes de NBs y en la glía cortical circundante. Nos centramos en los NBs de tipo II para este análisis, linajes que, como se ha mencionado previamente, son más susceptibles de formar tumores debido a que presentan un paso adicional de amplificación (neurogénesis indirecta). Para marcar los linajes de NBs de tipo II de forma específica usamos las líneas *Distal-less (Dll)-Gal4 UAS-CD8::GFP* y *worniu (wor)-Gal4 asense (ase)-Gal80; UAS-CD8::GFP* que expresan GFP en la membrana de todas las células de los linajes de NBs de tipo II. Para visualizar la glía se utilizaron las líneas *Gal4* específicas de glía *UAS-DC8::GFP;repo-Gal4* y *cortex glia-Gal4;UAS-CD8::GFP* que inducen la expresión de GFP en la membrana de todas las células de la glía (*repo-Gal4*) o en las de la glía cortical exclusivamente (*cortex glia-Gal4*). Asimismo, para analizar el patrón de las moléculas de guía axonal y sus receptores, usamos anticuerpos (Acs) específicos en todos los casos excepto para detectar las Netrinas, en cuyo caso usamos una línea de moscas transgénicas en las que NetA está endógenamente marcada con GFP (NetA::GFP), dado que no había Acs disponibles. Se observó que, en el caso de Slit/Robo1, Slit se expresaba en la glía cortical que envuelve al clon y Robo1 en la

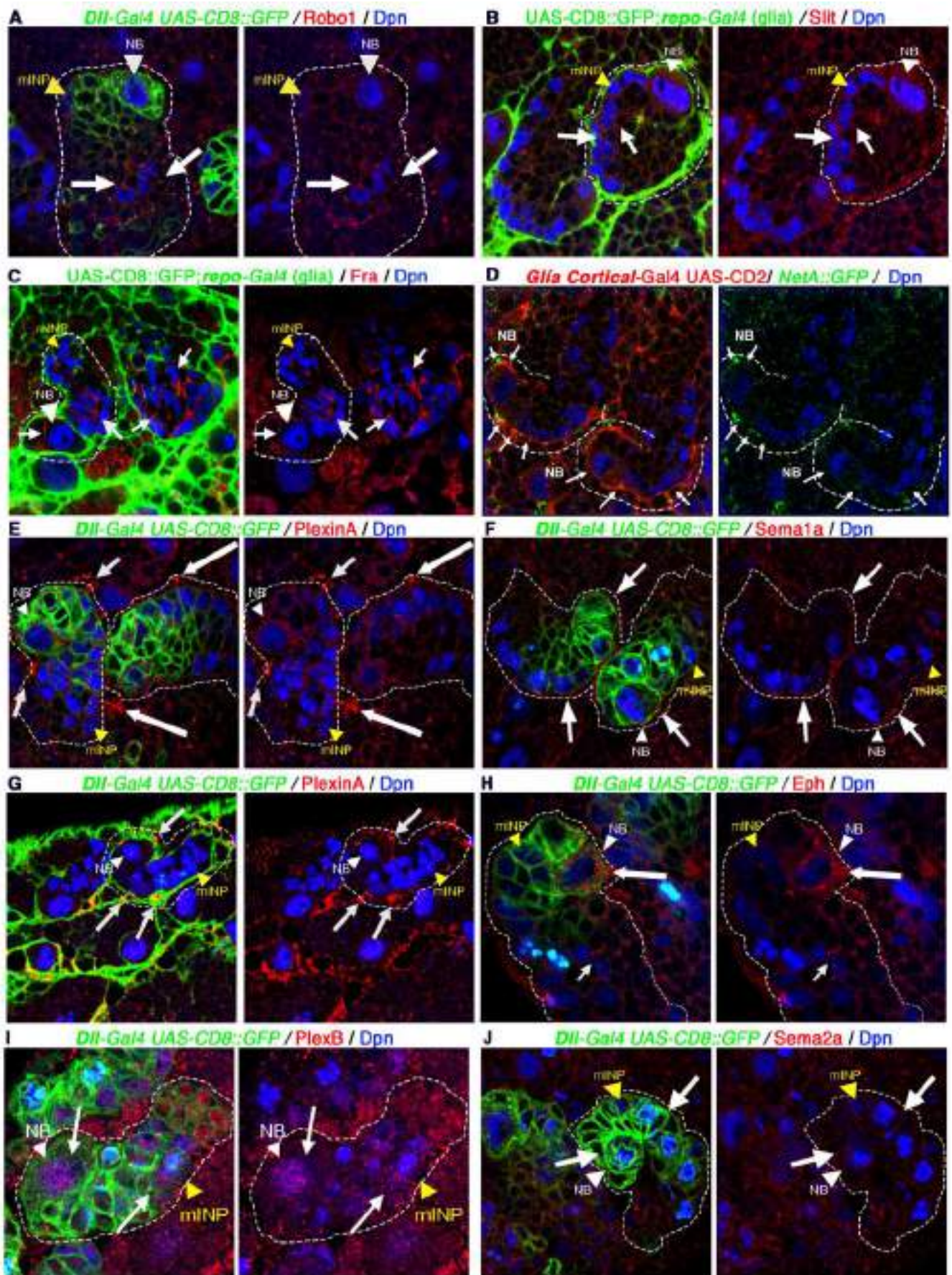


Figura 28. Patrón de expresión de las señales y de los receptores de la guía axonal Slit- Robo1, Net-Fra, Semas-Plexin y Efn-Eph en los linajes de NBs de tipo II y en la glía cortical. A) Robo1 (rojo) se expresa en la membrana de los NBs de tipo II marcada por el por el driver *Dll-Gal4*. (B) Slit (rojo) se expresa en la glía cortical que envuelve al clon, etiquetada por el controlador *repo-Gal4*. (C) Fra (rojo) está presente dentro de los linajes NBII y no se detecta en la glía circundante, que está marcada por el controlador *repo-Gal4*. (D) NetA, marcado endógenamente con GFP (verde), se detecta en la glía cortical, marcada por la línea *Akap200NP2222-Gal4*. (E) Se detecta una baja expresión de PlexinA (rojo) en la membrana de los linajes de NBs de tipo II marcado por el driver *Dll-Gal4*. (F y G) Sema 1a y PlexinA (rojo) presentan fuerte expresión en la glía cortical, marcada por el driver *repo-Gal4*. (H) Eph (rojo) se detecta en la membrana de los NBs de tipo II marcado por el por el driver *Dll-Gal4*. (I) La expresión de PlexinB (rojo) en la membrana de los NBs de tipo II marcado por el por el driver *Dll-Gal4* es muy baja. (J) Baja expresión de Sema2a (rojo) en la membrana de los NBs de tipo II marcado por el por el driver *Dll-Gal4*. Todos los paneles muestran micrografías confocales; el factor de transcripción Dpn (azul) marca las NB y las INP maduras.

membrana de los linajes de NBs de tipo II (figura 28 A, B). Obtuvimos el mismo resultado con NetA/Fra, habiendo una fuerte expresión de *NetA::GFP* en la glía cortical y de Fra dentro de los linajes de NBs de tipo II (figura 28 C, D). El receptor Eph también se expresaba en los linajes de NBs de tipo II (figura 28 H); sin embargo, no pudimos determinar el patrón de expresión de las Efrinas, al no tener herramientas adecuadas para ello. Respecto a la pareja Sema1a/PlexA, se observó una fuerte expresión en la glía cortical en ambos casos y Sema2a/PlexB se detectaron a muy bajos niveles tanto dentro de los linajes de NBs de tipo II (ambos) como en la glía cortical (sólo PlexinB) (figura 28 E, F, G, I, J).

Señalización guía axonal	Neuroblastos de tipo II	Glía Cortical
Slit/Robo1	Robo1 ↑	Slit ↑
Net/Fra	Fra	NetA
Efn/Eph	Eph	¿?
Sema1a /PlexA		Sema1a, PlexA
Sema2a /PlexB	Sema2a, PlexB	PlexB

Tabla 1. Resumen patrón de expresión de señales/receptores de la guía axonal en NBII y glía cortical.

Dado que observamos una consistente expresión de los ligandos Slit y NetA en la glía cortical y la de sus correspondientes receptores, Robo1 y Fra, dentro de los linajes de NBs, decidimos centrarnos en el estudio de estas parejas de señales de guía axonal. Para reforzar estos resultados de expresión, usamos las líneas *robo1-Gal4* y *slit-Gal4* (la expresión del factor Gal4 está bajo el control de secuencias reguladoras de *robo1* o *slit*,

respectivamente) para conducir la expresión de CD8::GFP, detectándose GFP en la membrana de los linajes de NBs de tipo II o en la glía que rodea los linajes de NBs, respectivamente (figura 29). En el caso de *Netrin/fra* no pudimos realizar un experimento similar debido a que no había disponibles líneas Gal4 para estos genes.

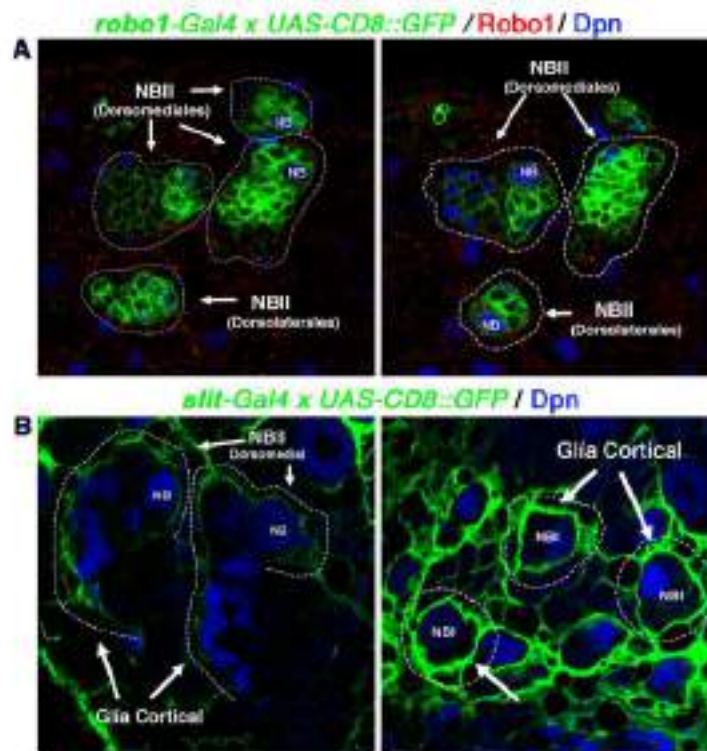


Figura 29. Robo1 se expresa dentro de los linajes de NB de tipo II y Slit en la glía cortical.
 (A) Una línea *robo1-Gal4* provoca la expresión de CD8::GFP en los linajes NBII. Se muestran dos planos confocales de una pila confocal z.
 (B) Una línea *slit-Gal4* conduce la expresión de CD8::GFP en la glía que rodea los linajes NBI y NBII.

2. Al afectar la señalización de Slit-Robo1 o Netrin-Fra se induce a la formación de NBs ectópicos en los linajes de NBs de tipo II del cerebro larvario

Dado que los ligandos Slit y Netrin se expresaban en la glía y sus receptores dentro de los linajes de NBs, quisimos analizar los efectos de su pérdida de función en los linajes de NBs. Para ello, comenzamos analizando la composición celular de dichos linajes utilizando marcadores de identidad celular específicos de los linajes de NBs de tipo II.

Concretamente, se emplearon los factores de transcripción Dpn y Ase para marcar los NBs (Dpn+Ase-) y los INPs maduros (mINPs; Dpn+ Ase+). En un linaje de NB de tipo II silvestre, hay solo una célula marcada con Dpn (el NB) y varias marcadas con Dpn y Ase (mINPs). La disminución de expresión, mediante ARN interferente, de *slit* en la glía cortical y la de *robo1* en los linajes de NBs de tipo II conllevó la formación de NBs ectópicos y un aumento significativo del número de mINPs (figura 30). La disminución de expresión de *NetA* y *NetB* o la falta total de función (mutante nulo) de *fra* (*fra*³) tuvo el mismo efecto, un incremento significativo en el número de NBs y de mINPs comparado con el control (figura 31). Por tanto, la falta o disminución de estas moléculas en el desarrollo de los clones de NBs de tipo II afecta directamente a su composición celular.

Para confirmar que las señales Slit y Netrinas se expresan específicamente en la glía, desde donde afectan a los NBs de tipo II, y que los receptores están expresándose y señalizando de forma específica en dichos NBs, realizamos el análisis a la inversa, es decir, disminuyendo la expresión de *robo1* o *fra* en la glía cortical y la de *slit* o *NetA* y *NetB* en los linajes de NBs (figura 32 y 33). Los clones de NBs no presentaron diferencias significativas frente al control. Por tanto, Slit y las Netrinas (NetA y NetB) se expresan de forma específica en la glía cortical, desde donde afectan el desarrollo de los linajes de NBs de tipo II, y Fra y Robo1 se expresan y son funcionalmente necesarios en los linajes de NBs de tipo II.

Dll-Gal4 UAS-CD8::GFP (clon NB II) / Dpn / Ase

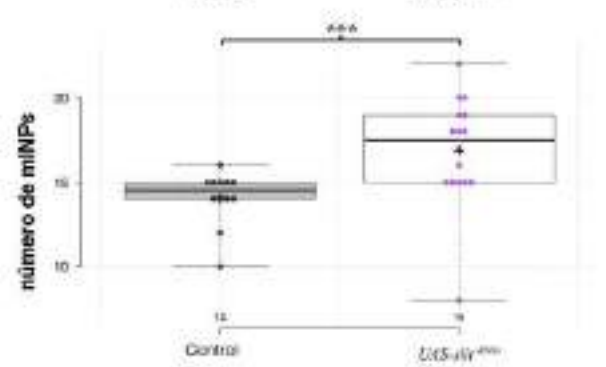
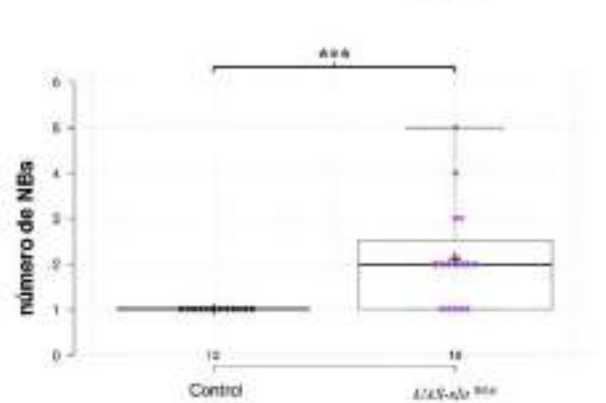
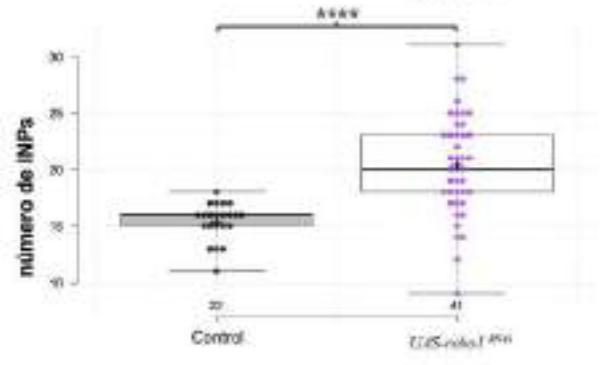
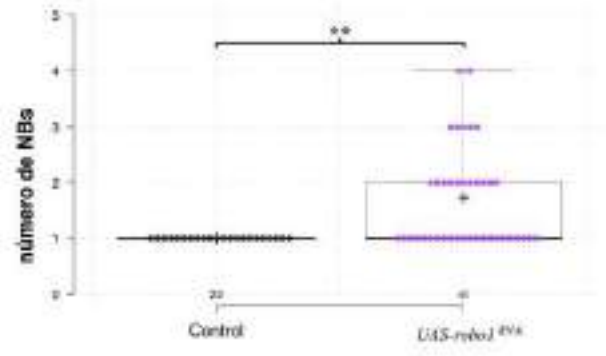
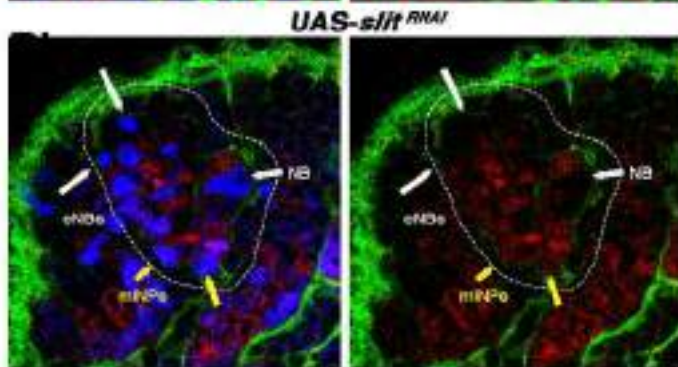
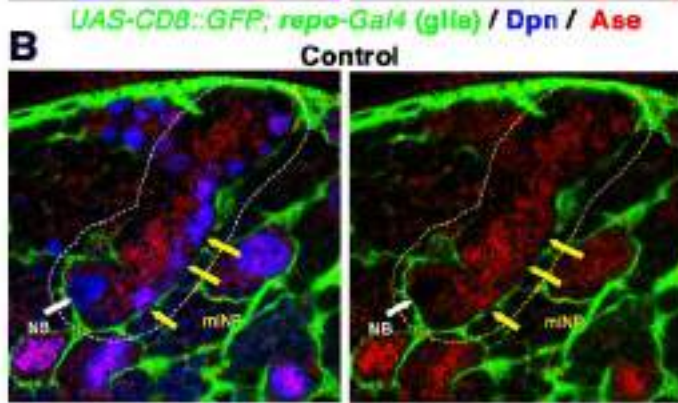
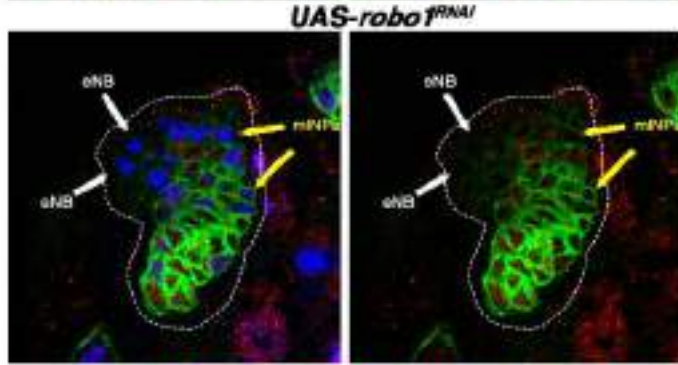
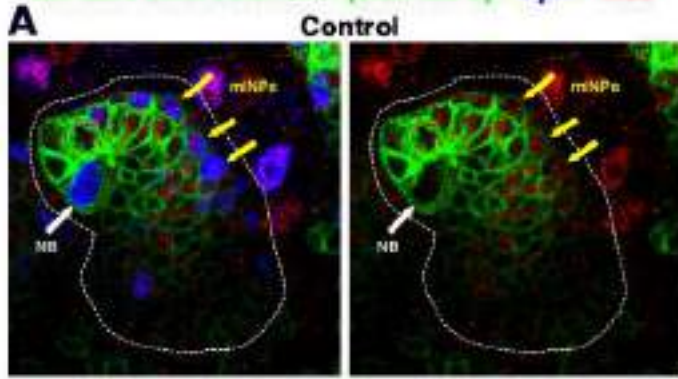


Figura 30. Al afectar la señalización de Slit-Robo1 se produce la formación de NBs ectópicos y un aumento en el número de mINPs, en los linajes de NBs de tipo II del cerebro larvario.

(A) Al disminuir la expresión de *robo1* en los linajes de NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, se produce la formación de NBs ectópicos (eNBs) y más mINPs.

(B) La disminución de la expresión de *slit* en la glía, mediante *repo-Gal4*, muestra eNBs y más mINPs.

Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura).

Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

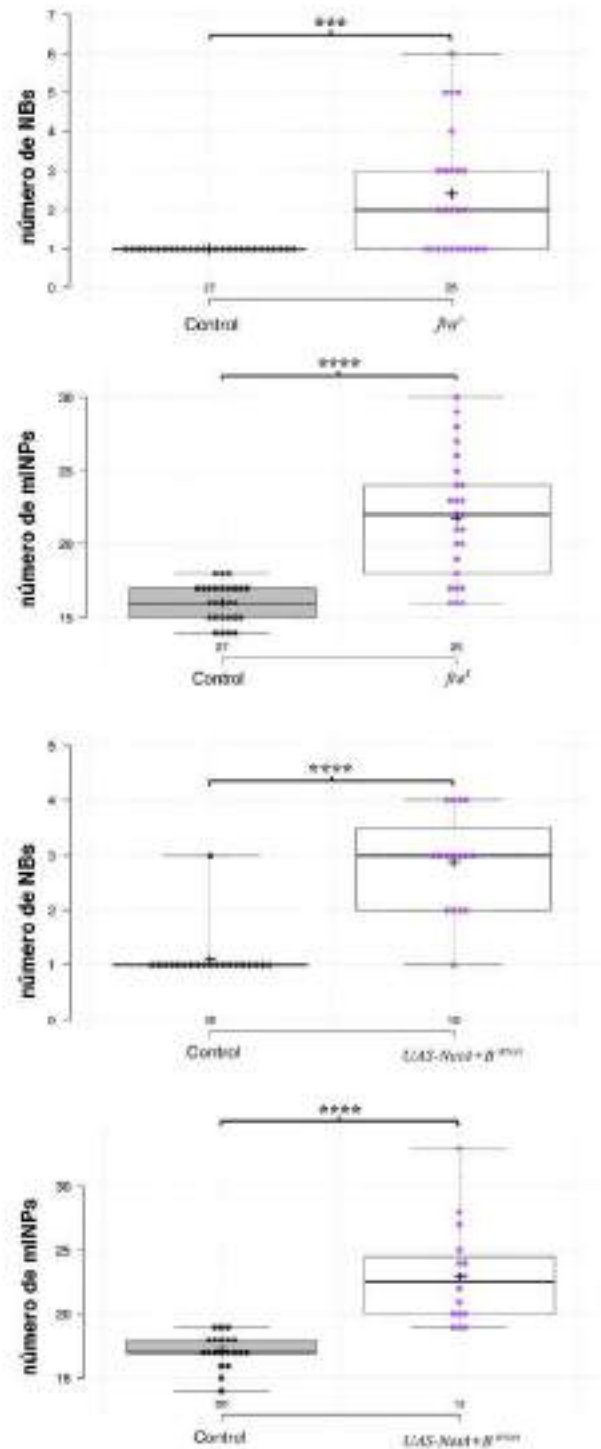
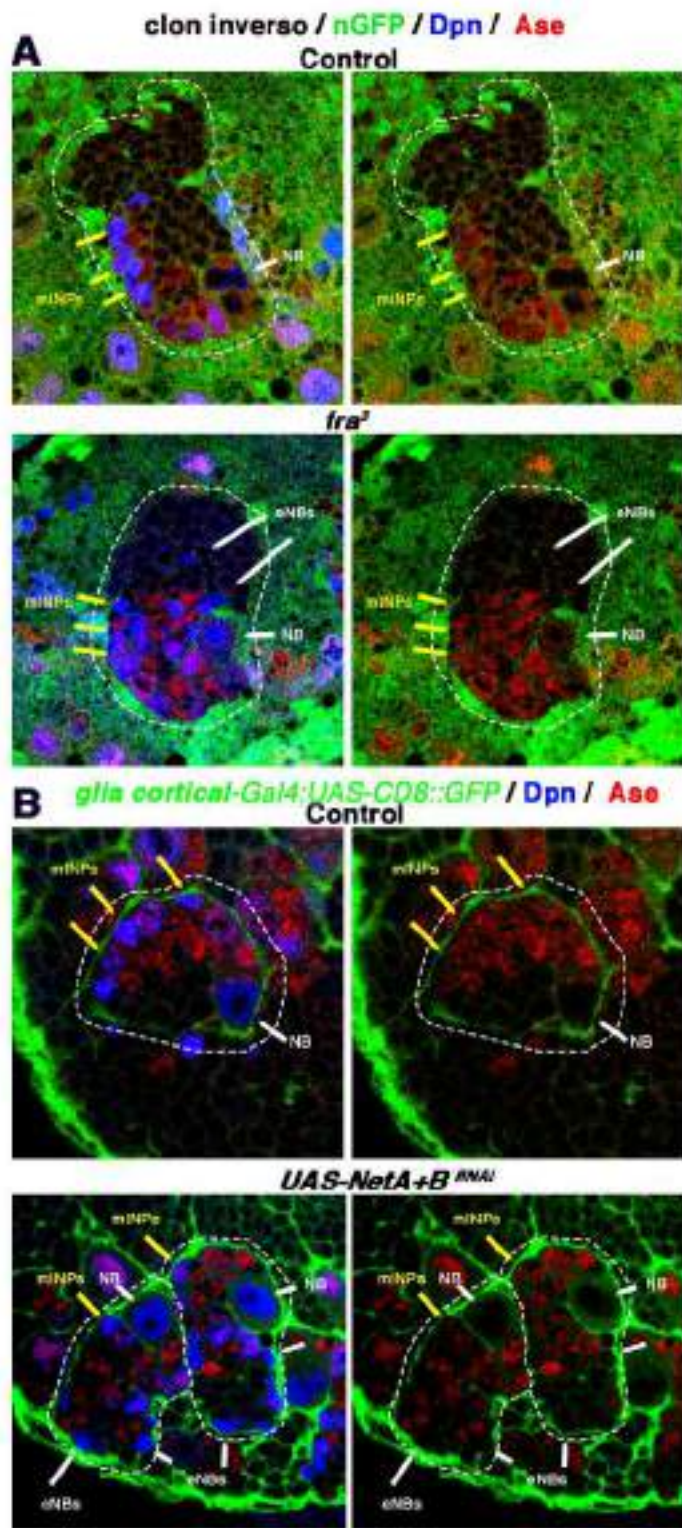


Figura 31. La disminución de expresión de *NetA* y *NetB* o la falta total de función de *fra* (*fra³*) muestra un incremento significativo en el número de NBs y de mINPs.

(A) Los clones de NB de tipo II mutantes *fra³* muestran eNBs y más mINPs.

(B) La disminución de la expresión de *NetA* y *NetB* en la glía, mediante *repo-Gal4* produce eNBs y más mINPs.

Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase+ (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura).

Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

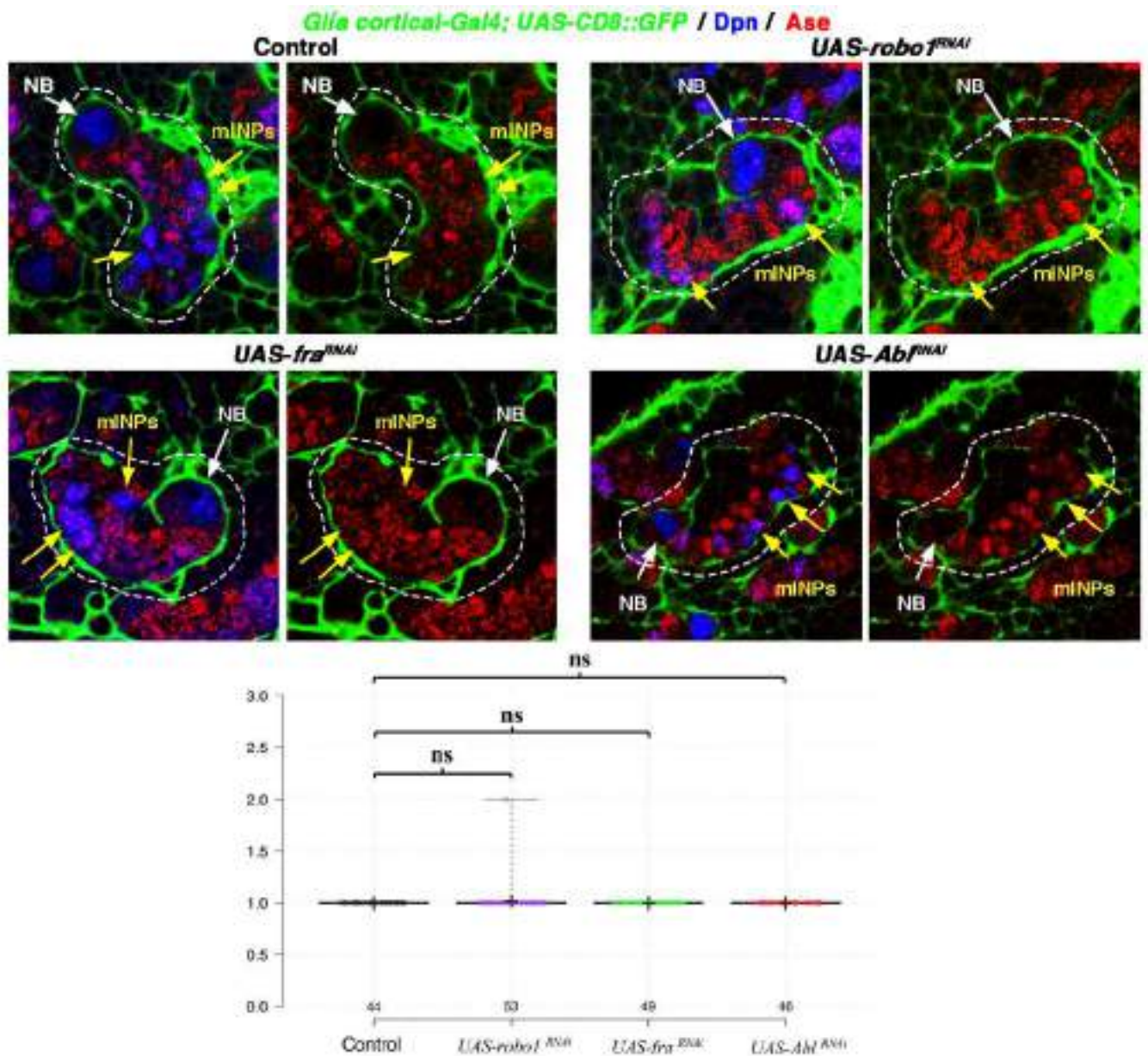


Figura 32. Los receptores Robo1 y Fra se expresan y señalizan de forma específica en los NBs de tipo II.

Al disminuir la expresión de *robo1*, *fra* y *Abl* en la glía, mediante *Akap200NP2222-Gal4*, no hay cambios en la composición celular del linaje de NB de tipo II.

Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura).

Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

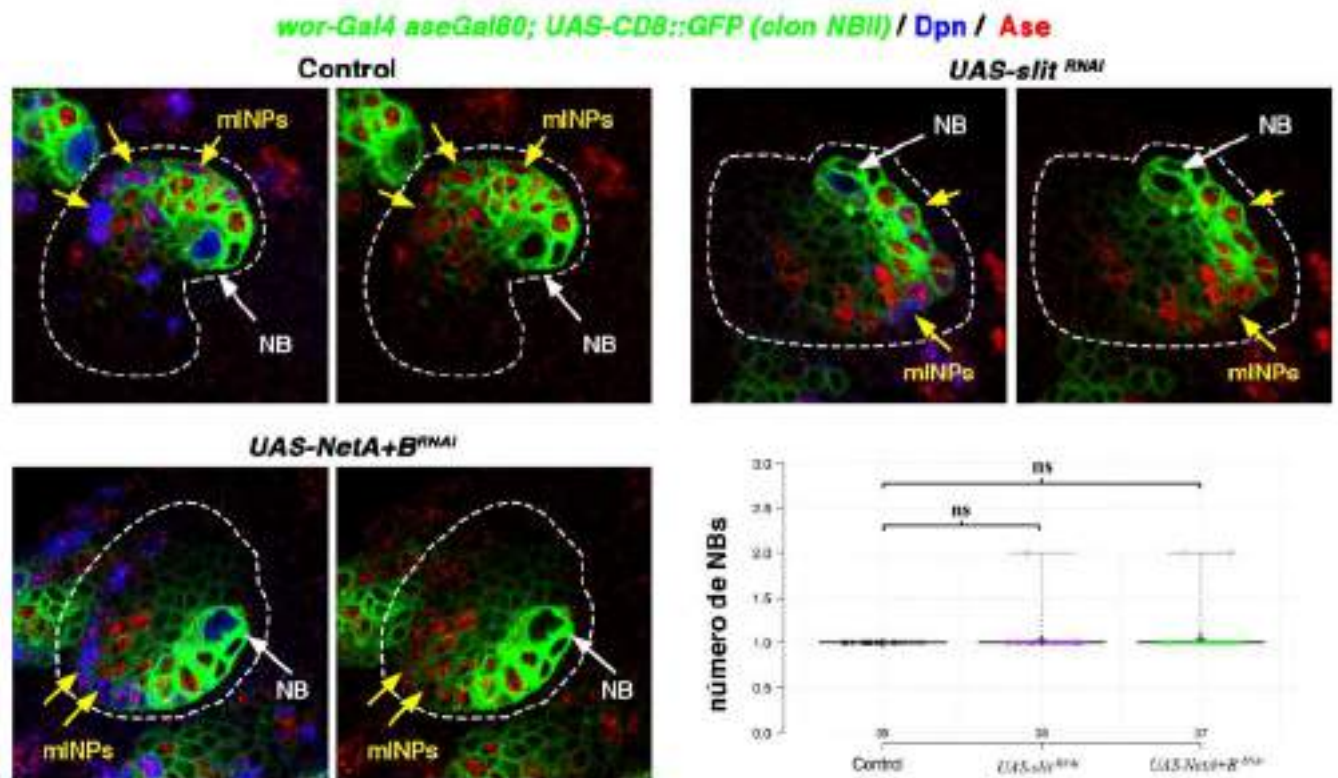


Figura 33. Las señales Slit y Netrin se expresan específicamente en la glía, desde donde afectan a los NBs de tipo II.

La disminución de la expresión de las señales *slit* y *NetA+B* en los linajes de los NBs de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, no altera la composición celular de dichos linajes.

Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura).

Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

Finalmente, nos preguntamos si la señalización de Robo1 y Fra era necesaria exclusivamente en los linajes de NBs de tipo II, o si era también necesaria para la correcta formación de los linajes de NBs de tipo I (figura 34). Curiosamente, al disminuir la expresión de ambos receptores, Robo1 o Fra, en los linajes de NBs de tipo I no detectamos NBs ectópicos como en el caso de los linajes de NBs de tipo II. En conclusión, los ligandos NetA, NetB y Slit y los receptores Fra y Robo1 son necesarios de forma específica en la glía cortical y en los NBs de tipo II, respectivamente, y su señalización es requerida exclusivamente para el correcto desarrollo de los linajes de NBs de tipo II.

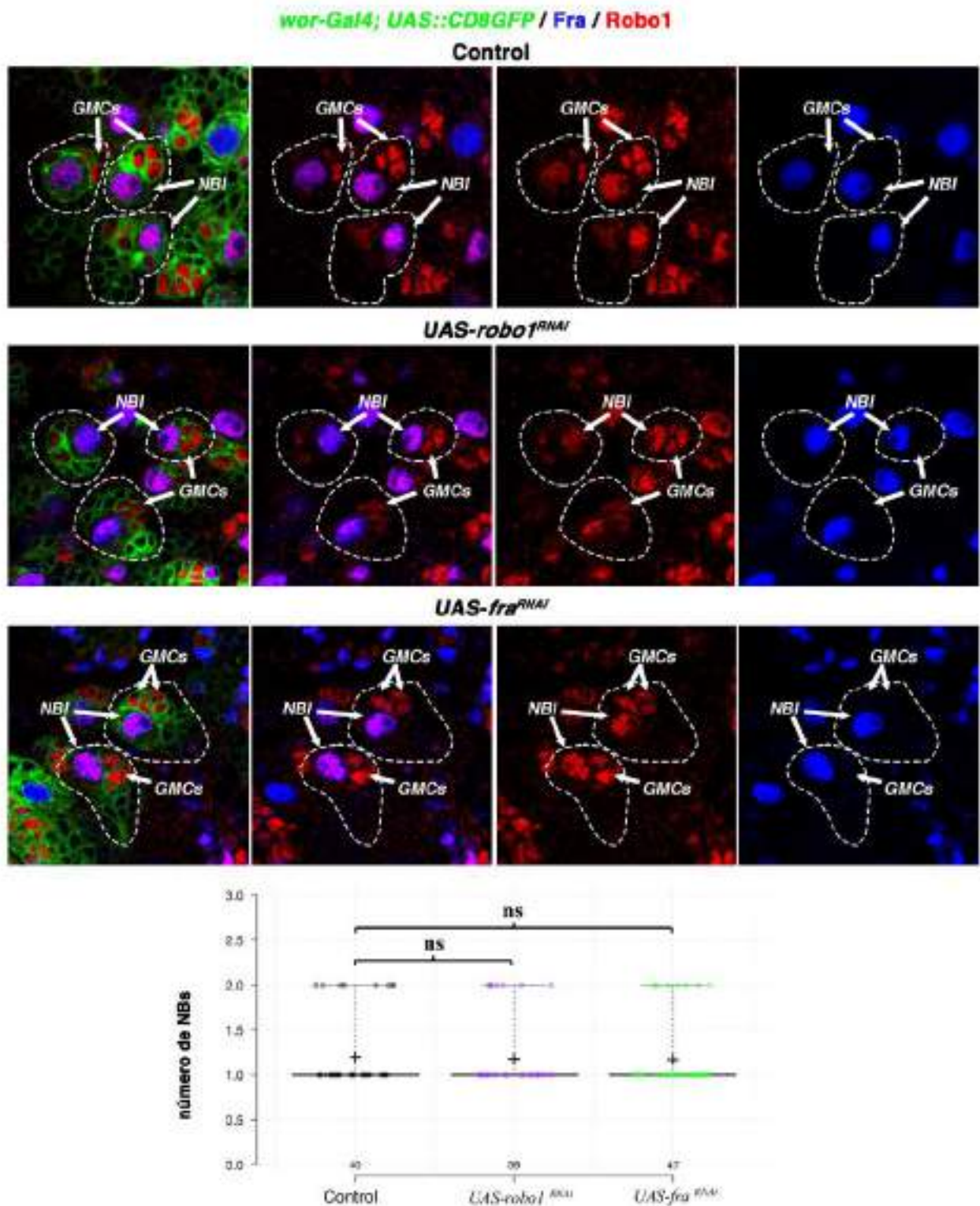


Figura 34. Los linajes NBI no requieren la señalización de Fra y Robo1 para su correcto desarrollo.

La disminución de la expresión de *robo1* o *fra* en los linajes de NB de tipo I, mediante *wor-Gal4*, no provoca la formación de eNBs.

Las micrografías confocales muestran linajes NBI de cerebro larvario marcados con Dpn (azul) y Ase (rojo). El controlador *wor-Gal4*, que etiqueta todos los linajes NB (NB de tipo I y NB de tipo II) se utilizó para etiquetar los clones NBI y para regular a la baja *robo1* o *fra* en ellos. Los linajes de NB de tipo I control muestran un NB Dpn⁺ Ase⁺ (en púrpura), que expresa tanto Dpn (azul) como Ase (rojo), y varios GMC (en rojo), que sólo expresan Ase.

Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados

3. Al disminuir simultáneamente la expresión de *robo1* y *fra* se suprime la formación de NBs ectópicos dentro de los linajes de NBs de tipo II.

Dado que al reducir la expresión de *robo1* o *fra* observamos el mismo fenotipo, la formación de NBs ectópicos e incremento en el número de mINPs, nos preguntamos si dichos receptores estarían cooperando funcionalmente de forma sinérgica, de tal manera que, si disminuyéramos la expresión de ambos receptores simultáneamente, podríamos observar un fenotipo incluso mayor al de la sumatoria de los fenotipos de los mutantes simples. Para abordar esta cuestión, analizamos la composición de los linajes de NBs de tipo II al disminuir la expresión de *robo1* y *fra* en los NBs de tipo II (figura 35). Curiosamente, el resultado obtenido fue el opuesto al hipotetizado: no se detectó un fenotipo significativo de NBs ectópicos en el doble mutante comparado con el control, mientras que los mutantes simples *robo1* o *fra* sí presentaron de nuevo tal fenotipo. Para confirmar el resultado y que el experimento estaba funcionando correctamente, llevamos a cabo varios controles. En primer lugar, para comprobar que la línea de moscas usadas llevaba los dos transgenes (*UAS-robo^{RNAi}*; *UAS-fra^{RNAi}*), teñimos los clones con Acs específicos para Robo1 y Fra certificando que la expresión de ambos receptores en los linajes de NBs de tipo II en la línea *UAS-robo^{RNAi}*; *UAS-fra^{RNAi}* estaba fuertemente reducida en comparación al control (figura 36). En segundo lugar, repetimos el experimento, esta vez analizando tanto el doble *UAS-robo^{RNAi}*; *UAS-fra^{RNAi}* como cada uno de los simples *UAS-robo^{RNAi}* y *UAS-fra^{RNAi}* procedentes del mismo stock doble *UAS-robo^{RNAi}*; *UAS-fra^{RNAi}*, obteniéndose el mismo resultado (figura 37). Para corroborar este resultado, llevamos a cabo un control adicional en el que cada uno de los *UAS-robo^{RNAi}* o *UAS-fra^{RNAi}* individuales se analizaron en presencia de otra construcción UAS (*UAS-CD8::GFP*) para descartar que el fenotipo del doble *UAS-robo^{RNAi}*; *UAS-fra^{RNAi}* hubiera sido causado por una titulación de dosis del Gal-4 (figura 38).

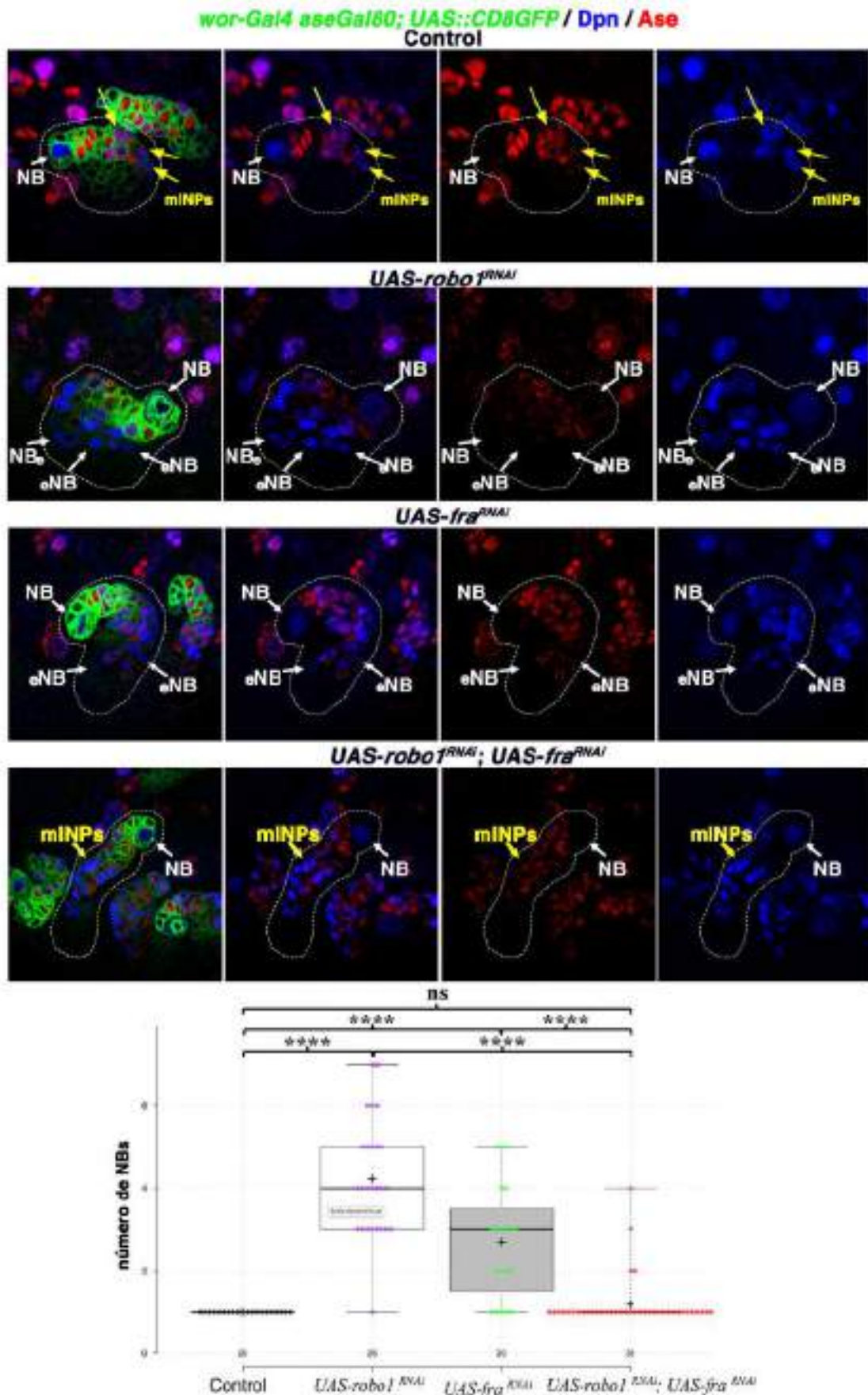


Figura 35. La disminución de expresión simultánea de *robo1* y *fra* en los linajes de NB de tipo II suprime la formación de eNBs, presentes en cada una de las condiciones de los mutantes simples. La disminución de la expresión de *robo1* o *fra* en los linajes de los NBs de tipo II, mediante *wor-Gal4 aseGal80*, suprime la formación de eNBs producida en los mutantes simples. Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura). Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

Ambos genotipos, *UAS-robo1^{RNAi}*; *UAS-CD8::GFP* así como *UAS-CD8::GFP*; *UAS-fra^{RNAi}* mostraron NBs ectópicos dentro de los linajes de NBs de tipo II mientras que el doble *UAS-robo1^{RNAi}*; *UAS-fra^{RNAi}* dio nuevamente lugar a una supresión del fenotipo.

Curiosamente, el doble mutante de alelos nulos *robo1* y *fra³* mostró el mismo resultado, la supresión del fenotipo de NBs ectópicos presente en los mutantes simples, siendo el doble mutante similar al silvestre (figura 39). Por consiguiente, los siguientes experimentos se diseñaron para comprender esta supresión del fenotipo de NB ectópicos, al disminuir o al eliminar totalmente y de forma simultánea la función de *robo1* y *fra*.

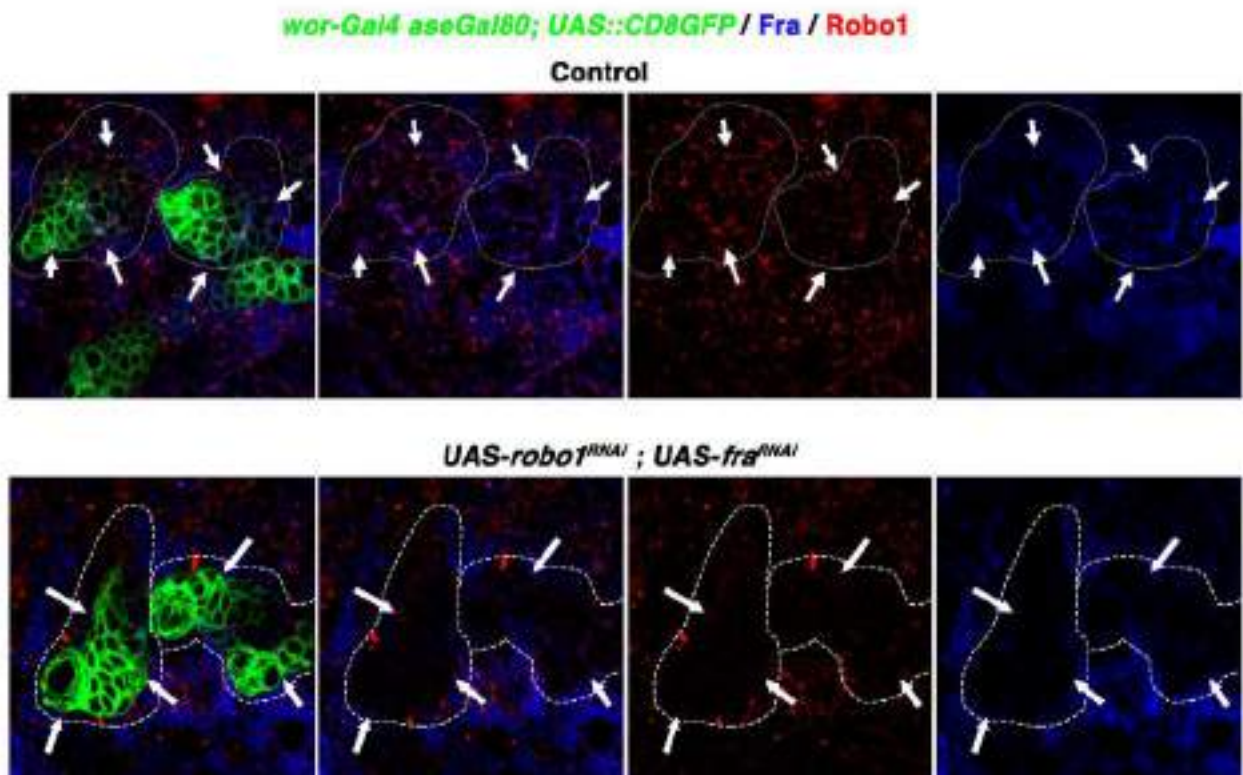


Figura 36. La expresión de ambos receptores Robo1 y Fra esta fuertemente reducida en comparación al control en la línea *UAS-robo1^{RNAi}*; *UAS-fra^{RNAi}*. Micrografías confocales de linajes de NB de tipo II que muestran una fuerte reducción de la expresión de Robo1 (rojo) y Fra (azul) tras la disminución de la expresión de *robo1* y *fra* en los linajes de NB de tipo II con el driver *wor-Gal4 aseGal80 Gal-4*.

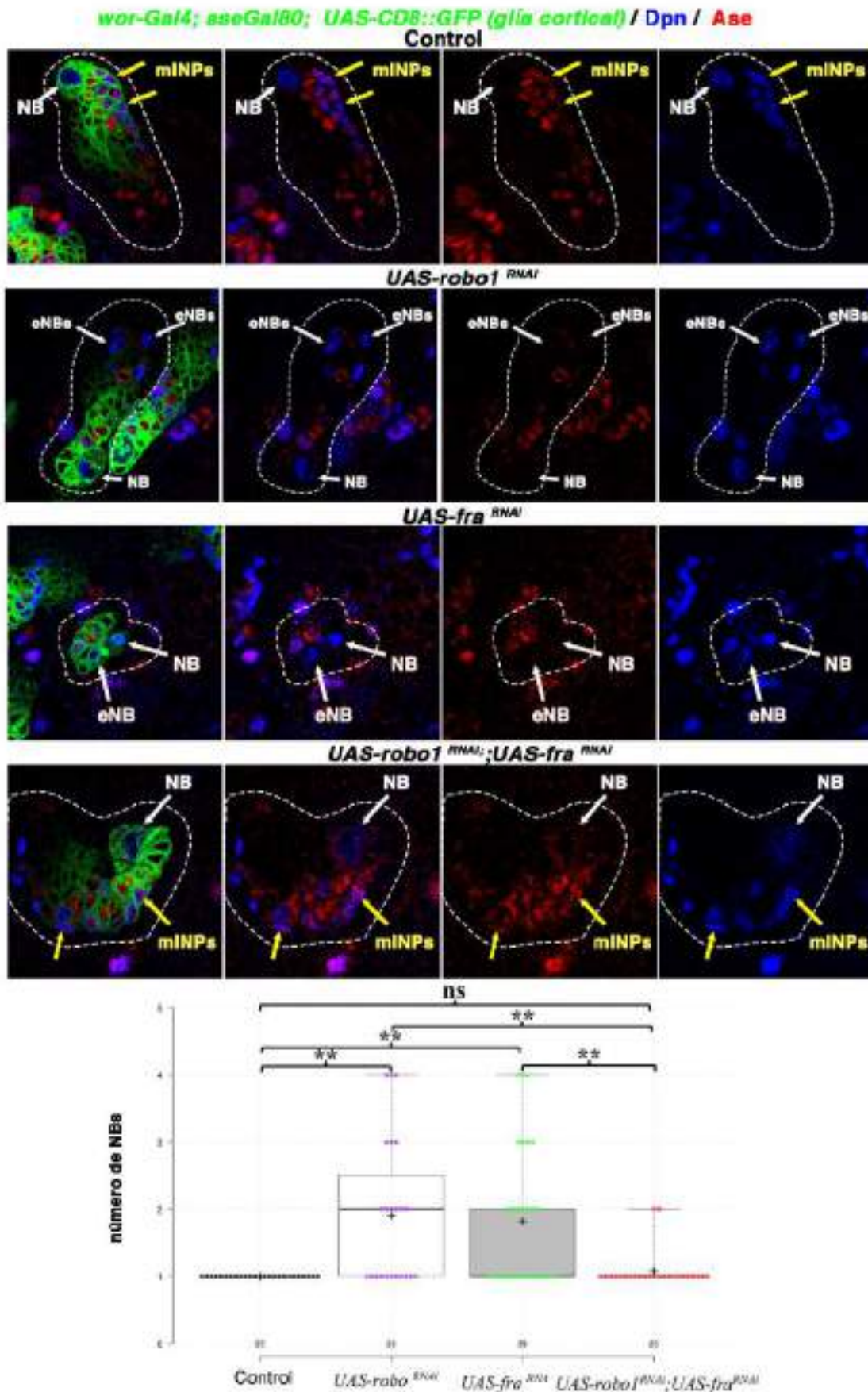


Figura 37. Comprobación de la supresión del fenotipo de NBs ectópicos al disminuir simultáneamente la expresión de Robo1 y Fra con la línea *UAS- robo1^{RNAi}; UAS- fra^{RNAi}*. Micrografías confocales de los linajes de NB de tipo II de los genotipos indicados. Las vírgenes de *wor-Gal4 aseGal80; UAS-CD8::GFP* se cruzaron con machos *UAS- robo1^{RNAi}; UAS- fra^{RNAi}/TM6B*, o con machos *UAS- robo1^{RNAi}/CyOTb; UAS- fra^{RNAi}*, de la estirpe de doble RNAi; las larvas Tb (es decir *wor-Gal4 aseGal80/ UAS- robo1^{RNAi}; UAS-CD8::GFP/TM6B* o *wor-Gal4 aseGal80/CyOTb; UAS- fra^{RNAi} / UAS-CD8::GFP*) fueron seleccionadas para su disección y tinción. Los vírgenes *wor-Gal4 aseGal80; UAS-CD8::GFP* se cruzaron con *UAS- robo1^{RNAi}; UAS- fra^{RNAi}* (homocigotos dobles) y las larvas *wor-Gal4 aseGal80/ UAS- robo1^{RNAi}; UAS- fra^{RNAi} / UAS-CD8::GFP* se seleccionaron para su disección y tinción. Los linajes de NB *robo1^{RNAi}* y *fra^{RNAi}* simples muestran eNBs, mientras que en el doble *robo^{RNAi}; fra^{RNAi}* este fenotipo se suprime.

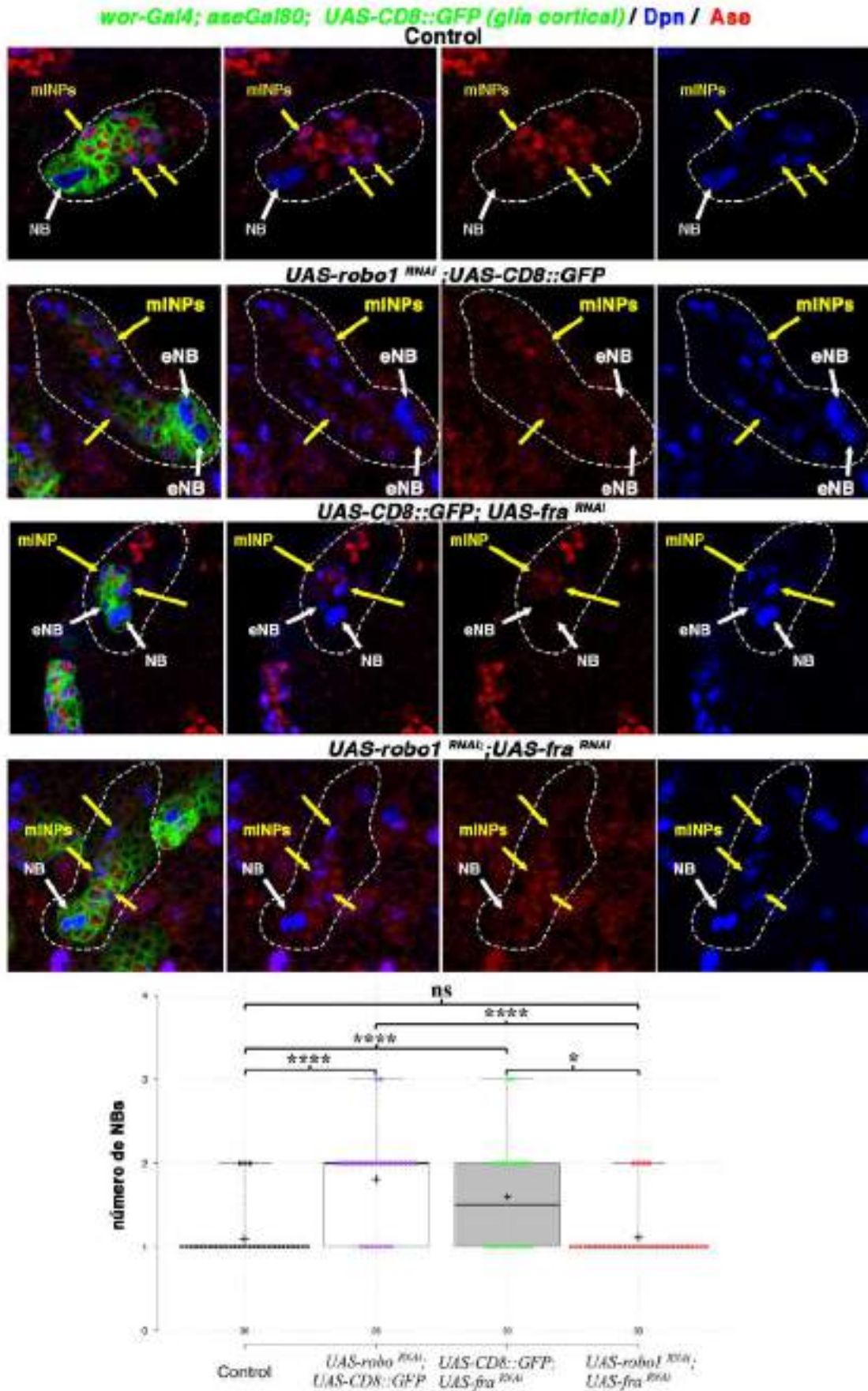


Figura 38. Comprobación de la supresión del fenotipo de NBs ectópicos al disminuir simultáneamente la expresión de Robo1 y Fra con la línea *UAS-robo1^{RNAi}; UAS-fra^{RNAi}*. Micrografías confocales de linajes de NB de tipo II de los genotipos indicados que muestran la disminución de expresión simultánea de *robo1* y *fra* en los linajes, donde se suprime la formación de eNB, en azul, presentes en cada una de las condiciones de RNAi simple. Las condiciones de RNAi simple (*robo^{RNAi}* o *fra^{RNAi}*) se analizaron en presencia de una construcción UAS adicional (*UAS-CD8::GFP*) para descartar que la pérdida de fenotipo en el doble RNAi se debiera a la titulación o eliminación del controlador Gal-4.

clones NBII "clones inversos" / nGFP / Dpn / Ase
Control

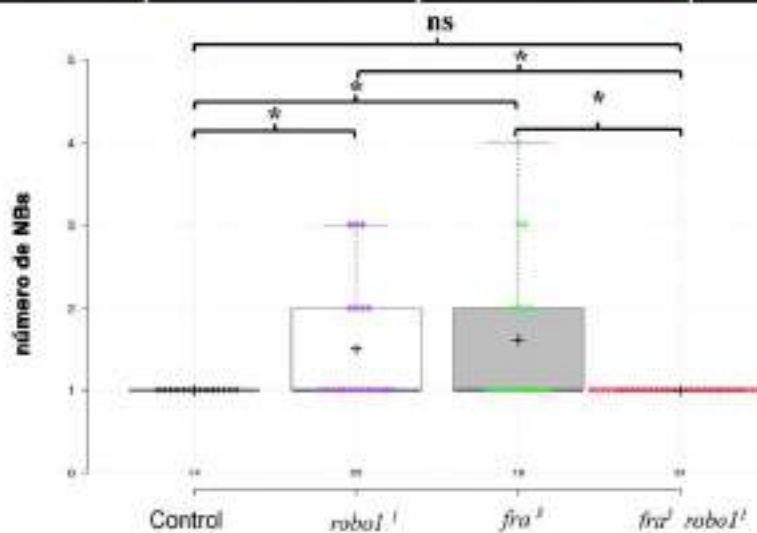
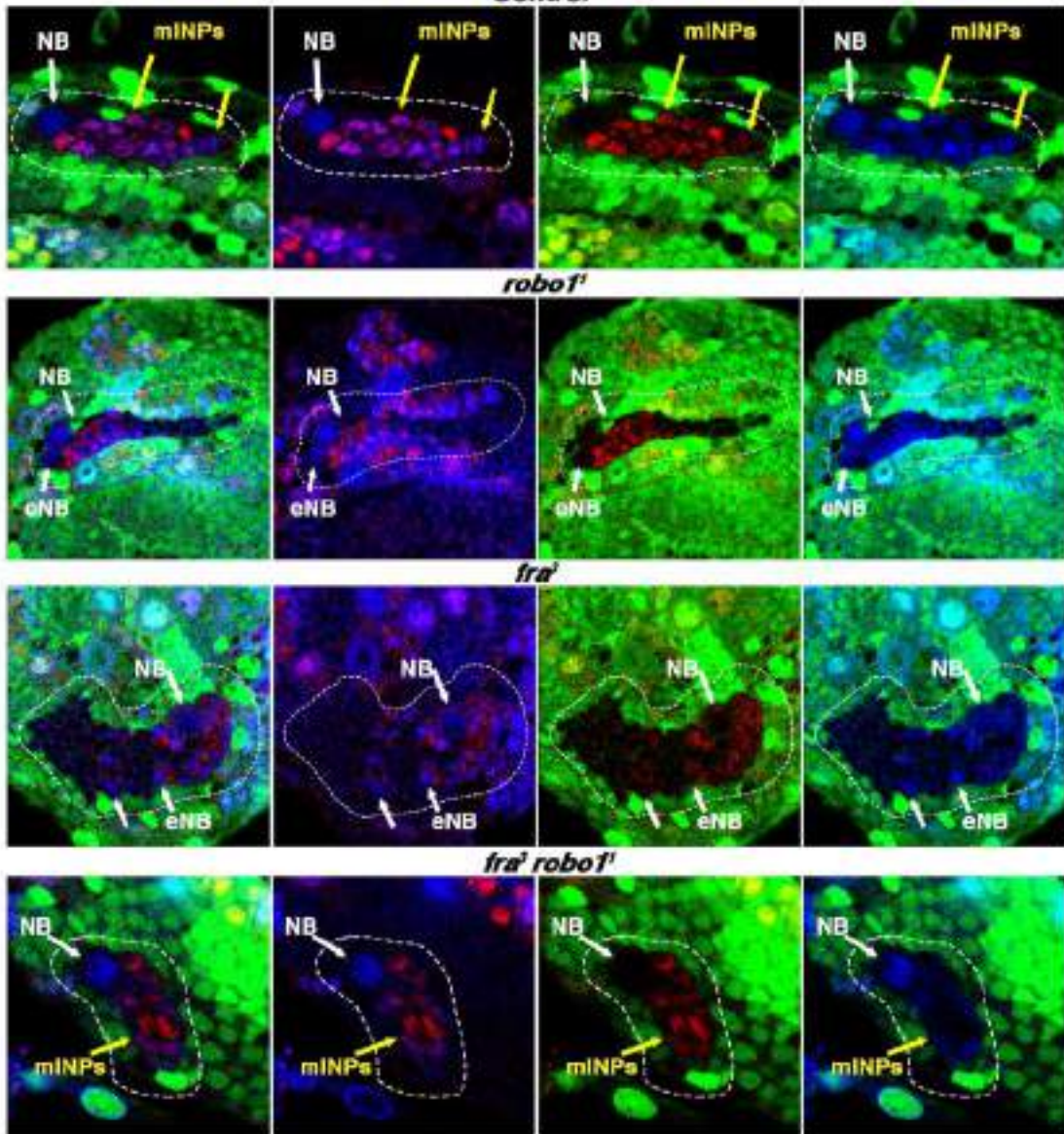


Figura 39. El doble mutante de alelos nulos *robo1* y *fra3* muestra la supresión del fenotipo de NBs ectópicos presentes en los mutantes simples. Los clones de NB de tipo II nulos de *fra3 robo1* no muestran NBs ectópicos frente a los que se observan en los clones mutantes nulos simples de *robo1* y *fra3*. Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura). Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

4. Al comprometer el inhibidor de Robo1 la tirosina quinasa Abl se induce la formación de NBs ectópicos dentro de los linajes de NBs de tipo II.

Robo1 y Fra fueron descritos por primera vez en el contexto de la señalización de la guía axonal durante el crecimiento de los conos neurales. Las funciones de Robo1 y Fra son independientes, pero también interdependientes, pudiendo desempeñar funciones opuestas entre sí en determinados ambientes (Bhat, 2005; Hiramoto & Hiromi, 2006). Robo1 media la repulsión de los axones para evitar el cruce (y la reversión de los axones una vez que cruzan) en la línea media mientras que Fra actúa como atrayente de éstos. La tirosina quinasa citoplasmática Abelson (Abl) está relacionada con Fra y Robo1 e interacciona físicamente con ambos. Abl fosforila directamente el dominio citoplasmático de Robo1 inhibiéndolo y por lo tanto antagonizando su señalización repulsiva, mientras que la unión de Abl al dominio citoplasmático de Fra promueve el cruce de la línea media de los axones y es independiente de la actividad quinasa de Abl (Forsthoefel et al., 2005; O'Donnell & Bashaw, 2013). Dada esta interacción y conexión opuesta de Abl-Fra y Abl-Robo1, pensamos que Abl podría estar desempeñando una función clave en nuestro sistema que nos ayudara a esclarecer el mecanismo por el cual se estaría produciendo la supresión de fenotipo al disminuir o eliminar completamente Fra y Robo1 simultáneamente en los linajes de NBs de tipo II.

El primer paso fue analizar si Abl estaba presente en los linajes de los NBs de tipo II, tanto mediante un anticuerpo que reconoce específicamente a la proteína Abl, como con una línea de Abl marcada endógenamente con GFP (figura 40). En ambos casos vimos que Abl está presente en los clones de NBs de tipo II.

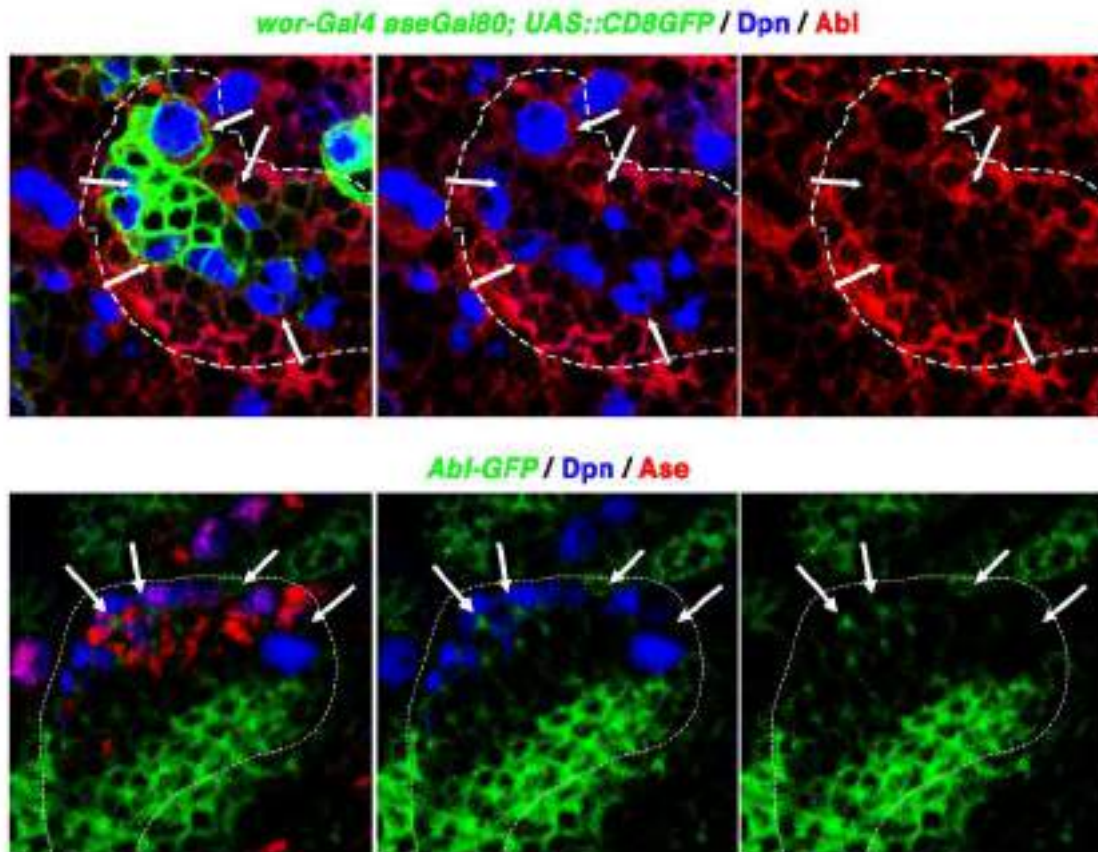


Figura 40. La tirosina quinasa Abl , inhibidora de Robo1 se expresa en los linajes de NBs de tipo II. La expresión de Abl se detecta dentro de los linajes de NB de tipo II mediante un anticuerpo (rojo en los paneles superiores) o mediante una línea de Abl marcada endógenamente con GFP (verde en los paneles inferiores).

A continuación, analizamos la falta de función de Abl en los clones de NBs de tipo II, dando como resultado presencia de NB ectópicos dentro de los clones (figura 41). La expresión de una forma de Abl con su motivo quinasa truncado o inactivo (Abl^{KD}) dio como resultado un fenotipo similar al anterior, presencia de NBs ectópicos dentro del clon (figura 42). Dado que Robo1 es fosforilado e inhibido por Abl, pensamos que el fenotipo hallado en el análisis de Abl^{KD} podría ser debido a un aumento de los niveles de señalización de Robo1. Para determinar si esta era una posibilidad real, analizamos el efecto de la sobreexpresión de Robo1 en los linajes de NBs de tipo II, observando que un número de NBs significativamente mayor respecto al control, resultado similar al obtenido en el análisis de Abl^{KD} (figura 43).

Por lo tanto, tanto la pérdida como la sobreexpresión de *robo1* alteran la identidad celular dentro de los linajes de NBs. Con todo, un potencial escenario para la explicación de la relación entre Robo1 y Fra en los linajes de los NBs de tipo II podía ser que Fra estuviera regulando los niveles adecuados de señalización de Robo1 a través de Abl quinasa, niveles apropiados que serían necesarios para determinar la identidad celular de las células del linaje de NBs.

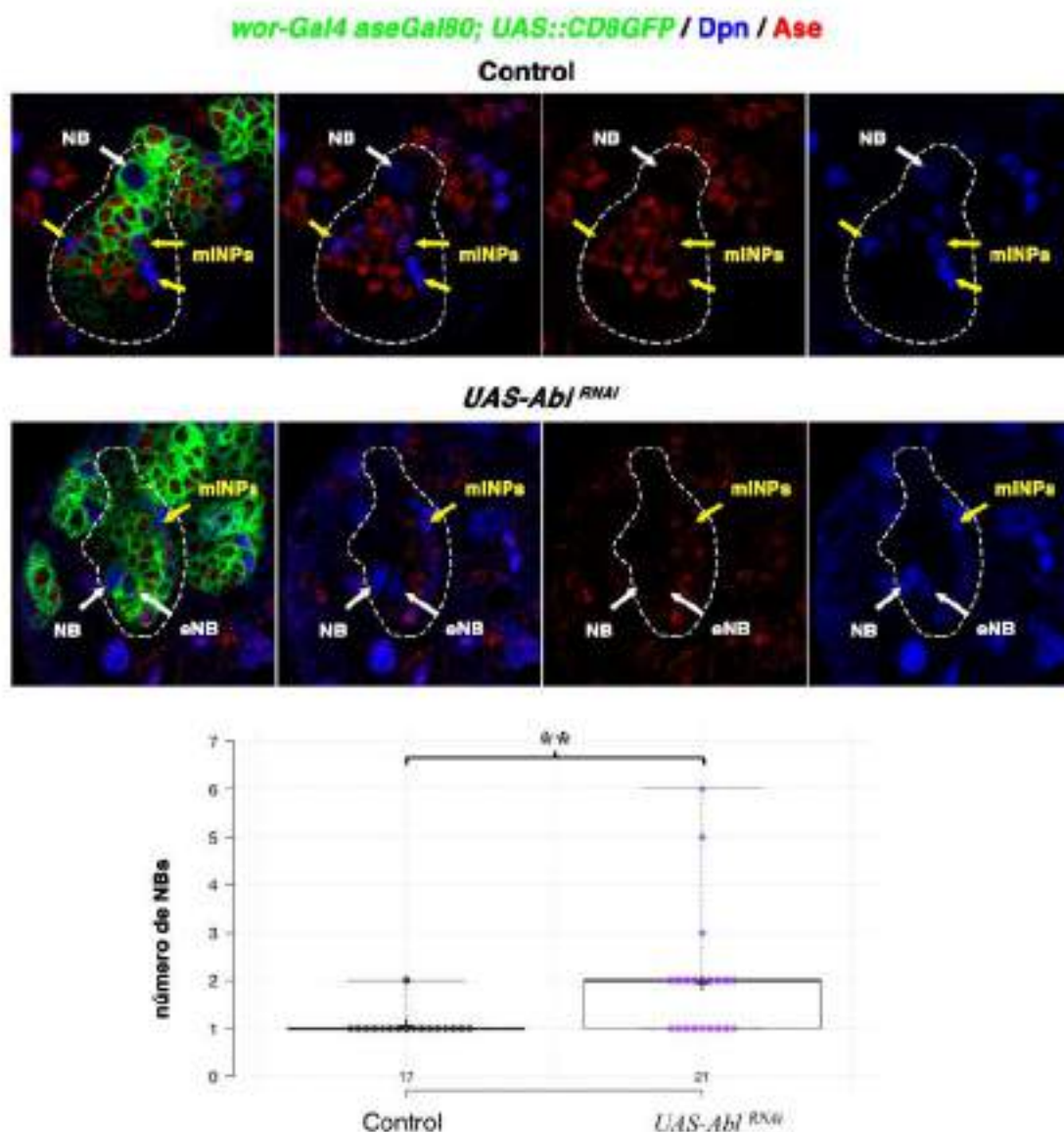


Figura 41. La disminución de la expresión de la tirosina quinasa Abl produce NBs ectópicos en los linajes de NB de tipo II. La disminución de la expresión de *Abl* (*Abl^{RNAi}*) en los linajes de NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, produce la formación de eNBs. Los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NBs de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura). Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

De esa manera, al reducir los niveles de expresión simultáneamente de *robo1* y *fra*, se estaría produciendo un proceso de compensación donde los bajos niveles de Fra implicarían una bajada de la actividad de la Abl quinasa y consecuente disminución de la inhibición a Robo1 y aumento de su señalización; este aumento contrarrestaría la reducción de los niveles de *robo1* en el doble *UAS-robo1^{RNAi}; UAS-fra^{RNAi}*. No obstante,

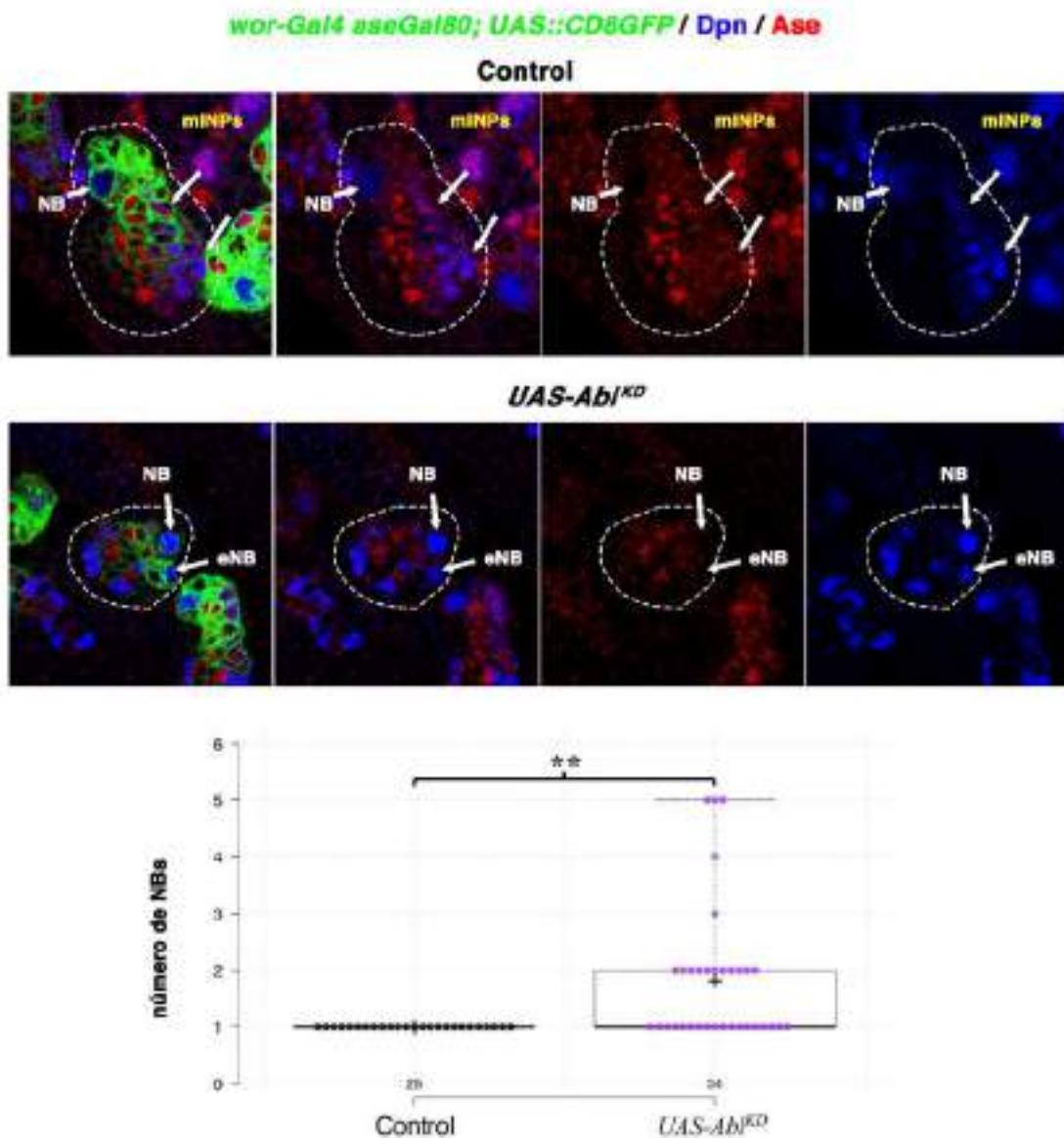


Figura 42. La expresión de una forma de Abl con el motivo quinasa inactivo produce NBs ectópicos en los linajes de NB de tipo II. La expresión de la forma de Abl con el motivo quinasa inactivo (*Abl^{KD}*) en los linajes de NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, produce la formación de eNBs. Los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NBs de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura). Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

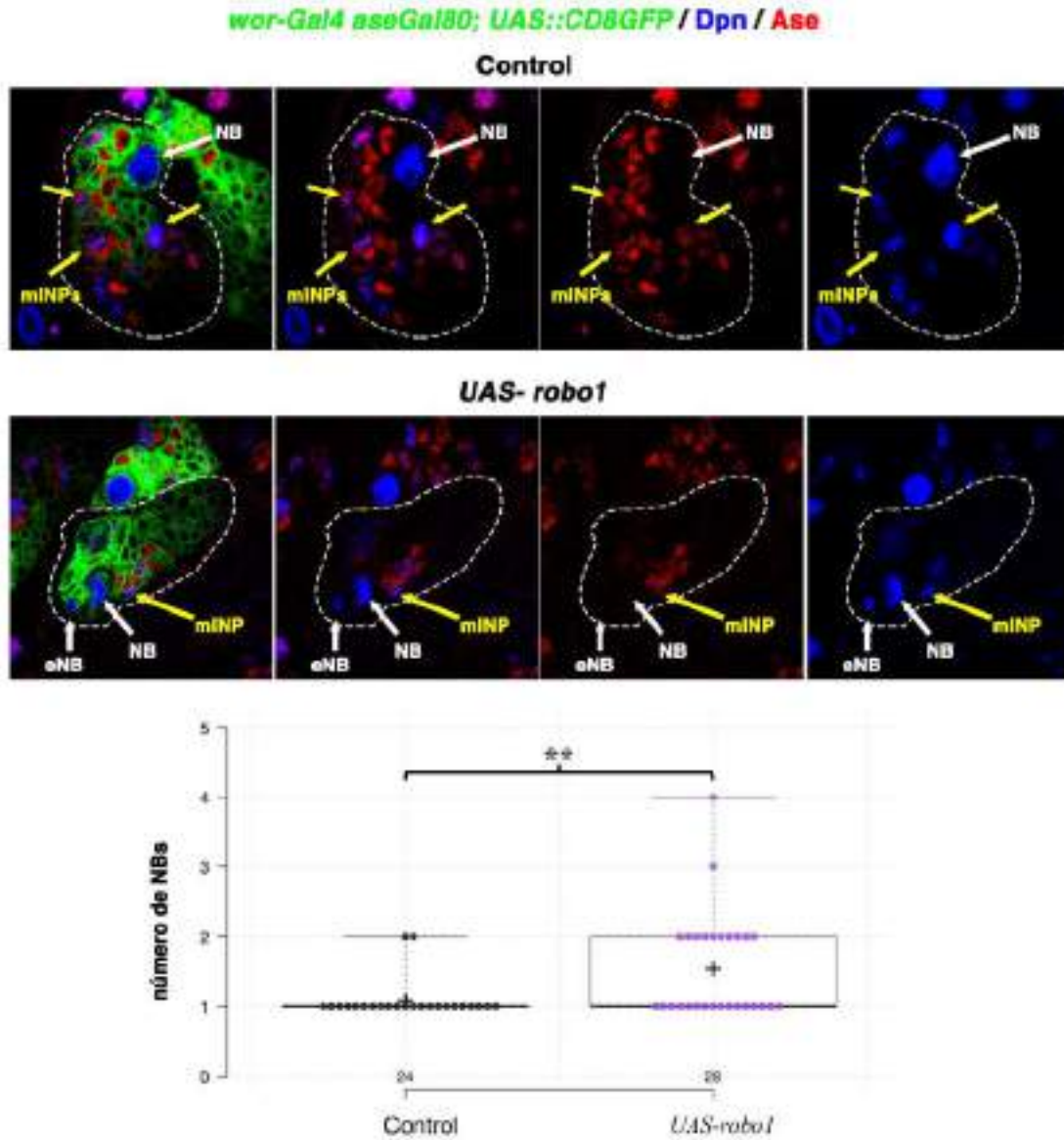


Figura 43. La sobreexpresión de *robo1* produce la formación de NBs ectópicos en los linajes de NB de tipo II. La sobreexpresión de la *robo1* en los linajes de NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, produce la formación de eNBs. Los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NBs de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura). Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

aunque de esta forma se podría explicar el resultado del doble RNAi *robo1 fra*, en el caso del doble mutante nulo *fra³ robo1* esta explicación no sería satisfactoria. En el doble nulo *fra³ robo1*, aunque Fra, debido a su ausencia total, no pudiera atraer a Abl quinasa para inhibir a Robo1 con el consecuente incremento en la señalización de Robo1, la pérdida total de *robo1* en el doble hace que no pudiera darse ese efecto de un aumento en la señalización de Robo1; y, por otra parte y como habíamos determinado, tanto al reducir

como al eliminar totalmente la expresión de *robo1*, se producían NBs ectópicos en el clon, es decir, la señalización de Robo1 sería necesaria en su justa medida para el correcto desarrollo de los linajes de NB de tipo II. Consecuentemente, cabría esperar un fenotipo de NBs ectópicos en el doble nulo *fra³ robo1*. Para intentar entender este fenotipo, hipotetizamos que otros receptores Robo podrían estar actuando en ausencia de *robo1*.

En *Drosophila* hay tres genes que codifican tres proteínas receptoras (Robo1, Robo2 y Robo3). Todas ellas presentan una estructura similar y participan en procesos similares o complementarios, por lo que nos planteamos si en ausencia de Robo1 podrían estar participando otros receptores de Robo para subsanar la falta de señalización de este en el mutante nulo de *fra³ robo1*, donde Abl está ausente para inhibir la señalización Robo2 o Robo3. Sin embargo, en el mutante simple de *robo1* sí se observaría fenotipo porque Abl estaría activado por Fra e inhibiría a Robo2 o/y Robo3. Curiosamente, Robo2 presenta los mismos sitios que Robo1 fosforilables por Abl.

Por tanto, decidimos analizar el efecto de la disminución de la expresión de *robo2* en los linajes de NBs de tipo II y, aunque el fenotipo no fue significativo, sí encontramos casos específicos de NBs ectópicos (figura 44 y 45). Concluimos que Robo2 podría estar actuando cuando las vías de señalización de Robo1 y Fra-Abl están simultáneamente alteradas, pero no es esencial para el correcto desarrollo de los linajes de NBs de tipo II en condiciones normales, proceso en el que Robo1 sería el regulador principal.

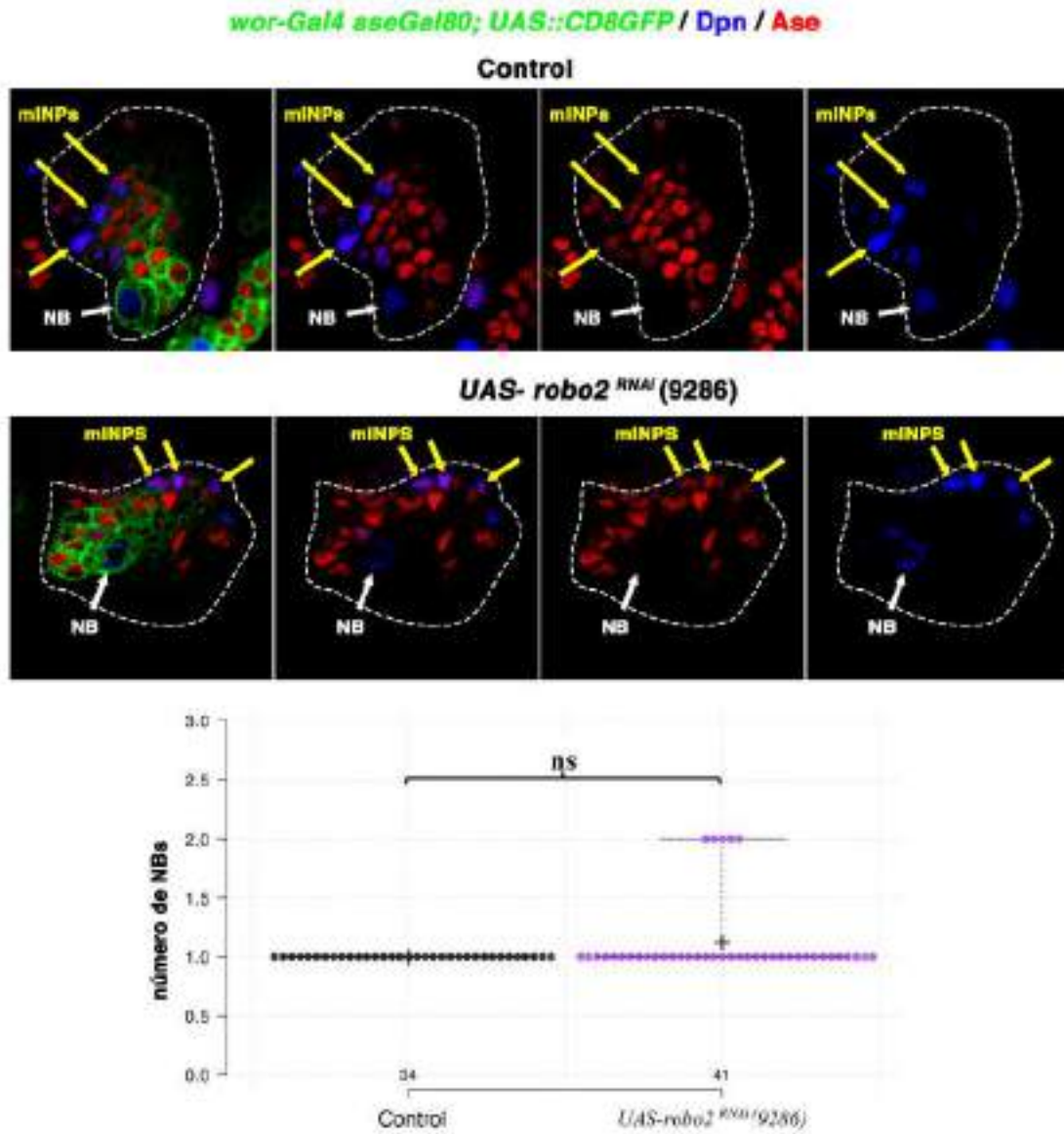


Figura 44. La disminución de la expresión de *robo2* en los linajes de NB de tipo II provoca la formación de NB ectópicos, pero el fenotipo no es significativo en comparación con los linajes de control.

Al disminuir la expresión de *robo2* (*UAS-robo2^{RNAi}9286*) en los linajes de NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, provoca la formación de eNBs pero el resultado no es significativo comparado con el control.

Los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NBs de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura). Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

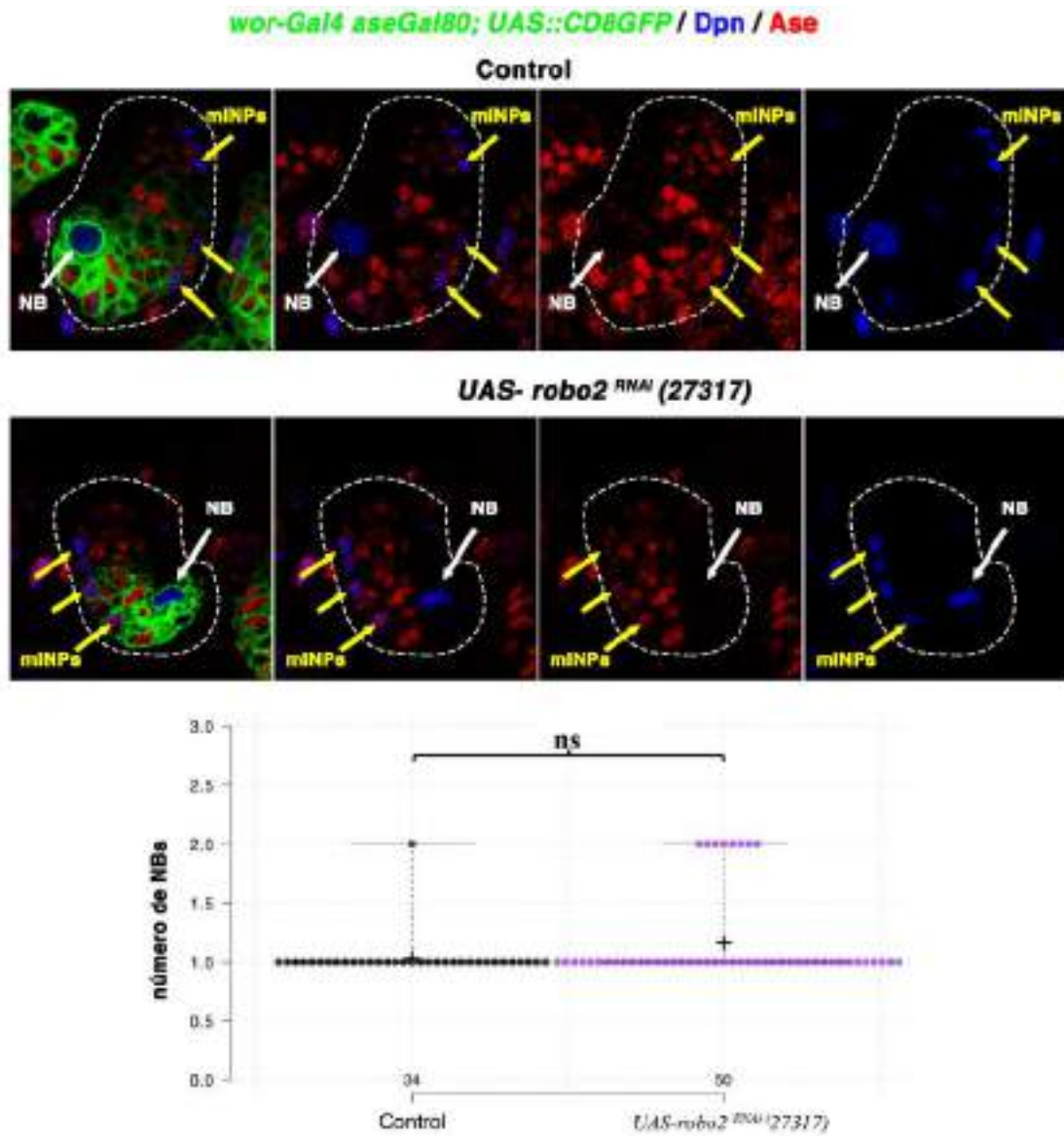


Figura 45. La disminución de la expresión de *robo2* en los linajes de NB de tipo II provoca la formación de NB ectópicos, pero el fenotipo no es significativo en comparación con los linajes de control. Al disminuir la expresión de *robo2* (*UAS-robo2^{RNAi27317}*) en los linajes de NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, provoca la formación de eNBs pero el resultado no es significativo comparado con el control. Los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NBs de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura). Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001,

5. La señalización Slit-Robo1 es necesaria durante la DCA de NBs y mINPs en los linajes de NBs de tipo II

Para comprender la existencia de NBs ectópicos al comprometer la señalización Slit/Robo1 o Net/Fra decidimos analizar si el proceso de DCA de las células progenitoras (NB e mINPs) en los linajes de NBs de tipo II estaba alterado en esa situación. Uno de los eventos clave para que la DCA del NB/INP sea exitosa es el establecimiento de la polaridad del progenitor, y está regulada por los complejos de proteínas apicales que controlan la correcta localización y segregación de los determinantes del destino celular en el polo opuesto. Por lo tanto, decidimos analizar la localización de un conjunto de dichos reguladores apicales, así como de determinantes de identidad, durante el proceso de división, concretamente en metafase, en las células progenitoras de linajes de NBs de tipo II al disminuir específicamente los niveles de los receptores Robo1 o Fra en los linajes de NBs de tipo II o de las señales Slit o Netrinas en la glía cortical.

La disminución específica de los niveles de expresión de *robo1* en los linajes de NBs de tipo II condujo a fallos significativos en la localización de los reguladores del complejo apical aPKC y Cno (figura 46 A y C). Mientras que en los progenitores de los linajes de NBII control estas proteínas se acumulan apicalmente de forma asimétrica formando "medias lunas" en metafase, la disminución de los niveles de *robo1* provocó su ausencia o localización alterada. Otros reguladores apicales, como Insc, no presentaron fallos significativos (figura 46 B). Al analizar la localización de los determinantes del destino celular observamos fallos en Numb (figura 46 D). Sin embargo, ni la localización de Brat ni la de su proteína adaptadora Mira mostraron fallos significativos (figura 47). Este resultado es consistente con los fallos observados en aPKC ya que la localización de Numb está regulada por aPKC. Además, los fallos de localización de Numb podrían

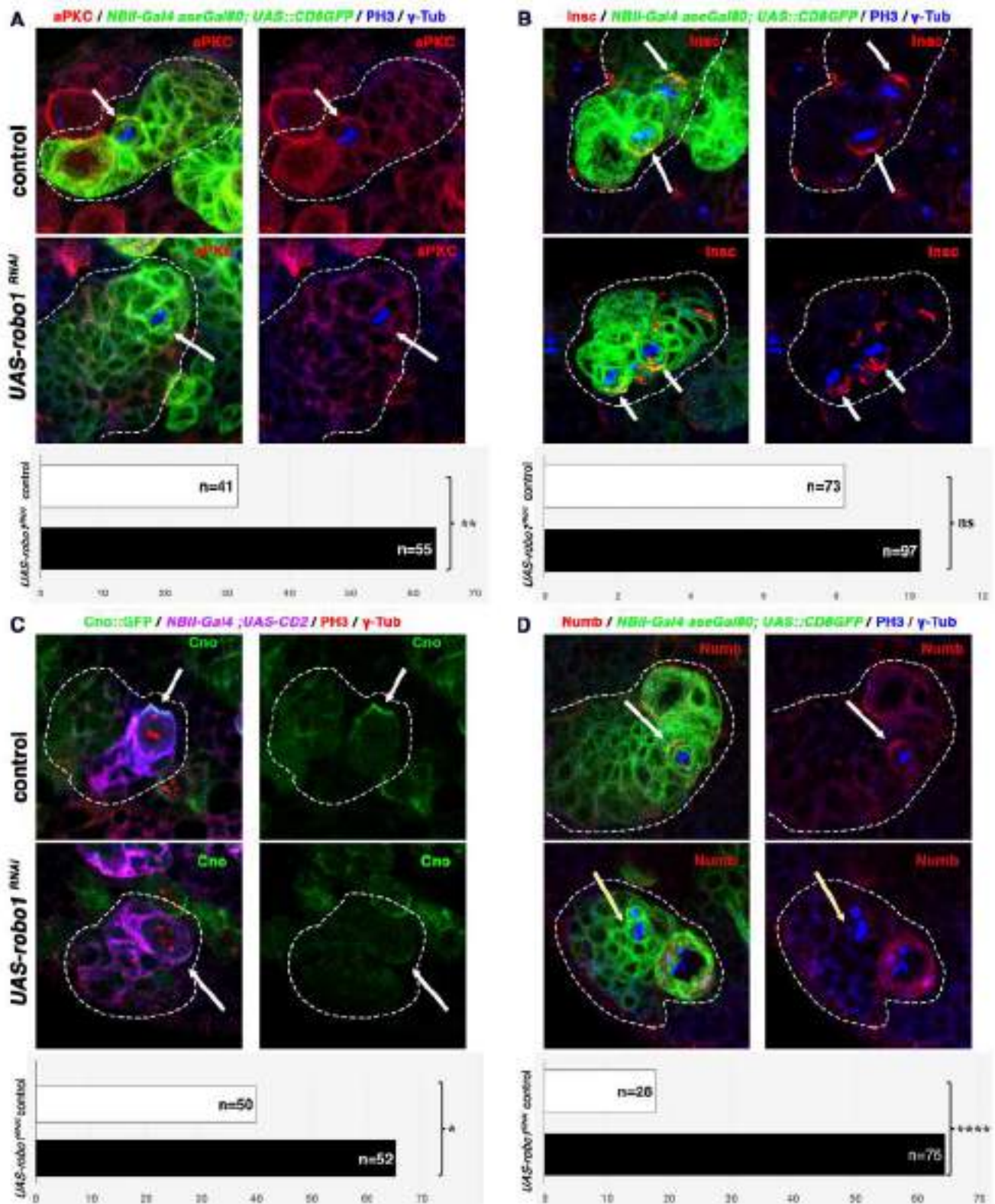


Figura 46. La señalización Slit-Robo1 regula la DCA en las células en división de los linajes de NB de tipo II del cerebro larvario.

La disminución de la expresión de *robo1* en los linajes de NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, provoca fallos en la localización de aPKC, Cno y Numb (flechas blancas); la localización de Insc no se ve afectada (flechas blancas).

Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; PH3 marca las células mitóticas; γ -Tub marca los centrosomas. Análisis de datos: prueba de chi-cuadrado, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de células en división analizadas.

explicar la presencia de NBs ectópicos después de disminuir la señalización de Robo1 en los linajes de NBII, ya que Numb es clave en el proceso de adquisición de identidad celular de la célula hija (INPs o GMCs) a la que se segrega.

Continuamos con el análisis de proteínas del complejo apical y de determinantes de destino celular al disminuir de forma específica el ligando de Robo1, Slit, en la glía cortical. Tanto la localización de las proteínas apicales aPKC y Cno, como la del determinante de destino celular Numb mostraron fallos significativos en su localización en progenitores metafásicos de los linajes de NBII (figura 48). En conclusión, el proceso de DCA de células progenitoras en linajes de NBII se ve afectado al comprometer la vía de señalización de Slit-Robo1.

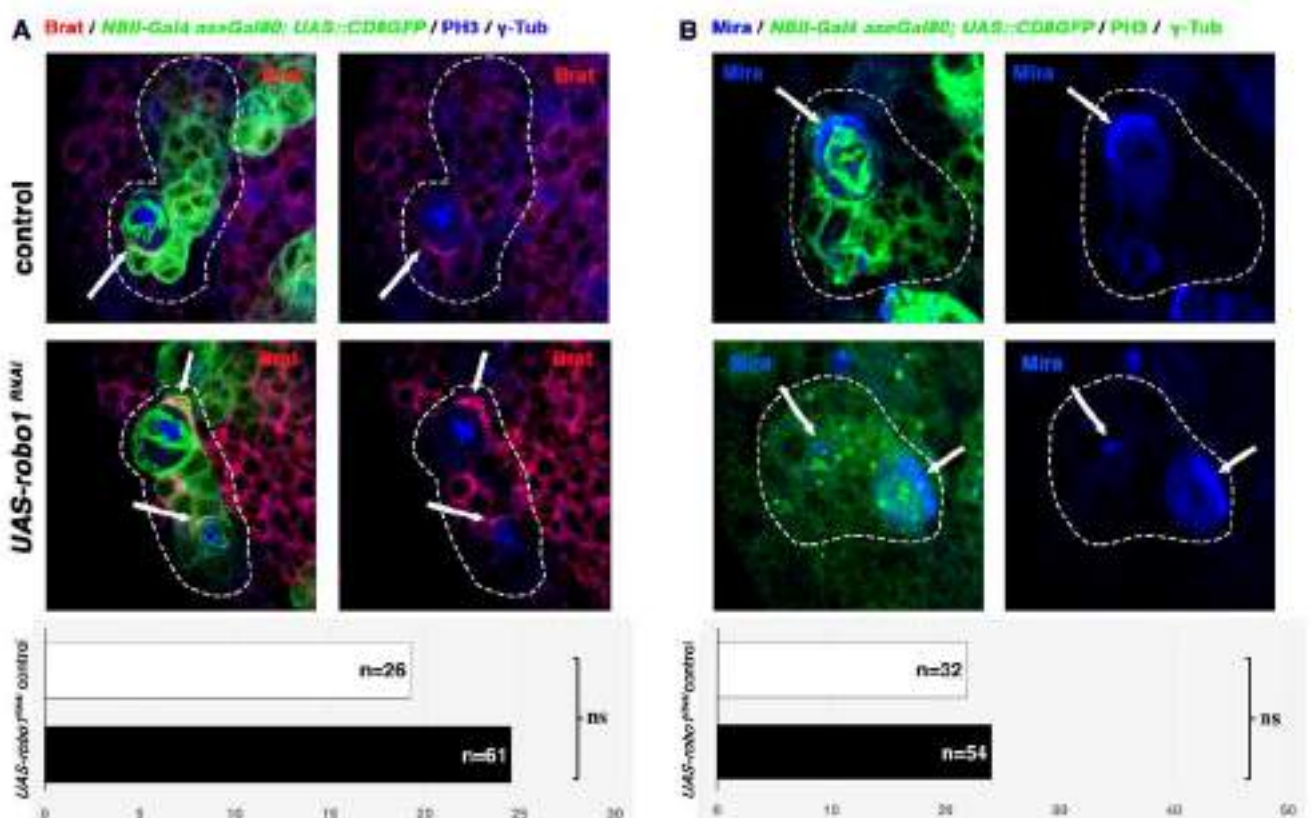


Figura 47. La señalización Slit-Robo1 regula la DCA en las células en división de los linajes de NB de tipo II del cerebro larvario.

La disminución de la expresión de *robo1* en los linajes NBII, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, no afecta a la localización los determinantes de destino celular Brat y Mira (flechas blancas).

Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; PH3 marca las células mitóticas; γ -Tub marca los centrosomas.

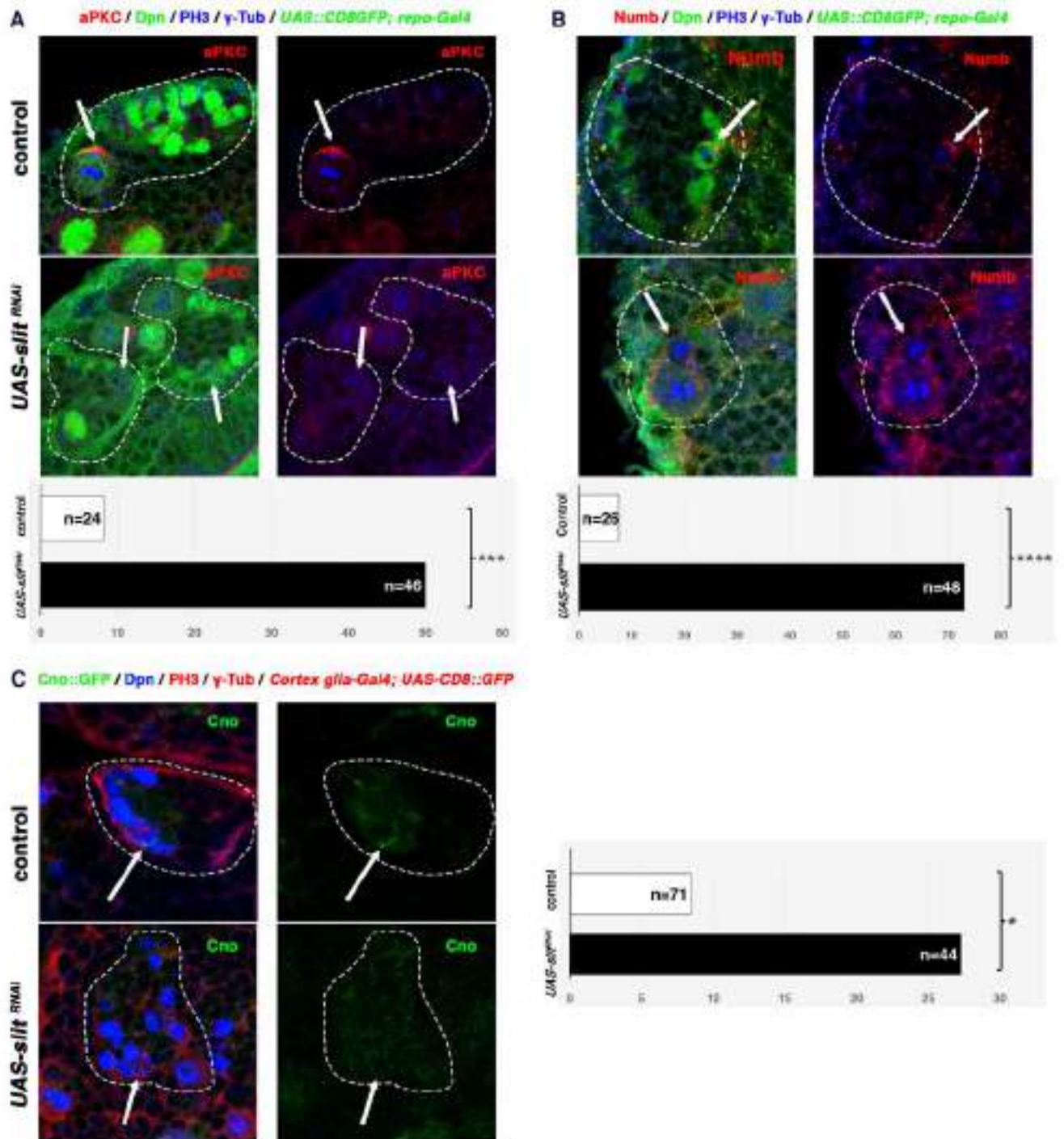


Figura 48. La señalización Slit-Robo1 regula la DCA en las células en división de los linajes de NB de tipo II del cerebro larvario.

La disminución de la expresión de *slit* en la glía cortical, mediante *Akap200NP2222-Gal4*, provoca fallos en la localización de aPKC, Cno y Numb (flechas blancas).

Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; PH3 marca las células mitóticas; γ -Tub marca los centrosomas. Análisis de datos: prueba de chi-cuadrado, *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001; ns, no significativo; n = número de células en división analizadas.

6. Al comprometer la señalización Netrin-Fra o la actividad quinasa de Abl se produce un fenotipo similar durante la DCA a la del mutante de *robo1*

Para apoyar la relación funcional entre Robo1 y Fra, en la que la vía de Fra podría regular los niveles de señalización de Robo1 a través de Abl, decidimos comenzar por analizar la DCA al comprometer los niveles de *fra*. Así, la reducción de la expresión de *fra* en los linajes de NBs de tipo II, condujo a un fenotipo similar al presente al reducir los niveles de *robo1*, detectándose fallos significativos en la localización de las proteínas apicales aPKC y Cno y del determinante de destino celular Numb durante el proceso de DCA de células progenitoras (figura 49). Asimismo, la reducción de los niveles de expresión de los ligandos de Fra, *NetA* y *NetB*, en la glía cortical también condujo a fallos significativos en la localización de aPKC y Numb (respecto a la proteína apical Cno, no pudimos realizar el análisis por falta de herramientas) (figura 50). Por último, quisimos consolidar la posibilidad de que Abl quinasa estuviera implicada, previo reclutamiento por Fra, fosforilando a Robo1 y controlando sus valores umbrales de señalización. Para ello, analizamos la localización de aPKC y Numb tanto en los linajes de NBs de tipo II en los que expresamos la forma de Abl^{KD} con el motivo quinasa inactivo, como tras sobreexpresar *robo1* en dichos linajes (figura 51). Los fenotipos observados fueron similares en ambos genotipos y al que se había detectado al disminuir la expresión de *fra* en los linajes de NBII: fallos de localización de aPKC y Numb en metafase de células progenitoras. En conclusión, la señalización de Netrin-Fra regula a través de Abl quinasa los valores umbrales de señalización de Robo1 necesarios para la correcta disposición de los reguladores de DCA en los NBs y en los INPs en los linajes de NBs de tipo II.

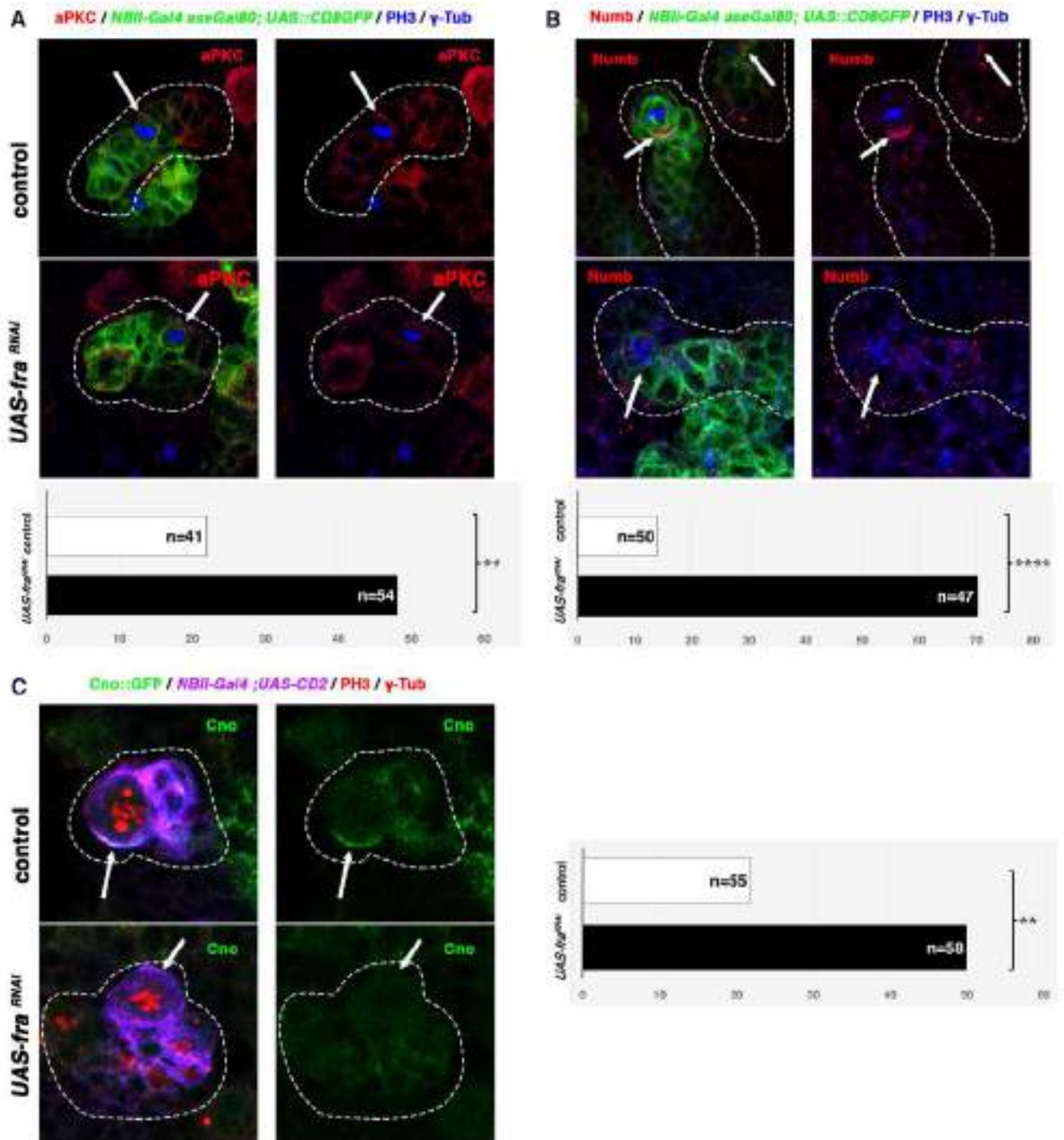


Figura 49. La señalización Netrin-Fra regula la DCA en las células en división de los linajes de NB de tipo II del cerebro larvario.

La disminución de la expresión de *fra* en los linajes NBII, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, provoca fallos en la localización de aPKC y Numb (flechas blancas).

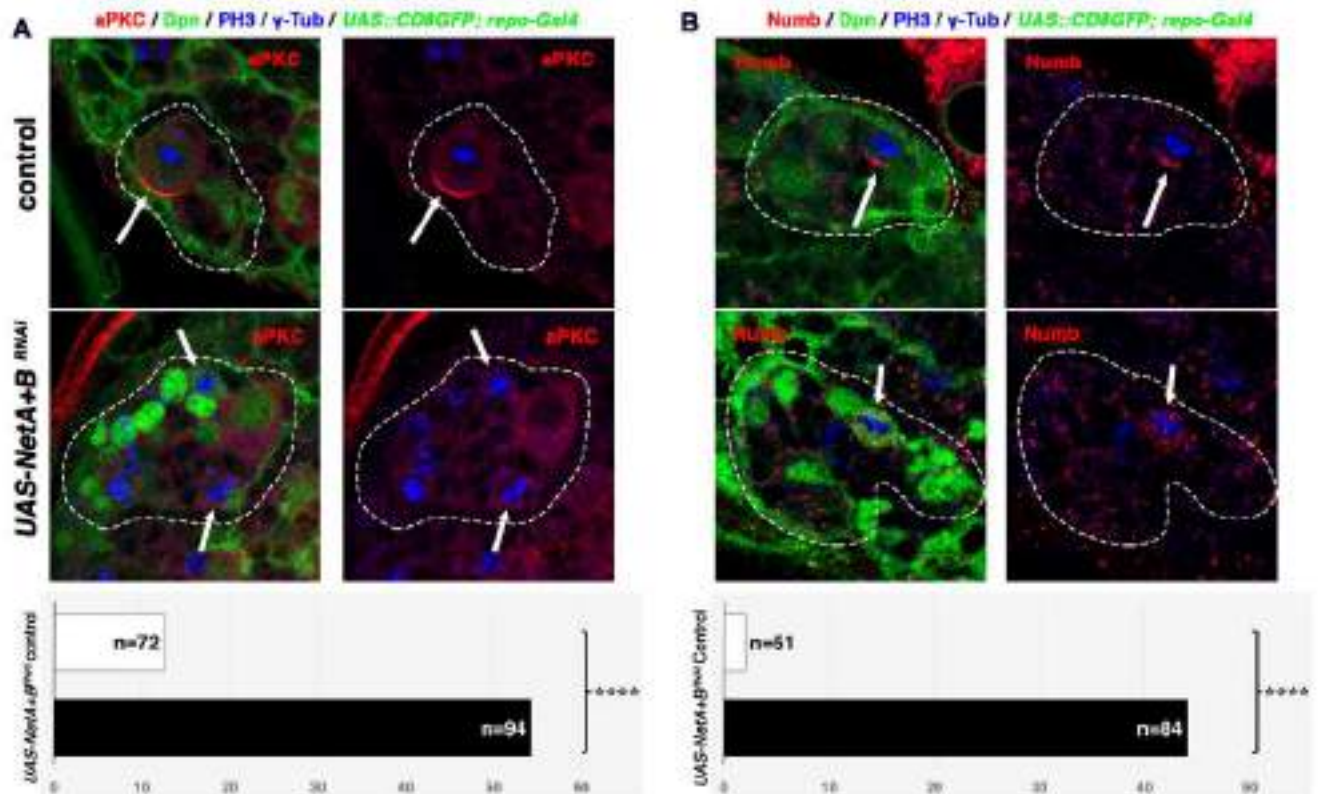


Figura 50. La señalización Netrin-Fra regula la DCA en las células en división de los linajes de NB de tipo II del cerebro larvario.

La disminución de la expresión de *NetA* y *NetB* en la glía cortical, mediante *Akap200NP2222-Gal4*, provoca fallos en la localización de aPKC, Cno y Numb (flechas blancas).

Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; PH3 marca las células mitóticas; γ -Tub marca los centrosomas. Análisis de datos: prueba de chi-cuadrado, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de células en división analizadas

7. El efecto de Robo1 durante la DCA es a través de las pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42.

Llegados a este punto y una vez que demostramos que la señalización de Robo1 está regulando la DCA de los NBs de tipo II y de los INPs, siendo necesaria para el correcto desarrollo de sus linajes, nos cuestionamos de qué forma esta señalización estaba afectando a la correcta localización de las proteínas apicales y la de los determinantes del destino celular (reguladores intrínsecos de DCA). Como se mencionó anteriormente, la localización de Numb está directamente regulada por aPKC por lo que lo que los fallos encontrados de Numb en los progenitores en división podrían ser debidos a los defectos de localización hallados en aPKC después de afectar la señalización de Robo1.

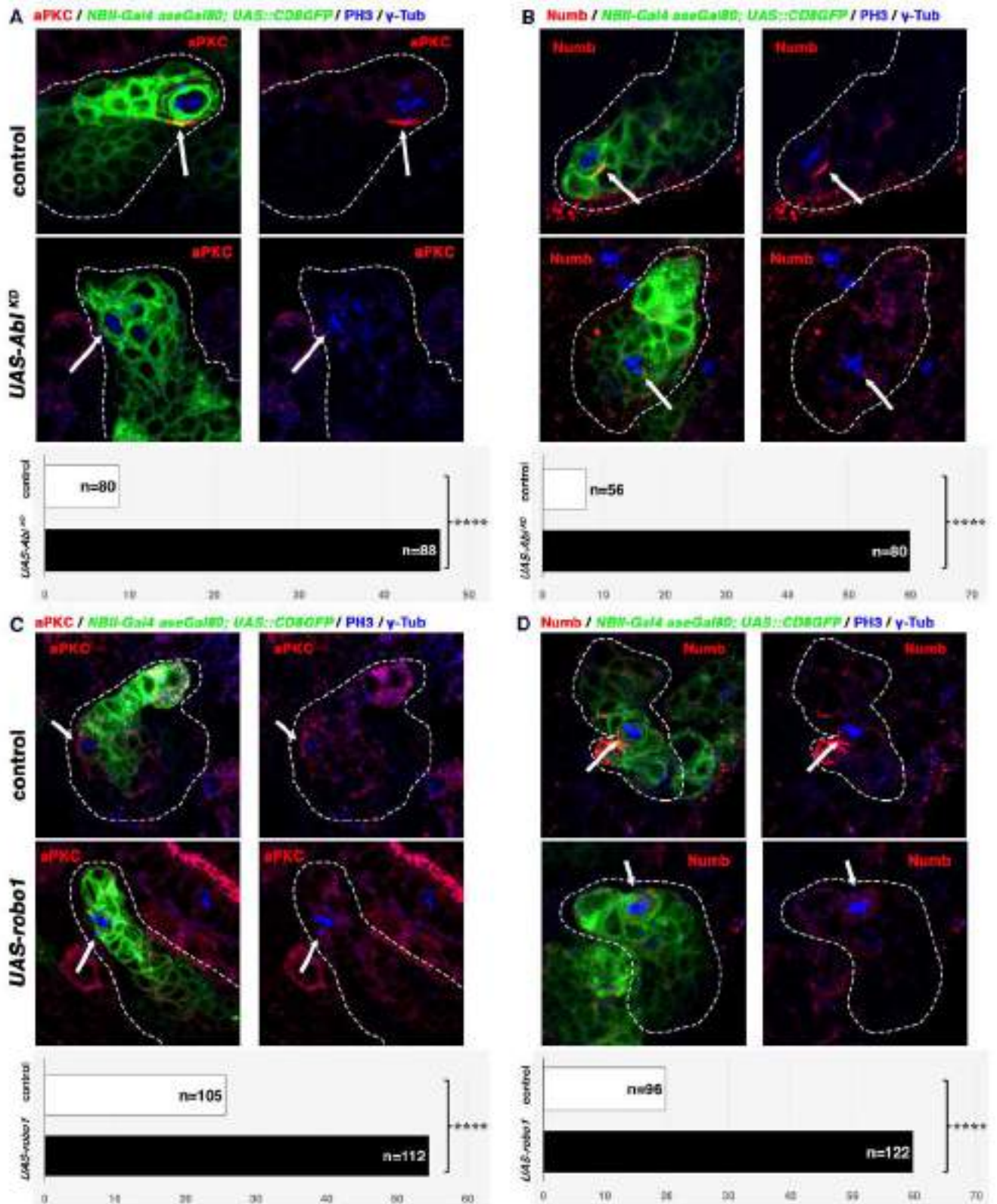


Figura 51. La quinasa Abl regula DCA en las células en división en los linajes de NB de tipo II del cerebro larvario.

(A, B) La expresión de *Abl* con el motivo quinasa inactivo (*Abl*^{KD}) en los linajes NBII, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, provoca fallos en la localización de aPKC, y Numb (flechas blancas).

(C, D) La sobreexpresión de *robo1* en los linajes de NBII, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, provoca fallos en la localización de aPKC y Numb. Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; PH3 marca las células mitóticas; γ -Tub marca los centrosomas. Análisis de datos: prueba de chi-cuadrado, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de células en división analizadas.

Los receptores de Robo son proteínas transmembrana sin actividad catalítica ni enzimática que dependen de moléculas de señalización aguas abajo para mediar su función. Los principales efectores que intervienen en la propagación de las distintas vías de señalización de Robo1 son pequeñas proteínas de unión a GTP (GTPasas) que reorganizan el citoesqueleto modulando la polaridad y el movimiento celular, así como sus proteínas activadoras (activadoras de GTPasas o GAPs), y sus proteínas inhibidoras (los factores de intercambio de los nucleótidos de guanina o GEFs). Así, por ejemplo, la proteína GAP RhoGAP93B y la proteína GEF Son of Sevenless (Sos) interactúan físicamente con Robo1; asimismo, el complejo de serina treonina quinasa p21 (Pak) y su proteína adaptadora Dreadlocks (Dock) se unen directamente al dominio citoplasmático de Robo1 (vía Pak) al unirse el ligando Slit a Robo1, formando todos un complejo multiproteico tanto en *Drosophila* como en mamíferos. Todos estos efectores regulan directamente la actividad de una pequeña GTPasa denominada Rac1. Rac1 participa en distintas funciones a través de la regulación de la dinámica de los diferentes componentes del citoesqueleto, principalmente el de actina y controla la orientación de el huso mitótico y el proceso de DCA en algunas células madre (Lu et al). Por tanto, decidimos analizar si la función reguladora de Robo1 en DCA estaba mediada por Rac1. Para ello comenzamos analizando el efecto de disminuir los niveles de *Rac1* en los linajes de NBs de tipo II empleando dos formas dominantes negativas de *Rac1* (*Rac1^{N17}* y *Rac1^{L89}*). En ambos casos (en *Rac1^{N17}* y *Rac1^{L89}*), se detectaron NBs ectópicos (figura 52). A continuación, se analizaron los mismos reguladores de DCA y de los determinantes del destino celular que habíamos observado afectados en Robo1, aPKC, Cno y Numb, y encontramos defectos significativos en la localización de todos ellos (figura 53 A, B y C). Estos resultados sugerían fuertemente que Rac1 podía estar mediando los efectos de Robo1.

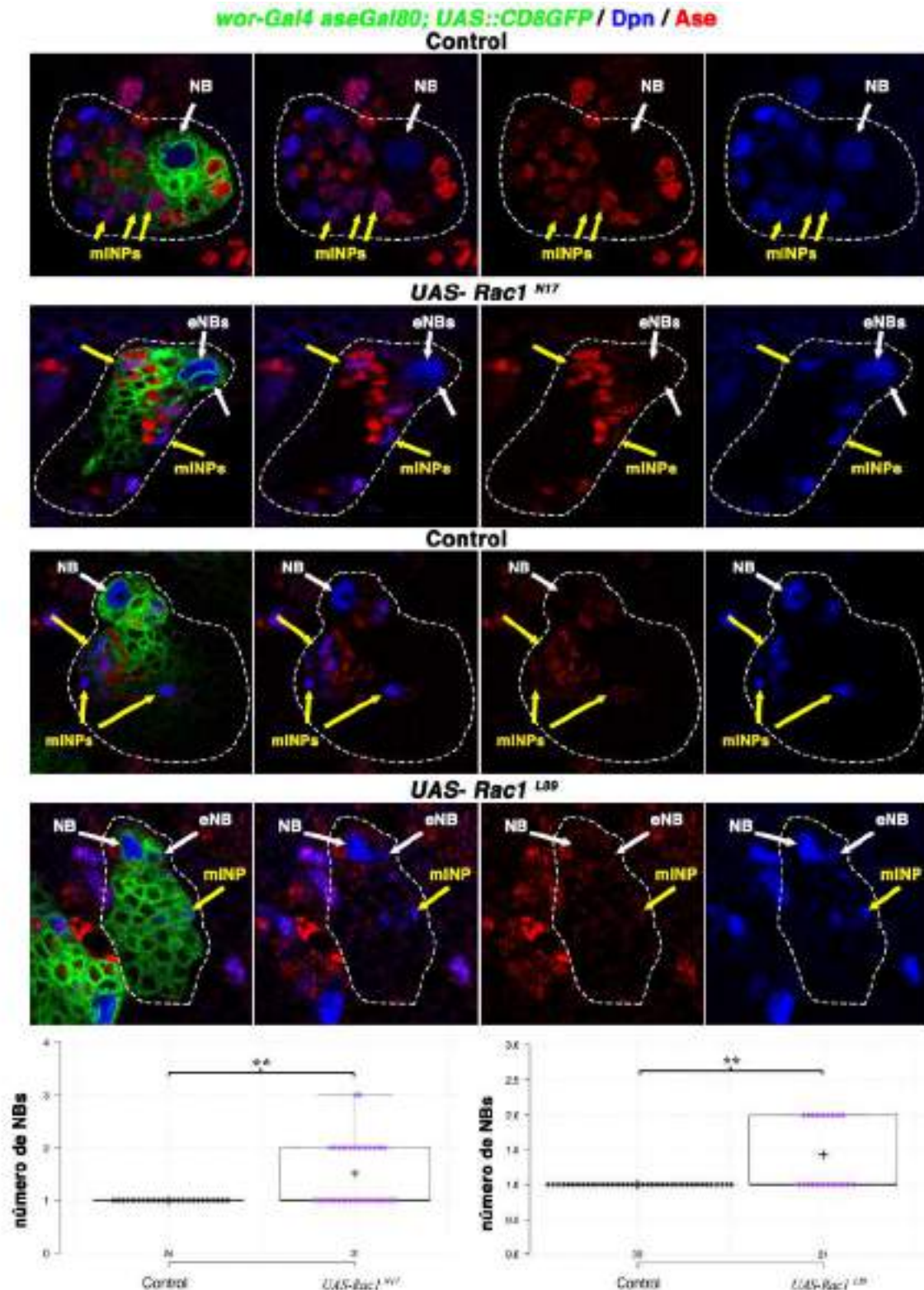


Figura 52. Robo1 regula la DCA de NBs a través de la pequeña GTPasa Rac1.

La expresión de *Rac1^{N17}* o *Rac1^{L89}* (formas dominantes negativas) en los linajes NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, producen eNBs. Los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NBs de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura). Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados

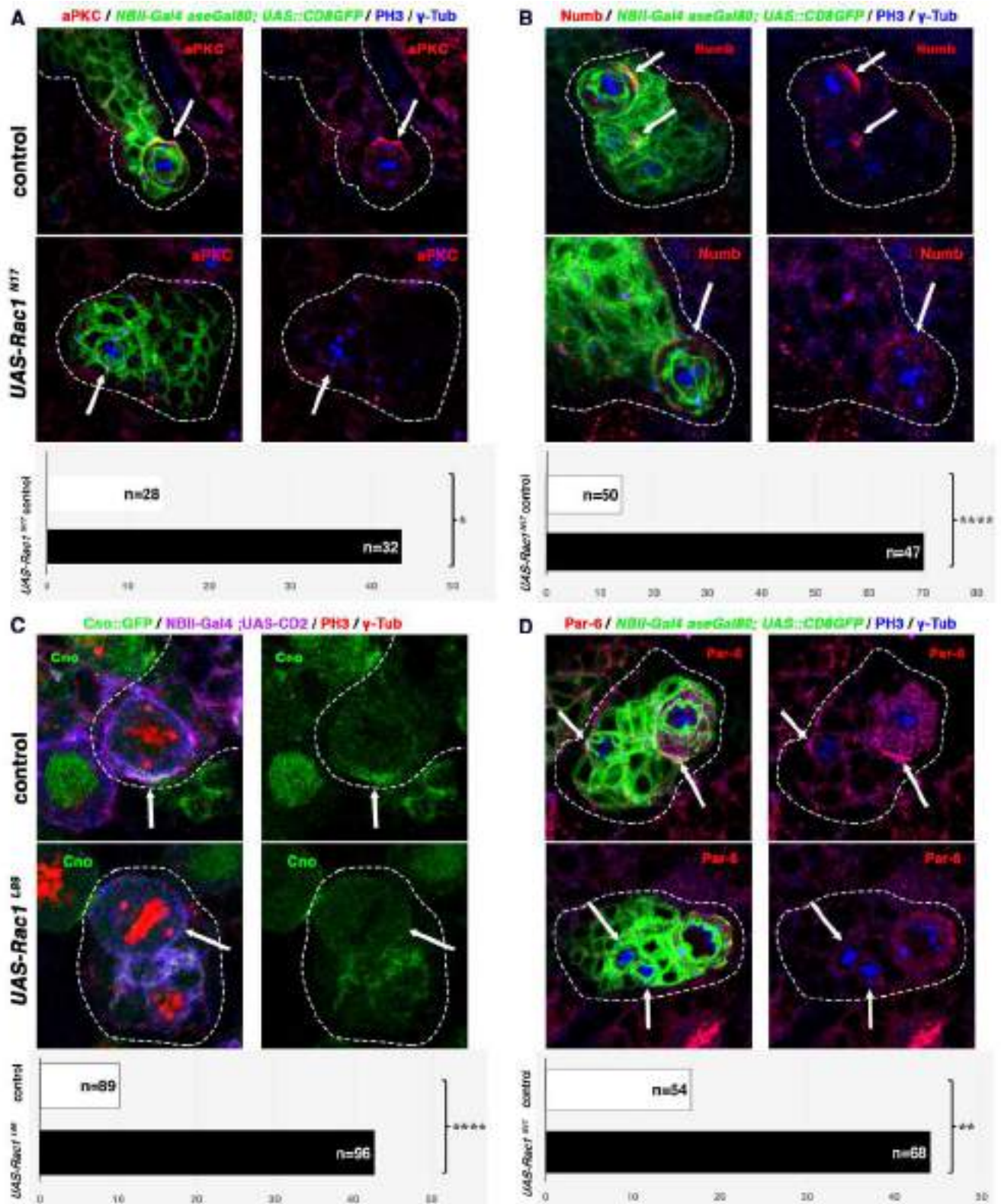


Figura 53. La expresión de formas dominantes negativas de Rac1 (*Rac1^{N17}* o *Rac1^{L89}*) produce defectos en el proceso de DCA en los linajes de NB de tipo II.

(A, B y C) La expresión de las formas dominantes negativas de *Rac1^{N17}* y *Rac1^{L89}* en los linajes de NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, muestra fallos de localización de aPKC, Cno y Numb (flechas blancas). (D) La expresión de la forma dominante negativa de *Rac1^{N17}* en los linajes de NB de tipo II mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, muestra fallos de localización de Par-6 (flechas blancas). Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; PH3 marca las células mitóticas; γ -Tub marca los centrosomas. Análisis de datos: prueba de chi-cuadrado, *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001; ns, no significativo; n = número de células en división analizadas

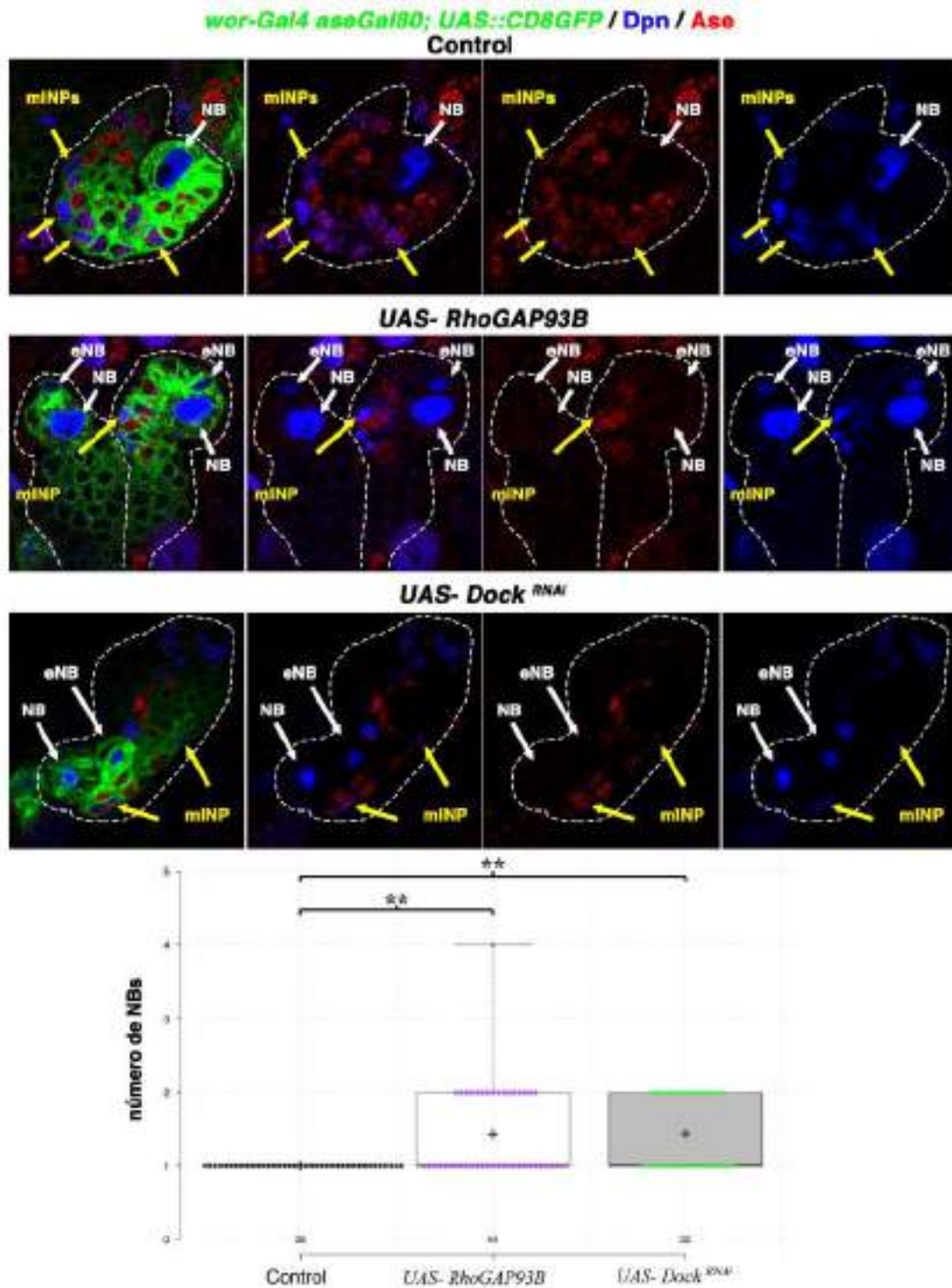


Figura 54. Robo1 regula la DCA a través de RhoGAP93B y Dock, reguladores de Rac1.

La sobreexpresión del inhibidor de *Rac1* *RhoGAP93B* o la disminución de la expresión de *Dock* (*Dock^{RNAi}*) en los linajes de NB de tipo II mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, produce eNBs. Los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NBs de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura). Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

Para reforzar estos resultados, analizamos si los efectores de Robo1 y reguladores de Rac1, previamente mencionados, estaban participando en la regulación de la DCA. La reducción de la expresión de Dock o Pak, con efecto positivo en Rac1, y la sobreexpresión RhoGAP93B, inhibidor de Rac1, condujo en los linajes de NBs de tipo II al mismo fenotipo, presencia de NBs ectópicos en dichos linajes de NBs (figura 54 y 55). Sin embargo, no se observaron defectos significativos (NBs ectópicos) al reducir la expresión de Sos en los linajes de NBII (figura 55). De esta forma, pudimos concluir que la señalización Slit-Robo1 estaba regulando la actividad de Rac1 a través de la reclusión e inhibición de RhoGAP93B (como ocurre en otros sistemas), que reprime a Rac1, así como de la reclusión del complejo Dock-Pak, que en otros sistemas está descrito que actúa aumentando la actividad de Rac1.

Otro miembro de la familia Rho-GTPasa diana de los efectores de señalización de Robo1 RhoGAP93B y de Pak es Cdc42 que, entre otras funciones, regula la expresión génica y la dinámica del citoesqueleto de actina. También, y más relevante en nuestro contexto, es un importante regulador de DCA, cuya actividad juega un papel esencial en el establecimiento de la polaridad celular de los NBs . Cdc42 recluta a Par-6/aPKC en la corteza apical, aguas abajo de la actividad de Baz, y forma el complejo apical a través de su unión directa al dominio CRIB-PDZ de Par-6. De hecho, la expresión de un dominante negativo de *Cdc42* (*Cdc42^{NI7}*) en los clones de NBII condujo a la presencia de NBs ectópicos dentro del clon (figura 56), como también a fallos en la localización de los reguladores de DCA aPKC, Cno y Numb (figura 57).

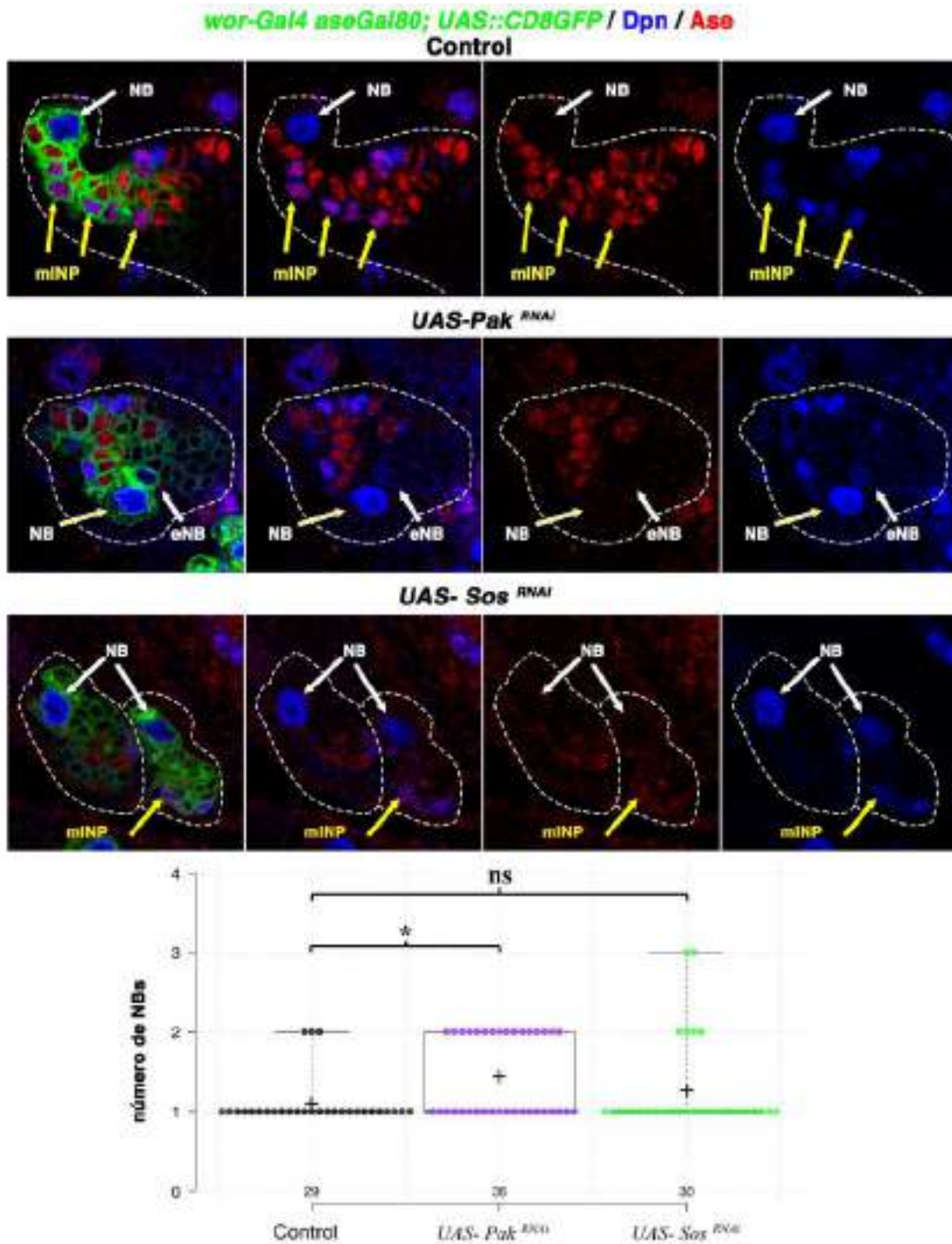


Figura 55. Robo1 regula la DCA de NBs a través de Pak pero no de Sos, ambos reguladores de Rac1.

La disminución de la expresión de *Pak* (*Pak^{RNAi}*) en los linajes de NB de tipo II mediante *wor-Gal4 aseGal80*, produce eNBs. Sin embargo, la disminución de la expresión de *Sos* (*Sos^{RNAi}*) no muestra defectos significativos. Los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NBs de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura).

Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

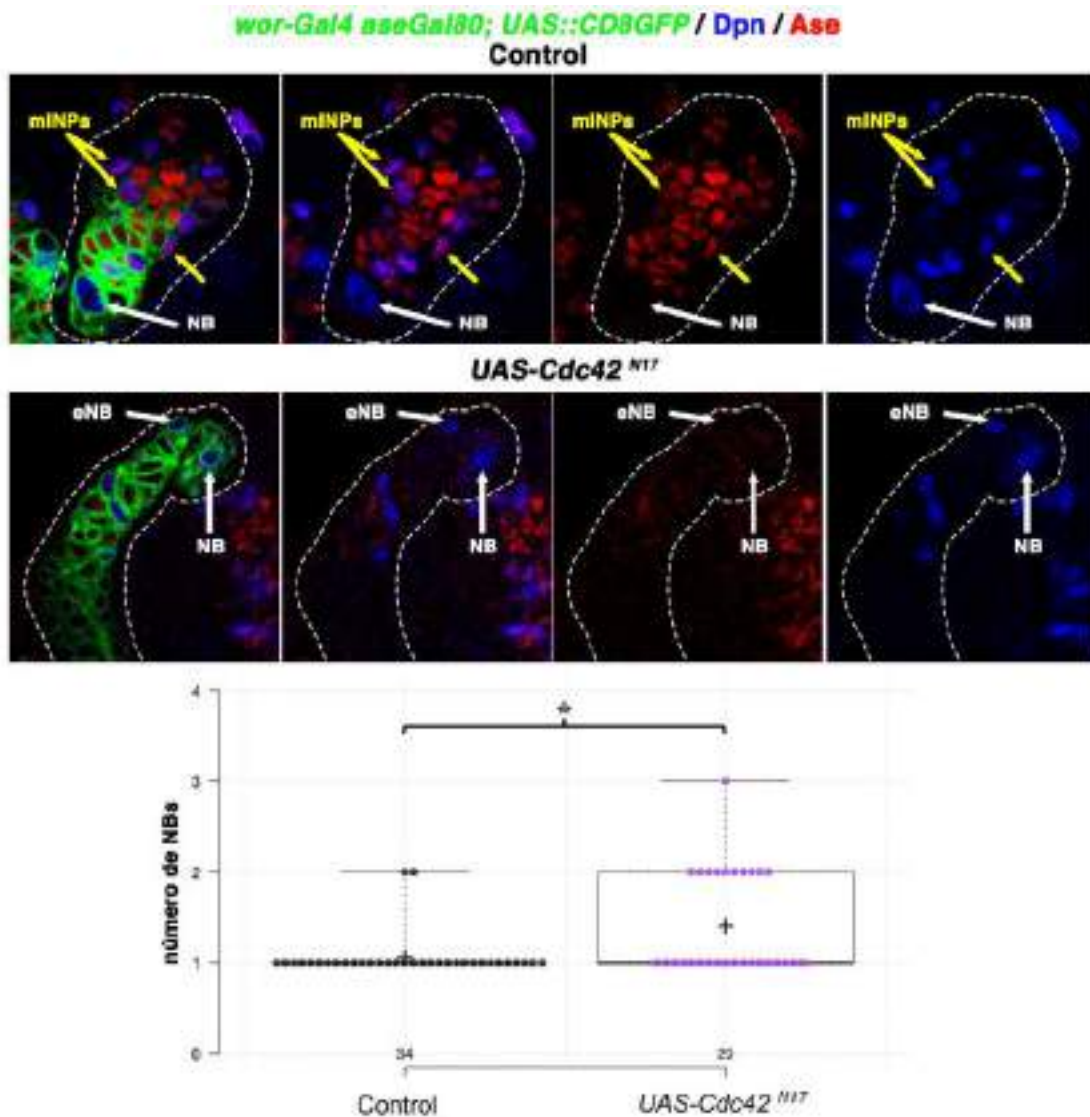


Figura 56. Robo1 regula la DCA de NBs a través de la pequeña GTPasa *Cdc42*.

La expresión de *Cdc42^{N17}* (forma dominante negativa) en los linajes NB de tipo II mediante *wor-Gal4 aseGal80*, producen eNBs.

Los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NBs de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura).

Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

Una vez que vimos y comprobamos que a través de los efectores de la señalización de Robo1 (RhoGAP93B y Pak) existe un vínculo directo con *Cdc42*, regulador de DCA en NBs, y que de esta forma podrían explicarse los fallos encontrados al modificar los niveles de Robo1 en los linajes de NBs de tipo II, nos preguntamos de qué forma Rac1 estaba actuando en el proceso de DCA de NBs de tipo II y de los INPs del clon, puesto que tal función para esta GTPasa en dicho proceso no había sido previamente descrita.

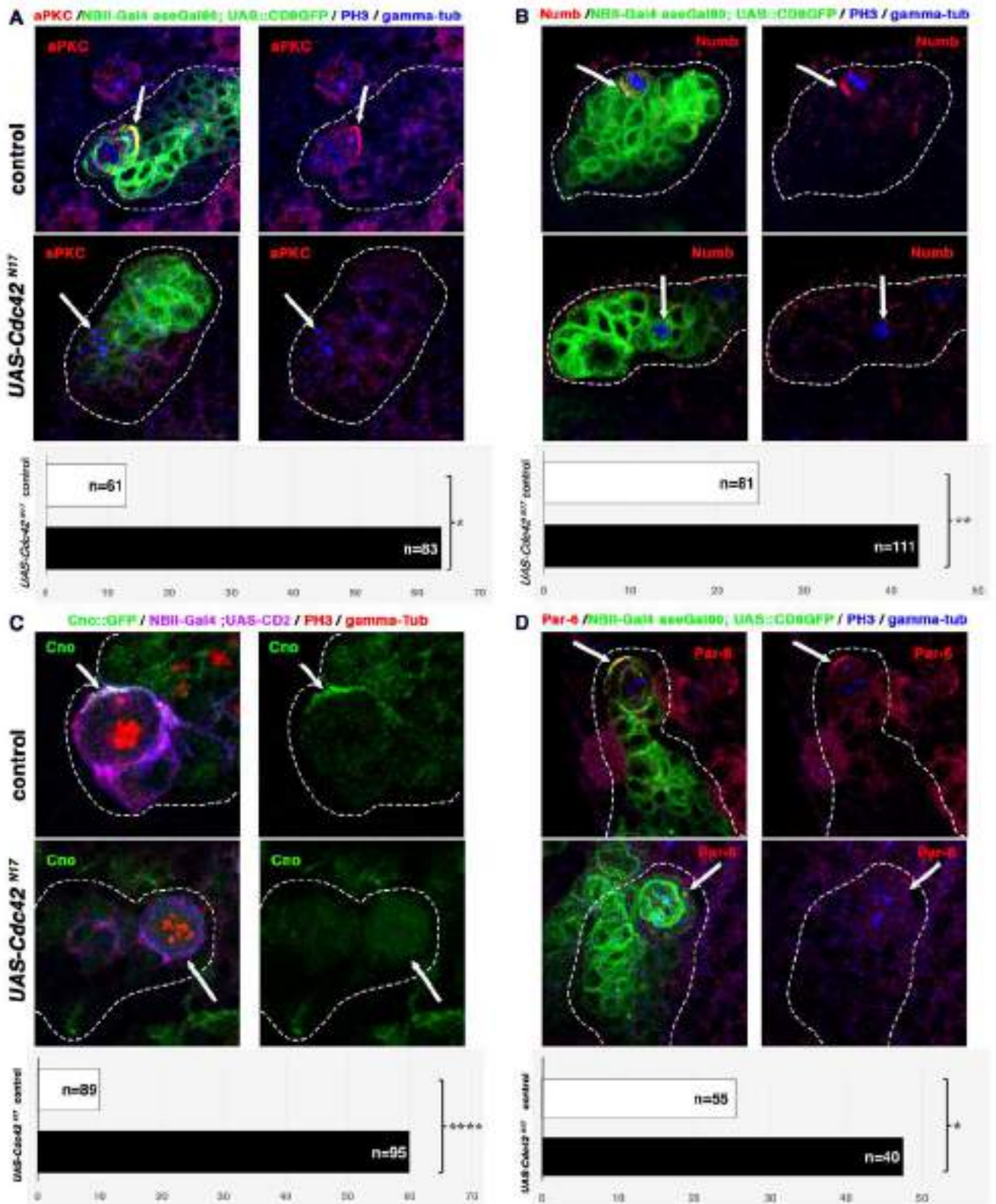


Figura 57. La expresión de la forma dominante negativa de *Cdc42* (*Cdc42^{N17}*) produce defectos en el proceso de la DCA. (A, B y C) La expresión de la forma dominante negativa de *Cdc42^{N17}* en los linajes de NB de tipo II mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, muestra fallos de localización de aPKC, Cno y Numb (flechas blancas). (D) La expresión de la forma dominante negativa de *Rac^{N17}* en los linajes de NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, muestra fallos de localización de Par-6 (flechas blancas). Los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NBs de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura). Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, *p < 0,05, **p < 0,01, *p < 0,001, ****p < 0,0001; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.**

bibliografía que, en las células epiteliales de mamíferos, ambos Rac1 y Cdc42 se unen físicamente a Par-6 que, como se ha descrito anteriormente, pertenece al complejo apical. Por tanto, Par-6 suponía un posible nexo de unión entre las GTPasas y el resto del complejo (aPKC, Par-3/Baz). Para comprobarlo, decidimos analizar la localización de Par-6 después de expresar las formas negativas de *Rac1* (*Rac1^{N17}*) y *Cdc42* (*Cdc42^{N17}*) en los linajes de NBs de tipo II (figura 53 D, 57 D); en ambos casos encontramos fallos de localización de Par-6 durante la metafase de células progenitoras (NBs de tipo II e INPs) del linaje, por lo que Rac1 estaría vinculado directamente con el regulador de DCA Par-6. Este resultado explicaría la presencia de NBs ectópicos al perturbar la señalización de Robo1.

Con el fin de integrar estos últimos datos y entender la similitud de estos fenotipos y los de la falta de función de *robo1* (NBs ectópicos y fallos en los reguladores de DCA aPKC y Numb) con el fenotipo de la ganancia de función de *robo1* en los linajes de NBs de tipo II, decidimos analizar el efecto de las formas activadas de *Rac1* (*Rac^{V12}*) y *Cdc42* (*Cdc42^{V12}*) en los linajes de NBs de tipo II (figura 58). Mientras que la expresión de *Cdc42^{V12}* no presentó diferencias de fenotipo frente al control, la expresión de *Rac1^{V12}* mostró un aumento muy significativo en el número de NBs dentro del clon, y también dio lugar a defectos de localización de aPKC (figura 59). Por tanto, un exceso de señalización de Robo1 y consecuente sobreactivación de Rac1 sería tan deletérea como la falta/disminución de Robo1 y actividad de Rac1.

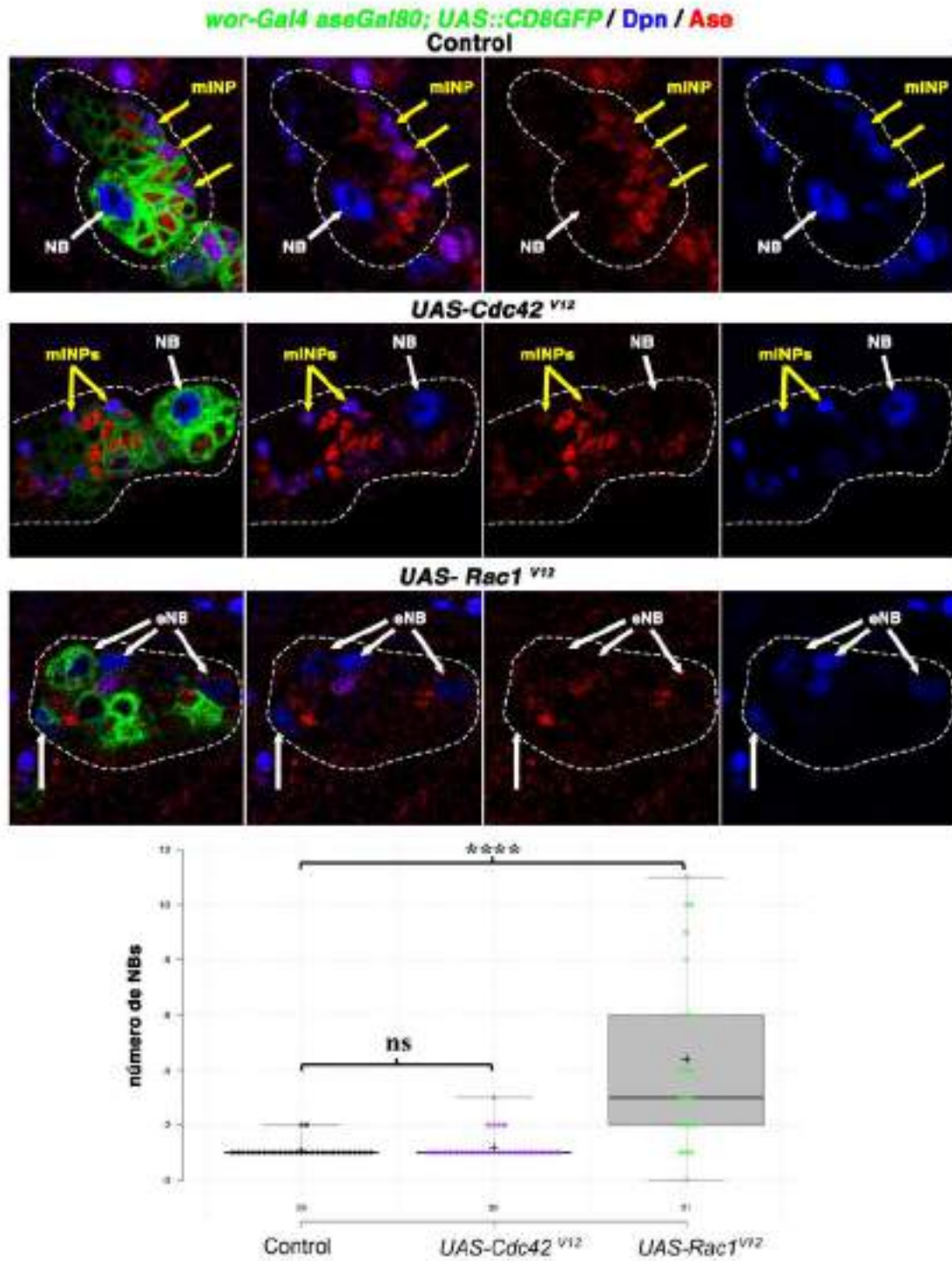


Figura 58. Robo1 regula la DCA de NBs a través de la pequeñas GTPasas *Rac1* y *Cdc42*.

La forma activada de Rac1 (*Rac1^{V12}*) en los linajes de NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, produce NBs ectópicos, pero la forma activada de Cdc42 (*Cdc42^{V12}*) no produce Nbs ectópicos.

Los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NBs de tipo II; los NB/eNB son Dpn+ Ase- (azul), y los INP maduros (mINP) son Dpn+ Ase+ (púrpura).

Análisis de datos mostrados en los gráficos de dispersión: prueba U no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001; ns, no significativo; n = número de linajes NB analizados.

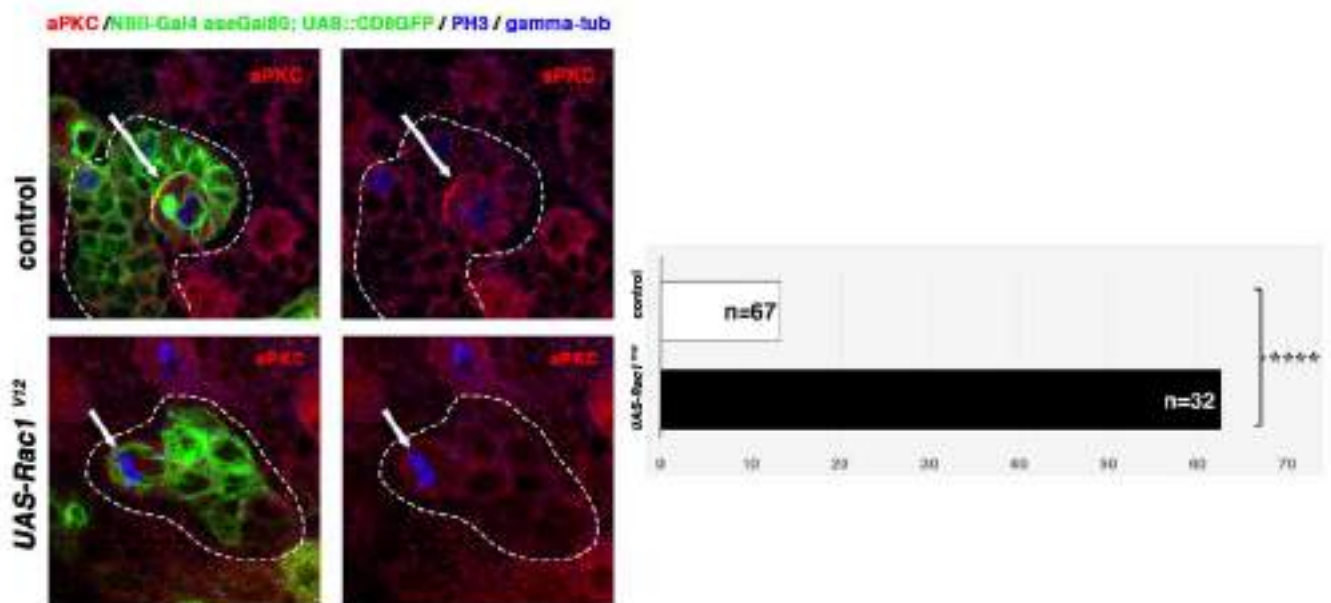


Figura 59. La forma constitutivamente activada de *Rac1* (*Rac1^{V12}*) produce fallos en el proceso de DCA.

La forma activada de *Rac1* (*Rac1^{V12}*) en los linajes de NB de tipo II, mediante *wor-Gal4 ase-Gal80*, provoca fallos en la localización de aPKC.

Todos los paneles muestran micrografías confocales de linajes de NB de tipo II; PH3 marca las células mitóticas; γ -Tub marca los centrosomas.

Análisis de datos: prueba de chi-cuadrado, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns, no significativo; n = número de células en división analizadas.

DISCUSIÓN

La minuciosa y rigurosa regulación de DCA de células madre es crucial durante el desarrollo, durante el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos como también en el contexto de tumorigénesis. Los mecanismos moleculares y celulares responsables de llevar a cabo con éxito este proceso, son los denominados mecanismos intrínsecos o extrínsecos, anteriormente descritos. Las señales extrínsecas procedentes de microambientes especializados, los nichos, colaboran de forma muy importante en la correcta regulación procurando el destino de célula madre a la célula hija que recibe estas señales, frente a la otra célula hija que pasa a no estar en contacto con el nicho, no recibe estas señales y entra en un programa de diferenciación.

En la mayoría de los sistemas que han sido bien caracterizados, las células madre residen en un nicho, siendo así, por ejemplo, en los testículos y los ovarios de *Drosophila* donde las células madre de la línea germinal se adhieren a microambientes locales formados por un grupo de células somáticas y quiescentes, que le proporcionan información esencial para su mantenimiento a través de la señalización paracrina de JAK-STAT y la señalización BMP respectivamente. Curiosamente, algunas células madre parece que llevan a cabo el proceso de DCA a través de mecanismos intrínsecos exclusivamente. En los túbulos de Malpighi de los adultos de *Drosophila* (órgano similar al riñón), las células madre renales y nefríticas (RNSCs) no se anclan a ningún tipo de célula en particular y están dispersas por la región de los túbulos inferiores y los uréteres. Las RNSCs se dividen asimétricamente dando lugar a otra RNSC y a un Renoblasto (RB) donde la señalización autocrina JAK-STAT regula la autorrenovación de las RNSCs y la señalización intrínseca de Notch se activa en los RBs promoviendo su diferenciación. De igual modo, siempre se ha considerado que la DCA de las células madre neurales del SNC de *Drosophila*, los

NBs, que han sido objeto de este estudio, dependen exclusivamente de los complejos de proteínas apicales que regulan la polaridad celular y de los determinantes del destino celular, es decir, de mecanismo de regulación intrínsecos. Al menos, hasta ahora no se ha identificado ninguna señal extrínseca que regule su DCA. Pero curiosamente, en el cerebro larvario de *Drosophila*, los NBs están en contacto directo con la glía cortical y mantienen la posición a lo largo de su desarrollo, habiendo un intercambio de señales bidireccionales que permiten, por una parte, la salida de quiescencia de los NBs reactivando su división con el consecuente el crecimiento de sus linajes, y por otra el correcto desarrollo y formación de la glía cortical. Así que, ¿son los NBs completamente independientes de su entorno en el proceso de DCA? ¿cómo de general es el requisito de los nichos y por lo tanto de su secreción de señales en el mantenimiento de la autorrenovación y en el estado de célula madre, en la DCA?

Durante el desarrollo de este estudio hemos visto que la DCA de los NBs de *Drosophila*, que han sido durante años un paradigma tradicional para el estudio de los mecanismos reguladores intrínsecos de DCA, también depende de señales extrínsecas secretadas por la glía cortical que está en estrecho contacto con los linajes de las células madre en el cerebro larvario y por lo tanto está actuando como un nicho. No obstante, estas señales extrínsecas no son necesarias para el mantenimiento del estado de célula madre de una de las células hijas, sino que, en última instancia, inciden en la regulación de los mecanismos intrínsecos para inducir diferenciación en una de las células hijas, reprimiendo el estado basal de autorrenovación de esta célula. A pesar de que distintos trabajos han demostrado que, en cultivos de NBs larvarios aislados, estos son capaces de dividirse asimétricamente y de formar semilunas de diferentes proteínas apicales y de algunos determinantes de destino celular sin necesidad de ninguna señal ni mecanismo de regulación extrínseco,

existen diferentes aspectos a tener en cuenta respecto a esto. En la mayoría de estos estudios se han utilizado NBs de tipo I del cerebro central en los que en nuestros análisis hemos demostrado que para su correcto desarrollo no es necesaria la señalización de Fra y Robo1. Otros estudios han utilizado en sus cultivos NBs del lóbulo óptico y estos provienen de la transformación de células neuroepiteliales a NBs de forma postembrionaria (en la etapa larvaria) por medio de la ola de expresión de los genes proneurales, a diferencia de los NBs del cerebro central que se originan durante la embriogénesis mediante delaminación del neuroectodermo bajo el control de genes proneurales y neurogénicos, por lo que el origen es totalmente distinto. Además, en este trabajo estos NBs no han sido analizados, de manera que podrían no necesitar tampoco la señalización de la glía cortical durante el proceso de DCA como en el caso de los NB de tipo I. Los NB de tipo II y los INPs, que son las células madre y progenitoras en las que hemos centrado nuestra investigación y en los que hemos demostrado que sí dependen de señales extrínsecas, se incluyeron en uno de los estudios de los cultivos celulares concluyendo que tanto los NB de tipo II como los INPs pueden localizar el marcador apical Baz y el determinante de destino celular basal Pon. Existen diferentes aspectos a considerar para entender qué puede estar sucediendo. En nuestro estudio in vivo hemos encontrado que las proteínas reguladoras apicales Par6, aPKC y Cno y el determinante del destino celular Numb están gravemente afectadas al alterar la señalización Fra-Robo1 en los NBs de tipo II y en las células progenitoras mediada por las señales de la glía Netrin y Slit, es decir al alterar o eliminar las señales extrínsecas. En cambio, no se han encontrado fallos significativos en Insc, Mira y Brat, que son los reguladores que se han analizado con mas frecuencia en los estudios de cultivo de NBs de tipo II. Además, en nuestro análisis in vivo no hemos analizado otros reguladores de DCA que forman semilunas en los experimentos en cultivo como Baz, Pins, Dlg o Pon, y su localización

podría no necesitar señales extrínsecas para su correcta formación y localización y, por lo tanto, tampoco estarían afectados en nuestro sistema como en el caso de *Insc*, *Mira* y *Brat*. Por otra parte, es muy importante cuantificar adecuadamente la formación de las semilunas en el momento clave de la DCA, en metafase, periodo en el que las proteínas reguladoras de los complejos apicales excluyen a las proteínas determinantes del destino celular al polo basal. Realizar la cuantificación en esta etapa es crucial ya que los fenotipos de los fallos de localización de los reguladores de DCA que hemos encontrado no son totalmente penetrantes; por ejemplo, en nuestro sistema *aPKC* y *Cno* presentaron alrededor del 50% y *Numb* aproximadamente el 35%, de fallos de localización en metafase, habiendo NBs de tipo II y mINPs que no mostraban defectos presentando semilunas correctamente formadas en metafase. Posteriormente, en la telofase, distintos mecanismos como el de “rescate en telofase”, podrían restaurar de forma autónoma la localización de los reguladores de DCA analizados. Resulta bastante sorprendente que las señales secretadas por la glía sean necesarias específicamente en los linajes de los NBs de tipo II y no en los NBs de tipo I. Esto puede ser debido a que, como hemos visto anteriormente, presentan un paso de amplificación (INPs) que da como resultado linajes mucho más grandes y complejos, con alta capacidad proliferativa, que los hace mucho más susceptibles a inducir un crecimiento exponencial de tipo tumoral cuando falla la DCA. Por lo que en estos linajes han podido evolucionar mecanismos adicionales de control para garantizar que el proceso de DCA en los NBs y los INPs sea correcto, como también, para que el destino celular sea el adecuado, con el fin de evitar que se produzca sobrecrecimiento o formación de tumores. Siguiendo esta línea, los defectos de localización encontrados de *aPKC* pero no del determinante de destino celular *Mira* cuya localización depende de la fosforilación de *aPKC*, tras alterar la señalización de *fra* o *robo1* en los linajes de NBs de tipo II podrían explicarse también por estos mecanismos

reguladores específicos que operan en los linajes de NB de tipo II. Se ha demostrado que la localización de Mira requiere de moduladores independientes de aPKC. Del mismo modo, tampoco se han encontrado fallos de localización de Brat, que depende de su proteína adaptadora Mira, tras disminuir la expresión de *robo1*. Todo esto deja abiertas una serie de preguntas que serían muy interesante seguir estudiando y aclarando para mejorar la comprensión de este proceso y los mecanismos de regulación que participan en este sistema.

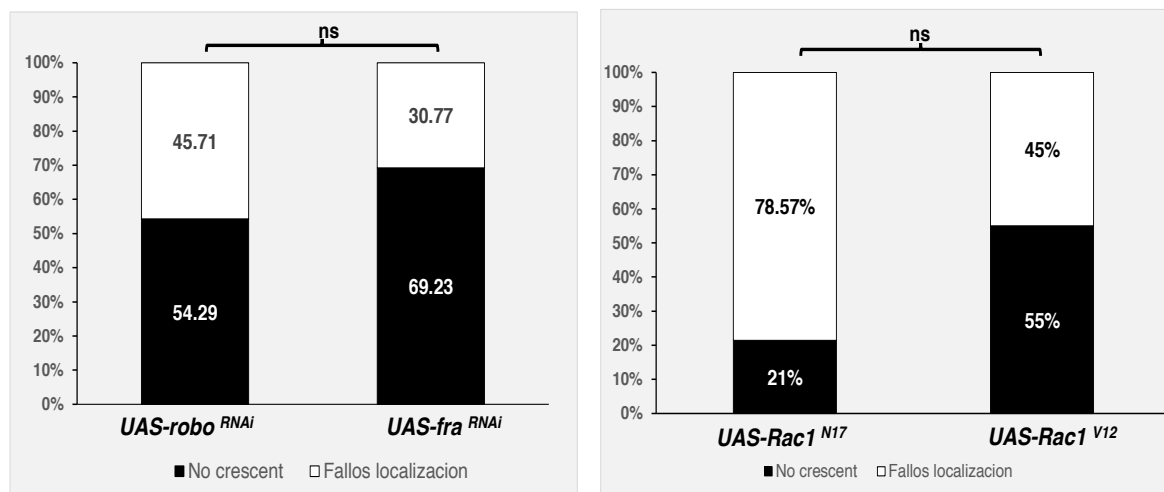


Figura 60. Comparativa de tipos de fallos de aPKC al disminuir la expresión de *robo1* o de *fra* y al disminuir o activar constitutivamente Rac1.

(A) La disminución de expresión de *robo1* y *fra* produjo fallos similares en ambos casos.

(B) La sobreexpresión de *Rac1^{V12}* y la expresión de la forma negativa *Rac1^{N17}* condujo a tipo de fallos que no son significativamente distintos.

Análisis de datos: prueba de chi-cuadrado, *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001; ns, no

En este estudio se ha puesto de manifiesto una nueva función de las señales de la glía Netrin-A y Netrin-B y la de su receptor Fra en el proceso de DCA, concretamente regulando el fino e importante equilibrio que existe entre autorrenovación versus diferenciación en las células madre y en los progenitores intermedios neurales de los

linajes de NBs de tipo II. La glía cortical envuelve a los linajes de las células neurales del cerebro larvario de *Drosophila*, comportándose como un nicho puesto que segrega señales que afectan al comportamiento y al desarrollo de estos linajes procurando que sea exitoso. Las Netrinas, son segregadas por la glía cortical y señalizan a través de su receptor Fra y de la quinasa citoplasmática Abl, con el fin de modular los niveles umbrales de señalización del receptor Robo1 en los NBs de tipo II y en las células progenitoras intermedias (INPs). Slit, en cambio, que también es segregado por la glía cortical, activa la señalización de Robo1, y Abl inhibe esta señalización mediante la fosforilación de Robo1, regulando así los niveles de señalización de Robo1 que resultan críticos para determinar el destino celular de la célula hija.

Los NBs de tipo II se originan durante la embriogénesis y después de unas rondas de divisiones entran en un estado de quiescencia antes de finalizar esta etapa. Durante el desarrollo larvario, final de L1 comienzo de L2, estos NBs reactivan su ciclo celular gracias a las señales nutricionales que segrega la glía y empiezan a desarrollar sus linajes. Durante este tiempo la glía también se está desarrollando y sufre un proceso de remodelación dinámica a lo largo de los estadios larvarios, que consta de tres fases: expansión, encapsulamiento y extensión, y hasta finales de L3 no forma en su totalidad las cámaras que envuelven a los linajes, al finalizar la fase de extensión. En este caso, ya se observa la presencia de las señales NetrinA y Slit en la glía cortical durante la fase L2 (figura 61), lo que sugiere que estas señales ya están siendo secretadas por la glía desde la reactivación de los NBs (a principio de L2)

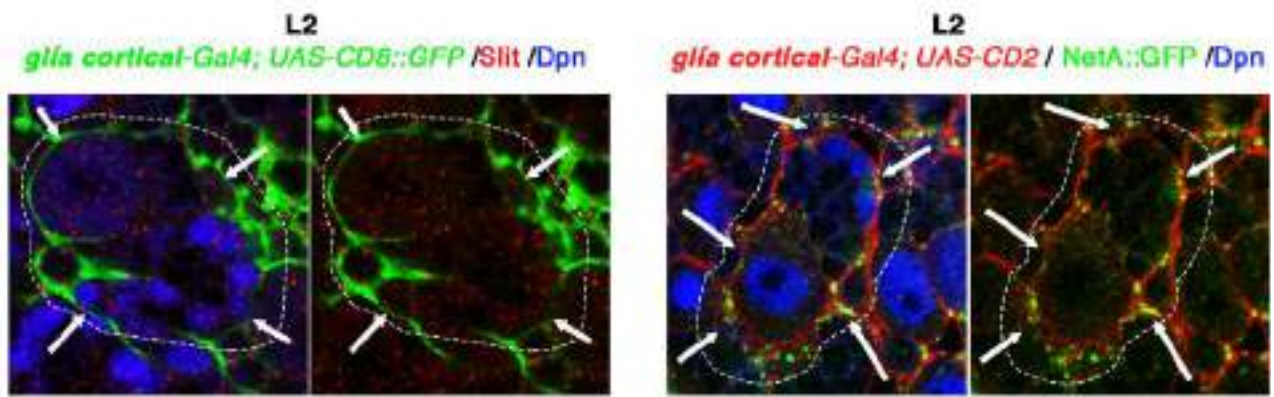


Figura 61. Slit y NetA son secretadas por la glía cortical desde L2.

Los ligandos Slit (rojo) y NetrinA (verde) están presentes en la glía cortical (flechas blancas) en estadio larvario temprano (L2) también se detectan y son secretados a los linajes de NB de tipo II, dentro de los cuales también se detectan (flechas blancas). Glía cortical marcada en verde, mediante *Akap200NP2222-Gal4; UAS-CD8::GFP*, y en rojo, mediante *Akap200NP2222-Gal4; UAS-CD2*.

La señalización Slit-Robo tiene un papel fundamental durante la neurogénesis del SNC de mamíferos, modela la dinámica de las células progenitoras ventriculares en la corteza cerebral de forma autónoma, regulando así el fino equilibrio entre el mantenimiento de progenitores y la producción de neuronas. Durante la neurogénesis, los progenitores primero se dividen de forma simétrica para aumentar el número de células en división y posteriormente se dividen asimétricamente para autorrenovarse dando lugar a otra célula progenitora y para generar nuevas neuronas. La señalización de Slit-Robo regula la proliferación de estas células progenitoras promoviendo su autorrenovación de forma que la pérdida de los receptores Robo1/2 como la de la señalización de Slit, produce una reducción de la autorrenovación de los progenitores y un aumento de células hijas diferenciadas. En cambio, en nuestro sistema el efecto de la señalización de Slit-Robo1 es justamente el contrario. Hemos visto que la pérdida tanto de Robo1 como de Slit dan lugar a un aumento de células progenitoras, habiendo un aumento de NBs de tipo II y de mINPs en el linaje, por lo que esta señalización sería necesaria para inducir diferenciación en una de las células hijas, tanto en el INP tras la división del NB, como en la GMC tras la división del INP. Curiosamente nuestros resultados siguen la línea de los observados

por Andrews y su equipo, en el que vieron un aumento de interneuronas progenitoras en la corteza de ratones mutantes de *Robo1* debido a un incremento de proliferación en la eminencia gangliolar del telencéfalo, demostrando que la señalización Slit/*Robo1* está implicada en la regulación de la división celular. En *Drosophila*, se ha demostrado que la señalización Slit-*Robo* promueve la división asimétrica terminal de una GMC dentro de un linaje concreto de NB, GMC-1, para generar dos neuronas postmitóticas diferentes (RP2 /sib). Esto se lleva a cabo mediante la inhibición de dos proteínas POU, Nubbin y Mitimere, que permite la localización asimétrica de *Insc* que, finalmente conduce a la división asimétrica terminal del linaje de la GMC-1. Fuera del SNC, distintos estudios han demostrado y descrito la participación de la señalización Slit/*Robo* en el proceso de división asimétrica de distintas células madre. En células madre mamarias de ratón, regula la elección entre división celular asimétrica (DCA) o simétrica (DCS) regulando los niveles de *mInsc*, regulador de la orientación del huso mitótico, a través del factor de transcripción *Snail* y se mostró que la falta de *Slit2/Robo1* hacía que las células madre se dividieran mediante DCS produciendo un aumento en el número de células madre. También es necesaria en otras células madre para la especificación de su linaje, como en el intestino de *Drosophila* donde la señalización limita el compromiso de las células madre del intestino (ISCs) con el linaje endocrino estableciendo un control de retroalimentación negativo de la generación de las células enterodendocrinas (EEs). Además, es un regulador clave de la identidad de los progenitores pancreáticos en el ratón, preservando la identidad después de la inducción de su destino y para la expansión del conjunto de progenitores. Igualmente participa en procesos de adhesión y de anclaje de las células madre al nicho, como por ejemplo anclando a las células hematopoyéticas de ratón a la médula ósea o en el caso de las células madre de los testículos de *Drosophila*.

En cambio, la señalización de Netrin-Fra/DCC no se ha descrito previamente en ninguno de estos contextos.

Una de las cuestiones a resolver sobre la señalización de Slit-Robo es ¿cómo regula los procesos celulares de los mecanismos mencionados anteriormente? En última instancia, se ha señalado a un control transcripcional como la vía de acción más común, pero los mecanismos detallados por los que la señalización de Robo incide en factores de transcripción específicos, activándolos o reprimiéndolos, no se han aclarado en la mayoría de los casos. Únicamente Ballard junto con su equipo han vinculado, la señalización de Slit2/Robo1 con la degradación del factor de transcripción SNAI1, como se ha mencionado anteriormente. Y esto lo hace a través de la activación de la GSK3beta que inhibe la actividad de SNAI regulando tanto su localización subcelular como su degradación y finalmente los niveles de mINSC. Altos niveles de mINSC impulsa la DCS a expensas de la DCA y da lugar a más células madre y a un mayor crecimiento mamario. En este trabajo presentamos un nuevo mecanismo de señalización de Robo1 mediante el cual, regula la DCA de células madre a través de un importante complejo de proteínas reguladoras del citoesqueleto, de forma independiente de transcripción. La señalización Robo1 sería necesaria para activar las pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42 a través de la represión de su inhibidor RhoGAP93B, así como mediante el reclutamiento del complejo Dock-Pak, que, a través de Pak, también puede unir formas activadas tanto de Rac1 como de Cdc42. La disminución de la expresión de Rac1 y de Cc42 afectó directamente a integrantes de la maquinaria que componen los mecanismos de regulación intrínsecos de DCA de células madre y de los progenitores intermedios. Concretamente al disminuir estas GTPasas de forma específica en los linajes de NB de tipo II, se produjeron defectos

de localización de distintos reguladores de DCA como Par-6, aPKC, Cno y Numb, y con ello se dirigió a una formación de NBs ectópicos dentro de los linajes neurales del cerebro, fenotipo que resume la alteración de la señalización de Slit-Robo1. Los defectos de localización de Cno al disminuir los niveles de expresión de Robo1 concuerdan y son congruentes con los resultados obtenidos previamente en el laboratorio que muestran que Cno forma un complejo con Robo1 in vivo y que actúa como regulador positivo de la vía de señalización de Slit-Robo, siendo relevante en el comportamiento de los conos de crecimiento neurales en el embrión de *Drosophila*. Además, cabe destacar que la localización de Cno depende a su vez de otra pequeña GTPasa asociada a la membrana Rap1. Ambas interactúan físicamente in vivo y modulan el eje de división de los NBs y la polaridad apico-basal durante DCA. A su vez, Rap1 interactúa con las proteínas aPKC y Par-6 formando un complejo en los NBs mitóticos.

La sobreexpresión de *robo1* produjo defectos similares a la pérdida total o la reducción de expresión de *robo1* que también fue un fenotipo similar al hallado tras la pérdida y reducción de *fra*, la reducción de Abl, y al de la expresión de Abl con el motivo quinasa inactivo, siendo así incapaz de reprimir Robo1. Por consiguiente, en base a todos estos experimentos y resultados pensamos que la señalización Netrin/Fra estaría modulando, a través de la quinasa Abl, los niveles umbrales de señalización de Robo1 necesarios para regular a su vez la correcta actividad de las pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42. Para reafirmar esta hipótesis analizamos la expresión de una forma sobreexpresada de Rac1 (*Rac^{V12}*) en los NB de tipo II y observamos que se produjeron NBs ectópicos dentro de los linajes y también defectos de localización de aPKC en los NBs y en las células progenitoras de los linajes, el mismo fenotipo observado al sobreexpresar *robo1* en los linajes de NBs de tipo II.

Con todo esto, finalmente concluimos, que el mantenimiento de los niveles de actividad de las GTPasas Rac1 y Cdc42 durante el proceso de DCA es necesario y fundamental para la correcta localización de los complejos de proteínas apicales (aPKC, Par-6, Cno) y con ello también del determinante del destino celular Numb en el polo basal y, tanto el aumento como la disminución de su actividad, da lugar a fallos de localización de estos componentes de la maquinaria que integran los mecanismos de regulación autónomos del NB. La señalización Slit/Robo1 está involucrado en la regulación y ajuste de los niveles de las GTPasas mediante la inhibición de sus represores (RhoGAP93B) y reclutamiento de sus activadores (Pak-Dock) y, a su vez, la actividad de Robo1 está regulada por las Netrinas, que señalizan a través de su receptor Fra activando a la quinasa citoplasmática Abl que inhibe la señalización de Robo1; consecuentemente, se produce una reducción del complejo Pak-Dock y un aumento de la actividad de RhoGAP93B, todo lo cual conduce a una bajada en la actividad de Rac1 y Cdc42. Por tanto, el mantenimiento de los niveles de actividad de Robo1-Rac1/Cdc42 es fundamental para el correcto desarrollo de los NBs de tipo II y de las INPs y por lo tanto también para sus linajes, y las Netrinas son las encargadas de mantener este equilibrio perfecto. En conclusión, el nicho de la glía cortical, a través de la secreción de las señales Netrinas y Slit, regula de forma extrínseca la DCA de los NBs de tipo II y de las células progenitoras de estos linajes, demostrándose así por primera vez la necesidad de mecanismos no autónomos para modular la DCA de los NBs (figura 62).

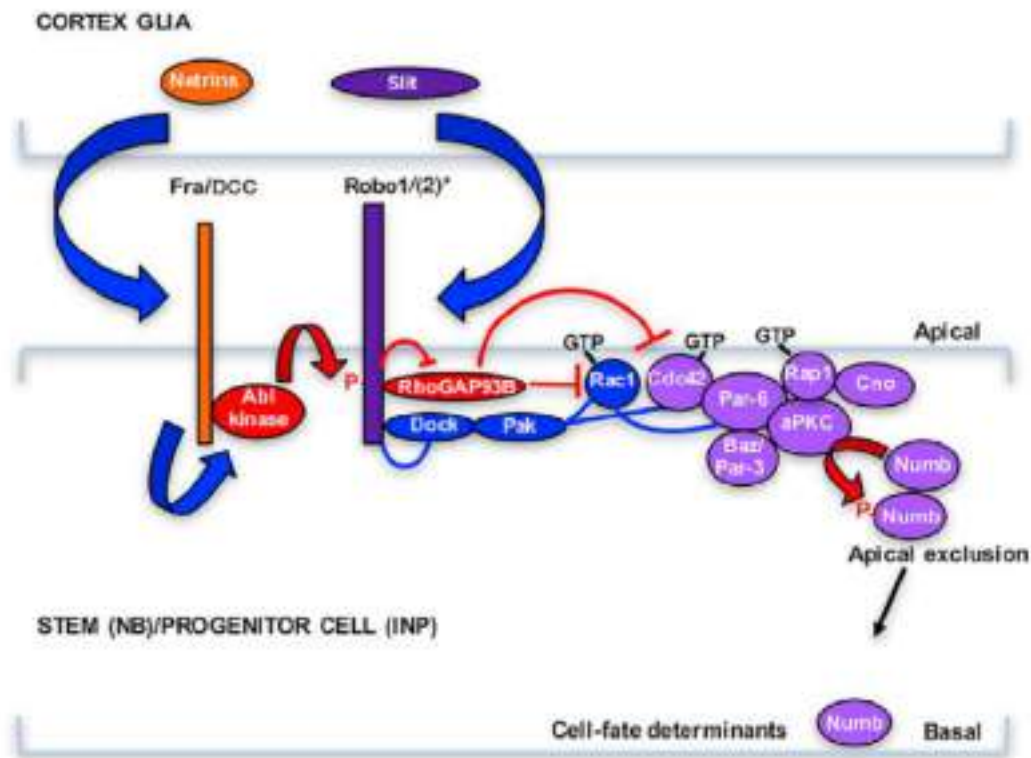


Figura 62. Modelo de trabajo. Slit, secretada por la glía cortical, activa a Robo1, localizado en el NB y los INPs. Robo1 recluta e inhibe a RhoGAP93B, represor de la actividad de Rac1 y Cdc42; y también recluta a Dock-Pak, que interactúa y activa a Rac1 y Cdc42. Ambas GTPasas estabilizan a Par-6 y aPKC, así como a Cno, que se une a Rap1 y que se encuentra en un complejo con Par-6 y aPKC. Por lo tanto, aPKC fosforila a Numb, excluyéndolo del polo apical. Las Netrinas secretadas por la glía cortical activan a Fra/DCC, localizadas en el NB y en los INPs. Fra recluta a la quinasa Abl, que fosforila a Robo1, reprimiendo su señalización y equilibrando los niveles umbrales de señalización Robo1/Rac1/Cdc42 necesarios para estabilizar los reguladores del complejo apical de DCA. Sólo en ausencia tanto de la inhibición de Fra-Abl como de la señalización de Robo1 (*fra robo1* doble mutante), Robo2 sería capaz de señalizar compensando la falta de Robo1. Los colores azul y rojo denotan efectos positivos/activos y negativos/inhibitorios, respectivamente. Los reguladores de DCA conocidos se representan en color púrpura.

CONCLUSIONES

- La DCA de los NBs y células progenitoras de los linajes de NBs de tipo II, en el cerebro larvario de *Drosophila*, depende de señales extrínsecas secretadas por la glía cortical, un nicho en estrecho contacto con dichos linajes. Estas señales extrínsecas inciden en la regulación de los mecanismos intrínsecos de la DCA para inducir diferenciación en una de las células hijas, reprimiendo el estado basal de autorrenovación en dicha célula.
- Los ligandos NetA, NetB y Slit y los receptores Fra y Robo1 se expresan en la glía cortical y en los linajes de NBs de tipo II respectivamente, desde donde actúan de forma específica para el correcto desarrollo de los linajes de NB de tipo II, siendo prescindibles en los linajes de NBs de tipo I.
- La señalización Netrin/Fra, a través de la quinasa citoplasmática Abl, modula los niveles umbrales de señalización de Robo1.
- Los niveles de señalización de Robo1 son críticos en la regulación de la DCA de los NBs e INPs en los linajes de NBs de tipo II.
- La señalización Slit/Robo1 actúa a través de las pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42, la cuales permiten la correcta localización en NBs metafásicos del complejo apical Par (aPKC-Par6-Par3/Baz), Cno/Afadin y del determinante del destino celular Numb, todos ellos reguladores intrínsecos del proceso de DCA en NBs e INPs.
- Robo2 podría estar actuando cuando las vías de señalización de Robo1 y Fra-Abl están simultáneamente alteradas, pero no es esencial para el correcto desarrollo de los linajes de NBs de tipo II en condiciones normales, situación en la que Robo1 sería el regulador principal.

REFERENCIAS

- Akin, O., & Lawrence Zipursky, S. (2016). Frazzled promotes growth cone attachment at the source of a Netrin gradient in the *Drosophila* visual system. *ELife*, 5(OCTOBER2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.20762.001>
- Allan Spradling, Daniela Drummond-Barbosa, & Toshie Kai. (2001). *Stem cells find their niche*. www.nature.com
- Álvarez, J. A., & Díaz-Benjumea, F. J. (2018). Origin and specification of type II neuroblasts in the *Drosophila* embryo. *Development (Cambridge)*, 145(7). <https://doi.org/10.1242/dev.158394>
- Andreas Wodarz, Andreas Ramrath, Ute Kuchinke, & Elisabeth Knust. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*, 402.
- Arakawa, H. (2004). Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 4, Issue 12, pp. 978–987). <https://doi.org/10.1038/nrc1504>
- Arakawa, H. (2005). p53, apoptosis and axon-guidance molecules. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 12, Issue 8, pp. 1057–1065). <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401601>
- Atwood, S. X., & Prehoda, K. E. (2009). aPKC Phosphorylates Miranda to Polarize Fate Determinants during Neuroblast Asymmetric Cell Division. *Current Biology*, 19(9), 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.056>
- Auld, V. J., Fetter, R. D., Broadie, K., & Goodman, C. S. (1995). Gliotactin, a Novel Transmembrane Protein on Peripheral Gila, Is Required to Form the Blood-Nerve Barrier in *Drosophila*. In *Cell* (Vol. 81).

- Awasaki, T., Lai, S. L., Ito, K., & Lee, T. (2008). Organization and postembryonic development of glial cells in the adult central brain of *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 28(51), 13742–13753. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4844-08.2008>
- Bainton, R. J., Tsai, L. T.-Y., Singh, C. M., Moore, M. S., Neckameyer, W. S., & Heberlein, U. (2000). *Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in Drosophila*.
- Bányai, L., & Patthy, L. (1999). *The NTR module: Domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases*.
- Barres, B. A. (2008). The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. In *Neuron* (Vol. 60, Issue 3, pp. 430–440). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.013>
- Barton, L. J., Lovander, K. E., Pinto, B. S., & Geyer, P. K. (2016). *Drosophila* male and female germline stem cell niches require the nuclear lamina protein Otefin. *Developmental Biology*, 415(1), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.001>
- Baumgardt, M., Karlsson, D., Salmani, B. Y., Bivik, C., MacDonald, R. B., Gunnar, E., & Thor, S. (2014). Global Programmed Switch in Neural Daughter Cell Proliferation Mode Triggered by a Temporal Gene Cascade. *Developmental Cell*, 30(2), 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.021>
- Baumgardt, M., Karlsson, D., Terriente, J., Díaz-Benjumea, F. J., & Thor, S. (2009). Neuronal Subtype Specification within a Lineage by Opposing Temporal Feed-Forward Loops. *Cell*, 139(5), 969–982. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.032>
- Bello, B. C., Izergina, N., Caussinus, E., & Reichert, H. (2008). Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development. *Neural Development*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-5>

- Bello, B., Reichert, H., & Hirth, F. (2006). The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of *Drosophila*. *Development*, *133*(14), 2639–2648. <https://doi.org/10.1242/dev.02429>
- Bertrand, N., Castro, D. S., & Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 3, Issue 7, pp. 517–530). <https://doi.org/10.1038/nrn874>
- Betschinger, J., & Knoblich, J. A. (2004). Dare to be different: Asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. In *Current Biology* (Vol. 14, Issue 16). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.08.017>
- Betschinger, J., Mechtler, K., & Knoblich, J. A. (2006). Asymmetric Segregation of the Tumor Suppressor Brat Regulates Self-Renewal in *Drosophila* Neural Stem Cells. *Cell*, *124*(6), 1241–1253. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.038>
- Bhat, K. M. (2005). Slit-roundabout signaling neutralizes netrin-frazzled-mediated attractant cue to specify the lateral positioning of longitudinal axon pathways. *Genetics*, *170*(1), 149–159. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.036863>
- Bier, E. (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 6, Issue 1, pp. 9–23). <https://doi.org/10.1038/nrg1503>
- Bilen, J., & Bonini, N. M. (2005). *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 39, pp. 153–171). <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.110304.095804>
- Bloch-Gallego, E., Dé Ric Ezan, F., Tessier-Lavigne, M., & Sotelo, C. (1999). Floor Plate and Netrin-1 Are Involved in the Migration and Survival of Inferior Olivary Neurons. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 19, Issue 11).

- Blockus, H., & Chédotal, A. (2016). Slit-robo signaling. *Development (Cambridge)*, 143(17), 3037–3044. <https://doi.org/10.1242/dev.132829>
- Boone, J. Q., & Doe, C. Q. (n.d.). *Identification of Drosophila type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells.*
- Bowman, S. K., Rolland, V., Betschinger, J., Kinsey, K. A., Emery, G., & Knoblich, J. A. (2008). The Tumor Suppressors Brat and Numb Regulate Transit-Amplifying Neuroblast Lineages in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 14(4), 535–546. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.004>
- Boxem, M., & van den Heuvel, S. (2019). Cell Polarity: Getting the PARty Started. In *Current Biology* (Vol. 29, Issue 13, pp. R637–R639). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.05.032>
- Brijesh Mehta, & Krishna Moorthi Bhat. (2001). Slit signaling promotes the terminal asymmetric division of neural precursor cells in the *Drosophila* CNS. *Development*.
- Brody, T., & Odenwald, W. F. (2000). Programmed transformations in neuroblast gene expression during *Drosophila* CNS lineage development. *Developmental Biology*, 226(1), 34–44. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9829>
- Brody, T., Stiversa, C., Nagleb, J., & Odenwalda, W. F. (n.d.). *Identification of novel Drosophila neural precursor genes using a differential embryonic head cDNA screen.* www.elsevier.com/locate/modo
- Brose, K., Bland, K. S., Hong Wang, K., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., & Kidd, T. (1999). Slit Proteins Bind Robo Receptors and Have an Evolutionarily Conserved Role in Repulsive Axon Guidance. In *Cell* (Vol. 96).
- Cabernard, C. (2012). Cytokinesis in *Drosophila melanogaster*. In *Cytoskeleton* (Vol. 69, Issue 10, pp. 791–809). <https://doi.org/10.1002/cm.21060>

- Cabernard, C., & Doe, C. Q. (2009). Apical/Basal Spindle Orientation Is Required for Neuroblast Homeostasis and Neuronal Differentiation in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 17(1), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.009>
- Campos-Ortega, J. A., & Wiley, J. (n.d.). *Mechanisms of Early Neurogenesis in Drosophila melanogaster*.
- Cao, F., Miao, Y., Xu, K., & Liu, P. (2015). Lethal (2) giant larvae: An indispensable regulator of cell polarity and cancer development. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 11, Issue 4, pp. 380–389). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.11243>
- Carlier, M. F. (1991). Actin: Protein structure and filament dynamics. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 266, Issue 1, pp. 1–4). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)52391-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)52391-7)
- Carter, A. P., Okumura, M., Natsume, T., Kanemaki, M. T., & Kiyomitsu, T. (2018). *Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble*. <https://doi.org/10.7554/eLife.36559.001>
- Catherine A. Dye, Ja-Kyeong Lee, Richard C. Atkinson, Rachel Brewster, Pyung-Lim Han, & Hugo J. Bellen. (1998). The *Drosophila* sanpodo gene controls sibling cell fate and encodes a tropomodulin homolog, an actin:tropomyosin-associated protein. *Development*.
- Chabu, C., & Doe, C. Q. (2008). Dap 160/intersectin binds and activates aPKC to regulated cell polarity and cell cycle progression. *Development*, 135(16), 2739–2746. <https://doi.org/10.1242/dev.024059>
- Chabu, C., & Doe, C. Q. (2009). Twins/PP2A regulates aPKC to control neuroblast cell polarity and self-renewal. *Developmental Biology*, 330(2), 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.014>

- Chang, K. C., Wang, C., & Wang, H. (2012). Balancing self-renewal and differentiation by asymmetric division: Insights from brain tumor suppressors in *Drosophila* neural stem cells. In *BioEssays* (Vol. 34, Issue 4, pp. 301–310). <https://doi.org/10.1002/bies.201100090>
- Chell, J. M., & Brand, A. H. (2010a). Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cells from quiescence. *Cell*, *143*(7), 1161–1173. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.007>
- Chell, J. M., & Brand, A. H. (2010b). Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cells from quiescence. *Cell*, *143*(7), 1161–1173. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.007>
- Chia, W., Somers, W. G., & Wang, H. (2008). *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions: Cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and tumorigenesis. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 180, Issue 2, pp. 267–272). <https://doi.org/10.1083/jcb.200708159>
- Chien, S., Reiter, L. T., Bier, E., & Gribskov, M. (2002). Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 30, Issue 1). <http://homophila.sdsc.edu>.
- Chintapalli, V. R., Wang, J., & Dow, J. A. T. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. In *Nature Genetics* (Vol. 39, Issue 6, pp. 715–720). <https://doi.org/10.1038/ng2049>
- Choksi, S. P., Southall, T. D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B. E. E., van Steensel, B., Micklem, G., & Brand, A. H. (2006). Prospero Acts as a Binary Switch between Self-Renewal and Differentiation in *Drosophila* Neural Stem Cells. *Developmental Cell*, *11*(6), 775–789. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.09.015>
- Choosing a cell fate- a view from the Notch locus.* (n.d.).

- Chotard, C., & Salecker, I. (2007). Glial cell development and function in the *Drosophila* visual system. In *Neuron Glia Biology* (Vol. 3, Issue 1, pp. 17–25). <https://doi.org/10.1017/S1740925X07000592>
- Conklin, E. G., Parsons, C. L., & By, A. E. (1905). The Organization and Cell-lineage of the. In *Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Second Series*.
- Corty, M. M., & Freeman, M. R. (2013). Architects in neural circuit design: Glia control neuron numbers and connectivity. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 203, Issue 3, pp. 395–405). <https://doi.org/10.1083/jcb.201306099>
- de Wit, J., & Verhaagen, J. (2003). Role of semaphorins in the adult nervous system. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 71, Issues 2–3, pp. 249–267). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2003.06.001>
- Dent, E. W., & Gertler, F. B. (2003). Review Cytoskeletal Dynamics and Transport in Growth Cone Motility and Axon Guidance organism, by isolating neurons in a relatively simple, easily manipulated, two-dimensional environment, we have learned much about the cytoskeleton and its role in motility and guidance. Our focus in this review will be on the final common target of signaling cascades in the. In *Neuron* (Vol. 40).
- Doe, C. Q., & Skeath, J. B. (1996). *Neurogenesis in the insect central nervous system*.
- Doe Chris Q. (1992). *Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the Drosophila central nervous system*.
- Duman-Scheel, M. (2012). *Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Pathfinding: Axon Guidance Gene Finally Turned Tumor Suppressor*.
- Dumstrei, K., Wang, F., & Hartenstein, V. (2003). *Role of DE-Cadherin in Neuroblast Proliferation, Neural Morphogenesis, and Axon Tract Formation in Drosophila Larval Brain Development*.

- Edwards, T. N., & Meinertzhagen, I. A. (2010a). The functional organisation of glia in the adult brain of *Drosophila* and other insects. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 90, Issue 4, pp. 471–497). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.001>
- Edwards, T. N., & Meinertzhagen, I. A. (2010b). The functional organisation of glia in the adult brain of *Drosophila* and other insects. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 90, Issue 4, pp. 471–497). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.001>
- Egger, B., Boone, J. Q., Stevens, N. R., Brand, A. H., & Doe, C. Q. (2007). Regulation of spindle orientation and neural stem cell fate in the *Drosophila* optic lobe. *Neural Development*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/1749-8104-2-1>
- Egger, B., Chell, J. M., & Brand, A. H. (2008). Insights into neural stem cell biology from flies. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 363, Issue 1489, pp. 39–56). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.2011>
- Egger, B., Gold, K. S., & Brand, A. H. (2010). Notch regulates the switch from symmetric to asymmetric neural stem cell division in the *Drosophila* optic lobe. *Development*, 137(18), 2981–2987. <https://doi.org/10.1242/dev.051250>
- &ens, A. J., Garren, H., Cheyette, B. N. R., & Zipursky, S. L. (1993). The *Drosophila* anachronism Locus: A Glycoprotein Secreted by Glia Inhibits Neuroblast Proliferation. In *Cell* (Vol. 74).
- Forsthoefel, D. J., Liebl, E. C., Kolodziej, P. A., & Seeger, M. A. (2005). The Abelson tyrosine kinase, the Trio GEF and enabled interact with the Netrin receptor Frazzled in *Drosophila*. *Development*, 132(8), 1983–1994. <https://doi.org/10.1242/dev.01736>
- Freeman, M. R. (2015a). *Drosophila* central nervous system glia. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 7, Issue 11). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020552>

- Freeman, M. R. (2015b). *Drosophila* central nervous system glia. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 7, Issue 11). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020552>
- Friedl, P., & Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 7, pp. 445–457). <https://doi.org/10.1038/nrm2720>
- Fujisawa, H., & Kitsukawat, T. (1998). Receptors for collapsin/kemaphorins. *Current Opinion in Neurobiology*, 8, 587–592. <http://biomednet.com/elecref/0959438800800587>
- Fuller, M. T., & Spradling, A. C. (2007). Male and female *Drosophila* germline stem cells: Two versions of immortality. In *Science* (Vol. 316, Issue 5823, pp. 402–404). <https://doi.org/10.1126/science.1140861>
- Fumio Matsuzaki. (2000). *Asymmetric division of Drosophila neural stem cells: a basis for neural diversity*.
- Fuse, N., Hisata, K., Katzen, A. L., & Matsuzaki, F. (2003). Heterotrimeric G Proteins Regulate Daughter Cell Size Asymmetry in *Drosophila* Neuroblast Divisions C (DaPKC), the G protein subunit Gi, and Partner of Inscuteable (Pins) [1-3]. The depletion of any single apical component does not severely affect the cell size. *Current Biology*, 13, 947–954. <https://doi.org/10.1016/S>
- Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J., & Baum, B. (2008). Cdc42, Par6, and aPKC Regulate Arp2/3-Mediated Endocytosis to Control Local Adherens Junction Stability. *Current Biology*, 18(21), 1631–1638. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.029>
- Gonzalez, C. (2013). *Drosophila melanogaster*: A model and a tool to investigate malignancy and identify new therapeutics. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 13, Issue 3, pp. 172–183). <https://doi.org/10.1038/nrc3461>

- Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 6, Issue 10, pp. 777–788). <https://doi.org/10.1038/nrm1739>
- Gungabissoon, R. A., & Bamburg, J. R. (2003). Regulation of Growth Cone Actin Dynamics by ADF/Cofilin 1. In *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (Vol. 51, Issue 4). <http://www.jhc.org>
- Guo, M., Yeh Jan, L., & Nung Jan, Y. (1996). Control of Daughter Cell Fates during Asymmetric Division: Interaction of Numb and Notch. In *Neuron* (Vol. 17).
- Hamasaki, T., Goto, S., Nishikawa, S., & Ushio, Y. (2001). *A Role of Netrin-1 in the Formation of the Subcortical Structure Striatum: Repulsive Action on the Migration of Late-Born Striatal Neurons.*
- Harris, K. P., & Tepass, U. (2008). Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the Drosophila neuroectoderm through regulation of apical endocytosis. *Journal of Cell Biology*, 183(6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807020>
- Harris, R., & Sabatelli, L. M. (1996). Guidance Cues at the Drosophila CNS Midline: Identification and Characterization of Two Drosophila Netrin/UNC-6 Homologs. In *Neuron* (Vol. 17).
- Hartenstein, V. (2011a). Morphological diversity and development of glia in Drosophila. *GLIA*, 59(9), 1237–1252. <https://doi.org/10.1002/glia.21162>
- Hartenstein, V. (2011b). Morphological diversity and development of glia in Drosophila. *GLIA*, 59(9), 1237–1252. <https://doi.org/10.1002/glia.21162>
- Hartenstein, V., & Campos-Ortega, J. A. (1984). Roux's Archives of Developmental Biology Early neurogenesis in wild-type Drosophila melanogaster. In *Arch Dev Biol* (Vol. 193).

- Hartenstein, V., & Wodarz, A. (2013). Initial neurogenesis in *Drosophila*. In *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* (Vol. 2, Issue 5, pp. 701–721). <https://doi.org/10.1002/wdev.111>
- Hidalgo, A., Kato, K., Sutcliffe, B., Mcilroy, G., Bishop, S., & Alahmed, S. (2011). Trophic neuron-glia interactions and cell number adjustments in the fruit fly. *GLIA*, 59(9), 1296–1303. <https://doi.org/10.1002/glia.21092>
- Hiramoto, M., & Hiromi, Y. (2006). ROBO directs axon crossing of segmental boundaries by suppressing responsiveness to relocalized Netrin. *Nature Neuroscience*, 9(1), 58–66. <https://doi.org/10.1038/nn1612>
- Hiroko Ikeshima-Kataoka, James B. Skeath, Yo-ichi Nabeshima, Chris Q. Doe, & Fumio Matsuzaki. (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature*, 390.
- Hirono, K., Margolis, J. S., Posakony, J. W., & Doe, C. Q. (2012). Identification of hunchback cis-regulatory DNA conferring temporal expression in neuroblasts and neurons. *Gene Expression Patterns*, 12(1–2), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2011.10.001>
- Hofbauer, A., & Campos-Ortega, J. A. (1990). Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in *Drosophila melanogaster*. In *Arch Dev Biol* (Vol. 198).
- Hohenester, E. (2008). Structural insight into Slit-Robo signalling. *Biochemical Society Transactions*, 36(2), 251–256. <https://doi.org/10.1042/BST0360251>
- Homem, C. C. F., & Knoblich, J. A. (2012a). *Drosophila* neuroblasts: A model for stem cell biology. *Development (Cambridge)*, 139(23), 4297–4310. <https://doi.org/10.1242/dev.080515>
- Homem, C. C. F., & Knoblich, J. A. (2012b). *Drosophila* neuroblasts: A model for stem cell biology. *Development (Cambridge)*, 139(23), 4297–4310. <https://doi.org/10.1242/dev.080515>

- Ito' And, K., & Ho~ta, Y. (1992). Proliferation Pattern of Postembryonic Neuroblasts in the Brain of *Drosophila melanogaster*. In *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (Vol. 149).
- Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T., & Matsuzaki, F. (2006). *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nature Cell Biology*, 8(6), 586–593. <https://doi.org/10.1038/ncb1409>
- Izumi, Y., Ohta, N., Itoh-Furuya, A., Fuse, N., & Matsuzaki, F. (2004). Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *Journal of Cell Biology*, 164(5), 729–738. <https://doi.org/10.1083/jcb.200309162>
- James B. Skeath, & Chris Q. Doe. (1998). Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the *Drosophila* CNS. *Development*.
- Janssens, D. H., Komori, H., Grbac, D., Chen, K., Koe, C. T., Wang, H., & Lee, C. Y. (2014). Earmuff restricts progenitor cell potential by attenuating the competence to respond to self-renewal factors. *Development (Cambridge)*, 141(5), 1036–1046. <https://doi.org/10.1242/dev.106534>
- Januschke, J., & Gonzalez, C. (2010). The interphase microtubule aster is a determinant of asymmetric division orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Journal of Cell Biology*, 188(5), 693–706. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905024>
- Jessica S. Britton, & Bruce A. Edgar. (1998). Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*- nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development*.
- Jin, T., Xu, X., & Hereld, D. (2008). Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. In *Cytokine* (Vol. 44, Issue 1, pp. 1–8). <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.06.017>

- Kefeli, U., Ucuncu Kefeli, A., Cabuk, D., Isik, U., Sonkaya, A., Acikgoz, O., Ozden, E., & Uygun, K. (2017). Netrin-1 in cancer: Potential biomarker and therapeutic target? In *Tumor Biology* (Vol. 39, Issue 4). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1010428317698388>
- Kemphues, K. J., Priess, J. R., Morton, D. G., & Cheng, N. (1988). Identification of Genes Required for Cytoplasmic Localization in Early *C. elegans* Embryos. In *Cell* (Vol. 52).
- Klein, R. (2012). Eph/ephrin signalling during development. *Development (Cambridge)*, 139(22), 4105–4109. <https://doi.org/10.1242/dev.074997>
- Knoblich, J. A. (2010a). Asymmetric cell division: Recent developments and their implications for tumour biology. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 12, pp. 849–860). <https://doi.org/10.1038/nrm3010>
- Knoblich, J. A. (2010b). Asymmetric cell division: Recent developments and their implications for tumour biology. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 12, pp. 849–860). <https://doi.org/10.1038/nrm3010>
- Knoblich Juergen A. (2001). Asymmetric cell division during animal development. *Nature Reviews*, 2.
- Kolodziej, P. A., Timpe, L. C., Mitchell, K. J., Fried, S. R., Goodman, C. S., Yeh Jan, L., & Nung Jan, Y. (n.d.). frazzled Encodes a Drosophila Member of the DCC Immunoglobulin Subfamily and Is Required for CNS and Motor Axon Guidance. In *Cell* (Vol. 87).
- Krahn, M. P., Egger-Adam, D., & Wodarz, A. (2009). PP2A Antagonizes Phosphorylation of Bazooka by PAR-1 to Control Apical-Basal Polarity in Dividing Embryonic Neuroblasts. *Developmental Cell*, 16(6), 901–908. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.04.011>

- Kuijper, S., Turner, C. J., & Adams*, R. H. (2007). *REVIEW ARTICLES Regulation of Angiogenesis by Eph-Ephrin Interactions*.
- Kuwada, J. Y., Luo, Y., Minna, J. D., Naylor, S. L., O'connor, T. P., O'leary, D. D. M., Pini, A., Poo, M.-M., Pü, A. W., & Raper, J. A. (1999). Letter to the Editor with phylogenetic tree analyses, allow at present for the (7) Sema domain, Ig domain, and a GPI membrane anchor (verte-kin. In *Cell* (Vol. 97). <http://www.gene.ucl.ac.uk/>
- Laird, D. J., von Andrian, U. H., & Wagers, A. J. (2008). Stem Cell Trafficking in Tissue Development, Growth, and Disease. In *Cell* (Vol. 132, Issue 4, pp. 612–630). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.041>
- Lander, A. D. (2012). *The richness of niche-ness-an introduction*. <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/19>
- Lee, C. Y., Wilkinson, B. D., Siegrist, S. E., Wharton, R. P., & Doe, C. Q. (2006). Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Developmental Cell*, 10(4), 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.01.017>
- Li, L., & Vaessin, H. (2000). Pan-neural prospero terminates cell proliferation during Drosophila neurogenesis. *Genes and Development*, 14(2), 147–151. <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.147>
- Li, L., & Xie, T. (2005). Stem cell niche: Structure and function. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 21, pp. 605–631). <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525>
- Li, X., Chen, Z., & Desplan, C. (2013). Temporal patterning of neural progenitors in drosophila. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 105, pp. 69–96). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396968-2.00003-8>

- Liakopoulos Dimistris, Kusch Justine, Grava Sandrine, Vogel Jackie, & Barral Yves. (2003). *Asymmetric Loading of Kar9 onto Spindle Poles and Microtubules Ensures Proper Spindle Alignment*. <http://www.cell.com/cgi/content/full/>
- Lim, Y.-S., & Wadsworth, W. G. (2002). *Identification of Domains of Netrin UNC-6 that Mediate Attractive and Repulsive Guidance and Responses from Cells and Growth Cones*.
- Liu, H., & Song, N. (2016). Molecular Mechanism of Adult Neurogenesis and its Association with Human Brain Diseases. *Journal of Central Nervous System Disease*, 8, JCNSD.S32204. <https://doi.org/10.4137/jcnsd.s32204>
- Loyer, N., & Januschke, J. (2018). The last-born daughter cell contributes to division orientation of Drosophila larval neuroblasts. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06276-0>
- Lu, B., Rothenberg, M., Jan, L. Y., & Nung Jan, Y. (1998). Partner of Numb Colocalizes with Numb during Mitosis and Directs Numb Asymmetric Localization in Drosophila Neural and Muscle Progenitors Recent studies indicate that intrinsically inherited Numb interacts with the cell surface. In *Cell* (Vol. 95). Gomez and Bate.
- Lu, M. S., & Johnston, C. A. (2013). Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. In *Development (Cambridge)* (Vol. 140, Issue 9, pp. 1843–1856). <https://doi.org/10.1242/dev.087627>
- Margulies, C., Tully, T., & Dubnau, J. (2005). Deconstructing memory in Drosophila. In *Current Biology* (Vol. 15, Issue 17). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.024>
- Marillat, V., Cases, O., Nguyenf-Ba-Charvet, K. T., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., & Chédotal, A. (2002). Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 442(2), 130–155. <https://doi.org/10.1002/cne.10068>

- Matthes, D. J., O, T. P., Patel, N. H., Admon, A., Bentley, D., & Corey Goodman, and S. (1992). Fasciclin IV: Sequence, Expression, and Function during Growth Cone Guidance in the Grasshopper Embryo. In *Neuron* (Vol. 9).
- Mausser, J. F., & Prehoda, K. E. (2012). Inscuteable regulates the pins-mud spindle orientation pathway. *PLoS ONE*, 7(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029611>
- Mcclung, C., & Hirsh, J. (1998). Stereotypic behavioral responses to free-base cocaine and the development of behavioral sensitization in *Drosophila*. *Brief Communication 109 Current Biology*, 8, 109–112.
<http://biomednet.com/elecref/0960982200800109>
- Merkle, F. T., & Alvarez-Buylla, A. (2006). Neural stem cells in mammalian development. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 18, Issue 6, pp. 704–709).
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.09.008>
- Merlos-Suárez, A., & Batlle, E. (2008). Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 20, Issue 2, pp. 194–200).
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.011>
- Mitchell, K. J., Doyle, J. L., & Serafini, T. (1996). Genetic Analysis of Netrin Genes in *Drosophila*: Netrins Guide CNS Commissural Axons and Peripheral Motor Axons. In *Neuron* (Vol. 17).
- Monedero Cobeta, I., Salmani, B. Y., & Thor, S. (2017). Anterior-Posterior Gradient in Neural Stem and Daughter Cell Proliferation Governed by Spatial and Temporal Hox Control. *Current Biology*, 27(8), 1161–1172.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.023>
- Neufeld, G., Mumblat, Y., Smolkin, T., Toledano, S., Nir-Zvi, I., Ziv, K., & Kessler, O. (2016). The role of the semaphorins in cancer. In *Cell Adhesion and Migration* (Vol. 10, Issue 6, pp. 652–674). Taylor and Francis Inc.
<https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1197478>

- Neuhaus-Follini, A., & Bashaw, G. J. (2015). The Intracellular Domain of the Frazzled/DCC Receptor Is a Transcription Factor Required for Commissural Axon Guidance. *Neuron*, 87(4), 751–763. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.006>
- Nipper, R. W., Siller, K. H., Smith, N. R., Doe, C. Q., & Prehoda, K. E. (2007). Gi generates multiple Pins activation states to link cortical polarity and spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. In *National Institutes of Health*. www.pnas.org/cgi/content/full/
- O'Donnell, M. P., & Bashaw, G. J. (2013). Distinct functional domains of the Abelson tyrosine kinase control axon guidance responses to Netrin and slit to regulate the assembly of neural circuits. *Development (Cambridge)*, 140(13), 2724–2733. <https://doi.org/10.1242/dev.093831>
- Ogawa, H., Ohta, N., Moon, W., & Matsuzaki, F. (2009). Protein phosphatase 2A negatively regulates aPKC signaling by modulating phosphorylation of Par-6 in *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *Journal of Cell Science*, 122(18), 3242–3249. <https://doi.org/10.1242/jcs.050955>
- Oland, L. A., & Tolbert, L. P. (2003). Key Interactions Between Neurons and Glial Cells During Neural Development in Insects. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 48, pp. 89–110). <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112654>
- Pandey, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 411–436. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>
- Patterning of the Drosophila nervous system- the achaete-scute gene complex.* (n.d.).
- Pereanu, W., Spindler, S., Cruz, L., & Hartenstein, V. (n.d.). *Tracheal development in the Drosophila brain is constrained by glial cells.* <http://www.pensament.net/java/>

- Picco, V., Hudson, C., & Yasuo, H. (2007). Ephrin-Eph signalling drives the asymmetric division of notochord/neural precursors in *Ciona* embryos. *Development*, *134*(8), 1491–1497. <https://doi.org/10.1242/dev.003939>
- Potter, C. J., Turenchalk, G. S., Xu, T., & Hughes Medical, H. (2000). *Drosophila in cancer research an expanding role* (Vol. 16, Issue 1). <http://info.med.yale.edu/genetics/xu/flycancergenes>.
- Rachel Kraut, & José A. Campos-Ortega. (1996). *inscuteable*, A Neural Precursor Gene of *Drosophila*, Encodes a Candidate for a Cytoskeleton Adaptor Protein. *Developmental Biology*.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, *11*(6), 1114–1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>
- Robert Horvitz, H., & Herskowitz, I. (1992). Mechanisms of Asymmetric Cell Division: Two Bs or Not Two Bs, That Is the Question. In *Cell* (Vol. 66).
- Role of dopamine in ethanol-induced locomotor stimulation*. (n.d.). <http://www.fly-trap.org/>
- Rolls, M. M., Albertson, R., Shih, H. P., Lee, C. Y., & Doe, C. Q. (2003). *Drosophila* aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *Journal of Cell Biology*, *163*(5), 1089–1098. <https://doi.org/10.1083/jcb.200306079>
- Rothberg, J. M., Hartley, D. A., Walther, Z., & Artavanis-Tsakonas, S. (1988). An EGF-Homologous Locus of *D. melanogaster* Involved in the Development of the Embryonic Central Nervous System. In *Cell* (Vol. 55).
- Rothberg, J. M., Jacobs, ^?^, / J Roger, Goodman, C. S., & Artavanis-Tsakonas, S. (1990). *slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains*.

- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li, P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., ... Lewis, S. (2000). Comparative Genomics of the Eukaryotes. In *Science* (Vol. 287, Issue 5461).
- S. Alcántara, M. Ruiz, F. D. C., E. Soriano, & C. Sotelo. (2000). Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development*.
- Saini, N., & Reichert, H. (2012). Neural stem cells in drosophila: Molecular genetic mechanisms underlying normal neural proliferation and abnormal brain tumor formation. In *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2012/486169>
- Scadden, D. T. (2014). Nice neighborhood: Emerging concepts of the stem cell niche. In *Cell* (Vol. 157, Issue 1, pp. 41–50). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.013>
- Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., & Knoblich, J. A. (2000). *A protein complex containing Inscuteable and the Ga α -binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in Drosophila*.
- Schwabe, T., Bainton, R. J., Fetter, R. D., Heberlein, U., & Gaul, U. (2005). GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in Drosophila. *Cell*, 123(1), 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.037>
- Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M., & Tessier-Lavigne, M. (1994). The Netrins Define a Family of Axon Outgrowth-Promoting Proteins Homologous to *C. elegans* UNC-6. In *Cell* (Vol. 79).
- Shen, C.-P., Jan, L. Y., & Nung Jan, Y. (1997). Miranda Is Required for the Asymmetric Localization of Prospero during Mitosis in Drosophila. In *Cell* (Vol. 90).

- Siller, K. H., Cabernard, C., & Doe, C. Q. (2006). The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nature Cell Biology*, 8(6), 594–600. <https://doi.org/10.1038/ncb1412>
- Siller, K. H., & Doe, C. Q. (2009). *R E V I E W Spindle orientation during asymmetric cell division.*
- Sink, H., & Whittington, P. M. (1991). Pathfinding in the central nervous system and periphery by identified embryonic *Drosophila* motor axons. In *Development* (Vol. 112).
- Slováková, J., Speicher, S., Sánchez-Soriano, N., Prokop, A., & Carmena, A. (2012). The actin-binding protein Canoe/AF-6 forms a complex with Robo and is required for Slit-Robo signaling during axon pathfinding at the CNS midline. *Journal of Neuroscience*, 32(29), 10035–10044. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6342-11.2012>
- Sousa-Nunes, R., Yee, L. L., & Gould, A. P. (2011a). Fat cells reactivate quiescent neuroblasts via TOR and glial insulin relays in *Drosophila*. *Nature*, 471(7339), 508–513. <https://doi.org/10.1038/nature09867>
- Sousa-Nunes, R., Yee, L. L., & Gould, A. P. (2011b). Fat cells reactivate quiescent neuroblasts via TOR and glial insulin relays in *Drosophila*. *Nature*, 471(7339), 508–513. <https://doi.org/10.1038/nature09867>
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H., & Frisén, J. (2013). X Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6), 1219. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.002>
- Speder, P., & Brand, A. H. (n.d.). *Systemic and local cues drive neural stem cell niche remodelling during neurogenesis in Drosophila.* <https://doi.org/10.7554/eLife.30413.001>

- Speicher, S., Fischer, A., Knoblich, J., & Carmena, A. (2008). The PDZ Protein Canoe Regulates the Asymmetric Division of *Drosophila* Neuroblasts and Muscle Progenitors. *Current Biology*, 18(11), 831–837. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.072>
- Stork, T., Bernardos, R., & Freeman, M. R. (2012). Analysis of glial cell development and function in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1101/pdb.top067587>
- Stork, T., Sheehan, A., Tasdemir-Yilmaz, O. E., & Freeman, M. R. (2014). Neuron-Glia interactions through the heartless fgf receptor signaling pathway mediate morphogenesis of *drosophila* astrocytes. *Neuron*, 83(2), 388–403. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.026>
- Thomas Kidd, Katja Brose, Kevin J. Mitchell, Richard D. Fetter, Marc Tessier-Lavigne, Corey S. Goodman, & Guy Tear. (1998). *Roundabout Controls Axon Crossing of the CNS Midline and Defines a Novel Subfamily of Evolutionarily Conserved Guidance Receptors.*
- Tomoatsu Ikeya, Milos Galic, Priyanka Belawat, Knud Nairz, & Ernst Hafen. (2002). *Nutrient-Dependent Expression of Insulin-like Peptides from Neuroendocrine Cells in the CNS Contributes to Growth Regulation in Drosophila median neurosecretory cells (m-NSCs) possessing axon.*
- Truman, J. W., & Bates, M. (1988). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Central Nervous System of *Drosophila melanogaster*. In *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (Vol. 125).
- Truman James W. (1996). Steroid Receptors and Nervous System metamorphosis in insects. *Developmental Neuroscience.*
- Ulvklo, C., MacDonald, R., Bivik, C., Baumgardt, M., Karlsson, D., & Thor, S. (2012). Control of neuronal cell fate and number by integration of distinct daughter cell

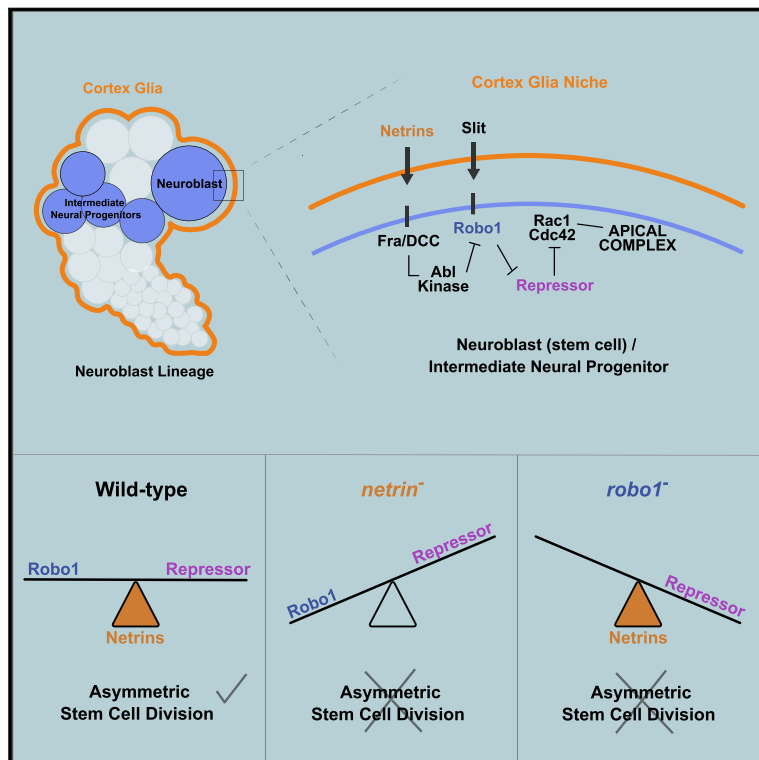
- proliferation modes with temporal progression. *Development*, 139(4), 678–689.
<https://doi.org/10.1242/dev.074500>
- van der Horst, S. E. M., Cravo, J., Woollard, A., Teapal, J., & van den Heuvel, S. (2019). C. Elegans Runx/CBF β suppresses POP-1 TCF to convert asymmetric to proliferative division of stem cell-like seam cells. *Development (Cambridge)*, 146(22). <https://doi.org/10.1242/dev.180034>
- van Pelt, J., Corner, M. A., Uylings, H. B. M., Lopes Da Silva, F. H., & van Veen, M. P. (n.d.). *Dynamic mechanisms of neuronal outgrowth*.
- Vanzomeren-Dohm, A., Sarro, J., Flannery, E., & Duman-Scheel, M. (2011). The drosophila netrin receptor frazzled/DCC functions as an invasive tumor suppressor. *BMC Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-11-41>
- Vermeer, P. D., Einwalter, L. A., Moninger, T. O., Rokhlina, T., Kern, J. A., Zabner, J., & Welsh, M. J. (2003). Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature*, 422(6929), 322–326.
<https://doi.org/10.1038/nature01440>
- Viktorin, G., Riebli, N., & Reichert, H. (2013). A multipotent transit-amplifying neuroblast lineage in the central brain gives rise to optic lobe glial cells in Drosophila. *Developmental Biology*, 379(2), 182–194.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.020>
- Wang, H., Ouyang, Y., Somers, W. G., Chia, W., & Lu, B. (2007). Polo inhibits progenitor self-renewal and regulates Numb asymmetry by phosphorylating Pon. *Nature*, 449(7158), 96–100. <https://doi.org/10.1038/nature06056>
- Weng, M., Golden, K. L., & Lee, C. Y. (2010a). dFzef/Earmuff Maintains the Restricted Developmental Potential of Intermediate Neural Progenitors in Drosophila. *Developmental Cell*, 18(1), 126–135.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.12.007>

- Weng, M., Golden, K. L., & Lee, C. Y. (2010b). dFzef/Earmuff Maintains the Restricted Developmental Potential of Intermediate Neural Progenitors in *Drosophila*. *Developmental Cell*, *18*(1), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.12.007>
- White' And, K., & Kankel', D. R. (1978). Patterns of Cell Division and Cell Movement in the Formation of the Imaginal Nervous System in *Drosophila melanogaster*. In *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (Vol. 65).
- Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T., & Knoblich, J. A. (2008a). Linking Cell Cycle to Asymmetric Division: Aurora-A Phosphorylates the Par Complex to Regulate Numb Localization. *Cell*, *135*(1), 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.049>
- Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T., & Knoblich, J. A. (2008b). Linking Cell Cycle to Asymmetric Division: Aurora-A Phosphorylates the Par Complex to Regulate Numb Localization. *Cell*, *135*(1), 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.049>
- Wodarz, A., & Huttner, W. B. (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. In *Mechanisms of Development* (Vol. 120, Issue 11, pp. 1297–1309). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2003.06.003>
- Yamashita, Y. M., Yuan, H., Cheng, J., & Hunt, A. J. (2010). Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001313>
- Yoo, Y. D., & Kwon, Y. T. (2015). Molecular mechanisms controlling asymmetric and symmetric self-renewal of cancer stem cells. In *Journal of Analytical Science and Technology* (Vol. 6, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s40543-015-0071-4>

- Yu Cai, 1 Fengwei Yu, Shuping Lin, William Chia, & Xiaohang Yang. (2003). *Apical Complex Genes Control Mitotic Spindle Geometry and Relative Size of Daughter Cells in Drosophila Neuroblast and pI Asymmetric Divisions*.
- Yu, F., Kuo, C. T., & Jan, Y. N. (2006). Drosophila Neuroblast Asymmetric Cell Division: Recent Advances and Implications for Stem Cell Biology. In *Neuron* (Vol. 51, Issue 1, pp. 13–20). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.016>
- Yu, F., Wang, H., Qian, H., Kaushik, R., Bownes, M., Yang, X., & Chia, W. (2005). Locomotion defects, together with Pins, regulates heterotrimeric G-protein signaling during Drosophila neuroblast asymmetric divisions. *Genes and Development*, 19(11), 1341–1353. <https://doi.org/10.1101/gad.1295505>
- Zhong, W., & Chia, W. (2008). Neurogenesis and asymmetric cell division. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 18, Issue 1, pp. 4–11). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.05.002>

Glial-secreted Netrins regulate Robo1/Rac1-Cdc42 signaling threshold levels during *Drosophila* asymmetric neural stem/progenitor cell division

Graphical abstract



Authors

Ana de Torres-Jurado,
Sandra Manzanero-Ortiz,
Ana Carmena

Correspondence

acarmena@umh.es

In brief

De Torres-Jurado et al. report a novel function for the axon guidance cues Netrins during asymmetric neural stem and progenitor cell division in *Drosophila* neuroblast lineages. They find that Netrins, secreted by a glial niche, modulate Robo1 signaling threshold levels, which are crucial to repress stem/progenitor cell fate through Rac1 and Cdc42.

Highlights

- Netrin cues secreted by a cortex glia niche extrinsically regulate neuroblast ASCD
- Netrins fine-tune Robo1 signaling threshold levels in stem and progenitor cells
- Proper Robo1 signaling levels are key to suppress stem or progenitor basal cell fate
- Robo1 acts through the small GTPases Rac1 and Cdc42 to modulate ASCD

Article

Glial-secreted Netrins regulate Robo1/Rac1-Cdc42 signaling threshold levels during *Drosophila* asymmetric neural stem/progenitor cell division

Ana de Torres-Jurado,¹ Sandra Manzanero-Ortiz,¹ and Ana Carmena^{1,2,3,*}

¹Developmental Neurobiology Department, Instituto de Neurociencias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Miguel Hernández, Avda. Ramón y Cajal s/n, Sant Joan d'Alacant, 03550 Alicante, Spain

²Twitter: @CarmenaLab

³Lead contact

*Correspondence: acarmena@umh.es

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.001>

SUMMARY

Asymmetric stem cell division (ASCD) is a key mechanism in development, cancer, and stem cell biology. *Drosophila* neural stem cells, called neuroblasts (NBs), divide asymmetrically through intrinsic mechanisms. Here, we show that the extrinsic axon guidance cues Netrins, secreted by a glial niche surrounding larval brain neural stem cell lineages, regulate NB ASCD. Netrin-Frazzled/DCC signaling modulates, through Abelson kinase, Robo1 signaling threshold levels in *Drosophila* larval brain neural stem and progenitor cells of NBII lineages. Unbalanced Robo1 signaling levels induce ectopic NBs and progenitor cells due to failures in the ASCD process. Mechanistically, Robo1 signaling directly impinges on the intrinsic ASCD machinery, such as aPKC, Canoe/Afadin, and Numb, through the small GTPases Rac1 and Cdc42, which are required for the localization in mitotic NBs of Par-6, a Cdc42 physical partner and a core component of the Par (Par-6-aPKC-Par3/Bazooka) apical complex.

INTRODUCTION

Stem cells are characterized by their ability to give rise simultaneously to both self-renewing and differentiated cells through an asymmetric stem cell division (ASCD). Thus, regulation of ASCD is crucial to balance stem and mature cell type production, a critical feature during development and adult tissue homeostasis. Two main types of mechanisms, extrinsic and intrinsic, regulate ASCD. Extrinsic mechanisms include the secreted cues provided by the niche, a complex extracellular microenvironment that surrounds stem cells, determining their state of division, dormancy, or differentiation.^{1–7}

Several signals secreted by stem cell niches have been described in different systems to promote stem cell maintenance.^{5–8} Intriguingly, ASCD in neuroblasts (NBs), the neural stem cells of *Drosophila* CNS and one of the paradigms for analyzing ASCD, seems to depend exclusively on intrinsic cues.^{9–13} These neural stem cells need intrinsic signals to induce differentiation in one of the daughter cells, whereas in stem cells that rely on extrinsic signals for their maintenance differentiation is the “basal state” that must be repressed by those external signals.^{5,9}

Drosophila embryonic NBs delaminate from a neuroepithelium and start dividing asymmetrically to give rise to another NB and a ganglion mother cell (GMC) that will terminally divide asymmetrically to give rise to two neurons or glial cells.¹⁰ The asymmetry of the division relies on the basal distribution of cell-fate determinants in the NB that are exclusively segregated to the GMC, promoting its differentiation and inhibiting self-renewal.^{14–22} The

asymmetric localization of cell-fate determinants is tightly coordinated with the orientation of the mitotic spindle by a group of proteins asymmetrically located at the apical pole of metaphase NBs known as “the apical complex,” which includes the Par (Par-6-aPKC-Par-3/Bazooka) complex.^{23–41} At the end of the embryogenesis, NBs enter a dormancy phase or quiescence and, in response to nutrients, resume proliferation at late first instar larval stages.⁴²

The neuroectoderm from which the embryonic NBs delaminate could be a potential niche for these NBs, whose polarity and cell division axis do depend on those neuroepithelial cells.^{13,43} However, we do not have any clear clue about potential niche-secreted signals that might be regulating this process.⁹ Post-embryonic NB lineages are in close contact with the cortex glia, which enwraps each NB lineage individually in a chamber, providing neuroprotective and trophic functions and promoting neuronal survival within each lineage.^{44–47} Thus, the cortex glia niche stands as an excellent potential source of secreted signals for regulating the ASCD of NBs, but, again, these hypothetical signals remain elusive. Here, we unravel a novel function for Netrins and Slit, secreted by the cortex glia niche, in regulating the ASCD of *Drosophila* larval brain neural stem and progenitor cells.

RESULTS

Robo1 and Fra localize within larval brain NB lineages and Slit and Netrin in the surrounding cortex glia

Two types of NB lineages are detected in the *Drosophila* larval brain (Figure 1A). Whereas type-I NBs (NBIs) are spread over

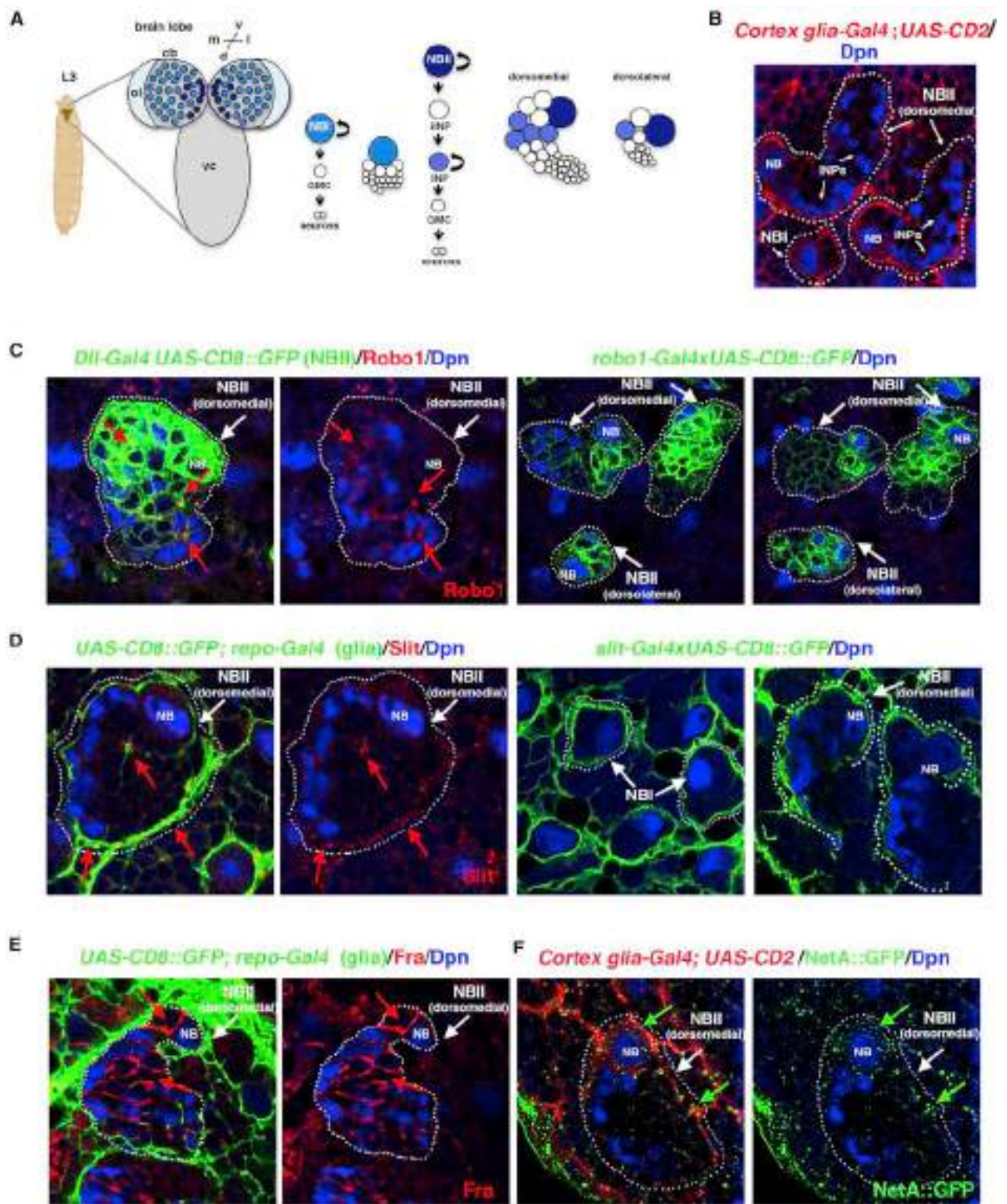


Figure 1. Robo1 and Fra localize within larval brain NB lineages and Slit and Netrin in the surrounding cortex glia
 (A) The *Drosophila* larval central brain (cb) contains type I (NBI) and type II (NBII) NBs. L3, third instar larva; ol, optic lobe; vc, ventral cord; m, medial; l, lateral; d, dorsal; v, ventral; iINP, immature INP.
 (B) The cortex glia (red), labeled by the *Akap200NP2222-Gal4* line, surrounds NBI and NBII lineages in the central brain.

(legend continued on next page)

the central brain and divide to give rise to another NB and a GMC, the only eight type-II NB lineages (NBII) per brain hemisphere are dorsally located and have an extra phase of proliferation through intermediate neural progenitors (INPs) (Figure 1A). Since both types of NB lineages are in tight contact with the surrounding cortex glia (Figure 1B), they are excellent candidates as sources of extrinsic signals to regulate ASCD within NB lineages. We previously found that the ASCD regulator Cno/Afadin forms a complex with the receptor Robo1 to modulate the process of axon guidance.⁴⁸ Hence, we wondered whether Slit-Robo1 and other functionally related axon guidance cues and their receptors, such as Netrins-Fra/DCC, might be potential secreted cues and receptors that extrinsically regulate ASCD within larval brain NB lineages. To investigate this, we first looked at the expression and localization of them in the larval brain. Both Robo1 and Fra accumulated within NB lineages at the membrane of stem (the NB) and progenitor cells (INPs), which express the transcription factor Deadpan (Dpn) (Figures 1C, 1E, S1A, and S1B). Intriguingly, Slit and NetrinA (NetA) were enriched at the cortex glia that surrounds those NB lineages (Figures 1D and 1F). Additionally, in the case of Robo1 and Slit, Gal4 lines in which the expression of the transcription factor Gal4 is under the control of *robo1* or *slit* regulatory regions drove the expression and accumulation of CD8::GFP at the membrane of NB lineages or cortex glia, respectively (Figures 1C and 1D).

Compromising Slit-Robo1 or Netrin-Fra signaling causes ectopic NBs in larval brain NBII lineages

Given the enrichment of Robo1 and Fra within NB lineages and of Slit and Netrin in the surrounding cortex glia, we next analyzed the consequences of compromising these signaling in those locations. We started analyzing NBII lineages (Figure 1A), using specific Gal4 drivers, such as *Distal-less (Dll)-Gal4* or *worniu (wor)-Gal4 asense (ase)-Gal80*.^{49,50} To determine potential changes in the NB lineage cellular composition, we used as markers the transcription factors Dpn (expressed in stem [the NB] and progenitor cells [mature INPs, mINPs]) and Ase, which in NBII lineages is expressed in INPs but not in the NB. Thus, NBs are Dpn⁺Ase⁻, and mINPs are Dpn⁺Ase⁺. Whereas in control NBII clones, only one NB is always detected, *robo1* downregulation in NBII clones or *slit* downregulation in the cortex glia led to the formation of ectopic NBs (eNBs) within the clone (Figures 2A, 2B, S2A, and S2B). A significant increase in the number of mINPs was also detected (Figures 2A and 2B). The same phenotype was observed in *fra*³ null mutant NB clones and after downregulating *NetA* and *NetB* in the cortex glia (Figures 2C, 2D, S2C, and S2D). To further determine that Netrins and Slit were specifically required in the glia and that Fra and Robo1 were signaling within NB lineages, we downregulated

the former within NB lineages and the latter within the cortex glia; no phenotype (i.e., eNBs) was observed in any of those situations (Figures S3A and S3B). Lastly, we explored whether NBII lineages also require Fra and Robo1 signaling. Intriguingly, *fra* or *robo1* downregulation in NBII lineages did not show eNBs (Dpn⁺Ase⁺ in NBII lineages) (Figure S3C). Thus, the ligands Netrins and Slit and the receptors Fra and Robo1 are specifically produced in the cortex glia and in the NB lineages, respectively, and their signaling is exclusively required for the proper development of NBII lineages (see discussion).

The simultaneous downregulation or knocking out of *robo1* and *fra* suppresses the formation of ectopic NBs within NB lineages

Given that compromising either Robo1 or Fra signaling led to a similar phenotype, the formation of eNBs, we reasoned that the simultaneous downregulation of both *robo1* and *fra* would cause a stronger, even synergistic, effect. However, the effect was just the opposite: the formation of eNBs observed after downregulating either *robo1* or *fra* was completely suppressed when both Robo1 and Fra signaling were compromised at the same time in NB clones (Figure 2E). To confirm that the flies used, *UAS-robo1^{RNAi}*; *UAS-fra^{RNAi}*, were carrying both transgenes, we stained the clones with Robo1 and Fra antibodies observing a reduction in the levels of both proteins (Figure S4A). Likewise, we repeated the experiment, this time analyzing both the double *UAS-robo1^{RNAi}*; *UAS-fra^{RNAi}* and the single *UAS-robo1^{RNAi}* and *UAS-fra^{RNAi}* from the same stock (see details in the Figure S4 legend), obtaining the same result (Figure S4B). We also ran an additional control in which each of the single *UAS-robo1^{RNAi}* or *UAS-fra^{RNAi}* was analyzed in the presence of another UAS construct (*UAS-CD8::GFP*) to discard that the phenotype of the double *UAS-robo1^{RNAi}*; *UAS-fra^{RNAi}* was caused by a titration of the Gal-4 driver. Both genotypes, *UAS-robo1^{RNAi}*; *UAS-CD8::GFP* as well as *UAS-CD8::GFP*; *UAS-fra^{RNAi}*, displayed eNBs within NB lineages, whereas the double *UAS-robo1^{RNAi}*; *UAS-fra^{RNAi}* showed again a suppression of that phenotype (Figure S4C). Strikingly, the double null mutant condition *fra*³ *robo1* presented the same effect, a suppression of the eNB phenotype, observed in the single *robo1* or *fra*³ null mutant clones (Figure 2F). Thus, the next set of experiments was directed at understanding this suppression of the eNB phenotype observed after downregulating or knocking out simultaneously *robo1* and *fra*.

Compromising the Robo1 inhibitor Abl tyrosine kinase causes ectopic NBs within NB lineages

During axon guidance, Fra/DCC and Robo signaling have independent but also interdependent functions, antagonizing each other in particular contexts.⁵¹⁻⁵³ In fact, the cytoplasmic Abl

(C) Robo1 (red) is present (red arrows) within NBII lineages, labeled by the *Distal-less (Dll)-Gal4* driver.⁴⁹ A *robo1-Gal4* line drives the expression of *CD8::GFP* in NBII lineages. Two focal planes of a confocal z stack are shown.

(D) Slit (red) is detected (red arrows) in the glia, labeled by the *repo-Gal4* driver. A *slit-Gal4* line drives the expression of *CD8::GFP* in the glia that surrounds NBI and NBII lineages.

(E) Fra (red) is present (red arrows) within NBII lineages and is not detected in the surrounding glia, which is labeled by the *repo-Gal4* driver.

(F) NetA, endogenously labeled with GFP (green), is detected (green arrows) at the cortex glia, marked by the *Akap200NP2222-Gal4* line.

All panels show confocal micrographs; the transcription factor Dpn (blue) labels NBs and mature INPs.

See also Figure S1.

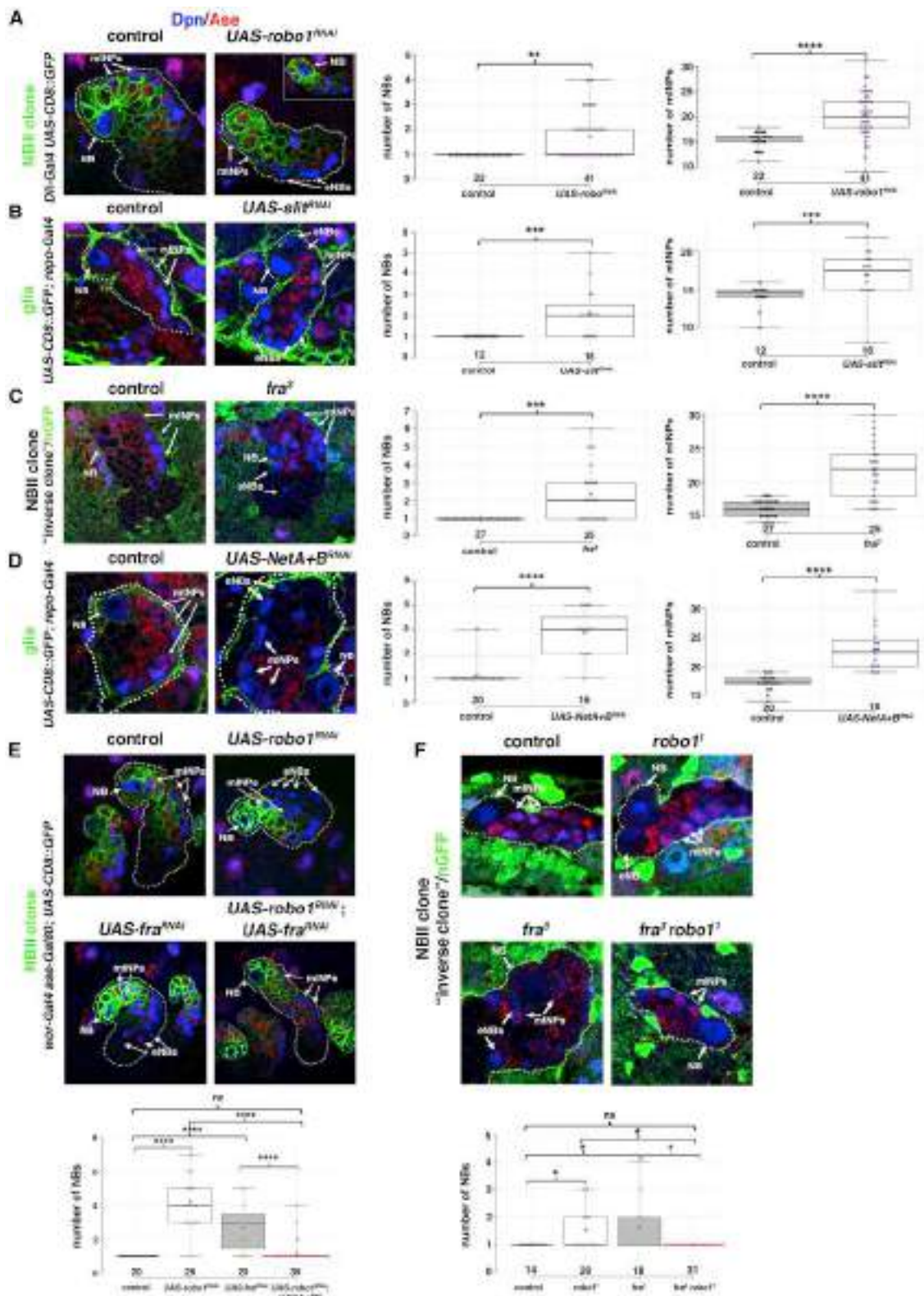


Figure 2. The ectopic NB phenotype of *robo1* or *fra* signaling loss is suppressed after simultaneously downregulating both receptors
 (A) *robo1* downregulation in NBII lineages displays ectopic NBs (eNBs) and more mNPs; the inset shows a z stack plane of focus in which the NB is detected.
 (B) *slit* downregulation in the glia shows eNBs and more mNPs.

(legend continued on next page)

tyrosine kinase has been linked with Fra and Robo1 receptors, physically interacting with both of them.^{54–56} Whereas Abl binding to the cytoplasmic domain of Fra promotes Netrin-dependent neuron midline crossing, and the process is kinase independent, Abl antagonizes Robo1 repulsive signaling, and it does so by directly phosphorylating Robo1 cytoplasmic domain.^{54–56} This interaction and opposed connection of Abl with Fra and Robo1 might be helping to understand the phenotype of *robo1 fra* double downregulation in larval brain NB lineages. Thus, we looked at a potential function of Abl in our system. First, we observed Abl expression within NB clones (Figure 3A). Next, we looked at the consequences of downregulating Abl in those NB lineages, finding eNBs within the clones (Figures 3B and S5A). Intriguingly, the expression of a kinase dead form of Abl (Abl^{KD}) showed a similar phenotype (Figures 3C and S5B). Given that Robo1 is phosphorylated and inhibited by Abl, an increase in Robo1 signaling in Abl^{KD} might be responsible for the observed phenotype. In fact, the overexpression of *robo1* led to the formation of eNBs within the NB lineages (Figures 3D and S5C). Thus, a potential scenario to explain the relationship between Robo1 and Fra in NB lineages was that Fra regulates, through Abl kinase, Robo1 signaling threshold levels, which would be critical (i.e., both *robo1* loss and overexpression alter NBII lineage development) for a correct cell-fate commitment (Figure 3E). This would explain the suppression of the eNB phenotype observed after downregulating simultaneously *robo1* and *fra* in NB lineages, i.e., *fra* downregulation, and the consequent increase in Robo1 signaling, would be compensated by the *robo1* downregulation in the double *UAS-robo1^{RNAi}; UAS-fra^{RNAi}*. However, if Robo1 signaling is necessary within NBII lineages, as shown by the eNB phenotype observed after downregulating *robo1* (Figure 2A) and in *robo1* null mutant clones (Figure 2F), an apparent paradox was the suppression of the eNB phenotype in the *fra robo1* double null mutant clones. To explain that, we hypothesized that other Robo receptors, such as Robo2, might signal in the absence of Robo1 compensating its loss in the *fra robo1* double null mutant because, in this genetic background, Abl kinase would not be present either to inhibit Robo2 signaling. Interestingly, Robo2 contains the same phosphorylation sites that are phosphorylated by Abl kinase in Robo1.⁵⁴ Following this reasoning, in the single *robo1* mutant, Abl would be recruited by Fra, and therefore, in this case, Abl could inhibit Robo2 causing the eNB phenotype observed in a *robo1* mutant background. Hence, we looked at the effect of downregulating *robo2* in NBII lineages, finding very specific cases of eNBs, although the phenotype was not significant (Figure S5D). We conclude that Robo2 is not essential in NB and progenitor cells in normal conditions, i.e., when Robo1 would be the key and main regulator, but it can act when Robo1 and Fra-Abl signaling is impaired.

Slit-Robo1 signaling is required for ASCD regulation in NBs and INPs of larval brain NB lineages

To understand the presence of eNBs within NBII lineages after compromising Robo1 signaling, we analyzed whether the process of ASCD in stem (the NB) and progenitor cells (INPs) was impaired. We looked at potential failures in the localization of key ASCD regulators, such as the apical proteins aPKC, Inscutable (Insc)/mlnsc, and Cno/Afadin, as well as of the basal cell-fate determinants Numb, Brain tumor (Brat)/TRIM3, and Miranda (Mira), a Brat-adaptor protein. Whereas all these regulators formed crescents in control metaphase stem and progenitor cells, the localization of aPKC, Cno, and Numb failed at this stage after downregulating *robo1* within NB clones (Figure 4A). However, no significant changes in the localization of Insc, Brat, and Mira were observed (Figure 4A). The localization of the ASCD regulators aPKC, Cno, and Numb also failed after downregulating *slit* in the glia (Figure 4B). To more directly demonstrate that the ASCD of progenitor cells within NBII clones was also altered, we labeled these cells with Ase (expressed in INPs/GMCs). We observed very significant defects in the distribution of Numb in these mitotic cells Ase⁺ (Figure S6). Thus, the process of ASCD in NBII lineages was impaired after compromising Slit-Robo1 signaling pathway.

Compromising Netrin-Fra signaling or Abl kinase activity causes a *robo1* mutant-like ASCD phenotype

To further corroborate that Fra signaling regulates Robo1 signaling threshold levels through Abl kinase, we first analyzed the localization of the ASCD regulators aPKC, Cno, and Numb after downregulating *fra* in NBII lineages, finding defects in all of them (Figure 5A). We also checked in these lineages for the localization of Numb in dividing Ase⁺ progenitors (INPs/GMCs), finding very significant defects (Figure S6). Given that the localization of aPKC and Numb was the most affected, we also looked at it after downregulating *NetA* and *NetB* expression in the glia, observing similar defects than in *fra* knockdown NBII lineages (Figure 5B). Finally, to further prove that Abl kinase was implicated in ASCD by phosphorylating and repressing Robo1, we looked at aPKC and Numb localization in NBII lineages expressing the kinase dead form of Abl (Abl^{KD}) or overexpressing *robo1*, finding a similar phenotype than that observed after downregulating *fra* in NB lineages (Figures 5C and 5D). Thus, Netrin-Fra signaling would regulate, through Abl kinase, Robo1 signaling threshold levels, which in turn directly impinge on the correct distribution of ASCD regulators in stem and progenitor cells, within NBII lineages.

Robo1 impacts on ASCD through the small GTPases Rac1 and Cdc42

Finally, we wondered how Robo1 signaling was impacting on the localization of the ASCD intrinsic regulators aPKC and Cno/Afadin;

(C) *fra*³ null mutant NBII clones show eNBs and more mINPs.

(D) *NetA* and *NetB* downregulation in the glia shows eNBs and more mINPs.

(E) *robo1* and *fra* simultaneous downregulation in NBII lineages suppresses the formation of eNBs, present in each of the single mutant condition.

(F) *fra*³ *robo1* double null mutant NBII clones do not show eNBs, which are observed in both *robo1* and *fra*³ null mutant clones.

Data analysis shown in the scatterplots: two-tailed Mann-Whitney non-parametric U test, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001; ns, not significant; n = number of NB lineages analyzed.

All panels show confocal micrographs of NBII lineages; NBs/eNBs are Dpn⁺ Ase⁻ (blue), and mature INPs (mINPs) are Dpn⁺ Ase⁺ (purple).

See also Figures S2–S4.

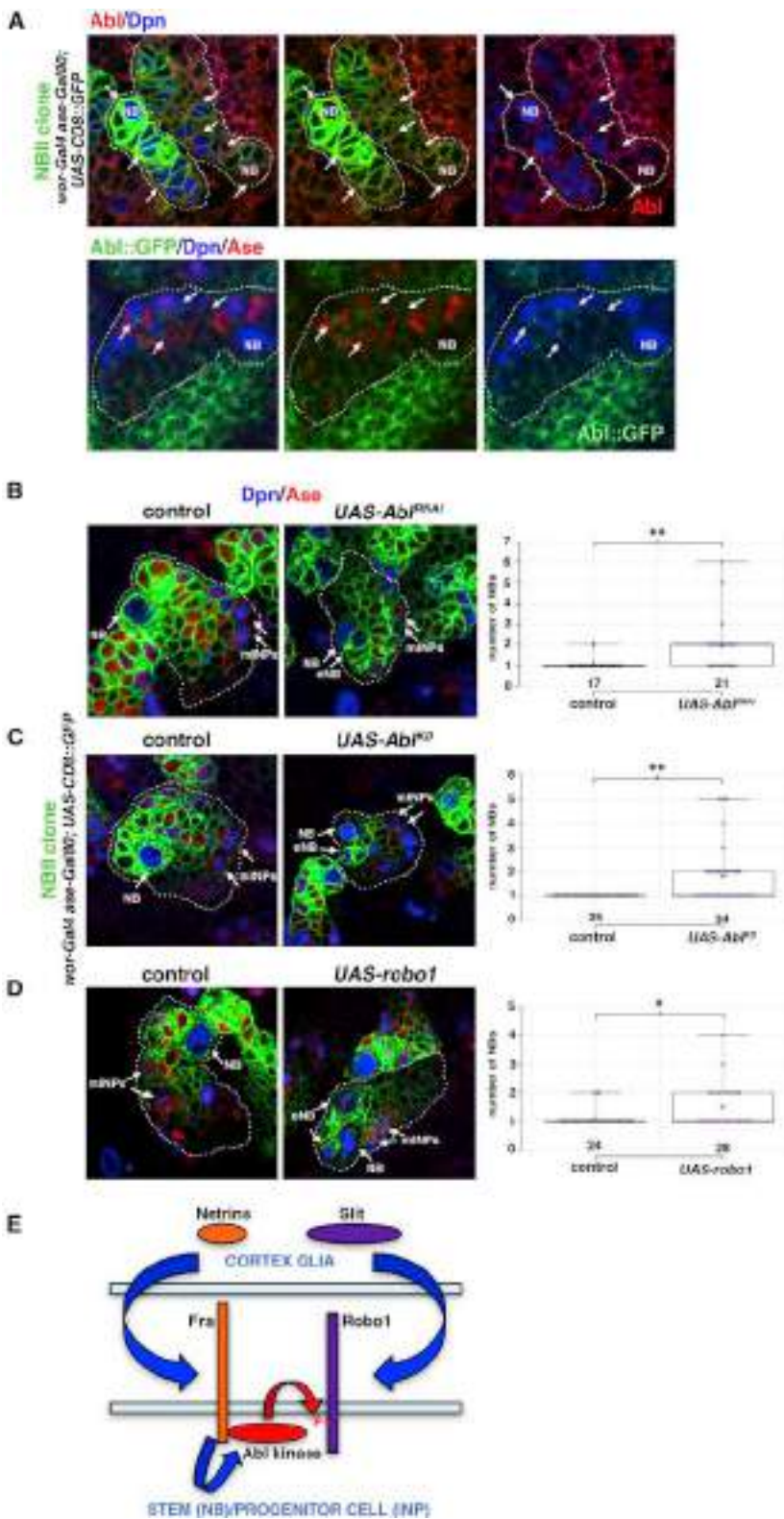


Figure 3. Compromising the Robo1 inhibitor Abi tyrosine kinase causes ectopic NBs within NB lineages

(A) Abi expression is detected within NBII lineages by an antibody (red in the upper panels) or by an endogenously GFP-labeled Abi line (green in the lower panels).

(B and C) *Abi* downregulation (B) or an *Abi* kinase dead form expression (C) causes eNBs.

(D) *robo1* overexpression causes eNBs.

(E) Working hypothesis: Netrins secreted by the cortex glia activates Fra, present at NBs and INPs; then, Fra recruits Abi kinase that phosphorylates and represses Robo1 signaling, which is activated by Slit, also secreted by the cortex glia. Blue arrows denote activation whereas the red arrow represents repression.

Data analysis shown in the scatterplots: two-tailed Mann-Whitney non-parametric U test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n =$ NB lineages analyzed.

All panels show confocal micrographs of NBII lineages; NBs/eNBs are Dpn⁺ Ase⁻ (blue), and mature INPs (mINPs) are Dpn⁺ Ase⁺ (purple). See also Figure S5.

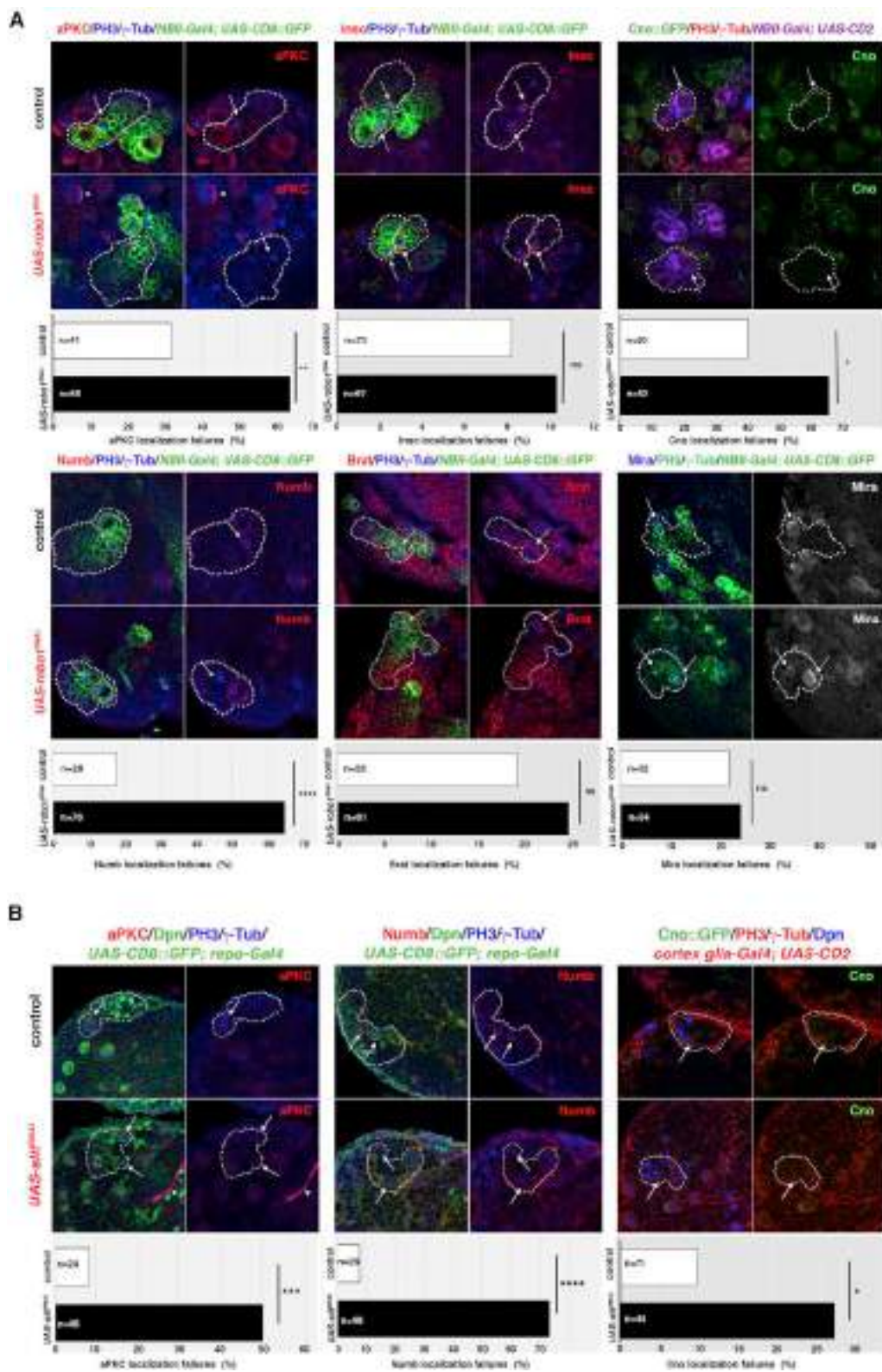


Figure 4. Slit-Robo1 signaling regulates ASCD in dividing cells of larval brain NB lineages

(A) *robo1* downregulation in NBII lineages, by *wor-Gal4 ase-Gal80*, causes aPKC, Cno, and Numb localization failures (white arrows); Insc, Brat, and Mira localization are not affected (white arrows).

(legend continued on next page)

the failures in Numb localization, which depends directly on aPKC,⁵⁷ could be explained by the mislocalization of aPKC after impairing Robo1 signaling. Several Robo1 downstream effectors and physically interacting partners, such as the GTPase-activating protein (GAP) RhoGAP93B, which is repressed by Robo1 in other systems,⁵⁸ the Dreadlocks (Dock)-p21-activated serine-threonine kinase (Pak) complex, as well as the guanine exchange factor (GEF) Son of Sevenless (Sos), directly regulate the small GTPase Rac1.^{58–61} Thus, we looked at the effect of downregulating Rac1 in larval brain NB lineages using dominant negative forms of Rac1 (Rac1^{N17} and Rac1^{L89}), observing eNBs within the clone (Figures 6A and S7A). In addition, the localization of the ASCD regulators aPKC, Cno, and Numb, affected after impairing Robo1 signaling, was also altered in Rac1^{N17} NB lineages (Figure 6B). Moreover, the overexpression of the Rac1 inhibitor and Robo1 partner RhoGAP93B in NB lineages also showed eNBs (Figures 6C and S7B). The same phenotype was observed after downregulating the Robo1 partner Dock and the Dock-interacting kinase Pak (Figures 6C and S7B). However, no significant defects were observed after downregulating the Robo1 interacting partner Sos in NB lineages (Figures 6C and S7B). Thus, Robo1 regulates Rac1 within NB lineages through the Rac1 GAP RhoGAP93B, which Robo1 would repress, and through the Dock-Pak complex, which Robo1 would attract and which can trigger Rac1 activation in other systems.^{58,60}

In addition to Rac1, the small GTPase Cdc42 is also a target of RhoGAP93B and partner of Pak.^{59,62,63} Intriguingly, Cdc42 is a well-known regulator of ASCD that forms a complex with Par-6-aPKC and is key for their apical localization in mitotic NBs.⁶⁴ In fact, the expression of a dominant negative form of Cdc42 (Cdc42^{N17}) in NB lineages also caused eNBs (Figures 7A and S7C) and failures in the localization of the ASCD regulators aPKC, Cno, and Numb (Figure 7B).⁶⁴ Lastly, we wondered how Rac1 was altering the ASCD of NB and progenitor cells, as such function for Rac1 has not previously been described. Remarkably, in vertebrate epithelial cells, both Cdc42 and Rac1 bind Par-6, which links the small GTPases with the rest of the Par complex, aPKC and Par-3.^{65–68} Hence, we looked at the effect on Par-6 of expressing dominant negative forms of Rac1 or Cdc42 in NB lineages, observing failures in the localization of Par-6 in both cases (Figure 7C). The above experiments could explain the formation of eNBs after losing Robo1 signaling. In order to clarify the similar phenotype (i.e., eNBs and failures in the localization of ASCD regulators) observed after overexpressing *robo1* in NB lineages, we analyzed the consequences of overexpressing Rac1 (Rac1^{V12}) or Cdc42 (Cdc42^{V12}) in NBII lineages. Whereas the expression of Cdc42^{V12} did not cause a significant phenotype compared with control lineages, the expression of Rac1^{V12} showed a very significant increase in the number of NBs (Figures 7D and S7D). In addition, the expression of Rac1^{V12} also led to very significant defects in the localization of aPKC (Figure 7E). Thus, proper Robo1/Rac1-Cdc42 signaling threshold levels modulate NB and progenitor ASCD by impinging on the correct localization of the Par (Par-6-aPKC-Par3/

Bazooka) complex and of Cno/Afadin, all components of the mitotic NB and progenitor “apical complex.”

DISCUSSION

A precise regulation of ASCD is critical in development, tissue homeostasis, and tumorigenesis. Extrinsic signals from specialized microenvironments, the niches, importantly contribute to that regulation by promoting the stem cell fate in the daughter cell that receives those signals, whereas the other daughter cell enters a differentiation program. Intriguingly, the ASCD of some stem cells, including the *Drosophila* CNS stem cells called NBs, the subject of this study, seems to depend exclusively on intrinsic regulatory mechanisms.^{9,69,70} Then, are those stem cells completely independent of their surrounding environment? Also, how general is the requirement of niches and the signals secreted from them for maintaining the stem cell fate in an ASCD?

Here, we show that the ASCD of *Drosophila* NBs, a traditional paradigm for studying intrinsic ASCD regulatory mechanisms, do also depend on extrinsic cues secreted by a glial niche, which are in close contact with those neural stem cell lineages in the larval brain. However, these extrinsic signals are not required to maintain the stem cell fate. They ultimately impact on the regulation of intrinsic factors to induce differentiation in one daughter cell, repressing the self-renewal “basal state” in this cell. We are aware that different studies have shown the possibility of growing in culture isolated larval NBs, which are able to form crescents and divide asymmetrically without any additional extrinsic signal.^{11,12,71,72} However, most of these experiments were performed using central brain NBI NBs, which do not require Fra and Robo1 signaling for their correct development (Figure S3C), or included NBII, but only particular markers were analyzed (i.e., Baz and Pon).⁷² This is relevant as, for example, we observed that the localization of some ASCD regulators were not affected without extrinsic signals (i.e., Insc, Mira, and Brat). In the experiments in culture, some of the latter regulators are frequently used.^{11,12,71} It is also key to properly quantify the cases of crescent formation at metaphase, as the phenotypes are never fully penetrant and can be even totally rescued at telophase. For example, in our system, aPKC showed about 50% localization failures at metaphase, implying that there are NBII that show aPKC crescents. Nevertheless, finding that glia-secreted cues are specifically required in NBII lineages was indeed very intriguing. NBII lineages are larger than NBI, as they undergo an additional proliferation phase through INPs (Figure 1) and hence are more prone to induce tumor-like overgrowth when ASCD fails. Thus, additional levels of regulation might have evolved in these lineages to ensure the correct division of the NB and INPs to avoid overgrowths. We will keep further exploring and clarifying this issue in the future.

In this work, we have unveiled a novel function for the axon guidance cues Netrins and their Fra/DCC-like receptor in regulating self-renewal versus differentiation in neural stem and

(B) *slit* downregulation in the glia, by *repo-Gal4* or *Akap200NP2222-Gal4* (cortex glia), causes aPKC, Cno, and Numb localization failures (white arrows).

All panels show confocal micrographs of NBII lineages; PH3 labels mitotic cells; γ -Tub labels centrosomes. Data analysis: chi-square test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; ns, not significant; n = number of dividing cells analyzed.

See also Figure S6.

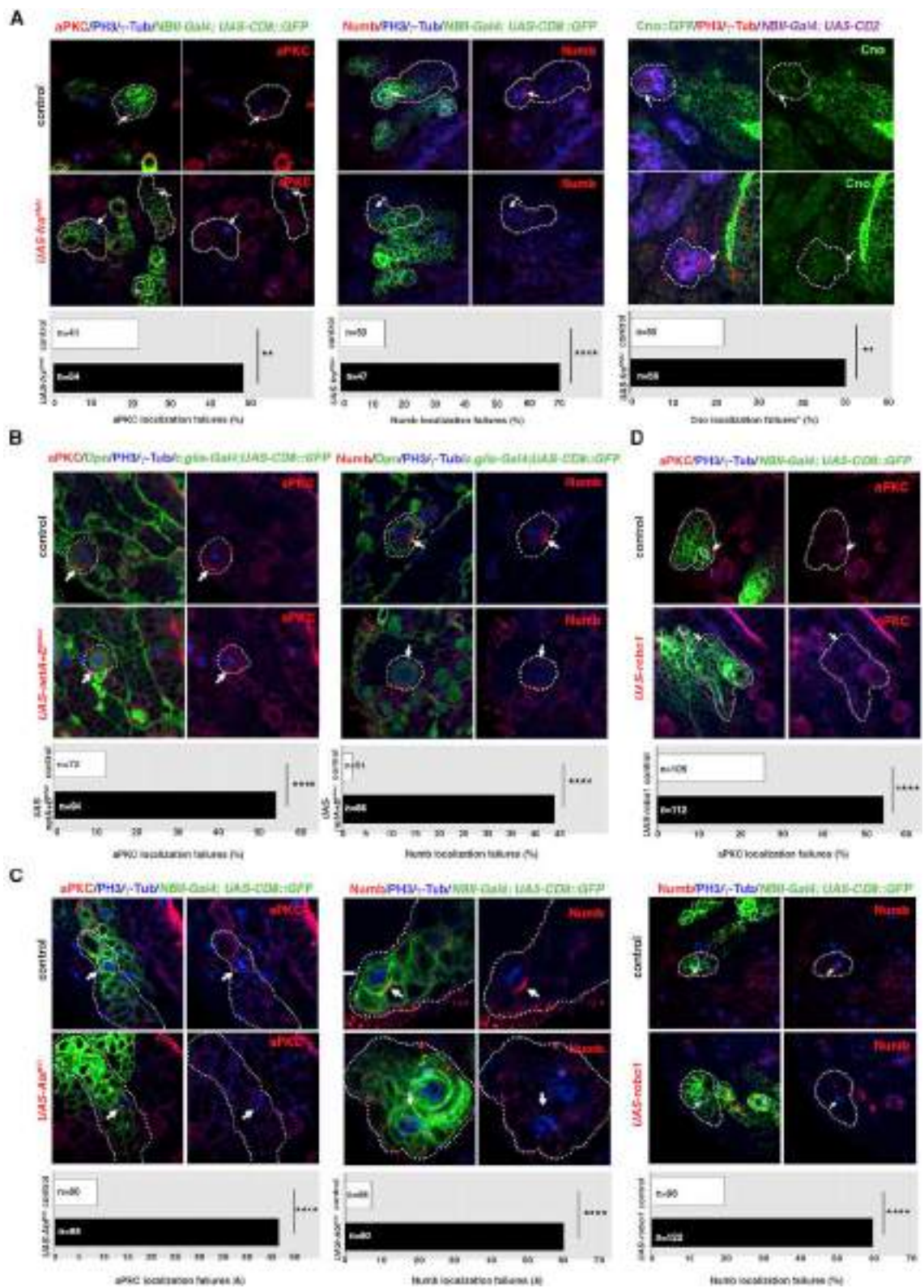


Figure 5. Netrin-Fra signaling and Abl kinase regulate ASCD in dividing cells of larval brain NB lineages

(A) *fra* downregulation in NBII lineages, by *wor-Gal4 ase-Gal80*, causes failures in aPKC, Cno, and Numb localization.

(B) *NetA* and *NetB* downregulation in the cortex glia (c. glia), by *Akap200NP2222-Gal4*, causes aPKC and Numb localization failures.

(legend continued on next page)

progenitor cells of larval NBII lineages. The cortex glial niche that surrounds those lineages secretes Netrins, which modulate Robo1 signaling threshold levels through Fra and Abl kinase in stem and progenitor cells. Whereas Robo1 signaling is activated by its ligand Slit, also secreted by the glial niche, Abl kinase represses this signaling, and these balanced Robo1 signaling levels appear to be critical for the cell-fate commitment of the daughter cell prone to differentiate. The cortex glia dynamically undergoes remodeling through larval stages; only at late third instar larval stages (L3) the glia chamber enwrapping each NB lineage forms completely.⁴⁷ Here, we already observed the presence of the secreted ligands Slit and NetA in the cortex glia at L2, suggesting that these cues are being secreted from the glia since the reactivation of dormant NBs at early L2 (Figure S1D).

Slit-Robo signaling regulates progenitor cell proliferation in the mammalian CNS^{73,74} and promotes the terminal asymmetric division of a differentiation-committed cell in the *Drosophila* CNS.⁷⁵ Likewise, in mammary stem cells, Robo1 favors their asymmetric mode of cell division.⁷⁶ Slit-Robo signaling is also required in other stem or progenitor cells to regulate their lineage specification,⁷⁷ identity,⁷⁸ or their adhesion/anchoring to the niche.^{79,80} No role for Netrin-Fra/DCC signaling has been previously described in all those contexts.

Ultimately, a transcriptional control has been pointed out as the most common way of action by which Robo signaling regulate the above-mentioned cellular processes.^{73,75–78} Here, we show a novel, transcription-independent mechanism by which Robo1 signaling regulates ASCD (Figure 7F). Robo1 signaling would be required to activate the small GTPases Rac1 and Cdc42 by repressing its inhibitor RhoGAP93B as well as by recruiting the Dock-Pak complex, which, through Pak, can also bind activated forms of both Rac1 and Cdc42.^{60,81} Rac1 and Cdc42 downregulation directly impacted on the intrinsic machinery that modulate ASCD in neural stem and progenitor cells. Specifically, compromising those small GTPases led to defects in the localization of the ASCD regulators, Par-6, aPKC, Cno, and Numb, and the concomitant formation of eNBs within brain neural lineages, a phenotype that recapitulates that of Slit-Robo1 signaling impairment. The overexpression of *robo1* caused similar defects than the loss of *robo1*. It was also a similar phenotype than for the loss of *fra*, the downregulation of Abl, or the expression of a kinase dead form of Abl (unable to repress Robo1). Hence, based on all those experiments, our working model proposes that Netrin-Fra signaling would be modulating, through Abl kinase, the Robo1 signaling threshold levels necessary to regulate in turn the correct activity of the small GTPases Rac1 and Cdc42. In fact, and according to this, the expression of *Rac1^{V12}* within NBII lineages caused the formation of eNBs and led to defects in the localization of aPKC in NB and progenitor cells, a similar phenotype than that observed after overexpressing *robo1* in these NBII lineages. It would be interesting to determine whether this novel function of Netrin-Fra/DCC signaling regulating ASCD is also

conserved in vertebrates, and whether Robo/Rac1-Cdc42 signaling threshold levels in the above-mentioned contexts are also critical for and dependent on Netrin-DCC signaling, as we have found in *Drosophila*.

STAR METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - *Drosophila* strains and genetics
 - *Drosophila* husbandry
- METHOD DETAILS
 - Histology, immunofluorescence, and microscopy
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.001>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Bashaw, E. Giniger, J. Knoblich, F. Matsuzaki, M.J. Murray, A. Wodarz, the Bloomington *Drosophila* Stock Center at the University of Indiana, the Vienna *Drosophila* Resource Center, the Kyoto Stock Center, and the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa for kindly providing fly strains and reagents. Our lab was supported by the Spanish grants from the Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2015-64251); the Ministry of Science, Innovation, and Universities (PGC2018-097093-B-100); and by FEDER (European Regional Development Fund). A.T.-J. was supported by a predoctoral FPI fellowship associated with the Severo Ochoa (SO) Project (SEV-2013-0317), and S.M. was supported by a predoctoral FPI fellowship associated with the BFU2015-64251 grant. The “Instituto de Neurociencias” in Alicante is a “Severo Ochoa Center of Excellence in R&D.”

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.T.-J. conducted most of the experiments and analyzed all data; S.M.-O. performed some experiments; and A.C. conceived the study, designed the experiments, and wrote the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests

Received: May 27, 2021

Revised: February 21, 2022

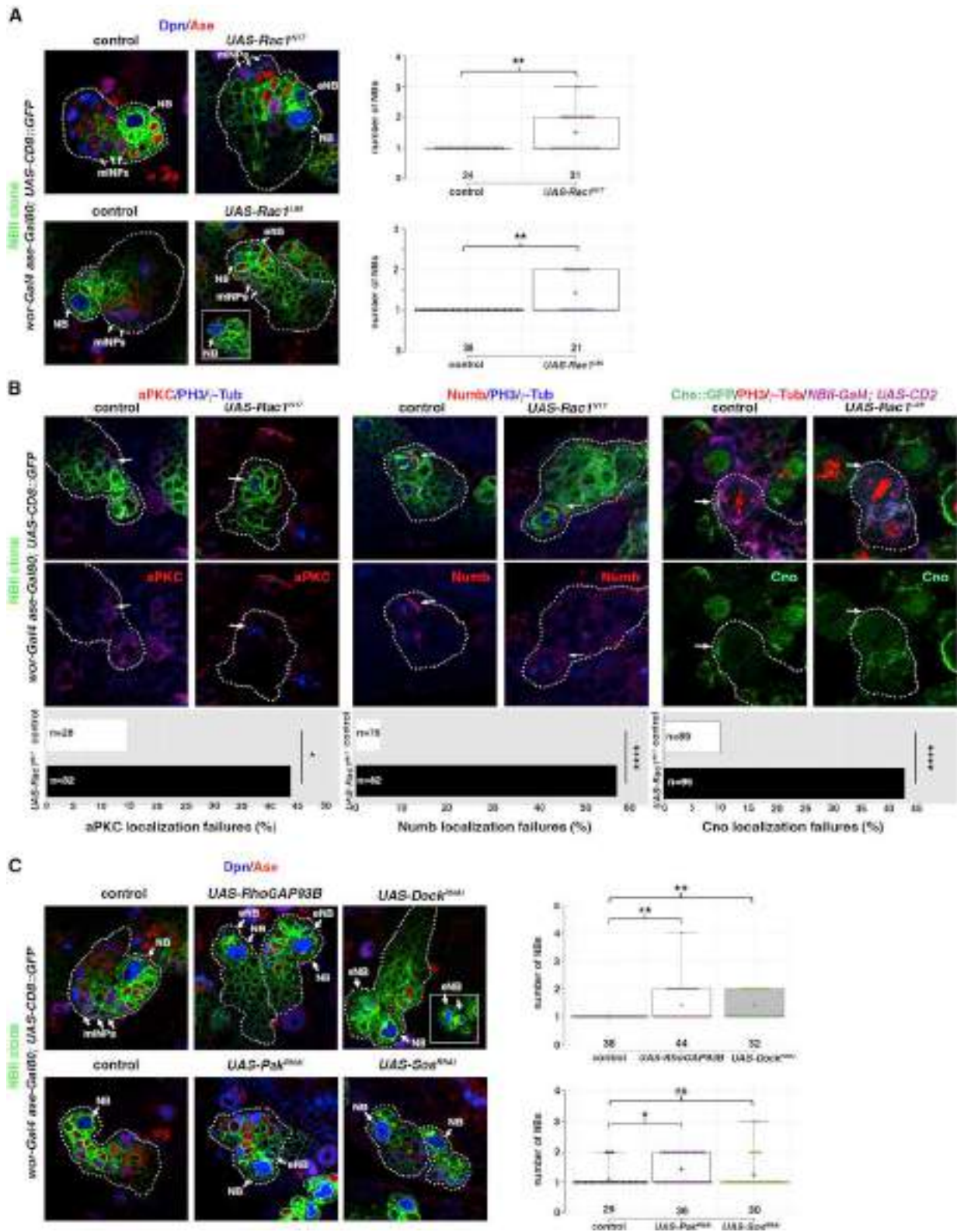
Accepted: April 1, 2022

Published: April 25, 2022

(C and D) An Abl kinase dead form expression (C) or *robo1* overexpression (D) in NBII lineages, by *wor-Gal4 ase-Gal80*, causes aPKC and Numb localization failures.

All panels show confocal micrographs of NBII lineages; PH3 labels mitotic cells; γ -Tub labels centrosomes. Data analysis: chi-square test; ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; n = number of dividing cells analyzed.

See also Figure S6.



(legend on next page)

REFERENCES

- Lander, A.D., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham, M., Calof, A.L., Trumpp, A., and Oskarsson, T. (2012). What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biol.* *10*, 19. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-19>.
- Scadden, D.T. (2014). Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche. *Cell* *157*, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.013>.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* *4*, 7–25.
- Harrison, S.M., and Harrison, D.A. (2006). Contrasting mechanisms of stem cell maintenance in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.* *17*, 518–533. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.07.004>.
- Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* *132*, 598–611. S0092-8674(08)00139-6 [pii]. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.038>.
- Falk, S., and Götz, M. (2017). Glial control of neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* *47*, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.025>.
- Bjornsson, C.S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., and Temple, S. (2015). It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Dev. Cell* *32*, 435–446. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.010>.
- Chacón-Martínez, C.A., Koester, J., and Wickström, S.A. (2018). Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity. *Development* *145*, dev165399. <https://doi.org/10.1242/dev.165399>.
- Chai, P.C., Chia, W., and Cai, Y. (2012). A niche for *Drosophila* neuroblasts? *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *1*, 307–314. <https://doi.org/10.1002/wdev.27>.
- Homem, C.C., and Knoblich, J.A. (2012). *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development* *139*, 4297–4310. <https://doi.org/10.1242/dev.080515>.
- Januschke, J., and Gonzalez, C. (2010). The interphase microtubule aster is a determinant of asymmetric division orientation in *Drosophila* neuroblasts. *J. Cell Biol.* *188*, 693–706. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905024>.
- Ceron, J., Tejedor, F.J., and Moya, F. (2006). A primary cell culture of *Drosophila* postembryonic larval neuroblasts to study cell cycle and asymmetric division. *Eur. J. Cell Biol.* *85*, 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.02.006>.
- Yoshiura, S., Ohta, N., and Matsuzaki, F. (2012). Tre1 GPCR signaling orients stem cell divisions in the *Drosophila* central nervous system. *Dev. Cell* *22*, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.027>.
- Bello, B., Reichert, H., and Hirth, F. (2006). The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of *Drosophila*. *Development* *133*, 2639–2648. <https://doi.org/10.1242/dev.02429>.
- Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J.A. (2006). Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* *124*, 1241–1253. S0092-8674(06)00236-4 [pii]. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.038>.
- Bowman, S.K., Rolland, V., Betschinger, J., Kinsey, K.A., Emery, G., and Knoblich, J.A. (2008). The tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in *Drosophila*. *Dev. Cell* *14*, 535–546.
- Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y., and Matsuzaki, F. (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* *377*, 627–630. <https://doi.org/10.1038/377627a0>.
- Knoblich, J.A., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* *377*, 624–627. <https://doi.org/10.1038/377624a0>.
- Lee, C.Y., Wilkinson, B.D., Siegrist, S.E., Wharton, R.P., and Doe, C.Q. (2006). Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev. Cell* *10*, 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.01.017>.
- Rhyu, M.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* *76*, 477–491. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90112-0).
- Spana, E.P., and Doe, C.Q. (1995). The Prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* *121*, 3187–3195.
- Uemura, T., Shepherd, S., Ackerman, L., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1989). numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell* *58*, 349–360. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90849-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90849-0).
- Culurgioni, S., Alfieri, A., Pendolino, V., Laddomada, F., and Mapelli, M. (2011). Inscuteable and NuMA proteins bind competitively to Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN) during asymmetric cell divisions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *108*, 20998–21003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113077108>.
- Keder, A., Rives-Quinto, N., Aerne, B.L., Franco, M., Tapon, N., and Carmena, A. (2015). The hippo pathway core cassette regulates asymmetric cell division. *Curr. Biol.* *25*, 2739–2750. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.064>.
- Kraut, R., and Campos-Ortega, J.A. (1996). inscuteable, a neural precursor gene of *Drosophila*, encodes a candidate for a cytoskeleton adaptor protein. *Dev. Biol.* *174*, 65–81. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0052>.
- Kraut, R., Chia, W., Jan, L.Y., Jan, Y.N., and Knoblich, J.A. (1996). Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* *383*, 50–55. <https://doi.org/10.1038/383050a0>.
- Kuchinke, U., Grawe, F., and Knust, E. (1998). Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr. Biol.* *8*, 1357–1365. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)00016-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)00016-5).
- Parmentier, M.L., Woods, D., Greig, S., Phan, P.G., Radovic, A., Bryant, P., and O’Kane, C.J. (2000). Rapsynoid/partner of inscuteable controls asymmetric division of larval neuroblasts in *Drosophila*. *J. Neurosci.* *20*, RC84.
- Petronczki, M., and Knoblich, J.A. (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* *3*, 43–49. <https://doi.org/10.1038/35050550>.
- Schaefer, M., Petronczki, M., Dorner, D., Forte, M., and Knoblich, J.A. (2001). Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Cell* *107*, 183–194. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00521-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00521-9).
- Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Knoblich, J.A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Alpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *10*, 353–362. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00401-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00401-2).

Figure 6. Robo1 impacts on ASCD through the small GTPase Rac1

(A) *Rac1^{N17}* or *Rac1^{L89}* (dominant negative forms) expression in NBII lineages shows eNB.

(B) *Rac1^{N17}* expression in NBII lineages shows aPKC, Cno, and Numb localization failures (white arrows). Data analysis: chi-square test, *p < 0.05, **** p < 0.0001; n = number of dividing cells analyzed. PH3 labels mitotic cells; γ -Tub labels centrosomes.

(C) The Rac1 inhibitor *RhoGAP93B* overexpression in NBII lineages, or the *Dock* or *Pak* downregulation, shows eNBs. Sos downregulation does not show significant defects.

Data analysis in (A) and (C): two-tailed Mann-Whitney non-parametric U test, *p < 0.05, **p < 0.01; ns, not significant; n = number of NB lineages analyzed.

All panels show confocal micrographs of NBII lineages.

See also Figures S7A and S7B.

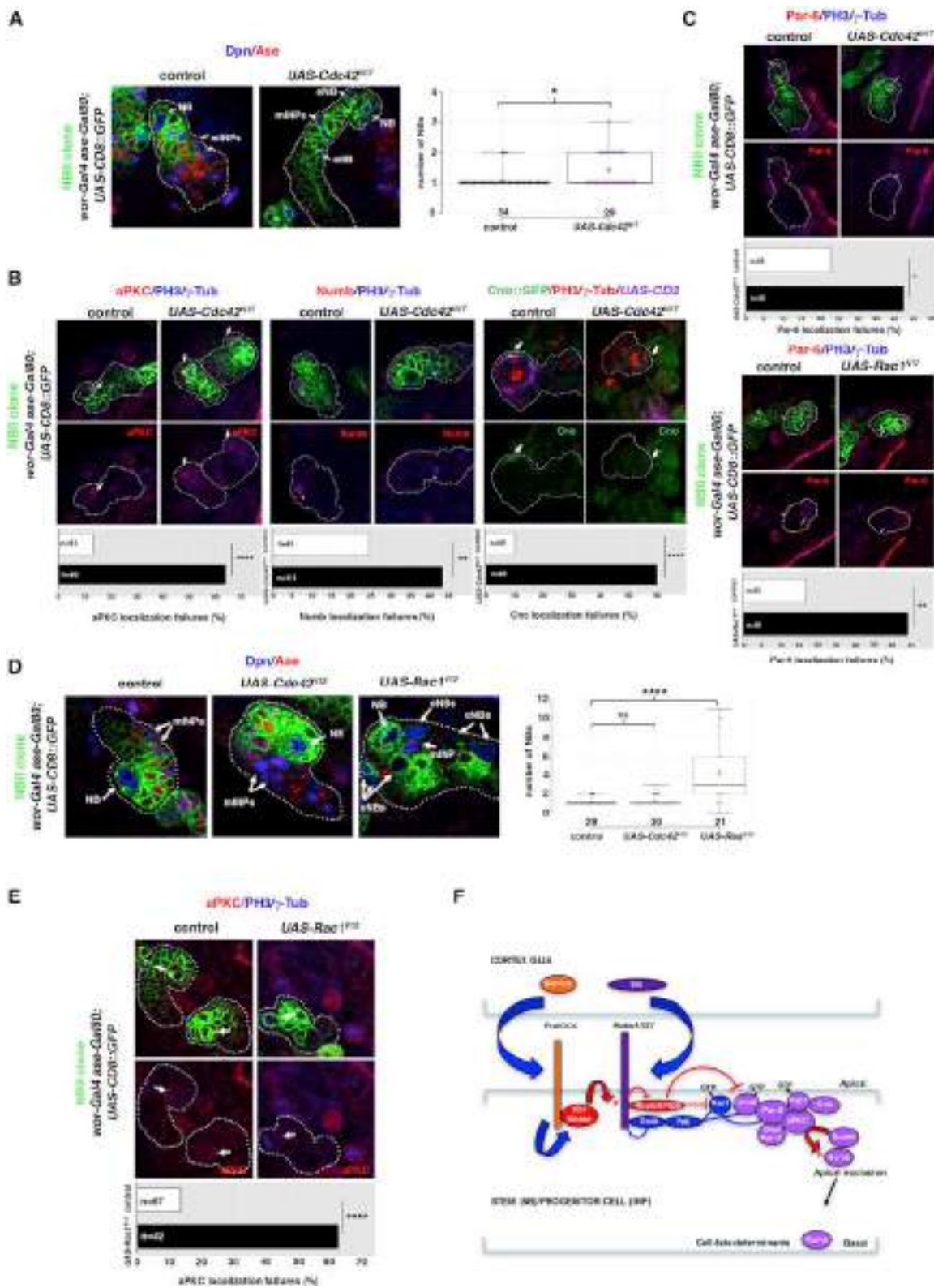


Figure 7. *Robo1* impacts on ASCD through the small GTPases *Rac1* and *Cdc42* required for *Par-6* localization

(A) *Cdc42*^{DN17} (dominant negative form) expression in NBII lineages shows eNBs.

(B) *Cdc42*^{DN17} expression in NBII lineages shows aPKC, Cno, and Numb localization failures (white arrows).

(legend continued on next page)

32. Schober, M., Schaefer, M., and Knoblich, J.A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 548–551. <https://doi.org/10.1038/990135>.
33. Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A., and Knust, E. (2000). *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J. Cell Biol.* 150, 1361–1374. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1361>.
34. Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U., and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 544–547. <https://doi.org/10.1038/990128>.
35. Yu, F., Cai, Y., Kaushik, R., Yang, X., and Chia, W. (2003). Distinct roles of Galphai and Gbeta13F subunits of the heterotrimeric G protein complex in the mediation of *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *J. Cell Biol.* 162, 623–633. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303174>.
36. Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X., and Chia, W. (2000). Analysis of partner of inscuteable, a novel player of *Drosophila* asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* 100, 399–409. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80676-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80676-5).
37. Speicher, S., Fischer, A., Knoblich, J., and Carmena, A. (2008). The PDZ protein Canoe regulates the asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts and muscle progenitors. *Curr. Biol.* 18, 831–837. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.072>.
38. Carmena, A., Makarova, A., and Speicher, S. (2011). The Rap1-Rgl-Ral signaling network regulates neuroblast cortical polarity and spindle orientation. *J. Cell Biol.* 195, 553–562. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108112>.
39. Siller, K.H., Cabernard, C., and Doe, C.Q. (2006). The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat. Cell Biol.* 8, 594–600. <https://doi.org/10.1038/ncb1412>.
40. Bowman, S.K., Neumüller, R.A., Novatchkova, M., Du, Q., and Knoblich, J.A. (2006). The *Drosophila* NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev. Cell* 10, 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.05.005>.
41. Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T., and Matsuzaki, F. (2006). *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat. Cell Biol.* 8, 586–593. <https://doi.org/10.1038/ncb1409>.
42. Britton, J.S., and Edgar, B.A. (1998). Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development* 125, 2149–2158.
43. Siegrist, S.E., and Doe, C.Q. (2006). Extrinsic cues orient the cell division axis in *Drosophila* embryonic neuroblasts. *Development* 133, 529–536. <https://doi.org/10.1242/dev.02211>.
44. Bailey, A.P., Koster, G., Guillemer, C., Hirst, E.M., MacRae, J.I., Lechene, C.P., Postle, A.D., and Gould, A.P. (2015). Antioxidant role for lipid droplets in a stem cell niche of *Drosophila*. *Cell* 163, 340–353. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.020>.
45. Cheng, L.Y., Bailey, A.P., Leevers, S.J., Ragan, T.J., Driscoll, P.C., and Gould, A.P. (2011). Anaplastic lymphoma kinase spares organ growth during nutrient restriction in *Drosophila*. *Cell* 146, 435–447. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.040>.
46. Peraanu, W., Shy, D., and Hartenstein, V. (2005). Morphogenesis and proliferation of the larval brain glia in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 283, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.04.024>.
47. Spéder, P., and Brand, A.H. (2018). Systemic and local cues drive neural stem cell niche remodelling during neurogenesis in *Drosophila*. *eLife* 7, e30413. <https://doi.org/10.7554/eLife.30413>.
48. Slovák, J., Speicher, S., Sánchez-Soriano, N., Prokop, A., and Carmena, A. (2012). The actin-binding protein Canoe/AF-6 forms a complex with Robo and is required for Slit-Robo signaling during axon pathfinding at the CNS midline. *J. Neurosci.* 32, 10035–10044. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6342-11.2012>.
49. Izergina, N., Balmer, J., Bello, B., and Reichert, H. (2009). Postembryonic development of transit amplifying neuroblast lineages in the *Drosophila* brain. *Neural Dev.* 4, 44. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-44>.
50. Neumüller, R.A., Richter, C., Fischer, A., Novatchkova, M., Neumüller, K.G., and Knoblich, J.A. (2011). Genome-wide analysis of self-renewal in *Drosophila* neural stem cells by transgenic RNAi. *Cell Stem Cell* 8, 580–593. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.022>.
51. Bhat, K.M. (2005). Slit-roundabout signaling neutralizes netrin-Frazzled-mediated attractant cue to specify the lateral positioning of longitudinal axon pathways. *Genetics* 170, 149–159. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.036863>.
52. Stein, E., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291, 1928–1938. <https://doi.org/10.1126/science.1058445>.
53. Hiramoto, M., and Hiromi, Y. (2006). ROBO directs axon crossing of segmental boundaries by suppressing responsiveness to relocalized netrin. *Nat. Neurosci.* 9, 58–66. <https://doi.org/10.1038/nn1612>.
54. Bashaw, G.J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., and Goodman, C.S. (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* 101, 703–715. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80883-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80883-1).
55. O'Donnell, M.P., and Bashaw, G.J. (2013). Distinct functional domains of the Abelson tyrosine kinase control axon guidance responses to Netrin and Slit to regulate the assembly of neural circuits. *Development* 140, 2724–2733. <https://doi.org/10.1242/dev.093831>.
56. Forsthoefel, D.J., Liebl, E.C., Kolodziej, P.A., and Seeger, M.A. (2005). The Abelson tyrosine kinase, the Trio GEF and Enabled interact with the Netrin receptor frazzled in *Drosophila*. *Development* 132, 1983–1994. <https://doi.org/10.1242/dev.01736>.
57. Smith, C.A., Lau, K.M., Rahmani, Z., Dho, S.E., Brothers, G., She, Y.M., Berry, D.M., Bonnell, E., Thibault, P., Schweisguth, F., et al. (2007). aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *EMBO J.* 26, 468–480.

(C) *Cdc42^{N17}* or *Rac1^{N17}* expression in NBII lineages shows Par-6 localization failures (white arrows).

(D) *Rac1^{V12}* (activated form), but not *Cdc42^{V12}* (activated form), causes eNBs.

(E) *Rac1^{V12}* (activated form) causes aPKC localization failures (white arrows).

(F) Working model. Slit, secreted by the cortex glia, activates Robo1, located at the NB and INPs. Robo1 recruits and inhibits RhoGAP93B, a Rac1 and Cdc42 activity repressor; Robo1 also recruits Dock-Pak, which interacts and activates Rac1 and Cdc42. Both GTPases stabilize Par-6 and aPKC, as well as Cno, which binds Rap1 found in a complex with Par-6 and aPKC.³⁸ Hence, aPKC phosphorylates Numb, excluding it from the apical pole.⁵⁷ Netrins secreted by the cortex glia activates Fra/DCC, located at the NB and INPs. Fra recruits Abl kinase, which phosphorylates Robo1, repressing its signaling and balancing the proper Robo1/Rac1/Cdc42 signaling threshold levels required to stabilize the ASCD apical complex regulators; (2)*: Only in the absence of both Fra-Abl inhibition and Robo1 signaling (*fra robo1* double mutant), Robo2 would be able to signal compensating the lack of Robo1. Blue and red colors denote positive/active and negative/inhibitory effects, respectively. Known ACD regulators are represented in purple.

Data in (A) and (D): two-tailed Mann-Whitney non-parametric U test, **p* < 0.05, *****p* < 0.0001; ns, not significant; n = number of NB lineages analyzed.

Data in (B), (C), and (E): chi-square test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, *****p* < 0.0001; n = number of dividing cells analyzed. PH3 labels mitotic cells; γ-Tub labels the centrosomes.

All panels show confocal micrographs of NBII lineages.

See also [Figures S7C](#) and [S7D](#).

58. Hu, H., Li, M., Labrador, J.P., McEwen, J., Lai, E.C., Goodman, C.S., and Bashaw, G.J. (2005). Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor to Rac to regulate midline repulsion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 4613–4618.
59. Lundström, A., Gallio, M., Englund, C., Steneberg, P., Hemphälä, J., Aspenström, P., Keleman, K., Falileeva, L., Dickson, B.J., and Samakovlis, C. (2004). Vilse, a conserved Rac/Cdc42 GAP mediating Robo repulsion in tracheal cells and axons. *Genes Dev.* *18*, 2161–2171.
60. Fan, X., Labrador, J.P., Hing, H., and Bashaw, G.J. (2003). Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* *40*, 113–127. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00591-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00591-9).
61. Yang, L., and Bashaw, G.J. (2006). Son of sevenless directly links the Robo receptor to rac activation to control axon repulsion at the midline. *Neuron* *52*, 595–607. S0896-6273(06)00777-X [pii]. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.039>.
62. Eby, J.J., Holly, S.P., van Drogen, F., Grishin, A.V., Peter, M., Drubin, D.G., and Blumer, K.J. (1998). Actin cytoskeleton organization regulated by the PAK family of protein kinases. *Curr. Biol.* *8*, 967–970. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)00398-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)00398-4).
63. Harden, N., Lee, J., Loh, H.Y., Ong, Y.M., Tan, I., Leung, T., Manser, E., and Lim, L. (1996). A *Drosophila* homolog of the Rac- and Cdc42-activated serine/threonine kinase PAK is a potential focal adhesion and focal complex protein that colocalizes with dynamic actin structures. *Mol. Cell Biol.* *16*, 1896–1908. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.5.1896>.
64. Atwood, S.X., Chabu, C., Penkert, R.R., Doe, C.Q., and Prehoda, K.E. (2007). Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6 aPKC. *J. Cell Sci.* *120*, 3200–3206. <https://doi.org/10.1242/jcs.014902>.
65. Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I.G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat. Cell Biol.* *2*, 531–539. <https://doi.org/10.1038/35019573>.
66. Qiu, R.G., Abo, A., and Steven Martin, G. (2000). A human homolog of the *C. elegans* polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKCzeta signaling and cell transformation. *Curr. Biol.* *10*, 697–707. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00535-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00535-2).
67. Lin, D., Edwards, A.S., Fawcett, J.P., Mbamalu, G., Scott, J.D., and Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.* *2*, 540–547.
68. Johansson, A., Driessens, M., and Aspenström, P. (2000). The mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1. *J. Cell Sci.* *113*, 3267–3275.
69. Singh, S.R., Liu, W., and Hou, S.X. (2007). The adult *Drosophila* malpighian tubules are maintained by multipotent stem cells. *Cell Stem Cell* *1*, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.07.003>.
70. Li, Z., Liu, S., and Cai, Y. (2014). Differential Notch activity is required for homeostasis of malpighian tubules in adult *Drosophila*. *J. Genet. Genomics* *41*, 649–652. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2014.11.001>.
71. Berger, C., Harzer, H., Burkard, T.R., Steinmann, J., van der Horst, S., Laurenson, A.S., Novatchkova, M., Reichert, H., and Knoblich, J.A. (2012). FACS purification and transcriptome analysis of drosophila neural stem cells reveals a role for Klumpffuss in self-renewal. *Cell Rep.* *2*, 407–418. S2211-1247(12)00218-5 [pii]. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.07.008>.
72. Homem, C.C., Reichardt, I., Berger, C., Lendl, T., and Knoblich, J.A. (2013). Long-term live cell imaging and automated 4D analysis of drosophila neuroblast lineages. *PLoS One* *8*, e79588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079588>.
73. Borrell, V., Cárdenas, A., Cicerí, G., Galcerán, J., Flames, N., Pla, R., Nóbrega-Pereira, S., García-Frigola, C., Peregrín, S., Zhao, Z., et al. (2012). Slit/Robo signaling modulates the proliferation of central nervous system progenitors. *Neuron* *76*, 338–352. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.003>.
74. Andrews, W., Barber, M., Hernandez-Miranda, L.R., Xian, J., Rakic, S., Sundaresan, V., Rabbitts, T.H., Pannell, R., Rabbitts, P., Thompson, H., et al. (2008). The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and morphological differentiation of cortical interneurons. *Dev. Biol.* *313*, 648–658. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.052>.
75. Mehta, B., and Bhat, K.M. (2001). Slit signaling promotes the terminal asymmetric division of neural precursor cells in the *Drosophila* CNS. *Development* *128*, 3161–3168.
76. Ballard, M.S., Zhu, A., Iwai, N., Stensrud, M., Mapps, A., Postiglione, M.P., Knoblich, J.A., and Hinck, L. (2015). Mammary stem cell self-renewal is regulated by Slit2/Robo1 signaling through SNAI1 and mNSC. *Cell Rep.* *13*, 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.006>.
77. Biteau, B., and Jasper, H. (2014). Slit/Robo signaling regulates cell fate decisions in the intestinal stem cell lineage of *Drosophila*. *Cell Rep.* *7*, 1867–1875. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.024>.
78. Escot, S., Willnow, D., Naumann, H., Di Francescantonio, S., and Spagnoli, F.M. (2018). Robo signalling controls pancreatic progenitor identity by regulating Tead transcription factors. *Nat. Commun.* *9*, 5082. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07474-6>.
79. Smith-Berdan, S., Nguyen, A., Hassanein, D., Zimmer, M., Ugarte, F., Ciriza, J., Li, D., García-Ojeda, M.E., Hinck, L., and Forsberg, E.C. (2011). Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches. *Cell Stem Cell* *8*, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.030>.
80. Stine, R.R., Greenspan, L.J., Ramachandran, K.V., and Matunis, E.L. (2014). Coordinate regulation of stem cell competition by Slit-Robo and JAK-STAT signaling in the *Drosophila* testis. *PLOS Genet.* *10*, e1004713. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004713>.
81. Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.S., and Lim, L. (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* *367*, 40–46. <https://doi.org/10.1038/367040a0>.
82. Rives-Quinto, N., Franco, M., de Torres-Jurado, A., and Carmena, A. (2017). Synergism between canoe and scribble mutations causes tumor-like overgrowth via Ras activation in neural stem cells and epithelia. *Development* *144*, 2570–2583. <https://doi.org/10.1242/dev.148171>.
83. Dimitrova, S., Reissaus, A., and Tavosanis, G. (2008). Slit and Robo regulate dendrite branching and elongation of space-filling neurons in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *324*, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.08.028>.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Guinea pig anti-Dpn	Carmena lab ⁸²	N/A
Mouse anti-Robo1	Developmental Studies Hybridoma Bank	DSHB Cat#13C9 anti-Robo; RRID:AB_2181861
Mouse anti-Slit	Developmental Studies Hybridoma Bank	DSHB Cat# c555.6d; RRID:AB_528470
Chicken anti-GFP	Aves Labs	Aves Labs Cat# GFP-1020; RRID:AB_1000024
Mouse anti-rat CD2	BioRad	Bio-Rad Cat# MCA154XZ; RRID:AB_207382
Rabbit anti-Fra	A gift from Dr. M. J. Murray	N/A
Rabbit anti-Ase	Carmena lab ⁸²	N/A
Rabbit anti-Abl kinase	A gift from Dr. E. Giniger	N/A
Rabbit anti-PKCζ	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-216; RRID:AB_2300359
Rabbit anti-Insc	A gift from Dr. J. Knoblich	N/A
Goat anti-Numb	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-23579; RRID:AB_653503
Rabbit anti-Brat	A gift from Dr. J. Knoblich	N/A
Rabbit anti-Mira	A gift from Dr. F. Matsuzaki	N/A
Rabbit anti-PH3	Millipore	Millipore Cat# 06-570; RRID:AB_310177
Mouse anti-PH3	Millipore	Millipore Cat# 05-806; RRID:AB_310016
Mouse anti-γTub	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich Cat# T5326; RRID:AB_532292
Rabbit anti-Par-6	A gift from Dr. A. Wodarz	N/A
Secondary antibodies conjugated to fluorescent dyes 488, 555, 546 or 647	Invitrogen	Cat# A11039, A11029, A32731, A32727, A32732, A32728, A32733, A21450
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Paraformaldehyde (PFA)	Electron Microscopy Sciences (EMS)	Cat# 15710
Triton CF 10	Fluka	Cat# 93416
DAPI	Sigma-Aldrich	Cat# D9542
VECTASHIELD Antifade Mounting Medium for Fluorescence	Vector Laboratories	Cat# H-1000
Experimental models: Organisms/strains		
<i>D. melanogaster: hs-FLP</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 6
<i>D. melanogaster: Akap200NP2222</i>	Kyoto Stock Center	DGRC: 112830
<i>D. melanogaster: Dll-Gal4 UAS-CD8::GFP</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 64307
<i>D. melanogaster: GMR36G09-Gal4</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 49941
<i>D. melanogaster: UAS-CD8::GFP</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 5137
<i>D. melanogaster: cno::GFP</i>	Carmena lab ⁸²	N/A
<i>D. melanogaster: repo-Gal4</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 7415
<i>D. melanogaster: slit-Gal4</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 9580
<i>D. melanogaster: UAS-robo1^{RNAi}</i>	Vienna Drosophila Resource Center	VDRC: 42241 and ⁸³
<i>D. melanogaster: UAS-slit^{RNAi}</i>	Vienna Drosophila Resource Center	VDRC: 20210
<i>D. melanogaster: UAS-CD2</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 1373
<i>D. melanogaster: FRTG13 fra³</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 8813
<i>D. melanogaster: FRTG13 ubi-GFP</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 5826
<i>D. melanogaster: FRTG13</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 1956

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<i>D. melanogaster: robo1</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC:8755
<i>D. melanogaster: FRTG13 robo1¹</i>	Carmena lab	N/A
<i>D. melanogaster: FRTG13 robo1¹ fra³</i>	Carmena lab: this study	N/A
<i>D. melanogaster: UAS-NetA^{RNAi}</i>	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center	VDRC: 330207
<i>D. melanogaster: UAS-NetB^{RNAi}</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC:34698
<i>D. melanogaster: UAS-fra^{RNAi}</i>	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center	VDRC: 6557 and 29910
<i>D. melanogaster: wor-Gal4 ase-Gal80</i>	50	N/A
<i>D. melanogaster: wor-Gal4</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC:56553
<i>D. melanogaster: Abl::GFP</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC:59761
<i>D. melanogaster: UAS-Abl^{RNAi}</i>	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center	VDRC: 110186
<i>D. melanogaster: UAS-Abl^{K417N (KD)}</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC:8566
<i>D. melanogaster: UAS-robo1::Myc</i>	A gift from Dr. G. Bashaw	N/A
<i>D. melanogaster: UAS-Rac1^{N17}</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 6292
<i>D. melanogaster: UAS-Rac1^{L89}</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 6290
<i>D. melanogaster: UAS-RhoGAP93B</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 19720
<i>D. melanogaster: UAS-Dock^{RNAi}</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 27728
<i>D. melanogaster: UAS-Pak^{RNAi}</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 41714
<i>D. melanogaster: UAS-Sos^{RNAi}</i>	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center	VDRC: 106925
<i>D. melanogaster: UAS-Cdc42^{N17}</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 6288
<i>D. melanogaster: UAS-robo2^{RNAi}</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 27317
<i>D. melanogaster: UAS-robo2^{RNAi}</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 9286
<i>D. melanogaster: UAS-Rac1^{V12}</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 6291
<i>D. melanogaster: UAS-Cdc42^{V12}</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 4854

Software and algorithms

Fiji/ImageJ	Open Resource	https://imagej.nih.gov/ij/
Adobe Photoshop CS6	Adobe Inc.	https://www.adobe.com/es/products/photoshop.html

Deposited data

Figures raw data	This paper	https://doi.org/10.17632/mrxryrd5r7y.1
------------------	------------	---

RESOURCE AVAILABILITY**Lead contact**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Ana Carmena (acarmena@umh.es).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

- Original data from all confocal figures were deposited on Mendeley at <https://doi.org/10.17632/mrxryrd5r7y.1>. The DOI is listed in the [key resources table](#).
- This study did not generate any unique code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the [lead contact](#) upon request.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS***Drosophila* strains and genetics**

The fly stocks used were from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC), the Kyoto Stock Center and the Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC), unless otherwise stated: *hs-FLP*; *Akap200NP2222-Gal4* (Kyoto: 112830); *Dll-Gal4 UAS-CD8::GFP* (BDSC: 64307); *GMR36G09-Gal4* (BDSC: 49941); *UAS-CD8::GFP* (BDSC: 5137); *cno::GFP^{B2}*; *repo-Gal4* (BDSC: 7415); *slit-Gal4*

(BDSC: 9580); *UAS-robo1^{RNAi}* (VDRC: 42241 and Dimitrova et al.⁸³); *UAS-slit^{RNAi}* (VDRC#20210); *UAS-CD2* (BDSC: 1373); FRTG13 *fra³* (BDSC: 8813); FRTG13 ubi-GFP (BDSC: 5826); FRT G13 (BDSC: 1956); FRTG13 *robo¹* (this work); FRTG13 *fra³ robo¹* (this work); *UAS-NetA^{RNAi}* (VDRC: 330207); *UAS-NetB^{RNAi}* (BDSC: 34698); *UAS-fra^{RNAi}* (VDRC: 6557 and 29910); *wor-Gal4 ase-Gal80⁵⁰*; *wor-Gal4* (BDSC:56553); *Abl::GFP* (BDSC: 59761); *UAS-Abl^{RNAi}* (VDRC: 110186); *UAS-Abl^{K417N (KD)}* (BDSC: 8566); *UAS-robo1::Myc* (from G. Bashaw); *UAS-Abl::Myc* (BDSC: 65264); *UAS-Rac1^{N17}* (BDSC: 6292); *UAS-Rac1^{L89}* (BDSC: 6290); *UAS-RhoGAP93B* (BDSC: 19720); *UAS-Dock^{RNAi}* (BDSC: 27728); *UAS-Pak^{RNAi}* (BDSC: 41714); *UAS-Sos^{RNAi}* (VDRC: 106925); *UAS-Cdc42^{N17}* (BDSC: 6288); *UAS-robo2^{RNAi}* (BDSC: 27317 and 9286); *UAS-Rac1^{V12}* (BDSC: 6291); *UAS-Cdc42^{V12}* (BDSC: 4854).

Drosophila husbandry

All the fly stocks were raised and kept in 18°C or 25°C incubators. Experimental temperatures for the assays were maintained using 25°C or 29°C incubators. All the *Gal-4 x UAS* crosses were carried out at 25°C for 2 days and then transferred to a new tube and left at 29°C until larvae of the proper stage (second or third instar, depending on the experiment) developed. All stocks were kept in bottles containing standard molasses fly food.

METHOD DETAILS

Histology, immunofluorescence, and microscopy

Larval brains were dissected out in PBS and fixed with 4% PFA in PBT (PBS and Triton X-100 0.1%) for 20 min at room temperature with gentle rocking. Fixed brains were washed 3 times for 15 min with PBT (PBS and Triton X-100 0.3%) and then incubated in PBT-BSA for at least 1h before incubation with the corresponding primary antibody/antibodies. The following primary antibodies were used in this study: guinea pig anti-Dpn (1:2,000; Rives-Quinto et al.⁸²), mouse anti-Robo1 (1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB]), chicken anti GFP (1:3,000; Aves Labs), mouse anti-Slit (1:10; DSHB), mouse anti-CD2 (1:50; Bio-Rad), rabbit anti-Fra (1:200; from M. J. Murray), rabbit anti-Ase (1:100; Rives-Quinto et al.⁸²), rabbit anti-Abl (1:1,000; from E. Giniger), rabbit anti PKC ζ (1:100; Santa Cruz Biotechnology, sc-216), rabbit anti-Insc (1:1,000; from J. Knoblich), goat anti-Numb (1:200; Santa Cruz Biotechnology, sc-23579), rabbit anti-Brat (1:200; from J. Knoblich), rabbit anti-Mira (1:1,000; from F. Matsuzaki), rabbit/mouse anti-PH3 (Rb1:1,000-1:2,000; Millipore, 06-570/05-806), mouse anti- γ Tub (1:200; Sigma-Aldrich, T5326), rabbit anti Par-6 (1:1,000, from A. Wodarz). Secondary antibodies conjugated to fluorescent dyes were obtained from Molecular Probes and they were used at a dilution of 1:200-1:400. Samples were mounted in VECTASHIELD antifade mounting medium for fluorescence. An anti-GFP Ab was used to improve the detection of NetA::GFP in Figure 1F.

Fluorescence images for Figure 1, with the exception of Figures 1B and 1F, were recorded by using an Inverted Leica laser-scanning spectral confocal microscope TCS SP2 (Leica). Fluorescence images for the rest of figures (including Figures 1B and 1F) were recorded by using a Super-resolution Inverted Confocal Microscope Zeiss LSM 880-Airyscan Elyra PS.1. Panels in Figures 4, 5, 6B, 7B, 7C, 7E, and S6 represent summations of different confocal planes of the corresponding Z stack.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

For statistical analysis, the data were first analyzed using the Shapiro-Wilk test to determine whether the sample followed a normal distribution. Data that did not follow a normal distribution were analyzed with a two-tailed Mann-Whitney nonparametric *U*-test. An R software was used for representing the scatter plot diagrams, with the central lines of the boxes showing the median, the "cross" representing the mean and the limits of the boxes indicating the lower and upper quartiles (see also figure legends). Data related to the ACD regulator localization failures were analyzed with a Chi-square test. The specific test used, the sample size (n), the SD of the population and the P value is indicated in each figure legend; *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001; ns, not significant.

Supplemental Information

**Glial-secreted Netrins regulate Robo1/Rac1-Cdc42
signaling threshold levels during *Drosophila*
asymmetric neural stem/progenitor cell division**

Ana de Torres-Jurado, Sandra Manzanero-Ortiz, and Ana Carmena

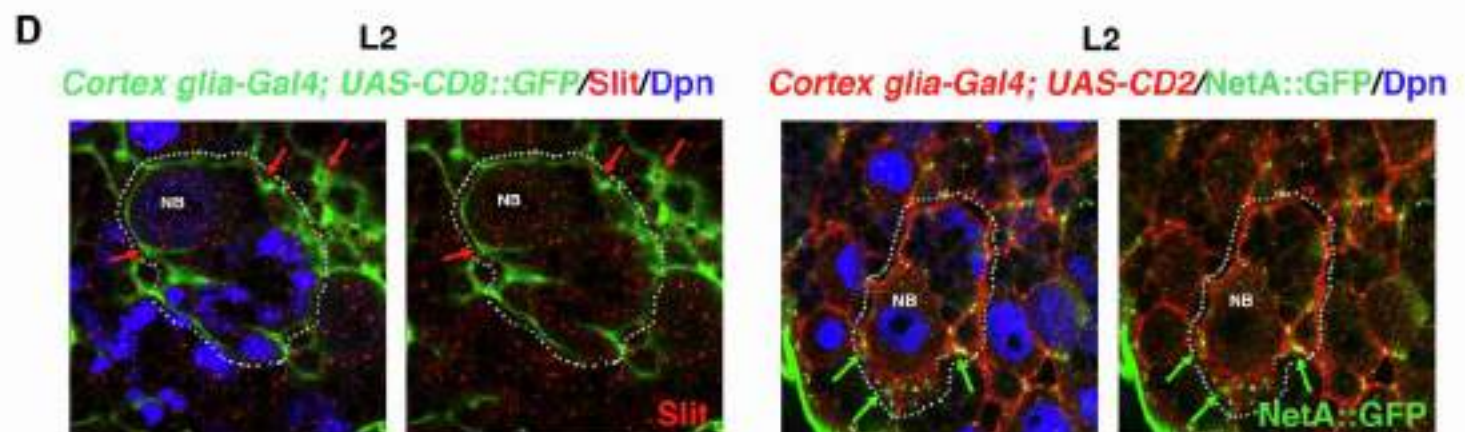
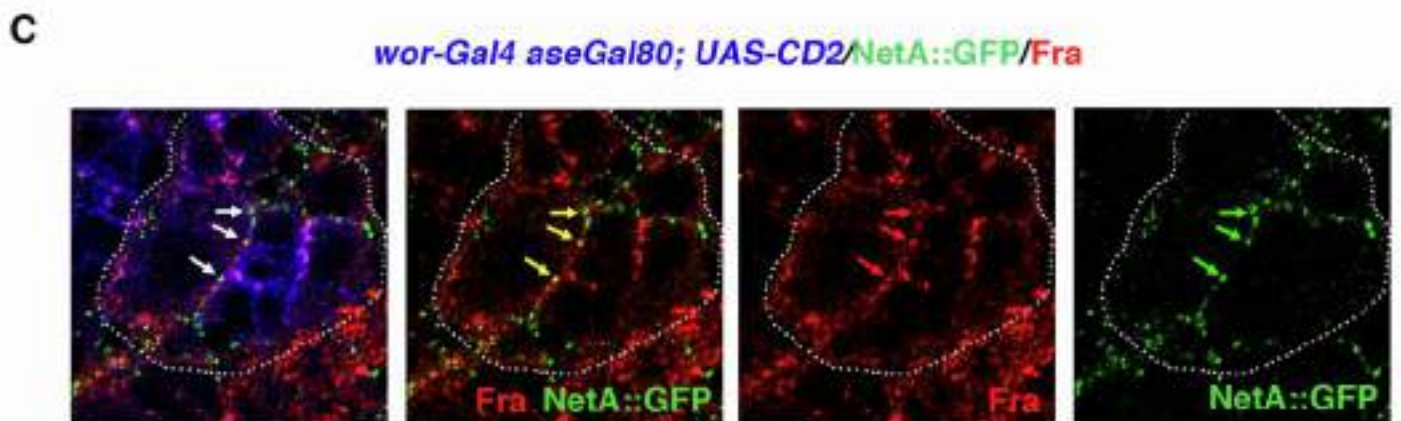
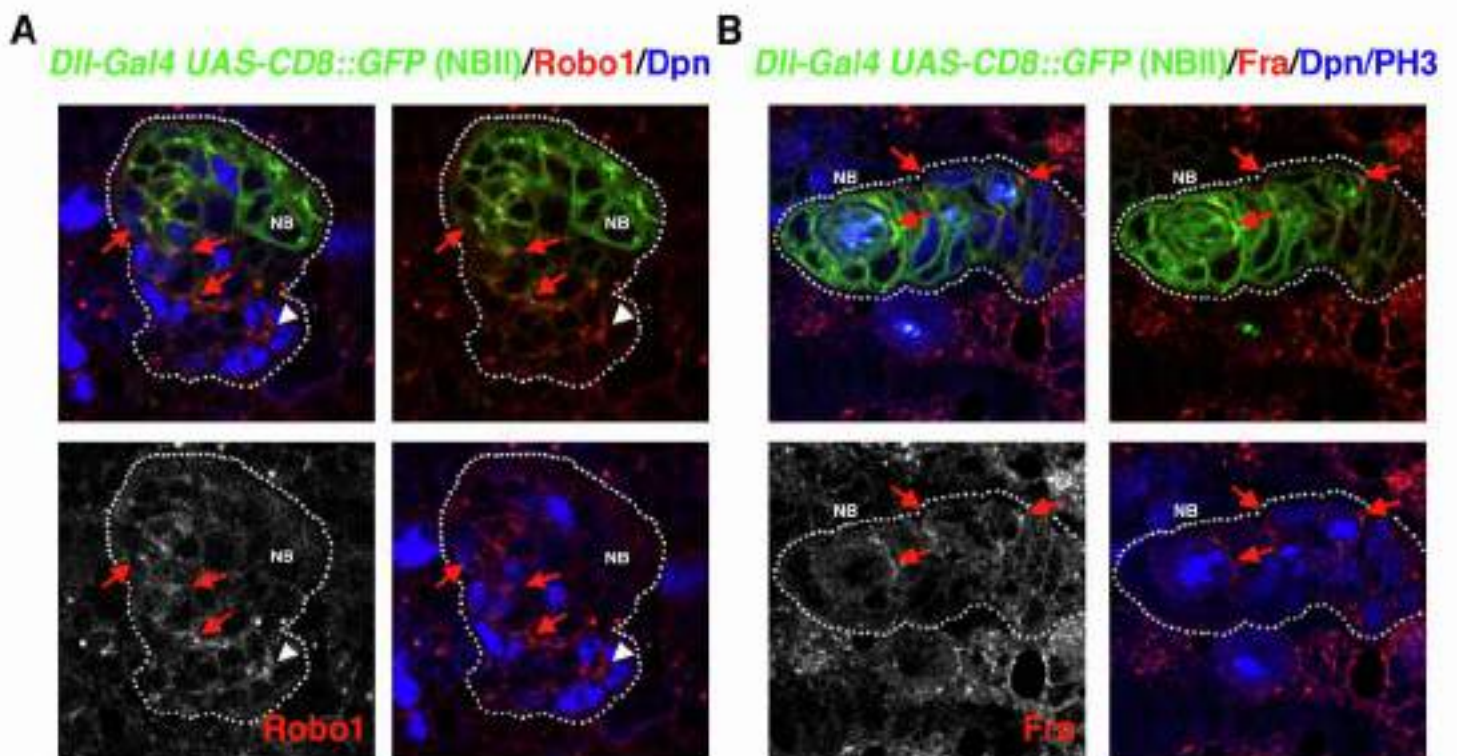


Figure S1. Robo1 and Fra are present at the membrane of NBII lineages and Slit and Netrin are secreted from the cortex glia since L2. Related to Figure 1.

(A) A confocal micrograph showing (red arrows) the Robo1 receptor, in red, colocalizing in the membrane with CD8::GFP, which is expressed under the control of an NBII *Distal-less (Dll)-Gal4* driver (see also the main text). Dpn, in blue, labels both the NB (out of focus in the picture) and the mature INPs within the NBII lineage. Note that the GFP signal is stronger in the lineage cells closer to the NB than in those located far away of it (arrowhead), in which Robo1 is also detected (see also Figure 1C, picture in which the GFP signal is more saturated). (B) A confocal micrograph showing (red arrows) the Fra receptor, in red, colocalizing in the membrane with CD8::GFP, which is expressed under the control of an NBII *Distal-less (Dll)-Gal4* driver (see also the main text). Dpn, in blue, labels both the NB and the mature INPs within the NBII lineage. PH3, in stronger blue signal, labels dividing cells. Note that the localization of Fra appears polarized in the dividing NB and INPs (red arrows). (C) A confocal micrograph showing colocalization (yellow arrows) of Fra (red) and NetA::GFP (green) within an NBII lineage labeled by the *worGal4 aseGal80* driver, which directs the expression of the transmembrane protein CD2 (blue). (D) The ligands Slit (red) and NetrinA (green) are already present in the cortex glia at L2 (second instar larva); red and green arrows, respectively, and secreted to the NB lineages, within which are also detected.

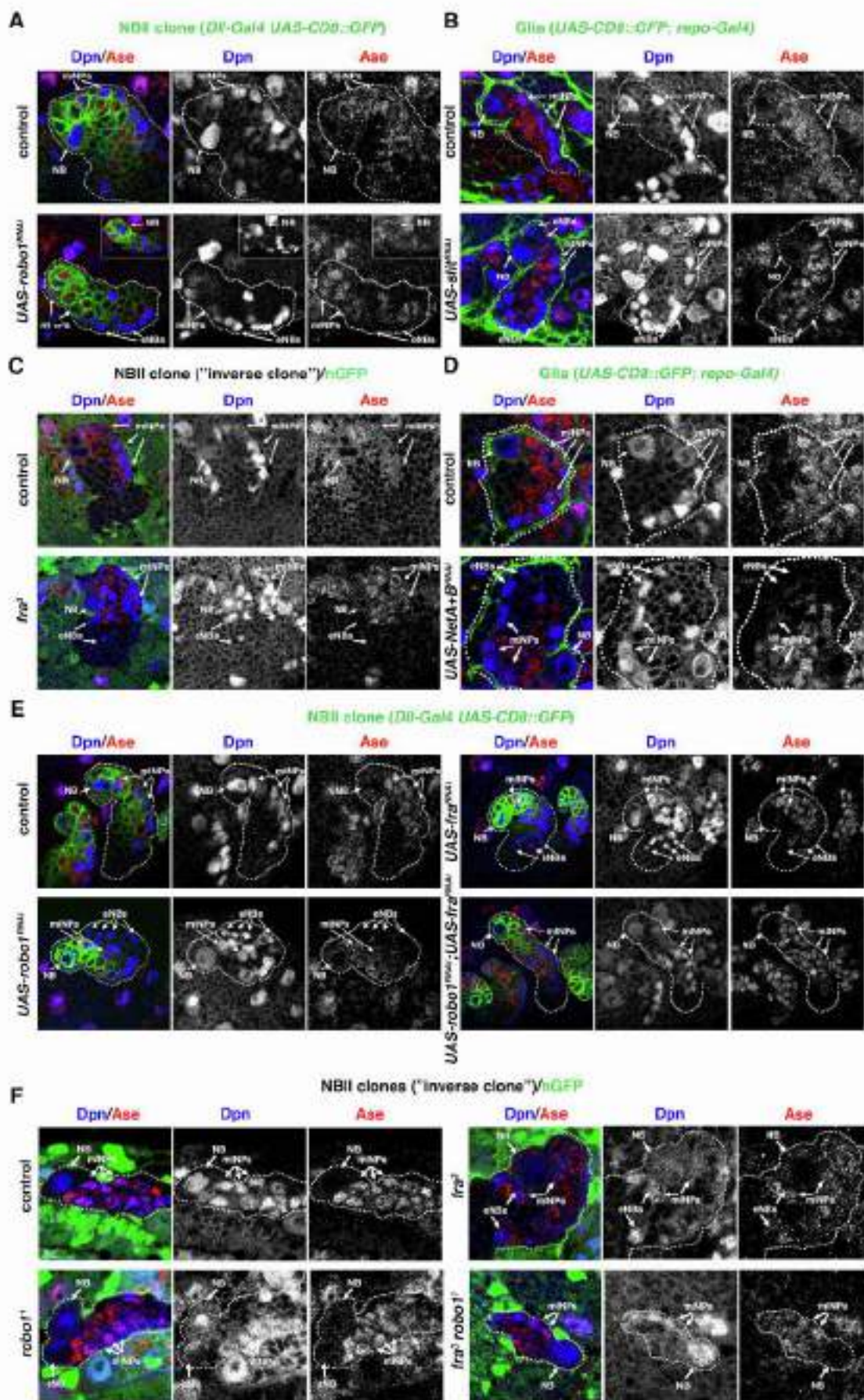


Figure S2. The simultaneous downregulation or knocking out of *robo1* and *fra* suppresses the formation of ectopic NBs within NB lineages. Related to Figure 2. (A) Confocal micrographs show larval brain NBII lineages labelled with Dpn (blue) and Ase (red). Control NBII lineages show one NB, which only expresses Dpn (blue) and several mature INPs (in purple), which express both Dpn (blue) and Ase (red). NBII lineages with *robo1* downregulated show ectopic NBs (eNBs) in blue, Dpn⁺ Ase⁻, and mature INPs (mINPs) in purple, Dpn⁺ Ase⁻; the inset in the *robo1* panel shows a different plane of focus of the confocal Z stack in which the NB of the lineage is detected. The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white. (B) Confocal micrographs of larval central brain showing an NBII control lineage and an NBII lineage with *s/it* downregulated in the glia that surrounds it. While only one NB (Dpn⁺, blue) is detected in control clones, ectopic NBs (eNBs), in blue, are found in the mutant condition. The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white. (C) Confocal micrographs of a control and a *fra*² null mutant NBII lineages, which do not express nuclear GFP (nGFP), showing ectopic NBs (eNBs) (Dpn⁺ Ase⁻), in blue, in the mutant condition. The control clone only present one NB, mINPs are shown in purple. The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white. (D) Confocal micrographs of a control NBII lineage and an NBII lineage in which *NetA* and *NetB* have been downregulated in the surrounding glia. While the control clone only presents one NB (Dpn⁺ Ase⁻), in blue, ectopic NBs (eNBs) are detected in the mutant condition; mINPs are shown in purple. The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white. (E) Confocal micrographs of NBII lineages showing the simultaneous downregulation of *robo1* and *fra* in NBII lineages, situation in which the formation of ectopic NBs (Dpn⁺ Ase⁻), in blue, present in each of the single *RNAi* condition, is suppressed. The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white. (F) Confocal micrographs of NBII lineages showing the simultaneous knocking out of *robo1* and *fra* in NBII lineages, situation in which the formation of ectopic NBs (Dpn⁺ Ase⁻), in blue, present in each of the single null mutant conditions, is suppressed. The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white.

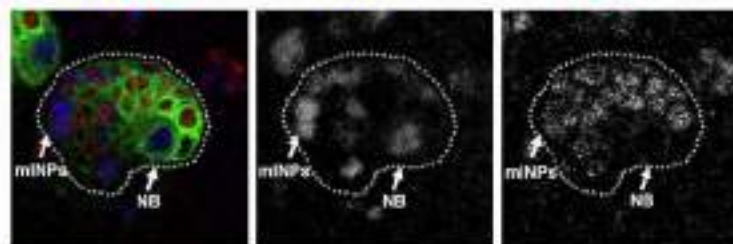
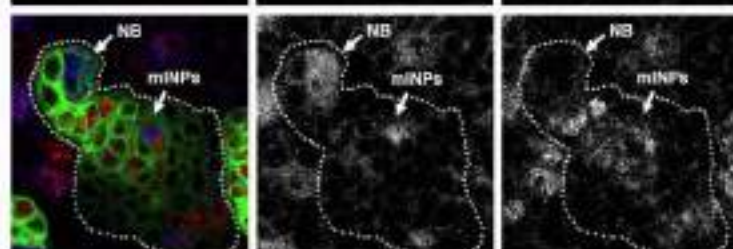
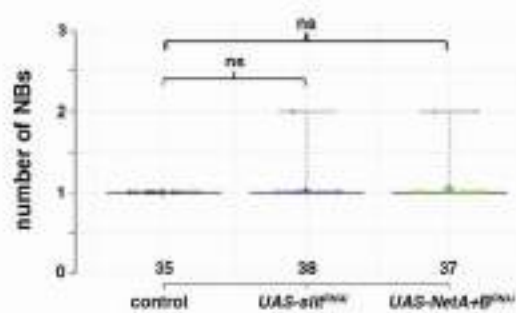
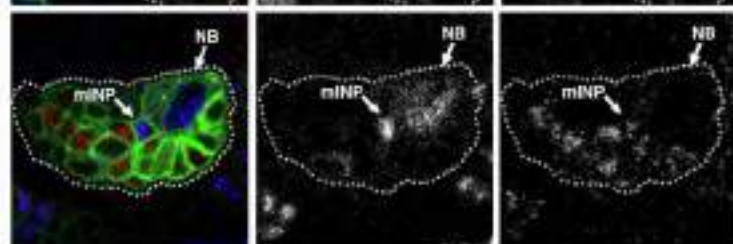
ANBI clones (*wor-Gal4 ase-Gal80; UAS-CD8::GFP*)

Dpn/Ase

Dpn

Ase

control

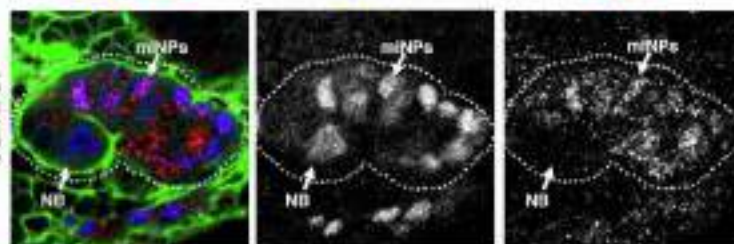
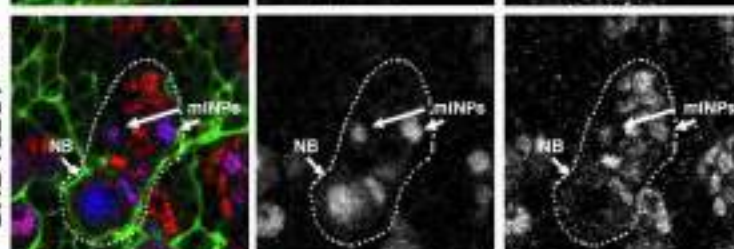
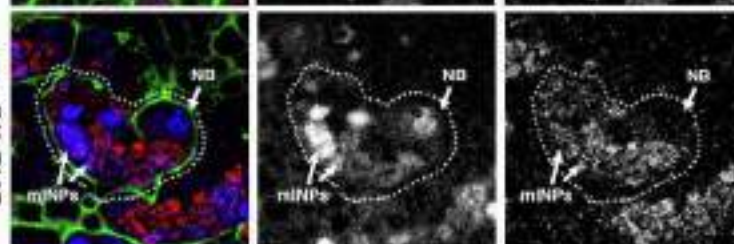
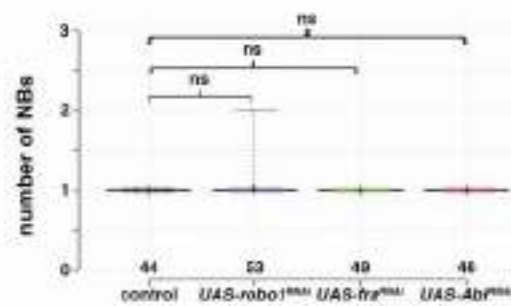
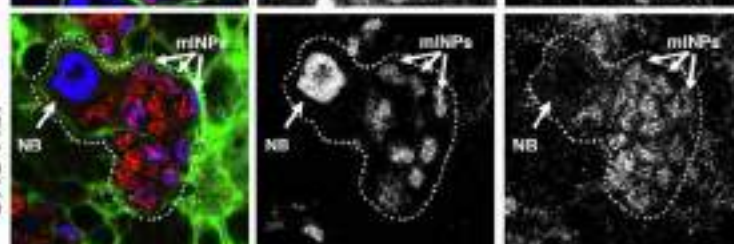
UAS-slit^{RNAi}UAS-NetA+B^{RNAi}**B**Cortex Glia (*cortex glia-Gal4; UAS-CD8::GFP*)

Dpn/Ase

Dpn

Ase

control

UAS-robo1^{RNAi}UAS-fra^{RNAi}UAS-Abi^{RNAi}**C**NBI clones (*wor-Gal4; UAS-CD8::GFP*)

Dpn/Ase

Dpn

Ase

control

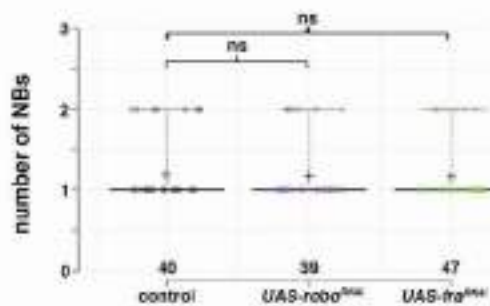
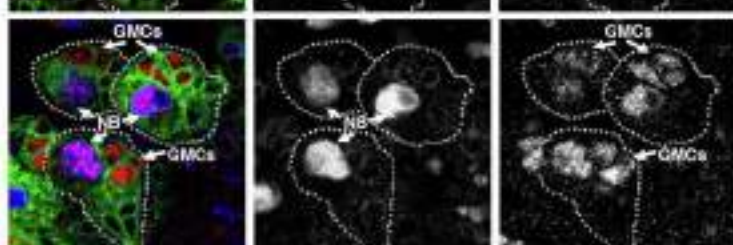
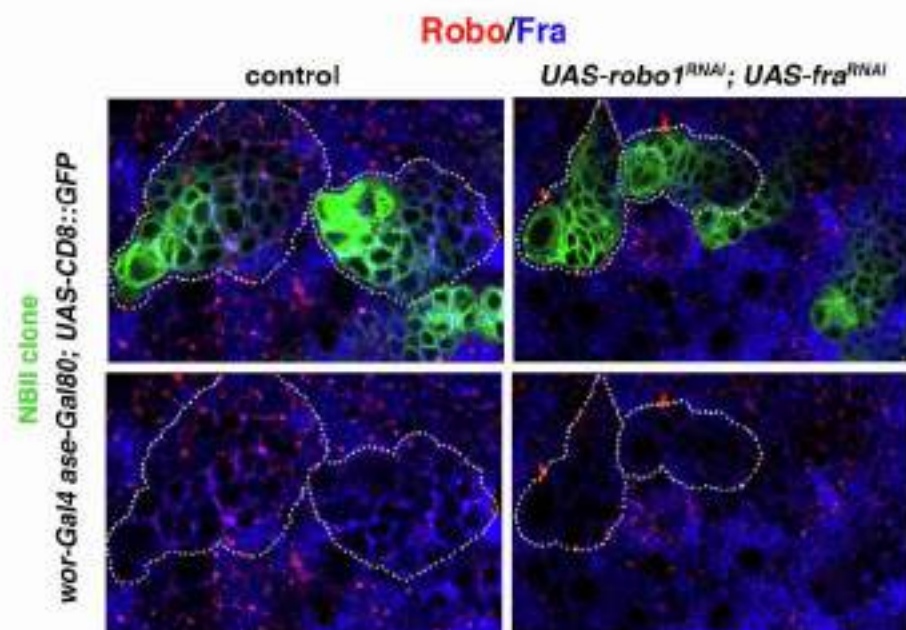
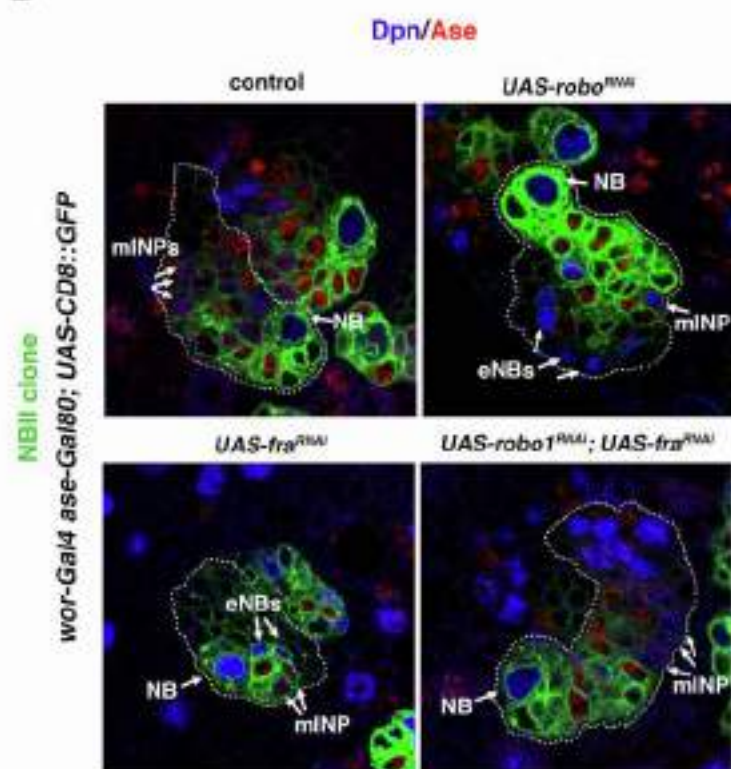
UAS-robo1^{RNAi}UAS-fra^{RNAi}

Figure S3. Netrins and Slit are secreted from the cortex glia and their receptors Fra and Robo1 are required within NBII but not in NBI lineages. Related to Figure 2. (A) Confocal micrographs show larval brain NBII lineages labeled with Dpn (blue) and Ase (red). Control NBII lineages show one NB, which only expresses Dpn (blue) and several mature INPs (in purple), which express both Dpn (blue) and Ase. The downregulation of *slit* or *NetA+B* in NBII clones (the NBII-specific Gal4 driver *wor-Gal4 aseGal-80* was used) does not cause the formation of ectopic NBs within the clone. (B) Confocal micrographs of a control NBII lineage and NBII lineages in which *robo1*, *fra* or *Abl* has been downregulated in the surrounding glia by the cortex glia-specific *Akap200NP2222-Gal4* driver. Mutant clones do not show ectopic NBs Dpn⁺ Ase⁻ (in blue), only one NB is observed per clone as it happens in control clones. (C) NBI lineages do not require Fra and Robo1 signaling for their proper development. Confocal micrographs show larval brain NBI lineages labeled with Dpn (blue) and Ase (red). The *wor-Gal4* driver, which labels all NB lineages (NBI and NBII) was used to label NBI clones and to downregulate *robo1* or *fra* in them. Control NBI lineages show one NB Dpn⁺ Ase⁺ (in purple), which expresses both Dpn (blue) and Ase (red), and several GMCs (in red), which only express Ase. The downregulation of either *robo1* or *fra* in NBI clones does not cause the formation of ectopic NBs. All data were analyzed with a two-tailed Mann-Whitney nonparametric *U*-test, with the central lines of the boxes showing the median, the "cross" representing the mean and the limits of the boxes indicating the lower and upper quartiles determined by R software; ns: not significant; *n* (above each genotype) depicts the number of NB lineages analyzed.

A



B



C

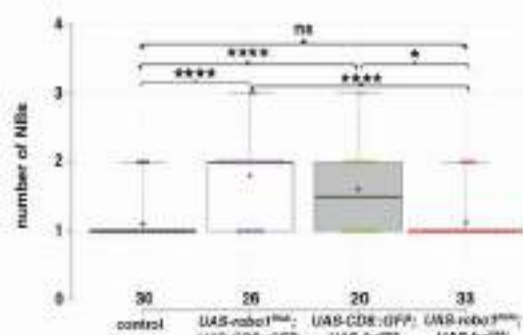
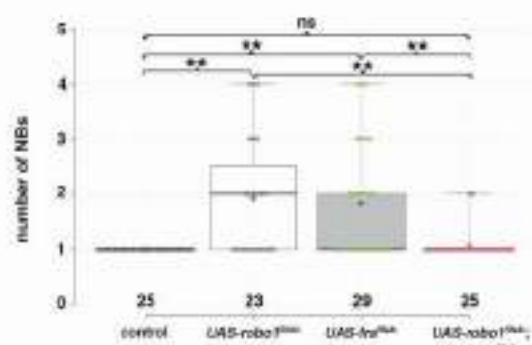
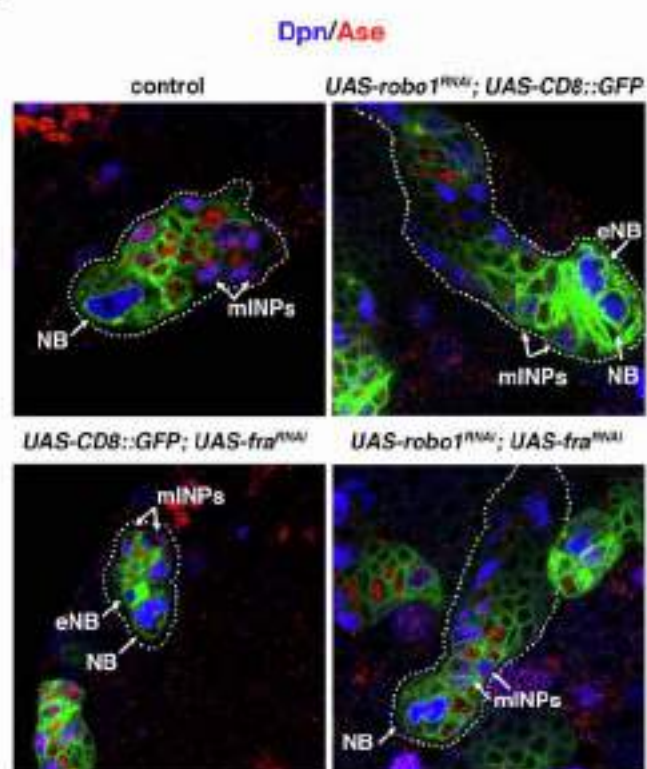


Figure S4. The ectopic NB phenotype of *robo1* or *fra* downregulation is suppressed after simultaneously downregulating both *robo1* and *fra*. Related to Figure 2. (A) Confocal micrographs of NBII lineages showing a strong reduction of *robo1* and *fra* expression after downregulating *robo1* and *fra* in NBII lineages with the *wor-Gal4 aseGal80* Gal-4 driver. (B) Confocal micrographs of NBII lineages of the indicated genotypes. *wor-Gal4 aseGal80; UAS-CD8::GFP* virgins were crossed with *UAS-robo1^{RNAi}; UAS-fra^{RNAi}*/TM6B males, or with *UAS-robo1^{RNAi}*/CyOTb; *UAS-fra^{RNAi}* males, from the double RNAi stock; Tb larvae (i.e. *wor-Gal4 aseGal80/ UAS-robo1^{RNAi}; UAS-CD8::GFP*/TM6B or *wor-Gal4 aseGal80/CyOTb; UAS-fra^{RNAi} / UAS-CD8::GFP*) were selected for dissecting and staining. *wor-Gal4 aseGal80; UAS-CD8::GFP* virgins were crossed with *UAS-robo1^{RNAi}; UAS-fra^{RNAi}* (double homozygotes) and larvae *wor-Gal4 aseGal80/ UAS-robo1^{RNAi}; UAS-fra^{RNAi} / UAS-CD8::GFP* were selected for dissecting and staining. The single *robo1^{RNAi}* and *fra^{RNAi}* NB lineages show ectopic NBs (eNBs), while in the double *robo^{RNAi}; fra^{RNAi}* this phenotype is suppressed. (C) Confocal micrographs of NBII lineages of the indicated genotypes showing the simultaneous downregulation of *robo1* and *fra* in NBII lineages, situation in which the formation of ectopic NBs, in blue, present in each of the single RNAi condition, is suppressed. The single RNAi conditions (*robo^{RNAi}* or *fra^{RNAi}*) were analyzed in presence of an additional UAS construct (*UAS-CD8::GFP*) to discard that the loss of phenotype in the double *robo^{RNAi}; fra^{RNAi}* was due to the titration of the Gal-4 driver. All data were analyzed with a two-tailed Mann-Whitney nonparametric *U*-test, with the central lines of the boxes showing the median, the "cross" representing the mean and the limits of the boxes indicating the lower and upper quartiles determined by R software; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ and ns: not significant; *n* (above each genotype) depicts the number of NB lineages analyzed.

NBII (*wor-Gal4 ase-Gal80; UAS-CD8::GFP*)

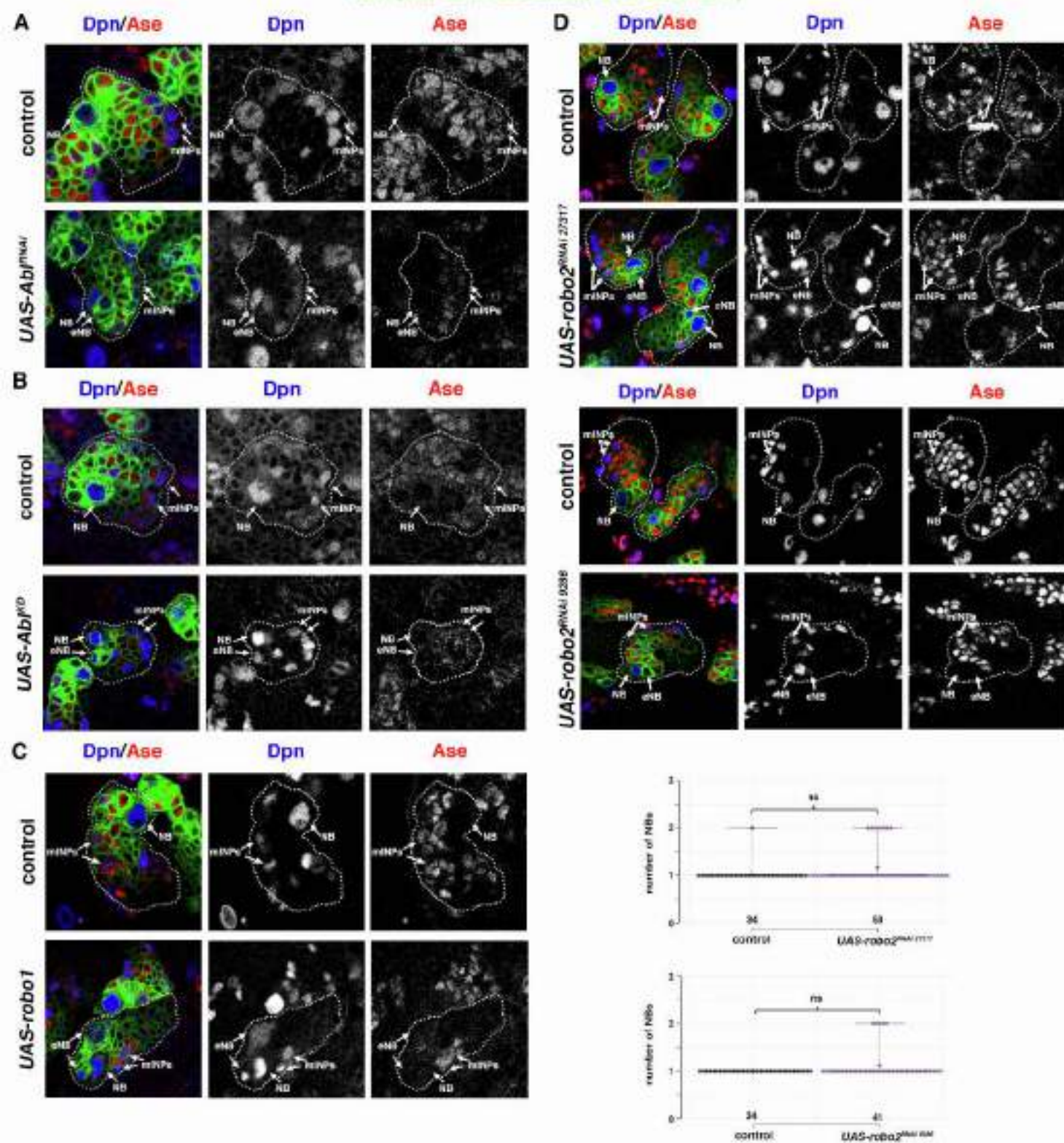


Figure S5. Compromising the Robo1 inhibitor Abl tyrosine kinase induces the formation of ectopic NBs within NB lineages. Related to Figure 3. (A and B) Confocal micrographs of NBII lineages showing ectopic NBs (Dpn⁺, Ase⁻), in blue, after downregulating *Abl* within the clone (A) or after expressing an *Abl* kinase dead form (*Abl^{KD}*) (B), while in control lineages only one NB is present; mINPs (Dpn⁺, Ase⁺) are shown in purple. The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white. (C) Confocal micrographs of NBII lineages showing ectopic NBs (Dpn⁺, Ase⁻), in blue, after the overexpression of *robo1* within NB clones, while in control lineages only one NB is present; mINPs (Dpn⁺, Ase⁺) are shown in purple. The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white. (D) The downregulation of *robo2* in NBII lineages causes the formation of ectopic NBs but the phenotype is not significant compared to control lineages. Confocal micrographs of NBII lineages showing ectopic NBs (Dpn⁺, Ase⁻), in blue, after downregulating *robo2* (two different *robo2* RNAi lines are shown), but the phenotype, as shown in the graphics, is not significant. Data were analyzed with a two-tailed Mann-Whitney nonparametric *U*-test, with the central lines of the boxes showing the median, the "cross" representing the mean and the limits of the boxes indicating the lower and upper quartiles determined by R software; ns: not significant; *n* (above each genotype) depicts the number of NB lineages analyzed.

Numb/Ase/PH3/ γ -Tub/NBII-Gal4; UAS-CD8::GFP

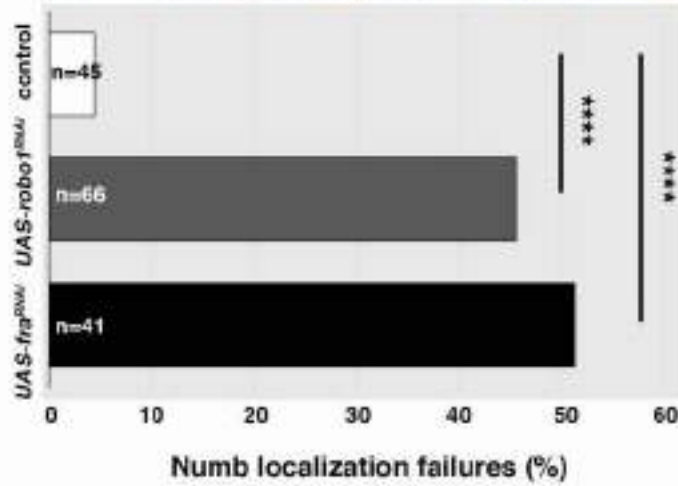
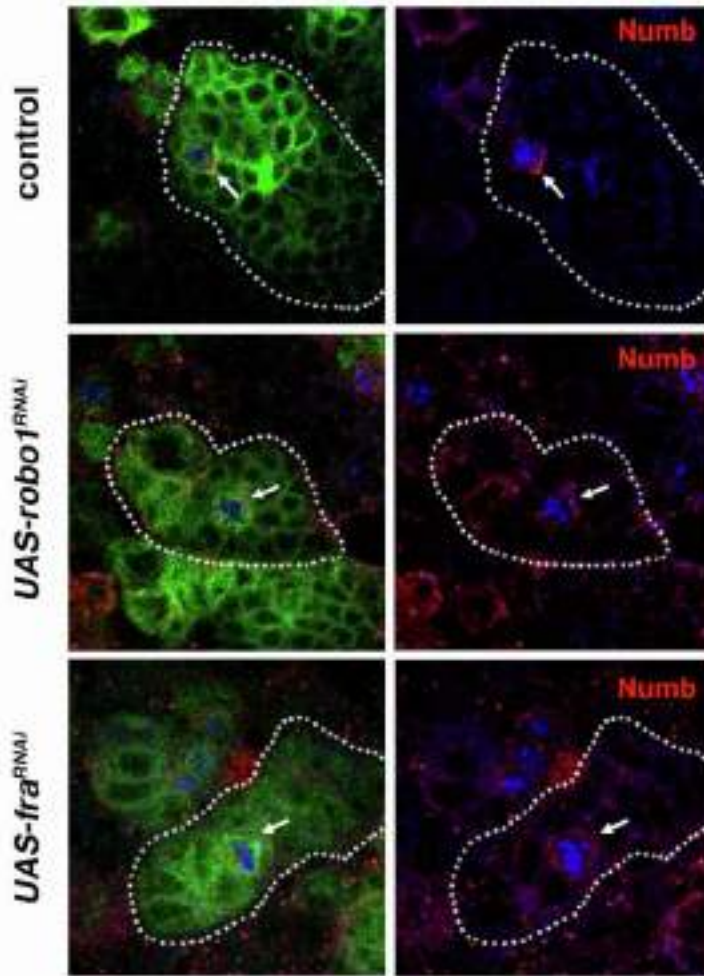


Figure S6. Robo1 and Fra signaling are required for the correct localization of the cell fate determinant Numb in mINPs/GMCs. Related to Figures 4 and 5. Confocal micrographs of control NBII lineages and NBII lineages in which *robo1* or *fra* has been downregulated. Mutant clones show failures in the localization of the cell fate determinant Numb in mINPs/GMCs (*Ase*⁺). The Gal4 line used as a driver was *wor-Gal4 ase-Gal80* that is specific for NBII lineages. In all panels, PH3 labels mitotic cells and γ -Tub the centrosomes. White arrows indicate the crescent correctly formed in control clones and their absence in the mutant condition. Data were analyzed with a Chi-square test, **** P<0.0001; *n* depicts the number of dividing cells analyzed.

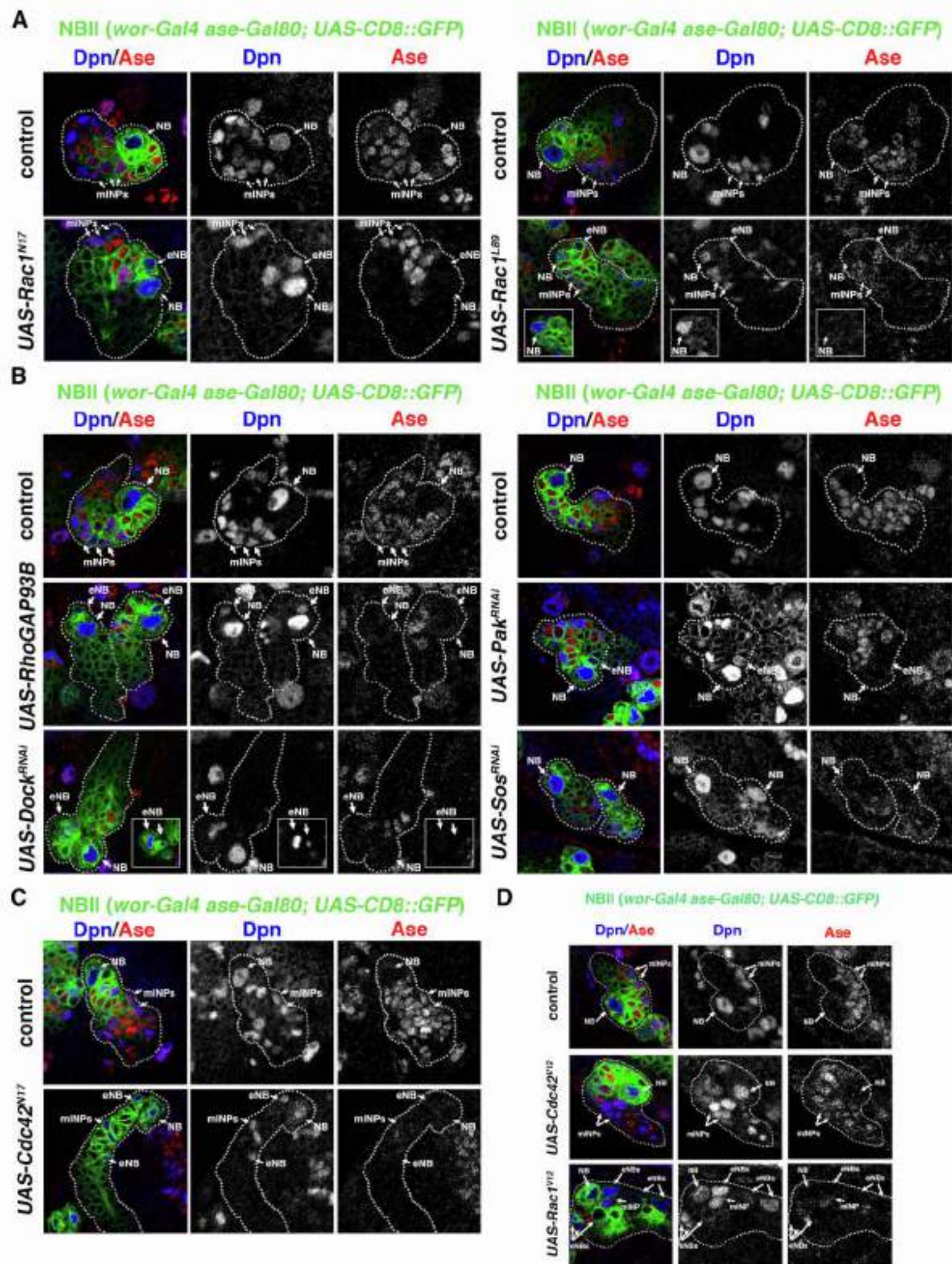


Figure S7. Robo1 impacts on ASCD through the small GTPases Rac1 and Cdc42. Related to Figures 6 and 7. (A) Confocal micrographs of control NBII lineages and NBII lineages expressing dominant negative forms of Rac1 (*Rac1^{N17}* or *Rac1^{L89}*). Both Rac1 dominant negative forms show a significant formation of ectopic NBs (eNB; Dpn⁺, Ase⁻, in blue) within larval brain NBII lineages. The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white. (B) Confocal micrographs of control NBII lineages and NBII lineages overexpressing the Rac1 inhibitor *RhoGAP93B* or showing downregulation of *Dock*, *Pak* or the RhoGEF *Sos* in larval brain NBII lineages. The downregulation of *Sos* does not show a significant change in the number of NBs, while all the other mutant conditions show a significant formation of ectopic NBs (eNB; Dpn⁺, Ase⁻, in blue) within larval brain NBII lineages. The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white. (C) Confocal micrographs of a control NBII lineage and an NBII lineage expressing a Cdc42 dominant negative form (*Cdc42^{N17}*). The expression of a *Cdc42^{N17}* leads to a significant formation of ectopic NBs (eNB; Dpn⁺, Ase⁻, in blue) within larval brain NBII lineages. The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white. (D) Confocal micrographs of a control NBII lineage and NBII lineages expressing constitutively active forms of Cdc42 (*Cdc42^{V12}*) or Rac1 (*Rac1^{V12}*). An increased activity of Rac1 (*Rac1^{V12}*), but not of Cdc42 (*Cdc42^{V12}*), causes a very significant formation of ectopic NBs (eNBs; Dpn⁺, Ase⁻, in blue). The single channels corresponding to Dpn and Ase labeling are shown in black and white.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de Tesis Ana. Gracias por darme la oportunidad de hacer posible que cumpliera mi sueño. Recuerdo perfectamente el día en el que me escribiste ofreciéndome ser parte de tu laboratorio y de tu equipo. Acaba de llegar a Oxford para buscarme la vida y estaba haciendo Skype con mi madre y mi abuela contándoles cómo iba la aventura y de repente recibí tu email. Me puse a dar saltos de alegría como si me hubiera tocado la lotería y tardé horas en hacer la maleta y volver. Por guiarme y apoyarme durante todo este recorrido, que no ha sido nada fácil, por las reuniones semanales en las que hacíamos seguimientos de cómo iban los experimentos, por tus ánimos cuando lo veía todo negro y ofrecerme tu mano cuando lo he necesitado y este proyecto tan bonito, pero sobre todo por creer en mí. Por eso y por mucho más ¡GRACIAS !

A mis compañeras de laboratorio, Sandra y Maribel, esta aventura no hubiera sido lo mismo sin vosotras. Hemos pasado horas y horas juntas trabajando codo con codo, enfrentándonos a retos similares, apoyándonos las unas a las otras e intentándonos sacar sonrisas en los días más grises. Sandri, empezamos esta andadura de la mano, y pronto nos ganamos el apodo de las Twins moscofilas de Carmena's Lab. Qué importantes y que gratificantes han sido los ratitos en los que nos salíamos al puente a llorar porque no salían los experimentos o todo se desarrollaba al revés, y terminábamos llorando, pero de risa, porque lo de tirarnos por el puente lo barajamos en varias ocasiones, pero con nuestra suerte decidimos abortar misión no fuera a ser que nos quedáramos más tontas aún. Muchas anécdotas y ratos que ensalzar que llevaré siempre conmigo. Ahora desearte toda la suerte del mundo y darte ánimos en el último empujón, que ya estás rozando el final y sin duda te mereces lo mejor. Maribel, nuestra post-Doc / Biblioteca / Fuente de sabiduría. Siempre dispuesta a responder todas mis dudas científicas, y discutir de los temas de la

vida. Me encantaban los momentos en los que desconectábamos en la “fly room” mientras cambiábamos o sacábamos moscas para hacer stocks (que por cierto, nunca es un solo cruce) y nos contábamos anécdotas de nuestras mascotas, de Katia, tu fiel e inseparable ser de luz que de forma indirecta también ha formado parte de toda este camino. He aprendido muchísimo con y de vosotras, a las dos gracias.

A mis padres, Ana y Alberto. Sois mi ejemplo a seguir y el motor de mi vida. Me habéis enseñado e inculcado que, trabajando duro, con constancia, pasión, humildad, amor e ilusión puedo conseguir todo aquello que me proponga, que, aunque me caiga mil veces tengo que levantarme mil y una y seguir luchando, que estáis a mi lado siempre y cuento con vuestra mano para apoyarme y coger impulso. Después de todo, soy lo que soy gracias a vosotros, y mis éxitos son los vuestros. A vosotros especialmente os dedico esta tesis; por todo lo que me habéis dado y seguís haciendo, por vuestras preocupaciones y alegrías constantes, por dejarme volar lejos, aunque me echéis de menos, ya que solo queréis verme feliz, por vuestro cariño y por todo el amor que me dais. Toda la vida aguantando mis “¿y esto, por qué?”, y continuar escuchando mis anécdotas en el labo, mis historias en el confocal, e interesándoos por lo que hago, aunque os suene a chino, simplemente para sentirnos más cerca de mí. Me siento muy orgullosa de vosotros y afortunada de que seáis mis padres. Los mejores del mundo.

A mi abuela Juanita, mi Reina Mora, que aunque no esté físicamente no me abandona en ningún momento y siempre está a mi lado protegiéndome. Mi ángel de la guarda que me enseñó a amar la naturaleza desde pequeña y a tener paciencia y tesón: eres muy ligera me decías, y al final llevo convalidado quinto de paciencia. A mi hermano, que siempre está ahí, pero sin hacer mucho ruido, y aparece cuando más

lo necesito. Le das un toque de humor a todo y hasta en los momentos más complicados eres capaz de sacarme una sonrisa y hacerme saber que todo va a salir bien. Admiro tu pasión en todo lo que haces y tu perfeccionismo. Aunque soy la mayor, tú eres mi ejemplo a seguir. En mi cabeza siempre suena ese “hermana ¡sin miedo a morir” que hace que me vuelva una gigante y me enfrente a todos mis miedos sabiendo que pase lo que pase todo va a salir bien porque siempre estás ahí.

A Carlos, mi tito Charles por su apoyo, su ayuda y por alegrarse de todos mis éxitos y celebrarlos como si fueran tuyos. Mil gracias por todo, me siento muy agradecida. Y por supuesto a toda mi familia, mi abuelos mis primos y mis tías y tíos.

A mis amigos de toda la vida que pese a la distancia en kilómetros siempre han estado disponibles para escucharme y apoyarme y como no, para compartir nuestra vida. Cristina, siempre llena de buenos consejos y de un cariño infinito (y que no falte tu toque de locura que te hace tan especial). Antonio (Luuluu), más de media vida apoyándonos y viéndonos crecer, apostando siempre por mí incluso más que yo misma y teniendo todo lo que engloba la palabra amistad. Carmen, mi rubita maravillosa siempre tan alegre y con tu forma de cuidarme y quererme que me da tanta paz. Me encanta poder hablar contigo de todo, incluso de mi trabajo por el que te interesas y quieres que te ponga al día. Mercedes, mi amiga que siempre está cuando tiene que estar. Tus visitas, llamadas y el tiempo que compartimos siempre son oro líquido. Patri, mi Patt que, aunque nos distancie un océano haces todo lo posible por que te sienta a mi lado (y lo consigues), siempre pendiente y atenta de lo que pueda necesitar. Esther con tus ganas y tu apoyo que hace que me venga arriba y no pare de luchar. Curro, mi amigo y mi amor que has hecho que la recta final la afronte con más ganas e ilusión. Colmándome de cariño por los cuatro “costaos” y poniéndole risas a los momentos más complicados donde el

cansancio ganaba por goleada. Gregorio, mi amigo bonito que le pones un poco de cordura a mi locura, aunque tampoco mucha. Javi, que con un abrazo siempre haces que me sienta en casa. Javi, mi majaron siempre sacando un rato al año para que nos reuniéramos todos. Irene, cambiando el mundo con nuestras cervezas. Vosotros siempre habéis creído en mí y os habéis encargado de recordarme que puedo y merezco luchar por mis sueños.

A los amigos que me ha dado Alicante y esta gran aventura. Leti nuestros paseos por la playa donde veíamos atardecer y que nos servían, entre muchas cosas, para coger oxígeno y recargar pilas, han sido cuanto menos mágicos. Siempre me alegrabas el día cuando nos cruzábamos por los pasillos y me sonreías amiga mía. Lau qué grande eres y qué bonito es bailar y guerrear a tu lado. Tu apoyo, tus risas, los temazos en el coche y hasta las lágrimas compartidas me han dado alegría de vivir. Javi en los momentos más difíciles de este camino has sido mi familia y me has servido de ancla para impedir que me fuera a la deriva. Rafa siempre atento y pendiente de que estuviera bien. Sergio, por todas las risas y consejos que me has dado, qué grandes han sido los momentos de ciclo contándonos nuestros experimentos y el día a día del labo. A mis teleros, Conchi, Joana, Sara, Iñaki, Cristian y Ana, siempre luchándolo y sin abandonos. Y los miembros de la compañía Unkwon Project, Natalia, Bryan, Andrea, Paula, Laura, Didi, Piro y Gabri, con especial mención a Jorge por devolverme la ilusión y por todo lo que me has dado de forma totalmente altruista.

Después de todo, esta tesis trata de la influencia del ambiente en el desarrollo y sin duda sois mi nicho y mi fuente de señales extrínsecas que habéis hecho que todo esto haya sido posible. A vuestro lado todo es más fácil y sin duda alguna el resultado hubiera sido totalmente distinto.