

**Caracterización funcional del gen *vestigial* de
*Drosophila melanogaster***

Memoria presentada por

Luis Alberto Baena López

para optar al grado de Doctor en Ciencias

por la Universidad Autónoma de Madrid

Octubre de 2005

Director de Tesis: Antonio García-Bellido

Tutor de Tesis: Juan Fernández Santarén

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”

(CSIC-UAM)

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

Cualquier trabajo para su realización, requiere el apoyo directo e indirecto de muchas personas. Afortunadamente, todas las personas que han contribuido a mi educación, me han enseñado a valorar y reconocer el esfuerzo de la gente que tenemos alrededor. Mi lista de agradecimientos es larga y pido perdón si olvidara incluir a alguien en ella. Esta circunstancia no sería rara, ya que en mi cabeza la palabra despiste ocupa un espacio más grande de lo que me gustaría.

En primer lugar quiero expresar mi gratitud a **Antonio García-Bellido** que, durante la dirección de tesis y a lo largo de estos años, me ha enseñado a “sentir y vivir” la ciencia en el laboratorio y, por tanto, ha contribuido de forma decisiva a mi formación profesional y también personal.

A **Juan Fernández Santarén** quiero agradecerle su instructiva colaboración y amable disposición para tutelar la tesis.

A **Almudena** le agradezco la llamada de teléfono que marcará mi vida y la sonrisa-bronca-sonrisa que me ha acompañado con agrado en el trabajo.

Reconocer la predisposición, el trabajo bien hecho y el esfuerzo en la mejor profesional del laboratorio es secundario, cuando surge la necesidad de agradecer la compañía y el consejo a una amiga; **Charo**.

A **Jaime, Pepe, Antonio Baonza, Paloma, Martín y Cristina Cruz**, quiero agradecerles su intensa discusión científica, pero sobre todo, su amistad y capacidad para hacer del lugar de trabajo un sitio en el que divertirse constantemente.

En momentos importantes, la guía para mi desarrollo profesional ha surgido de los inteligentes consejos de **José Felix, Rosa y Cassandra**; gracias por vuestro interés y certeros comentarios.

Mi agradecimiento profesional también se extiende a todos los miembros pasados y presentes del laboratorio que han contribuido o, actualmente, son partícipes de mi trabajo; **Pedro, Enrique, Cristina Molnar, Ana, Mar, Carmen, Ana T, Jana, Álvaro, Manel, David, Lola, Sandra, María, Noe, Bea...**

En el ámbito personal esta tesis no se hubiera podido realizar sin el impulso constante, las broncas, el afecto y la cercanía de los miembros de mi familia más próxima (**Antonio, Clara, Pablo, Silvia, David, Gabriel, Mónica** y la “**Sosa**” favorita), de todos mis amigos de Soto del Real (**Maricruz, José, Mena, Marta, Carol, Pablo, Chema, Rosa**) y también **José** (Tomelloso), **Félix, Cristina, Susana, Esme, Ele, Itzi, la Cañón, José** (Pepen Alemanien), **Ricardo, Amelia...**

En último lugar de citación aparecen las personas que por su cariño y apoyo sobrehumano, sin embargo, ocupan el primer lugar en mi vida y, por tanto, a las que quiero dedicar la tesis:

mi **MADRE**, mis **ABUELOS** y **LAURA**

ÍNDICE

INDICE

	Páginas
SUMMARY	1
1. INTRODUCCIÓN	2-23
1.1 La biología del desarrollo. Marco conceptual general	2-7
<u>1.1.1 Modelos de asignación posicional</u>	2
<u>1.1.2 Etapas en el desarrollo de un órgano</u>	6
1.2 Drosophila melanogaster, organismo modelo para estudios de desarrollo	7-19
<u>1.2.1 El ala de de Drosophila melanogaster como sistema experimental. Especificación temprana y segregación territorial del ala</u>	9
<u>1.2.2 Control de la proliferación y bordes de referencia para el crecimiento del ala</u>	12
<u>1.2.3 La forma del ala como resultado del proceso proliferativo y del plano de división celular</u>	18
1.3 Aspectos conocidos del gen vestigial	19-23
<u>1.3.1 Patrón de expresión de vestigial</u>	20
<u>1.3.2 Función de vestigial durante el desarrollo del ala</u>	21
2. OBJETIVOS	24-25
3. MATERIAL Y MÉTODOS	26-40
3.1 Estirpes de moscas	26-29
<u>3.1.1 Alelos mutantes</u>	26
<u>3.1.2 Líneas G4</u>	26
<u>3.1.3 Líneas UAS</u>	27
<u>3.1.4 Generación de líneas transgénicas. UAS-vqRNAi</u>	27
<u>3.1.5 Líneas lacZ utilizadas</u>	28

3.2 Tinciones Histológicas e Inmunohistoquímicas	28-30
<u>3.2.1 Anticuerpos</u>	29
<u>3.2.2 Sondas</u>	30
3.3 Microscopía y tratamiento de imágenes	30
<u>3.3.1 Captura de imágenes en campo claro</u>	30
<u>3.3.2 Captura de imágenes de Florescencia y Microscopía confocal</u>	30
3.4 Estudios de análisis clonal	31-36
<u>3.4.1 Generación de clones de recombinación mitótica mediante Rayos X</u>	31
<u>3.4.2 Clones de recombinación mitótica mediante la técnica Flipasa-FRT</u>	31
<u>3.4.3 Clones de sobreexpresión mediante la técnica Flip-out</u>	32
<u>3.4.4. Estudio de linaje celular en diferentes fondos silvestres y mutantes mediante Flip-out</u>	33
<u>3.4.5 Generación de clones gemelos de sobreexpresión mediante la técnica MARCM</u>	33
<u>3.4.6 Generación de clones de sobreexpresión y falta de función simultáneamente mediante la técnica MARCM</u>	34
3.5 Cálculo de la densidad celular en el ala, discos imaginales y cutículas adultas	34-35
<u>3.5.1 Estimación del tamaño celular en el ala adulta</u>	35
<u>3.5.2 Estimación del tamaño celular en discos imaginales</u>	35
3.6 Cálculo de áreas y distancias en el tejido de ala adulto	35
3.7 Parametrización de clones gemelos de sobreexpresión	36
3.8 Cálculo de la densidad de división celular en discos imaginales	37
3.9 Análisis de Citometría de Flujo y cálculo de “Cell Doubling Time” en discos imaginales	38-41
<u>3.9.1 Análisis de FACS</u>	38

<u>3.9.2 Cálculo de "Cell Doubling Time"</u>	39
3.10 Determinación de la orientación de la división celular en discos imaginales	39
4. RESULTADOS	41-103
4.1 PATRÓN DE EXPRESIÓN DE VESTIGIAL DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO Y PUPAL	41
4.2 EXPRESIÓN DE VESTIGIAL. IDENTIDAD ALA	41-71
4.2.1 La expresión ectópica de vestigial es imprescindible pero insuficiente para promover el desarrollo completo de las partes distales del ala	41-52
<u>4.2.1.1 Descripción detallada de los fenotipos máximos de transformación</u>	41
<u>4.2.1.2 Análisis experimental y genético de factores que podrían influir en el proceso de transformación</u>	46
4.2.2 Fenotipos obtenidos con la expresión ectópica de vg en clones. Limitaciones temporales y genéticas del proceso de transformación	53-63
<u>4.2.2.1 La sobreexpresión clonal de vestigial otorga identidad distal a las células proximales del ala</u>	53
<u>4.2.2.2 La expresión ectópica de vestigial requiere un marco temporal y genético específico para promover transformaciones de tejido</u>	56
4.2.3 La identidad diferencial del ala requiere la combinatoria de diferentes genes entre los que se encuentra vestigial	63-64
4.2.4 La interacción genética entre wingless y vestigial es esencial para iniciar el desarrollo del ala	65-70
<u>4.2.4.1 Efectos de la sobreexpresión clonal de wingless</u>	65
<u>4.2.4.2 La células que coexpresan wingless y vestigial adquieren identidad histotípica y posicional de margen de ala</u>	67

4.2.4.3 La coexpresión clonal wg-vg sólo produce transformaciones fuera del ala en determinados contextos genéticos.....67

4.2.4.4 ¿Cuál es el nivel de interacción entre la ruta de señalización de wingless y vestigial?.....70

4.3 EXPRESIÓN DE VESTIGIAL. PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA CELULAR. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS CÉLULAS EN EL ALA.....71-103

4.3.1 La falta de función vestigial reduce autónomamente la supervivencia celular y la tasa de proliferación celular en las partes distales del ala.....71-75

4.3.1.1 La expresión de vestigial es esencial para la supervivencia celular.....71

4.3.2 La expresión de vestigial puede reducir o incrementar la tasa de proliferación celular dentro del ala de una forma dependiente de dosis y posición.....76-96

4.3.2.1 La falta de función de vestigial reduce la proliferación celular en el ala de una forma dosis dependiente.....76

4.3.2.2 La sobreexpresión de vestigial en las partes distales del ala también reduce la proliferación celular de una forma dependiente de dosis.....80

4.3.2.3 La sobreexpresión de vestigial fuera de las partes distales del ala incrementa la proliferación celular.....83

4.3.2.4 Los efectos autónomos y no autónomos de vg sobre la proliferación celular son continuos a lo largo del eje de crecimiento próximo-distal.....86

4.3.2.5 La expresión de vestigial también se requiere para el crecimiento del eje antero-posterior.....86

4.3.2.6 La expresión de vestigial podría modular el crecimiento del eje antero-posterior afectando la diferenciación de territorios de vena e intervena.....89

4.3.2.7 Contribución del desarrollo pupal a los fenotipos de falta de crecimiento provocados por variaciones en la expresión de vestigial.....94

4.3.3 La expresión de vestigial afecta la proliferación celular modulando el ritmo de proliferación celular	96-99
<u>4.3.3.1 La reducción o el incremento de la proliferación no es una consecuencia de las alteraciones en un paso concreto del ciclo celular</u>	96
<u>4.3.3.2 La reducción o el incremento del crecimiento se deben a cambios en el ritmo de proliferación celular</u>	96
4.3.4 La expresión heterogénea de vestigial a lo largo del eje próximo-distal es requerida para dar forma a las partes distales del ala	99-101
<u>4.3.4.1 La expresión heterogénea de vestigial es requerida para mantener la división celular preferentemente orientada a lo largo del eje de crecimiento próximo-distal</u>	100
4.3.5 La función de scalloped no es comparable a la de vestigial o del complejo Vg-Sd	102-103
5. DISCUSIÓN	104-118
5.1 El desarrollo del ala está dirigido por la función combinada de múltiples genes	104
5.2 Requerimientos y restricciones del proceso de transformación	105
5.3 Disección de la interacción entre wingless y vestigial	107
5.4 Identidad histotípica asociada a la expresión de vestigial	109
5.5 “Tejidos mixtos” y fenómeno de “asimilación inductiva”	110

5.6 Expresión heterogénea de Vestigial y crecimiento.....	111
5.7 Asignación posicional y crecimiento mediado por interacciones locales.....	113
5.8 vestigial modula la proliferación celular definiendo el ritmo de proliferación celular.....	115
5.9 Expresión heterogénea de Vestigial y distribución espacial de las células.....	116
5.10 Expresión de Vestigial y viabilidad celular en las partes distales del ala.....	116
5.11 Vestigial atribuye la especificad funcional al complejo Vg-Sd	117
6. CONCLUSIONES.....	119
7. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	120
8. BIBLIOGRAFÍA.....	121-134
9. ANEXO I. Recopilación de artículos publicados.....	135-140

SUMMARY

SUMMARY

The development of *Drosophila* imaginal discs is a classical model to study the growth and genetic specification of growing organs. The growth, size and shape of an organ result from the coordination of different cellular processes (cell proliferation, cell death and the spatial arrangement of cells) in specific patterns during development. In turn, these processes are intimately related to mechanisms of positional specification dependent on the activity of genetic factors. However, the relationships between positional information and gene expression patterns are poorly understood.

vestigial (vg) is an essential gene for the development of the wing in *Drosophila* (Kim et al., 1996; Williams et al., 1991; Williams et al., 1994). Vg function has been involved in the control of identity (Halder et al., 1998; Kim et al., 1996; Williams et al., 1991), cell proliferation and cell survival (Delanoue et al., 2004; Delanoue et al., 2002; Kim et al., 1996; Liu et al., 2000; Van de Bor et al., 1999) of the wing from early larval stages of development (Williams et al., 1991; Williams et al., 1993). Attending to its functionality, *vg* has been proposed to act as a “master gene” (Kim et al., 1996). However, I present evidences that its ectopic expression only elicits certain characteristics of wing blade development in specific genetic context. Furthermore, my results show a strong dependence of *vg* on *wingless* to initiate the wing blade developmental program. These findings suggest that the combinatorial function of different genes drives the developmental program of the wing blade.

In this work it is also shown that Vg is heterogeneously expressed along the axes of growth (anterior-posterior A/P, proximo-distal P/D) in the wing blade. Moreover, differences in Vg expression among neighbour cells elicits, autonomously and non-autonomously, cell proliferation. The effects of *vg* on cell proliferation are correlated with changes in rate of cell proliferation. I show in addition that the heterogeneous distribution of Vg is required for the proper orientation of cell division. In this context, the expression of Vg appears to be related with the definition of positional information in the wing blade. Taken together these results, I conclude that the growth and shape of the wing blade could be modulated by local cell interactions triggered by differences in Vg expression.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La biología del desarrollo. Marco conceptual general

La “biología del desarrollo” tiene como objeto de estudio el conjunto de eventos que, tras la formación del cigoto, permiten generar organismos con una morfología muy diversa y constante. La “genética del desarrollo”, como parte esencial de la “biología del desarrollo”, intenta determinar el papel que desempeñan los genes en la formación de un organismo.

La información genética activa de cada célula (especificación genética) controla la diversidad de funciones celulares (proliferación, supervivencia/muerte, diferenciación...) que realiza durante el desarrollo. A su vez, el perfil de activación génica de cada célula está determinado por las interacciones que establece con otras células de su entorno inmediato (García-Bellido, 1966b). La especificación genética particular de cada célula, de esta manera, está relacionada con su posición relativa (información posicional) dentro de un territorio (García-Bellido, 1966b; Locke, 1959; Wolpert, 1969). Formalmente, el programa de desarrollo de cada órgano está definido por la información posicional de todas y cada una de las células que lo componen. En este contexto conceptual, conocer los mecanismos que permiten adquirir un valor posicional a cada célula, y cómo esa información determina las funciones celulares, es esencial para comprender la morfogénesis de un órgano.

1.1.1 Modelos de asignación posicional

La posición relativa de cada célula dentro de un tejido tiene asignado un valor posicional. Existen dos modelos básicos para explicar el mecanismo que permite adquirir a las células un valor posicional determinado dentro un órgano; el modelo basado en **interacciones celulares** (Fig. 1A) (Bohn, 1974; García-Bellido, 1966b), y el modelo basado en **proteínas difusibles** (modelo de los morfógenos difusibles, Fig. 1B) (Lawrence, 1966; Stumpf, 1965; Wolpert, 1969). En ambos modelos, el

crecimiento del tejido está organizado alrededor de zonas de confrontación de expresión génica que actúan como bordes de referencia.

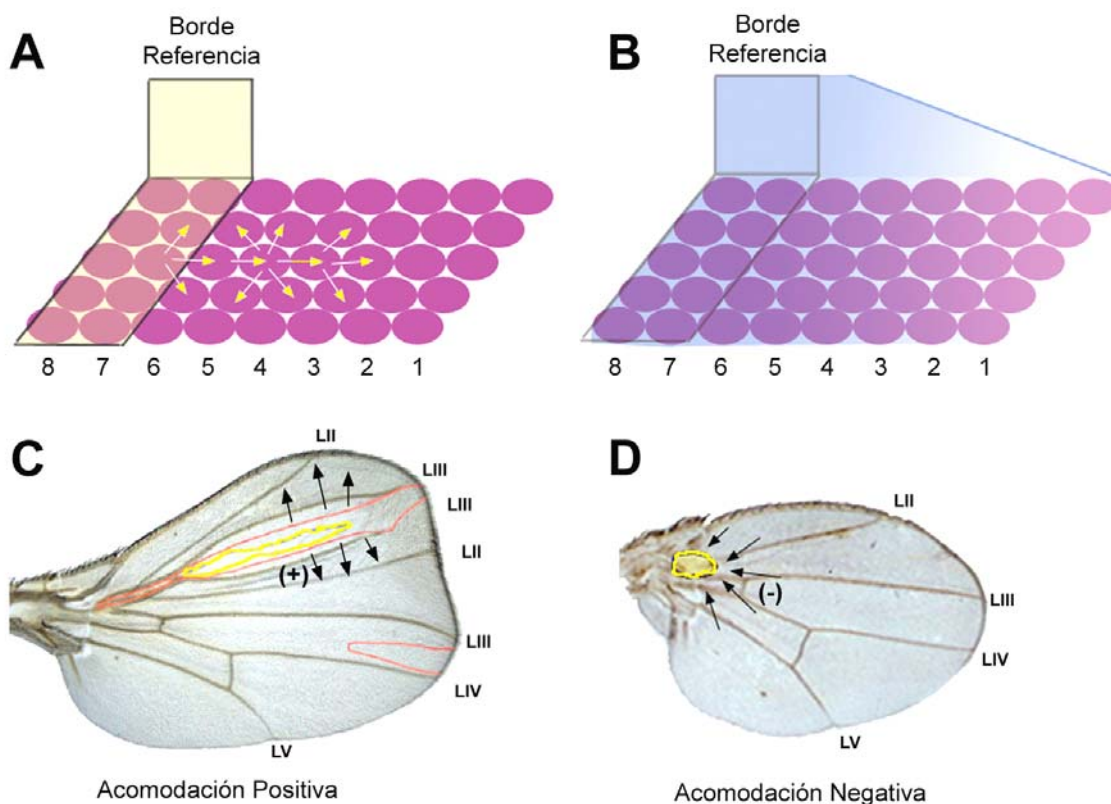


Figura 1. Modelos para explicar el crecimiento de un órgano (A, B) y ejemplos de acomodación (C,D). El tamaño final de un órgano está formalmente determinado por el valor posicional de cada una de sus células (valor numérico en A y B). Cada célula adquiere un valor posicional por el conjunto de interacciones locales que establece con células adyacentes (flechas en A) o por el gradiente de concentración de proteínas difusibles que recibe (color azul degradado en B). En ambos modelos existen bordes de referencia desde los que empiezan el conjunto de interacciones (A) o emanan los morfógenos difusibles (B). La creación de nuevos bordes de referencia provoca alteraciones en el crecimiento y en el patrón morfológico (C y D). Clones de sobreexpresión de *en* están delimitados en amarillo o rojo en (C) (modificado de (Zecca et al., 1995)), mientras que un clon de falta de función de *nub* está delimitado en amarillo en (D) (modificado de (Cifuentes and García-Bellido, 1997)). El efecto no autónomo sobre el crecimiento asociado a la presencia de nuevos bordes de referencia recibe el nombre de acomodación (C y D). La acomodación tiene sentido positivo si aumenta el crecimiento y duplica elementos de patrón (flechas positivas señalizando hacia fuera de los clones en C), y tiene sentido negativo si reduce el crecimiento (flechas negativas señalizando hacia el clon en D).

A partir de los bordes de referencia comienza la asignación posicional de cada célula dentro de un territorio (Fig. 1A, B) y su ausencia impide su desarrollo. En el modelo de interacciones celulares los bordes de referencia sirven para iniciar el conjunto de interacciones celulares locales que dirigen el crecimiento (García-Bellido, 1966b) (Fig. 1A). En el modelo de los morfógenos difusibles, desde los bordes de referencia emanan proteínas difusibles que, de una forma dependiente de concentración, dotan a las células de la información posicional (Lawrence, 1966; Stumpf, 1965; Wolpert, 1969) (Fig. 1B).

En el modelo basado en **interacciones celulares**, las propiedades celulares dependen de los contactos locales con intercambio de información que se establecen entre células adyacentes (células vecinas). El control del desarrollo se realiza de forma local mediante interacciones célula-célula (Bohn, 1974; García-Bellido, 1966b). La supresión o mantenimiento de los contactos entre células vecinas depende de marcas posicionales que determinan el grado de afinidad celular (García-Bellido, 1966b). Los resultados que sugirieron el modelo derivan de experimentos clásicos de regeneración, disociación, reagrupación y trasplante de células procedentes de un mismo órgano o diferentes órganos. Los disociados y trasplantes de células de un mismo órgano mostraron que las células transplantes conservaban, en la mayor parte de los casos, sus características histotípicas y posicionales; aunque también con una frecuencia baja, podían modificar su identidad (**fenómeno de transdeterminación**) (García-Bellido, 1966a; García-Bellido, 1966b; Hadorn, 1965). También revelaron que el contacto entre células con diferentes valores posicionales estimulaba el crecimiento y la regeneración de elementos de patrón. Además, los elementos de patrón regenerados eran todos los intermedios que, normalmente, aparecen entre la posición relativa de los dos tipos de células en contacto en el órgano de procedencia (Bohn, 1974; García-Bellido, 1966b; Locke, 1959). A partir de estos experimentos se pudo inferir que el crecimiento dentro de un órgano es de tipo intercalar, y depende del contacto local entre células con identidad

posicional relativa diferente (Bohn, 1974; García-Bellido, 1966b). La respuesta proliferativa, no autónoma, que surge alrededor de una nueva referencia posicional se denomina “**acomodación**” (Fig.1C, D) (García-Bellido et al., 1994). Cuando la acomodación supone un incremento de la proliferación celular se considera positiva (Zecca et al., 1995) (Fig.1C), mientras que cuando impide la proliferación se considera negativa (Fig.1D) (Cifuentes and García-Bellido, 1997; Resino and García-Bellido, 2004). Recientemente, el control local de la proliferación celular se ha correlacionado con la aparición de grupos de células contiguas, sin origen clonal, con ciclo celular sincronizado (Milán et al., 1996a; Milán et al., 1996b). Los experimentos de disociación y trasplante de células procedentes de órganos diferentes demostraron la capacidad que tienen las células para reagruparse o segregarse, tras el reconocimiento celular, en función de su grado de afinidad (García-Bellido, 1966b). También revelaron que, ocasionalmente, el contacto de células con una identidad determinada puede modificar el histotipo de células adyacentes (**fenómeno de asimilación inductiva** introducido por H. Spemann) (García-Bellido, 1966b; Hamburger, 1988; Sander, 1991).

El modelo de **morfógenos difusibles** propone que el valor posicional de una célula en un órgano está definido por la cantidad de proteína difusible (morfógeno difusible) que recibe (Lawrence, 1966; Stumpf, 1965; Wolpert, 1969) e independientemente de las interacciones celulares con el entorno. Los genes de *Drosophila melanogaster* *wingless* (*wg*), *decapentaplegic* (*dpp*) o *hedgehog* (*hh*) (Nellen et al., 1996; Zecca et al., 1995; Zecca et al., 1996b) y sus homólogos conservados son ejemplos clásicos de morfógenos difusibles. El gradiente de concentración se genera mediante mecanismos específicos para cada proteína difusible, entre los que se incluyen, sistemas de transporte extracelular controlados por proteínas de la matriz extracelular y sistemas específicos de transporte vesicular (Gallet and Therond, 2005; Han et al., 2005; Kreuger et al., 2004; Strigini and Cohen, 2000; Teleman and Cohen, 2000). La teoría de los morfógenos difusibles está

basada en 1) los experimentos de regeneración realizados por Wolpert (Wolpert, 1969) en diferentes organismos, 2) en los trasplantes epidérmicos en insectos realizados por Stumpf y Lawrence (Lawrence, 1966; Stumpf, 1965) y 3) el descubrimiento de proteínas difusibles como *wg*, *dpp*, o *hh* capaces de generar respuestas celulares no autónomas y dependientes de la concentración de morfógeno recibido. Las alteraciones en el crecimiento y la formación de patrón de un órgano, asociadas a la expresión ectópica o la falta de expresión de morfógenos difusibles, se atribuyen a cambios en el gradiente de concentración de morfógeno (Nellen et al., 1996; Zecca et al., 1995; Zecca et al., 1996b).

1.1.2 Etapas en el desarrollo de un órgano

La iniciación del programa de desarrollo de un órgano está definido por la especificación genética particular de una o varias células, en posiciones constantes e invariantes. El descubrimiento del gen *eyeless* (*ey*), y su implicación en el desarrollo del ojo de *Drosophila*, sugirió la existencia de proteínas cuya función era suficiente e imprescindible para iniciar y controlar el desarrollo completo de un órgano (Halder et al., 1995). *ey* y otros genes de función similar, como *vestigial* (*vg*), fueron incluidos en la categoría de “genes selectores de tejido” o “**genes maestros**” (Halder et al., 1995; Kim et al., 1996). La existencia de esta categoría de genes está basada en la caracterización funcional de *ey*. La función de *ey*, además de ser esencial para iniciar el desarrollo del ojo, es capaz de promover el desarrollo de ojos ectópicos en otros tejidos (Halder et al., 1995). Sin embargo, estudios recientes sugieren que *ey* resulta insuficiente para iniciar y controlar de forma individual el desarrollo completo del ojo. Así se ha observado que *ey* no se expresa exclusivamente en el ojo, su expresión ectópica sólo promueve el desarrollo del ojo en determinados contextos genéticos y la actividad combinatorial de determinadas rutas de señalización es necesaria, junto con *ey*, para la especificación temprana del ojo (Baker et al., 2001; Kumar and Moses, 2001a; Kumar and Moses, 2001b). Como

alternativa a la existencia de genes maestros surge la hipótesis de las “**combinatorias génicas**”. En esta teoría el desarrollo de un órgano es iniciado y controlado por la acción combinada de diferentes genes (Baker et al., 2001; Kango-Singh et al., 2003; Kumar and Moses, 2001b).

El crecimiento de un órgano, tras iniciarse su programa de desarrollo, está coordinado con una subdivisión territorial progresiva, que depende de la expresión restringida de múltiples genes. A su vez, la consecución de su tamaño y forma final están definidos por el número y la ordenación espacial de las células que lo componen. El número final de células de un órgano es el resultado del balance entre los procesos de proliferación y muerte celular. La ordenación espacial de las células está fuertemente determinada por la orientación de la división mitótica (Baena-López et al., 2005; Gong et al., 2004; Reddy et al., 2004) y la alocaión celular (Ribeiro et al., 2004). La morfogénesis de un órgano concluye con una fase de especialización celular que recibe el nombre de diferenciación. El proceso de diferenciación permite que las células adquieran las características morfológicas y funcionales que tendrán en el organismo adulto.

1.2 *Drosophila melanogaster*, organismo modelo para estudios de desarrollo

Drosophila melanogaster es uno de los organismos modelo mejor conocidos a nivel genético, y más utilizados para estudios de morfogénesis. *Drosophila* es un insecto holometábolo cuyo ciclo vital comienza con una fase embrionaria de veinticuatro horas de duración. Posteriormente, durante cuatro días transcurren tres etapas larvarias que preceden a un periodo pupal de cinco días. El proceso de desarrollo culmina con la eclosión del adulto o imago (Wolpert et al., 1998) (Fig.2).

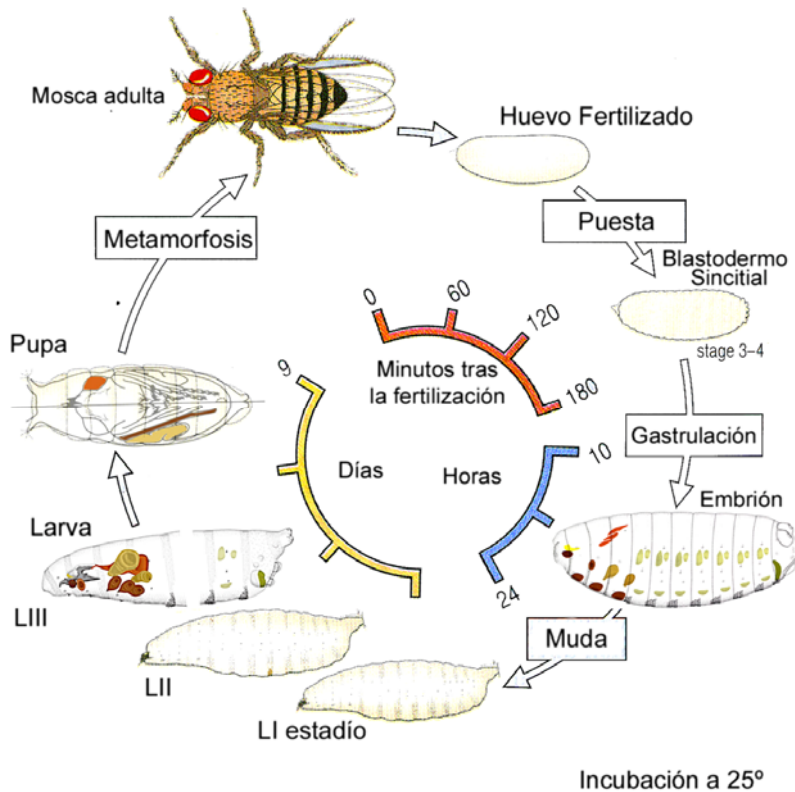


Figura 2. Ciclo Vital de *Drosophila melanogaster* a una temperatura de cultivo de 25° (modificado de (Wolpert et al., 1998))

Al final de la embriogénesis y en posiciones constantes del ectodermo embrionario se especifican grupos discretos de células, que darán lugar al tejido imaginal (Fig.2) (Wolpert et al., 1998). Los discos imaginales y las células de los nidos de histoblastos constituyen el tejido imaginal del que se derivan las estructuras cuticulares adultas (Fig.3) (Cohen, 1993; Wolpert et al., 1998). Los discos imaginales tienen un origen policlonal (García-Bellido and Merriam, 1969; Wieschaus and Gehring, 1976). En las últimas etapas del desarrollo embrionario, las células de los discos imaginales se invaginan del ectodermo embrionario y forman una estructura con morfología de saco aplanado (Cohen, 1993). Durante el período larvario, los discos imaginales y la epidermis larvaria están en contacto a través de un pedúnculo (Cohen, 1993), pero el desarrollo de los dos tejidos es independiente (Fig. 2). La mayoría de la proliferación de los discos imaginales se realiza durante el desarrollo larvario, siguiendo un régimen exponencial (Cohen, 1993; García-Bellido, 1975; García-Bellido and Merriam, 1971), y concluye al poco tiempo de comenzar la

pupación (Milán et al., 1996a). El número final de células que forman los discos imaginales es característico y constante para cada disco imaginal (Cohen, 1993). Durante la pupación se produce la histólisis de los tejidos larvarios y la evaginación de los discos imaginales (Gilbert, 2000; Pastor-Pareja et al., 2004). Por último, la formación del organismo adulto requiere la fusión de los discos imaginales y nidos de histoblastos (ipsolaterales y contralaterales) ((Fristrom, 1976; Martin-Blanco et al., 2000; Pastor-Pareja et al., 2004) (Fig.2).

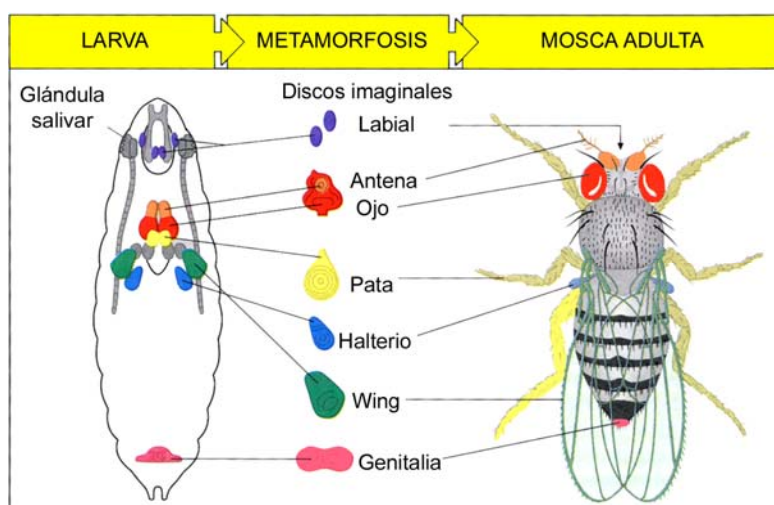


Figura 3. Representación de los discos imaginales durante el desarrollo larvario y correspondencia con los órganos adultos que forman (modificado de (Wolpert et al., 1998)).

1.2.1 El ala de *Drosophila melanogaster* como sistema experimental.

Especificación temprana y segregación territorial del ala

La morfogénesis del ala de *Drosophila* es un sistema modelo muy utilizado para analizar los mecanismos genéticos que controlan la proliferación celular y la creación de patrón en un órgano. El número de células que forman el primordio embrionario del disco imaginal de ala es de 12-47 células (Bryant, 1970; Cohen, 1993; García-Bellido and Merriam, 1971), pero aumenta hasta las 50.000, al final del desarrollo (Bryant, 1970; Cohen, 1993; García-Bellido and Merriam, 1971). Cada disco imaginal de ala da lugar a la mitad del tórax y un ala adulta de la mosca (Cohen, 1993; Gilbert, 2000). Los primeros eventos de segregación territorial, que ocurren en el disco imaginal de ala, surgen con la aparición de las restricciones

clonales antero-posterior (A/P) (García-Bellido, 1975; García-Bellido et al., 1973) y dorso-ventral (D/V) (Cohen et al., 1992; Díaz-Benjumea and Cohen, 1993) (Fig. 4A, B; 5A; ver detalles punto 1.2.2). Poco después se segregan los presuntivos territorios de tórax, ala (Baonza et al., 2000b; Cavodeassi et al., 2002; Wang et al., 2000; Williams et al., 1993) y membrana peripodial (Baena-López et al., 2003; McClure and Schubiger, 2005) (Fig. 4B-D; 5A). La segregación de estos últimos se realiza durante el segundo estadio larvario (Williams et al., 1993) y no está asociada a bordes de restricción clonal definidos (Resino et al., 2002). Para la especificación genética del tórax es esencial la actividad de los genes *homothorax* (*hth*) y *teashirt* (*tsh*) (Azpiazu and Morata, 2000; Casares and Mann, 2000; Wu and Cohen, 2002; Zirin and Mann, 2004) junto a la ruta de señalización del EGFR (Baonza et al., 2000b; Klein, 2001; Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002a; Zecca and Struhl, 2002b). La especificación del ala requiere la ruta de señalización de Wg junto a *vestigial* (*vg*) (Kim et al., 1996; Klein, 2001; Ng et al., 1996; Williams et al., 1991; Williams et al., 1993) (Fig. 4C). Las células de la membrana peripodial tienen características genéticas e histotípicas propias y su especificación está inhibida por altos niveles de activación de las rutas de señalización del EGFR y Wg (Baena-López et al., 2003) (Fig. 4D). La expresión de *wg* en estadios posteriores del desarrollo larvario permite distinguir dos dominios de especificación génica y diferenciación en el ala. Por un lado, el “wing blade” o ala distal (territorios incluidos dentro del dominio de expresión del anillo interno del *wg*), y por otro lado, el “wing hinge” o ala proximal (territorios incluidos entre el anillo interno y externo de *wg*) (Klein, 2001; Rodríguez del Álamo et al., 2002) (Fig. 5A, B).

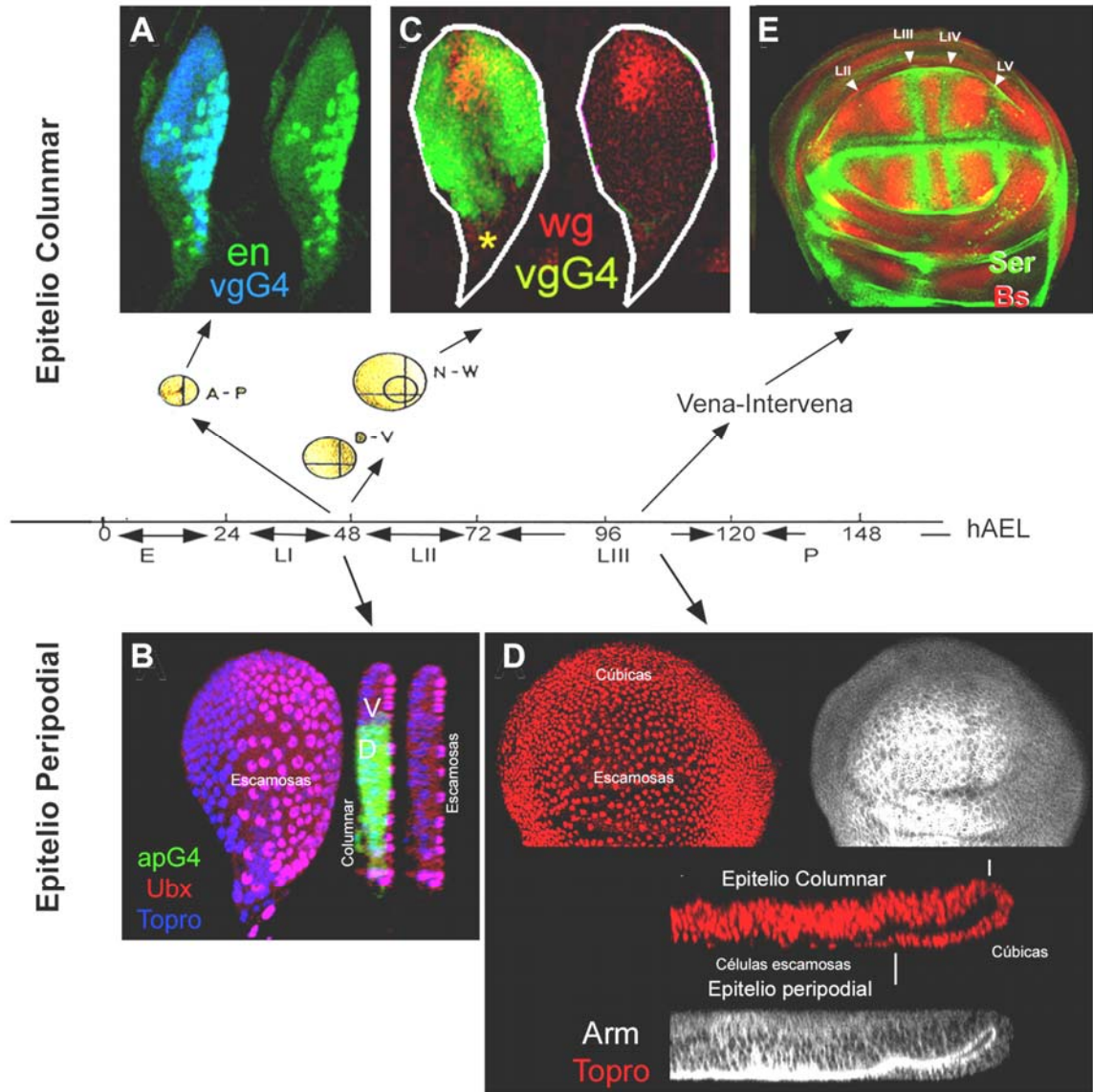


Figura 4. Segregación territorial en el ala durante el desarrollo larvario. El tiempo de desarrollo desde la puesta del huevo y cada una de sus etapas está representada por la línea negra segmentada; E = etapa embrionaria, LI = primer período larvario, LII = segundo período larvario, LIII = tercer período larvario, P = pupación (modificado de (García-Bellido et al., 1976)). (A) La segregación anterior-posterior (A/P) se hereda del período embrionario y está definida por la restricción al compartimento posterior de la expresión del gen *en* (verde). (B) Al final del segundo estadio larvario se empiezan a observar diferencias en la expresión génica y la morfología celular de las dos capas de células que forman el disco imaginal de ala. (B) Las células del disco imaginal que darán lugar a las estructuras epiteliales adultas no expresan Ultrabithorax (rojo) y muestran una morfología cúbica, mientras que las células que formarán el epitelio peripodial expresan *Ubx* (rojo) y empiezan a adquirir una morfología plana o escamosa. (B) El borde de restricción clonal dorsal-ventral (D/V) del ala se genera gracias a la expresión restringida de *ap* (verde) en células dorsales del lado epitelial propiamente dicho. (C) La segregación de los presuntivos territorios de ala y tórax depende de la actividad de genes y rutas de señalización específicas en el ala y en el tórax. (C) La

expresión de Wg (rojo) y de Vg (verde) es esencial para la especificación del presuntivo territorio de ala. (D) Desde la mitad del tercer estadio larvario las diferencias morfológicas y genéticas entre los dos epitelios que forman el disco imaginal son muy evidentes; Armadillo (blanco) y núcleos (Rojo). (E) Los presuntivos territorios de provena (LII-LV y marcados con flechas blancas) e intervena empiezan a especificarse desde la mitad del tercer estadio larvario, gracias a la expresión restringida de genes como Ser (verde) o Bs (rojo) respectivamente.

En el tercer estadio larvario, aparecen heterogeneidades genéticas a lo largo del eje de crecimiento antero-posterior, que sirven para segregar los presuntivos territorios de provena e intervena (De Celis, 2003) (Fig. 4E, ver detalles en 1.2.2). La diferenciación final del patrón morfológico se realiza durante la pupación. El patrón morfológico del ala adulta está constituido por mecanorreceptores y quimiorreceptores, diferentes regiones de intervena (A-E), cinco venas longitudinales (LI-LVI) y dos venas transversales (a-cv, p-cv) (Fig. 5A).

1.2.2 Control de la proliferación y bordes de referencia para el crecimiento del ala

La especificación genética de las células que forman los discos imaginales está coordinada con su actividad proliferativa. Las señales instructivas que definen la creación de patrón y la proliferación celular en los discos imaginales son, principalmente, autónomas al disco (García-Bellido, 1965); pero su crecimiento, de forma permisiva, también está modulado por factores fisiológicos externos como el balance hormonal (Caldwell et al., 2005; Colombani et al., 2005).

INTRODUCCIÓN

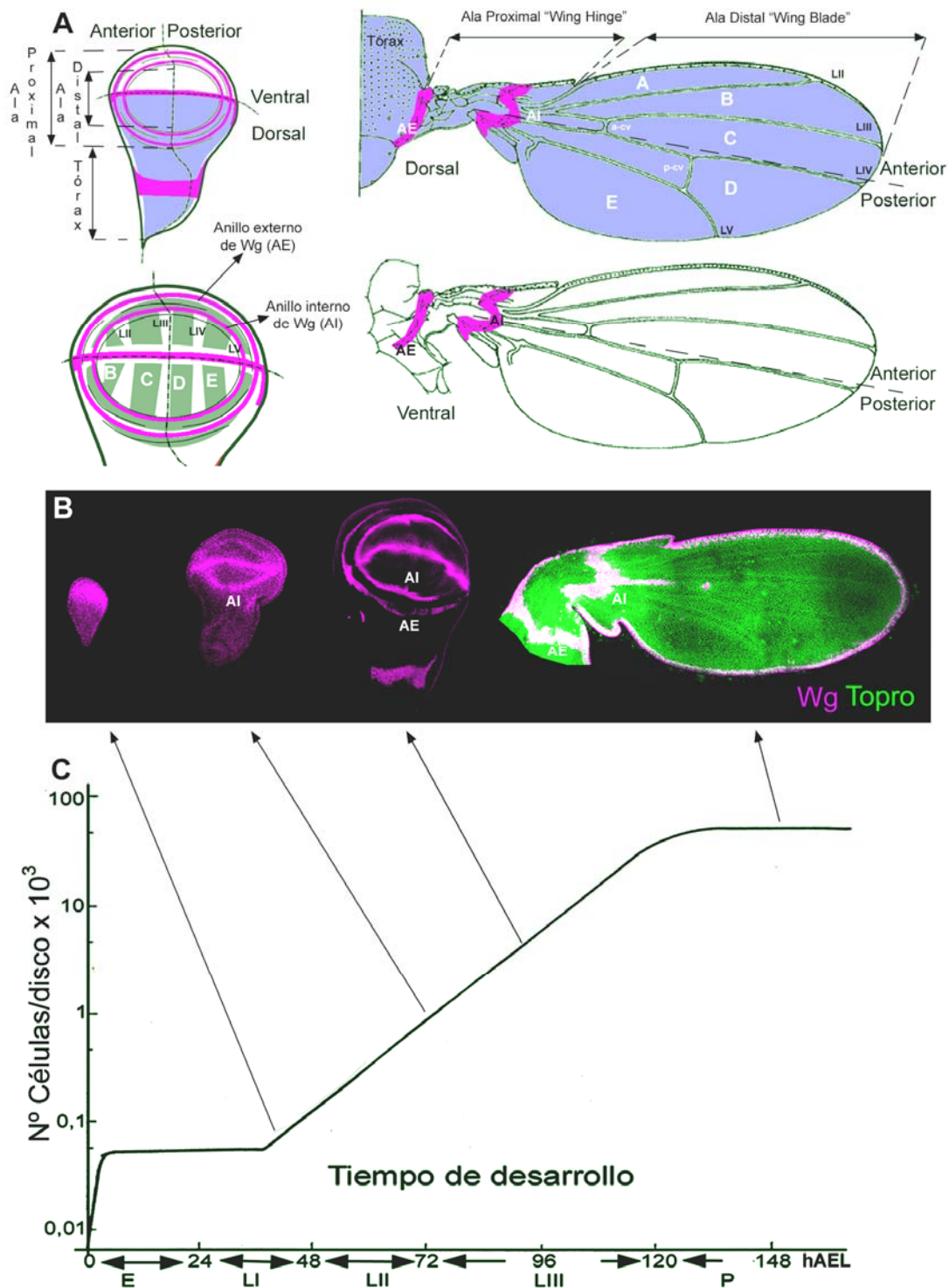


Figura 5. Esquema territorial del disco imaginal de ala y correspondencia con el ala adulta (A); crecimiento exponencial del disco imaginal de ala (B) y tiempo de desarrollo (C). (A) La superficie dorsal del disco imaginal de ala está especificada por la expresión diferencial de *ap* (representado en color azul en A). Los territorios en color rosa marcan altos niveles de expresión de Wg (A y B). (A) Los presuntivos territorios de interviena están representados en color gris y tienen asignado su nombre en letras blancas. La "cross vein" anterior y posterior están indicadas como a-cv y p-cv, respectivamente (A). La expresión

correspondiente al anillo interno y externo de wg están indicadas como AI y AE, respectivamente (A y B). Los esquemas de las alas adultas son modificaciones de originales obtenidos en <http://www.flybase.bio.indiana.edu>. (B) Crecimiento exponencial del disco imaginal de ala. En púrpura se muestra la expresión de Wg y en verde el marcaje de núcleos con Topro-3 (B). (C) Representación del crecimiento del disco imaginal de ala y tiempo de desarrollo (modificado de (García-Bellido et al., 1976)).

La proliferación de las células del ala sigue un régimen exponencial desde la mitad del primer estadio larvario y llega hasta el final del tercer estadio larvario (Cohen, 1993; García-Bellido, 1975; García-Bellido and Merriam, 1971) (Fig. 5B, C). Al principio de la pupación la proliferación celular cesa después de dos rondas de división adicionales (Milán et al., 1996a). Los estudios de linaje celular han demostrado que todas las células del ala proliferan de forma intercalar con una tasa constante e independiente de su posición (García-Bellido and Merriam, 1971; González-Gaitan et al., 1994; Resino et al., 2002). El crecimiento del ala requiere la expresión restringida y diferencial de genes en distintos territorios. En los límites de expresión génica se establecen referencias posicionales, a partir de las cuales, se organiza el crecimiento del ala. Los territorios sobre los que diferenciarán las venas y los bordes de compartimento A/P y D/V son zonas de confrontación génica y referencias posicionales esenciales para dirigir el crecimiento del ala (González-Gaitan et al., 1994)(Díaz-Benjumea and Cohen, 1993; García-Bellido et al., 1973; García-Bellido et al., 1976). Los bordes A/P y D/V, además de ser referencias para el crecimiento, son bordes de restricción clonal (Díaz-Benjumea and Cohen, 1993; García-Bellido et al., 1973; García-Bellido et al., 1976). A ambos lados de los bordes de restricción, cada grupo inmisible de células constituye formalmente un compartimento (García-Bellido et al., 1973; García-Bellido et al., 1976) (Fig. 5A). El establecimiento de los bordes de compartimento A/P y D/V es necesario para dotar a las células del ala de información posicional a lo largo de los ejes de crecimiento anterior-posterior y dorsal-ventral. Superimpuesto a los ejes de crecimiento antero-posterior y dorsal-ventral está el eje próximo-distal (P/D). La forma y tamaño final del

ala depende de la integración posicional en los ejes de crecimiento descritos y, por tanto, la ausencia de cualquiera de ellos impide su desarrollo.

La **compartimentalización antero-posterior A/P** se hereda de las etapas embrionarias y es una consecuencia de la expresión diferencial del gen selector *engrailed (en)* en el compartimento posterior (Kornberg et al., 1985) (Fig. 4A). La falta de función de *en* transforma la identidad genética del compartimento posterior en anterior. De forma inversa, su expresión ectópica en el compartimento anterior transforma la identidad de células anteriores en posteriores (Guillen et al., 1995; Zecca et al., 1995). En cualquiera de los dos casos, la zonas de confrontación ectópicas, que se establecen entre células anteriores y posteriores, provoca la aparición de bordes de compartimento A/P ectópicos. La creación de un borde ectópico A/P produce la duplicación de elementos de patrón y el sobrecrecimiento del tejido circundante (Guillen et al., 1995; Zecca et al., 1995) (Fig. 1C). La acomodación que se produce por la formación de un borde A/P ectópico tiene sentido positivo (acomodación positiva) y su tamaño aumenta a medida que el nuevo borde A/P se aleja del borde A/P natural del ala (Guillen et al., 1995; Zecca et al., 1995) (Fig. 1C). En el compartimento posterior, la expresión de *en* induce la expresión de *hh* (Guillen et al., 1995; Zecca et al., 1995). Hh es una proteína difusible que llega desde las células posteriores a las células anteriores adyacentes al borde de compartimento A/P, activando finalmente la expresión del gen *dpp* (Kojima et al., 1994). *dpp* se expresa en una estrecha franja de células anteriores adyacentes al borde de compartimento al final del desarrollo larvario (Masucci et al., 1990) y codifica para una proteína difusible. Los efectos sobre el crecimiento que produce la expresión ectópica de *dpp*, son equivalentes a los descritos cuando se modifica la expresión de *en* (Capdevila and Guerrero, 1994). Estos resultados han llevado a sugerir que *dpp* controla la proliferación (Campbell and Tomlinson, 1999; Lawrence and Struhl, 1996; Lecuit and Cohen, 1998; Pages and Kerridge, 2000) y la supervivencia diferencial de las células del ala de una forma dependiente de

concentración (Adachi-Yamada and O'Connor, 2002; Milán et al., 2002; Moreno et al., 2002). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la expresión de *dpp* contribuye más al mantenimiento de la integridad epitelial que a la supervivencia celular; el efecto primario de su falta de función sólo provoca la extrusión de las células mutantes del epitelio del ala (Gibson and Perrimon, 2005; Shen and Dahmann, 2005). La activación de la ruta de señalización de *dpp* también es requerida para la creación de patrón (expresión territorial de diferentes genes) en el ala desde estadíos tempranos del desarrollo larvario (Barrio and de Celis, 2004; Grimm and Pflugfelder, 1996; Minami et al., 1999; Sivasankaran et al., 2000).

La **compartimentalización dorso-ventral D/V** se debe a la expresión diferencial del gen *apterous* (*ap*) en las células dorsales del ala (Díaz-Benjumea and Cohen, 1993) (Fig. 4B). Al igual que sucedía para *en*, la expresión ectópica de *ap* en las células ventrales o la falta de función en las dorsales lleva asociados cambios de identidad celular que forman bordes ectópicos de restricción D/V (Díaz-Benjumea and Cohen, 1993). La formación de un nuevo borde D/V provoca el sobrecrecimiento no autónomo del tejido circundante (acomodación positiva) (Díaz-Benjumea and Cohen, 1993; Fernández-Fúnez et al., 1998). El tamaño de los sobrecrecimientos depende de la posición en la que aparecen las células mutantes para *ap* (por exceso o falta de función), siendo mayores a medida que se alejan del borde D/V del ala (Díaz-Benjumea and Cohen, 1993; Fernández-Fúnez et al., 1998). En este caso la acomodación, además, provoca la distalización y extrusión del tejido sobrecrecido fuera del plano normal del ala (Díaz-Benjumea and Cohen, 1993; Fernández-Fúnez et al., 1998). En las zonas de confrontación entre células con expresión y sin expresión de *ap*, se activa la ruta de señalización de *Notch* (*N*) a través de sus ligandos *Serrate* (*Ser*) y *Delta* (*DI*) (de Celis and Bray, 1997; Diaz-Benjumea and Cohen, 1993; Díaz-Benjumea and Cohen, 1995). Como resultado de la actividad de *N* se inducen altos niveles de expresión de *wg* en los bordes ectópicos dorso-ventrales (Díaz-Benjumea and Cohen, 1995). Al igual que para *Dpp*, se ha sugerido

que la difusión de *Wg* a ambos lados del borde D/V podría estimular la proliferación celular y la expresión génica dentro del ala de una forma dependiente de concentración (Neumann and Cohen, 1996; Neumann and Cohen, 1997; Zecca et al., 1996a). El gen *vg* se expresa en el “wing blade” desde la creación del margen D/V del ala y la activación *wg* (Williams et al., 1993; Williams et al., 1994).

La especificación genética y el crecimiento en el **eje P/D**, es uno de los aspectos más desconocidos en el desarrollo de los apéndices. El crecimiento en el eje P/D no está asociado a bordes estrictos de restricción clonal. La actividad conservada de genes como *homothorax (hth)* o *tsh* es requerida para el crecimiento de las zonas proximales de los apéndices (Abu-Shaar and Mann, 1998; Abzhanov and Kaufman, 2000; Azpiazu and Morata, 2002; Campbell and Tomlinson, 1998; Casares and Mann, 2000; Williams et al., 1993; Williams et al., 1994; Wu and Cohen, 1999; Wu and Cohen, 2000; Wu and Cohen, 2002; Zirin and Mann, 2004), mientras que los territorios distales dependen de la expresión y actividad conservada de *Distalless (Dll)* (Gorfinkiel et al., 1997). Ahora bien, la distalización del ala es independiente de la expresión de *Dll* (Gorfinkiel et al., 1997). La expresión y función de *vg*, por el contrario, parece estar implicada en la especificación genética de las partes distales del ala (Halder et al., 1998; Kim et al., 1996; Williams et al., 1991; Williams et al., 1994). Otros genes requeridos en diferentes dominios del eje P/D del ala son *nubbin (nub)* (Cifuentes and García-Bellido, 1997), *rotund (rn)* (Rodríguez del Álamo et al., 2002), *zinc-finger homeodomain 2 (zfh2)* (Whitworth and Russell, 2003), *defective proventriculus (dve)* (Kolzer et al., 2003) y *Ventral veinless (Vvl)* (Certel et al., 2000; de Celis et al., 1995b).

Desde la mitad del tercer estadio larvario, la actividad de las rutas de señalización de *Dpp*, *Hh*, *N* y *EGFR* subdividen el disco imaginal de ala a lo largo del eje A/P en territorios de **provena e intervena** (de Celis, 1998; De Celis, 2003). La posición en la que se especifican las provenas e intervenas es constante y depende del pre-patrón que configura la expresión de genes como *knot (kn)* (se expresa desde la intervena

de LIII a LIV) (Crozatier et al., 2002; Crozatier et al., 1996) o *spalt (sal)* (de LII-LV) (Barrio and de Celis, 2004; de Celis and Barrio, 2000). Posteriormente, cada provena adquiere una identidad genética característica determinada por la expresión de genes específicos (LII expresa *knirps (kni)* (Lunde et al., 1998), LIII y LV *Iroquois-complex (C-Iro)* (Gómez-Skarmeta and Modolell, 1996). La expresión de genes característicos de las provenas está reprimida en las intervenas por *blistered (bs)* (Montagne et al., 1996; Roch et al., 1998), *extramacrochaete (emc)* (Baonza et al., 2000a; de Celis et al., 1995a) o *Enhancer of split, E(spl)m β* (de Celis et al., 1996b). El programa de diferenciación de las provenas también está reforzado, durante el desarrollo larvario, por la expresión restringida de los ligandos de la ruta de señalización de N (*Delta (Dl)* y *Serrate (Ser)* (de Celis et al., 1997; de Celis et al., 1996a) y la activación de la ruta del EGFR, a través del procesamiento que ejerce *veinlet (ve)* sobre sus ligandos (Urban and Freeman, 2003). Durante la metamorfosis, las rutas de señalización mencionadas y la expresión de diferentes genes completan la diferenciación de los territorios de **vena-intervena**. La diferenciación final de los territorios de vena e intervena se realiza tras la aposición de las dos superficies del ala. El resultado de la diferenciación es un mayor grado de compactación y pigmentación celular en los territorios de vena que en los de intervena (De Celis, 2003).

1.2.3 La forma del ala como resultado del proceso proliferativo y del eje de división celular

La forma constante de un órgano depende en gran medida de la distribución espacial específica de las células que lo componen. Recientemente, se ha demostrado que la distribución espacial de las células en el ala y en otros órganos está fundamentalmente definida por la orientación del **eje de división celular** (Baena-López et al., 2005). La posición relativa adoptada por cada célula en los discos imaginales durante el desarrollo larvario no se modifica durante la eversión y

la diferenciación pupal, tal y como sugiere el mantenimiento de la morfología clonal en la cutícula adulta y la cohesión celular de los clones morfogénéticos (Resino et al., 2002).

1.3 Aspectos conocidos del gen vestigial

A pesar de los años transcurridos desde el descubrimiento del primer alelo mutante para el gen *vg* (*vg*¹) (Morgan 1910; ver <http://www.flybase.bio.indiana.edu>), actualmente, siguen sin conocerse muchos aspectos relacionados con su función. Los datos conocidos sugieren su implicación funcional en la especificación genética característica del ala respecto a otros tejidos (Halder et al., 1998; Kim et al., 1996; Williams et al., 1991; Williams et al., 1994) y el control de los procesos de proliferación/muerte celular (Delanoue et al., 2004; Delanoue et al., 2002; Kim et al., 1996; Liu et al., 2000; Van de Bor et al., 1999). Estas propiedades lo convierten en un buen candidato para estudiar los mecanismos que determinan la especificación genética y posicional en un órgano.

El gen ***vg*** está mapeado citológicamente en la posición 49 D2-E1 del brazo derecho del cromosoma 2 (2R) (Fig. 6). *vg* tiene una longitud de 16 Kb que dan lugar a un transcrito procesado de 3.8 Kb (Williams et al., 1990). Los 8 exones que componen el transcrito del gen procesado codifican para una proteína de 453 aminoácidos con escasa homología a las descritas hasta el momento (Williams et al., 1990; Williams and Bell, 1988). *Vg* actúa como un regulador transcripcional (Halder and Carroll, 2001; Halder et al., 1998) tras interactuar con el producto del gen ***scalloped (sd)*** (Campbell et al., 1992; Simmonds et al., 1998; Vaudin et al., 1999). *sd* se expresa en todos los territorios con expresión *Vg* y pertenece a la familia conservada de proteínas con capacidad de unión al DNA, TEA/ATTS (Campbell et al., 1992; Campbell et al., 1991; Vaudin et al., 1999). El complejo *Vg*-*Sd* es funcional gracias a la complementariedad de cada una de sus proteínas. *Vg* dota de especificidad funcional al complejo y *Sd* permite su unión al DNA (Halder and Carroll, 2001; Halder

et al., 1998). Es importante destacar que en cualquier circunstancia cuando se habla de la función de *vg* se hace referencia al complejo Vg-Sd (Simmonds et al., 1998; Vaudin et al., 1999).

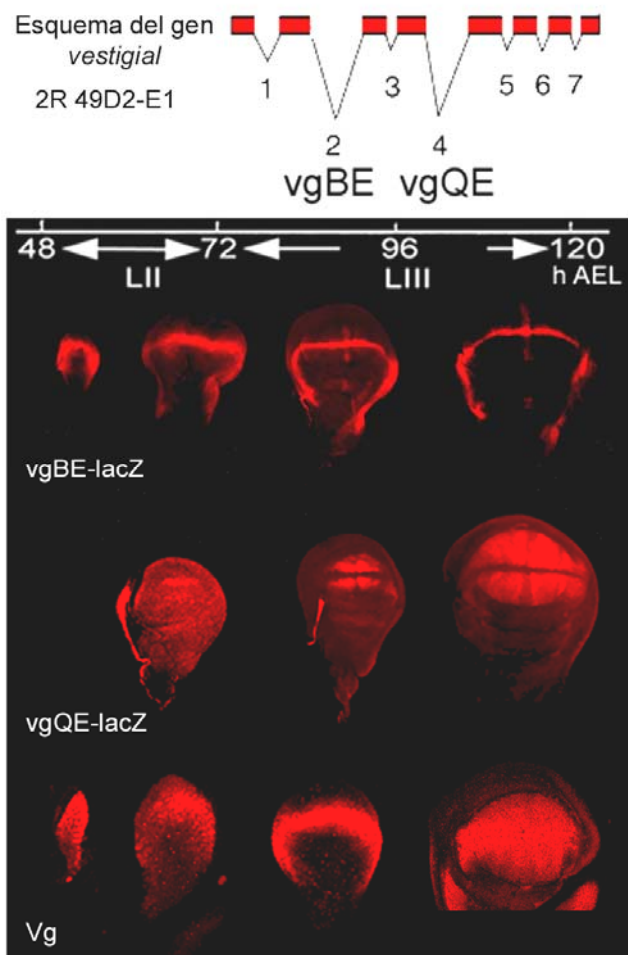


Figura 6. Esquema del gen *vestigial* y patrón de expresión en el disco imaginal de ala. El esquema del gen *vg* es una modificación del presentado por Kim y colaboradores (Kim et al., 1996). El patrón de expresión que muestra la proteína Vg durante el desarrollo depende de la acción complementaria de dos secuencias reguladoras que reciben el nombre de “enhancer del borde” (vgBE) y “enhancer del cuadrante” (vgQE) (en rojo).

1.3.1 Patrón de expresión de *vestigial*

La expresión de *vg* comienza ha observarse en el primordio del disco imaginal de ala al final del desarrollo embrionario (Williams et al., 1991). Posteriormente durante el desarrollo larvario y pupal, dos secuencias reguladoras, localizadas en el segundo y cuarto intrón del gen, dirigen su expresión. Las secuencias de regulación reciben los nombres de “enhancer” del borde (vg-BE) y “enhancer” del cuadrante (vg-QE) (Kim et al., 1996; Williams et al., 1990; Williams and Bell, 1988; Williams et al., 1994). vg-BE dirige bajos niveles de expresión de *vg* en todas las células que componen el primordio embrionario de los discos imaginales de ala y halterio (Williams et al., 1991). La función asociada a esta expresión no está definida claramente, pero podría ser necesaria para distinguir los

discos imaginales dorsales del tórax de los ventrales (Williams et al., 1991). Al final del segundo estadio larvario, después de la aparición de la restricción D/V, la expresión de *vg* dirigida por el *vg*-BE queda restringida al territorio que dará lugar al margen D/V del ala y del halterio (Klein and Martínez-Arias, 1999a; Williams et al., 1994). La expresión del *vg*-BE está regulada en el borde D/V por la actividad de las rutas de señalización de *Notch* (*N*) y *wg* (Kim et al., 1997; Kim et al., 1996; Klein and Martínez-Arias, 1999a; Prasad et al., 2003). La expresión de *vg* en el ala, desde el comienzo del tercer estadio larvario, se amplía fuera del margen D/V por la actividad del *vg*-QE (Kim et al., 1996; Klein and Martínez-Arias, 1999a). La expresión del *vg*-QE necesita la activación previa del *vg*-BE y está regulada por la actividad del propio *vg* (Kim et al., 1996; Klein and Martínez-Arias, 1999a; Prasad et al., 2003; Varadarajan and VijayRaghavan, 1999), *vvl* (Certel et al., 2000) y las rutas de señalización de *dpp*, *wg* y *N* (Kim et al., 1996; Klein and Martínez-Arias, 1999a; Prasad et al., 2003; Rodríguez del Álamo et al., 2004). La suma de los dos “enhancer” de regulación define el patrón de expresión completo de la proteína Vg dentro del ala (Fig. 6). La expresión de *vg* en el disco imaginal de halterio está restringida al margen D/V por la acción de *Ubx* (Prasad et al., 2003; Weatherbee et al., 1998). La represión de *vg* fuera de este territorio es necesaria para evitar su transformación hacia ala (Prasad et al., 2003).

Además de en los discos imaginales de ala y halterio, se ha constatado que *vg* se expresa y contribuye a la diferenciación específica de ciertas células en el sistema nervioso periférico y muscular durante el desarrollo larvario (Bernard et al., 2003; Srivastava and Bell, 2003; Zider et al., 1998).

1.3.2 Función de vestigial durante el desarrollo del ala

Desde el segundo estadio larvario, la función de *vg* es imprescindible para la especificación, supervivencia y proliferación celular de las partes distales del ala

(Delanoue et al., 2004; Delanoue et al., 2002; Halder et al., 1998; Kim et al., 1996; Liu et al., 2000; Van de Bor et al., 1999; Williams et al., 1991; Williams et al., 1994). Diferentes combinaciones heteroalélicas de falta de función de *vg* impiden el desarrollo de las partes distales del ala y, ocasionalmente, generan duplicaciones de tórax (Van de Bor et al., 1999; Williams et al., 1993). Estos fenotipos son el resultado de fallos en la **especificación** temprana del ala (segregación tórax-ala inadecuada) y muerte celular (Van de Bor et al., 1999; Williams and Bell, 1988) (Fig. 7A). Los estudios de sobreexpresión han mostrado su capacidad para inducir la expresión ectópica de marcadores genéticos característicos del “wing blade” fuera del ala (Halder et al., 1998; Paumard-Rigal et al., 1998), provocando la diferenciación cuticular característica del ala (Kim et al., 1996; Simmonds et al., 1998) (Fig. 7B). Estos resultados, por analogía con *ey*, han incluido a *vg* dentro de la categoría de “genes maestros o selectores de tejido” (Kim et al., 1996). Atendiendo a esa definición, *vg* debería ser capaz de iniciar y controlar el desarrollo completo del “wing blade” en cualquier situación.

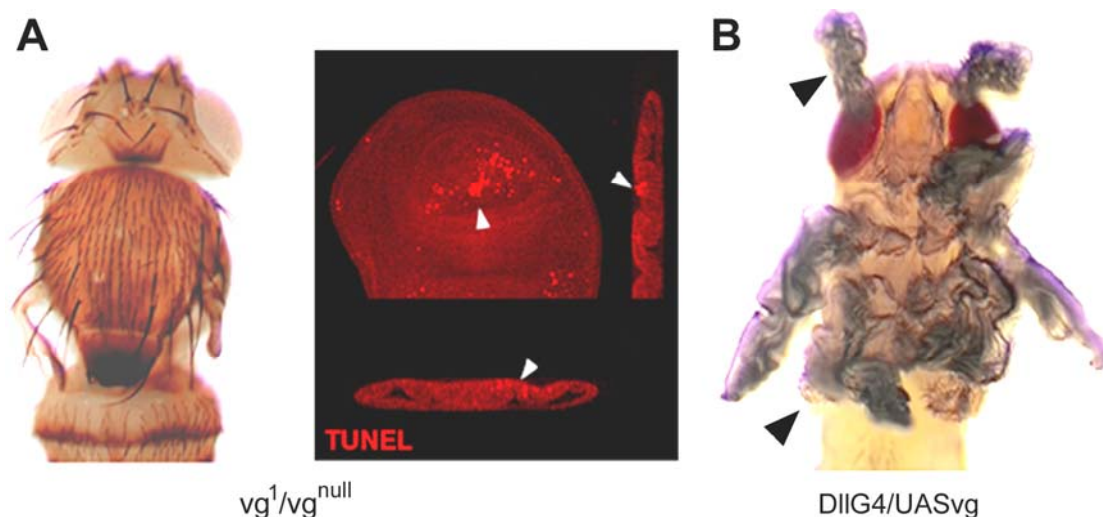


Figura 7. Efectos de la insuficiencia y la expresión ectópica de *vg*. (A) La falta de función de *vg* provoca una ablación de las partes distales del ala y muerte celular (células marcadas con TUNEL en rojo y señaladas con flechas blancas). (B) La expresión ectópica de *vg*, dirigida con *DII4*, produce transformaciones hacia tejido de ala en diferentes partes de la mosca.

Los clones morfogénéticos de falta de función para *vg* o *sd* apenas **prolifera**n en el ala y tienen un tiempo escaso de **supervivencia**, desapareciendo en las 48 horas posteriores a su iniciación (Kim et al., 1996; Liu et al., 2000). Al contrario que la falta de función de *vg*, la sobreexpresión *in vivo* o en células en cultivo tiene capacidad para promover proliferación celular, acelerando la transición de G1 a S (Delanoue et al., 2004). Los efectos de *vg* sobre la proliferación y la supervivencia celular se han atribuido a su capacidad para inducir la expresión de genes relacionados con ambos procesos. Así, se ha mostrado que la sobreexpresión de *Vg* mantiene la expresión de factores antiapoptóticos como DIAP-1 e incrementa la transcripción de diferentes genes reguladores del ciclo celular como *dE2F-1*, *RNR2*, *DHFR* o *stg* (Delanoue et al., 2004; Paddy et al., 1996; Silber et al., 1989; Zider et al., 1996). Estos resultados han llevado a sugerir que *Vg* es capaz de estimular la proliferación celular de forma constitutiva (Delanoue et al., 2004). Ahora bien, aunque son abundantes los datos que relacionan la expresión de *Vg* con el control de la proliferación y supervivencia celular, no están claras las bases mecánicas de dichas funciones biológicas y su conexión con el patrón de expresión endógeno del gen.

Los fenotipos de falta de función de *sd*, al igual que la falta de función de *vg*, elimina las partes distales del ala y del halterio reduciendo la tasa de proliferación e induciendo muerte celular (Campbell et al., 1992; Campbell et al., 1991; Liu et al., 2000). Sin embargo, la expresión ectópica de *sd* no es equivalente a la expresión ectópica de *vg*; no produce transformaciones de tejido ni sobrecrecimientos. Aún más, la expresión ectópica de *sd* provoca muerte celular en el ala (Liu et al., 2000). Estos resultados se han asociado a descompensaciones en la estequiometría de los complejos *Vg/Sd*, y un desplazamiento por parte de *Sd* de otros factores de transcripción (Liu et al., 2000; Simmonds et al., 1998).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los antecedentes sugieren que *vg* es uno de los pocos genes conocidos capaces de dirigir el programa de desarrollo de un órgano, participando en procesos esenciales para su desarrollo como la proliferación y la supervivencia celular. El **objetivo general** de la tesis ha sido profundizar, mediante la caracterización funcional del gen *vg* de *Drosophila*, en los mecanismos de especificación genética y control del crecimiento de un órgano.

La tesis tiene como **objetivos parciales**:

1. Evaluación de los mecanismos que determinan la **identidad diferencial** de un órgano. Análisis de la capacidad de *vg* para **iniciar y controlar** el desarrollo de las **partes distales del ala**, en el disco imaginal de ala y otras partes de la epidermis de la mosca. Para su resolución:

- Se realiza un estudio a lo largo del desarrollo larvario y pupal del patrón de expresión de *vg*.
- Se describen detalladamente las características genéticas e histotípicas de los tejidos transformados por la expresión ectópica de *vg*.
- Son evaluados los requerimientos genéticos y temporales del proceso de transformación.
- Son caracterizadas las referencias genéticas que *vg* genera o recluta para el desarrollo de tejidos transformados.

2. Aproximación a los mecanismos de **asignación posicional** que controlan el crecimiento de un órgano. Para ello se realiza el análisis funcional del patrón de expresión endógeno de *vg*; evaluando su relación con los procesos de **proliferación, supervivencia y distribución espacial** de las células en las partes distales del ala durante el desarrollo larvario y pupal. Para su resolución:

OBJETIVOS

- Se describe el efecto de la falta de función y sobreexpresión de *vg* en distintas partes del ala, analizando los efectos autónomos y no autónomos sobre la proliferación y supervivencia celular a lo largo de los ejes de crecimiento.
- Se definen los efectos de *vg* sobre el ciclo celular mediante FACS, análisis de marcadores moleculares del ciclo celular y cálculo de "cell doubling time".
- Se determina la implicación de *vg* en el control de la distribución espacial de las células en un órgano en desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Estirpes de moscas

Toda la información relativa a las estirpes de moscas utilizadas se encuentra en la dirección web: <http://www.flybase.bio.indiana.edu>; excepcionalmente, información más precisa de alguna estirpe se detalla en esta sección.

El mantenimiento de todas las estirpes y la ejecución de los experimentos se llevaron a cabo en medios de cultivo convencionales y en cámaras de temperatura regulable a 25 °C. Algunos experimentos fueron realizados a 17 ó 29 °C. En esos casos la temperatura se especifica convenientemente en los resultados del experimento.

3.1.1 Alelos mutantes

*vg*¹ / *Cyo*; *vg*^{null} / *Cyo*; *FRT*_{42D} *vg*^{null} / *Cyo*; *DfH99/TM3, Sb; yw; w, CyO / If, MKRS / TM6b*.

3.1.2 Líneas G4

El sistema G4/UAS (Brand and Perrimon, 1993) permite dirigir la sobreexpresión de genes en dominios completos de expresión génica (sobreexpresión territorial). La producción del activador transcripcional G4 está bajo el control de un promotor de choque térmico y, por tanto, la sobreexpresión de un gen puede controlarse, cuantitativa y cualitativamente (en el espacio y en el tiempo), modificando la temperatura de ejecución del experimento. Las líneas G4 utilizadas han sido *decapentaplegic-G4^{blk}* (*dppG4^{blk}*), *vestigial^{BE}-G4* (*vgG4*), *C253-G4* (*C253G4*), *patch-G4^{559.1}* (*ptcG4*), *engrailed-G4^{21A}* (*enG4*), *zfh2-G4^{MS209}* (*zfh2G4*), *scalloped-G4^{29.1}* (*sdG4*), *nubbin-G4* (*nubG4^K*), *596-G4*, *MZ980-G4*, *MZ984-G4*, *MS248-G4*, *C719-G4* y *30A-G4*. *spalt-G4^{EPV}* (*salG4^{EPV}*) y *dpp^{short vein}-G4* (*shvG4*) fueron cedidos por R. Barrio y J.F. de Celis, respectivamente. *Optomotorblind-G4^{md653}* (*Omb-G4*), *caudal-G4^{md509}* (*cadG4*), *teashirt-G4^{md621}* (*tshG4*), *Distalless-G4* (*DllG4^{md23}*), *apterous-G4*

(*apG4^{md544}*), *panier-G4^{MD237}* (*pnrG4*), *blistered-G4* (*BsG4*) fueron cedidos por Manolo Calleja.

3.1.3 Líneas UAS

La secuencia UAS es reconocida por la proteína G4 y permite la activación transcripcional de cualquier gen adyacente.

Las líneas UAS utilizadas han sido: UAS-*vg*, UAS-*vg^Z*; UAS-*wg^{ElI}*, UAS-*wg^{DN}* (forma dominante negativa), UAS-*Dll*, UAS-homothorax-GFP (UAS-*hth*-GFP), UAS-*nubbin* (UAS-*nub*), UAS-*sd*, UAS-*Delta* (UAS-*DI*), UAS-*Serrate* (UAS-*Ser*), UAS-*Notch_{intra}^{12.1}* (UAS-*N_{intra}^{12.1}*), UAS-*thickveins* constitutivamente activo (UAS-*tkv^{Q25}*) o dominante negativo (UAS-*tkv^{DN}*), UAS-*Ras^{V12}* forma constitutivamente activa, UAS-*Raf^{3.1DN}* dominante negativo, UAS-P35, UAS-*ap*, UAS-*fringe* (UAS-*fng*), UAS-GFP, UAS-*armadillo^{Δ13}* constitutivamente activo (UAS-*arm^{Δ13}*), UAS-*armadillo¹⁷* (UAS-*arm¹⁷*), UAS-GSK-3* constitutivamente activo (UAS-*GSK-3**) UAS-*CiclinaE* (UAS-*CycE*), UAS-*ciclinaDI/Cdk4* (UAS-*CycDI/Cdk4*), UAS-*string* (UAS-*stg*), UAS-*Ultrabithorax* (UAS-*Ubx*), UAS-*apterous* (UAS-*ap*), UAS-*puckered* (UAS-*puc^{2A}*).

3.1.4 Generación de líneas transgénicas. UASvg-RNAi

Para poder analizar la insuficiencia de *vg* de forma controlada en el espacio y en el tiempo, se ha realizado una línea UAS que expresa un RNA interferente (Elbashir et al., 2001; Yang et al., 2000; Zamore et al., 2000) para el gen. A partir de DNA genómico, se amplificaron por PCR 553 pares de bases, que incluyen el segundo exón completo para el gen. Los primers usados fueron:

5' AACCCAGGATTTGTACTCCTCCTCGG 3'

5' GCACGATGAGGTCCTCTTCTTTGG 3'

El producto amplificado fue clonado en el vector pST Blue-1 (Novagen), y extraído con la digestión de *BamHI*+*SacI* y *SphI*+*NotI*. El fragmento *BamHI*+*SacI* fue

subclonado en el vector pHIBS (Nagel et al., 2002), y posteriormente liberado con las enzimas *SphI* y *XhoI*. Los fragmentos *SphI-NotI* y *SphI-XhoI* fueron clonados en el vector pBluescript II SK+ (Stratagene). El inserto fue liberado con las enzimas *KpnI* y *NotI* y subclonado en el vector (w^+) pUAST (Brand and Perrimon, 1993). Para todas las ligaciones se empleó Ligasa T4 y se transformaron células *E. coli* de la estirpe XL-1 Blue, excepto en los clonajes en pBluescript y pUAST en los que se emplearon células SURE. Para generar moscas transgénicas portadoras de la construcción se realizaron puestas de 30 minutos de la estirpe *yw*. Los embriones recolectados se decorionaron durante 2 minutos con lejía al 50% y posteriormente se lavaron con agua. A continuación, los embriones se microinyectaron con 6 μ g de la construcción UAS junto con 1,6 μ g del vector pUC Δ 2-3 como fuente de transposasa. A las 48 horas se recogieron larvas que dieron lugar a moscas adultas que se cruzaron con moscas *y w*. De la progenie resultante se seleccionaron las moscas transformantes con fenotipo w^+ . Para generar líneas estables y discernir en qué cromosoma se había insertado la construcción UAS, se empleó la estirpe *w; CyO / If; MKRS / TM6b*. El resultado del proceso fue una inserción funcionalmente activa en el cromosoma III.

3.1.5 Líneas *lacZ* y *CD2* utilizadas

Las líneas *lac-Z* utilizadas han sido: *vg QE-lacZ*, *vg BE-lacZ*, *wg-lacZ*; *ap^{rk560}* (*ap-lacZ*), *sd^{ETX4}* (*sd-lacZ*), *tkv-lacZ*, *E(spl)m β -CD2*, *dpp-lacZ*, *Act<FRT> w⁺ <FRT>* *lac-Z*, *PCNA-GFP* (reportero de la actividad de *E2F-1*).

3.2 Tinciones Histológicas e Inmunohistoquímicas

Las tinciones inmunohistoquímicas, hibridaciones con sonda, detección de muerte celular mediante Tunel y los marcajes de proliferación celular con BrdU se

realizaron mediante protocolos convencionales para *Drosophila* (encontrar información en la página web de la profesora Laura Johnston)

http://cpmcnet.columbia.edu/dept/genetics/faculties/Johnston/Protocols_page.html

3.2.1 Anticuerpos

Todos los anticuerpos se incubaron en PBT 0,3%-BSA+NaCl (250mM). Los anticuerpos primarios usados fueron conejo anti-Dll y anti-Vg (1:20; cedido por S. Carroll); ratón anti-Wg (1:20; Hybridoma Bank); conejo anti-Hth (1:100; cedido por N. Azpiazu); ratón anti-Cut (Hybridoma Bank); ratón anti-Bs (1:500; cedido por M. Affolter); ratón anti-Nub (1:5; cedido por S. Cohen); ratón anti-En (1:10; Hybridoma Bank); rata anti-Ser (1:100; Hybridoma Bank); conejo anti-Iro (1:10; cedido por J. Modolell); ratón anti-Dl (1:20; Hybridoma Bank); conejo anti-Fat (1:1000 cedido por M. Simon); rata anti-Ds (1:1000 M. Simon); rata anti-Fj (1:1000 cedido por D Strutt); conejo anti-Diap1 (1:100 cedido por H. Steller); conejo anti-Defective proventriculus (1:1000 cedido por F. Matsuzaku); rata anti-tsh (1:50 cedido por S. Kerridge); rata anti-sal (1:50; cedido por Rosa Barrio); ratón anti-B-Tubulin (1:1000; Hybridoma Bank); rat anti-Zfh2 (1:100 cedido por S. Russell); rat anti-CD2 (1:100 cedido por J. F. de Celis); rat ratón anti-Armadillo (1:50; Hybridoma Bank); conejo anti-fosfohistona III (PH3) (1:500; Upstate Biotechnology); conejo anti-Caspasa III activada (1:50; Cell Signaling Technology); ratón anti-BrdU (1:1000 SIGMA); ratón anti-Patch (1:50; cedido por I. Guerrero) ratón o conejo anti B-gal (Promega). La detección se ha llevado a cabo con anticuerpos secundarios anti-conejo, ratón y rata (Alexa rojo, azul o verde 1:200; Jackson Immunological Laboratories). El marcaje de núcleos se realizó utilizando el agente intercalante de DNA Topro-3 (1:1000; Molecular Probes). Para el revelado de los marcajes de TUNEL se usó streptavidina-Texas-Red (1:50; Molecular Probes).

3.2.2 Sondas

Las sondas utilizadas fueron:

sonda de DNA anti-*string* (cedida por Sonsoles Campuzano)

ribosonda anti-*veinlet* (cedida por Sol Sotillos).

3.3 Microscopía y tratamiento de imágenes

3.3.1 Captura de imágenes en campo claro

Las preparaciones de cutículas adultas se realizaron en un medio de montaje compuesto por Ácido Láctico/Etanol (1:1). El medio de montaje utilizado en las hibridaciones con sonda de discos imaginales fue glicerol al 70%. Las imágenes se captaron con una cámara Spot digital acoplada a un microscopio Zeiss Axioplan.

También se han obtenido imágenes de moscas o tejidos adultos sin montaje previo. Para ello los tejidos de análisis se sumergieron en etanol absoluto en un pocillo de vidrio convencional. Las imágenes fueron captadas con la cámara de video SONY-IRIS (sscc370P) acoplada a la lupa LEICA (MZFLIII). El programa informático controlador de la cámara de video fue Metaview (Meta Imaging Corporation Plus).

En todos los casos el procesamiento de las imágenes se realizó con el programa Adobe Photoshop 7.0.

3.3.2 Captura de imágenes de Fluorescencia y Microscopía confocal

Todas las preparaciones para microscopía de fluorescencia fueron realizadas en el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Inc). Las imágenes de confocal fueron captadas usando el microscopio confocal de BioRad (Radiance 2000). Toda la información correspondiente a los tejidos analizados, en su visión de superficie y en profundidad, fue obtenida tomando una media de 40 planos consecutivos en el microscopio confocal. El procesamiento posterior de las imágenes se realizó con los

programas Confocal Assistant 4.0.2, Metaview (Meta Imaging Corporation Plus) y Adobe Photoshop 7.0.

3.4 Estudios de análisis clonal

Muchas de las mutaciones genéticas son letales para la viabilidad de un organismo, sin embargo, son viables a nivel celular. La incorporación de la técnica de análisis clonal permitió el análisis, con resolución celular, de mutaciones letales. El análisis clonal, mediante un proceso de recombinación mitótica, genera células homocigóticas para genes de interés (Blair, 2003). Adicionalmente, el análisis clonal evita los efectos cooperativos entre células, favorece el seguimiento espacio-temporal de células mutantes, y permite el estudio de los efectos autónomos y no autónomos en los procesos de proliferación celular, creación de patrón y reclutamiento celular.

3.4.1 Generación de clones de recombinación mitótica mediante Rayos X (Ashburner 1989)

La recombinación para generar los clones se indujo mediante Rayos X (5 1,000 R; 300 R/min, 100 kV, 15 mA, 2-mm aluminium filter; 1 R 5 0.258 mZCykg) en un aparato Muhler. Para realizar los clones de falta de función de *vg M⁺* en fondo *M* se usó la estirpe *f^{36a}; f^{+44A} f⁺⁵² M(2)^F / CyO*. La edad de irradiación para iniciar los clones fue 48-72h AEL.

3.4.2 Clones de recombinación mitótica mediante la técnica Flipasa-FRT (Chou y Perrimon 1992)

En este tipo de análisis clonal, la recombinación se induce con una alta frecuencia entre sitios de recombinación específica procedentes de levaduras (FRT) por una recombinasa denominada (Flipasa). Permite el análisis de clones morfogenéticos

clásicos y análisis de clones gemelos. La recombinación para generar los clones se indujo mediante choque térmico. Los viales fueron sumergidos en un baño de agua a 37 °C durante periodos de tiempo variables entre 45-60 minutos. El genotipo de larvas usadas para el análisis de falta de función para *vg* en fondo silvestre fue $w^{f^{36a}}$ *hs-FLP; FRT_{42D} P[UbiGFP]/FRT_{42D} vg^{null}*. Para realizar el análisis en un fondo *M* el genotipo usado fue $w^{f^{36a}}$ *hs-FLP; FRT_{42D} M(2)^f arm-lacZ / FRT_{42D} vg^{null}*. La edad de iniciación de los clones en ambos casos fue 48-72h y 72-96h AEL. Las larvas se diseccionaron excepcionalmente a las 24, 48 y 72h después de la generación de los clones, observando su desaparición del epitelio.

3.4.3 Clones de sobreexpresión mediante la técnica "Flip-out"

Combinando las técnica de recombinación mitótica mediante FLP-FRT con el sistema G4/UAS se pueden generar clones de células que sobreexpresan genes de interés. La recombinación para generar los clones se indujo mediante choque térmico. Los viales fueron sumergidos en un baño de agua a 37 °C durante periodos de tiempo variables entre 7-15 minutos.

Para realizar los clones en el disco imaginal se ha usado la estirpe *hs-FLP; P[Act <FRT> y⁺ <FRT> GAL4] UAS-GFP / CyO* (Ito et al., 1997). Para obtener clones de sobreexpresión marcados en el tejido adulto se ha usado la estirpe $w^{f^{36a}}$ *hsFLP1.22; P[abx/Ubx<FRT> f⁺ <FRT> GAL4] UAS-lacZ] /CyO* (de Celis and Bray, 1997). Las edades de inducción de la recombinación se especifican en cada experimento. Los genotipos de las larvas analizadas fueron:

hs-FLP, P[Act <FRT> y⁺ <FRT> GAL4] UAS-GFP / UAS-vg^K;

hs-FLP, P[Act <FRT> y⁺ <FRT> GAL4] UAS-GFP / UAS-wg^{EII}, UAS-vg^Z;

hs-FLP, P[Act <FRT> y⁺ <FRT> GAL4] UAS-GFP / UAS-wg^{EII};

hs-FLP, P[Act <FRT> y⁺ <FRT> GAL4] UAS-GFP / UAS-P35, UAS-vg^Z;

hs-FLP, P[Act <FRT> y⁺ <FRT> GAL4] UAS-GFP / +, UAS-vgRNAi;

y w^{f^{36a}}} hsFLP1.22; P[abx/Ubx<FRT> f⁺ <FRT> GAL4]UAS-lacZ] / UAS-vg^K;

$y w^{f^{36a}} hsFLP1.22; P[abx/Ubx<FRT> f^+ <FRT> GAL4]UAS-lacZ / +, UAS-vgRNAi;$

$y w^{f^{36a}} hsFLP1.22; P[abx/Ubx<FRT> f^+ <FRT> GAL4]UAS-lacZ/UAS-wg^{EII}, UAS-vg^Z;$

$y w^{f^{36a}} hsFLP1.22; P[abx/Ubx<FRT> f^+ <FRT> GAL4]UAS-lacZ/UAS-wg^{EII};$

3.4.4. Estudio de linaje celular en diferentes fondos silvestres y mutantes mediante "Flip-out"

El análisis de linaje celular es una variante de análisis clonal, que permite realizar un seguimiento del crecimiento de un tejido silvestre o mutante. La recombinación para generar los clones se indujo mediante choque térmico. Los viales fueron sumergidos en un baño de agua a 37 °C durante 8 minutos. La edad de inducción de la recombinación fue 48-72h AEL. Los genotipos de las larvas analizadas fueron:

$hs-FLP, apG4/ Act<FRT> w^+ <FRT> lac-Z, +;$

$hs-FLP, apG4/ Act<FRT> w^+ <FRT> lac-Z, UAS-vg^Z;$

$hs-FLP, salG4^{EPV}/ Act<FRT> w^+ <FRT> lac-Z, +;$

$hs-FLP, salG4^{EPV}/ Act<FRT> w^+ <FRT> lac-Z, UAS-vg^Z;$

$hs-FLP, nubG4^K/Act<FRT> w^+ <FRT> lac-Z, +;$

$hs-FLP, nubG4^K/Act<FRT> w^+ <FRT> lac-Z, UAS-vg^Z;$

3.4.5 Generación de clones gemelos de sobreexpresión mediante la técnica MARCM (Lee and Luo, 1999)

El análisis de clones gemelos permite comparar el crecimiento de células silvestres y mutantes en un fondo genético silvestre. La célula que sufre el evento de recombinación mitótica después de la mitosis genera dos células hijas que expresan marcadores celulares diferentes y permite seguir su crecimiento. La recombinación para generar los clones se indujo mediante choque térmico. Los viales, con larvas de los genotipos indicados, fueron sumergidos en un baño de agua a 37 °C durante 25 minutos. Los genotipos de las larvas analizadas fueron:

yw hs-FLP [Tub α 1G4]UAS-GFP, UAS-vg^K, FRT_{2A}[Tub α 1G80]/FRT_{2A} [UbiGFP];

yw hs-FLP [Tub α 1G4]UAS-GFP, +, FRT_{2A}[Tub α 1G80]/FRT_{2A} [UbiGFP];

La edad de generación de los clones fue 48-72 h AEL.

3.4.6 Generación de clones de sobreexpresión y falta de función simultáneamente mediante la técnica MARCM (Lee and Luo, 1999)

En la actualidad se puede observar el comportamiento de clones de células mutantes para un gen que simultáneamente sobreexpresan otro, mediante la técnica MARCM. La recombinación para generar los clones se indujo mediante choque térmico. Los viales fueron sumergidos en un baño de agua a 37 °C durante 25 minutos. La edad de iniciación de los clones fue 48-72h AEL. Los genotipos de las larvas analizadas fueron:

yw hs-FLP P[Tub α 1G4] UAS-GFP^{hls}, FRT_{42D} P[Tub α 1G80] / FRT_{42D} vg^{null} ;

*yw hs-FLP P[Tub α 1G4] UAS-GFP^{hls}, FRT_{42D} P[Tub α 1G80] / FRT_{42D} vg^{null} ,
UAS-P35;*

*yw hs-FLP P[Tub α 1G4] UAS-GFP^{hls}, FRT_{42D} P[Tub α 1G80] / FRT_{42D} vg^{null} ,
DfH99/+;*

*yw hs-FLP P[Tub α 1G4] UAS-GFP^{hls}, FRT_{42D} P[Tub α 1G80] / FRT_{42D} vg^{null} ,
UAS-*puc*^{2A};*

3.5 Cálculo de la densidad celular en el ala, discos imaginales y cutículas adultas

El tamaño de un órgano puede alterarse modificando el tamaño de sus células y, por tanto, la estimación del tamaño celular es un parámetro que debe definirse al estudiar el crecimiento de cualquier órgano. En la tesis se ha estimado el tamaño celular en distintos momentos del desarrollo, para diferentes condiciones mutantes.

3.5.1 Estimación del tamaño celular en el ala adulta

Para estimar el tamaño celular en alas adultas, se fotografiaron 15 alas correspondientes a diferentes genotipos $salG4^{EP}/UAS-vg^K$, $UAS-GFP$; $salG4^{EP}/+$, $UAS-GFP$; $BsG4/+$; $BsG4/+$, $UASvg-RNAi$. Posteriormente en cada genotipo, se cuantificó el número de células contenidas en un área constante de la región C del ala. La definición del área de estudio y el conteo de células se realizó ayudándose del programa Adobe Photoshop 7.0. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa SPSS 12.0.1. Para realizar la representación gráfica de los datos se usó el programa Microsoft Excel 2003.

3.5.2 Estimación del tamaño celular en discos imaginales

La estimación del tamaño celular en discos imaginales se puede realizar de forma automática mediante análisis de FACS o por cuantificación directa. Para la cuantificación directa se tomaron imágenes, mediante microscopía confocal, de 20 discos imaginales de los genotipos $enG4$, $UAS-GFP /UAS-vg^K$; $enG4$, $UAS-GFP /+$; $enG4$, $UAS-GFP / UASvg-RNAi$. Después se estimó el tamaño celular en el “wing blade”. Para poder visualizar las células y cuantificarlas se marcó su DNA con TOPRO-3 y el contorno celular con Arm. A continuación se cuantificó, en los diferentes genotipos, el número de células contenidas en un área constante del plano más apical del “wing blade”. La definición del área de estudio y el conteo de células se realizó ayudándose del programa Adobe Photoshop 7.0. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa SPSS 12.0.1. Para realizar la representación gráfica de los datos se usó el programa Microsoft Excel 2003.

3.6 Cálculo de áreas y distancias en el tejido de ala adulto

Para estimar el área y determinadas distancias en el tejido adulto de ala, se fotografiaron 15 alas correspondientes a diferentes genotipos:

salG4^{EP}/UAS-vg^K;

salG4^{EP}/+;

salG4^{EP}/UAS-vg^K, DfH99/+;

salG4^{EP}/UAS-vg^K, UAS-puc^{2A}/+;

salG4^{EP}/UAS-vg^K, UAS-hpo^{DN}/+;

salG4^{EP}/UAS-CycE, UAS-vg^Z/+;

salG4^{EP}/UAS-vg^K, UAS-stg/+;

Posteriormente en cada genotipo, se midió el área y las distancias indicadas en la Figura. 32. ayudándose del programa Imagen 3.2. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa SPSS 12.0.1. Para realizar la representación gráfica de los datos se usó el programa Microsoft Excel 2003.

3.7 Parametrización de clones gemelos de sobreexpresión

La localización topológica de los clones en el ala fue determinada tomando como referencias los dominios de expresión génica de *ptc* y *wg*. Posteriormente se trazó el perímetro de clones individuales calculando su área, perímetro, circularidad y centroide con el programa ImageJ 3.2. También se ha medido la distancia más corta desde el centroide de cada clon al borde D/V, A/P y punto de cruce entre ambos ejes (Fig. 8A). Independientemente, se ha medido la longitud del borde A/P y D/V del ala que queda comprendido dentro de la expresión correspondiente al anillo interno de Wg. Para normalizar las variaciones de tamaño y distancias de cada disco, consideramos el área relativa (área de cada clon/área del tejido de ala comprendido dentro del anillo interno de Wg) y las distancias relativas (distancia de cada clon al borde D/V o A/P/longitud del borde A/P y D/V) para cada clon. La escala logarítmica fue elegida para comparar las medidas correspondientes a los clones mutantes y a los clones gemelos silvestres.

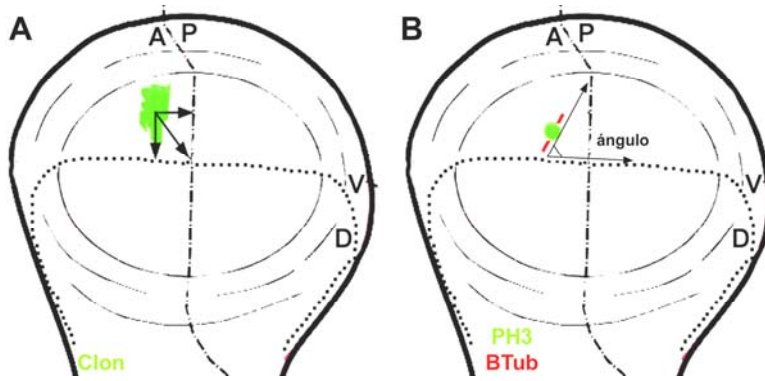


Figura 8. Medidas tomadas para realizar la parametrización de clones de sobreexpresión de *vg* (A); determinación de la orientación de la división celular (B). (A) Se ha determinado el área y las distancias (flechas negras) a los bordes de referencia indicados, que tienen clones silvestres y sus twines asociados o clones de sobreexpresión de *vg* y sus twines. (B) La orientación de la división celular se puede determinar midiendo el ángulo que forma la recta que une los “spindles” (marcados con B-tubulina, B-tub) de una célula en división (marcada con fosfo-histona 3, PH3) respecto al borde D/V del ala.

Al menos se realizaron dos experimentos independientes por genotipo, en los que se tomaron muestras de un mínimo de 25 discos. Los genotipos de los experimentos se describen en el punto 8.4.5 de la tesis. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa SPSS 12.0.1. Para realizar la representación gráfica de los datos se usó el programa Microsoft Excel 2003.

3.8 Cálculo de la densidad de división celular en discos imaginales

En primer lugar se calculó el área de los territorios de interés usando el programa ImageJ 3.2. Después normalizamos las medidas de área, considerando el área relativa de dichos territorios (área del territorio de interés/valor medio del área de todos los territorios analizados). Los territorios analizados en diferentes experimentos fueron el dominio de expresión de *dpp* y la región del ala incluida dentro del anillo interno de Wg. La densidad de división celular en dichos territorios fue obtenida dividiendo el número de mitosis (marcadas con PH3) entre el área relativa de los

territorios analizados. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa SPSS 12.0.1. Para realizar la representación gráfica de los datos se usó el programa Microsoft Excel 2003. Los genotipos analizados fueron:

apG4^{md544}/UAS-vg^K, UAS-GFP;

apG4^{md544}/+, UAS-GFP;

UAS-vg^K/+, dppG4^{blk}/UAS-GFP;

+, dppG4^{blk}/UAS-GFP;

3.9 Análisis de Citometría de Flujo y cálculo de “Cell Doubling Time” en discos imaginales

Mediante estas técnicas es posible conocer el efecto de una condición mutante sobre la progresión de los diferentes pasos del ciclo celular (“análisis de FACS”) y sobre la longitud general del mismo (“cell doubling time”) (Johnston and Sanders, 2003; Neufeld et al., 1998). También permite definir el tamaño y la complejidad de diferentes poblaciones celulares.

3.9.1 Análisis de FACS

Se realizó siguiendo el protocolo convencional de disociación de células de discos imaginales (30-40 discos por experimento) (Neufeld et al., 1998). La toma de muestras se llevó a cabo en un equipo FACS Vantage 2 (Becton Dickinson, San Jose, CA). Al menos tres experimentos independientes se realizaron por genotipo, obteniendo los perfiles de ciclo celular en cada experimento con poblaciones de más 10.000 células. La temperatura de ejecución de todos los experimentos fue de cultivo de a 25°C. Las edades de disección fueron 72-96 y 96-120 h AEL. Los perfiles de ciclo celular y los análisis de las poblaciones celulares se realizaron con el programa WIN.MDI 2.8. Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular se obtuvieron con el programa Modfit. La significación estadística de los datos se determinó con el programa SPSS 12.0.1. Los genotipos analizados fueron:

apG4^{md544}/UAS-vg^K, UAS-GFP;

apG4^{md544}/+, UAS-GFP;

salG4^{EP}/UAS-vg^K, UAS-GFP;

salG4^{EP}/+, UAS-GFP;

DIIG4^{md23}/UAS-vg^K, UAS-GFP;

DIIG4^{md23}/+, UAS-GFP;

DIIG4^{md23}/+, UAS-GFP/UASvg-RNAi

3.9.2 Cálculo de "Cell Doubling Time"

Esta técnica permite hacer una estimación del tiempo que tarda una célula en dividirse, o lo que es lo mismo, permite determinar la longitud total del ciclo celular. Para ello se calculó el número medio de células que tienen diferentes clones de sobreexpresión transcurridas 48-72h desde su generación. Después el "cell doubling time" se obtiene con la fórmula $\log_2(N)/\log_2(Z)$; siendo (N) el número de horas transcurridas desde la generación del clon y (Z) la media de células por clon (Johnston and Sanders, 2003). Los genotipos usados en los experimentos fueron:

yw hs-FLP [Tub α 1G4]UAS-GFP, UAS-vg^K, FRT_{2A}[Tub α 1G80]/FRT_{2A} [UbiGFP];

yw hs-FLP [Tub α 1G4]UAS-GFP, +, FRT_{2A}[Tub α 1G80]/FRT_{2A} [UbiGFP];

hs-FLP, P[Act <FRT> y⁺ <FRT> GAL4] UAS-GFP / +;

hs-FLP, P[Act <FRT> y⁺ <FRT> GAL4] UAS-GFP / +, UASvg-RNAi;

El cálculo del "cell doubling time" en clones de sobreexpresión para el RNAi de *vg* se realizó a 29°. Al menos se analizaron 50 clones por cada genotipo. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa SPSS 12.0.1. Para realizar la representación gráfica de los datos se usó el programa Microsoft Excel 2003.

3.10 Determinación de la orientación de la división celular en discos imaginales

La orientación de la división celular, respecto a referencias invariantes en los discos imaginales, puede definirse mediante un doble marcaje inmunohistoquímico

con B-tubulina (B-tubulin) y PH3. La referencia invariante considerada en el disco imaginal es el borde D/V. Todos los discos imaginales se han orientado respecto a esa referencia y, posteriormente, se ha determinado el ángulo que forma el huso mitótico respecto al borde D/V (Fig. 8B). Los genotipos analizados fueron $nubG4^K/UAS-vg^K$, $UAS-GFP$ y $nubG4^K/+$, $UAS-GFP$. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa SPSS 12.0.1. Para realizar la representación gráfica de los datos se usó el programa Microsoft Excel 2003.

***RESULTADOS.
IDENTIDAD***

4. RESULTADOS

4.1 PATRÓN DE EXPRESIÓN DE VESTIGIAL DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO Y PUPAL

El trabajo experimental comienza definiendo el patrón de expresión silvestre de *vg* durante el desarrollo imaginal y pupal (Fig. 9).

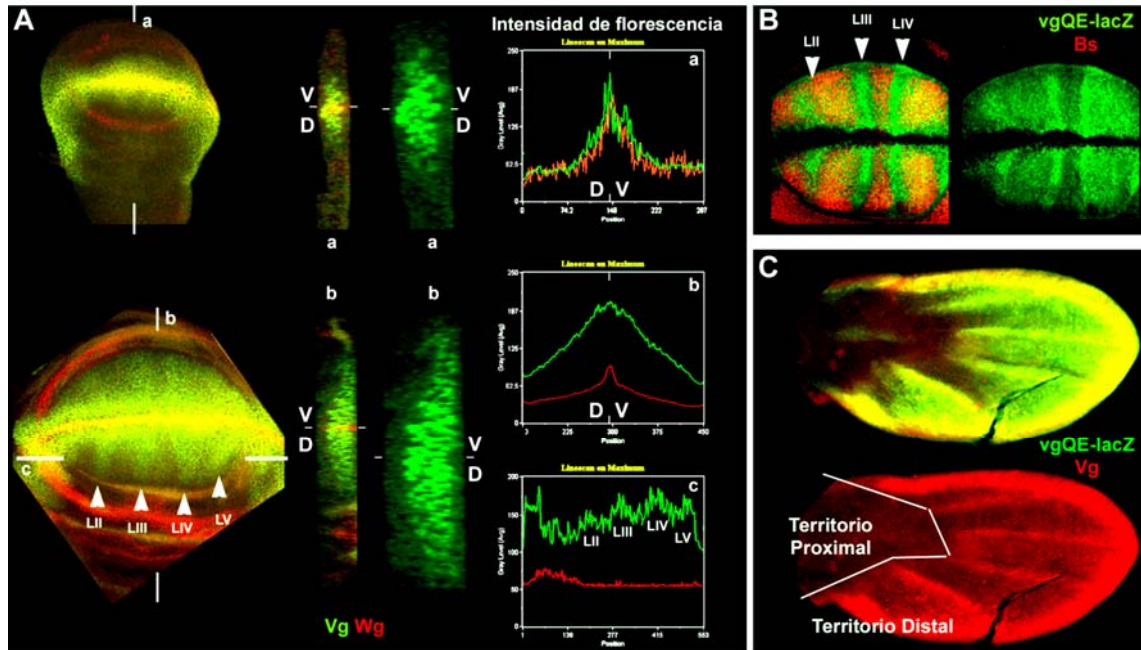


Figura 9. Patrón de expresión de *vg* durante el desarrollo larvario y pupal del ala. (A) Después de la formación de la restricción dorso-ventral en el ala, Vg (verde) muestra un patrón de expresión heterogéneo y restringido a las partes distales del ala (expresión de Wg en rojo). (A) La expresión de Vg (verde) forma un gradiente de concentración decreciente a ambos lados del margen D/V (cortes en el eje Z a y b). (A, B) Desde la mitad del tercer estadio larvario la expresión de Vg o *vgQE-lacZ* (verde) también es heterogénea en el eje de crecimiento (A/P), observándose una mayor concentración de proteína (verde) sobre los presuntivos territorios de vena (flechas blancas y numeración de LII-LV, corte en el eje Z c) (Bs rojo en B). (C) Las heterogeneidades del patrón de expresión de Vg se conservan durante el desarrollo pupal; Vg (rojo) y *vgQE-lacZ* (verde).

La expresión de Vg está restringida a las partes distales del ala desde fases tempranas del desarrollo larvario (larva II) (Williams et al., 1991) y se distribuye de forma heterogénea a lo largo de los ejes de crecimiento próximo-distal (P/D) (Williams et al., 1994) y anterior-posterior (A/P). En el eje P/D, Vg se expresa

formando un gradiente de concentración simétrico a ambos lados del margen D/V (Fig. 9A). Los niveles máximos del gradiente de concentración se localizan en el margen del ala y los niveles mínimos en las zonas más alejadas de éste (Fig. 9A). En el eje A/P desde fases tempranas del tercer estadio larvario, se observa más cantidad de Vg sobre los presuntivos territorios de vena que en los de intervena (Fig. 9A, B). Las diferencias de concentración de proteína Vg en el eje A/P son más notables si se revela su patrón de expresión utilizando la secuencia reguladora correspondiente al enhancer del cuadrante (*vg*-QE) (Fig. 9B). La expresión diferencial de Vg en el eje A/P y P/D se mantiene a lo largo del desarrollo pupal (Fig. 9C).

4.2 EXPRESIÓN DE VESTIGIAL. IDENTIDAD ALA

La expresión restringida de *vg* se ha asociado a la especificación genética diferencial del ala respecto a otros tejidos. En este bloque de resultados se evalúa el papel de *vg* en el control de la identidad del ala. También se analizan las interacciones necesarias entre *vg* y otros genes para iniciar el programa de desarrollo del ala.

4.2.1 La expresión ectópica de vestigial es imprescindible pero insuficiente para promover el desarrollo completo de las partes distales del ala

La expresión ectópica de *vg* en dominios de expresión génica G4 ha permitido determinar 1) algunos de los requerimientos del proceso de transformación de tejido mediado por *vg*, 2) describir genética e histotípicamente los tejidos transformados y 3) evaluar las referencias genéticas que *vg* genera o recluta del tejido de fondo para iniciar el proceso de transformación.

4.2.1.1 Descripción detallada de los fenotipos máximos de transformación

La expresión ectópica de *vg* sólo induce transformaciones cuando está dirigida por determinadas líneas G4 como *ptcG4* (Paumard-Rigal et al., 1998; Simmonds et al., 1998), *dppG4* (Kim et al., 1996; Klein and Martínez-Arias, 1998; Klein and Martínez-Arias, 1999b) o *DllG4* (Halder et al., 1998; Weatherbee et al., 1998) (Tabla. 1). Los fenotipos más claros y completos de transformación han sido obtenidos dirigiendo la expresión ectópica de *vg* con *DllG4* a 25°. La expresión ectópica *vg* dirigida con *DllG4* transforma, autónomamente hacia tejido de “wing blade”, los territorios de expresión *Dll* en la antena, probóscide, los dos primeros pares de patas y estructuras de la analia-genitalia (Fig. 10A, C). A diferencia de los dos primeros pares de patas, el tercer par de patas adquiere características histotípicas y genéticas específicas de halterio (Fig. 10A, A5) (Halder et al., 1998; Weatherbee et al., 1998).

Los dos primeros pares de patas diferencian tricomas con longitud y grosor equivalente a los de las partes distales del ala (Fig. 10A); elementos sensoriales comparables a los del margen del ala, con especificación A/P y D/V definida (Fig. 10 A2, A3, A4); venas corrugadas (15 / 77 total patas transformadas) y sensilas dorsales (25 / 77) equivalentes a las del ala silvestre (Fig. 10A3). Los discos imaginales transformados expresan marcadores genéticos característicos del ala (*wg*, *cut (ct)* y el *vg-QE*), cuya disposición coincide con la que se observa en el ala silvestre (Fig. 11A, B). Los territorios anteriores y posteriores están correlacionados con la expresión y localización normal de *en* (Fig. 11C).

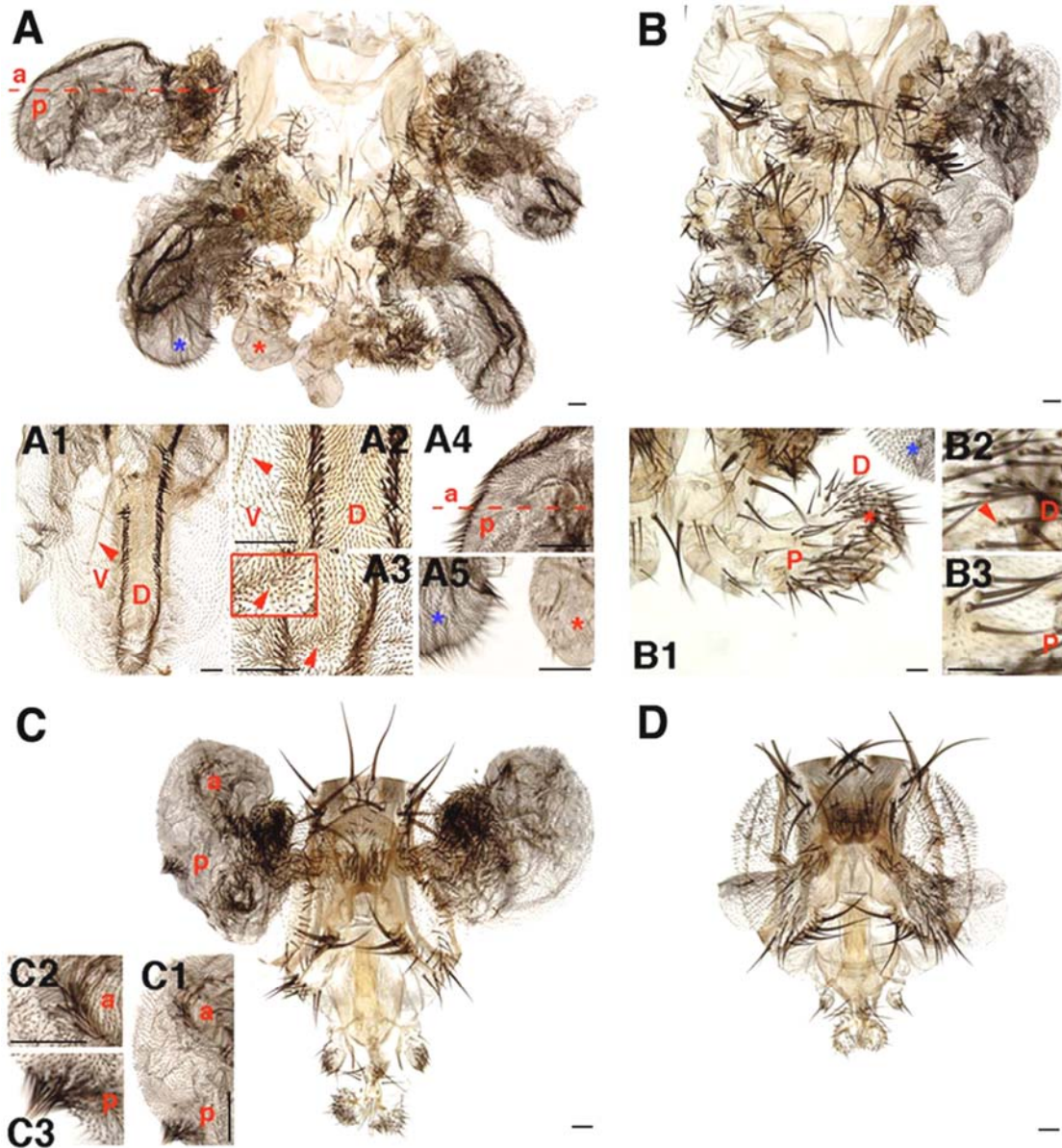


Figura 10. Transformaciones en el adulto de pata y antena en tejido de ala provocadas por la expresión ectópica de *vg*, dirigida con *DIIG4*. (A, B) Los dos primeros pares de patas y la antena están transformados hacia tejido de ala al dirigir la expresión ectópica de *vg* con *DIIG4*. (B-D) Los fenotipos de transformación y la extensión de los territorios transformados se reduce si se sobreexpresa *vg* y una construcción dominante negativa de *Wg*, de forma conjunta, con *DIIG4*. (A1, A2, A4, C1, C2, C3) Los tejidos transformados en la pata y en la antena diferencian bordes de ala con un patrón dorso-ventral y antero-posterior como el del ala silvestre. (A1, A3) También diferencian venas y sensilas. (A4) El tercer par de patas se transforma hacia tejido de halterio (el asterisco azul indica el tejido transformado en ala mientras el asterisco rojo indica el tejido transformado en halterio). (B1-B3) El tercer par de patas no se transforma hacia halterio si se co-expresa *vg* y una forma dominante negativa de *Wg*; estructuras distales (D) con identidad de pata (B2) aparecen a continuación de estructuras proximales (P) (B3).

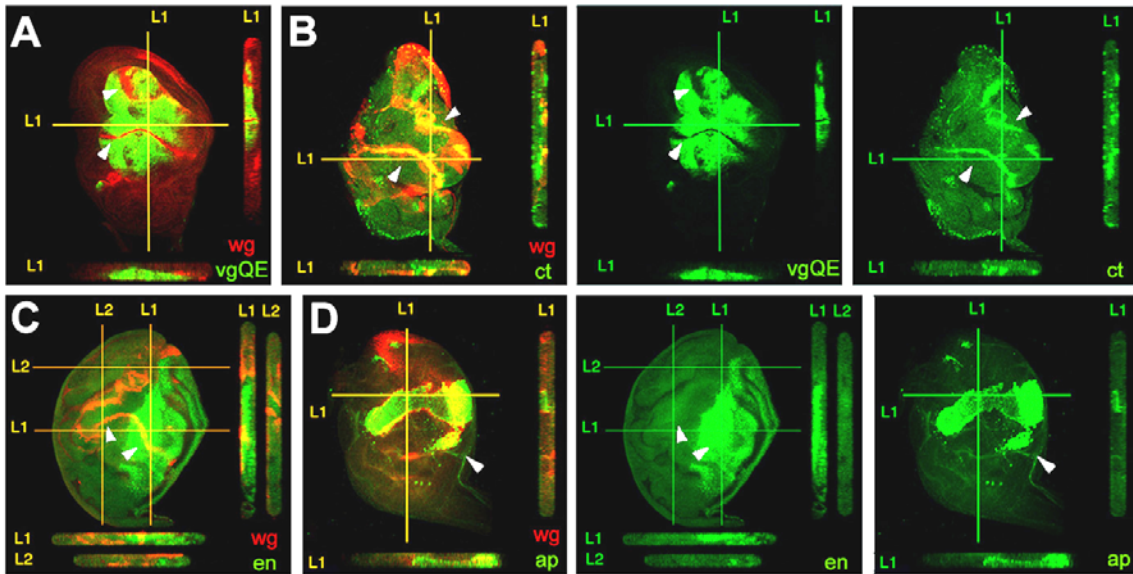


Figura 11. Expresión genética en discos imaginales de patas transformadas en ala por la expresión ectópica de *vg*, dirigida con *DII4*. (A) Todo el dominio de expresión de *DII4* expresa como marcador de transformación en tejido de ala el *vgQE* (verde), excepto aquellas zonas diferenciadas como margen de ala (expresan altos niveles de *Wg* (rojo) y están indicadas con flechas blancas). (B) Los márgenes de ala ectópicos (*Wg* en rojo), al igual que en el ala, expresan altos niveles de *Ct* (verde). (C) La expresión de *En* (rojo) es normal en las patas transformadas. (D) La expresión de *ap* (verde) está comprendida entre los márgenes de ala ectópicos (*Wg* en rojo). (D) A diferencia de *en* la expresión de *ap* está expandida en la superficie ventral de la pata y reducida en la superficie dorsal (indicado con una punta de flecha blanca).

La aparición de superficies dorsales y ventrales está correlacionada con la expresión diferencial del gen *ap* (Fig. 11D). A diferencia de *en*, el dominio de expresión normal de *ap* se expande en la superficie ventral de la pata transformada y disminuye en la superficie dorsal (Fig. 11D). La represión dorsal de *ap* en la pata no es completa en todos los casos y ocasionalmente se observan restos de su expresión anular (Fig. 11D). La identidad como tejido de ala de los tejidos transformados está correlacionada con la aparición de marcadores genéticos característicos de las partes distales del ala como *spalt* (*sal*) (Halder et al., 1998; Weatherbee et al., 1998) o *vgQE*. Las transformaciones tienen siempre un carácter autónomo, tal y como demuestra, la expresión restringida de los marcadores genéticos utilizados al dominio DII. La transformación del tercer par de patas está corregida hacia tejido de

halterio por la expresión de *Ultrabithorax (Ubx)* (no mostrado) (Halder et al., 1998; Weatherbee et al., 1998) (Fig. 10A5). La transformación hacia tejido de halterio impide la expresión de algunos marcadores característicos de “wing blade” como por ejemplo *vgQE* (no mostrado) o *sal* (Weatherbee et al., 1998), aunque no varía la expresión de *en* y *ap* (no mostrado).

A diferencia de los G4 que al dirigir ectópicamente *vg* producen transformaciones, otros G4 sólo provocan perturbaciones tejido-específicas sin modificar las características histotípicas del tejido silvestre (Tabla. 1, Fig. 12). La existencia de condiciones experimentales en las que no se producen transformaciones, impide incluir a *vg* en la categoría de “genes maestros” (Kim et al., 1996). Además sugiere que *vg* sólo promueve el proceso de transformación en combinación con otros factores genéticos adicionales.

4.2.1.2 Análisis experimental y genético de factores que podrían influir en el proceso de transformación

La ausencia de transformación en determinados territorios, al dirigir ectópicamente *vg*, ha motivado la búsqueda de otros factores que podrían influir en el proceso de transformación.

Para identificar nuevos factores genéticos que podrían colaborar en el proceso de transformación, se han sobreexpresado junto con *vg* genes que afectan a diferentes procesos, utilizando la expresión de *vgG4* en el ojo (Fig. 12C, 13A). De todas las interacciones realizadas (ver Tabla. 2) la sobreexpresión conjunta *wg-vg* es la única que produce transformaciones (Fig. 13).

Tabla 1.

Resumen de fenotipos obtenidos al dirigir la sobreexpresión de *vg* con diferentes G4 y en distintas condiciones experimentales. El guión indica que el experimento no se ha llevado a cabo.

Sobreexpresiones con G4					
Descripción de la expresión G4	G4	UAS	Temperatura		
			17 °C	25 °C	29 °C
G4 con expresión en el "wing blade"	<i>C719G4</i>	UAS- <i>vg</i>	-	Letal en pupa temprana	-
	<i>bsG4</i>	UAS- <i>vg</i>	-	Expansión territorios vena	Igual que a 25°
	<i>sdG4</i>	UAS- <i>vg</i>	Letal embrionario	Letal embrionario	-
		UAS- <i>vg</i> ; UAS- <i>sd</i>	Letal embrionario	Letal embrionario	-
	<i>DIIG4</i>	UAS- <i>vg</i>	Transformación hacia ala de patas, antena, analia.	Igual que a 17°	Igual que a 17°
		UAS- <i>vg</i> ; UAS- <i>vg</i>	Igual que el UASvg a 17°	Igual que el UAS- <i>vg</i> a 17°	-
		UAS- <i>vg</i> ; UAS- <i>sd</i>	Igual que el UASvg a 17°	Igual que el UAS- <i>vg</i> a 17°	-
		UAS- <i>vg</i> ; UAS- <i>wg</i>	Letal embrionario.	Letal embrionario.	-
		UAS- <i>vg</i> ; UAS- <i>wg^{DN}</i>	Transformaciones en antena y pata hacia tejido de ala de menor tamaño que con <i>vg</i> sólo.	Letal larva III	-
		UAS- <i>Ni^{12.1}</i>	Letal larva III media.	-	-
		UAS- <i>vg</i> ; UAS- <i>Ni^{12.1}</i>	Letal larva III media.	-	-
		UAS- <i>ap</i>	-	Letal larva III media-tardía.	-
		UAS- <i>vg</i> ; UAS- <i>ap</i>	-	Letal larva III media-tardía.	-
		UAS- <i>Hth</i>	-	Letal larvario temprano	-
		UAS- <i>vg</i> ; UAS- <i>Hth</i>	-	Letal larvario temprano.	-
		UAS- <i>Dll</i>	-	Fenotipo wt	-
		UAS- <i>Dll</i> ; UAS- <i>vg</i>	-	Letal larva temprana	-
	UAS- <i>Ubx</i>	Letal embrionario.	-	-	
	<i>enG4</i>	UAS- <i>vg</i>	-	Letal en pupa temprana	-

RESULTADOS. IDENTIDAD

Sobrexpresiones con G4					
Descripción de la expresión G4	G4	UAS	Temperatura		
			17 °C	25 °C	29 °C
G4 con expresión en el "wing blade"	<i>apGal4</i>	UAS- <i>vg</i>	-	Letal en pupa tardía. Reducción del compartimento dorsal, engrosamiento de venas y reducción del notum. Aumento del número de elementos sensoriales del notum	
		UAS- <i>vg</i> ; UAS- <i>wg</i>	-	Letal larva temprana	-
	<i>dppG4</i>	UAS- <i>vg</i>	Letal en pupa tardía. Transformaciones de pequeño tamaño en las patas, ojo y antena.	Letal larva III tardía.	-
		UAS- <i>vg</i> ; UAS- <i>wg</i>	Letal en pupa tardía. Transformaciones de mayor tamaño en las patas, ojo y antena que con <i>vg</i> sólo.	Letal en larva III tardía.	-
	<i>ptchG4</i>	UAS- <i>vg</i>	Letal en pupa tardía. Transformaciones las patas, ojo y antena.	Letal larva III tardía.	-
	G4 con expresión en las zonas proximales del ala	<i>30.AG4</i>	UAS- <i>vg</i>	-	Sobrecrecimiento del hinge. Tejido con características de wing blade y engrosamiento de venas.
<i>Zfh2G4</i>		UAS- <i>vg</i>	-	Sobrecrecimiento del hinge	-
<i>OmbG4</i>		UAS- <i>vg</i>	Letal embrionario	-	-
<i>tshG4</i>		UAS- <i>vg</i>	Letal larva III temprana.	-	-

Sobrexpresiones con G4					
Descripción de la expresión G4	G4	UAS	Temperatura		
			17 °C	25 °C	29 °C
G4 con expresión en el notum	<i>MS248-G4</i>	<i>UAS-vg</i>	Letal embrionario		-
	<i>Mz980-G4</i>	<i>UAS-vg</i>	-	Ausencia de scutellum y problemas débiles de cierre dorsal .	-
		<i>UAS-vg; UAS-sd</i>	Fenotipo WT	Letal larva temprana	-
		<i>UAS-vg; UAS-wg</i>	Letal embrionario	-	-
	<i>pnr-G4</i>	<i>UAS-vg</i>	Problemas de cierre dorsal en la cabeza, torax, abdomen. Tamaño del notum menor de lo normal con más elementos sensoriales de los normales.	Igual que a 17°	-
		<i>UAS-vg; UAS-vg</i>	Igual que el <i>UAS-vg</i> a 17°	Igual que el <i>UAS-vg</i> a 17°	-
		<i>UAS-vg; UAS-wg</i>	Letal en pupa temprana.	Letal larva III temprana.	-
		<i>UAS-vg; UAS-sd</i>	Letal en pupa temprana.	-	-
	<i>C253-G4</i>	<i>UAS-vg</i>	-	Duplicación de quetas dorsocentrales	-
		<i>UAS-vg; UAS-wg</i>	-	Duplicación de quetas	-

Tabla 2.

Sobrexpresiones dirigidas con *vgG4*, hipótesis analizadas y fenotipos obtenidos. El guión indica que el experimento no se ha llevado a cabo y las comillas que se obtuvo el mismo resultado que el caso inmediatamente superior.

Sobrexpresiones con <i>vg-G4</i>				
Hipótesis	UAS	Temperatura		
		17 °C	25 °C	29 °C
Cantidad de proteína <i>vg</i>	<i>UAS-vg</i>	Fenotipo WT	Fenotipo WT	Fenotipo WT
	<i>UAS-vg; UAS-vg</i>	Fenotipo WT	Produce cortes en el margen del ala. Ojo WT.	Fenotipo WT
Estequiometría <i>vg-sd</i>	<i>UAS-sd</i>	"	Los fenotipos fuertes son equivalentes a un <i>vg</i> -. Fenotipos más débiles tienen cortes de gran tamaño en el margen del ala. Ojo WT.	-
	<i>UAS-vg; UAS-sd</i>	Fenotipo WT	Alas con el crecimiento rescatado parcialmente que falta cuando se sobrepresa sólo <i>sd</i> , pero con el eje proximo-distal acortado. Ojo WT.	Fenotipo WT
	<i>UAS-wg</i>	"	Sobrecrecimiento del wing hinge, y problemas de polaridad en el ojo.	-

Sobrexpresiones con vg-G4				
Hipótesis	UAS	Temperatura		
		17 °C	25 °C	29 °C
Interacción con genes que intervienen en múltiples procesos de desarrollo	UAS-vg; UAS-wg	“	Sobrecrecimientos en el ojo con características de tejido de ala. Fenotipo del ala es como <i>wg</i> sólo.	-
	UAS- <i>arm</i> ^{Δ13}	“	Fenotipo WT	= 25°
	UAS-vg; UAS- <i>arm</i> ^{Δ13}	“	Alas acortadas en el eje P/D. Ojo wt.	Letal
	UAS- <i>arm</i> ¹⁷	“	Fenotipo WT	= 25°
	UAS-vg; UAS- <i>arm</i> ¹⁷	“	Fenotipo WT	= 25°
	UAS- <i>Ni</i> ^{12.1}	“	Ojo sobrecrecido ligeramente	-
	UAS-vg; UAS- <i>Ni</i> ^{12.1}	“	“	-
	UAS- <i>Ser</i>	“	Produce cortes en el alula y margen del ala	-
	UAS- <i>Ser</i> ; UAS-vg	“	Produce cortes en el margen del ala. Ojo WT.	-
	UAS- <i>DI</i>	“	Sobrecrecimiento del blade y formación de bordes de ala ectópicos. Ojo ligeramente sobrecrecido.	-
	UAS- <i>DI</i> ; UAS-vg	“	“	-
	UAS- <i>tkv</i> ^{Q25D}	“	Acortamiento en el eje P/D del ala. Engrosamiento de venas. Superficies del ala mal apuestas. Sobrecrecimiento del wing hinge. Ojo WT.	-
	UAS-vg; UAS- <i>tkv</i> ^{Q25D}	“	Sobrecrecimientos del wing hinge. Superficies del ala mal apuestas.	-
	UAS- <i>Ras</i> ^{v12}	“	Provoca cortes en el borde del ala. Ojo WT.	-
	UAS-vg; UAS- <i>Ras</i> ^{v12}	“	“	-
Interacción con genes que intervienen en la definición del eje proximo distal de los apéndices	UAS-vg; UAS- <i>Dll</i>	“	Fenotipo WT.	-
	UAS- <i>nub</i>	“	Alas que presentan el eje P/D acortado. Ojo WT.	-
	UAS-vg; UAS- <i>nub</i>	“	Alas que tiene rescatado parte del acortamiento en el eje proximo-distal que se produce al sobreexpresar <i>nub</i> sólo. OjoWT.	-
	UAS- <i>Hth</i>	“	Alas acortadas en el eje P/D y con problemas de diferenciación de vena distal. Ojo WT.	-
	UAS-vg; UAS- <i>Hth</i>	“	Rescate de la proximalización del ala y rescate parcial del wing blade. Ojo WT	-
Interacción con genes necesarios para el establecimiento del borde D/V en el ala	UAS- <i>fng</i>	“	Cortes en el ala de gran tamaño. Sólo queda la parte central de ala. Ojo WT.	-
	UAS-vg; UAS- <i>fng</i>	“	Rescate parcial del crecimiento del ala. Ojo WT.	-
	UAS- <i>ap</i>	“	Alas con fenotipo <i>ap</i> - . OjoWT.	-
	UAS- <i>ap</i> ; UAS-vg	“	Rescate del crecimiento del ala. Ojo WT.	-
Interacción con genes que aceleran el ciclo celular.	UAS- <i>stg</i>	“	Alas ligeramente mayores que el WT.Ojo WT.	= 25°
	UAS-vg; UAS- <i>stg</i>	“	Alas ligeramente mayores que el WT.Ojo WT.	= 25°
	UAS- <i>CycE</i>	“	Fenotipo WT.	= 25°
	UAS-vg; UAS- <i>CycE</i>	“	Fenotipo WT.	= 25°
	UAS- <i>CycD</i> /CDK4	“	Ala y Ojo células ligeramente más grandes.	= 25°
	UAS-vg; UAS- <i>CycD</i> /CDK4	“	“	= 25°

Sobrexpresiones con vg-G4				
Hipótesis	UAS	Temperatura		
		17 °C	25 °C	29 °C
Interacción con genes que previenen muerte celular.	UAS-vg; UAS-P35	"	Fenotipo WT.	Fenotipo WT

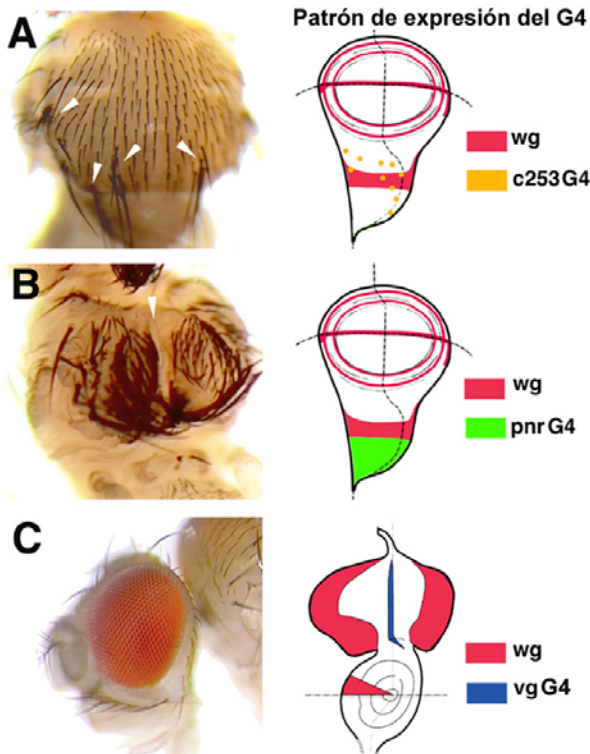


Figura 12. La expresión ectópica de *vg*, dirigida con determinados G4, produce perturbaciones específicas de tejido, pero no transformaciones. (A) La expresión ectópica de *vg* dirigida con *c253G4* provoca duplicaciones de elementos sensoriales en el tórax. (B) La expresión ectópica de *vg* dirigida con *pnrG4* provoca fallos en el cierre dorsal. (C) La expresión ectópica de *vg* dirigida con *vgG4* en el ojo no altera su desarrollo normal.

Este resultado sugiere que *vg* y *wg* cooperan para iniciar el programa de desarrollo del ala. La interacción entre *wg* y *vg* está reforzada por tres observaciones adicionales; 1) sólo producen transformaciones de tejido, aquellos G4 que incluyen en su dominio de expresión territorios con altos niveles de expresión *wg*; 2) la sobreexpresión simultánea de *vg* con un dominante negativo de *wg* disminuye el tamaño de las transformaciones obtenidas al dirigir ectópicamente *vg* con *DllG4* (Fig. 10B, D); 3) la sobreexpresión conjunta de *wg* y *vg* puede expandir el ala en el territorio del tórax (Klein and Martínez-Arias, 1999b). Un detalle relevante es que los niveles de expresión de *Wg*, a diferencia de los de *Vg*, no son iguales en todas las células mutantes del ojo y además son sorprendentemente bajos (ver discusión) (Fig. 13I).

Otros condicionantes genéticos y experimentales que han resultado insuficientes para inducir el proceso de transformación han sido: las dimensiones del dominio de expresión del G4, la temperatura de desarrollo, el rescate de muerte celular (coexpresando *vg* y P35), variaciones en la estequiometría Vg-Sd y la cantidad de proteína Vg sobreexpresada (Tabla. 2).

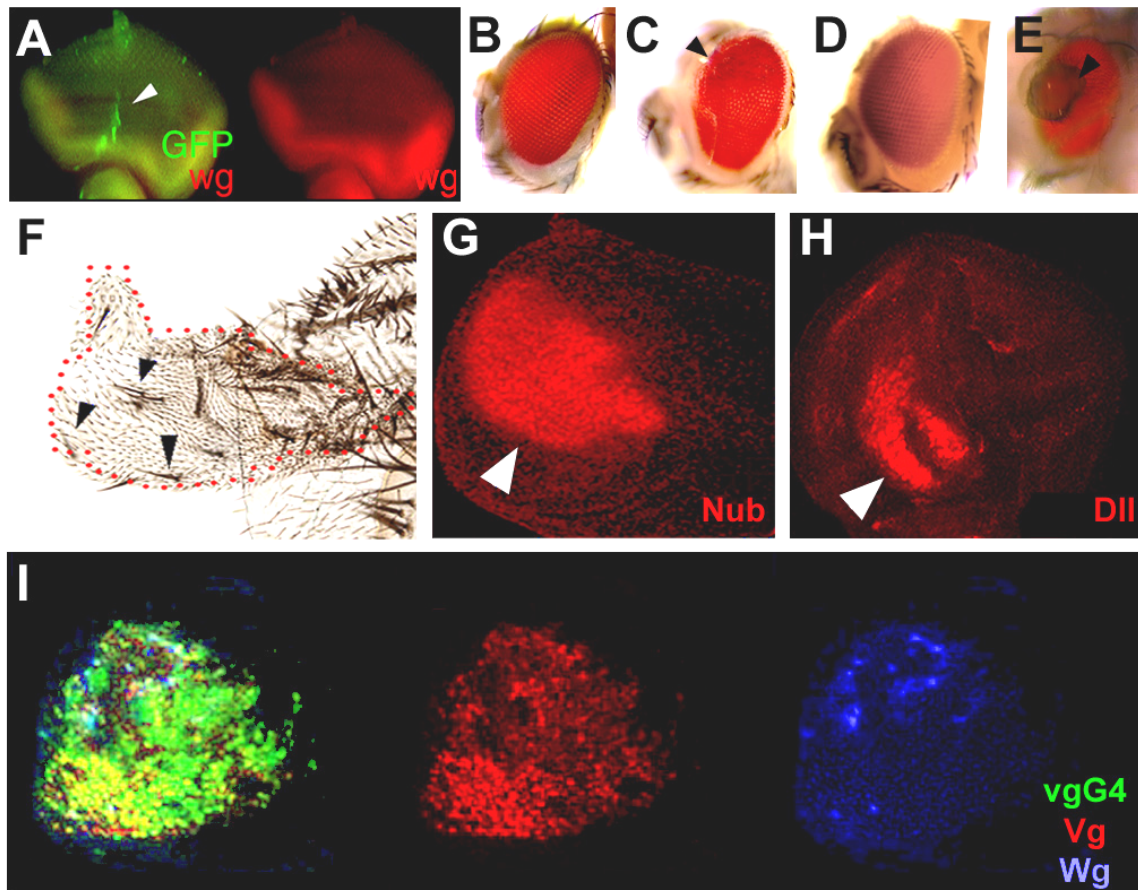


Figura 13. Diferenciación cuticular y expresión génica en discos imaginales de los territorios transformados al sobreexpresar, de forma conjunta, Vg y Wg con vgG4 en el ojo. (A) Patrón de expresión larvario silvestre de vgG4. (B y D) La expresión ectópica de una (B) o dos copias de *vg* (D) en el ojo no provoca alteraciones en su desarrollo. (C) La expresión ectópica de *wg* produce problemas de polaridad y diferenciación en los omatidios. (E y F) La sobreexpresión conjunta de *vg* y *wg* provoca transformaciones hacia tejido de ala. (G y H) Las transformaciones de tejido producidas por la co-expresión de *wg* y *vg* están acompañadas de la expresión ectópica de marcadores genéticos característicos de las partes distales del ala como Nub (rojo en G) o Dll (rojo en H). (I) Las transformaciones siempre son autónomas y sólo algunas células del territorio mutante muestran altos niveles de *wg* (azul).

4.2.2 Fenotipos obtenidos con la expresión ectópica de *vestigial* en clones.

Limitaciones temporales y genéticas del proceso de transformación.

El análisis clonal 1) evita los efectos cooperativos entre células, 2) favorece el análisis espacio-temporal y 3) permite distinguir los efectos autónomos y no autónomos en los procesos de proliferación celular y creación de patrón. Para completar el estudio de los efectos que tiene la sobreexpresión de *vg* sobre el control del desarrollo del ala, se ha realizado un análisis de clones morfogenéticos de sobreexpresión de *vg* en los discos imaginales y el tejido adulto de diferentes órganos (ala, pata, ojo y halterio).

4.2.2.1 La sobreexpresión clonal de *vestigial* otorga identidad distal a las células proximales del ala

En el **ala** adulta, los clones de sobreexpresión de *vg* provocan sobrecrecimientos tubulares de tamaño variable, en función de la posición en el eje de crecimiento P/D en la que aparezcan (ver Resultados. Proliferación). Una parte del sobrecrecimiento está constituida por el clon (situado en las zonas más distales del sobrecrecimiento) y otra parte por tejido silvestre (Fig. 14A). Las células de los clones de sobreexpresión tienen una diferenciación histotípica equivalente a la del resto del ala, aunque presentan un mayor grado de compactación y pigmentación (Fig. 14A). Los clones nunca diferencian elementos sensoriales equivalentes a los del margen del ala excepto cuando están situados sobre él.

La sobreexpresión clonal de *vg* en las zonas proximales del ala tiene un doble efecto. Por un lado, provoca la represión de los genes de identidad proximal como *ds* (Fig. 14B, C), *hth*, (Azpiazu and Morata, 2000; Casares and Mann, 2000; Liu et al., 2000) (Fig. 14B, C; Tabla. 3) y *Zinc finger homeodomain 2 (zfh2)* (Whitworth and Russell, 2003) (no mostrado). Por otro lado, promueve la expresión ectópica de genes característicos de zonas distales del ala como *Dll* (Fig. 14C) (Azpiazu and Morata, 2000; Liu et al., 2000), *vgQE* (Fig. 14D; Tabla. 3), *nub* (Tabla. 3) (Liu et al., 2000), *bs*

(Tabla. 3) (Liu et al., 2000), *m* (Rodríguez del Álamo et al., 2002), *four-jointed* (*fj*) (Cho and Irvine, 2004) o *dve* (Kolzer et al., 2003).

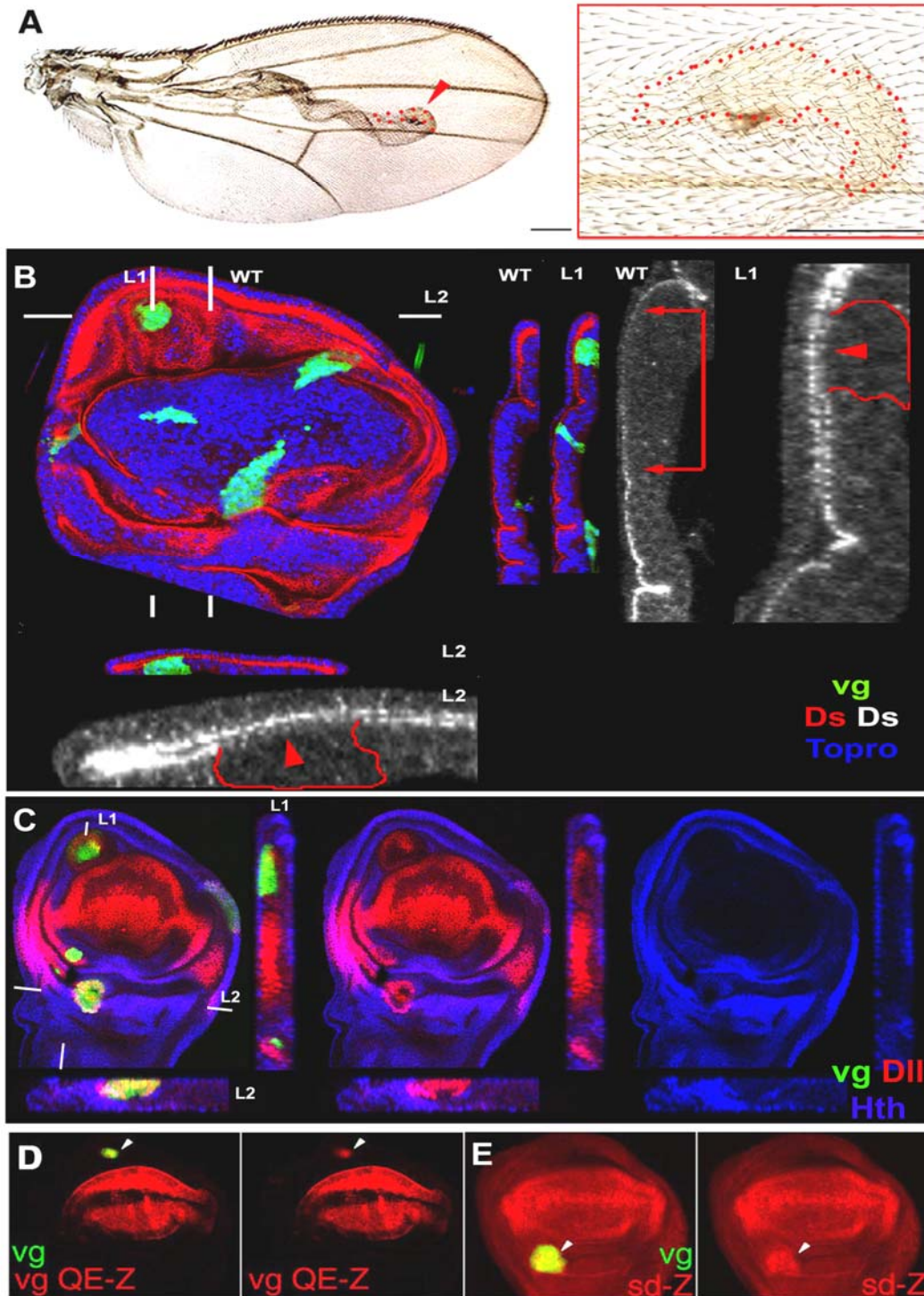


Figura 14. La sobreexpresión clonal de *vg* produce sobrecrecimientos en las partes proximales del ala e induce la expresión, autónoma y no autónoma, de marcadores genéticos característicos de las partes distales del ala. (A) La sobreexpresión clonal de *vg* (clon delimitado por el punteado rojo y señalado con flecha roja) en las partes proximales del

ala provoca sobrecrecimientos tubulares en los que sólo una parte de los mismos es territorio mutante. (A) El territorio mutante suele localizarse en la zona más distal del los clones y, frecuentemente, tiene una pigmentación equivalente a la de los territorios diferenciados como vena, pero nunca diferencia elementos sensoriales equivalentes a los del margen del ala. (A) El sobrecrecimiento no autónomo que rodea al clon es un ejemplo de acomodación positiva. (B y C) Los sobrecrecimientos tienen asociada la represión autónoma y no autónoma de genes proximales como *Ds* (rojo en B) u *Hth* (azul en C) en el disco imaginal de ala. (C) De forma contraria, en los sobrecrecimientos se expresan, autónoma y no autónomamente, genes asociados a la especificación de las partes distales del ala como *DII* (rojo en C). (D y E) La sobreexpresión de *Vg* en las partes proximales del ala está acompañada de un incremento de su propia expresión (*vgQE* rojo en D) y de la expresión de *sd* (rojo en E). Las células mutantes están marcadas en la cutícula adulta (A) por la mutación *forked (f)* y en los discos imaginales mediante GFP (verde) (B-E).

Los fenotipos no son exclusivamente autónomos y, al igual que en el ala adulta, pueden extenderse a varios diámetros celulares alrededor del clon (Fig. 14C) (Cho and Irvine, 2004)(Liu et al., 2000)(Kolzer et al., 2003). Los clones de sobreexpresión de *vg* reducen la expresión de *wg* a medida que avanza el desarrollo. Así, aunque en estadios tempranos altos niveles de *Wg* pueden coexistir junto con *Vg*, posteriormente, la expresión de *Wg* siempre está desplazada a varios diámetros celulares de distancia del clon (Fig. 15; Tabla. 3) (Liu et al., 2000). El desplazamiento de *Wg* permite la expresión no autónoma a larga distancia de marcadores genéticos, contribuyendo a la expansión de los sobrecrecimientos (Rodríguez del Álamo et al., 2002). Sin embargo, la no autonomía comienza con la señalización a corta distancia de las células *Vg* (Rodríguez del Álamo et al., 2002); los efectos no autónomos a corta distancia, en los clones de sobreexpresión de *vg*, son independientes de la expresión del anillo interno de *Wg* (Rodríguez del Álamo et al., 2002). La ausencia de elementos sensoriales correspondientes al margen en los clones alejados de éste está correlacionada con la ausencia de expresión de sus marcadores genéticos característicos como *cut (ct)* Tabla (1) o *vg-BE* Fig 3 (E), Tabla (1). El conjunto de resultados sugiere que las células que sobreexpresan *vg* tienen identidad histotípica y genética equivalente a la de las partes distales del ala, sin incluir el territorio

correspondiente al margen D/V. Finalmente, se observa que todos los clones de expresión ectópica de *vg*, independientemente de su posición, inducen la expresión ectópica de *sd-lacZ* (Fig. 14E, Tabla. 3). Este resultado indica que la acción de *vg* sobre la regulación génica en diferentes tejidos depende de la actividad transcripcional del complejo Vg-Sd (Halder et al., 1998)(Halder and Carroll, 2001).

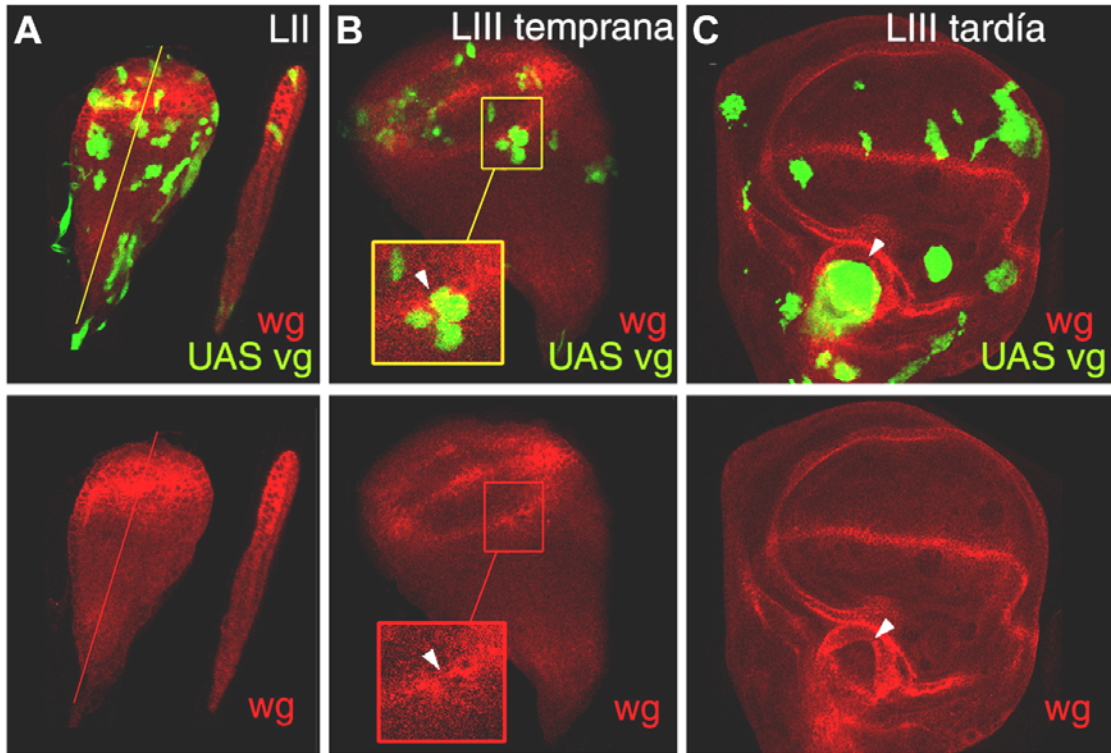


Figura 15. La sobreexpresión de *vg* desplaza altos niveles de Wg a medida que avanza el desarrollo larvario. (A) La sobreexpresión de *vg* (verde) en momentos tempranos del desarrollo larvario no afecta a la expresión de Wg (rojo). (B y C) Sin embargo, a medida que avanza el desarrollo larvario desplaza la expresión (flechas blancas en B y C) del anillo interno de Wg (rojo). (B y C) Observar la expresión de Wg (rojo) en los detalles de (B y C).

4.2.2.2 La expresión ectópica de *vestigial* requiere un marco temporal y genético específico para promover transformaciones de tejido

Los clones de expresión ectópica de *vg*, en **tejidos diferentes del ala**, sólo producen transformaciones cuando son generados dentro de un marco temporal específico en cada tejido, y sobre territorios con altos niveles de expresión de *wg* (Fig. 16, 17, 18). La edad restrictiva para que se produzca el proceso de transformación en el tórax está comprendida entre las 24-48h AEL, mientras que en

el ojo o la pata está entre las 36-60h AEL. La expresión ectópica de *vg* sin transformación asociada provoca perturbaciones tejido-específicas que no modifican el histotipo original del tejido de fondo (Fig. 19).

A diferencia de las sobreexpresiones dirigidas con G4, los clones de sobreexpresión de *vg* que producen transformaciones sólo diferencian tricomas equivalentes a los del ala (Fig. 16A-B, 17A, 18A). Es más, aparecen “tejidos mixtos” en los que se mezclan, con una distribución en sal y pimienta, tricomas de ala con elementos sensoriales característicos del tejido no transformado (Fig. 16A-B, 17A). La transformación restringida a algunas células en los clones está correlacionada con niveles de expresión de los distintos marcadores de transformación variables (Fig. 17B, 18B). Por último se observa que el repertorio de genes expresado en los tejidos transformados fuera del ala es específico de tejido (Tabla. 3). Estos resultados indican que la expresión individual de *vg* no es capaz de iniciar y dirigir el programa completo de desarrollo del ala. También sugieren que *vg* no puede desplazar todas las señales de identidad de los tejidos analizados. Alternativamente, las células que rodean al clon podrían influir, de forma no autónoma, reprimiendo la expresión de marcadores genéticos característicos de ala.

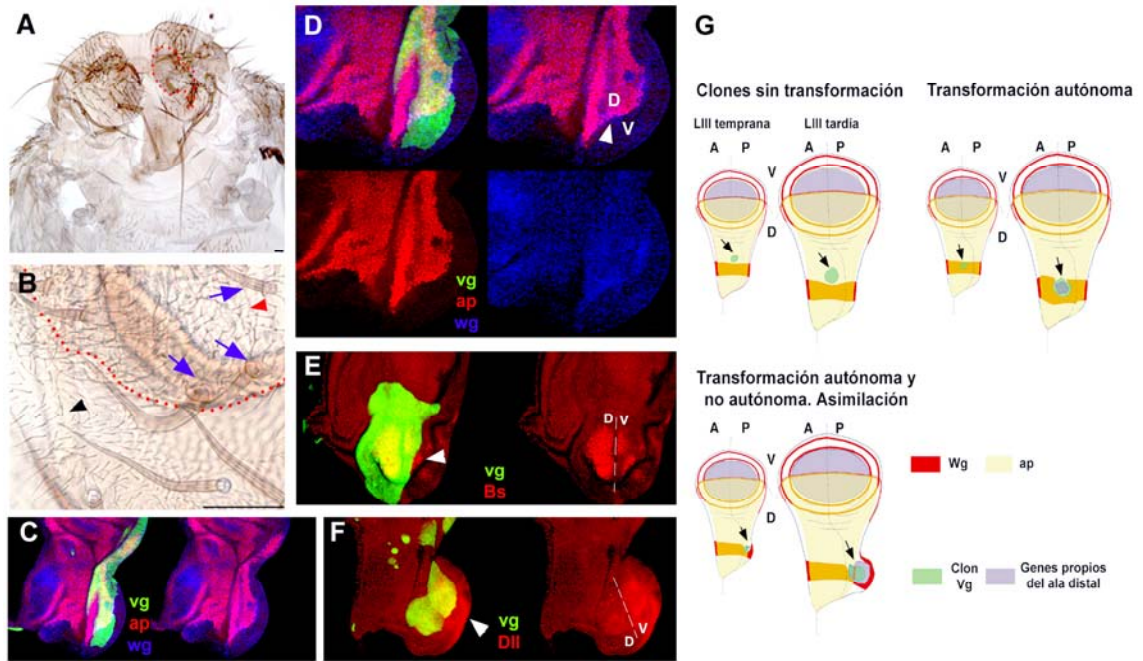


Figura 16. La expresión ectópica de *vg* en el tórax puede provocar la aparición de “tejidos mixtos” e inducir la expresión de marcadores genéticos de ala, de forma autónoma y no autónoma. (A y B) Los clones de expresión ectópica de *vg* en el tórax (el clon está delimitado por un punteado rojo) pueden provocar la diferenciación de “tejidos adultos mixtos”, en los que dentro del territorio mutante se mezclan tricomas equivalentes a los del ala (punta de flecha roja en B) y elementos sensoriales propios del tórax (flechas azules en B). (B) Observar las diferencias morfológicas que presentan los tricomas del territorio mutante (punta de flecha roja) respecto a los del territorio silvestre del tórax (punta de flecha negra). (C, D y G) Las transformaciones en el territorio del disco imaginal del ala, que dará lugar al tórax, se producen cuando los clones están sobre el dominio de expresión de altos niveles de *Wg* (azul). (C, D y G) La expresión diferencial de *ap*, en el en los clones que producen transformaciones, puede usarse para formar bordes dorso-ventrales equivalentes a los del ala. (E, F y G) La formación de un margen ectópico D/V de ala permite la transformación y la expresión no autónoma de marcadores genéticos de ala como *Bs* (rojo en E) o *Dll* (rojo en F), de forma autónoma y no autónoma (flechas blancas); fenómeno de “asimilación inductiva”. (G) Esquema de los efectos, autónomos y no autónomos, de los clones de sobreexpresión de *vg* en el tórax. Las células mutantes están marcadas en la cutícula adulta (A y B) por la mutación *f* y en los discos imaginales mediante GFP (verde) (C-G).

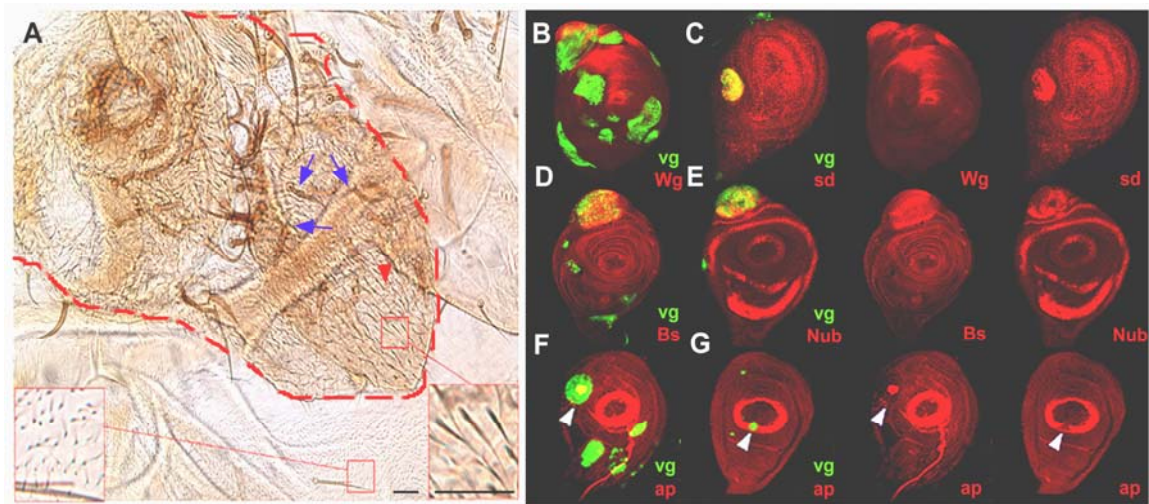


Figura 17. La expresión ectópica de *vg* en la pata puede provocar la aparición de “tejidos mixtos” e inducir la expresión de marcadores genéticos de ala, de forma exclusivamente autónoma. (A) Los clones de expresión ectópica de *vg* en la pata (el clon está delimitado por un punteado rojo) pueden provocar la diferenciación de “tejidos adultos mixtos”, en los que dentro del territorio mutante se mezclan tricomas equivalentes a los del ala (punta de flecha roja) y cerdas propias de la pata (flechas azules). (A) Observar la diferencia morfológica que presentan los tricomas del territorio mutante (detalle inferior derecho) respecto a los del territorio silvestre (detalle inferior izquierdo). (B) Las transformaciones en el disco imaginal de pata sólo se producen cuando los clones están situados sobre el dominio de expresión de altos niveles de *Wg* (rojo). (C) La expresión ectópica de *vg* en la pata induce la expresión autónoma de *sd* (rojo). (C y D) Las transformaciones tienen asociada la expresión, exclusivamente autónoma, de marcadores genéticos característicos de las partes distales del ala como *Bs* (rojo en D) o *Nub* (rojo en E). (F) La expresión ectópica de *vg* en la superficie ventral de la pata puede inducir la expresión ectópica de *ap* (rojo). (G) Sin embargo, en la superficie dorsal de la pata reprime la expresión de *ap* (rojo). Las células mutantes están marcadas en la cutícula adulta (A) por la mutación *f* y en los discos imaginales mediante GFP (verde) (B-G).

Las transformaciones fuera del ala son autónomas en todos los órganos estudiados excepto en el tórax. Los clones en el tórax, cuando aparecen sobre territorios que expresan altos niveles de *wg* y crecen simultáneamente entre células *ap*^{+/ap}- (que expresan y no expresan *ap*), producen transformaciones no autónomas. En estos clones, las zonas de confrontación entre células con diferente nivel de expresión de *ap*, tienen un comportamiento equivalente al margen del ala (Fig. 16C-D) y tienen asociada la expresión no autónoma de marcadores genéticos y cuticulares

característicos del ala (Fig. 16E-F). El fenómeno que permite el reclutamiento de tejido no autónomamente lo hemos denominado “asimilación inductiva”. A diferencia del tórax, la expresión ectópica de *vg* en otros tejidos puede interferir con la expresión de *ap* de forma específica de tejido. Así, la expresión de *ap* en la antena (no mostrado) o en la superficie dorsal de la pata está reprimida autónomamente; mientras que en cualquier posición de la superficie ventral de la pata está inducida de forma autónoma (Fig. 16D, 17B). Estos resultados sugieren que, a diferencia de la referencia A/P, la expresión de *ap* en determinados contextos genéticos puede ser modificada o reclutada para generar diferencias dorsoventrales como las del ala.

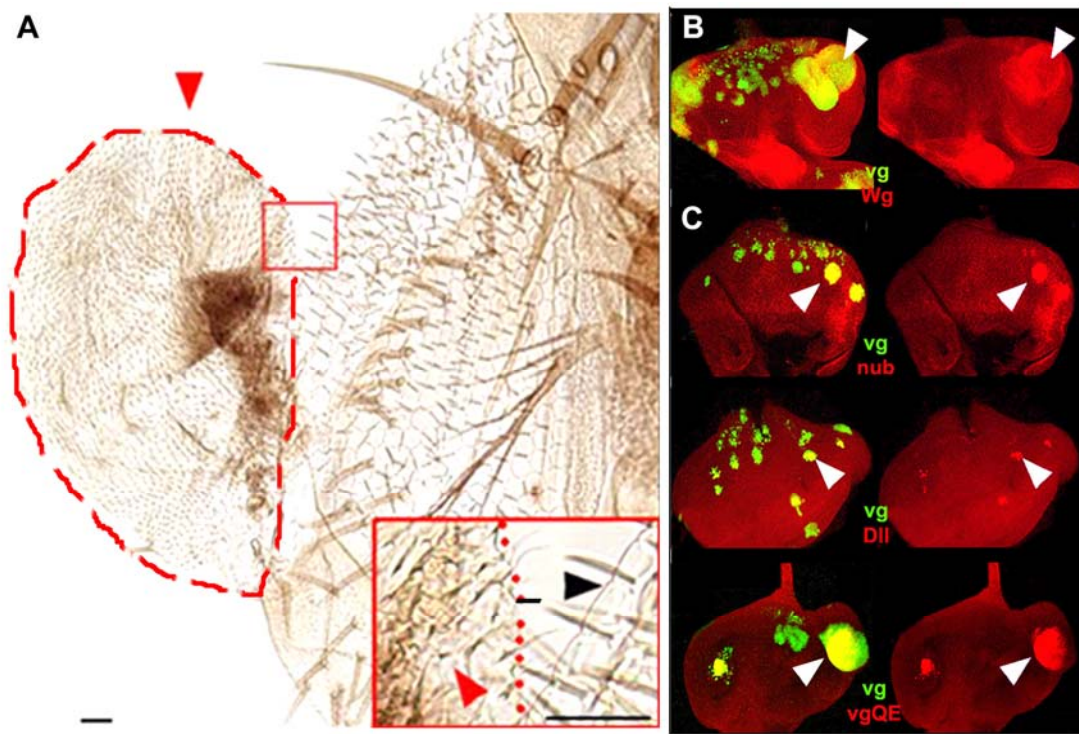


Figura 18. La expresión ectópica de *vg* en el ojo puede transformar, autónomamente, el tejido de ojo en tejido de ala. (A) Los clones de expresión ectópica de *vg* en el ojo (el clon está delimitado por un punteado rojo) transforman el tejido de ojo en tejido de ala, de forma autónoma. (A) Observar la diferencia morfológica que presentan los tricomas del territorio mutante (punta de flecha roja) respecto a los del territorio silvestre del ojo (punta de flecha negra). (B) Las transformaciones en el disco imaginal de ojo sólo se producen cuando los clones están situados sobre el dominio de expresión de altos niveles de *Wg* (rojo). (C) Las transformaciones tienen asociada la expresión, exclusivamente autónoma, de marcadores genéticos característicos de las partes distales del ala como *Nub*, *Dll* o *vgQE* (rojo). Las

células mutantes están marcadas en la cutícula adulta (A) por la mutación *f* y en los discos imaginales mediante GFP (verde) (B y C).

Los clones sin transformación provocan perturbaciones tejido-específicas. Las perturbaciones más frecuentes son 1) duplicaciones de elementos sensoriales en el tórax (Fig. 19A), 2) fenotipos de proximalización en la pata asociados a protusiones o inclusiones de tejido (Fig. 19B) y 3) duplicaciones de elementos sensoriales acompañadas de inclusiones o protusiones de tejido en el ojo (Fig.19C).

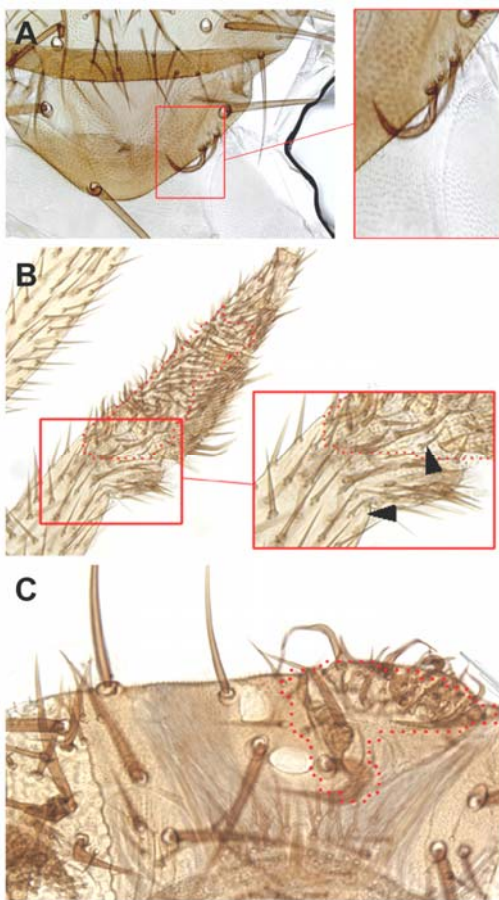


Figura 19. Los clones de expresión ectópica de *vg*, cuando no producen transformaciones, provocan perturbaciones específicas en cada órgano analizado. (A) En el tórax promueve duplicaciones de elementos sensoriales. (B) En la pata provoca acortamientos y fusiones tarsales. (C) En la cabeza induce la aparición de protusiones de tejido sin variaciones en la identidad histotípica. Las células mutantes están marcadas en la cutícula adulta por la mutación *f* (A-C).

Tabla 3.

Expresión de genes analizada en clones de sobreexpresión de *vg* y *wg-vg* en diferentes órganos.

Genotipo	Tejido analizado	Genes analizados										Fenotipo Adulto			
		nub	bs	vg	Eq	vg	EB	sd-z	Dll	Hth	wg		ct	ap	en
UAS <i>vg</i>	Wing-hinge	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	Wing blade sin margen D/V
	Tórax	⬇	⬇	⬇	-	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	Tejido mixto
	Pata	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	Tejido mixto
	Ojo	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	Wing blade sin margen D/V
UASwg; UASvg	Wing-hinge	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	-	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	Margen D/V
	Tórax	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	-	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	Margen D/V
	Pata	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	-	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	Tejido mixto
	Ojo	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	-	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	⬇	Margen D/V
Activación	⬇ No activación	⬆ Represión	⬆ No Represión	- No analizado	⊙ Expresión génica no autónoma										

En el halterio, los clones de expresión ectópica de *vg* mantienen la expresión de *Ubx* y, por tanto, la identidad de halterio (Shashidhara et al., 1999; Weatherbee et al., 1998). Por último, es importante destacar que el comportamiento autónomo y no autónomo de los clones de expresión ectópica de *vg* en el ala es equivalente en el halterio (ver discusión). Teniendo en cuenta el conjunto de datos obtenidos, puede afirmarse que *vg* es uno de los genes que participan de la combinatoria génica necesaria para dirigir el desarrollo de las partes distales del ala, pero no el único.

4.2.3 La identidad diferencial del ala requiere la combinatoria de diferentes genes entre los que se encuentra vestigial

La expresión en el ala de *sal* y *nub* (Kim et al., 1996) o la represión de *hth* y *tsh* (Azpiazu and Morata, 2000; Casares and Mann, 2000) se ha sugerido que depende de *vg*. Sin embargo, la expresión de *sal* o *nub* no se elimina completamente en células insuficientes para *vg*. Es más, la insuficiencia completa para el gen sólo se reduce su nivel de expresión (Barrio and de Celis, 2004; Johnston and Sanders, 2003) (Fig. 20A, B). De forma complementaria, la falta de *vg* sólo permite la expresión ectópica en las partes distales del ala de algunos marcadores genéticos característicos de las regiones proximales. En esa dirección se observa que las células mutantes para *vg* no expresan ectópicamente Hth (Fig. 20B), pero sí Ds (Fig. 20C). De estos resultados se concluye que *vg* sólo contribuye a mantener el nivel de expresión o represión de algunos marcadores genéticos en las partes distales del ala. Este resultado refuerza la hipótesis que señala a *vg* como un gen más dentro de la combinatoria genética que dirige el programa de desarrollo de las partes distales del ala.

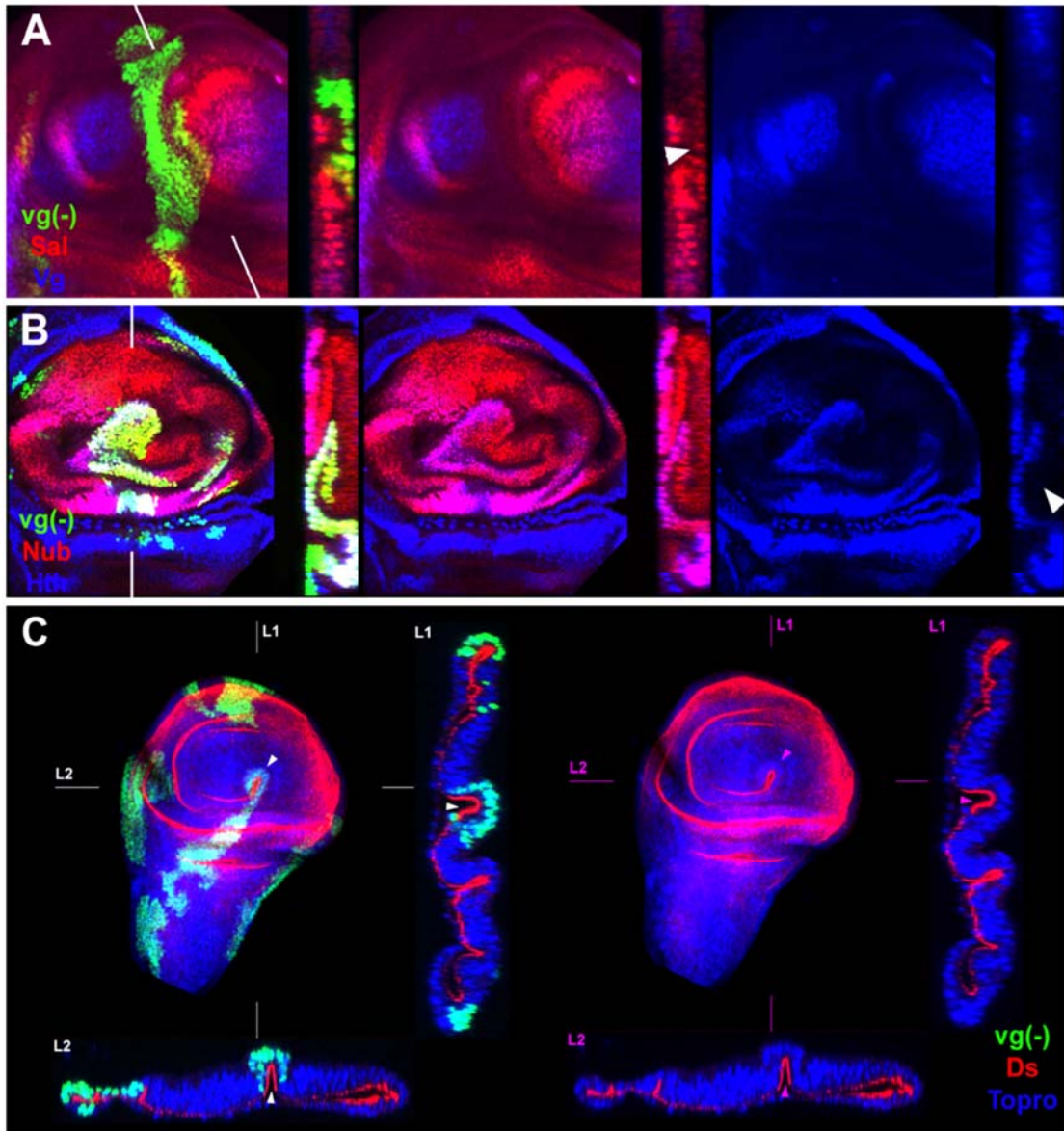


Figura 20. La expresión de *vg* en el disco imaginal del ala mantiene el nivel de expresión o represión de algunos marcadores genéticos. (A y B) La insuficiencia para *vg* (verde y azul en A), en las partes distales del disco imaginal de ala, no elimina completamente la expresión de algunos marcadores genéticos característicos de ellas como *Sal* (rojo en A) o *Nub* (rojo en B). (B y C) La insuficiencia para *vg* (verde) en las partes distales del ala sólo permite la expresión ectópica de algunos marcadores genéticos característicos de los territorios proximales; observar que *Hth* en los clones de falta de función de *vg* no se expresa de forma ectópica (azul en B) mientras que *Ds* si lo hace (rojo en C). Las células de los clones están marcadas mediante GFP (verde). El genotipo de todos los clones es *yw hs-FLP P[Tub α 1G4] UAS-GFPnls, FRT_{42D} P[Tub α 1G80] / FRT_{42D} *vg*^{null}, UAS-*puc*^{2A}.*

4.2.4 La interacción genética entre *wingless* y *vestigial* es esencial para iniciar el desarrollo del ala

Los datos obtenidos, dirigiendo la sobreexpresión de *vg* en clones o en dominios de expresión génica, destacan la interacción genética entre *wg* y *vg* para promover el proceso de transformación. Para intentar caracterizar la interacción se han realizado dos aproximaciones experimentales. Por un lado, se ha evaluado el efecto de la sobreexpresión clonal de *wg* y de la sobreexpresión conjunta de *wg* y *vg* (*wg-vg*). Por otro lado, se ha intentado encontrar el nivel de interacción entre *wg* y *vg* sobreexpresando diferentes componentes de la ruta de señalización de *Wg* junto con *vg*.

4.2.4.1 Efectos de la sobreexpresión clonal de *wingless*

En el ala, las células de los clones de sobreexpresión de *wg* adquieren una diferenciación equivalente al margen D/V, pero no producen sobrecrecimientos como los clones de sobreexpresión de *vg* (Fig. 21A). Estos clones expresan, autónoma y no autónomamente, algunos marcadores genéticos característicos de ala como *Dll* o *nub* (Fig. 21B). También provocan la represión de otros genes que no se expresan en el margen del ala como *bs* (Fig. 21B).

Fuera del ala, los clones de sobreexpresión de *wg* nunca producen transformaciones de tejido (Fig. 21C; Tabla. 3) y muestran diferentes fenotipos dependiendo del proceso de desarrollo que afecten en cada órgano considerado. La ausencia de transformación, sin embargo, no impide que la sobreexpresión de *wg* induzca la expresión de algunos marcadores genéticos de ala. Así por ejemplo, los clones de sobreexpresión de *wg* en el tórax pueden activar, autónoma y no autónomamente, la expresión de *nub* o *Dll* (Fig. 21D; Tabla. 3). En todos los casos la ausencia de transformación está correlacionada con la falta de expresión de *vg*.

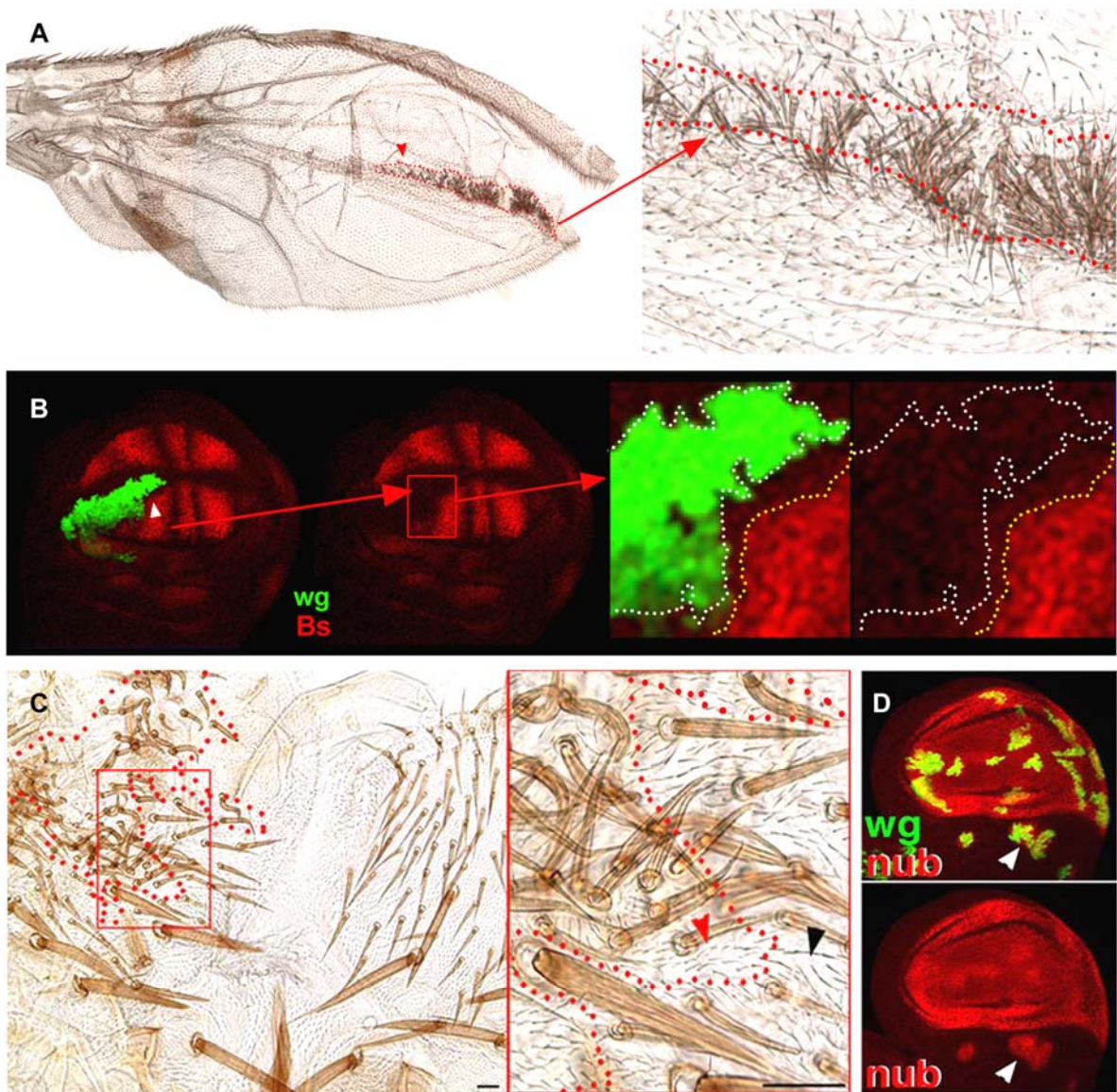


Figura 21. La sobreexpresión de *wg* en el ala fuerza la diferenciación cuticular y la especificación genética de las células mutantes como margen de ala, pero no transforma la identidad de otros tejidos en ala. (A y B) Los clones de expresión ectópica de *wg* en el ala adulta (el clon está en la superficie ventral del ala y está delimitado por un punteado rojo) o en el disco imaginal fuerzan la diferenciación del territorio mutante como margen de ala. En (B), las células mutantes están en color verde y *Bs* en rojo. Observar que la sobreexpresión de *wg* no produce sobrecrecimientos en las partes distales del ala (A y B). (C, D) Los clones de sobreexpresión de *Wg* en el tórax no transforman su identidad histotípica, aunque promueven la expresión, autónoma y no autónoma (a corta distancia), de marcadores genéticos característicos de ala como *Nub* (rojo en D). Las células mutantes están marcadas en la cutícula adulta (A y C) por la mutación *f* y en los discos imaginales mediante GFP (verde) (B y D).

4.2.4.2 La células que co-expresan wingless y vestigial adquieren identidad histotípica y posicional de margen de ala

En el ala, los clones de sobreexpresión conjunta *wg-vg* adquieren, autónomamente, una diferenciación histotípica equivalente a la del margen del ala (Fig. 22A-C), pero inducen mayores sobrecrecimientos que los clones de sobreexpresión de *vg* (Fig. 22A, B). La parte no autónoma del sobrecrecimiento no tiene una diferenciación distinta a la del resto del ala (Fig. 22A, B). Estos clones muestran el mismo patrón de activación y represión de genes analizados que los clones de sobreexpresión individual de *wg* (Fig. 22E-H; Tabla. 3). En otros territorios del disco imaginal de ala, y a diferencia de la sobreexpresión clonal de *wg* o de *vg*, los clones *wg-vg*, provocan transformaciones de tejido autónomas y no autónomas independientemente de su posición (Fig. 22E-H; Tabla. 3). En el tórax o en la membrana peripodial del ala, los clones *wg-vg* inducen la expresión y diferenciación de marcadores genéticos y cuticulares característicos del ala (Fig. 22D-H; Tabla. 3) (Baena-López et al., 2003). Es importante destacar, que en los clones *wg-vg* los efectos no autónomos se extienden a un mayor número de diámetros celulares de distancia que en los clones de sobreexpresión de *wg* o *vg*. Estos resultados sugieren que los clones de sobreexpresión conjunta de *wg* y *vg* tienen una identidad de margen de ala asociada a una información posicional más distal que los clones de sobreexpresión de sólo *vg*.

4.2.4.3 La sobreexpresión clonal *wg-vg* sólo produce transformaciones fuera del ala en determinados contextos genéticos

En otros órganos diferentes del ala, los clones de sobreexpresión *wg-vg* sólo producen transformaciones en determinados contextos genéticos (Fig. 23). A diferencia de los clones de sobreexpresión de *vg* en el ojo, los clones *wg-vg* producen transformaciones independientemente de su posición (Fig. 23B, D; Tabla. 3). Sin embargo, en la pata sólo provocan la aparición de tejidos mixtos en determinados territorios de la pata (Fig. 23A, C; Tabla. 3). Estos clones tienen asociada la

expresión, exclusivamente, autónoma de algunos marcadores genéticos de ala (Fig. 23A, C; Tabla. 3). La sobreexpresión *wg-vg* afecta la expresión de *ap*, *en* y *Ubx* igual que la sobreexpresión de *vg*. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión conjunta de *wg-vg* también resulta insuficiente para promover el desarrollo completo del ala en cualquier contexto genético, pero es esencial para la iniciación del proceso de transformación. Al igual que los clones de sobreexpresión de *vg*, los clones *wg-vg* que no producen transformaciones provocan perturbaciones específicas de tejido para cada órgano analizado.

4.2.4.4 ¿Cuál es el nivel de interacción entre la ruta de señalización de *wingless* y *vestigial*?

Los resultados mostrados, indican una interacción positiva entre *wg* y *vg* para iniciar el desarrollo de las partes distales del ala. También muestran una interacción negativa, mediada por *vg*, que impide la expresión simultánea de ambos genes después de los momentos iniciales del desarrollo.

Para analizar la interacción positiva se ha dirigido en el ojo, con *vg-G4*, la sobreexpresión conjunta de *vg* y diferentes componentes de la ruta de señalización de *wg*. Los resultados muestran que el efector transcripcional de la ruta de *wg*, Armadillo, en su forma silvestre (UAS-*arm*¹⁷) o fosforilada (UAS-*arm*^{Δ13}) no incrementa la capacidad de *vg* para promover el desarrollo del ala (Tabla. 2). Este resultado sugiere que la interacción podría ser independiente de la actividad transcripcional de la ruta de señalización canónica de *Wg*. La sobreexpresión de *vg* junto con una forma constitutivamente activa de *zeste/white* (*zw*) de *Drosophila* (homólogo de la proteína GSK-3 de vertebrados), tampoco potencia el proceso de transformación y sugiere que la interacción podría darse por encima de *zw* (Tabla. 2). Por último, los bajos niveles de *Wg* detectados en los clones y sobreexpresiones de *vg* o *wg-vg* (Fig. 13I, 15C, 17B, 18B, 22E) sugieren que, directa o indirectamente, *vg* es capaz de reprimir la expresión de *wg*.

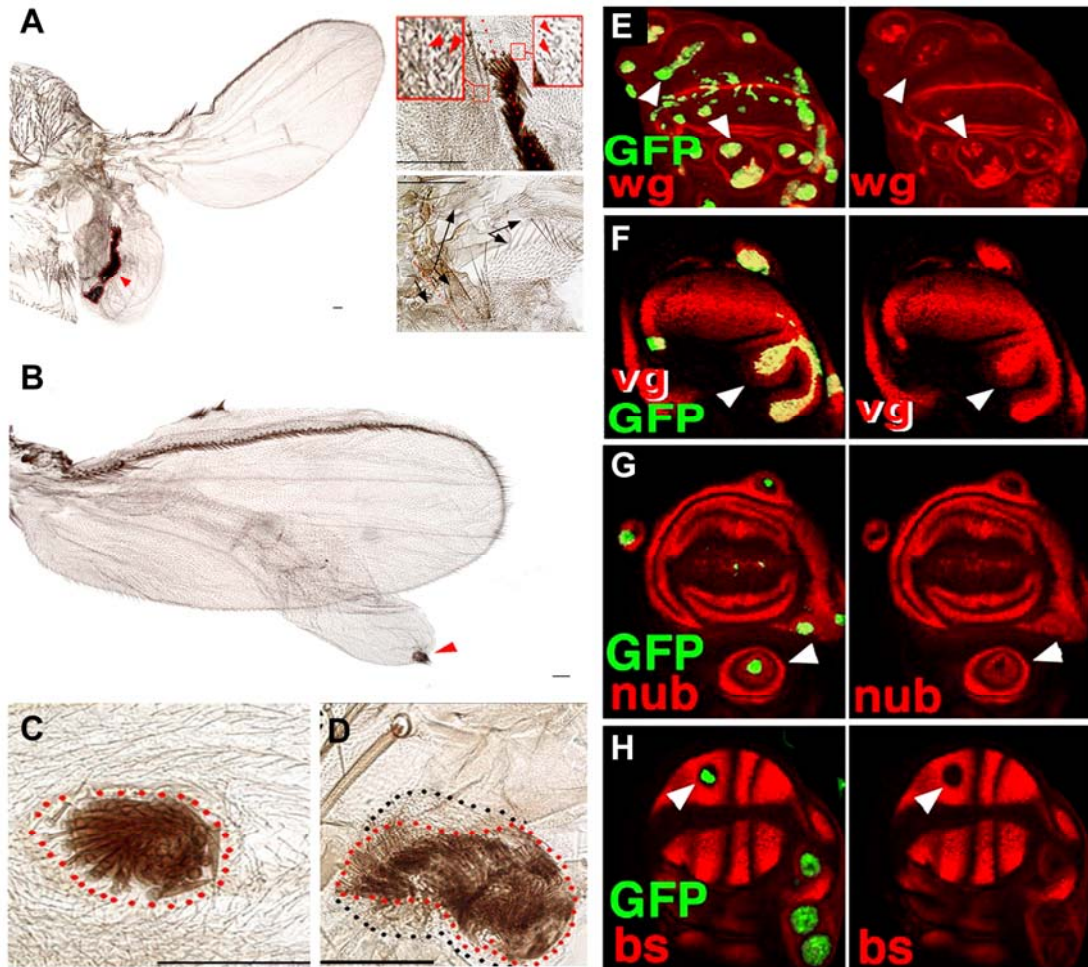


Figura 22. La sobreexpresión conjunta de *wg* y *vg* provoca grandes sobrecrecimientos en el ala y transformaciones con identidad de ala en otros órganos. (A y B) Los clones de sobreexpresión *wg-vg* en el ala (los clones están indicados mediante puntas de flecha rojas y están delimitados por el punteado rojo) provocan grandes sobrecrecimientos en los que la mayor parte del territorio es no mutante (ejemplo de acomodación positiva). Observar la duplicación de elementos de patrón alrededor de los clones (detalles en A). (A-C) Todas las células mutantes en estos clones presentan un patrón de diferenciación cuticular equivalente al del margen del ala. (D) Los clones de sobreexpresión *wg-vg* (el clon está delimitado por un punteado rojo) pueden transformar, autónomamente y no autónomamente (territorio delimitado por un punteado negro), la identidad histotípica de las células del tórax. (D) Todas las células de los clones de sobreexpresión *wg-vg*, sorprendentemente, no tienen la misma cantidad de Wg (rojo) y, además, el nivel de expresión de Wg suele ser bajo (puntas de flecha blancas). (E y F) Los clones de sobreexpresión *wg-vg*, en el disco imaginal del ala, inducen la expresión en el tórax, autónoma y no autónoma (a larga distancia), de marcadores genéticos característicos de ala como Vg (rojo en E) o Nub (rojo en F). (G) Los clones *wg-vg* reprimen, de forma no autónoma y a larga distancia, genes que se expresan en el ala normalmente fuera del margen D/V como Bs (rojo). Las células mutantes están marcadas en la cutícula adulta (A-D) por la mutación *f* y en los discos imaginales mediante GFP (verde) (E-G).

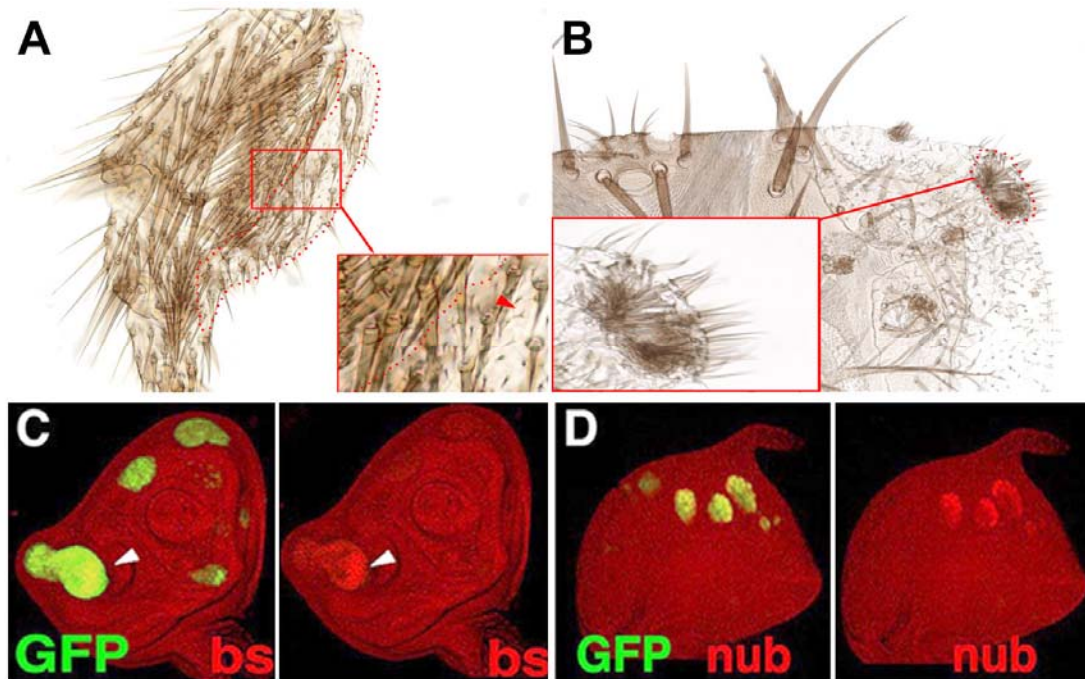


Figura 23. La sobreexpresión conjunta de *wg* y *vg* puede provocar la aparición de “tejidos mixtos” en la pata y transformaciones del ojo en ala. (A y C) Los clones de sobreexpresión *wg-vg* en la pata adulta y el disco imaginal provocan la aparición de “tejidos mixtos” y transformaciones del ojo hacia ala. (B) Las transformaciones en la pata tienen asociada la expresión, exclusivamente autónoma, de marcadores genéticos de ala como *Bs* (rojo). Observar que, a diferencia de los clones de expresión ectópica de *vg*, los clones de coexpresión para producir transformaciones no necesitan estar en la superficie ventral de la pata (territorio que normalmente expresa altos niveles de *Wg*). Es importante destacar que en todos los clones *wg-vg* no se detectan marcadores genéticos de transformación (B). Tampoco se observa que todas las células de los clones *wg-vg* expresen un mismo nivel de los marcadores genéticos de transformación considerados (B). (D) Independientemente de la posición en la que aparezcan los clones *wg-vg* en el ojo, producen transformaciones histotípicas que tienen asociada la expresión autónoma de marcadores genéticos de ala como *Nub* (rojo).

***RESULTADOS.
PROLIFERACIÓN***

4.3 EXPRESIÓN DE VESTIGIAL. PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA CELULAR. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS CÉLULAS EN EL ALA

Todos los órganos de una especie tienen una forma característica y un tamaño constante. El tamaño de un órgano depende del balance entre la tasa de proliferación y muerte celular en cada momento del desarrollo. La forma es una consecuencia de la distribución espacial de las células que lo componen. Muchos de los mecanismos genéticos que subyacen a esos procesos de desarrollo son desconocidos, pero sabemos que están dirigidos por la identidad posicional que tiene cada célula. En este apartado se evalúa la implicación de *vg* en el control del crecimiento y la distribución espacial de las células en las partes distales del ala. Por último, se examina la correlación funcional entre las heterogeneidades del patrón de expresión de *vg* y la asignación posicional en los diferentes ejes de crecimiento del ala.

4.3.1 La falta de función vestigial reduce autónomamente la supervivencia celular y la tasa de proliferación celular en las partes distales del ala

El análisis de mutantes para *vg* y *sd* indica que los fenotipos resultantes surgen por la alteración de dos procesos independientes pero posiblemente interrelacionados, muerte celular y tasa de proliferación celular reducida (Van de Bor et al., 1999).

4.3.1.1 La expresión de vestigial es esencial para la supervivencia celular

El alelo nulo de *vg* (vg^{null}) es viable homocigótico y su fenotipo adulto consiste en una ablación completa de la partes distales del ala (Paumard-Rigal et al., 1998; Van de Bor et al., 1999). Ocasionalmente, además de la ausencia de ala distal se producen duplicaciones de tórax (Paumard-Rigal et al., 1998) (no mostrado). Estos fenotipos adultos están correlacionados con la expresión, en las partes distales del ala, de marcadores de muerte celular (TUNEL y Caspasall) durante el desarrollo

larvario (Fig. 7A). Recientemente, también se ha observado que la función de *vg* induce la expresión de genes antiapoptóticos como DIAP-1 (Delanoue et al., 2004; Van de Bor et al., 1999), capaces de reprimir genes pro-apoptóticos como *reaper* (Delanoue et al., 2004). Estos resultados indican que la expresión de *vg* es esencial para la supervivencia celular en las partes distales del ala. Considerando la relación entre *vg* y la supervivencia celular, parecería factible un rescate fenotípico de todas las condiciones mutantes de falta de función para el gen mediante la sobreexpresión de inhibidores de apoptosis; sin embargo, esta situación no ocurre. En diferentes fondos genéticos en los que la apoptosis está reducida, los clones de células insuficientes para *vg* (*vg*^{null}) sólo sobreviven durante los estadios larvarios (Fig. 24). Los inhibidores de apoptosis que se han evaluado han sido P35 (proteína vírica que inhibe muerte celular) (Hay et al., 1995), *puckered* (*puc*) (regulador negativo de la ruta de señalización JNK que impide de forma muy eficiente la apoptosis en el ala) (Adachi-Yamada and O'Connor, 2002; Martín-Blanco et al., 1998; Moreno et al., 2002) y la deficiencia H99 (deficiencia que elimina la función de los efectores de apoptosis *hid*, *reaper* y *grim*) (Foley and Cooley, 1998; Goyal et al., 2000); obteniendo el mayor grado de viabilidad celular con la sobreexpresión de *puc*. Las células insuficientes para *vg* aunque expresen simultáneamente inhibidores de apoptosis tienen fuertemente comprometida su viabilidad, y muestran altos niveles de marcadores genéticos de apoptosis (Caspasa-III activada) (Fig. 24C). A lo largo del desarrollo pupal los clones de células (*vg*^{null}; UAS*puc*) desaparecen del epitelio tras completar un proceso de extrusión (no mostrado) y muerte celular iniciado durante los estadios larvarios (Fig. 24B-C). Esta circunstancia impide su análisis en el tejido adulto.

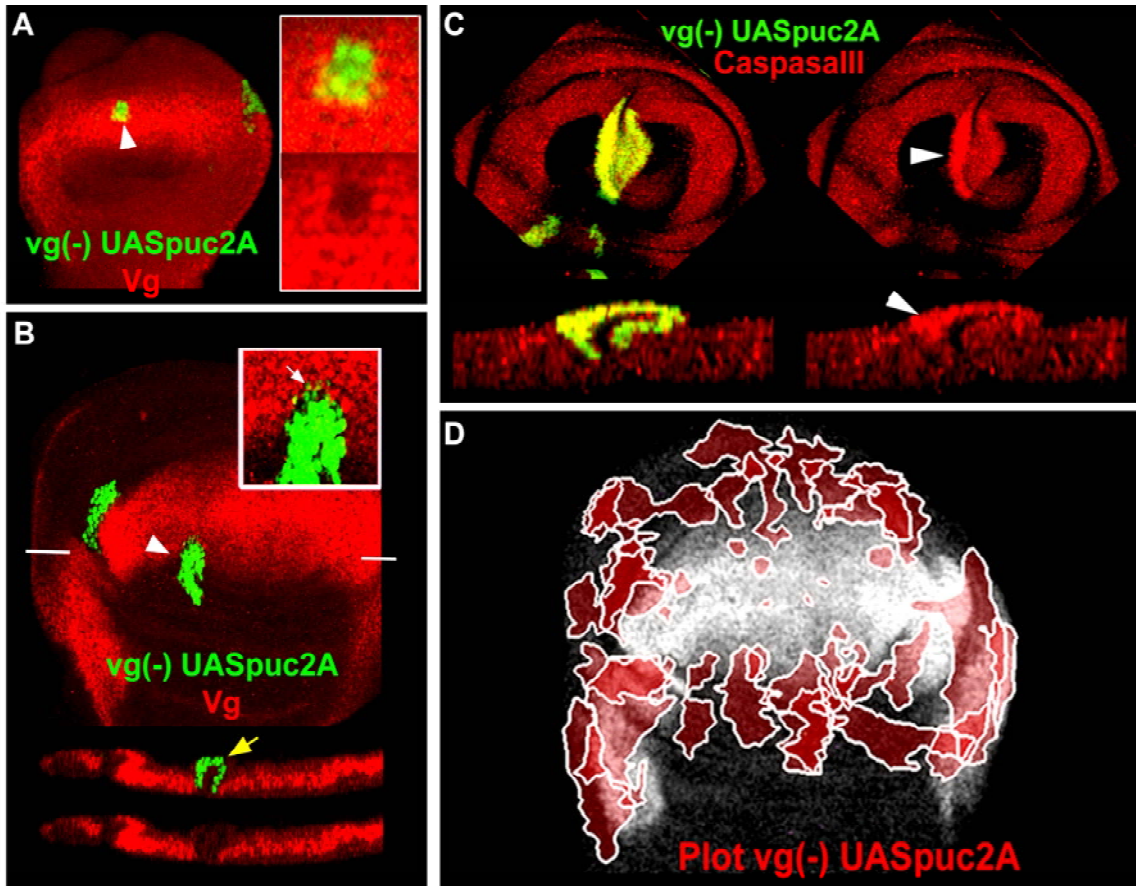


Figura 24. La insuficiencia completa de *vg*, en clones, elimina autónomamente la expresión de *Vg*, disminuye la proliferación celular en las partes distales del ala, induce muerte celular y provoca la extrusión del epitelio de las células mutantes. (A y B) Los clones de falta de función de *Vg* y sobreexpresión simultánea de *puc* proliferan con dificultad en las partes distales del ala y eliminan la expresión de *Vg* de forma autónoma (rojo). También comienzan un proceso de extrusión del epitelio (punta de flecha amarilla en B) y muerte celular direccional desde zonas distales a proximales (la punta de flecha blanca en el detalle de B muestra núcleos de pequeño tamaño y picnóticos característicos de células apoptóticas). (C) A pesar de sobreexpresar el inhibidor de apoptosis *puc*, las células insuficientes para *vg* expresan altos niveles de marcadores de muerte celular (caspasa III activada en rojo), desde los estadios larvarios del desarrollo. (D) El tamaño y la frecuencia con la que aparecen los clones de células insuficientes para *vg* depende de su posición dentro del ala; los clones tienen un mayor tamaño y aparecen con más frecuencia a medida que se alejan del borde D/V del ala, o lo que es lo mismo, cuando están situados en zonas que expresan normalmente niveles más bajos de *Vg*. El genotipo de todos los clones de la figura es *yw hs-FLP P[Tub α 1G4] UAS-GFPnls, FRT_{42D} P[Tub α 1G80] / FRT_{42D} vg^{null}, UAS-*puc*^{2A}*. Las células mutantes están marcadas mediante GFP (verde).

También observamos que la viabilidad celular en ausencia de expresión *vg* no depende del fenómeno de “competición celular” (Moreno et al., 2002). Los clones *vg^{null}* siempre tienen un número escaso de células (4-5 células) y desaparecen al poco tiempo de su inducción (48 horas después) en un fondo genético silvestre o en un fondo *Minute*. Estos resultados confirman la implicación de *vg* en la regulación de la supervivencia celular en las partes distales del ala, pero también sugieren un papel adicional en el mantenimiento de la integridad epitelial.

Es importante destacar que la insuficiencia para *vg* no tiene el mismo efecto sobre la supervivencia celular a lo largo de todo el eje de crecimiento P/D. Los clones de células insuficientes para *vg* (*vg^{null};UASpuc*) se observan con una mayor frecuencia y tienen un mayor tamaño a medida que aumenta su distancia al borde D/V del ala (Fig. 24D). Esta circunstancia se refleja, de forma más evidente, en el tipo de crecimiento característico que muestran los clones de sobreexpresión de la construcción RNAi para *vg* a 29°. Estos clones se estrechan a medida que se aproximan al borde D/V del ala, creciendo con una forma triangular característica (Fig. 25). Este resultado sugiere que aquellos lugares del ala que expresan niveles más altos de *Vg* tienen un requerimiento superior del gen para sobrevivir y proliferar. Por último se observa que el contacto entre células que expresan diferente cantidad de *Vg* puede estimular la proliferación celular (Fig. 27B), siempre y cuando la insuficiencia para *Vg* no sea muy fuerte (las inferencias extraídas de este resultado y su implicaciones funcionales son expuestas al final del apartado 4.3.2.2).

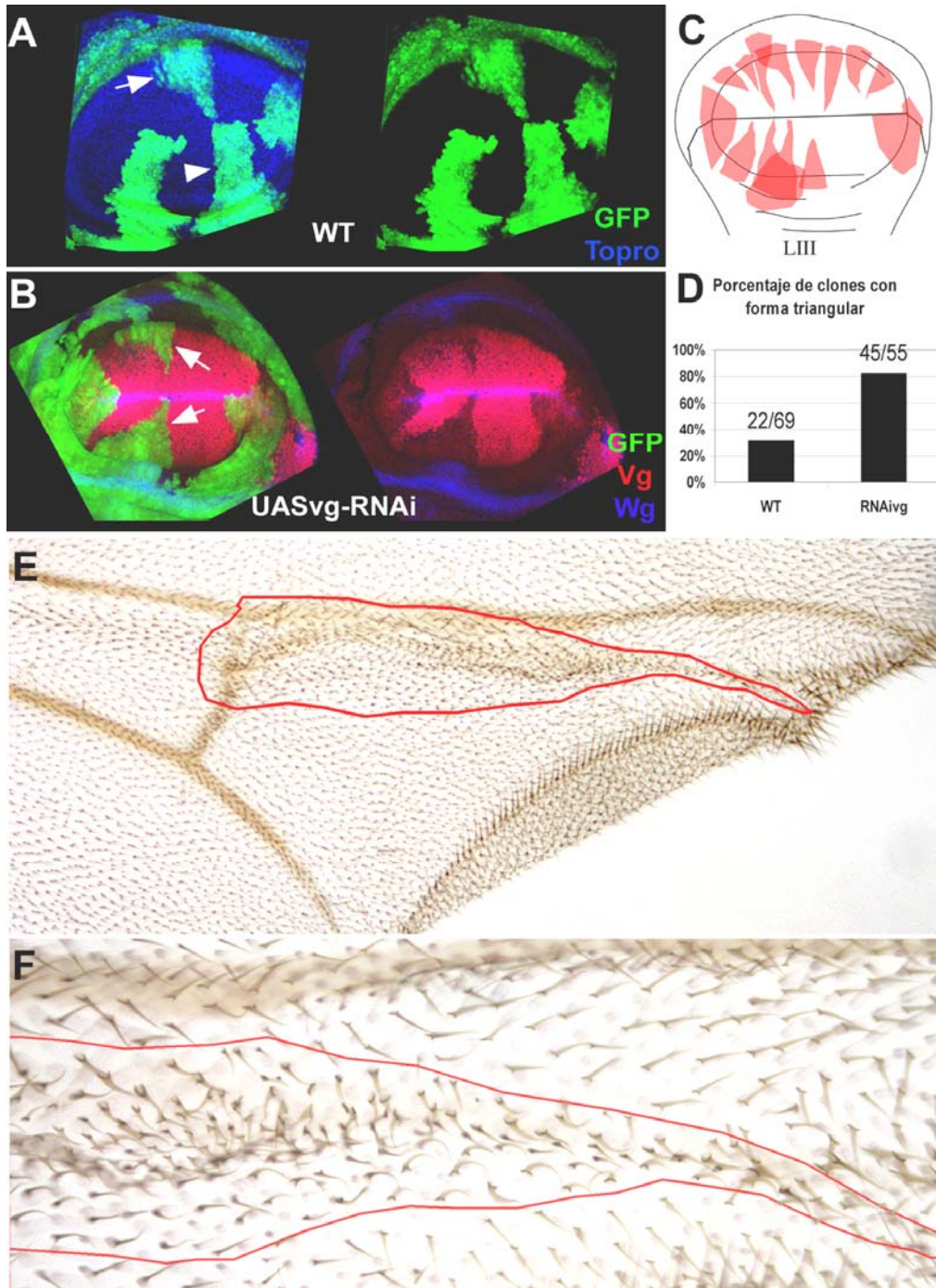


Figura 25. La forma de los clones está modificada en condiciones hipomorfas para *vg*. (A) Forma de clones silvestres durante el desarrollo imaginal a 29°. (B y C) La sobreexpresión de la construcción *UASvg-RNAi* a 29° altera la forma normal de los clones; los clones adquieren una morfología triangular. (D) Frecuencia de aparición de clones con forma triangular en la condición mutante y silvestre. (E y F) Ejemplo de clon (delimitado por la línea roja) de sobreexpresión de la construcción *UASvg-RNAi* en el tejido adulto. Las células mutantes están marcadas en la cutícula adulta (E y F) por la mutación *f* y en los discos imaginales mediante GFP (verde) (A y B).

4.3.2 La expresión de vestigial puede reducir o incrementar la tasa de proliferación celular dentro del ala de una forma dependiente de dosis y posición

Los datos de sobreexpresión clonal demuestran la capacidad de *vg* (Fig. 14A) para incrementar la proliferación celular en las partes proximales del ala (Azpiazu and Morata, 2000; Baena-López and García-Bellido, 2003; Casares and Mann, 2000; Liu et al., 2000; Rodríguez del Álamo et al., 2002). A su vez, los sobrecrecimientos proximales están correlacionados con un incremento en el nivel de expresión de diferentes reguladores del ciclo celular (*dE2F-1*, *RNR2*, *DHFR*, *stg*) y una aceleración de la transición de G1 a S (Delanoue et al., 2004). También se ha mostrado la capacidad, del complejo *Vg-Sd*, para aumentar la tasa de proliferación en cultivos celulares (Delanoue et al., 2004). Considerando los precedentes expuestos, se ha sugerido que *vg* es capaz de estimular la proliferación celular constitutivamente (Delanoue et al., 2004). Sin embargo, los resultados que se mostrarán sugieren un efecto de *vg* sobre la proliferación celular no constitutivo y dependiente de las heterogeneidades de su patrón de expresión en los diferentes ejes de crecimiento.

4.3.2.1 La falta de función de vestigial reduce la proliferación celular en el ala de una forma dependiente de dosis

En las partes distales del ala, las células con insuficiencia *vg* tienen una tasa de proliferación celular reducida respecto a la condición silvestre, que se refleja claramente en el tamaño de los clones de falta de función *vg^{null}* y sobreexpresión simultánea de *puc* (Fig. 24D). Sin embargo, estos clones tienen un sesgo fenotípico atribuible a muerte celular (Fig. 24B, C). Para intentar evitar la muerte celular y modular el grado de insuficiencia para *vg*, se ha sobreexpresado la construcción de RNA interferente (Elbashir et al., 2001; Yang et al., 2000; Zamore et al., 2000) para *vg* controlada por secuencias UAS (ver material y métodos).

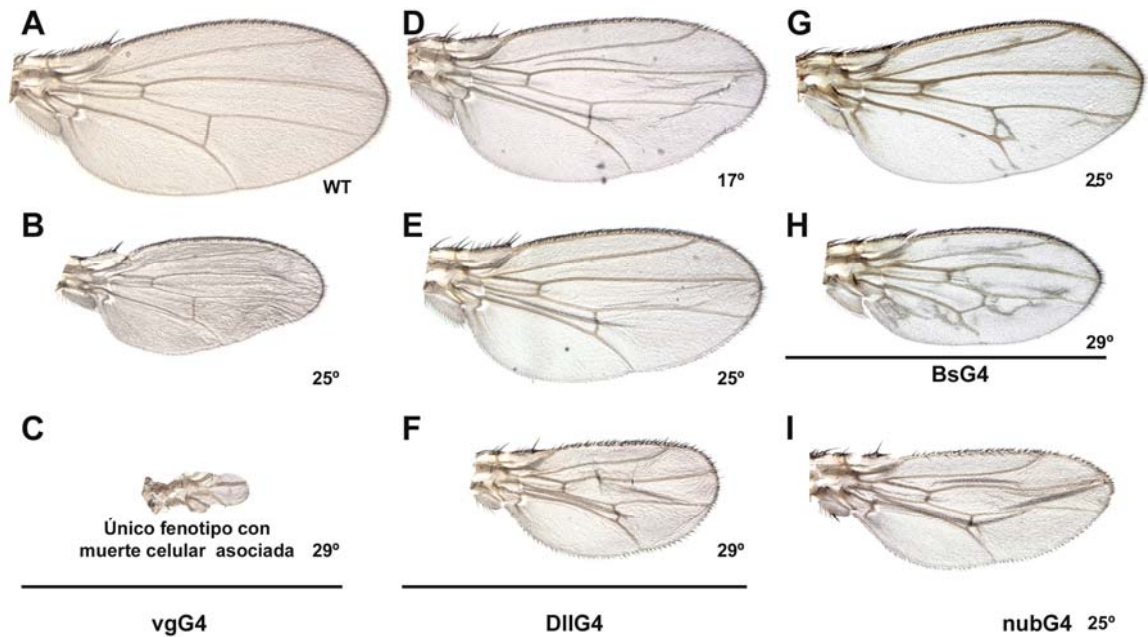


Figura 26. La sobreexpresión de una construcción de RNA interferente de *vg*, dirigida con diferentes G4, reduce el crecimiento del ala de una forma dependiente de dosis. (A) Ala silvestre o “wild-type, WT”. (B, E, G, I) La sobreexpresión de la construcción UAS*vg*-RNAi, dirigida con *vg*G4 (B), DIIIG4 (E), BsG4 (G) o nubG4 (I), a 25°, disminuye el crecimiento de las partes distales del ala. (C, D, F, H) Los efectos sobre el crecimiento, de la sobreexpresión de la construcción UAS*vg*-RNAi, dirigida con *vg*G4 (C), DIIIG4 (F) o BsG4 (H), son más fuertes a 29° y más débiles a 17° (D). *vg*G4 se expresa en el margen D/V. DIIIG4 se expresa en casi la totalidad de las partes distales del ala a ambos lados del borde D/V. BsG4 se expresa en todas las intervenas durante todo el desarrollo sin incluir el borde D/V. nubG4 se expresa en todo el ala durante todo el desarrollo.

La sobreexpresión de la construcción (UAS*vg*-RNAi), dirigida por diferentes G4 a distintas temperaturas, disminuye el crecimiento del ala (Fig. 26, 27B, 37C) de una forma dependiente de dosis sin afectar la viabilidad celular (sin inducción de Caspasa-III activada en los discos imaginales) (Fig. 26). La falta de crecimiento de los territorios mutantes está correlacionada con una disminución de la expresión de *vg* (Fig. 25B; 26B; 37C) y marcadores genéticos característicos de células en proliferación (PCNA y PH3) (Fig. 27A, B).

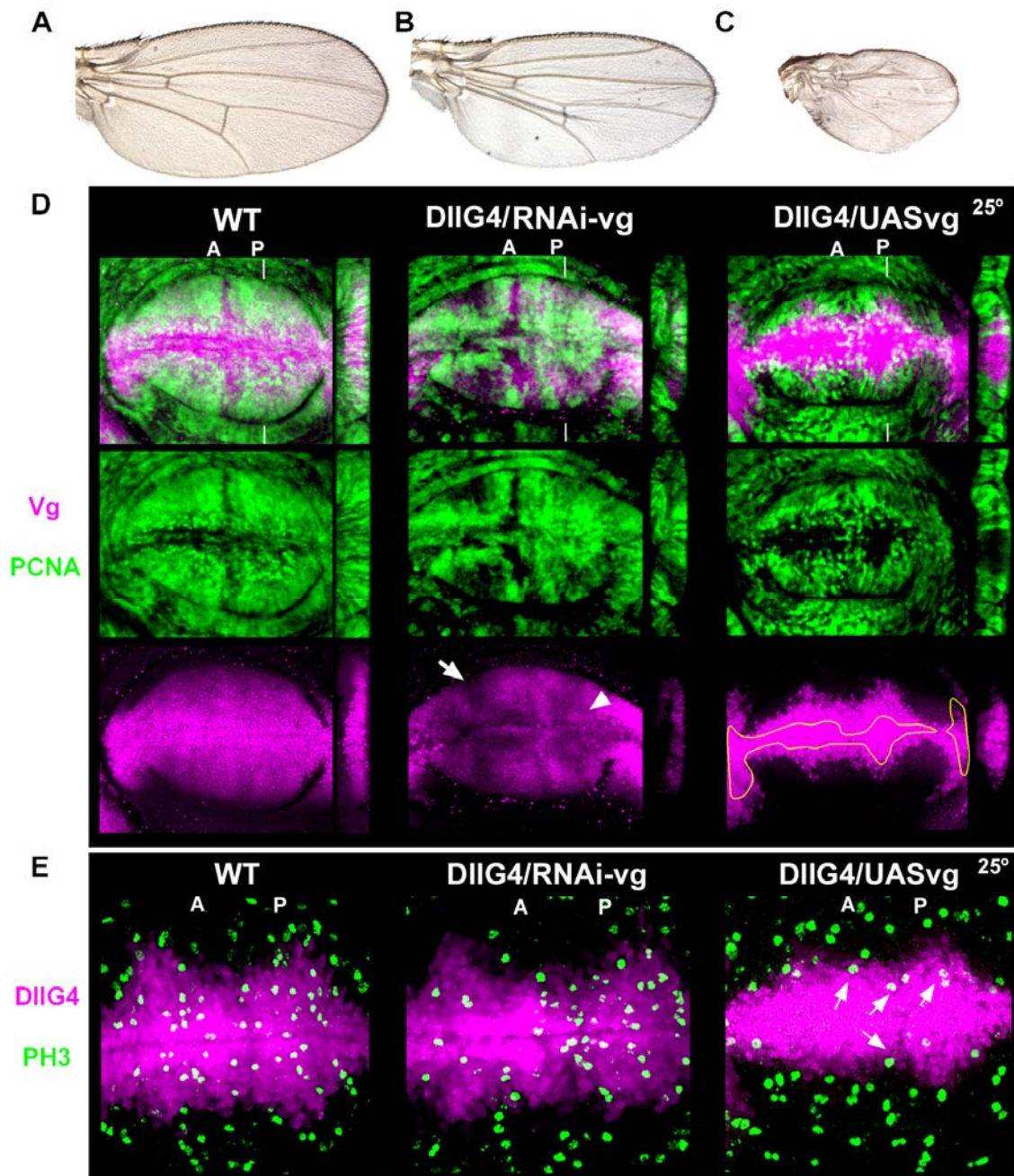


Figura 27. La falta y el exceso de Vg reducen la proliferación celular, de forma autónoma, en las partes distales del ala. (A) Ala adulta silvestre. (B) Fenotipo adulto de la sobreexpresión de la construcción de RNA interferente de Vg, dirigida con DIIG4 a 25°. (C) Fenotipo adulto de la sobreexpresión de Vg, dirigida con DIIG4 a 25°. (D) La falta y el exceso de función de Vg (púrpura) reduce, de forma autónoma, la expresión de marcadores de proliferación celular como PCNA (marcador de la fase S del ciclo celular en verde). Observar que la sobreexpresión del UASvg-RNAi reduce de forma más fuerte la expresión de Vg en el compartimento anterior A que en el compartimento posterior P (D). Esta circunstancia reduce de forma muy notable la expresión de PCNA (verde) en las células anteriores (flecha blanca en D). Sin embargo, cuando la insuficiencia para Vg es más débil (compartimento posterior en D y punta de flecha blanca), el contacto entre células que expresan diferentes niveles de

Vg puede aumentar la expresión de PCNA (D). Observar que en la sobreexpresión de *vg* sólo las células del borde del territorio mutante (fuera de la zona delimitada en amarillo en D) expresan PCNA (verde en D). (E) Los efectos descritos para la expresión de PCNA, tienen un reflejo evidente en la localización y el número de mitosis (marcadas con fosfo-histona III, PH3 en verde) en las condiciones experimentales analizadas. *DIIG4* se expresa en casi la totalidad de las partes distales del ala a ambos lados del borde D/V.

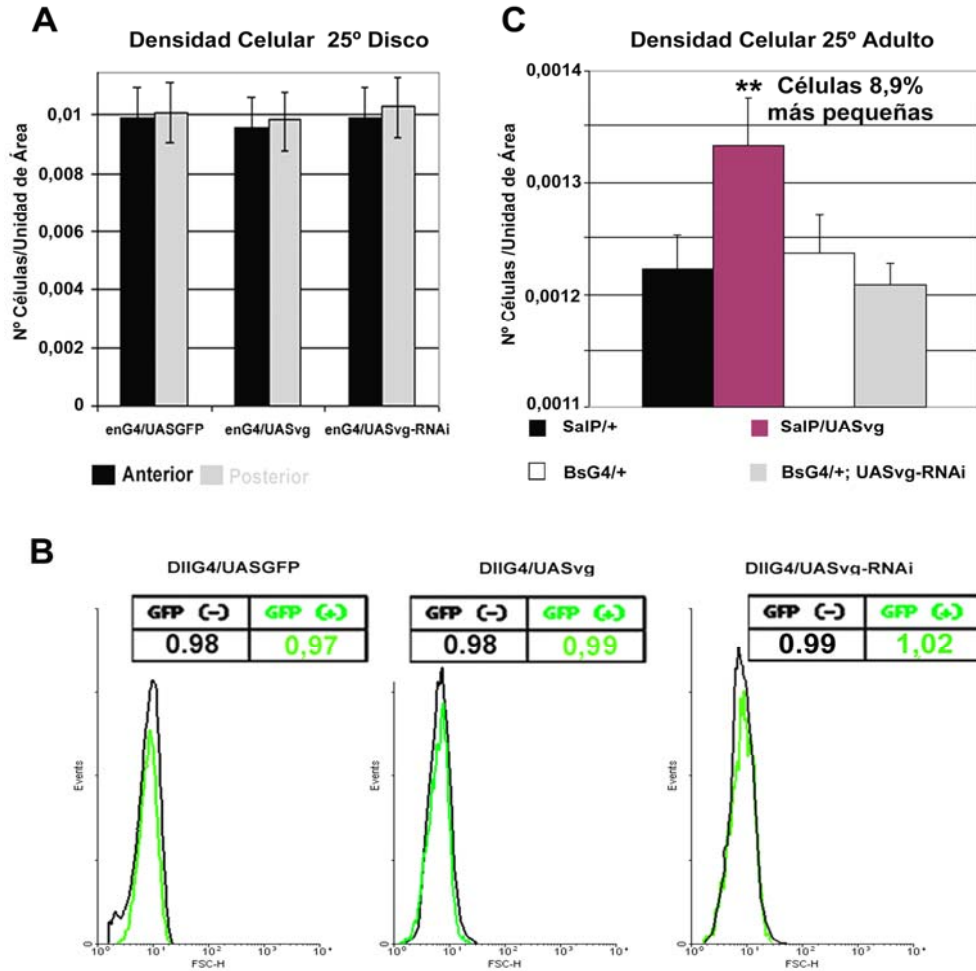


Figura 28. El tamaño celular sólo está modificado por la sobreexpresión de *vg*, durante el desarrollo pupal. (A) Comparación de la densidad celular, durante el desarrollo larvario, en el compartimento anterior y posterior en un fondo genético de sobreexpresión y falta de función para *vg* a 25°. (B) Tamaño celular, determinado mediante FACS a 25°, para una condición de falta y exceso de función *Vg*. (C) Densidad celular en el ala adulta en diferentes condiciones de falta y exceso de función *Vg* a 25°. Los asteriscos en (C) indican significación estadística al 99% de confianza. *enG4* se expresa en todo el compartimento posterior del ala. *DIIG4* se expresa en casi la totalidad de las partes distales del ala a ambos lados del borde D/V. *BsG4* se expresa en todas las intervenas del disco imaginal de ala y no incluye el borde D/V. *salG4* se expresa, durante el desarrollo larvario, en los territorios distales del ala comprendidos entre LII y LV.

En ningún caso las reducciones de tamaño son atribuibles a variaciones en el tamaño celular durante el desarrollo larvario (Fig. 28A, B) o pupal (Fig. 28C). Estos resultados indican que mantener la expresión heterogénea de *vg* es necesario para conservar el ritmo normal de proliferación celular normal en las partes distales del ala.

4.3.2.2 La sobreexpresión de *vestigial* en las partes distales del ala también reduce la proliferación celular de una forma dependiente de dosis

La sobreexpresión de *vg*, dirigida por diferentes líneas G4 (*salG4*, *DllG4*, *apG4* y *nubG4*) reduce autónomamente el crecimiento en las partes distales del ala (Fig. 29). Esta reducción además es dependiente de dosis y puede corregirse parcialmente disminuyendo la temperatura de desarrollo a 17° (Fig. 29B). Las reducciones del tamaño del ala en individuos adultos están correlacionadas con una disminución autónoma del territorio mutante durante el desarrollo larvario (Fig. 30), con una reducción de la expresión de marcadores de proliferación celular (PCNA) (Fig. 27C) y, también, del número de divisiones celulares (marcaje con PH3) (Fig. 27C, 30B, 31A-C). Estos fenotipos no son permanentes y pueden corregirse eliminando la sobreexpresión de *vg*. En etapas tempranas del desarrollo larvario, la sobreexpresión de *vg* con *dppG4* ocupa casi la totalidad del compartimento anterior y reduce notablemente su proliferación celular (Fig. 31A). Sin embargo, cuando *dppG4* se restringe a la zona central del ala al final del tercer estadio larvario, se recupera parcialmente la proliferación celular en el resto del compartimento anterior (Fig. 31B). Es importante destacar que, durante el desarrollo larvario, la reducción del crecimiento no está correlacionada con la aparición de muerte celular (Caspasa-III activada o TUNEL), en ninguna de las condiciones experimentales analizadas (sobreexpresiones territoriales o clonales). Esto podría explicar la incapacidad para rescatar el crecimiento que tiene la sobreexpresión de inhibidores de apoptosis

(clones UASvg-UASP35 o salG4/UASvg; UASpuc2A) en esas etapas del desarrollo (Fig. 32A-D). La reducción del tamaño de las partes distales del ala tampoco se debe a cambios en el tamaño celular (Fig. 28A, B). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *vg* reduce el crecimiento al disminuir la proliferación celular de forma autónoma y dependiente de dosis. Al igual que en la falta de función para *vg* (Fig. 27B), las células que sobreexpresan *vg* proliferan más cuando están próximas o en contacto con otras células que expresan una cantidad diferente de la proteína (Fig. 27C).

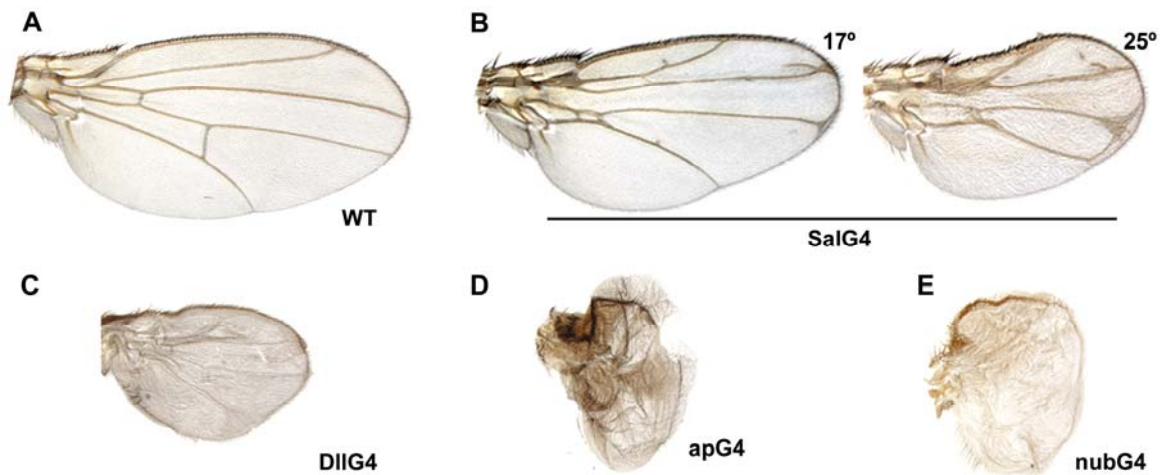


Figura 29. La sobreexpresión de *vg*, dirigida con diferentes G4, reduce el crecimiento del ala de una forma dependiente de dosis. (A) Ala silvestre o “wild-type, WT”. (B-E) La sobreexpresión de *vg* dirigida con salG4 (B), DllG4 (C), apG4 (D) y nubG4 (E) disminuye el crecimiento en las partes distales del ala. Observar que los efectos de la sobreexpresión de *vg* son más débiles a 17° que a 25°, indicando un efecto de *vg* dependiente de dosis (B). salG4 se expresa, durante el desarrollo larvario, en los territorios distales del ala comprendidos entre LII y LV. apG4 se expresa en todo el compartimento dorsal del ala. nubG4 se expresa en todo el ala.

Además de los efectos autónomos, la sobreexpresión de *vg* también afecta, no autónomamente, el crecimiento de los territorios silvestres adyacentes (observar regiones de intervena A y E en Fig. 29B). Los efectos negativos y no autónomos de

vg sobre el crecimiento ejemplifican el fenómeno de “acomodación negativa”. Los resultados obtenidos con la sobreexpresión y la falta de función de *vg* indican que su expresión no estimula constitutivamente la proliferación celular en las partes distales del ala. Es más, sugieren que la tasa de proliferación celular en el “wing blade” podría depender de las diferencias cuantitativas de *Vg* entre células vecinas.

4.3.2.3 La sobreexpresión de vestigial fuera de las partes distales del ala incrementa la proliferación celular

A diferencia del efecto en las partes distales del ala, la sobreexpresión de *vg* (*enG4*, *dppG4*, *ptcG4*) incrementa, de una forma autónoma y no autónoma, la proliferación celular en las partes proximales del ala (Fig. 31; 33A, D; 34A-C). El incremento de la proliferación está correlacionado con un mayor número de mitosis (aumenta el número de células marcadas con PH3) (Fig. 31B) y células en división (incrementa el marcaje de BrdU y PCNA) (Fig. 31 D, E). La proliferación no autónoma está acompañada de la expresión de marcadores genéticos característicos de las partes distales del ala en los territorios proximales (Fig. 14; Tabla. 3). En este caso los efectos no autónomos son un ejemplo de “acomodación positiva”. Estos resultados indican un efecto diferencial de *vg* sobre la proliferación celular dependiente de posición a lo largo del eje P/D del ala.

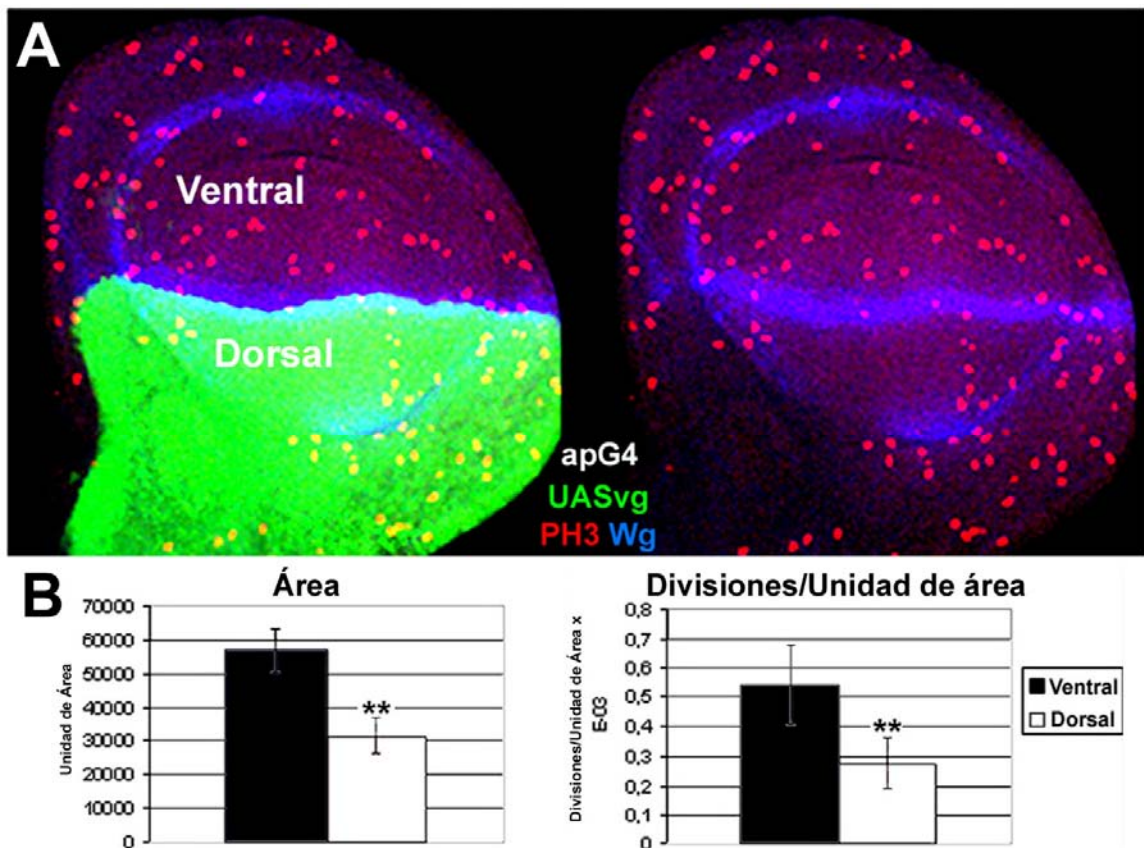


Figura 30. La sobreexpresión de *vg*, dirigida con *apG4* a 25°, reduce el crecimiento en las partes distales del ala y la proliferación celular. (A) La sobreexpresión de *vg*, dirigida en todo el compartimento dorsal del disco imaginal de ala con *apG4* (verde), reduce la proliferación celular (mitosis marcadas con fosfo-histona III, PH3 en rojo) en las partes distales del ala (territorio comprendido dentro del anillo interno de expresión de *Wg* en azul). (B) Comparación del área y número de mitosis por unidad de área observadas en el compartimento dorsal y ventral de discos mutantes *apG4/UASvg* a 25°. Los asteriscos indican significación estadística al 99% de confianza (B).

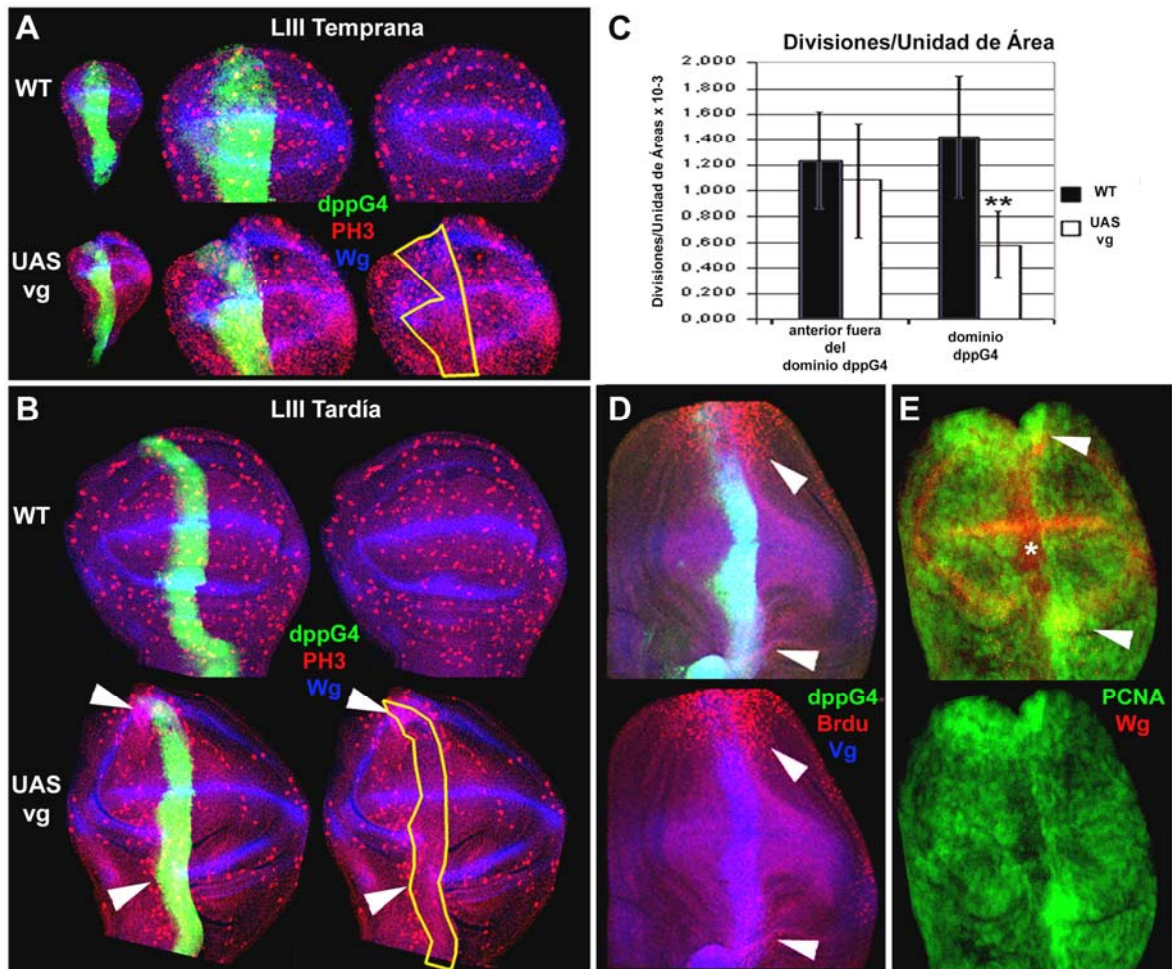


Figura 31. La sobreexpresión de *vg*, dirigida con *dppG4* o *ptcG4* a 25°, reduce la proliferación celular en las partes distales del ala, pero la aumenta en las partes proximales. (A, B y C) La sobreexpresión de *vg*, observada en diferentes momentos del desarrollo larvario y dirigida con *dppG4* (verde), reduce la proliferación celular (mitosis marcadas con fosfo-histona III, PH3 en rojo) en los territorios mutantes (verde) de las partes distales del ala (*Wg* en azul). (B) Sin embargo, la proliferación celular está incrementada en las partes proximales del ala (puntas de flecha blancas en B), de forma autónoma y no autónoma. (D y E) El incremento de la proliferación celular en las partes proximales del ala está correlacionado con un aumento del marcaje de BrdU (rojo en D) y PCNA (puntas de flecha y verde en E). (E) La reducción de la proliferación celular en las partes distales del ala está correlacionada con un descenso del marcaje de PCNA (asterisco blanco y verde en E). El genotipo correspondiente a los discos mostrados es en todos los casos *dppG4/UASvg*, excepto en (E) que es *ptcG4/UASvg*. El patrón de expresión de *ptcG4* es equivalente al de *dppG4* (verde en B). Los asteriscos indican significación estadística al 99% de confianza (C).

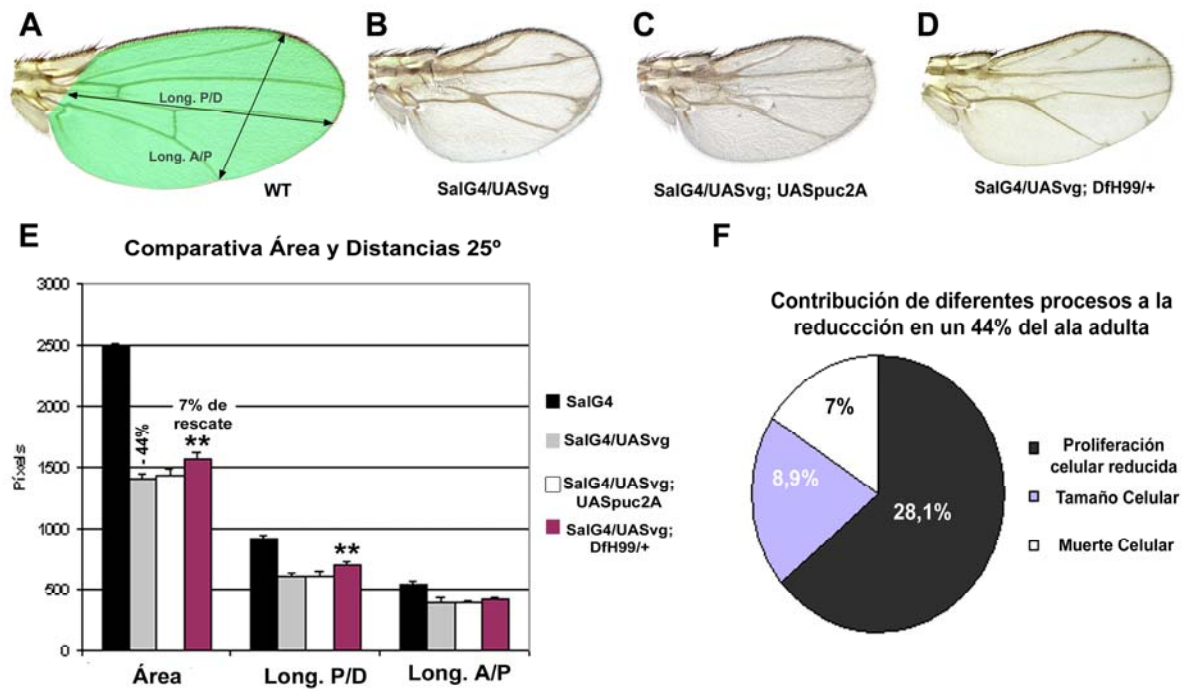


Figura 32. La inhibición de la muerte celular sólo rescata un 7% de la falta de crecimiento provocado por la sobreexpresión de *vg*, y siempre que se realice durante el desarrollo pupal. (A) Ala silvestre o “wild-type, WT”. (B) Ala SalG4/UASvg. (C) Observar que la sobreexpresión de inhibidores de apoptosis (*UASpuc^{2A}*) durante el desarrollo larvario, no rescata la falta de crecimiento provocada por la sobreexpresión de *vg*. (D) La inhibición durante todo el desarrollo de la muerte celular (insuficiencia de *grim*, *reaper*, y *hid* que se genera en un fondo genético heterocigótico para la *DfH99*) rescata parcialmente la falta de crecimiento provocada por la sobreexpresión de *vg*. Observar que el resultado mostrado en D indica que la sobreexpresión de *vg* sólo provoca muerte celular durante el desarrollo pupal. (E) Comparación de medidas analizadas en cada genotipo. En todos los genotipos n=15 (E). Los asteriscos indican significación estadística al 99% de confianza (E). El área considerada en las diferentes condiciones experimentales está sombreada en verde en A y las distancias están indicadas con flechas. *salG4* se expresa, durante el desarrollo larvario, en los territorios distales del ala comprendidos entre LII y LV. (F) Diagrama que representa la contribución de diferentes procesos de desarrollo, a la reducción de tamaño del ala obtenida con la sobreexpresión de *vg*.

4.3.2.4 Los efectos autónomos y no autónomos de vestigial sobre la proliferación celular son continuos a lo largo del eje de crecimiento próximo-distal

El tamaño de los clones que sobrepresan *vg* y de sus clones gemelos varía de forma continua a lo largo de todo el eje P/D del ala (Fig. 33A, B, D, E; 34A, E). Su tamaño aumenta a medida que se alejan del borde D/V del ala (Fig. 34D, E). Estos resultados indican una acción de *vg* sobre la proliferación celular continua a lo largo de todo el eje P/D, con carácter autónomo y no autónomo. La correlación de estos resultados con el patrón de expresión endógeno del gen sugiere su implicación funcional en la asignación posicional de las células del ala en el eje de crecimiento P/D. En este contexto, las diferencias en la cantidad de proteína Vg entre células vecinas podrían modular la tasa de proliferación celular de forma autónoma y no autónoma (ver discusión).

4.3.2.5 La expresión de vestigial también se requiere para el crecimiento del eje antero-posterior

Aunque el tamaño de los clones de sobrepresión de *vg* no cambia en función de su posición en el eje de crecimiento A/P (Fig. 34G), su falta y exceso de función también puede reducir el crecimiento en el eje A/P del ala (Fig. 26, 27, 29, 35A). Estos resultados sugieren la implicación de *vg* en el control de la proliferación celular en el eje A/P. Los efectos de *vg* sobre el crecimiento del eje A/P son más débiles que sobre el eje P/D; posiblemente porque sólo se expresa de forma heterogénea en ese eje de crecimiento al final del desarrollo larvario.

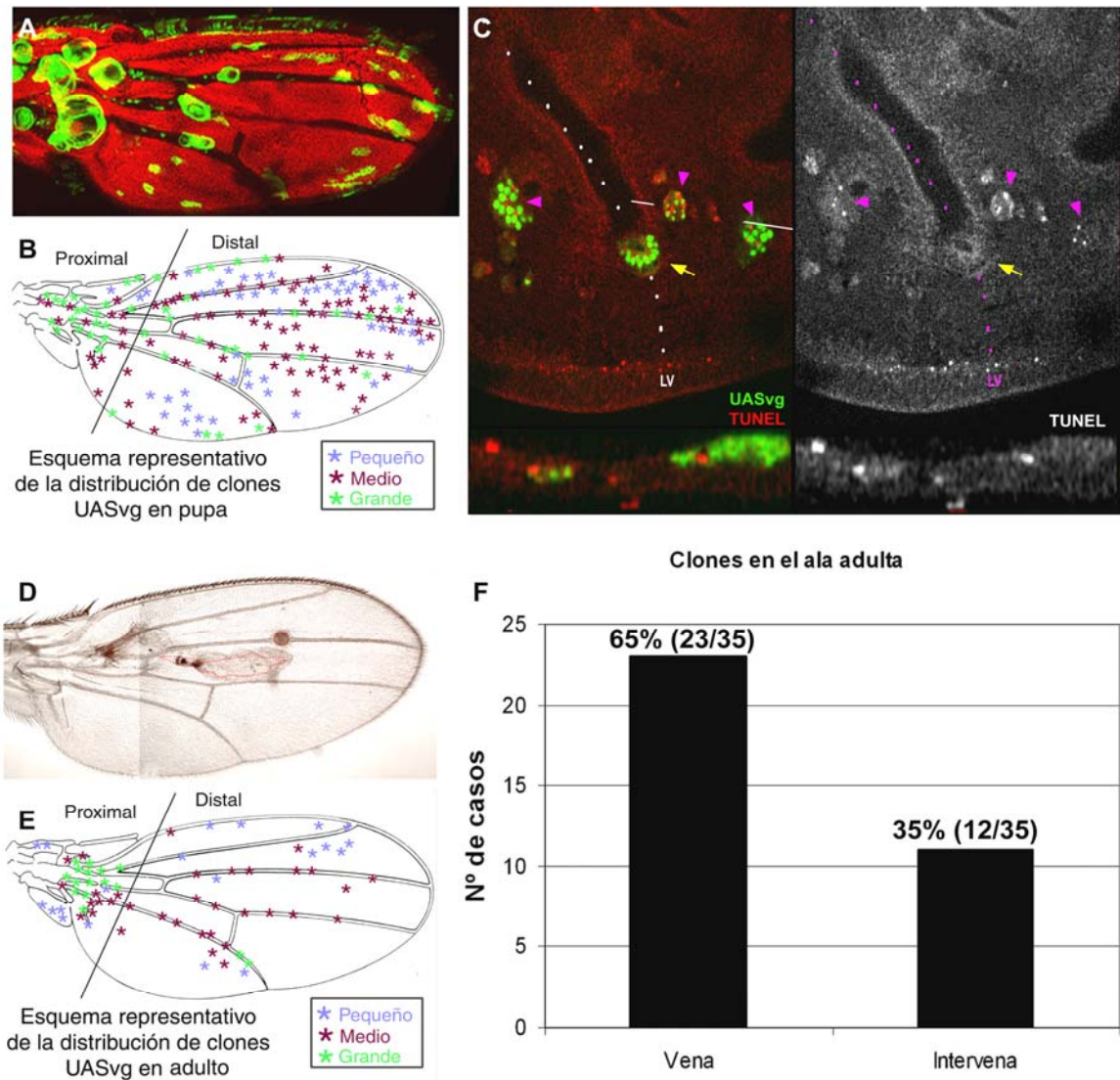


Figura 33. El tamaño y la frecuencia de clones de sobreexpresión de *vg*, durante el desarrollo pupal y adulto, es diferente en función de la posición en la que aparecen. (A, B) Los clones de sobreexpresión de *vg*, durante el desarrollo pupal, tienen un tamaño mayor cuanto más proximales aparecen. También son más grandes si aparecen sobre los presuntivos territorios de vena que en los de intervena (Plot en B). (C) La reducción en el tamaño de los clones que aparecen sobre las intervenas (puntas de flecha en color púrpura) está correlacionada con un aumento de la muerte celular (marcaje de TUNEL en rojo o blanco). (D-E) Los efectos que tiene la sobreexpresión de *vg* (clones está delimitados por un punteado rojo en D) sobre el crecimiento y la viabilidad celular se manifiestan de forma más evidente en el tejido adulto. (F) Frecuencia de clones que aparecen sobre las venas o intervenas en el tejido adulto. Las células mutantes están marcadas en alas pupales mediante GFP (verde) (A y C) y en la cutícula adulta (D) por la mutación *f*.

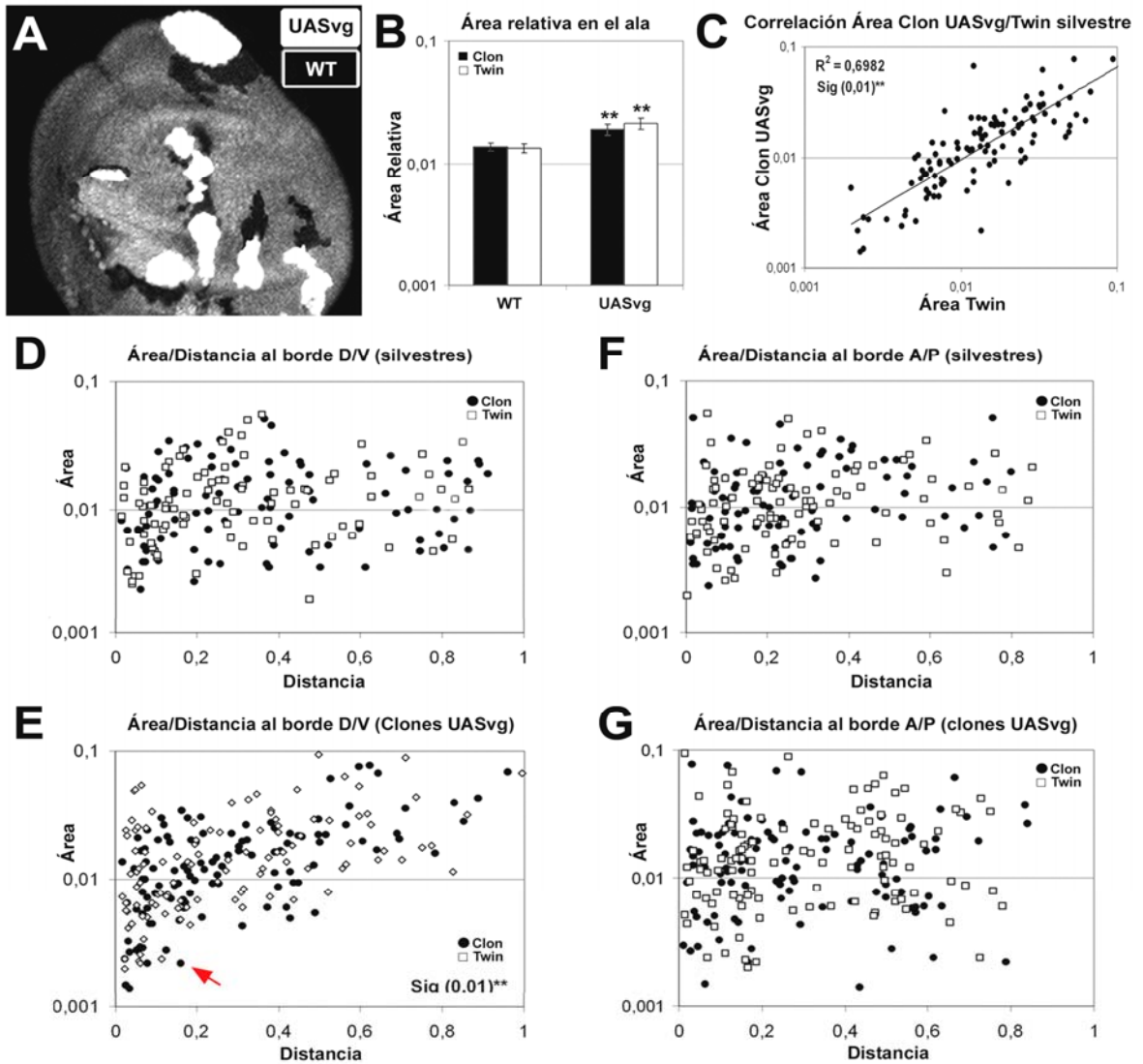


Figura 34. La sobreexpresión clonal de *vg* provoca cambios, autónomos y no autónomos, en el crecimiento del ala a lo largo de todo el eje P/D, durante el desarrollo larvario. (A) Ejemplo de clones de sobreexpresión de *vg* (2xGFP, blanco intenso) y twines de células silvestres asociados (negro). (B) El tamaño de los clones de sobreexpresión de *vg* y sus twines asociados es mayor que los controles si se consideran todos los casos (el n siempre es mayor de 50). (C) El tamaño de los twines, compuestos por células silvestres, está altamente correlacionado con el de clones de sobreexpresión de *vg*. (D) En la condición control el tamaño de los clones y twines no se modifica en función de la posición en la que aparezcan en el ala. (E) El tamaño de los clones de sobreexpresión de *vg* y de sus twines asociados aumenta de forma continua a medida que se alejan del borde D/V del ala. Observar también que los clones que aparecen muy cerca del borde D/V pueden ser más pequeños que los controles (flecha roja en E). (F) El tamaño de los clones y twines control es independiente de la posición en la que parecen en el eje A/P. (G) A diferencia del eje P/D, los clones de sobreexpresión de *vg* y sus twines no tienen modificado su tamaño por la posición en la que aparecen en el eje A/P. Los asteriscos indican significación estadística con un 99% de confianza.

4.3.2.6 La expresión de vestigial podría modular el crecimiento del eje antero-posterior afectando la diferenciación de territorios de vena e intervena

La especificación de los territorios de vena e intervena, desde la mitad del tercer estadio larvario, y su diferenciación pupal es necesaria para el crecimiento del ala (González-Gaitan et al., 1994; Milán and Cohen, 2000). La cantidad de Vg en los presuntivos territorios de vena es superior que en los territorios de intervena desde que comienza su especificación genética (Fig. 9A, B). Esta heterogeneidad en el patrón de expresión se mantiene durante la pupación (Fig. 9C). La sobreexpresión territorial o clonal de *vg*, cuando se realiza sobre los territorios diferenciados como venas o en los borde de las mismas, puede ampliar el territorio diferenciado como vena (Fig. 35A; 36A; 38A, B). Esta circunstancia además está correlacionada con la ampliación del dominio de expresión de marcadores genéticos de vena como *Ser*, *Dl* *vgQE*, *ve* (Fig. 36B, C; 38C, E, F) y una mayor supervivencia de las células que sobreexpresan *vg* en los territorios diferenciados como vena (Fig. 33C,E; 35B). Sin embargo, la sobreexpresión de *vg* no es capaz de transformar por sí misma el programa de desarrollo completo de las intervenas; sólo reduce el nivel de expresión algunos de sus marcadores como *Bs* (Fig. 36B, C; 37A, B; 38B). De forma contraria, la sobreexpresión del RNAi de *vg*, dirigida por *shvG4* en la venas durante el desarrollo pupal, impide su diferenciación adecuada. Estos resultados sugieren que altos niveles de expresión de Vg forman parte de la combinatoria génica necesaria para especificar y diferenciar correctamente los presuntivos territorios de vena. La falta de función de *vg*, en un fondo genético hipomorfo para *bs*, reduce su expresión desde el final del desarrollo larvario (Fig. 37A, C). La reducción de la expresión de *bs* se manifiesta de forma más fuerte durante el período pupal y permite la diferenciación de venas ectópicas en las intervenas (Fig. 39A, B). Sin embargo, las venas ectópicas nunca tienen una diferenciación completa como vena; sus células están menos empaquetadas y pigmentadas (Fig. 39C, D). Estos resultados sugieren que la diferenciación adecuada de las intervenas requiere niveles moderados de expresión

Vg. Considerando los resultados de falta de función y sobreexpresión de *vg* se puede concluir que existe un requerimiento funcional del gen dependiente de dosis y posición para la especificación y diferenciación adecuada de las venas e intervenas. Sin embargo, es difícil discernir si los efectos de Vg sobre el crecimiento en el eje A/P son el resultado de su acción sobre la diferenciación o la asignación posicional de ese eje (ver discusión).

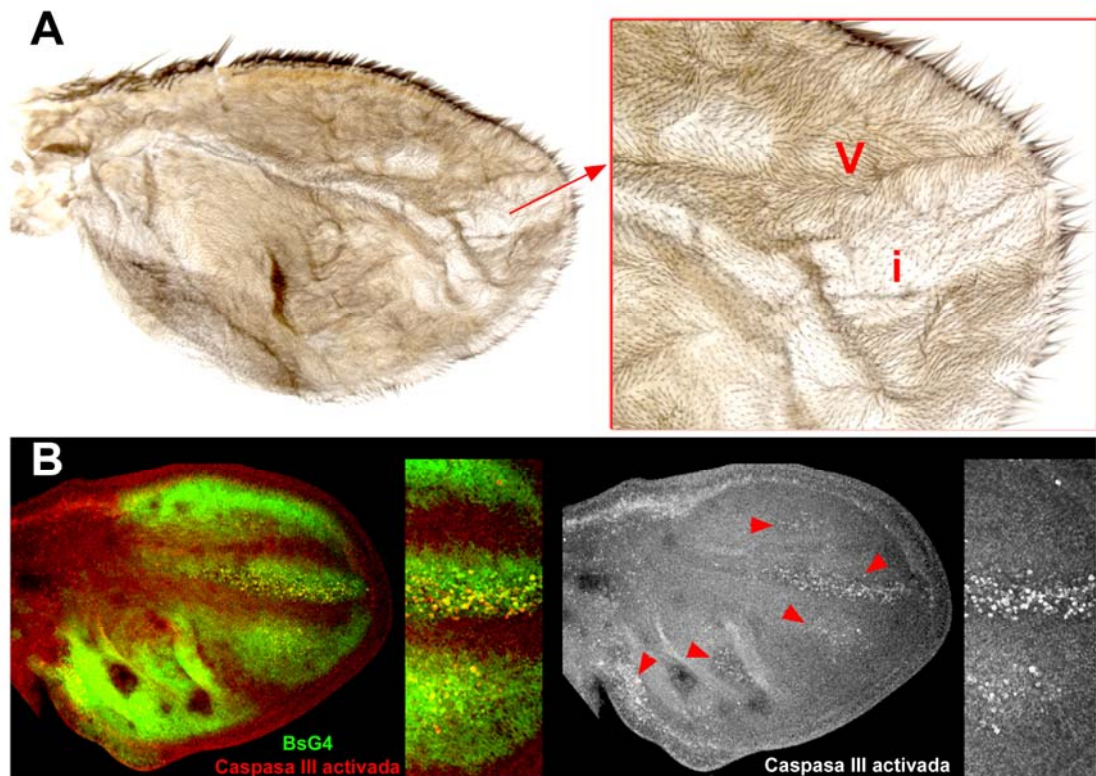


Figura 35. La sobreexpresión de *vg*, dirigida con BsG4 a 25°, disminuye el crecimiento en el ala y promueve la diferenciación de vena. (A) La sobreexpresión de *vg*, dirigida con BsG4, reduce el tamaño del ala, pero aumenta el tamaño de los territorios diferenciados como tejido de vena. (B) La reducción de los territorios diferenciados como intervena (ver detalle en A), está correlacionada con un aumento de muerte celular (marcaje de Caspasa III activada en rojo o blanco) durante el desarrollo pupal (las intervenas están marcadas en verde por BsG4). BsG4 se expresa en todas las intervenas del ala desde la mitad del tercer estadio larvario.

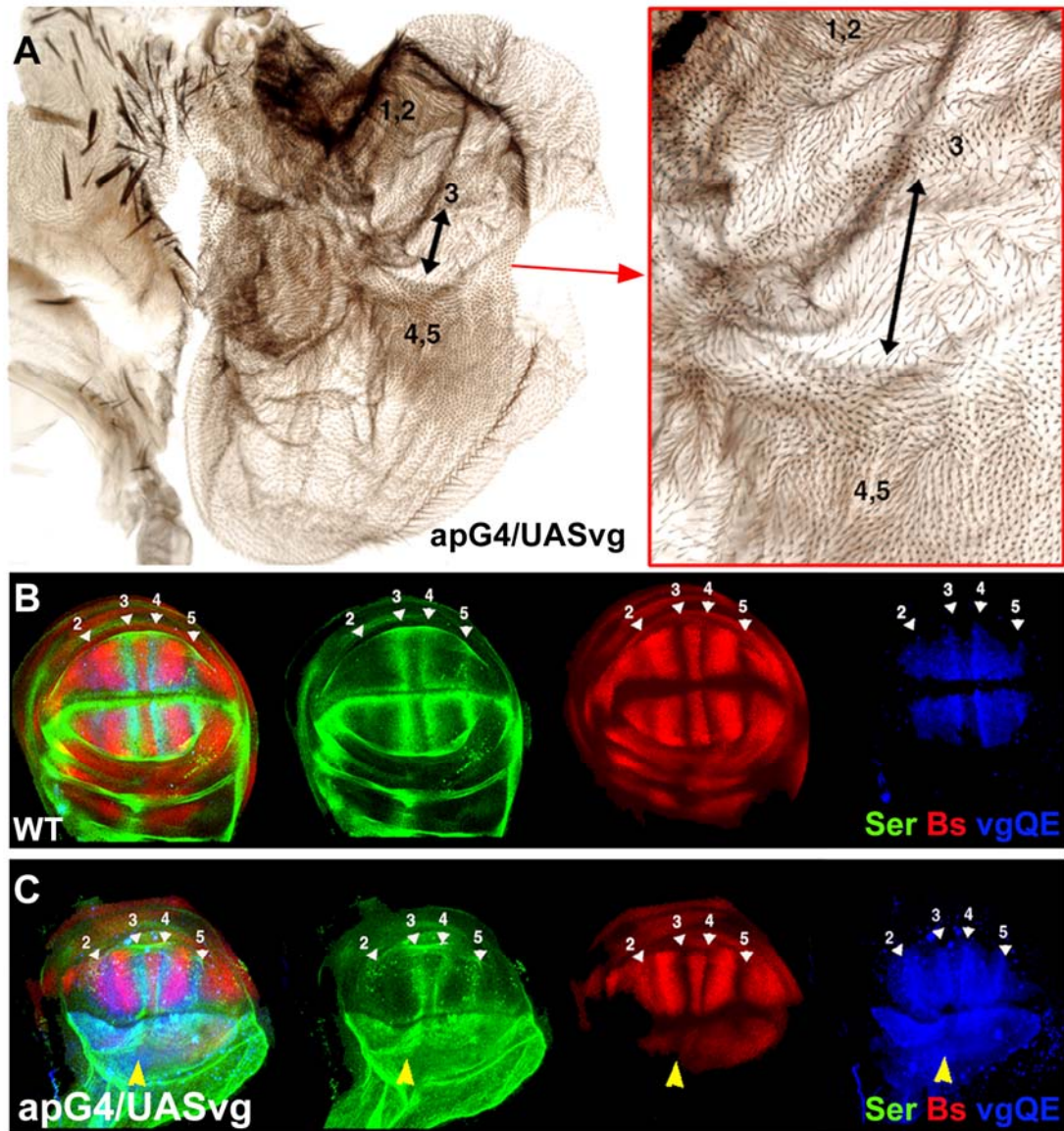


Figura 36. La sobreexpresión de *vg*, dirigida con *apG4*, disminuye el crecimiento en el ala y promueve la diferenciación de vena. (A) La sobreexpresión de *vg*, dirigida con *apG4* en la superficie dorsal del ala, aumenta el tamaño de los territorios diferenciados como tejido de vena. (B) Expresión de marcadores genéticos característicos de vena (*Ser* en verde y *vgQE* en azul) e intervena (*Bs* en rojo) en discos imaginales control. (C) La expansión de los territorios diferenciados como vena en el tejido adulto, está correlacionada con una expansión de los marcadores genéticos de vena (*Ser* en verde y *vgQE* en azul) y una reducción de la expresión de los de intervena (*Bs* en rojo), en los discos imaginales.

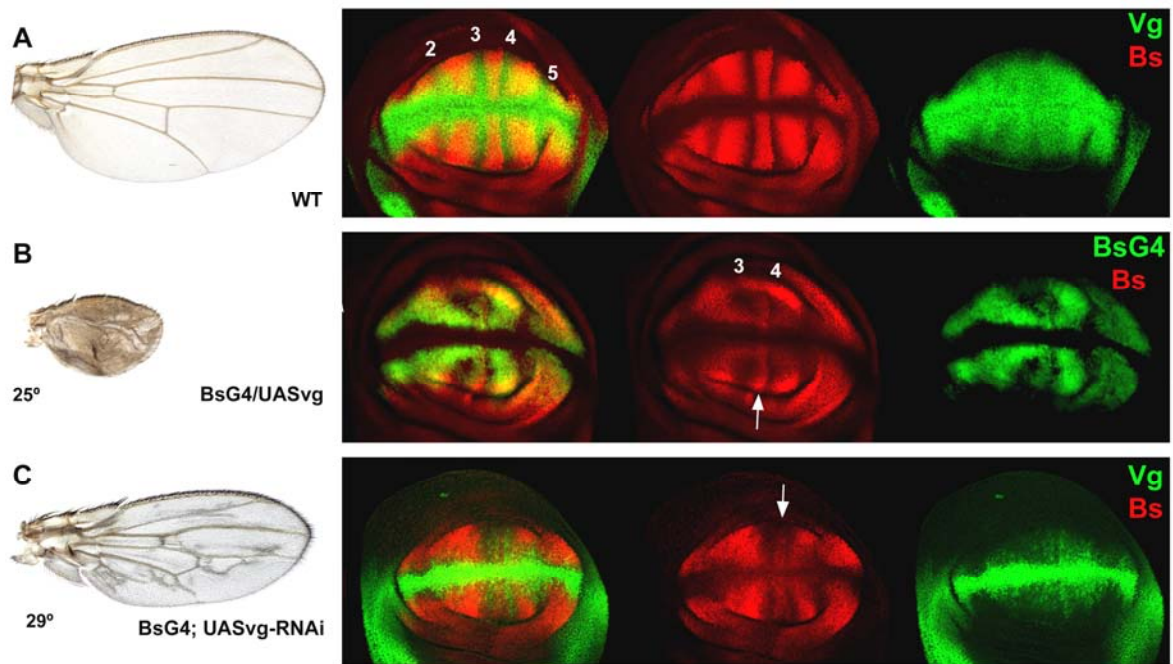


Figura 37. La diferenciación adecuada de los territorios de venas e intervenas requiere un nivel de expresión de Vg diferente desde el final del desarrollo larvario. (A) Condición silvestre, expresión de Vg (verde) y Bs (rojo). (B) La sobreexpresión de *vg*, dirigida con BsG4 (verde), aumenta el tamaño de los territorios diferenciados como tejido de vena y disminuye la expresión de marcadores genéticos característicos de intervena (Bs en rojo). (C) La insuficiencia para Vg (verde), generada con la sobreexpresión de la construcción UASvg-RNAi, también disminuye los niveles de expresión de Bs (rojo). Es importante destacar que BsG4 es una inserción que genera un alelo mutante hipomorfo para Bs y, por tanto, todo el experimento está realizado sobre un fondo genético sensibilizado. En un fondo silvestre la sobreexpresión de *vg* o de su construcción RNAi no altera la expresión de Bs de forma tan manifiesta. BsG4 se expresa en todas las intervenas del ala desde la mitad del tercer estadio larvario.

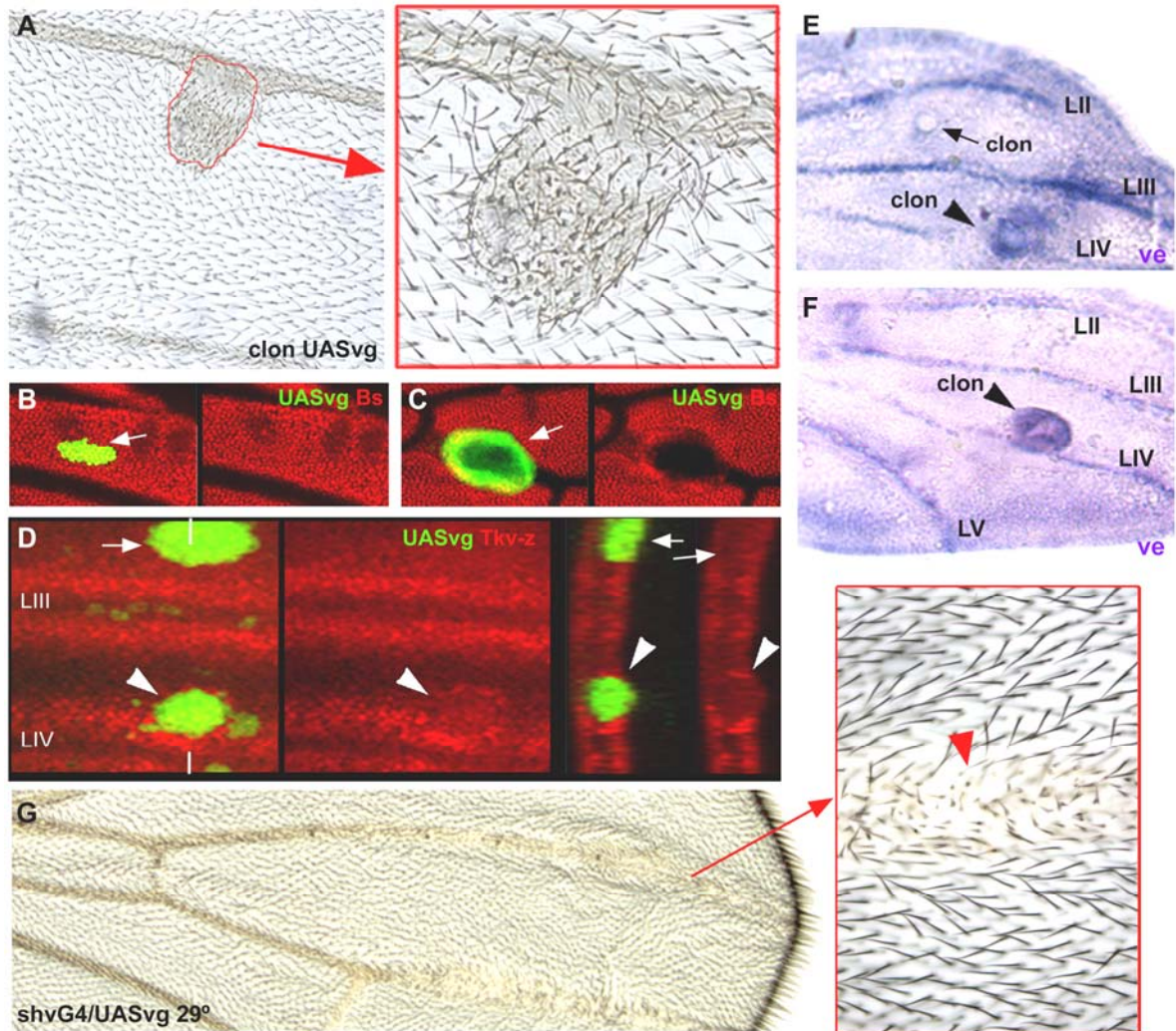


Figura 38. La diferenciación adecuada de las venas durante el desarrollo pupal requiere altos niveles de expresión Vg. (A, B) Los clones de sobreexpresión de *vg*, que crecen sobre las venas o adyacentes a ellas, expanden la diferenciación del territorio de vena, pero no pueden reprimir la expresión de Bs en las intervenas (rojo en B). (C-F) La expansión de los territorios de vena está correlacionada con la represión de Bs (rojo en C) y *thickvein* (*tkv*) (rojo en D y clon señalado con punta de flecha blanca). La expansión de la diferenciación de vena está correlacionada con la expansión de la expresión de *veinlet* (*ve*) (azul intenso en E y F). Las puntas de flecha señalan clones que expanden la diferenciación de vena y la expresión de *ve* (E y F), mientras que la flecha indica un clon en la intervena que no es capaz de inducir la expresión ectópica de *ve* (E). Las células mutantes están marcadas en la cutícula adulta (A) por la mutación *f* y en las alas pupales mediante GFP (verde). (G) La sobreexpresión de UASvg-RNAi, dirigida por *shvG4* a 29°, impide la diferenciación adecuada de las venas. Observar que la pigmentación, compactación y diferenciación de los tricomas mutantes es anómalo (ver detalle en G). *shvG4* se expresa durante el desarrollo pupal en la parte distal de las venas.

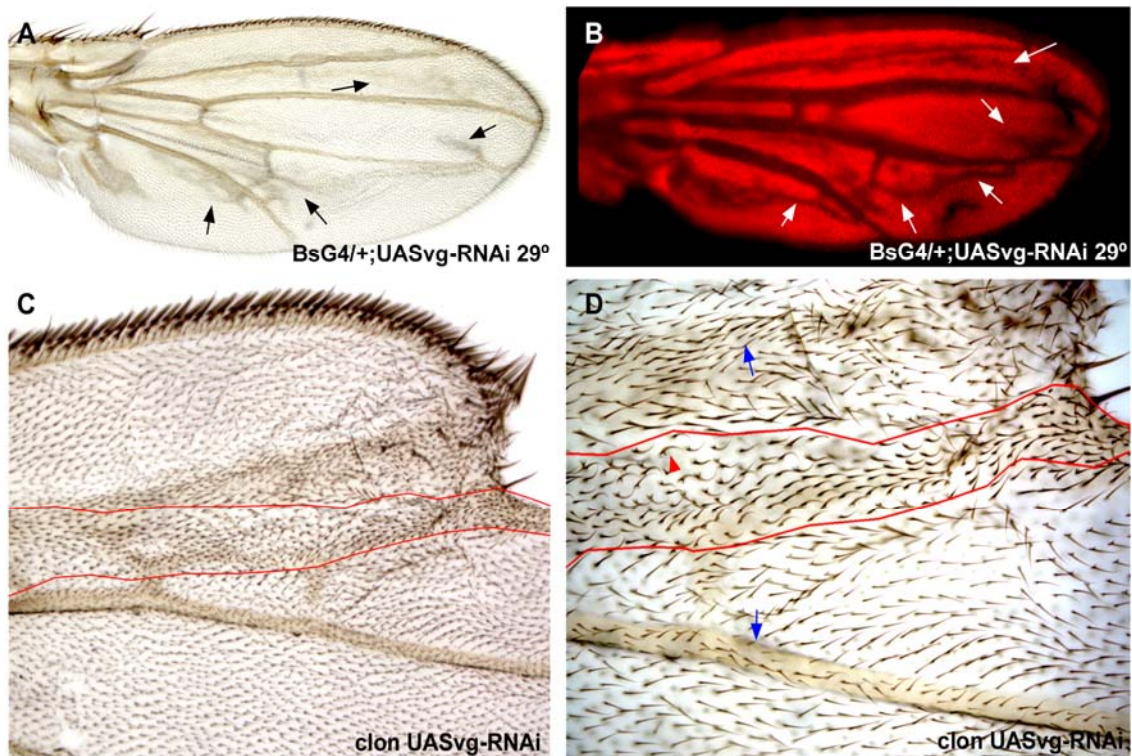


Figura 39. La diferenciación adecuada de las intervenas requiere niveles moderados de expresión Vg. (A y B) La sobreexpresión de la construcción RNAi de *vg*, dirigida por *BsG4* a 25°, provoca la diferenciación ectópica de venas en los territorios de intervena (flechas negras en A) y la represión de *Bs* (rojo en B). (B, D) Los clones de sobreexpresión de la construcción *UASvg-RNAi* confirman lo descrito en A y B. Sin embargo, la diferenciación de las venas ectópicas como tejido de vena es incompleta (D); no tienen la pigmentación y el grado de compactación (punta de flecha roja en D) característico de los territorios diferenciados como vena (flechas azules en D). Las células mutantes en los clones (C y D) están marcadas por la mutación *f*. *BsG4* se expresa en todas las intervenas del ala desde la mitad del tercer estadio larvario.

4.3.2.7 Contribución del desarrollo pupal a los fenotipos de falta de crecimiento provocados por variaciones en la expresión de *vestigial*

Muchas mutaciones que afectan la proliferación o la especificación genética durante el desarrollo larvario, no se manifiestan en el ala adulta por la capacidad de recuperación que conserva el ala durante el período pupal. Esta circunstancia se ha observado en experimentos en los que determinados fenotipos larvarios son corregidos, durante el desarrollo pupal, por modificaciones en la tasa de proliferación y muerte celular (Milán et al., 1997). Los resultados obtenidos durante los estadios

larvarios indicaban un efecto de *vg* sobre el crecimiento del ala asociado a cambios en la proliferación celular. Para determinar la contribución del desarrollo pupal a los fenotipos adultos, se ha hecho un seguimiento de las diferentes formas de sobreexpresión (clonal o territorial) durante ese período de desarrollo. A diferencia de lo que ocurre durante el desarrollo larvario, la sobreexpresión de *vg*, dirigida por diferentes G4 (apG4 o BsG4) durante el período de desarrollo pupal, provoca muerte celular (Fig. 35). La sobreexpresión clonal de *vg* también produce muerte celular durante el desarrollo pupal (Fig. 33A, C). Esta circunstancia reduce notablemente el número de clones que aparecen en el ala adulta si se compara con las alas pupales (Fig. 33A, B, D, E), aunque se sobreexpresen junto a *vg* inhibidores de apoptosis (*P35*) (no mostrado). Las tinciones con marcadores de muerte celular (Caspasa III activada o TUNEL) (Fig. 35B) y el plot de clones de sobreexpresión en el ala adulta (Fig. 33E) también indican que las células que sobreexpresan *vg* tienen una viabilidad superior en los presuntivos territorios de vena que en los de intervena (ver punto 4.3.2.6). En un fondo genético en el que se ha inhibido de forma permanente la apoptosis a la vez que se sobreexpone *vg*, se ha estimado que la muerte celular contribuye en un 7% a la falta de crecimiento observada en el ala adulta (Fig. 32D-F).

A diferencia del desarrollo larvario, la sobreexpresión de *vg* durante el desarrollo pupal disminuye en un 8,5 % el tamaño celular (Fig. 28C); pero esta circunstancia tampoco explica las grandes reducciones de tamaño observadas en las alas adultas (44% con SalG4, ver Fig 32E). Estas variaciones en el tamaño celular podrían estar correlacionadas con la diferenciación ocasional como tejido de vena de las células mutantes (Fig. 35, 36, 37B, ver punto 4.3.2.6). El conjunto de resultados indican que los cambios en la proliferación celular durante el desarrollo larvario son los principales responsables (28%) de las reducciones de tamaño (44%) observadas en las alas adultas (Fig. 32F).

4.3.3 La expresión de vestigial afecta la proliferación celular modulando el ritmo de proliferación celular

Una vez demostrada la capacidad de *vg* para modificar la tasa de proliferación celular se ha intentado determinar de qué forma actúa sobre el ciclo celular. Los trabajos precedentes centraban el efecto de *vg* sobre el ciclo celular en una aceleración de la transición de G1 a S, acompañada de un incremento de la transcripción de su regulador principal, dE2F-1 (Delanoue et al., 2004). Sin embargo, los resultados que se muestran a continuación sugieren que la expresión de *vg* podría modular la longitud del ciclo celular más que un paso concreto del mismo.

4.3.3.1 La reducción o el incremento de la proliferación no es una consecuencia de alteraciones puntuales sobre un paso concreto del ciclo celular

Para determinar los efectos de *vg* sobre el ciclo celular, se ha realizado el análisis de FACS en condiciones de falta de función y sobreexpresión de *vg*. El perfil de ciclo celular observado en las sobreexpresiones de *vg* es igual cuando reducen (DIIG4 o salG4/UAS*vg*) o aumentan (apG4/UAS*vg* incrementa la proliferación en las partes proximales del ala) la proliferación celular (Fig. 40). En ambos casos se detecta una aceleración de la transición de G1 a S y un retraso de la transición de G2 a M (Fig. 40 A-C). Este resultado demuestra que los efectos de *vg* sobre el crecimiento no se deben a su acción sobre un paso concreto del ciclo celular. De acuerdo con ese hecho, la falta de función para *vg* reduce el crecimiento en las partes distales del ala sin alterar el perfil del ciclo celular (Fig. 40D).

4.3.3.2 La reducción o el incremento del crecimiento se debe a cambios en el ritmo de proliferación celular

Puesto que la acción sobre un paso concreto del ciclo celular no explicaba el exceso o la falta de crecimiento provocados por los cambios en la expresión de *vg*, se evaluó la acción de la proteína sobre la longitud del ciclo celular.

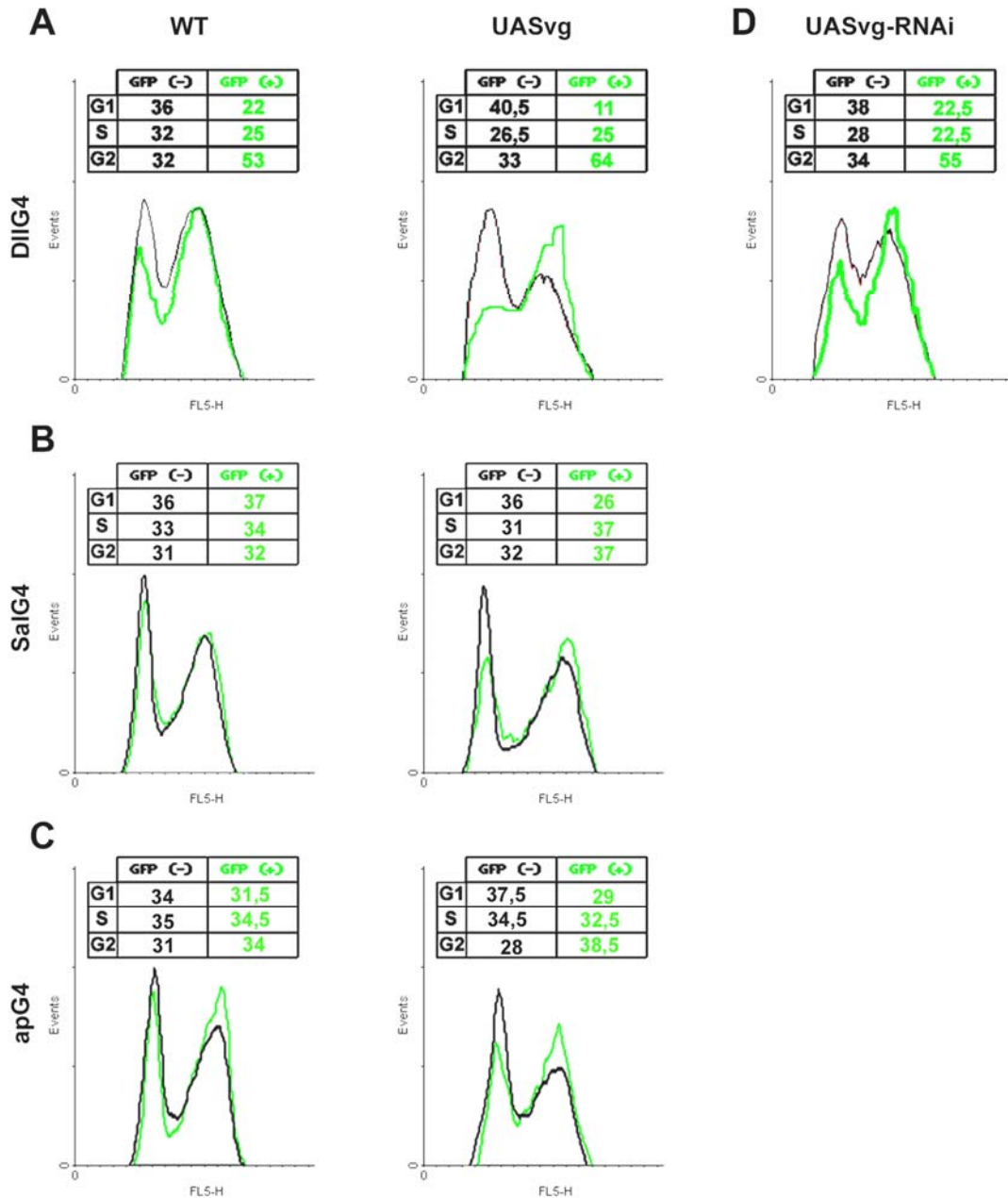


Figura 40. Los efectos de *vg* sobre la proliferación celular no se deben a cambios en el perfil de ciclo celular. Análisis de FACS en discos imaginales de recogidos a las 72-96h AEL. (A, B, C) La sobreexpresión de *vg*, independientemente de su efecto sobre el crecimiento (promueva o reduzca), acelera la transición de G1 a S del ciclo celular y retrasa la transición de G2 a M. (D) La falta de función de *vg* no modifica el perfil de ciclo celular. En todos los casos las células mutantes son GFP positivas (líneas y valores verdes). *salG4* se expresa, durante el desarrollo larvario, en los territorios distales del ala comprendidos entre LII y LV. *apG4* se expresa en todo el compartimento dorsal del ala. *DIIG4* se expresa en casi la totalidad de las partes distales del ala a ambos lados del borde D/V.

Para ello se ha comparado la velocidad con la que se duplica una población de células silvestres y otra que sobrepresan *vg*, en diferentes partes del ala (cálculo de “cell doubling time”). Los datos obtenidos muestran que la sobrepresión de *vg* acelera, autónoma y no autónomamente, la división celular en las partes proximales del ala si se compara con las partes distales (Fig. 41A). Este resultado resuelve la paradoja que suponía obtener diferentes efectos sobre el crecimiento en distintas partes del ala bajo un mismo perfil de ciclo celular. La falta de crecimiento asociada a la sobrepresión de la construcción RNAi de *vg* también está correlacionada con una reducción de la velocidad de división (Fig. 41B). Estos resultados indican que *vg* modula el crecimiento actuando sobre el ritmo de proliferación celular, y no sobre un paso concreto del mismo. Apoyando lo expuesto se han observado dos hechos adicionales; 1) la expresión de reguladores de un único paso del ciclo celular sólo rescata parcialmente la falta de crecimiento provocada por la sobrepresión de *vg* (Fig. 42A, B); 2) *vg* promueve la expresión de reguladores de todas las fases del ciclo celular (*dE2F-1*, *PCNA*, *RNR2*, *DHFR*, *stg*) (Fig. 42C).

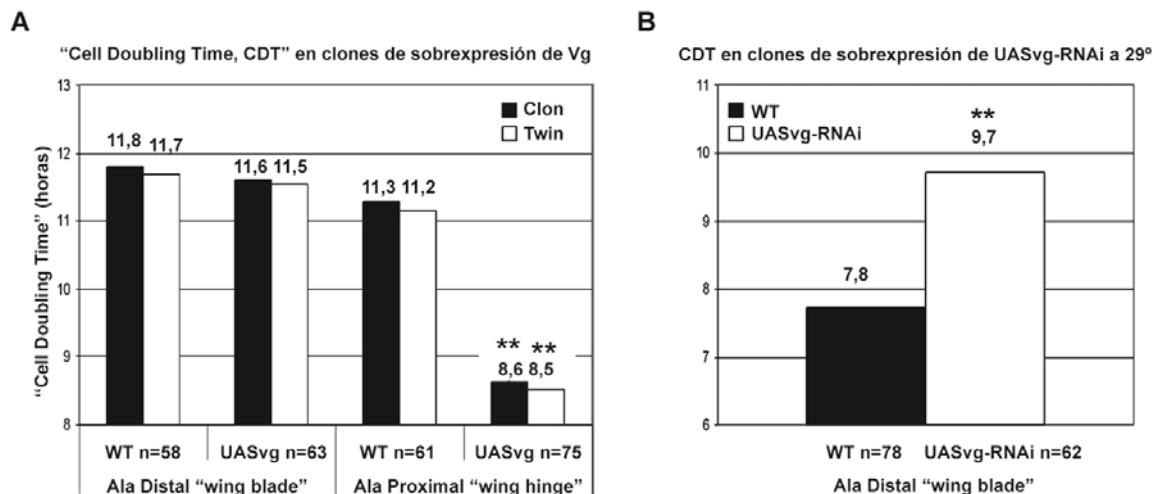


Figura 41. Cambios en la expresión de *vg* modifican la tasa de proliferación celular; acortan o aumentan el “cell doubling time” de forma autónoma y no autónoma. (A) La sobrepresión de *vg* promueve más proliferación celular en las partes proximales del ala porque reduce, autónoma y no autónomamente, el tiempo que tarda una célula en dividirse. (B) La insuficiencia para *vg* aumenta el tiempo que tarda una célula en dividirse en las partes distales del ala. Los asteriscos indican significación estadística con un 99% de confianza.

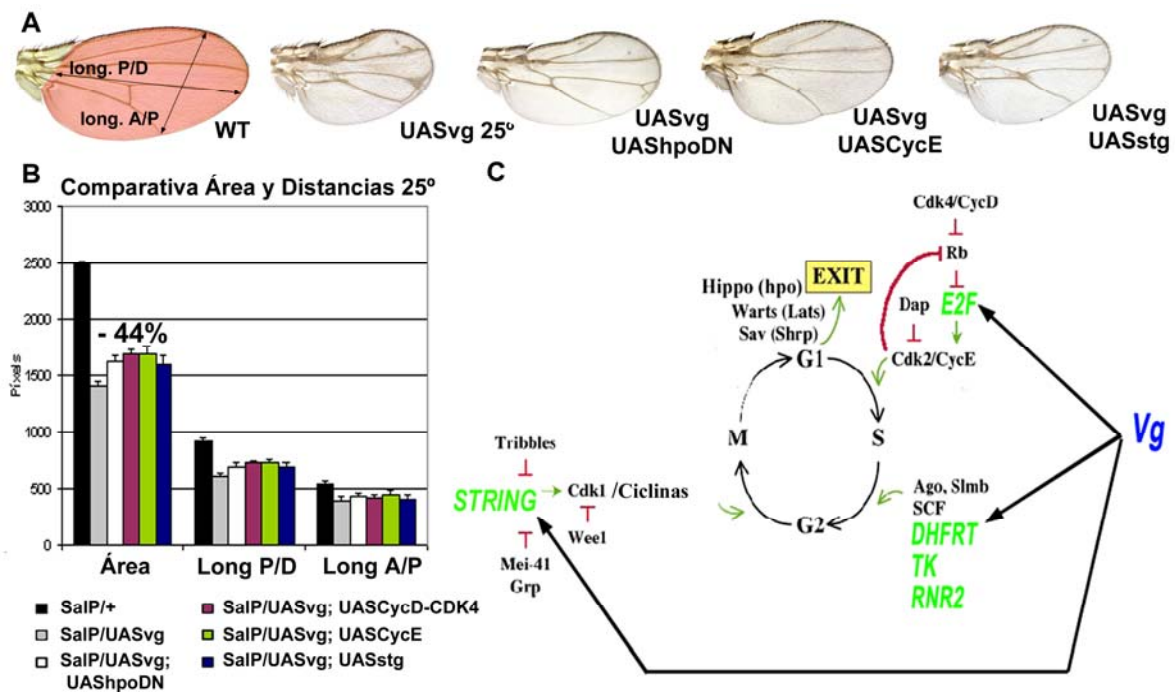


Figura 42. La falta de crecimiento, provocada por la sobreexpresión de *vg*, sólo se rescata parcialmente con la sobreexpresión de diferentes reguladores del ciclo celular. (A) Fenotipos producidos por la sobreexpresión de *vg* y diferentes reguladores del ciclo celular, con SalG4 a 25°. (B) Resumen de medidas tomadas en cada condición mutante. (C) Esquema del ciclo celular en el que se indica la acción de *vg* sobre diferentes reguladores de cada paso del ciclo celular (modificado de (Lee and Orr-Weaver, 2003)). El área medida en las diferentes condiciones experimentales está sombreada en rojo en A. Las distancias medidas están indicadas con flechas en A. *salG4* se expresa, durante el desarrollo larvario, en los territorios distales del ala comprendidos entre LII y LV.

4.3.4 La expresión heterogénea de *vestigial* a lo largo del eje próximo-distal es requerida para dar forma a las partes distales del ala

La forma final de un órgano es un reflejo del crecimiento clonal (Resino et al., 2002). Recientemente, hemos demostrado que la forma de los clones está fuertemente determinada por la orientación del eje de división mitótico (Baena-López et al., 2005). Al igual que otras funciones celulares la orientación del eje de división, presumiblemente, depende del valor posicional que adquiere cada célula dentro de un órgano. Teniendo en cuenta que la expresión heterogénea de *vg* podría estar relacionada con la asignación posicional en las partes distales del ala, nos

preguntamos si también estaría relacionada con la orientación del eje de división mitótico.

4.3.4.1 La expresión heterogénea de vestigial es requerida para mantener la división celular preferentemente orientada a lo largo del eje de crecimiento próximo-distal

La sobreexpresión de *vg* dirigida con diferentes G4 (*apG4*, *salG4*, *nubG4*) modifica significativamente la forma final del ala (Fig. 29). Estas variaciones en la forma del ala, a su vez, están correlacionadas con cambios en la tendencia de crecimiento clonal (Fig. 43A, B). Por último, se observa una clara correlación entre los cambios en el crecimiento clonal y la pérdida de la preferencia en la orientación de la división (Fig. 43C, D). Estos resultados sugieren que las heterogeneidades del patrón de expresión endógeno de *vg* son requeridas para mantener la división preferentemente orientada en las partes distales del ala.

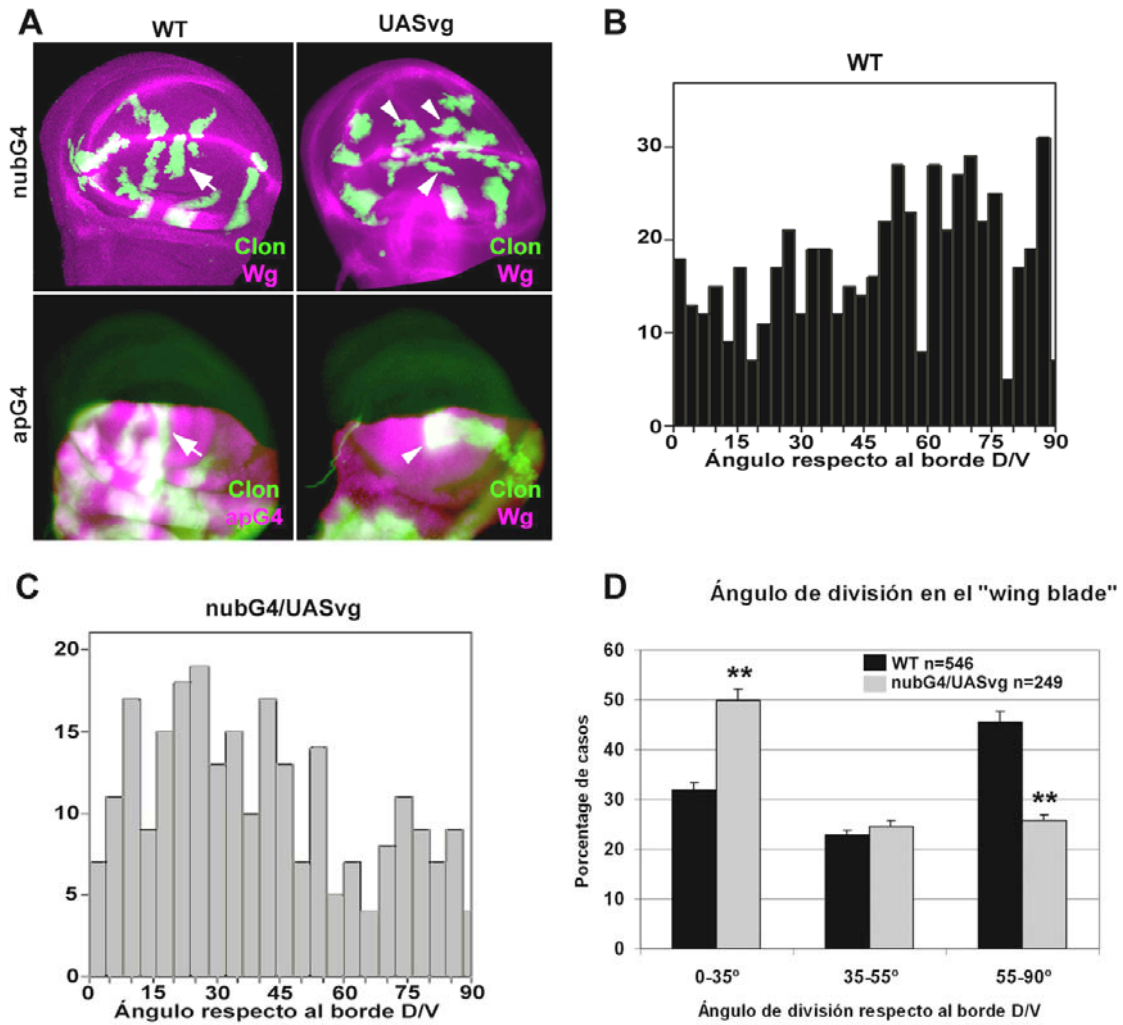


Figura 43.

La sobreexpresión de *vg* altera la orientación de la división celular en las partes distales del ala, y por tanto, la forma del ala. (A) La forma de los clones es anómala en diferentes condiciones de sobreexpresión de *vg*; comparar el crecimiento P/D característico de un fondo silvestre (flechas blancas) y el perturbado que muestran diferentes condiciones de sobreexpresión de *vg* (puntas de flecha blancas). (B) Histograma que muestra la orientación de la división en un fondo silvestre. (C) Histograma que muestra la orientación de la división en un fondo genético *nubG4/UASvg* (D). Comparación por categorías de la orientación de la división en una condición silvestre y un fondo genético de sobreexpresión de *vg*. Los asteriscos indican significación estadística positiva con un 99% de confianza. *nubG4* se expresa por todo el ala. *apG4* se expresa en el compartimento dorsal del ala.

4.3.5 La función de *scalloped* no es comparable a la de *vestigial* o el complejo *Vg-Sd*

Sd es la proteína con capacidad de unión al DNA a través de la cual ejerce su función *Vg*. Al igual que la insuficiencia para *vg*, su falta de función provoca letalidad celular en las partes distales del ala (Campbell et al., 1991). Sin embargo, la sobreexpresión de *sd* no se comporta como la sobreexpresión de *vg*, ni en el ala ni en otros tejidos (Liu et al., 2000; Simmonds et al., 1998). Así, se observa que la sobreexpresión de *sd* en vez de aumentar la transcripción de *Vg*, tal y como hace *Vg* (Fig. 44), disminuye su expresión (Fig. 45A).

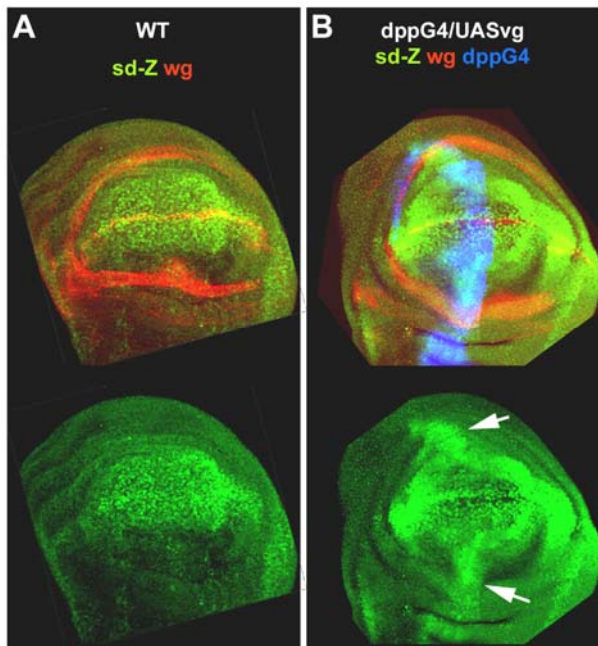


Figura 44. La sobreexpresión de *vg* promueve la expresión de *sd*. (A) Expresión de *sd* (en verde) en el ala en un fondo genético silvestre. (B) La sobreexpresión de *vg*, dirigida con *dppG4* (azul), induce la expresión de *sd* (verde) en las partes proximales del ala (flechas blancas).

Tampoco provoca transformaciones de tejido ni sobrecrecimientos. Es más, induce muerte celular en el ala (Liu et al., 2000) de una forma dependiente de dosis (Fig. 45B,C). Así, se observa que las reducciones en el tamaño del ala provocadas por la sobreexpresión de *sd* sólo se rescatan por genes capaces de inhibir la muerte celular (Fig. 45C) (Adachi-Yamada and O'Connor, 2002; Martín-Blanco et al., 1998; Milán et al., 2002; Moreno et al., 2002). Estos datos sugieren que, aunque la presencia de *Sd* es un requerimiento esencial para la función del complejo *Vg-Sd*, la especificad

funcional depende de Vg. También indican que la sobreexpresión de Sd modifica la estequiometría del complejo Vg-Sd por encima de su nivel de autorregulación, provocando efectos deletéreos en las células del ala. En ese contexto los fenotipos de sobreexpresión de Vg sólo pueden interpretarse como una consecuencia de la acción funcional del complejo Vg-Sd (Halder et al., 1998; Simmonds et al., 1998; Vaudin et al., 1999). Por último, se puede concluir que Sd no es funcionalmente comparable a Vg, o lo que es lo mismo, al complejo Vg-Sd.

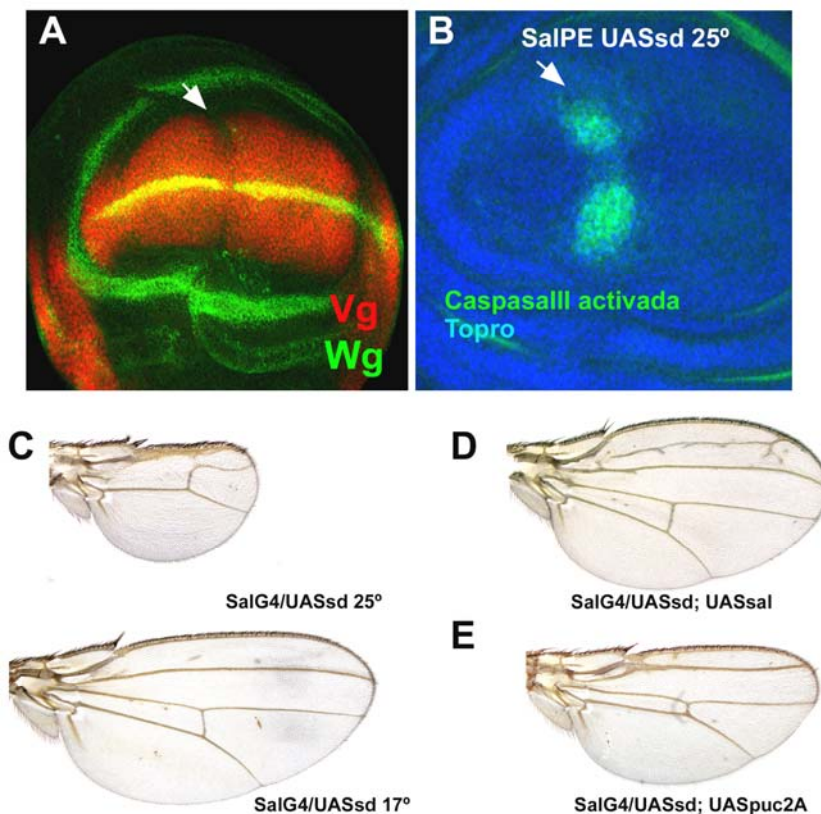


Figura 45.

La sobreexpresión de *sd* reduce la expresión de Vg y provoca muerte celular. (A) La sobreexpresión de *sd*, dirigida con *ptcG4*, reduce la expresión de Vg (rojo) en las partes distales del ala. (B) También provoca muerte celular (marcaje positivo con Caspasa III activada en verde) cuando se

sobreexpresa con SalG4 a 25°. (C) El efecto sobre la viabilidad celular de la sobreexpresión de *sd* es dosis dependiente y se reduce cuando se disminuye la temperatura de desarrollo a 17°. (D, E) Los fenotipos provocados por la sobreexpresión de *sd* pueden corregirse si se sobreexpresan genes capaces de bloquear la muerte celular en el ala. *salG4* se expresa, durante el desarrollo larvario, en los territorios distales del ala comprendidos entre LII y LV. *ptcG4* se expresa como *dppG4* (ver Fig.31B).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 El desarrollo del ala está dirigido por la función combinada de múltiples genes

La caracterización funcional del gen *ey* llevó a sugerir la existencia de una clase de genes denominada “genes maestros” o “genes selectores de tejido”, cuya actividad se propuso como suficiente para iniciar y dirigir el programa de desarrollo completo de un órgano (Halder et al., 1995; Kim et al., 1996). Aunque los paralelismos funcionales entre *ey* y *vg* llevaron a incluir al último en la categoría de “gen selector” (Kim et al., 1996), los resultados obtenidos en el trabajo no corroboran esta circunstancia.

Nuestros resultados demuestran que la expresión de *vg*, por sí misma, resulta insuficiente para iniciar y controlar el programa de desarrollo completo del ala en cualquier circunstancia (Fig. 12 y 19). La evidencia más clara, en este sentido, son las restricciones genéticas y temporales (ver punto 5.2) que tiene el proceso de transformación hacia histotipo de ala, mediado por la expresión ectópica de *vg*. Este resultado sugiere que *vg* sólo es uno dentro del conjunto de genes involucrados en la especificación genética de las partes distales del ala. Argumentos adicionales que apoyan la teoría de las combinatorias génicas aplicada a la especificación genética del ala son:

- *vg* no se expresa exclusivamente en el ala y también es necesario para la especificación genética de otros tejidos (Bernard et al., 2003; Srivastava and Bell, 2003; Zider et al., 1998).
- La mayoría de los tejidos transformados, con la sobreexpresión de *vg*, no presentan una transformación completa; aparecen tejidos mixtos en los que se combina la expresión de genes y la diferenciación de elementos cuticulares propios del ala con los del tejido de fondo (Fig. 16, 17, 18).

- Las sobreexpresiones de *vg* sólo inducen la diferenciación cuticular y la expresión, tejido-específica, de algunos de los marcadores de expresión génica característicos de las partes distales del ala (Tabla. 3).
- *vg* no regula la expresión de muchos de los marcadores genéticos característicos de las partes distales del ala (*sal* o *nub*) (Barrio and de Celis, 2004; Johnston and Sanders, 2003), aunque contribuye a su mantenimiento (Fig. 20).
- *vg* no es capaz de generar las referencias mayores necesarias para dirigir el crecimiento de un órgano (A/P y D/V), aunque puede usar las propias del tejido de fondo en determinados contextos genéticos (Fig. 10, 11).

El conjunto de datos obtenidos reafirma que el programa de desarrollo característico del ala no depende de la función de un sólo gen, sino de la combinación espacio-temporal de diferentes factores genéticos. Similares resultados se han observado estudiando el proceso de transformación mediado por la expresión ectópica de *ey* en distintos órganos (Baker et al., 2001; Kango-Singh et al., 2003; Kumar and Moses, 2001b).

5.2 Requerimientos y restricciones del proceso de transformación

El proceso de transformación, mediado por la expresión ectópica de *vg*, tiene una serie de restricciones genéticas y temporales (sección 4.2), que lo facilitan en ciertos impiden contextos genéticos y momentos del desarrollo. La búsqueda de factores genéticos que favorecen el proceso de transformación, junto con *vg*, ha dado como único candidato la expresión de *wg* (Fig. 13 y Tabla. 2). Sin embargo, la expresión conjunta de ambos genes (*wg-vg*) tampoco es capaz de dirigir el proceso de transformación en cualquier tejido/región y etapa del desarrollo. Es más, se ha observado que la expresión conjunta de ambos genes se necesita, exclusivamente y de forma transitoria, para iniciar del proceso de transformación (ver los detalles de la interacción *wg-vg* en el punto 5.3). Esta circunstancia indica que, aunque *wg* es

esencial para iniciar el proceso de transformación, existen otros factores genéticos adicionales que lo favorecen.

Una de las características llamativas del proceso de transformación es que sólo se produce en un marco temporal específico para cada órgano analizado. Esta circunstancia contrasta con hechos como 1) que las células situadas en los bordes de una herida puedan revertir su estado de diferenciación en cualquier momento del desarrollo para reparar el tejido dañado (Bosch et al., 2005; Brockes and Kumar, 2002; Gilbert et al., 1996; Johnson and Tabin, 1997; Lee et al., 2005; Maves and Schubiger, 2003; Schubiger, 1971), 2) que células con una especificación genética puedan modificar su identidad celular (**transdeterminar**) hasta etapas muy avanzadas del desarrollo (García-Bellido, 1966a; Hadorn, 1965; Lee et al., 2005; Maves and Schubiger, 2003; Schubiger, 1971), o 3) que puedan obtenerse células “troncales” partiendo de células de un tejido adulto diferenciado (Alison, 1998; Alison and Sarraf, 1998; Potten, 1998; Ulloa-Montoya et al., 2005; Watt, 1998). Todo ello sugiere varias preguntas que se plantean y discuten a continuación.

1) ¿Las restricciones asociadas al proceso de transformación, mediado por *vg*, son realmente temporales o genéticas?, 2) ¿hasta cuándo es reversible el estado de diferenciación de una célula?, 3) ¿qué factores moleculares mantienen la identidad de una célula diferenciada? La proliferación activa de las células de un tejido es esencial para que puedan producirse los procesos de regeneración y transdeterminación (García-Bellido, 1966a; García-Bellido, 1966b; Hadorn, 1965; Maves and Schubiger, 2003; Schubiger, 1973; Schweizer and Bodenstein, 1975); limitando el proceso de transformación a las etapas de mayor proliferación en un órgano. Sin embargo, las restricciones temporales, encontradas en los órganos analizados, se sitúan en momentos tempranos del desarrollo larvario (24-48h AEL), tras los cuales se produce la mayor parte de la proliferación celular de los discos imaginales. Atendiendo a este hecho se puede descartar que las restricciones del proceso de transformación sean temporales en sentido estricto. Por el contrario, la

restricción temporal estaría relacionada con el grado de especificación genética de los órganos analizados en el momento de introducir la expresión ectópica de *vg*. Considerando esta circunstancia y los datos mencionados al principio de este punto, cualquier célula parece poder modificar su identidad, a pesar de tener un alto grado de especificación genética, siempre que se den las condiciones moleculares necesarias para ello. Entre los factores moleculares que parecen influir en la plasticidad de una célula se encuentra el perfil de compactación de la cromatina, mediado por proteínas del grupo-*trithorax* (*trxG*) y *polycomb* (*PcG*) (Francis and Kingston, 2001; Katsuyama et al., 2005; Lee et al., 2005; Simon and Tamkun, 2002). Alteraciones en el perfil de condensación de la cromatina provocadas por modificaciones genéticas o experimentales son capaces de alterar la identidad de células diferenciadas (Katsuyama et al., 2005; Lee et al., 2005; Simon and Tamkun, 2002). En ese contexto, los experimentos realizados (sección 4.2) no parecen reunir los condicionantes necesarios para modificar, a partir de una cierta edad de desarrollo, el grado de especificación genética de los órganos analizados. Estas consideraciones permiten hipotetizar que la historia genética de una célula, derivada de su especificación genética progresiva, podría quedar plasmada en su perfil de condensación cromatínica.

5.3 Disección de la interacción entre *wingless* y *vestigial*

wg ha sido el único factor genético capaz de promover el proceso de transformación junto con *vg*. El sentido de la interacción entre *wg* y *vg* es doble y cambia a lo largo del desarrollo larvario. En momentos tempranos, el proceso de transformación requiere altos niveles de expresión de *wg* y *vg* para iniciarse (**interacción positiva**), mientras que, en estadíos más tardíos, la expansión de los territorios distales del ala fuera del margen D/V necesita la represión de altos niveles de *Wg* (**interacción negativa**) (Fig. 15).

La expresión conjunta de altos niveles de Wg y Vg (interacción positiva) resulta esencial para iniciar el proceso de transformación (sección 4.2) y promover el fenómeno de transdeterminación de otros tejidos (Johnston and Schubiger, 1996; Maves and Schubiger, 1995; Maves and Schubiger, 1998). Los mecanismos moleculares que explican el fenómeno de transdeterminación podrían explicar la interacción positiva entre ambos genes, dada la similitud existente entre los dos procesos (transdeterminación y transformación). El fenómeno de transdeterminación y la expresión ectópica de *wg* en tejidos transdeterminados (Collins and Treisman, 2000) parecen ser dependiente del perfil de compactación de la cromatina (Francis and Kingston, 2001; Katsuyama et al., 2005; Lee et al., 2005; Simon and Tamkun, 2002). De forma inversa, se ha observado que el homólogo de *arm* (β -catenina) interacciona genética y molecularmente con proteínas *trxG*, favoreciendo su actividad (Barker et al., 2001; Takemaru and Moon, 2000). Estos hechos sugieren que altos niveles de Wg podrían mantener un estado de relajación cromatínica que permitiría el acceso de ciertos factores de transcripción (Vg-Sd) a sus zonas de unión en el DNA. El resultado final de este hecho sería la apertura de ciertos programas de desarrollo. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que el proceso de transformación es independiente de la actividad transcripcional de *arm* (ver punto 4.2.4.4), aunque no podemos descartar que no sea consecuencia de otras actividades de *arm* en el núcleo.

La represión de altos niveles de Wg por parte de Vg (interacción negativa) es necesaria para evitar que las células adquieran una especificación genética y un patrón de diferenciación equivalente al del borde D/V. Durante el desarrollo del trabajo se realizó una búsqueda de secuencias de regulación que incluyeran los sitios consenso de unión para Sd al DNA. En la búsqueda se encontraron sitios de unión para Sd en las zonas de regulación de *wg*. Sin embargo, esta circunstancia sólo es un indicio de una posible regulación directa de la expresión de *wg* por parte del complejo Vg-Sd. Alternativamente, existen datos que sugieren una función de *vg*

capaz de reprimir, autónoma y no autónomamente, altos niveles de expresión de *wg* (Baena-López and García-Bellido, 2003; Cho and Irvine, 2004; Kolzer et al., 2003; Liu et al., 2000; Rodríguez del Álamo et al., 2002) y, a la vez, estimularlos de forma no autónoma a través de otros genes como *nub*, *rn* y *fj* (Cho and Irvine, 2004; Liu et al., 2000; Rodríguez del Álamo et al., 2002).

5.4 Identidad histotípica asociada a la expresión de *vestigial*

La expresión de *vg* desde los primeros estadios del desarrollo larvario está restringida a las partes distales del presuntivo territorio de ala. Su expresión ectópica, en determinados contextos genéticos, es capaz de activar la expresión de algunos de los genes característicos de las partes distales del ala sin incluir el margen dorso-ventral. En todos los casos, los cambios genéticos están correlacionados con una diferenciación cuticular que incluye tricomas equivalentes a los de las partes distales del ala fuera del margen D/V (Fig. 9, 16, 17, 18 y Tabla. 3). La especificación genética e histotípica de los clones de sobreexpresión de *vg* en el ala también está correlacionada con un tipo de crecimiento característico fuera del plano normal de crecimiento (generan un nuevo eje P/D y provocan distalización). Estos resultados demuestran que la expresión de *vg* otorga una identidad celular y posicional equivalente a la de las partes distales del ala fuera del margen D/V.

Al final del desarrollo larvario, *vg* se expresa de forma heterogénea en el eje A/P, observándose mayor cantidad de proteína sobre los presuntivos territorios de vena que en los de intervena (Fig. 9). Esta expresión diferencial contribuye a la especificación genética y diferenciación de ambos territorios (Fig. 35-39). Sin embargo, los experimentos realizados no permiten concretar las interacciones genéticas que integran a *vg* en el programa de diferenciación de las venas e intervenas.

5.5 “Tejidos mixtos” y fenómeno de “asimilación inductiva”

Una de las observaciones más llamativas en los territorios que sobreexpresan *vg* o *wg-vg* es la aparición de tejidos “mixtos” caracterizados por una transformación incompleta (Fig. 16, 17, 21, 23). En estos tejidos sólo una fracción de las células mutantes expresan genes característicos del ala. Acorde con la expresión de marcadores genéticos, en las cutículas diferenciadas se mezclan células características del tejido de fondo y del ala. Además, en las células transformadas sólo detectamos la expresión, de forma específica de tejido, de algunos de los genes característicos de las partes distales del ala. Las transformaciones parciales son independientes de la cantidad de expresión ectópica de *vg* o *wg-vg*. Así, la identidad particular de cada célula sería el resultado de su expresión genética característica *v* del conjunto de interacciones que establece con las células del entorno próximo. Estos hechos sugieren que el control del proceso de transformación no es exclusivamente autónomo.

Las transformaciones obtenidas con la sobreexpresión de *vg* o *wg-vg* son autónomas en todos los órganos analizados, excepto en los discos imaginales de ala y halterio. El fenómeno de “asimilación inductiva” consiste en un cambio de identidad celular, no autónomo, en las células del disco imaginal de ala o halterio que previamente tenían otra especificación genética (Fig. 16; ver punto 4.2.2.2). Desconocemos la base molecular de estas transformaciones de tejido no autónomas, pero podrían estar favorecidas por la señalización de *wg*, ya que sin su expresión no se producen. La restricción a los discos imaginales de ala y halterio del fenómeno de asimilación inductiva sugiere que sólo en ellos es interpretable la señalización que surge de células mutantes (*wg-vg* o *vg*). A partir de este hecho, se extrae que la transmisión e interpretación de información posicional sólo se produce entre células de órganos homólogos (en este caso ala y halterio).

5.6 Expresión heterogénea de Vestigial y crecimiento

La sobreexpresión clonal de *vg* en las partes proximales del ala provoca sobrecrecimientos tubulares. En los sobrecrecimientos se observa la expresión autónoma y no autónoma de genes asociados a la especificación genética de los territorios distales en el ala situados fuera del margen D/V. A su vez, la expresión de genes distales está correlacionada con la represión de genes propios de las zonas proximales del ala (Fig. 14). Los sobrecrecimientos proximales surgen como resultado de un incremento de la proliferación celular durante el desarrollo larvario (ver punto 4.3.2.3). Estos hechos reflejan que la expresión de *vg* está asociada a una información posicional distal dentro del disco imaginal de ala. También se ha observado que, aunque la expansión no autónoma del sobrecrecimiento requiere altos niveles de *Wg* fuera de los clones, su iniciación es independiente de *Wg* y se debe a la señalización a corta distancia de *Vg* sobre las células adyacentes (Cho and Irvine, 2004; Kolzer et al., 2003; Rodríguez del Álamo et al., 2002).

En las partes distales del ala fuera del territorio correspondiente al margen D/V, *vg* se expresa de forma heterogénea a lo largo de los ejes de crecimiento P/D y A/P (Fig. 9). Así, se ha observado que células adyacentes tienen diferente cantidad de proteína *Vg* (Fig. 9). La homogenización de los niveles de expresión de *vg*, por exceso o por defecto, reduce autónomamente la expresión de marcadores moleculares de proliferación celular (*PH3* y *PCNA*) y, por tanto, el crecimiento en las partes distales del ala.

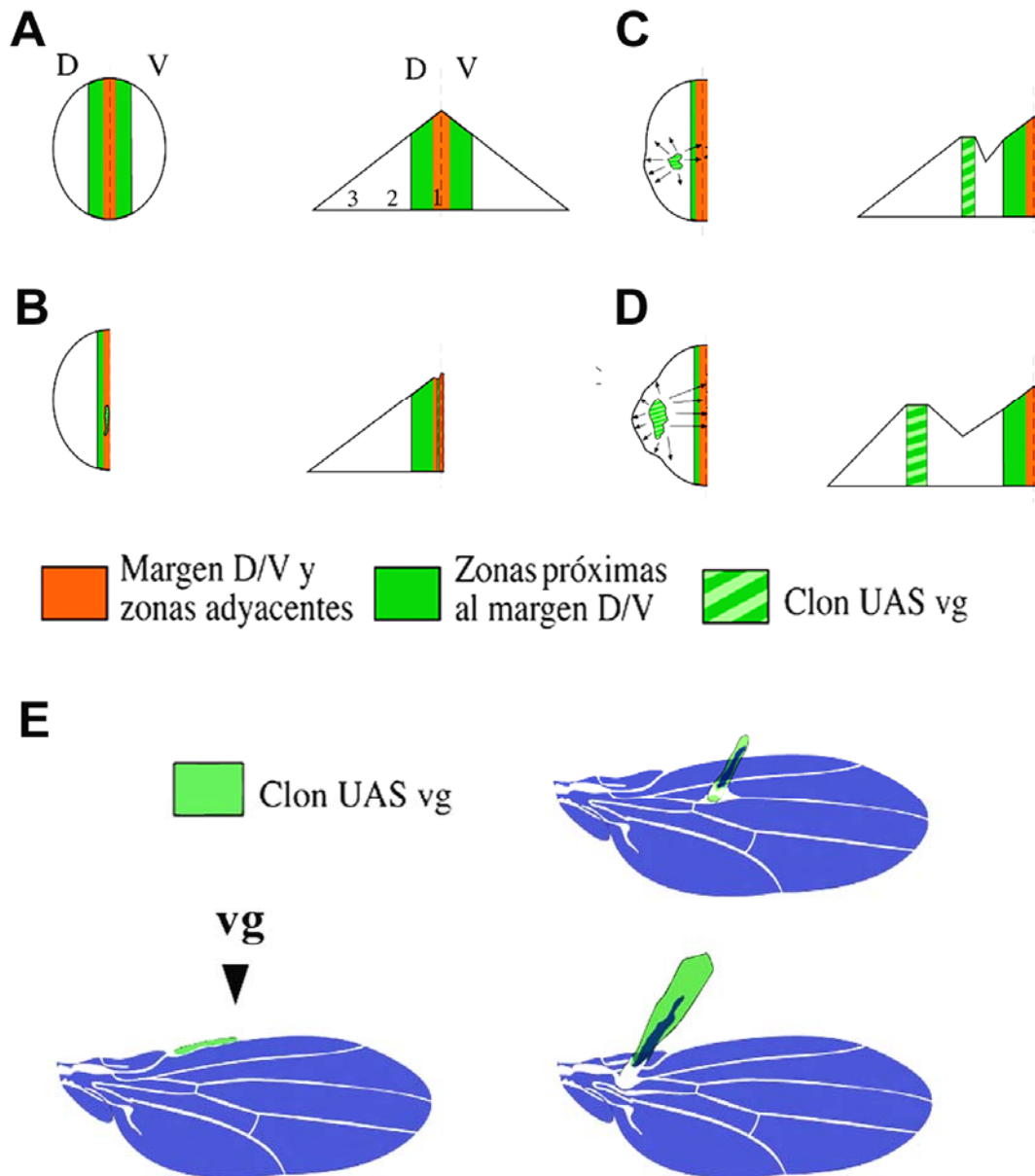


Figura 46. Esquemas representativo de los efectos, autónomos y no autónomos, de *vg* sobre el crecimiento en el ala. (A) Regiones del ala y representación de la información posicional en un fondo silvestre. La pendiente del triángulo a ambos lados del margen del ala es una representación de los valores posicionales en el eje P/D (A). (B y D) Los clones de sobreexpresión de *vg* cerca del margen del ala apenas modifican el crecimiento. (C, D y E) Sin embargo, el aumento de su distancia al borde del ala incrementa la proliferación celular de forma autónoma y no autónoma, provocando sobrecrecimientos. Observar que la presencia de clones de sobreexpresión de *vg* supone una nueva referencia posicional que provoca efectos no autónomos (acomodación), alrededor de ellos, dependientes de posición (C, D y E). Los efectos de los clones se interpretan considerando que sus células tienen un valor posicional distal determinado por su nivel de expresión Vg (C, D y E).

Estos hechos sugieren que las heterogeneidades en el patrón de expresión del gen son necesarias para estimular la proliferación celular en el ala. De acuerdo con esta proposición, las zonas de confrontación entre células que expresan diferentes cantidades de *Vg* proliferan más activamente que otras (Fig. 27E). Además de los efectos autónomos, cambios en la expresión de *vg* también pueden modificar no autónomamente, de forma positiva o negativa, la proliferación celular. A su vez, todos los efectos sobre la proliferación celular dependen de la posición en la que se cambie la expresión de *vg* a lo largo de los ejes de crecimiento (Fig. 34E, 46). Esta circunstancia es especialmente notable en el eje P/D, donde de acuerdo con la expresión endógena del gen los efectos sobre el crecimiento además son continuos (Fig. 34E, 46). La supervivencia celular, al igual que la proliferación, también está alterada de forma continua a lo largo del eje P/D en la insuficiencia para *vg* (Fig. 24C, 25).

Estos resultados sugieren que, al menos en el eje P/D, las heterogeneidades en la expresión de *vg* están asociadas a valores posicionales escalares que determinan su crecimiento. A diferencia del eje de crecimiento P/D, los experimentos realizados no permiten concluir si *vg* afecta al crecimiento del eje A/P por su implicación en la diferenciación territorial o en la identidad posicional. El ejemplo de *vg* es uno de los primeros casos en los que se asocia la información posicional con la expresión escalar de un gen y el control del crecimiento de un órgano.

5.7 Asignación posicional y crecimiento mediado por interacciones locales

Las observaciones realizadas no sugieren que los efectos de *vg* sobre el crecimiento del ala sean atribuibles a modificaciones en la acción de los morfógenos que actúan en ella.


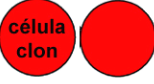




Condiciones	Nivel de Expresión Vg	Balace de Vg entre células vecinas	Longitud del ciclo celular CDT	Fenotipo resultante
Margen D/V y Zonas adyacentes	 Alto		- Proliferación más lenta	- Menos crecimiento
“Wing Blade” Ala Distal	 Moderado		+ Proliferación ligeramente más rápida	+ Crecimiento ligeramente incrementado
“Wing Hinge” Ala Proximal	 Nulo		+++ Proliferación más rápida	+++ Mucho más crecimiento

Figura 47. Balance de Vg entre células vecinas y efectos, autónomos y no autónomos, sobre la proliferación y el ciclo celular. El nivel de expresión de Vg de una célula está indicado en función del tamaño del círculo y el color rojo (segunda columna de la tabla).

Por el contrario, la expresión de *vg* modula la proliferación celular en el ala en función de las diferencias cuantitativas de proteína que se establecen entre células adyacentes (Fig. 47). Estos hechos favorecen el modelo de crecimiento basado en interacciones locales; donde el control del crecimiento depende de la comunicación de información posicional que se establece entre células vecinas (Fig. 47). Los resultados obtenidos en el trabajo y el modelo de “Entelechia” (García-Bellido and García-Bellido, 1998) sugieren el estímulo proliferativo se mantiene mientras que existen diferencias posicionales entre células vecinas. En el eje P/D del ala, la homogeneización de los niveles de expresión de Vg, por exceso o por defecto, reproduce una situación de “Entelechia” en la que los valores posicionales están satisfechos, provocando la parada del crecimiento (García-Bellido and García-Bellido, 1998). Los mecanismos moleculares que permiten la transmisión posicional entre células vecinas actualmente son desconocidos. Sin embargo, deben incluir moléculas de señalización que permitan comparar las diferencias relativas en la expresión de Vg entre células adyacentes. Los mismos mecanismos, posiblemente,

son responsables de la señalización que parte de células *vg* e induce la expresión no autónoma de ciertos genes.

5.8 *vestigial* modula el crecimiento definiendo el ritmo de proliferación celular

Trabajos previos mostraron la capacidad de *vg* para inducir la expresión de diferentes reguladores del ciclo celular (*dE2F-1*, DHFR, TK, *stg*), promover la transición de G1 a S e incrementar la proliferación en cultivos celulares (Delanoue et al., 2004). Estos resultados llevaron a sugerir un efecto positivo y estimulante de *vg* sobre la proliferación celular (Delanoue et al., 2004). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no apoyan lo publicado. 1) Así, la expresión uniforme de *vg* en el wing blade disminuye la tasa de proliferación celular. 2) El efecto de *vg* sobre la tasa de proliferación celular es dependiente de posición a lo largo del eje P/D (Fig. 40). 3) La sobreexpresión de *vg* siempre acelera la transición de G1 a S independientemente de su efecto final sobre el crecimiento. 4) Los cambios en el ritmo de proliferación celular (Fig. 41), definidos por el diferencial de cantidad de Vg entre células vecinas (Fig. 27, 47), se ejecutan modulando la longitud total del ciclo celular (Fig. 41) y no sólo uno de sus pasos. Estos resultados permiten concluir que los mecanismos que determinan la tasa de proliferación celular están superimpuestos a la regulación individual, en cada célula, de los diferentes pasos del ciclo celular.

Además de los efectos autónomos, cambios en la expresión de *vg* modifican (acelerando o reduciendo) la proliferación celular no autónomamente. Los efectos no autónomos podrían tener su origen en la necesidad que tienen células adyacentes de comparar el nivel relativo de Vg para establecer su tasa de proliferación celular. El conjunto de resultados mostrados y su correlación con la expresión heterogénea de *vg*, podrían conectar el control de la proliferación celular y los mecanismos moleculares de asignación posicional en las células del ala.

5.9 Expresión heterogénea de Vestigial y distribución espacial de las células

La forma constante de un órgano requiere una distribución espacio-temporal controlada de las células que lo componen durante el desarrollo. Recientemente se ha demostrado que la distribución espacial de las células está predeterminada por la orientación en la que se dividen (Baena-López et al., 2005). A su vez, el proceso proliferativo y la distribución espacial de las células en un órgano parece depender de su identidad posicional. Estos hechos podrían estar relacionados, en las partes distales del ala y a lo largo del eje P/D, con la distribución heterogénea de Vg. La expresión uniforme de *vg* perturba la orientación preferente de la división celular en las partes distales del ala (Fig. 43). Esta circunstancia no indica que *vg* regule la orientación de la división, pero sugiere que forma parte de los mecanismos genéticos que participan en su regulación. Los mecanismos moleculares que traducen la distribución diferencial de Vg en una orientación preferente de la división son desconocidos, pero podrían incluir proteínas implicadas en el control de la polaridad planar. En esa dirección se ha observado que *vg* es capaz de modificar el nivel de expresión de genes como *ds* (gen que participa en los mecanismos controlan polaridad planar), cuya función es indispensable para mantener la división preferentemente orientada en el ala (Baena-López et al., 2005) y (Fig. 14B; 20C).

5.10 Expresión de Vestigial y viabilidad celular en las partes distales del ala

Mantener cierto nivel de expresión de *vg* es un requerimiento esencial para la supervivencia celular en las partes distales del ala durante todo el desarrollo. La falta de función de *vg* provoca la muerte y extrusión de las células del epitelio en las partes distales del ala (Fig. 24). La muerte celular aparece como consecuencia de una reducción de factores inhibidores de muerte celular como DIAP-1 (Delanoue et al., 2004). La extrusión del epitelio podría deberse a cambios en el citoesqueleto, en la afinidad celular o directamente al proceso de muerte celular. En este sentido, se ha observado que la insuficiencia del gen puede incrementar la expresión de

moléculas implicadas en adhesión celular como *ds* que, normalmente, muestran un nivel bajo de expresión en las partes distales del ala (Fig. 20C). La función de *vg* sobre la supervivencia celular es un requerimiento básico en las partes distales del ala para que, de forma independiente, se realicen el resto de las funciones descritas para el gen.

Desde el final del tercer estadio larvario los niveles de expresión de *Vg*, tal y como se ha comentado previamente, intervienen en la especificación territorial y diferenciación de venas e intervenas (ver punto 4.3.2.6). Durante la pupación, alteraciones en el nivel de expresión del gen (por exceso o defecto) disparan la muerte celular (Fig. 33C, 35B). Este resultado podría deberse a alteraciones en la diferenciación de los territorios de vena e intervena. Sin embargo, no se ha observado que otras mutaciones que afectan a la diferenciación pupal de esos territorios, como la falta de función de *bs*, alteren la viabilidad celular (Roch et al., 1998). Alternativamente, la muerte celular podría deberse a cambios en la identidad posicional que surgen tras modificar la expresión de *Vg*. Nuestros experimentos no son concluyentes para poder distinguir entre las dos posibles explicaciones expuestas, pero indican una acción de *vg* dependiente de cantidad, sobre la viabilidad celular en los diferentes territorios (vena-intervena) del ala durante la pupación. La corrección fenotípica mediante muerte celular durante la pupación no es exclusiva para *vg*, y se ha observado para otras combinaciones genéticas (Milán et al., 1997). Esta circunstancia plantea el siguiente problema teórico durante el proceso de diferenciación pupal: ¿cómo detecta el ala lo que debe mantener o eliminar?, ¿el ala detecta variaciones en la especificación posicional o en la diferenciación? Estas preguntas todavía no pueden ser contestadas.

5.11 Vestigial atribuye la especificad funcional al complejo Vg-Sd

La función de *Vg* depende de su unión con *Sd*, y la capacidad de éste último para interactuar con el DNA. Sin embargo, la especificad funcional del complejo

Vg-Sd es dependiente de Vg, puesto que Sd sólo es capaz de perturbar el sistema sin reproducir los efectos que normalmente tiene el complejo (ver punto 4.3.5). Considerando esta situación y la capacidad del complejo Vg-Sd para autorregular la expresión de Vg y Sd, podemos decir que todos los efectos descritos para la sobreexpresión de Vg son atribuibles a la especificidad funcional del complejo Vg-Sd y no a perturbaciones del sistema. Por el contrario, la sobreexpresión de Sd perturba la autorregulación del complejo interfiriendo con la función de otros factores de transcripción, al unirse, posiblemente, de forma inespecífica al DNA. Estos hechos explican las diferencias fenotípicas encontradas entre las sobreexpresiones de Sd y Vg.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El desarrollo del ala depende de la función combinada de múltiples genes, en contraposición a la teoría de “genes maestros”.
2. *vg* junto con *wg* forman parte de la combinatoria de genes necesaria para iniciar el desarrollo de las partes distales del ala, aunque posiblemente existen otros factores genéticos que favorecen el proceso.
3. La identidad de una célula está definida por la expresión de genes característicos del territorio donde se encuentra y por el conjunto de interacciones locales que determinan su identidad posicional.
4. Las transformaciones no autónomas, asociadas a la expresión ectópica de *vg* o *wg-vg*, están restringidas a los discos imaginales de ala y halterio; indicando que la transmisión e interpretación de información posicional sólo es posible entre células de órganos homólogos.
5. La distalización, el crecimiento y la distribución espacial de las células en las partes distales del ala podrían depender de las interacciones locales que se establecen entre células adyacentes que expresan diferente cantidad de Vg.
6. Las diferencias relativas de proteína Vg entre células vecinas modulan el ritmo de proliferación celular en las partes distales del ala, de forma autónoma y no autónoma.
7. La distribución heterogénea de Vg, en las células de las partes distales del ala a lo largo del eje de crecimiento P/D, es un reflejo del valor posicional.
8. Desde la mitad del tercer estadio larvario, las heterogeneidades en el patrón de expresión de Vg, a lo largo del eje de crecimiento A/P, se requieren para la especificación y diferenciación adecuada de las venas e intervenas.
9. La especificidad funcional del complejo Vg-Sd está definida por Vg.

***ÍNDICE.
FIGURAS Y TABLAS***

7. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. (pág. 3)	Figura 18. (pág. 60)	Figura 35. (pág. 90)
Figura 2. (pág. 8)	Figura 19. (pág. 61)	Figura 36. (pág. 91)
Figura 3. (pág. 9)	Figura 20. (pág. 64)	Figura 37. (pág. 92)
Figura 4. (pág. 11)	Figura 21. (pág. 66)	Figura 38. (pág. 93)
Figura 5. (pág. 13)	Figura 22. (pág. 68)	Figura 39. (pág. 94)
Figura 6. (pág. 20)	Figura 23. (pág. 69)	Figura 40. (pág. 97)
Figura 7. (pág. 23)	Figura 24. (pág. 73)	Figura 41. (pág. 98)
Figura 8. (pág. 37)	Figura 25. (pág. 75)	Figura 42. (pág. 99)
Figura 9. (pág. 41)	Figura 26. (pág. 77)	Figura 43. (pág. 101)
Figura 10. (pág. 44)	Figura 27. (pág. 78)	Figura 44. (pág. 102)
Figura 11. (pág. 45)	Figura 28. (pág. 79)	Figura 45. (pág. 103)
Figura 12. (pág. 51)	Figura 29. (pág. 81)	Figura 46. (pág. 112)
Figura 13. (pág. 52)	Figura 30. (pág. 82)	Figura 47. (pág. 114)
Figura 14. (pág. 54)	Figura 31. (pág. 84)	Tabla 1. (pág. 47-49)
Figura 15. (pág. 56)	Figura 32. (pág. 85)	Tabla 2. (pág. 49-51)
Figura 16. (pág. 58)	Figura 33. (pág. 87)	Tabla 3. (pág. 62)
Figura 17. (pág. 59)	Figura 34. (pág. 88)	

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Shaar, M. and Mann, R. S.** (1998). Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development. *Development* **125**, 3821-30.
- Abzhanov, A. and Kaufman, T. C.** (2000). Homologs of *Drosophila* appendage genes in the patterning of arthropod limbs. *Dev Biol* **227**, 673-89.
- Adachi-Yamada, T. and O'Connor, B.** (2002). Morphogenetic apoptosis: a mechanism for correcting discontinuities in morphogen gradients. *Dev Biol* **251**, 74-90.
- Alison, M.** (1998). Liver stem cells: a two compartment system. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 710-5.
- Alison, M. and Sarraf, C.** (1998). Hepatic stem cells. *J Hepatol* **29**, 676-82.
- Azpiazu, N. and Morata, G.** (2000). Function and regulation of homothorax in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Development* **127**, 2685-93.
- Azpiazu, N. and Morata, G.** (2002). Distinct functions of homothorax in leg development in *Drosophila*. *Mech Dev* **119**, 55-67.
- Baena-López, L. A., Baonza, A. and García-Bellido, A.** (2005). The orientation of cell divisions determines the shape of *Drosophila* organs. *Curr Biol* **15**, 1640-4.
- Baena-López, L. A. and García-Bellido, A.** (2003). Genetic requirements of vestigial in the regulation of *Drosophila* wing development. *Development* **130**, 197-208.
- Baena-López, L. A., Pastor-Pareja, J. C. and Resino, J.** (2003). Wg and Egrf signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in *Drosophila* wing discs. *Development* **130**, 6497-506.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. and McCammon, J. A.** (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10037-41.
- Baonza, A., de Celis, J. F. and García-Bellido, A.** (2000a). Relationships between extramacrochaetae and Notch signalling in *Drosophila* wing development. *Development* **127**, 2383-93.
- Baonza, A., Roch, F. and Martín-Blanco, E.** (2000b). DER signaling restricts the boundaries of the wing field during *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7331-5.
- Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M. and Clevers, H.** (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *Embo J* **20**, 4935-43.

- Barrio, R. and de Celis, J. F.** (2004). Regulation of spalt expression in the *Drosophila* wing blade in response to the Decapentaplegic signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6021-6.
- Bernard, F., Lalouette, A., Gullaud, M., Jeantet, A. Y., Cossard, R., Zider, A., Ferveur, J. F. and Silber, J.** (2003). Control of apterous by vestigial drives indirect flight muscle development in *Drosophila*. *Dev Biol* **260**, 391-403.
- Blair, S. S.** (2003). Genetic mosaic techniques for studying *Drosophila* development. *Development* **130**, 5065-72.
- Bohn, H.** (1974). Extent and properties of the regeneration field in the larval legs of cockroaches (*Leucophaea maderae*) III. Origin of the tissues and determination of symmetry properties in the regenerates. *J Embryol Exp Morphol* **32**, 81-98.
- Bosch, M., Serras, F., Martín-Blanco, E. and Baguña, J.** (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* **280**, 73-86.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 401-415.
- Brockes, J. and Kumar, A.** (2002). Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 566-574.
- Bryant, P. J.** (1970). Cell lineage relationships in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **22**, 389-411.
- Caldwell, P. E., Walkiewicz, M. and Stern, M.** (2005). Ras Activity in the *Drosophila* Prothoracic Gland Regulates Body Size and Developmental Rate via Ecdysone Release. *Curr Biol* **15**, 1785-95.
- Campbell, G. and Tomlinson, A.** (1998). The roles of the homeobox genes *aristaless* and *Distal-less* in patterning the legs and wings of *Drosophila*. *Development* **125**, 4483-93.
- Campbell, G. and Tomlinson, A.** (1999). Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of *Drosophila*: regulation of Dpp targets by *brinker*. *Cell* **96**, 553-62.
- Campbell, S., Inamdar, M., Rodrigues, V., Raghavan, V., Palazzolo, M. and Chovnick, A.** (1992). The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev* **6**, 367-79.
- Campbell, S. D., Duttaroy, A., Katzen, A. L. and Chovnick, A.** (1991). Cloning and characterization of the scalloped region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **127**, 367-80.

- Capdevila, J. and Guerrero, I.** (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *Embo J* **13**, 4459-68.
- Casares, F. and Mann, R. S.** (2000). A dual role for homothorax in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in *Drosophila*. *Development* **127**, 1499-508.
- Cavodeassi, F., Rodríguez, I. and Modolell, J.** (2002). Dpp signalling is a key effector of the wing-body wall subdivision of the *Drosophila* mesothorax. *Development* **129**, 3815-23.
- Certel, K., Hudson, A., Carroll, S. B. and Johnson, W. A.** (2000). Restricted patterning of vestigial expression in *Drosophila* wing imaginal discs requires synergistic activation by both Mad and the drifter POU domain transcription factor. *Development* **127**, 3173-83.
- Cifuentes, F. J. and García-Bellido, A.** (1997). Proximo-distal specification in the wing disc of *Drosophila* by the nubbin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11405-10.
- Cohen, B., McGuffin, M. E., Pfeifle, C., Segal, D. and Cohen, S. M.** (1992). apterous, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev* **6**, 715-29.
- Cohen, S.** (1993). Imaginal disc development.: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carre, C., Noselli, S. and Leopold, P.** (2005). Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* **310**, 667-70.
- Collins, R. T. and Treisman, J. E.** (2000). Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of wingless target genes. *Genes Dev* **14**, 3140-52.
- Crozatier, M., Glise, B. and Vincent, A.** (2002). Connecting Hh, Dpp and EGF signalling in patterning of the *Drosophila* wing; the pivotal role of collier/knot in the AP organiser. *Development* **129**, 4261-4269.
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibsouda, S. and Vincent, A.** (1996). Collier, a novel regulator of *Drosophila* head development, is expressed in a single mitotic domain. *Curr Biol* **6**, 707-18.
- Cho, E. and Irvine, K. D.** (2004). Action of fat, four-jointed, dachsous and dachsin distal-to-proximal wing signaling. *Development* **131**, 4489-4500.
- de Celis, J. F.** (1998). Positioning and differentiation of veins in the *Drosophila* wing. *Int J Dev Biol* **42**, 335-43.

- De Celis, J. F.** (2003). Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *Bioessays* **25**, 443-51.
- de Celis, J. F., Baonza, A. and García-Bellido, A.** (1995a). Behavior of extramacrochaetae mutant cells in the morphogenesis of the *Drosophila* wing. *Mech Dev* **53**, 209-21.
- de Celis, J. F. and Barrio, R.** (2000). Function of the spalt/spalt-related gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. *Mech Dev* **91**, 31-41.
- de Celis, J. F. and Bray, S.** (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 3241-51.
- de Celis, J. F., Bray, S. and Garcia-Bellido, A.** (1997). Notch signalling regulates *veinlet* expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 1919-1928.
- de Celis, J. F., de Celis, J., Ligoxiars, P., Preiss, A., Delidakis, C. and Bray, S.** (1996a). Functional relationships between *Notch*, *Su(H)* and the bHLH genes of the *E(spl)* complex: the *E(spl)* genes mediate only a subset of *Notch* activities during imaginal development. *Development*, 2719-2728.
- de Celis, J. F., de Celis, J., Ligoxygakis, P., Preiss, A., Delidakis, C. and Bray, S.** (1996b). Functional relationships between Notch, Su(H) and the bHLH genes of the *E(spl)* complex: the *E(spl)* genes mediate only a subset of Notch activities during imaginal development. *Development* **122**, 2719-28.
- de Celis, J. F., Llimargas, M. and Casanova, J.** (1995b). Ventral veinless, the gene encoding the Cf1a transcription factor, links positional information and cell differentiation during embryonic and imaginal development in *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 3405-16.
- Delanoue, R., Legent, K., Godefroy, N., Flagiello, D., Dutriaux, A., Vaudin, P., Becker, J. and Silber, J.** (2004). The *Drosophila* wing differentiation factor vestigial-scalloped is required for cell proliferation and cell survival at the dorso-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Cell Death Differ* **11**, 110-22.
- Delanoue, R., Zider, A., Cossard, R., Dutriaux, A. and Silber, J.** (2002). Interaction between apterous and early expression of vestigial in formation of the dorso-ventral compartments in the *Drosophila* wing disc. *Genes Cells* **7**, 1255-66.
- Díaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-52.
- Díaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-52.

- Díaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 4215-25.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T.** (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* **20**, 6877-88.
- Fernández-Fúnez, P., Lu, C. H., Rincon-Limas, D. E., García-Bellido, A. and Botas, J.** (1998). The relative expression amounts of apterous and its co-factor dLdb/Chip are critical for dorso-ventral compartmentalization in the *Drosophila* wing. *Embo J* **17**, 6846-53.
- Foley, K. and Cooley, L.** (1998). Apoptosis in late stage *Drosophila* nurse cells does not require genes within the H99 deficiency. *Development* **125**, 1075-82.
- Francis, N. J. and Kingston, R. E.** (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 409-421.
- Fristrom, D.** (1976). The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. III. Evidence for cell rearrangement. *Dev Biol* **54**, 163-71.
- Gallet, A. and Therond, P. P.** (2005). Temporal modulation of the Hedgehog morphogen gradient by a patched-dependent targeting to lysosomal compartment. *Dev Biol* **277**, 51-62.
- García-Bellido, A.** (1965). Larvalentwicklung transplantiertes Organe von *Drosophila melanogaster* im Adultmilieu. *J. Ins. Physiol* **11**, 1071-1078.
- García-Bellido, A.** (1966a). Changes in selective affinity following transdetermination in imaginal disc cells of *Drosophila melanogaster*. *Exp Cell Res* **44**, 382-92.
- García-Bellido, A.** (1966b). Pattern reconstruction by dissociated imaginal disk cells of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **14**, 278-306.
- García-Bellido, A.** (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Found Symp* **0**, 161-82.
- García-Bellido, A., Cortes, F. and Milan, M.** (1994). Cell interactions in the control of size in *Drosophila* wings. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10222-6.
- García-Bellido, A. and García-Bellido, A.** (1998). Cell proliferation in the attainment of constant sizes and shapes: the Entelechia model. *Intl. J. Dev. Biol.* **42**, 353-362.
- García-Bellido, A. and Merriam, J. R.** (1969). Cell lineage of the imaginal discs in *Drosophila gynandromorphs*. *J Exp Zool* **170**, 61-75.
- García-Bellido, A. and Merriam, J. R.** (1971). Clonal parameters of tergite development in *Drosophila*. *Dev Biol* **26**, 264-76.
- García-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* **245**, 251-3.

- García-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1976). Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. *Dev Biol* **48**, 132-47.
- Gibson, M. C. and Perrimon, N.** (2005). Extrusion and death of DPP/BMP-compromised epithelial cells in the developing *Drosophila* wing. *Science* **307**, 1785-9.
- Gilbert, F.** (2000). *Developmental Biology*. 6th ed. USA.
- Gilbert, S. F., Opitz, J. M. and Raff, R. A.** (1996). Resynthesizing evolutionary and developmental biology. *Dev Biol* **173**, 357-372.
- Gómez-Skarmeta, J. L. and Modolell, J.** (1996). *araucan* and *caupolican* provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. *Genes Dev* **10**, 2935-45.
- Gong, Y., Mo, C. and Fraser, S. E.** (2004). Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* **430**, 689-93.
- González-Gaitan, M., Capdevila, M. P. and Garcia-Bellido, A.** (1994). Cell proliferation patterns in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mech Dev* **46**, 183-200.
- Gorfinkiel, N., Morata, G. and Guerrero, I.** (1997). The homeobox gene *Distal-less* induces ventral appendage development in *Drosophila*. *Genes Dev* **11**, 2259-71.
- Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E. and Steller, H.** (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *Embo J* **19**, 589-97.
- Grimm, S. and Pflugfelder, G. O.** (1996). Control of the gene *optomotor-blind* in *Drosophila* wing development by *decapentaplegic* and *wingless*. *Science* **271**, 1601-4.
- Guillen, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sanchez-Herrero, E., Morata, G. and Guerrero, I.** (1995). The function of *engrailed* and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development* **121**, 3447-56.
- Hadorn, E.** (1965). Problems of determination and transdetermination. In *Brookhaven Symp Biol*, vol. 18 (ed., pp. 148-161).
- Halder, G., Callaerts, P. and Gehring, W. J.** (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* **267**, 1788-92.
- Halder, G. and Carroll, S. B.** (2001). Binding of the *Vestigial* co-factor switches the DNA-target selectivity of the *Scalloped* selector protein. *Development* **128**, 3295-305.
- Halder, G., Polaczyk, P., Kraus, M. E., Hudson, A., Kim, J., Laughon, A. and Carroll, S.** (1998). The *Vestigial* and *Scalloped* proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 3900-9.
- Hamburger, V.** (1988). *The Heritage of Experimental Embriology: Hans Spemann and the Organizer*. New York.

- Han, C., Yan, D., Belenkaya, T. Y. and Lin, X.** (2005). *Drosophila glypicans* Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc. *Development* **132**, 667-79.
- Hay, B. A., Wassarman, D. A. and Rubin, G. M.** (1995). *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* **83**, 1253-62.
- Johnson, R. L. and Tabin, C. J.** (1997). Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* **90**, 979-990.
- Johnston, L. A. and Sanders, A. L.** (2003). Wingless promotes cell survival but constrains growth during *Drosophila* wing development. *Nat Cell Biol* **5**, 827-33.
- Johnston, L. A. and Schubiger, G.** (1996). Ectopic expression of wingless in imaginal discs interferes with decapentaplegic expression and alters cell determination. *Development* **122**, 3519-29.
- Kango-Singh, M., Singh, A. and Henry Sun, Y.** (2003). Eyeless collaborates with Hedgehog and Decapentaplegic signaling in *Drosophila* eye induction. *Dev Biol* **256**, 49-60.
- Katsuyama, T., Sugawara, T., Tatsumi, M., Oshima, Y., Gehring, W. J., Aigaki, T. and Kurata, S.** (2005). Involvement of winged eye encoding a chromatin-associated bromo-adjacent homology domain protein in disc specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15918-23.
- Kim, J., Johnson, K., Chen, H. J., Carroll, S. and Laughon, A.** (1997). *Drosophila* Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* **388**, 304-8.
- Kim, J., Sebring, A., Esch, J. J., Kraus, M. E., Vorwerk, K., Magee, J. and Carroll, S. B.** (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* **382**, 133-8.
- Klein, T.** (2001). Wing disc development in the fly: the early stages. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 470-5.
- Klein, T. and Martínez-Arias, A.** (1998). Different spatial and temporal interactions between Notch, wingless, and vestigial specify proximal and distal pattern elements of the wing in *Drosophila*. *Dev Biol* **194**, 196-212.
- Klein, T. and Martínez-Arias, A.** (1999a). The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in *Drosophila*. *Development* **126**, 913-25.
- Klein, T. and Martínez-Arias, A.** (1999b). The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in *Drosophila*. *Development* **126**, 913-25.

- Kojima, T., Michiue, T., Orihara, M. and Saigo, K.** (1994). Induction of a mirror-image duplication of anterior wing structures by localized hedgehog expression in the anterior compartment of *Drosophila melanogaster* wing imaginal discs. *Gene* **148**, 211-7.
- Kolzer, S., Fuss, B., Hoch, M. and Klein, T.** (2003). Defective proventriculus is required for pattern formation along the proximodistal axis, cell proliferation and formation of veins in the *Drosophila* wing. *Development* **130**, 4135-47.
- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. and Simon, M.** (1985). The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* **40**, 45-53.
- Kreuger, J., Perez, L., Giraldez, A. J. and Cohen, S. M.** (2004). Opposing activities of Dally-like glypican at high and low levels of Wingless morphogen activity. *Dev Cell* **7**, 503-12.
- Kumar, J. P. and Moses, K.** (2001a). EGF receptor and Notch signaling act upstream of Eyeless/Pax6 to control eye specification. *Cell* **104**, 687-97.
- Kumar, J. P. and Moses, K.** (2001b). Eye specification in *Drosophila*: perspectives and implications. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 469-74.
- Lawrence, P.** (1966). Gradients in the insect segment: the orientation of hairs in the milkweed *Oncopeltus fasciatus*. *Journal of Experimental Biology* **44**, 607-620.
- Lawrence, P. A. and Struhl, G.** (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *Drosophila*? *Cell* **85**, 951-61.
- Lecuit, T. and Cohen, S. M.** (1998). Dpp receptor levels contribute to shaping the Dpp morphogen gradient in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **125**, 4901-7.
- Lee, L. A. and Orr-Weaver, T. L.** (2003). Regulation of cell cycles in *Drosophila* development: intrinsic and extrinsic cues. *Annu Rev Genet* **37**, 545-78.
- Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L. and Paro, R.** (2005). Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* **438**, 234-7.
- Lee, T. and Luo, L.** (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-61.
- Liu, X., Grammont, M. and Irvine, K. D.** (2000). Roles for scalloped and vestigial in regulating cell affinity and interactions between the wing blade and the wing hinge. *Dev Biol* **228**, 287-303.
- Locke, M.** (1959). The cuticular pattern in an insect, *Rhodnius prolixus* Stal. *Journal of Experimental Biology* **36**, 459-477.
- Lunde, K., Biehs, B., Nauber, U. and Bier, E.** (1998). The knirps and knirps-related genes organize development of the second wing vein in *Drosophila*. *Development* **125**, 4145-54.

- Martín-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. and Martínez-Arias, A.** (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 557-70.
- Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. and Garcia-Bellido, A.** (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7888-93.
- Masucci, J. D., Miltenberger, R. J. and Hoffmann, F. M.** (1990). Pattern-specific expression of the *Drosophila* decapentaplegic gene in imaginal disks is regulated by 3' cis-regulatory elements. *Genes Dev* **4**, 2011-23.
- Maves, L. and Schubiger, G.** (1995). Wingless induces transdetermination in developing *Drosophila* imaginal discs. *Development* **121**, 1263-72.
- Maves, L. and Schubiger, G.** (1998). A molecular basis for transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: interactions between wingless and decapentaplegic signaling. *Development* **125**, 115-24.
- Maves, L. and Schubiger, G.** (2003). Transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: a model for understanding pluripotency and selector gene maintenance. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 472-9.
- McClure, K. and Schubiger, G.** (2005). Developmental analysis and squamous morphogenesis of the peripodial epithelium in *Drosophila* imaginal discs. *Development* **132**, 5033-42.
- Milán, M., Campuzano, S. and García-Bellido, A.** (1996a). Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11687-92.
- Milán, M., Campuzano, S. and García-Bellido, A.** (1996b). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 640-5.
- Milán, M., Campuzano, S. and García-Bellido, A.** (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5691-6.
- Milán, M. and Cohen, S. M.** (2000). Subdividing cell populations in the developing limbs of *Drosophila*: do wing veins and leg segments define units of growth control? *Dev Biol* **217**, 1-9.
- Milán, M., Pérez, L. and Cohen, S. M.** (2002). Short-range cell interactions and cell survival in the *Drosophila* wing. *Dev Cell* **2**, 797-805.
- Minami, M., Kinoshita, N., Kamoshida, Y., Tanimoto, H. and Tabata, T.** (1999). brinker is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* **398**, 242-6.

- Montagne, J., Groppe, J., Guillemin, K., Krasnow, M. A., Gehring, W. J. and Affolter, M.** (1996). The Drosophila Serum Response Factor gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to blistered. *Development* **122**, 2589-97.
- Moreno, E., Basler, K. and Morata, G.** (2002). Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in Drosophila wing development. *Nature* **416**, 755-9.
- Nagel, A. C., Maier, D. and Preiss, A.** (2002). Green fluorescent protein as a convenient and versatile marker for studies on functional genomics in Drosophila. *Dev Genes Evol* **212**, 93-8.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K.** (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-68.
- Neufeld, T. P., de la Cruz, A. F., Johnston, L. A. and Edgar, B. A.** (1998). Coordination of growth and cell division in the Drosophila wing. *Cell* **93**, 1183-93.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M.** (1996). A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the Drosophila wing. *Development* **122**, 3477-85.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M.** (1997). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the Drosophila wing. *Development* **124**, 871-80.
- Ng, M., Diaz-Benjumea, F. J., Vincent, J. P., Wu, J. and Cohen, S. M.** (1996). Specification of the wing by localized expression of wingless protein. *Nature* **381**, 316-8.
- Paddy, M. R., Saumweber, H., Agard, D. A. and Sedat, J. W.** (1996). Time-resolved, in vivo studies of mitotic spindle formation and nuclear lamina breakdown in Drosophila early embryos. *J Cell Sci* **109**, 591-607.
- Pages, F. and Kerridge, S.** (2000). Morphogen gradients. A question of time or concentration? *Trends Genet* **16**, 40-4.
- Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martin-Blanco, E. and Garcia-Bellido, A.** (2004). Invasive cell behavior during Drosophila imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev Cell* **7**, 387-99.
- Paumard-Rigal, S., Zider, A., Vaudin, P. and Silber, J.** (1998). Specific interactions between vestigial and scalloped are required to promote wing tissue proliferation in Drosophila melanogaster. *Dev Genes Evol* **208**, 440-6.
- Potten, C. S.** (1998). Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**, 821-30.

- Prasad, M., Bajpai, R. and Shashidhara, L. S.** (2003). Regulation of Wingless and Vestigial expression in wing and haltere discs of *Drosophila*. *Development* **130**, 1537-47.
- Reddy, G. V., Heisler, M. G., Ehrhardt, D. and Meyerowitz, E.** (2004). Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**, 4225-4237.
- Resino, J. and García-Bellido, A.** (2004). *Drosophila* genetic variants that change cell size and rate of proliferation affect cell communication and hence patterning. *Mech Dev* **121**, 351-64.
- Resino, J., Salama-Cohen, P. and García-Bellido, A.** (2002). Determining the role of patterned cell proliferation in the shape and size of the *Drosophila* wing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7502-7.
- Ribeiro, C., Neumann, M. and Affolter, M.** (2004). Genetic control of cell intercalation during tracheal morphogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol* **14**, 2197-207.
- Roch, F., Baonza, A., Martín-Blanco, E. and García-Bellido, A.** (1998). Genetic interactions and cell behaviour in blistered mutants during proliferation and differentiation of the *Drosophila* wing. *Development* **125**, 1823-32.
- Rodríguez del Álamo, D., Terriente, J., Galindo, M. I., Couso, J. P. and Díaz-Benjumea, F. J.** (2002). Different mechanisms initiate and maintain wingless expression in the *Drosophila* wing hinge. *Development* **129**, 3995-4004.
- Rodríguez del Alamo Rodríguez, D., Terriente Felix, J. and Díaz-Benjumea, F. J.** (2004). The role of the T-box gene *optomotor-blind* in patterning the *Drosophila* wing. *Dev Biol* **268**, 481-92.
- Sander, K.** (1991). "Mosaic work" and "assimilating effects" in embryogenesis: Wilhelm Roux's conclusions after disabling frog blastomeres. *Roux,s Arch. Dev. Biolo.* **200**, 237-239.
- Schubiger, G.** (1971). Regeneration, duplication and transdetermination in fragments of the leg disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **26**, 277-95.
- Schubiger, G.** (1973). Regeneration of *Drosophila melanogaster* male leg disc fragments in sugar fed female hosts. *Experientia* **29**, 631-2.
- Schweizer, P. and Bodenstein, D.** (1975). Aging and its relation to cell growth and differentiation in *Drosophila* imaginal discs: developmental response to growth restricting conditions. *Proc Natl Acad Sci* **72**, 4674-4678.
- Shen, J. and Dahmann, C.** (2005). Extrusion of cells with inappropriate Dpp signaling from *Drosophila* wing disc epithelia. *Science* **307**, 1789-90.

- Silber, J., Bazin, C. and Le Menn, A.** (1989). Vestigial mutants of *Drosophila melanogaster* live better in the presence of aminopterin: increased level of dihydrofolate reductase in a mutant. *Mol Gen Genet* **218**, 475-80.
- Simmonds, A. J., Liu, X., Soanes, K. H., Krause, H. M., Irvine, K. D. and Bell, J. B.** (1998). Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 3815-20.
- Simon, J. A. and Tamkun, J. W.** (2002). Programming off and on states in chromatin: mechanisms of polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 210-218.
- Sivasankaran, R., Vigano, M. A., Muller, B., Affolter, M. and Basler, K.** (2000). Direct transcriptional control of the Dpp target omb by the DNA binding protein Brinker. *Embo J* **19**, 6162-72.
- Srivastava, A. and Bell, J. B.** (2003). Further developmental roles of the Vestigial/Scalloped transcription complex during wing development in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* **120**, 587-96.
- Strigini, M. and Cohen, S. M.** (2000). Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing. *Curr Biol* **10**, 293-300.
- Stumpf, H.** (1965). Cuticular Differentiation brought about by one level of a concentration gradient in *Galleria mellonella*. *Amer. Zoologist* **5**, 699.
- Takemaru, K. I. and Moon, R. T.** (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* **149**, 249-254.
- Teleman, A. A. and Cohen, S. M.** (2000). Dpp gradient formation in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Cell* **103**, 971-80.
- Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C. M. and Hu, W. S.** (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* **100**, 12-27.
- Urban, S. and Freeman, M.** (2003). Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol Cell* **11**, 1425-34.
- Van de Bor, V., Delanoue, R., Cossard, R. and Silber, J.** (1999). Truncated products of the vestigial proliferation gene induce apoptosis. *Cell Death Differ* **6**, 557-64.
- Varadarajan, S. and VijayRaghavan, K.** (1999). Scalloped functions in a regulatory loop with vestigial and wingless to pattern the *Drosophila* wing. *Dev Genes Evol* **209**, 10-7.
- Vaudin, P., Delanoue, R., Davidson, I., Silber, J. and Zider, A.** (1999). TONDU (TDU), a novel human protein related to the product of vestigial (vg) gene of *Drosophila melanogaster* interacts with vertebrate TEF factors and substitutes for Vg function in wing formation. *Development* **126**, 4807-16.

- Wang, S. H., Simcox, A. and Campbell, G.** (2000). Dual role for Drosophila epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev* **14**, 2271-6.
- Watt, F. M.** (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**, 831-7.
- Weatherbee, S. D., Halder, G., Kim, J., Hudson, A. and Carroll, S.** (1998). Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the Drosophila haltere. *Genes Dev* **12**, 1474-82.
- Whitworth, A. J. and Russell, S.** (2003). Temporally dynamic response to Wingless directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the Drosophila wing. *Dev Biol* **254**, 277-88.
- Wieschaus, E. and Gehring, W.** (1976). Clonal analysis of primordial disc cells in the early embryo of Drosophila melanogaster. *Dev Biol* **50**, 249-63.
- Williams, J. A., Atkin, A. L. and Bell, J. B.** (1990). The functional organization of the vestigial locus in Drosophila melanogaster. *Mol Gen Genet* **221**, 8-16.
- Williams, J. A. and Bell, J. B.** (1988). Molecular organization of the vestigial region in Drosophila melanogaster. *Embo J* **7**, 1355-63.
- Williams, J. A., Bell, J. B. and Carroll, S. B.** (1991). Control of Drosophila wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes Dev* **5**, 2481-95.
- Williams, J. A., Paddock, S. W. and Carroll, S. B.** (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing Drosophila wing disc into discrete subregions. *Development* **117**, 571-84.
- Williams, J. A., Paddock, S. W., Vorwerk, K. and Carroll, S. B.** (1994). Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature* **368**, 299-305.
- Wolpert, L.** (1969). Positional Information and Spatial Pattern of Cellular Differentiation. *Journal of Theoretical Biology* **25**, 1-47.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessel, T., Lawrence, P. and Meyerowitz, E.** (1998). Principles of Development. New York: Oxford University Press, Inc.
- Wu, J. and Cohen, S. M.** (1999). Proximodistal axis formation in the Drosophila leg: subdivision into proximal and distal domains by Homothorax and Distal-less. *Development* **126**, 109-17.
- Wu, J. and Cohen, S. M.** (2000). Proximal distal axis formation in the Drosophila leg: distinct functions of teashirt and homothorax in the proximal leg. *Mech Dev* **94**, 47-56.
- Wu, J. and Cohen, S. M.** (2002). Repression of Teashirt marks the initiation of wing development. *Development* **129**, 2411-8.

- Yang, D., Lu, H. and Erickson, J. W.** (2000). Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol* **10**, 1191-200.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.
- Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 2265-78.
- Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1996a). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-44.
- Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1996b). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-44.
- Zecca, M. and Struhl, G.** (2002a). Control of growth and patterning of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1369-76.
- Zecca, M. and Struhl, G.** (2002b). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1357-68.
- Zider, A., Flagiello, D., Frouin, I. and Silber, J.** (1996). Vestigial gene expression in *Drosophila melanogaster* is modulated by the dTMP pool. *Mol Gen Genet* **251**, 91-8.
- Zider, A., Paumard-Rigal, S., Frouin, I. and Silber, J.** (1998). The vestigial gene of *Drosophila melanogaster* is involved in the formation of the peripheral nervous system: genetic interactions with the scute gene. *J Neurogenet* **12**, 87-99.
- Zirin, J. D. and Mann, R. S.** (2004). Differing strategies for the establishment and maintenance of teashirt and homothorax repression in the *Drosophila* wing. *Development* **131**, 5683-93.

ANEXO. I

ANEXO I. Recopilación de artículos publicados

Baena-López, L. A., Baonza, A. and García-Bellido, A. (2005). The orientation of cell divisions determines the shape of *Drosophila* organs. *Current Biology* **15**, 1640-4.

Baena-López, L. A. and García-Bellido, A. (2003). Genetic requirements of vestigial in the regulation of *Drosophila* wing development. *Development* **130**, 197-208.

Baena-López, L. A., Pastor-Pareja, J. C. and Resino, J. (2003). Wg and Egrf signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in *Drosophila* wing discs. *Development* **130**, 6497-506.

Alonso, J., Rodríguez, M. J., Baena-López, L. A. and Santarén, J. F. (2005). Characterization of the *Drosophila melanogaster* Mitochondrial Proteome. *Journal of Proteome Research*. **4**, 1636-45.

Alonso, J., Rodríguez, M. J., Baena-López, L. A. Alonso, M. T. and Santarén, J. F. (2005). Constitutive expression of heat shock protein p23 correlates with proneural territories in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Proteomics* **5**, 3604-13.

The Orientation of Cell Divisions Determines the Shape of *Drosophila* Organs

Luis Alberto Baena-López, Antonio Baonza, and Antonio García-Bellido*

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
Edificio Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid
CX-504
28049 Madrid
Spain

Summary

Organ shape depends on the coordination between cell proliferation and the spatial arrangement of cells during development [1–3]. Much is known about the mechanisms that regulate cell proliferation, but the processes by which the cells are orderly distributed remain unknown. This can be accomplished either by random division of cells that later migrate locally to new positions (cell allocation) [4] or through polarized cell division (oriented cell division; OCD). Recent data suggest that the OCD is involved in some morphogenetic processes such as vertebrate gastrulation [5], neural tube closure [6], and growth of shoot apex in plants [7]; however, little is known about the contribution of OCD during organogenesis. We have analyzed the orientation patterns of cell division throughout the development of wild-type and mutant imaginal discs of *Drosophila*. Our results show a causal relationship between the orientation of cell divisions in the imaginal disc and the adult morphology of the corresponding organs, indicating a key role of OCD in organ-shape definition. In addition, we find that a subset of planar cell polarity genes is required for the proper orientation of cell division during organ development.

Results and Discussion

Drosophila imaginal discs are a classical model system for studying general mechanisms involved in the control of organ growth and patterning [8]. The imaginal discs are epithelial structures that originate from the embryonic ectoderm, and, after a period of cell proliferation during the larval stages, give rise to most adult organs [8]. The wing disc is divided into lineage units known as compartments [9]. The boundaries between compartments play a key role in the control of wing disc growth and patterning [10]. Analysis of mitotic recombination clones in animals and plants allows for tracing the descendants of single marked cells during development [1, 2, 11]. These experiments have shown a clear correlation between the shape of the clones and adult morphology of the organ where the clones are studied, i.e., clone growth defines organ shape [1, 2, 11]. Most clones in the wing blade are very elongated and grow along the proximal-distal (P/D) axis of the

wing, perpendicular to the D/V border (Figures 1A–1D, arrowhead) [1, 2]. In contrast, clones within the wing margin grow along the D/V border (Figures 1B and 1C, arrow) [1, 2]. We have considered the dorsal-ventral (D/V) boundary (Figure 1B) as a reference to measure the orientation of cell divisions during wing disc development (see Supplemental Experimental Procedures available with this article online). We observe a striking relationship between the shape of the clones (Figure 1B) and the orientation of cell divisions (Figure 1E and Figures S1A and S1B). Thus, the majority of cells divide along the proximal-distal (P/D) axis of the wing blade (Figures 1B and 1F); 59.4% (n = 549) of mitoses form angles higher than 55° with respect to the D/V boundary, while only 13.8% are lower than 35° (Figure 1H). In contrast, in the wing margin, most cells divide nearly parallel to the D/V boundary (Figures 1B and 1G), forming angles lower than 35° (71.4%; n = 70) (Figure 1H). Furthermore, the characteristic shape of each intervein region (Figures 1A and 1B and Figure S1C) [1, 2, 4] is also reflected in the cell-orientation patterns. Thus, 65.8% (n = 116) of the mitotic figures studied in intervein regions C and D, where clones are very elongated and grow perpendicular to the wing margin, are nearly perpendicular to the D/V border (Figures S1D and S1F), whereas in regions A and E, where clones are wider and grow parallel to the D/V border, only 50.3% of mitoses (n = 81) have this orientation (Figures S1E and S1F).

Early-induced clones also show an elongated shape along the P/D axis of the wing [1]. Accordingly, most of the cell divisions in the second instar wing discs appear with a P/D orientation (Figures 1I and 1J). In everted wings in pupae, most cells also divide preferentially along the P/D axis [12], indicating that the correlation between the orientation of cell divisions and the shape of the clones is maintained throughout development [1, 2].

Interestingly, the orientation of postmitotic daughter cells, analyzed in clones of two cells (Figure 1J), conserve the positions determined by the angle of the OCD (Figure 1K). The orientation of the first cell division tends to be maintained in subsequent divisions, since we observe that 57% (n = 121) of clones of four cells form straight lines of one cell width. Although these results suggest that the cell relocation plays a minor role to define the clone shape, we can not rule out that this process might refine clone shapes and therefore organ shape. Finally, we suggest that the width of the clones mainly depends on the general probability of OCD.

To evaluate the general requirement of OCD in organogenesis, we analyzed the patterns of mitotic orientation in other wing disc regions. The thorax shows an isodiametric morphology, and mitotic recombination clones grow isodiametrically (Figure 2A) [2]. Accordingly, we failed to find any preferential orientation of the planar axes of cell divisions (Figures 2B and 2C). In the peripodial epithelium, we also observe that the orientation of cell divisions (data not shown) define the characteristic shape of the clones [2]. As in the wing blade,

*Correspondence: agbellido@cbm.uam.es

Genetic requirements of *vestigial* in the regulation of *Drosophila* wing development

L. Alberto Baena-López and Antonio García-Bellido*

Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa'-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Madrid 28049, Spain

*Author for correspondence (e-mail: agbellido@cbm.uam.es)

Accepted 3 October 2002

SUMMARY

The gene *vestigial* has been proposed to act as a master gene because of its supposed capacity to initiate and drive wing development. We show that the ectopic expression of *vestigial* only induces ectopic outgrowths with wing cuticular differentiation and wing blade gene expression patterns in specific developmental and genetic contexts. In the process of transformation, *wingless* seems to be an essential but insufficient co-factor of *vestigial*. *vestigial* ectopic expression alone or *vestigial* plus *wingless* co-expression in clones differentiate 'mixed' cuticular patterns (they contain wing blade trichomes and chaetae characteristic of the endogenous surrounding tissue) and

express wing blade genes only in patches of cells within the clones. In addition, we have found that these clones, in the wing imaginal disc, may cause autonomous as well as non-autonomous cuticular transformations and wing blade gene expression patterns. These non-autonomous effects in surrounding cells result from recruitment or 'inductive assimilation' of *vestigial* or *wingless-vestigial* overexpressing cells.

Key words: *Drosophila*, *vestigial*, Wing development, Inductive assimilation, Cellular identity, 'Mixed' tissues.

INTRODUCTION

Morphogenesis is normally associated with cell proliferation and genetic specification of territories or tissues. Several types of regulatory genes define these genetic specifications. Thus, in *Drosophila*, 'selector' genes such as *Ultrabithorax* (*Ubx*) or *engrailed* (*en*) (García-Bellido, 1975), in combination with other selector genes, confer identity to segments or compartments. These genes are expressed in clonally restricted territories, are cell autonomous in genetic mosaics and transform the tissue to an archetypal specification. Other types of genes, such as *pannier* (*pnr*) (Calleja et al., 2000; Calleja et al., 1996), *iroquois* (*iro*) (Diez del Corral et al., 1999; Gomez-Skarmeta et al., 1996; Grillenzoni et al., 1998) or *Distal-less* (*Dll*) (Abu-Shaar and Mann, 1998; Campbell and Tomlinson, 1998; Gonzalez-Crespo et al., 1998; Wu and Cohen, 1999), may give territorial identity by themselves or in combination with others, but they specify territories that are rarely clonally delimited. 'Differentiation genes', such as *achaete-scute* (*ac-sc*), are involved in the terminal development of cells or tissues (Jimenez and Campos-Ortega, 1990). Finally, a new category has been introduced, the 'master' genes (Halder et al., 1995; Kim et al., 1996), which includes genes such as *eyeless* (*ey*) and *vestigial* (*vg*). These genes are considered to be able to individually initiate and drive specific developmental pathways, thus changing the fate of the tissues in which they are ectopically expressed. The concept of master gene has been applied to 'selector of tissue' genes later by other authors (Bray, 1999; Affolter and Mann, 2001; Halder

and Carroll, 2001). In this context, the expression of *ey* or *vg* would be sufficient to give identity to eyes and wings, respectively (Halder et al., 1995; Kim et al., 1996). We show here that the ectopic expression of *vg* is the subject of temporal and genetic constraints in the promotion and driving of the wing developmental program.

vg encodes a nuclear protein of 453 amino acids with poor homologies to other known proteins. It is expressed at low levels in the primordial wing and haltere imaginal discs (Williams et al., 1991). Later in the development of both discs, the dorsoventral border of compartment is defined by differential expression of *apterous* (*ap*) (Diaz-Benjumea and Cohen, 1993), and subsequent restricted activation of *Notch* (*N*) (Irvine and Vogt, 1997) and downstream genes such as *wingless* (*wg*) (Kim et al., 1995). The activity of *wg* and *N* in the wing margin leads to the expression of the *vg* through the activation of the *vg* boundary enhancer (*vg BE-lacZ*) (Kim et al., 1996; Williams et al., 1994). Subsequent to *vg BE-lacZ* activation, the expression of *vg* in more proximal parts of the wing blade is regulated by the *decapentaplegic* (*dpp*) pathway and by *vg* itself, acting on the *vg* quadrant enhancer (*vg QE-lacZ*) (Kim et al., 1996). Reflecting the activity of the *vg* enhancers, *Vg* is expressed in a gradient with maximal concentrations in the wing margin and minimal in more proximal territories of the wing (Williams et al., 1991). *Vg* interacts with the product of the gene *scalloped* (*sd*), a protein with DNA recognition motifs (Campbell et al., 1992), forming a transcriptional activation complex (Halder and Carroll, 2001;

Wg and Egfr signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in *Drosophila* wing discs

Luis Alberto Baena-López^{*,†}, José Carlos Pastor-Pareja^{*,†} and Jaime Resino^{*}

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Facultad de Ciencias, 28049, Madrid, Spain

^{*}All authors contributed equally to this work

[†]Authors for correspondence (e-mail: abaena@cbm.uam.es and jcpastor@cbm.uam.es)

Accepted 26 September 2003

Development 130, 6497-6506

Published by The Company of Biologists 2003

doi:10.1242/dev.00884

Summary

Imaginal discs contain a population of cells, known as peripodial epithelium, that differ morphologically and genetically from the rest of imaginal cells. The peripodial epithelium has a small contribution to the adult epidermis, though it is essential for the eversion of the discs during metamorphosis. The genetic mechanisms that control the identity and cellular morphology of the peripodial epithelia are poorly understood. In this report, we investigate the mechanisms that pattern the peripodial side of the wing imaginal disc during early larval development. At this time, the activities of the Wingless (Wg) and Epidermal growth factor receptor (Egfr) signalling pathways specify the prospective wing and notum fields, respectively. We show that peripodial epithelium specification occurs in the

absence of Wingless and Egfr signalling. The ectopic activity in the peripodial epithelium of any of these signalling pathways transforms the shape of peripodial cells from squamous to columnar and resets their gene expression profile. Furthermore, peripodial cells where Wingless signalling is ectopically active acquire hinge identity, while ectopic Egfr activation results in notum specification. These findings suggest that suppression of Wg and Egfr activities is an early step in the development of the peripodial epithelium of the wing discs.

Key words: Peripodial epithelium, *Drosophila*, Squamous cells, Imaginal discs, Wing disc, Patterning, Wingless, Egfr

Introduction

The development of *Drosophila* imaginal discs, from which most of the adult epidermis derives, is a classical model for the study of pattern formation. Small groups of cells of the embryonic ectoderm are genetically specified in stereotyped positions to constitute the primordia of imaginal discs (Cohen, 1993). Later on, during larval development, the primordia invaginate and become flat epithelial sacs with two opposing faces enclosing the disc lumen (Cohen, 1993). In mature imaginal discs, both sides present easily noticeable differences in cell morphology and cell density (Fig. 1A), maybe with the exception of genital discs (Littlefield and Bryant, 1979). One side contains most of the cells of the disc in the form of a columnar monolayered epithelium, while the other face (peripodial side) consists of squamous cells, in the peripodial epithelium (PE), surrounded by cubic cells (Fig. 1A) (Auerbach, 1936; Waddington, 1940). The PE is required, together with the cells of the stalk, for the eversion of the discs during metamorphosis (Fristrom and Fristrom, 1993; Milner et al., 1984) (J.C.P.-P., E. Martín-Blanco and A. García-Bellido, unpublished), and their subsequent closure (Agnes et al., 1999; Martín-Blanco et al., 2000; Usui and Simpson, 2000; Zeitlinger and Bohmann, 1999), but has a small contribution to the adult cuticle (J.C.P.-P., E. Martín-Blanco and A. García-Bellido, unpublished). Cubic cells produce adult pleural structures (Bryant, 1978; Sprey and Oldenhave, 1974). The columnar and cubic cells, therefore, are imaginal cells in the strictest sense, as they eventually give rise to all

the adult epidermal structures except for the abdomen (Bryant, 1978).

Cell proliferation in the imaginal discs during larval development is coordinated with progressive, genetically determined territorial segregation. Pattern formation and territorial segregation in imaginal discs have been extensively studied, but little attention has been drawn to the development of the peripodial side of the discs. Cell lineage analyses in the PE of the wing imaginal disc show preferential growth territories associated to gene expression domains, although the anteroposterior border is the only clonal restriction described so far in the PE (Resino et al., 2002). Recent reports suggested that several signalling proteins produced in the PE of the disc, such as Wingless (Wg), Hedgehog (Hh) and Decapentaplegic (Dpp), might be necessary for the proliferation and patterning of imaginal discs, either released by cell contact through transluminal extensions (Cho et al., 2000; Gibson and Schubiger, 2000) or secreted into the disc lumen (Gibson et al., 2002). These findings underline the relevance of exploring the development of the PE in order to understand how the size and pattern of the whole wing disc is established.

At the end of the third instar, the peripodial side of the wing imaginal disc consists of several cell types with different morphology (Fig. 1A) and gene expression profiles (Fig. 1D,F). The central territories in the peripodial side of the wing imaginal disc consist of around 400 squamous cells that constitute its PE. *Ultrabithorax* (*Ubx*) (Fig. 1D) and *puckered* (*pu*), among other genes (Gibson and Schubiger, 2001), are

Characterization of the *Drosophila melanogaster* Mitochondrial Proteome

Jana Alonso, Javier M. Rodriguez, Luis Alberto Baena-López, and Juan F. Santarén*

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain

Received May 6, 2005

We have combined high-resolution two-dimensional (2-D) gel electrophoresis with mass spectrometry with the aim of identifying proteins represented in the 2-D gel database of *Drosophila melanogaster* mitochondria. First, we purified mitochondria from third instar *Drosophila* larvae and constructed a high-resolution 2-D gel database containing 231 silver-stained polypeptides. Next, we carried out preparative 2-D PAGE to isolate some of the polypeptides and characterize them by MALDI-TOF analysis. Using this strategy, we identified 66 mitochondrial spots in the database, and in each case confirmed their identity by MALDI-TOF/TOF analysis. In addition, we generated antibodies against two of the mitochondrial proteins as tools for characterizing the organelle.

Keywords: *Drosophila* • mitochondria • proteomics • 2D gels • MALDI-TOF

Introduction

Since the early 90s, cataloguing the proteins of single-celled microorganisms, cells, biological fluids, tissue, and whole organisms has been undertaken at a rapid pace as advances are made in protein and peptide separation, detection and identification. This progress is evident from the numerous databases that are available (see for example the directory of 2D databases on the ExPASy server at <http://us.expasy.org/ch2d/>). It has been supported by continual innovation in 2D gel electrophoresis technology and in methods of identification, and the availability of complete genome sequences.

These techniques, however, are not free of limitations, at least for complex eukaryotes where the number of proteins in a single cell is estimated to approach 10 000.¹ This means that proteome analysis on whole cell extracts tends to miss low-abundance proteins. One solution to this problem is to take advantage of the compartmentalization of the eukaryotic cell, and to analyze subcellular organelles. These can be isolated in good yield and the complexity of their protein composition is lower than that of whole cells. Classical cell subfractionation yields four major fractions: nucleus, mitochondria, microsomes and cytosol. Of these, the nucleus and mitochondria contain 5–10% of the total proteins and constitute interesting targets of analysis because they are discrete functional units.

Mitochondria are ubiquitous cytoplasmic organelles that play crucial roles in oxidative phosphorylation, β -oxidation of fatty acids and the Krebs's cycle. They also generate most of the cellular reactive oxygen species and are crucial for calcium signaling.² Given their importance in cellular physiology, it is not surprising that defective mitochondrial biogenesis and

metabolism are involved in a broad range of pathologies. For example, the Human disease catalog lists about one hundred diseases related to mitochondrial dysfunction such as diabetes, obesity, cancer, aging, neurodegeneration, and cardiomyopathy.³ However, many of the nuclear genes involved remain to be identified, and an inventory of such genes is essential for a better understanding of mitochondrial function. As a result there have been several recent efforts to define the mitochondrial proteome in humans and model organism. For example, the mitochondrial proteome of *Arabidopsis thaliana* was analyzed by 2D-PAGE, and 91 proteins were identified by peptide mass fingerprinting and MALDI-TOF mass spectrometry.⁴ Similarly, Pflieger et al.⁵ adopted a LC-MS/MS approach and identified 179 gene products in the yeast mitochondrion. This number was later increased to 750 by Sickmann et al.⁶

Drosophila is a well-established model organism in cellular and developmental biology, and, for the reasons adduced above as well as the need for markers of cellular organelles, we have initiated a project on the mitochondrial proteome. At present, the number of *Drosophila* nuclear genes that encode mitochondrial proteins and whose function has been studied by molecular genetic techniques, is relatively low, presumably because of the difficulty of isolating such genes in conventional genetic screens. In addition, mitochondrial alterations in *Drosophila* mimic some human diseases. For example mitochondrial dysfunction is the earliest manifestation of muscle degeneration and a prominent characteristic of individualizing spermatids in *parkin* mutants. Loss-of-function mutations in *parkin* result in an early onset form of programmed cell death known as autosomal recessive juvenile Parkinsonism.⁷

We have compiled a catalog of the mitochondrial proteome using highly purified mitochondria from *Drosophila* third instar larvae. This provides a basis for identifying novel proteins or

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 34-1-914978447. Fax: 34-1-914974799. E-mail: jfsantaren@cbm.uam.es.

REGULAR ARTICLE

Constitutive expression of heat shock protein p23 correlates with proneural territories in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*

Jana Alonso^{1,*}, Javier M. Rodríguez^{1,*}, Luis Alberto Baena-López^{1,*},
 María Teresa Alonso² and Juan F. Santarén¹

¹ Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

² SIDI, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

2-DE followed by MALDI-TOF was used to purify and identify a *Drosophila* protein (catalogued as SSP 6002) that showed marked differences in the level of expression in the different imaginal discs of third instar larvae. Fingerprinting showed that the spot of interest was the heat shock 23 polypeptide (hsp23). We characterized the kinetics of its induction by heat shock in wing imaginal discs and raised an antiserum against the denatured protein, which recognizes a single unphosphorylated spot on 2-D gels. The difference in its expression in discs was corroborated by analyzing its level in the imaginal discs of *postbithorax* mutants. We also investigated the developmental expression of hsp23 in imaginal discs with antiserum raised against the native protein. Its spatial and temporal pattern of expression is related to the proneural territories and maintained even under heat shock conditions. In addition, its pattern of expression is regulated by transcription factors and signaling pathways (notch and epidermal growth factor receptor) involved in proneural specification.

Received: October 19, 2004
 Revised: December 15, 2004
 Accepted: December 27, 2004

Keywords:

Drosophila / Heat shock / hsp23 / Imaginal discs / Proneural differentiation

1 Introduction

We use high-resolution 2-DE to analyze aspects of the development, morphogenesis, and genetic variation of the wing imaginal discs of mature larvae of *Drosophila melanogaster* as a model system. For this purpose, we constructed a protein database that was used in a previous study to compare the

standard wing pattern with those of haltere, leg 1, leg 2, leg 3, and eye-antenna imaginal discs of the same developmental stage. We thus defined a set of 17 polypeptides whose levels of expression varied between the different imaginal discs [1]. In the present study, we tried to purify and identify one of those proteins, specifically an acidic protein that was named IEF 41 in the original report and later catalogued as SSP 6002 when computerized quantitative analysis was introduced [2]. By preparative 2-DE and MALDI-TOF, we identified the protein as hsp23, one of the four small heat shock proteins of *Drosophila* (hsp22, hsp23, hsp26, and hsp27), whose genes cluster within 12 kb of DNA at cytological locus 67B. This locus encodes three other genes that were first identified by their expression at specific stages of development [3] and whose transcripts are also activated after heat shock. The beginning of the pupal period is the only stage of *D. melanogaster* development during which these

Correspondence: Dr. Juan F. Santarén, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

E-mail: jfsantaren@cbm.uam.es

Fax: +34-91-4974799

Abbreviations: **shsps**, small heat shock proteins; **hsp23**, heat shock 23 polypeptide; **apG4**, apterous-G4; **dppG4**, decapentaplegic-G4 A.3; **UAS-sc**, UAS-scute; **UAS-N_i**, UAS-Notch_{intra}; **wg**, wingless; **AC-C**, achaete-scute complex; **sc**, scute; **bs**, blistered; **EGFR**, notch (N) and epidermal growth factor receptor; **SMCs**, sensory organ mother cells

* These authors contributed equally.

Genetic requirements of *vestigial* in the regulation of *Drosophila* wing development

L. Alberto Baena-López and Antonio García-Bellido*

Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa'-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Madrid 28049, Spain

*Author for correspondence (e-mail: agbellido@cbm.uam.es)

Accepted 3 October 2002

SUMMARY

The gene *vestigial* has been proposed to act as a master gene because of its supposed capacity to initiate and drive wing development. We show that the ectopic expression of *vestigial* only induces ectopic outgrowths with wing cuticular differentiation and wing blade gene expression patterns in specific developmental and genetic contexts. In the process of transformation, *wingless* seems to be an essential but insufficient co-factor of *vestigial*. *vestigial* ectopic expression alone or *vestigial* plus *wingless* co-expression in clones differentiate 'mixed' cuticular patterns (they contain wing blade trichomes and chaetae characteristic of the endogenous surrounding tissue) and

express wing blade genes only in patches of cells within the clones. In addition, we have found that these clones, in the wing imaginal disc, may cause autonomous as well as non-autonomous cuticular transformations and wing blade gene expression patterns. These non-autonomous effects in surrounding cells result from recruitment or 'inductive assimilation' of *vestigial* or *wingless-vestigial* overexpressing cells.

Key words: *Drosophila*, *vestigial*, Wing development, Inductive assimilation, Cellular identity, 'Mixed' tissues.

INTRODUCTION

Morphogenesis is normally associated with cell proliferation and genetic specification of territories or tissues. Several types of regulatory genes define these genetic specifications. Thus, in *Drosophila*, 'selector' genes such as *Ultrabithorax* (*Ubx*) or *engrailed* (*en*) (García-Bellido, 1975), in combination with other selector genes, confer identity to segments or compartments. These genes are expressed in clonally restricted territories, are cell autonomous in genetic mosaics and transform the tissue to an archetypal specification. Other types of genes, such as *pannier* (*pnr*) (Calleja et al., 2000; Calleja et al., 1996), *iroquois* (*iro*) (Diez del Corral et al., 1999; Gomez-Skarmeta et al., 1996; Grillenzoni et al., 1998) or *Distal-less* (*Dll*) (Abu-Shaar and Mann, 1998; Campbell and Tomlinson, 1998; Gonzalez-Crespo et al., 1998; Wu and Cohen, 1999), may give territorial identity by themselves or in combination with others, but they specify territories that are rarely clonally delimited. 'Differentiation genes', such as *achaete-scute* (*ac-sc*), are involved in the terminal development of cells or tissues (Jimenez and Campos-Ortega, 1990). Finally, a new category has been introduced, the 'master' genes (Halder et al., 1995; Kim et al., 1996), which includes genes such as *eyeless* (*ey*) and *vestigial* (*vg*). These genes are considered to be able to individually initiate and drive specific developmental pathways, thus changing the fate of the tissues in which they are ectopically expressed. The concept of master gene has been applied to 'selector of tissue' genes later by other authors (Bray, 1999; Affolter and Mann, 2001; Halder

and Carroll, 2001). In this context, the expression of *ey* or *vg* would be sufficient to give identity to eyes and wings, respectively (Halder et al., 1995; Kim et al., 1996). We show here that the ectopic expression of *vg* is the subject of temporal and genetic constraints in the promotion and driving of the wing developmental program.

vg encodes a nuclear protein of 453 amino acids with poor homologies to other known proteins. It is expressed at low levels in the primordial wing and haltere imaginal discs (Williams et al., 1991). Later in the development of both discs, the dorsoventral border of compartment is defined by differential expression of *apterous* (*ap*) (Diaz-Benjumea and Cohen, 1993), and subsequent restricted activation of *Notch* (*N*) (Irvine and Vogt, 1997) and downstream genes such as *wingless* (*wg*) (Kim et al., 1995). The activity of *wg* and *N* in the wing margin leads to the expression of the *vg* through the activation of the *vg* boundary enhancer (*vg BE-lacZ*) (Kim et al., 1996; Williams et al., 1994). Subsequent to *vg BE-lacZ* activation, the expression of *vg* in more proximal parts of the wing blade is regulated by the *decapentaplegic* (*dpp*) pathway and by *vg* itself, acting on the *vg* quadrant enhancer (*vg QE-lacZ*) (Kim et al., 1996). Reflecting the activity of the *vg* enhancers, *Vg* is expressed in a gradient with maximal concentrations in the wing margin and minimal in more proximal territories of the wing (Williams et al., 1991). *Vg* interacts with the product of the gene *scalloped* (*sd*), a protein with DNA recognition motifs (Campbell et al., 1992), forming a transcriptional activation complex (Halder and Carroll, 2001;

Halder et al., 1998). The Vg-Sd complex is known to regulate the expression of downstream genes involved in wing development (Halder and Carroll, 2001; Halder et al., 1998; Kim et al., 1996; Klein and Martínez-Arias, 1998). The absence of Vg, Sd or both causes lack of cell proliferation in the wing blade region where *vg* is expressed (Williams et al., 1991; Williams et al., 1993). By contrast, the ectopic expression of *vg* may cause the appearance of territories with cuticular and genetic expression patterns that are characteristic of distal wing blade (Halder et al., 1998; Kim et al., 1996). It is important to note that the ectopic expression of Sd alone does not induce tissue transformations. Thus, Sd is necessary to bind the complex Vg-Sd to DNA, but does not confer tissue specificity by itself (Halder and Carroll, 2001).

In order to analyse the capacity and the genetic requirements of the ectopic expression of *vg* to initiate and drive the transformation of tissue towards wing blade identity, we studied the autonomous and non autonomous cuticular and gene expression patterns that appear after the ectopic expression of *vg* during development. We drove *vg* ectopic expression using different territorial Gal4 lines (G4/UAS system) (Brand and Perrimon, 1993) or by Flip-out (FLP/FRT system) recombination in clones (de Celis and Bray, 1997; Ito et al., 1997). The results show that the morphogenetic effects of *vg* ectopic expression depend on developmental timing and the genetic specification of a disc territory where the overexpression takes place.

MATERIALS AND METHODS

Fly stocks

The experiments were carried out using the following G4 lines: *dpp-G4 A.3* (Staehling-Hampton et al., 1994); *vg-G4* (Simmonds et al., 1995); *Dll-G4* (Calleja et al., 1996); *c253-G4* (provided by Juan Modolell); *pnr-G4* (Calleja et al., 1996); and *patch-G4* (*ptch-G4*) (Speicher et al., 1994).

We used the following UAS lines: *UAS-vg^K* (Kim et al., 1996); *UAS-vg^Z* (Paumard-Rigal et al., 1998); *UAS-wg* (Lawrence et al., 1995); *UAS-wg* dominant negative (*UAS-wg^{DN}*) (Klein and Martínez-Arias, 1999); *UAS-Dll* (Gorinkiel et al., 1997); *UAS-homothorax-GFP* (*UAS-hth-GFP*) (provided by Fernando Casares); *UAS-nubbin* (*UAS-nub*) (Neumann and Cohen, 1998); *UAS-sd* (Campbell et al., 1992); *UAS-Delta* (*UAS-Dl*) (Huppert et al., 1997); *UAS-Serrate* (*UAS-Ser*) and *UAS-Notch* constitutively active (*UAS-N^{intra12.1}*) (de Celis and Bray, 1997); *UAS-thickvein* constitutively active (*UAS-*tkv*^{Q25}*) (Lecuit et al., 1996) or dominant negative *tkv* (*UAS-*tkv*^{DN}*) (Haerry et al., 1998); *UAS-Ras* constitutively active (*UAS-Ras^{V12}*) (Karim and Rubin, 1998); *UAS-Ras* dominant negative (*UAS-Ras^{Δ1DN}*) (Kim et al., 1995); *UAS-P35* (provided by C. Lehner); *UAS-ap* (Fernandez-Funez et al., 1998); *UAS-fringe* (*UAS-fng*) (Kim et al., 1995); and *UAS-GFP*.

We used the following *lacZ* lines: *vg QE-lacZ* (Kim et al., 1996); *vg BE-lacZ* (Williams et al., 1994); *wg-lacZ* (Kassis et al., 1992); *ap^{rk560}* (*ap-lacZ*) (Diaz-Benjumea and Cohen, 1993); and *sd^{ETX4}* (*sd-lacZ*) (Anand et al., 1990).

The lines used for the induction of overexpression mosaics by Flip-out were *y^{β6a} FLP¹²²*; *abx/Ubx FRT f⁺ FRT G4 UAS lacZ* (de Celis and Bray, 1997); and *y FLP¹²²*; *Act FRT y⁺ FRT G4 UAS-GFP*; *MKRS/SM6A-TM6B* (Ito et al., 1997).

Ectopic expression using territorial G4 lines and generation of overexpression clones

The ectopic expression with different lines G4 was induced at 17, 25

and 29°C. Genetic of Flip-out to induce clones of overexpression of *vg*, *wg* or both *wg-vg*: larvae were transferred from 25°C to 37°C for 7 minutes at different ages 36±12, 48±12 or 60±12 hours after laying egg AEL for *vg* clones, and 36±12 and 60±12 hours AEL for the *wg-vg* or *wg* clones.

Immunohistochemistry

Imaginal disc were dissected in 1×PBS and fixed in 4% PFA at 4°C for 40 minutes, followed by 3×20 minute washes in 0.3% PBTrition and 3×20 minute washes in PBT-BSA. Incubation with primary antibody was carried out overnight at 4°C. After repeating washes with PBT and PBT-BSA the imaginal discs were incubated 2 hours at room temperature with the secondary antibody. Imaginal discs were mounted in Vectashield.

We used the following primary antibodies: rabbit anti-Dll and anti-Vg (provided by Sean Carroll); mouse anti-Wg (Hybridoma Bank); guinea pig anti-Hth (gift of Fernando Casares); mouse anti-Cut (Hybridoma Bank); mouse anti-Bs (provided by M. Affolter); mouse anti-Nub (provided by S. Cohen); mouse anti-En (Hybridoma Bank); rat anti-Ser (Hybridoma Bank); rat anti-CD2 (Hybridoma Bank); and mouse or rabbit anti β-gal (Amersham). We used rabbit and mouse Alexa 488, 546, Cy5 and guinea pig-Cy5 as secondary antibodies.

Microscopy and image treatment

For the processing of images in clear field and confocal microscopy we used the programs Metaview (Meta Imaging Corporation Plus) and Photoshop 6.0 (Adobe Corporation).

RESULTS

The ectopic expression of *vg* in G4 territories shows constraints on the promotion of the wing developmental program

We drove the ectopic expression of *vg* with different G4 lines, in order to observe the response of territories of cells ectopically expressing *vg* from early development onwards. Here, we monitor patterns of gene expression and cuticular differentiation.

It has been shown that the overexpression of *vg* driven by different G4 lines, such as *ptch-G4* (Paumard-Rigal et al., 1998) (Simmonds et al., 1998), *dpp-G4* (Kim et al., 1996; Klein and Martínez-Arias, 1998; Klein and Martínez-Arias, 1999) and *Dll-G4* (Fig. 1A,C) (Halder et al., 1998; Weatherbee et al., 1998), ectopically induce histotypes and gene expression patterns characteristic of the wing blade. We explored the maximal transformation phenotypes using the driver *Dll-G4*. The ectopic expression of *vg* in the distal territories of the appendages (proboscis, first and second pairs of legs and genitalia), where *Dll* is expressed, leads to the transformation into tissues with characteristic cuticular patterns and differentiation of the wing blade (Fig. 1A,C). In the first and second pairs of legs, these transformations include typical trichomes, anteroposterior and dorsoventral wing margin chaetae (Fig. 1A2-A4, C1-C3), veins and campaniform sensillae (25/77) (Fig. 1A1,A3). In the third pair of legs, the transformations are to haltere histotypes (Fig. 1A5) (Halder et al., 1998; Weatherbee et al., 1998).

The adult transformations are correlated in imaginal discs with autonomous expression of genes characteristic of wing blade. These gene expressions only appear within GFP-expressing cells, as mobilised by *Dll-G4*. The ectopic wing margin differentiated in the outgrowths correlates with the

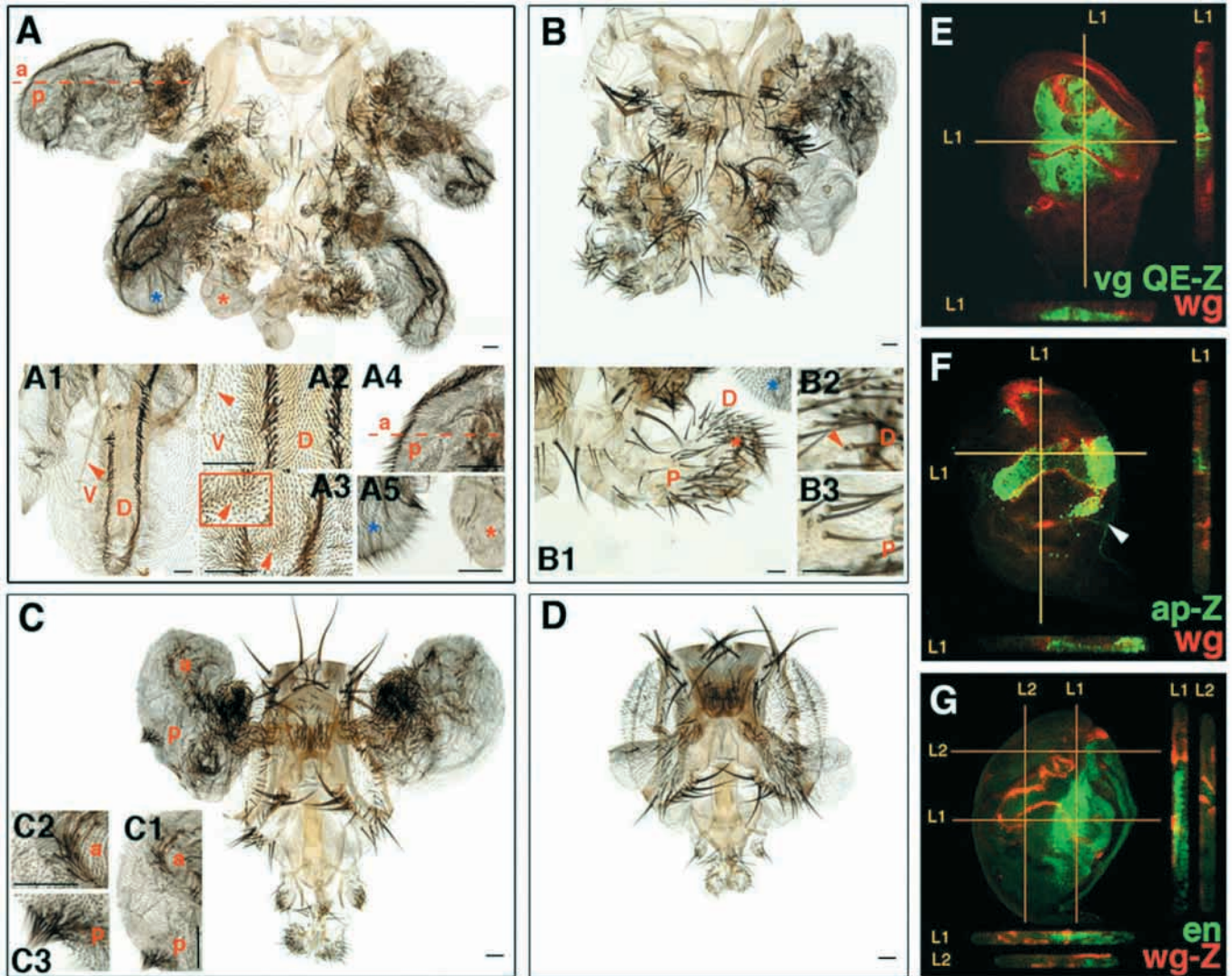


Fig. 1. Cuticular transformations caused by the ectopic expression of *vg* (A,C) and co-overexpression of *wg^{DN}-vg* (B,D) under the control of *Dll-G4*. Effects of *vg* ectopic overexpression on gene expression in the second pair of the legs driven by *Dll-G4* (E-F). Lines indicate optical sections along the *z*-axis. Scale bars: 0.1 mm. (A) Ventral view of a transformed thorax with distal segments of first and second legs differentiating as wing blade (blue asterisk) and third legs as haltere (red asterisk). The broken red line separates anterior (a) from posterior (p) territories in transformed legs. (A1,A2) Transformed wing blade with dorsal (D) and ventral (V) regions. Arrowheads indicate veins. (A3) The arrowhead indicates a campaniform sensillae. (A4) Higher magnification of the wing margin in anteroposterior transition. (A5) Observe the histotypic differences between wing blade (blue asterisk) and haltere territories (red asterisk). (B) Ectopic co-expression of *vg* and a dominant-negative form of *wg* reduces the transformation phenotypes obtained with the ectopic expression of *vg* alone. (B1) Distal (D) (red arrowhead) and proximal (P) tarsal parts in the third pair of legs (red asterisk) at higher magnification. Distal segments (arrowhead indicates bracts) are shown in B2 and proximal segments (without bracts) in B3. (C) Ectopic expression of *vg* leads to transformation of antenna with anterior (a) and posterior (p) wing margin elements. The insets show the differentiation of wing margin elements with anterior (a; C1,C2) and posterior (p; C1,C2) specifications. (D) Transformation in the antenna is reduced by the co-expression of *vg* and a dominant-negative form of *wg*. (E) Ectopic expression of *vg QE-lacZ* (green) in the transformed legs. Notice repression of *vg QE-lacZ* report (green) in territories with high levels of *wg* expression (red). (F) Dorsal transformed territories in adult legs are correlated with *ap* (green) expression. Notice that the annular expression of *ap-lacZ* in the leg is modified: it is expanded in ventral territories but reduced (white arrowhead) in dorsal ones. The expression of *wg* (red) is activated at high levels in the border (wing margin) of *ap* expression. (G) Anterior and posterior specification in transformations denoted by the wild-type expression of *en* (green). The expression of *wg-lacZ* (red) corresponding to the wing margin appears in anterior as well as in posterior territories.

expression of *cut* (*ct*) (not shown) and *wg* in the presumptive wing margin in the disc (Fig. 1E-G). Thus, as in the wild-type wing margin, *wg* represses the expression of *vg QE-lacZ* (Fig. 1E). The transformations have large ventral wing territories and small dorsal territories encircled by the new wing margin

(Fig. 1A1-4,E,F). The dorsoventral and anteroposterior transformations are correlated with the differential expression of *en* and *ap* (Fig. 1A,E,F,G), in the mature imaginal discs. The expression of *en* is maintained in the wild-type topology but the expression of *ap* is modified (Fig. 1F,G). Thus, the ring of

ap in the leg is repressed in dorsal leg territories and expanded in ventral ones (Fig. 1F). In the first and second leg-transformed territories, the genes characteristic of wing blade territories, such as *spalt* (*sal*), *blistered* (*bs*) (Halder et al., 1998; Weatherbee et al., 1998) and *vg* *QE-lacZ* (Fig. 1G) are expressed. In the third leg, where transformations are to haltere, some markers of wing transformation (such as *sal* or *vg* *QE-lacZ*) are not expressed (not shown), probably because of *Ubx* activity (Halder et al., 1998; Shashidhara et al., 1999; Weatherbee et al., 1998). *Ubx* expression is never modified by overexpression of *vg* or *wg*-*vg* driven by different G4 lines or in clones (not shown, see below). All described transformations and expression of wing blade genes are autonomously restricted to the *Dll* expression domain, visualised by GFP.

In contrast to these G4 lines, which induce transformation phenotypes, the ectopic expression of *vg* driven by G4 lines is not associated with histotypic transformations, and only causes tissue-specific malformations. Thus, with *pnr*-G4, we observe defects in thorax closure, and with *c253*-G4 duplications of chaetae in the notum (not shown). We also failed to obtain transformations when the ectopic expression of *vg* alone in the eye was driven by *vg*-G4.

These results indicate that expression of *vg* is necessary but not sufficient for the initiation of the wing blade developmental pathway.

Cooperative effects of *vg* and *wg* in the ectopic transformations

We analyzed why some G4 lines may lead transformations while others fail to do it driving UAS-*vg*. We have found that the overexpression of *vg* only induces transformations when the G4 line shares expression domains with high levels of *wg* in early stages of larval development. Thus, we have found that the overexpression of *vg* only induces transformations when the G4 line shares expression domains with high levels of *wg* in early stages of larval development. Furthermore, that *wg* is

necessary for the augment the transformation is confirmed by experiments in the leg in which a dominant-negative form of *wg* (*wg^{DN}*) is ectopically co-expressed with *vg*, using the driver *Dll*-G4. In these legs, the transformation is strongly reduced (Fig. 1B,D). Without transformation, these legs maintain distal tarsal structures (territories of the legs with chaetae and without bracts), suggesting that the lack of transformation is not simply a consequence of the low levels of Wg activity (Fig. 1B). To test the hypothesis of collaboration of *wg* and *vg* in wing blade transformation, we co-expressed them in the expression domain of *vg*-G4 in the eye (Fig. 2B). Whereas the ectopic expression of *vg* or *wg* alone does not show cuticular transformations (not shown), the co-expression of both causes wing outgrowths with histotypical characteristics of wing blade (Fig. 2A). The transformation is autonomously associated with the expression of wing blade genetic markers as *nub*, *vg* (Fig. 2C,D) and *Dll* (not shown). Surprisingly, in the transformed territories the expression of *wg* is lower than we would expect of an overexpression using the G4/UAS system (Fig. 2D) (see Discussion). These results demonstrate that that *wg* and *vg* collaborate to initiate wing development in imaginal discs other than the wing.

Other experimental or genetic conditions that affect ectopic *vg* transformations

We have explored other experimental conditions that might allow *vg* to induce wing transformations.

We searched for other genes, in addition to *wg*, that might cooperate with *vg*, using *vg*-G4 expression in the eye. First, we studied: (1) the effects of one or several UAS-*vg* doses and G4 induction temperatures (not shown); (2) variations in the stoichiometry of Vg with Sd (Paumard-Rigal et al., 1998; Simmonds et al., 1998) co-expressing several doses of the corresponding UAS; (3) co-expression of *vg* with genes involved in the specification of the proximodistal axes of the wing, such as *nub*, *Dll* and *hth* (Abu-Shaar and Mann, 1998; Azpiazu and Morata, 2000; Cifuentes and Garcia-Bellido,

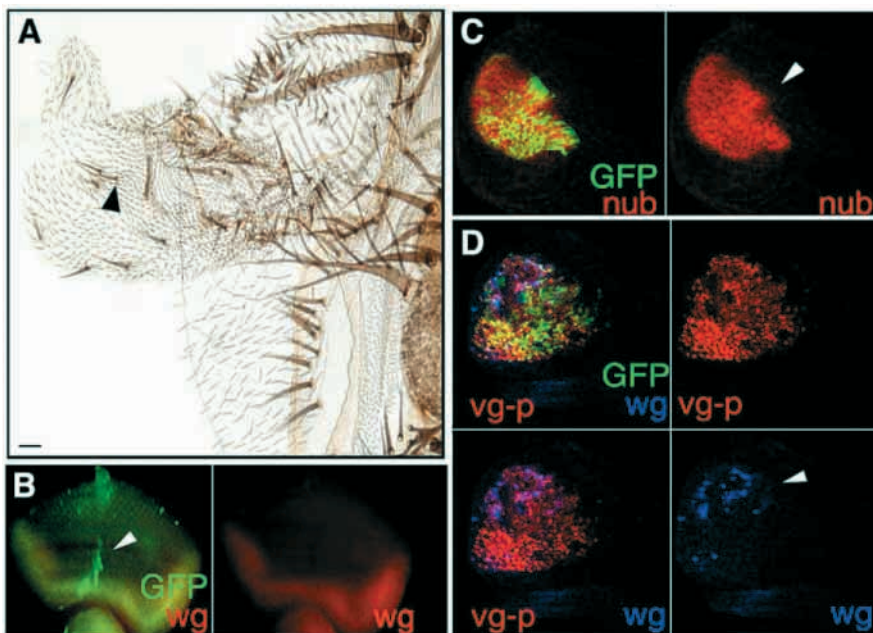


Fig. 2. Ectopic *wg*-*vg* co-expression driven by *vg*-G4 causes the transformation of eye territories into wing blade with cuticular structures (A) and gene expression (C,D) characteristic of wing blade. The expression of *vg*-G4 is detected in the eye imaginal disc by the simultaneous mobilisation of UAS-GFP (GFP) (B-D). Scale bars: 0,1 mm. (A) Observe chaetae (black arrowhead) and wing blade trichomes which appear when we ectopically express *vg* in the eye. (B) In the wild-type eye imaginal disc, *vg*-G4 (GFP) and *wg* (red) are expressed in different territories. High levels of *wg* expression are detected in the poles of the eye, whereas *vg*-G4 is expressed in the equatorial line in the eye. (C) Notice the autonomous ectopic expression of *nub* (red; white arrowhead) in transformed eye cells caused by *wg*-*vg* co-expression (GFP). (D) Ectopic expression of *vg* (red; white arrowhead) in eye transformations caused by the *wg*-*vg* co-expression. Notice that the level of *wg* expression is very low in the transformed territories (white arrowhead).

1997); (4) co-expression with genes involved in dorsoventral wing margin specification, such as *ap* (Diaz-Benjumea and Cohen, 1993) and *fng* (Irvine and Wieschaus, 1994); (5) co-expression of *vg* with UAS p35 to rescue possible cell death (Hay et al., 1994); and (6) co-expression of *vg* with several constructs of genes that are involved in signalling pathways during development, such as UAS-*Dl*, UAS-*Ser*, UAS-*N^{intra}12.1*, UAS-*tkv*^{Q25}, UAS-*Ras*^{V12}, UAS-*tkv*^{DN}, UAS-*Raf*^{β.1DN}.

Secondly, we tested whether the size of the territory of ectopic expression was critical in the process of transformation, overexpressing *vg* with other G4 lines such as *pnr-G4* and *c253-G4*.

We failed, in all instances, to enhance the histotypic transformation caused by overexpressing *vg* alone, and therefore conclude that neither the extension of the territory ectopically expressing *vg* nor the amount of overexpression is significantly relevant to the extent of transformation to wing. Thus, only *wg* in collaboration with *vg* seems to be specifically relevant in the promotion of wing development.

Phenotypes induced by the ectopic expression of *vg* in clones: temporal and genetic limitations to the initiation of a wing developmental program

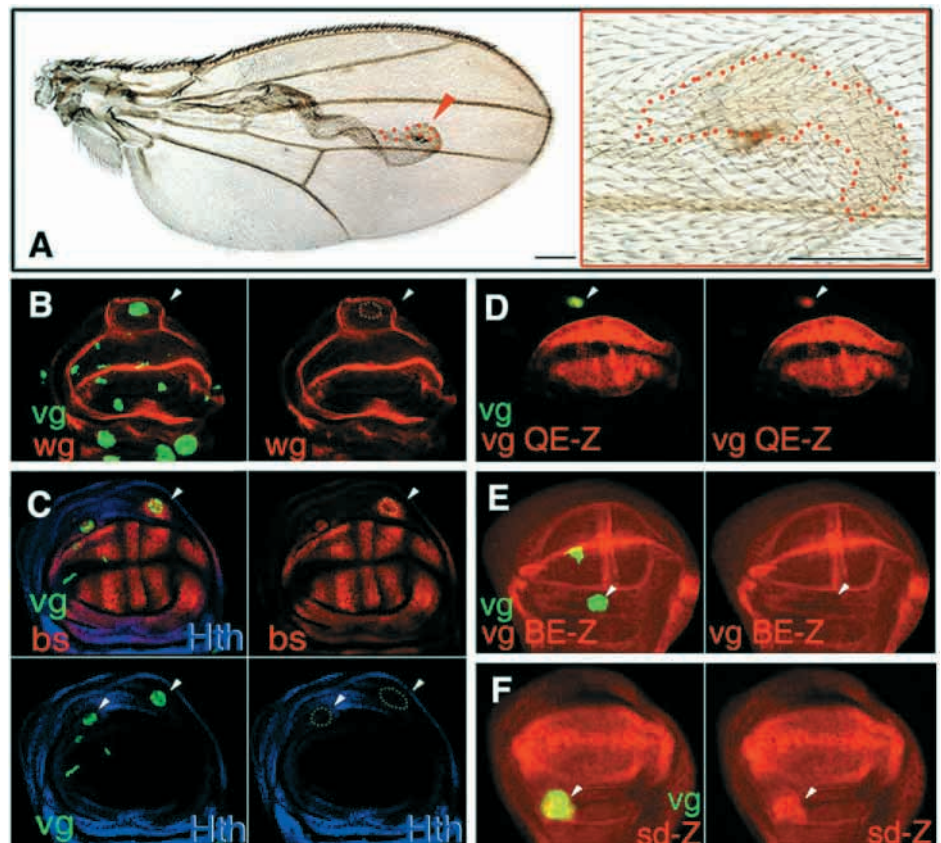
Gene expression driven by a given G4 line occurs simultaneously in all the cells of the territory at a given developmental stage, allowing collaborative effects between cells. By contrast, the ectopic expression in clones provides

temporal and positional limits to the transformation. In clonal mosaics, individual mutant cells are confronted with wild-type cells, allowing the study of autonomous and non-autonomous effects in cell proliferation, cuticular patterning and gene expression. We have monitored the cuticular and genetic effects of *vg* ectopic expression in Flip-out clones [labelled with *forked* (*f*) or GFP], in the wing, haltere, leg and eye-antenna imaginal discs.

In the wing blade and wing hinge, *vg* clones induce tubular, perpendicular outgrowths to the wing surface (Fig. 3A). The outgrowths include *vg*-expressing cells and surrounding wild-type cells (Fig. 3A). *vg* clones are frequently located at the tip of the outgrowth but they can also grow along the lateral zones (Fig. 3A). In those clones that appear in central parts of the wing, all the cells of the outgrowth and the clone always show a differentiation corresponding to wing blade trichomes (Fig. 3A). Clones near the wing margin may differentiate marginal chaetae (not shown). The size of the clones and the non-autonomous part of the outgrowth depend on their distance to the wing margin (Liu et al., 2000).

vg clones in the presumptive wing blade do not modify the wild-type expression of genes expressed, such as *Dll*, *bs* and *nub* (not shown). However in the wing hinge, clones of *vg* overexpression autonomously repress proximal genes such as *hth* (Fig. 3C) (Azpiazu and Morata, 2000; Casares and Mann, 2000; Liu et al., 2000) and activate antagonist distal genes such as *Dll* (Azpiazu and Morata, 2000; Liu et al., 2000), *vg QE-lacZ* (Fig. 3D), *nub* (Liu et al., 2000) and *bs* (Fig. 3C; Table 1)

Fig. 3. Adult phenotypes (A) and imaginal disc gene expression (B-F) caused by the overexpression of *vg* in clones initiated in the wing blade and wing hinge. Adult clones are labelled with *f* and delimited by a broken red line. In the imaginal discs, *vg* clones are associated with green fluorescent protein (GFP). Scale bars: 0.1 mm. (A) Tubular outgrowth including a clone of *vg* (red arrowhead). The age of clone initiation is 36 ± 12 hours AEL. In the inset a detail of the same clone is shown. (B) In the wing hinge, *vg* overexpression in clones (green) displaces the rings of *wg* expression (red) by several cellular diameters. The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (C) In the wing hinge, the *vg* overexpression in clones (green) non-autonomously activates the expression of *Dll* (red) and autonomously represses *Hth* expression (blue). The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (D) In the wing hinge, *vg* overexpression in clones (green) (white arrowhead) autonomously activates the *vg QE-lacZ* reporter (red). The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (E) *vg* overexpression in clones (green; white arrowhead) never activates the *vg BE-lacZ* reporter (red) reporter in the wing imaginal disc (or in other tissues). The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (F) In all studied tissues, *vg* overexpression in clones (green; white arrowhead) autonomously activates the *sd-lacZ* reporter (red). The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL.



(Liu et al., 2000). In some cases, the ectopic expression of distal genes may appear non-autonomously outside the clone, up to a distance of several cell diameters (Fig. 3B,C; Table 1) (Liu et al., 2000). *Vg*, or the *vg* enhancer *lacZ* reporters, are never detected non-autonomously in *vg* clones located outside of the wing blade. Whereas early *vg* clones can show co-expression with *wg* (not shown), later in development, *wg* expression is displaced outside of the clone several cell diameters (Fig. 3A) (Liu et al., 2000). The absence of wing margin cuticular elements in adult *vg* clones and *ct* or *vg* *BE-lacZ* (Fig. 3E; Table 1) expression in the discs suggests that the clones are specified as wing blade, not including wing margin territories. *vg* clones in the wing imaginal disc show a correlated and autonomous expression of *sd-lacZ* within the clone (Fig. 3F). In tissues other than the wing, the ectopic expression of *vg* may drive the expression of its transcriptional partner (not shown) (Halder and Carroll, 2001; Halder et al., 1998).

In territories other than the wing, *vg* clones show transformations toward wing histotype only when they are initiated in specific positions and stages of development. Thus,

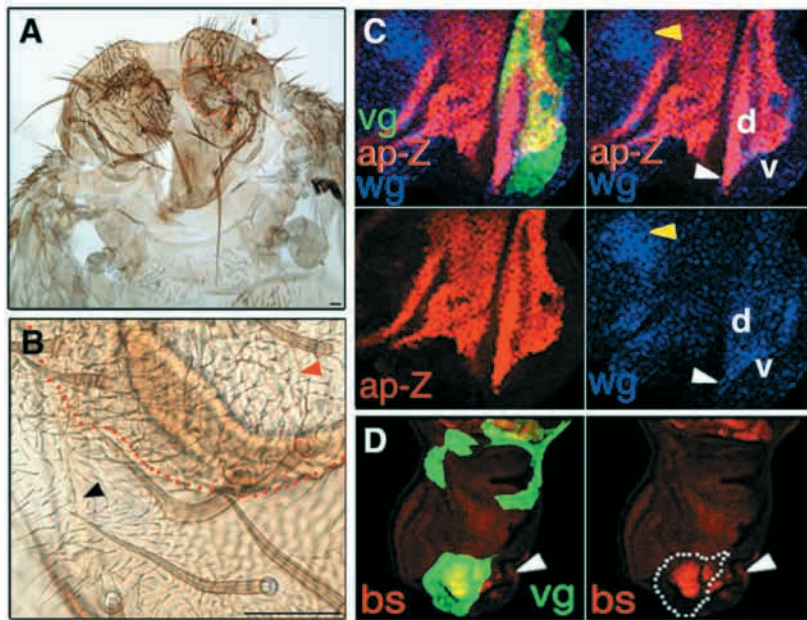


Fig. 4. Adult 'mixed' tissue phenotypes (A,B) and imaginal disc expression (C,D) caused by the ectopic clonal expression of *vg* in the notum. Adult clones are labelled with *f* and delimited by a broken red line. In the imaginal discs, *vg* clones are associated with GFP. The age of clone initiation is 36 ± 12 hours AEL. Scale bars: 0.1 mm. (A) Clone of *vg* ectopic expression in the notum initiated at 36 ± 12 hours AEL; high magnification is shown in B. The clone territory contains trichomes of wing blade (red arrowhead) and notum chaetae in a 'salt and pepper' distribution. Notice the differences between trichomes with wing blade characteristics (red arrowhead) contained in the clone with notum trichomes (black arrowhead). (C) Clones of *vg* ectopic expression (green) in the notum that simultaneously contain cells expressing [dorsal territories (d)] and non-expressing [ventral territories (v)] the *ap-lacZ* reporter. Notice that endogenous *wg* expression in the notum appears displaced (yellow arrowhead), whereas *wg* expression is enhanced within the clone (white arrowhead) at the confrontation between cells expressing and non-expressing *ap-lacZ*, as occurs in the wild-type wing margin. (D) Adult mixed tissues are correlated, in imaginal discs, with the autonomous expression of wing blade genes such as *bs* (red). Notice that the expression of *bs* is non-autonomously induced outside the clone (green; white arrowhead), as well as partially induced within the clone.

ectopic expression of *vg* in clones is only associated with wing outgrowth phenotypes when it is initiated in territories that normally express high levels of *wg* (Fig. 4C, Fig. 5C,H). For example, *vg* clones in the notum, only show wing histotype when they are initiated very early in development (36 ± 12 hours AEL), whereas in the eye and leg imaginal discs, transformations may appear later (48 ± 12 hours AEL). Clones initiated later in development or in territories with low levels of *wg* expression cause cuticular abnormalities (Fig. 5B) but not transformations towards wing histotype.

In tissues other than the wing, clones of *vg* ectopic expression associated with transformation differentiate only wing blade trichomes (Fig. 4A,B, Fig. 5A,G), in contrast to the overexpression of *vg* with G4 lines in the same territories. The wing blade trichomes in some tissues such as notum or legs may appear 'mixed', with tissue-specific chaetae in a 'salt and pepper' distribution (Fig. 4B, Fig. 5A). The adult 'mixed' cuticular patterns are correlated for each examined tissue with the specific expression of some wing blade genes (Table 1). Thus, we never detected the expression of *nub* in the notum,

whereas it is induced in the leg or eye imaginal discs (Fig. 5I); and *bs* is never detected in the eye, whereas it is induced in the leg (Fig. 5D). Paradoxically, in contrast to 'salt and pepper' distribution of the adult cuticular structures detected in the transformations, the ectopic expression of specific wing blade genes only occurs in subsets of cells within the clones (Fig. 4D, Fig. 5D,E). Moreover, the cells expressing wing blade genes are compacted and located anywhere within the clones of *vg* (Fig. 4D, Fig. 5D,E). The discrepancy between cuticular pattern and gene expression suggests that *vg* can not displace all endogenous identity signals or, alternatively, that there are non-autonomous influences of surrounding cells on of the clone expressing wing blade genes.

In tissues other than the wing, the histotype transformations and expression of wing blade gene are cell autonomous. But in the notum, *vg* clones that straddle the DV boundary and are initiated in territories with high levels of *wg* (Fig. 4C) and occasionally cause non-autonomous expression of wing gene markers such as *bs* (Fig. 4D). This phenomenon of non-autonomous induction of tissue to express wing blade genes, we called 'inductive assimilation' (see Discussion). In these clones, the wild-type expression of *wg* is displaced, but where *ap* expressing and non-expressing cells are confronted in the clone, *wg* expression is autonomously enhanced, as in the wing margin (Fig. 4C). This reflects the possibility that *vg* clones may recruit the expression of *ap* before the wild-type specification of DV wing margin, generating ectopic DV wing margins.

As in the G4 experiments, the expression of *en* is not modified in *vg* clones, and the disc therefore retains the embryonic AP compartment specification. However, *ap* expression is altered in clones expressing ectopically *vg* in a tissue-

specific way. Thus, *ap* expression is not modified in the wing imaginal disc or haltere, whereas in leg discs, *ap* expression is induced in ventral territories and repressed in dorsal ones (Fig. 5E,F).

Similar to *en* expression, *Ubx* is not modified in clones expressing ectopically *vg* or *vg* and *wg* simultaneously (*wg-vg*), and therefore, the segmental identity dependent on *Ubx* expression is maintained. In the haltere, *vg* or *wg-vg* clones have otherwise the same autonomous and non-autonomous effects than in the wing (not shown).

The activity of *wg* pathway together with *vg* is insufficient to promote a wing developmental program in clones

In order to test the interaction of the *wg* pathway with *vg* in

clones, we have studied the cuticular and gene expression patterns shown by cells expressing either *vg* or *wg* alone, and co-expressing *wg* and *vg* (*wg-vg*) simultaneously. The phenotypes of *wg* or *wg-vg* clones have been monitored in the wing, haltere, leg and eye-antenna imaginal discs.

In the wing, the overexpression of *wg* in clones does not cause outgrowths and all cells of the clone differentiate into wing margin sensory elements (not shown). These results confirm the proposition of Klein and co-workers (Klein et al., 1997; Klein and Martínez-Arias, 1998) that the overexpression of *wg* induces the cells to acquire characteristics of wing margin. However, these cells fail to express *vg* *BE-lacZ* or other wing margin genes such as *ct* (not shown). In these clones, some wing blade markers such as *Dll* (not shown) (Zecca et al., 1996), *vg* (Fig. 6B) (Zecca et al., 1996) or *nub* (Fig. 6C)

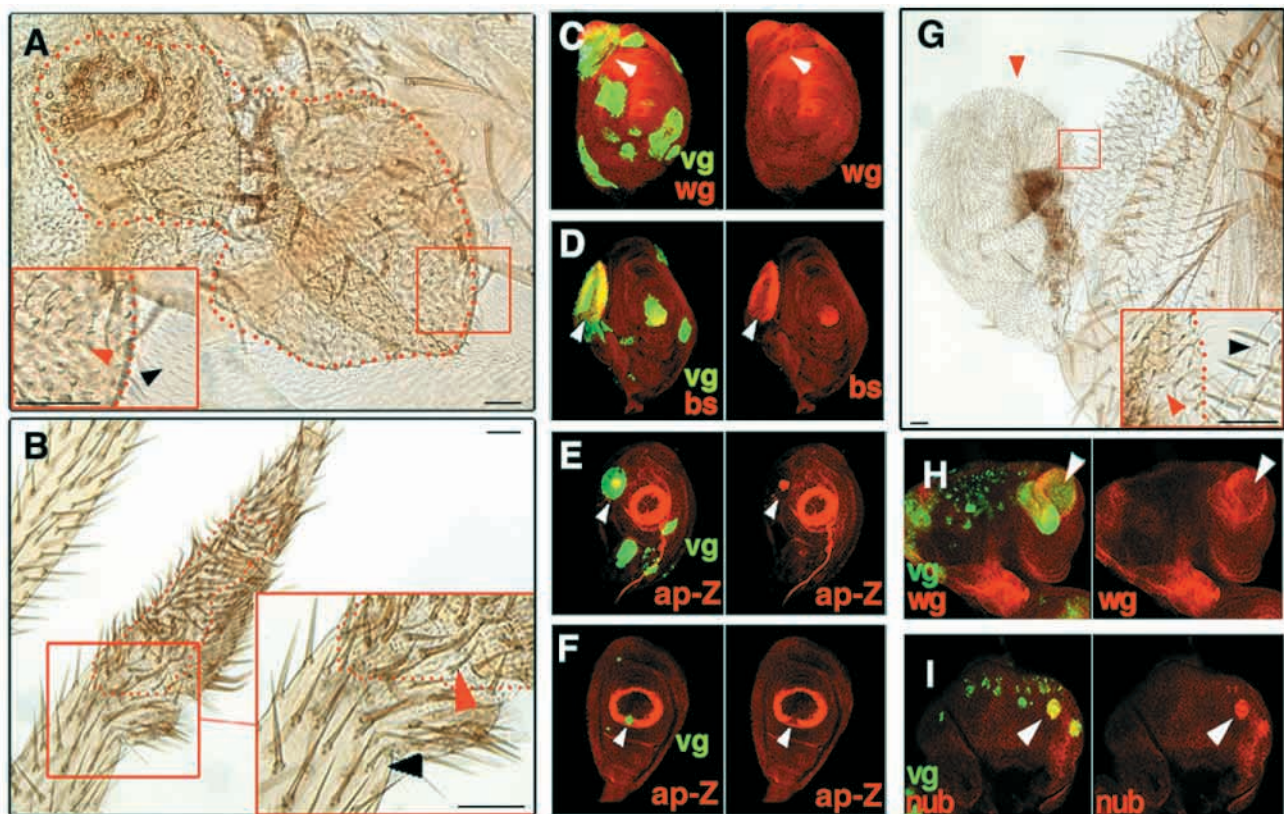


Fig. 5. Adult phenotypes (A,B,G) and gene expression patterns caused by the ectopic expression of *vg* in clones located in the leg (C-F) and eye (H,I) imaginal discs. Adult clones are labelled with *f* and delimited by a broken red line. In the imaginal discs, *vg* clones are associated with GFP. Scale bars: 0.1 mm. (A) Clones of *vg* ectopic expression include 'mixed' cuticular differentiation patterns in the leg, with leg chaetae mixed in a 'salt and pepper' distribution with wing blade trichomes. In the inset, compare trichomes of the leg (black arrowhead) with wing blade trichomes (red arrowhead). The age of clone initiation is 36 ± 12 hours AEL. (B) Proximalisation phenotypes of the leg without cuticular transformation induced by *vg* ectopic expression in clones. In distal tarsal segments of the leg, typical chaetae are associated with bracts (black arrowhead in the inset), whereas in *vg* clones chaetae are not associated with bracts (red arrowhead in the inset). Notice the non-autonomous size reduction in distal tarsal segments of the leg. The age of clone initiation is 36 ± 12 hours AEL. (C) Clones of *vg* ectopic expression (green) autonomously reduce endogenous *wg* expression (red; white arrowhead). The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (D) Clones of *vg* ectopic expression (green) may activate *bs* expression (red) (white arrowhead) in a subset of cells within the clone. Notice that only those clones situated in ventral leg territories induce *bs* expression. The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (E,F) Clones of *vg* ectopic expression (green) in ventral territories of the leg show autonomous expression of the *ap-lacZ* reporter (red) (E), whereas it is repressed in dorsal territories (F). Notice that *ap* expression is not detected in all cells of the clone, similar to D. The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (G) Outgrowth with wing blade trichomes (indicated by red arrowhead) induced by *vg* clone. In the inset, trichomes with wing blade characteristics (red arrowhead) are compared with surrounded ommatidial differentiation (black arrowhead). The age of clone initiation is 36 ± 12 hours AEL. (H) Clones of ectopic *vg* expression (green) autonomously reduce the expression of *wg* (red; white arrowhead). The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (I) In the eye, clones of *vg* ectopic expression (green) autonomously induce the expression of *nub* (white arrowhead). Only those clones induced in territories with high levels of *Wg* express *nub*. The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL.

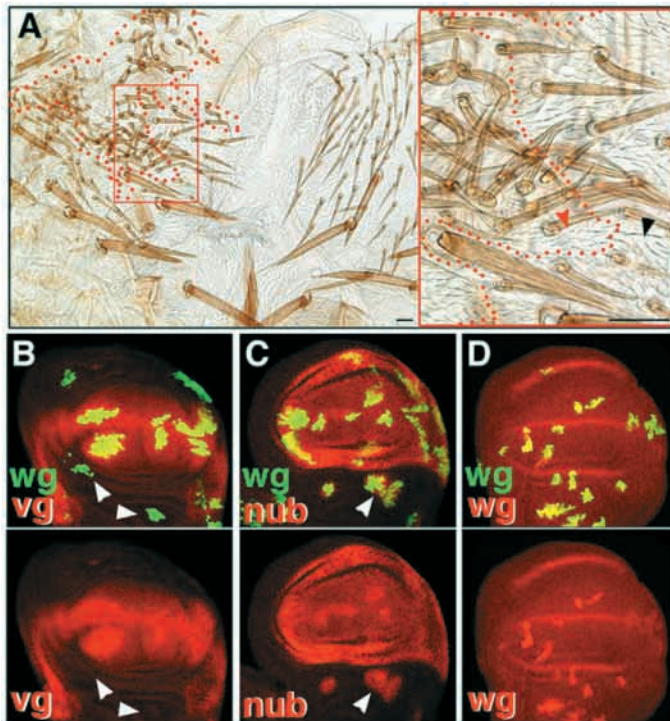


Fig. 6. Cuticular phenotypes (A) and imaginal disc expression pattern (B-D) caused by clonal overexpression of *wg* in the wing imaginal disc. Adult clones are labelled with *f* and delimited by a broken red line. In the imaginal discs, *wg* clones are associated with GFP. Scale bars: 0.1 mm. (A) Clones of *wg* overexpression in the notum show the typical differentiation of this territory. In the inset notice that trichomes are equal inside (red arrowhead) and outside the clone (black arrowhead). The age of clone initiation is 36 ± 12 hours AEL. (B) Clones of *wg* overexpression (green) in the wing blade autonomously and non-autonomously induce the expression of *vg* (red), whereas those clones outside the wing blade do not express *vg* (white arrowhead). The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (C) Clones of *wg* overexpression (green) in the wing imaginal disc autonomously and non-autonomously induce the expression of *nub* (red; white arrowhead). Notice that non-autonomous expression of *nub* is detected only in the closest cells surrounding the clone. The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (D) Clones of *wg* overexpression (green) show homogenous and high levels of *Wg* (red). The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL.

are autonomous and non-autonomously expressed, whereas other wing blade genes such as *bs* are autonomous and non-autonomously repressed (not shown).

In the notum, overexpression of *wg* in clones is not associated with histotype transformations or ‘mixed’ tissues (Fig. 6A), but may autonomously and non-autonomously express wing blade genes such as *Dll* (not shown) and *nub* (Fig. 6C) (Table 1). In *wg* clones, the non-autonomous gene expression is restricted to the nearest surrounding cells of the clone (see below and Discussion). The absence of transformation detected in these clones overexpressing *wg* is correlated with the absence of *vg* expression (Fig. 6B).

In the eye or leg imaginal discs, overexpression of *wg* in clones usually does not activate the ectopic expression of *vg* or show cuticular transformations (Table 1), but causes specific cuticular perturbations and gene expression alterations as

shown elsewhere (Lee and Treisman, 2001; Royet and Finkelstein, 1997; Struhl and Basler, 1993; Theisen et al., 1996).

In the wing blade, the co-expression *wg-vg* in clones leads to the formation of tubular and perpendicular outgrowths. The size of the outgrowths is larger than in *vg* clones and is dependent on the distance from the wing margin (Fig. 7A,B). All the cells of the *wg-vg* clones are differentiated into wing margin sensory elements, as occurs in *wg* clones, whereas non autonomous territories of the outgrowth are differentiated into wing blade trichomes (Fig. 7A,B). In contrast to clones of *wg*, in which we detect homogeneously high levels of *Wg* (Fig. 6D), clones of *wg-vg* show low levels of *Wg* in some cases (Fig. 7E; Table 1), which are still sufficient to promote the autonomous differentiation of wing margin sensory elements. *wg-vg* clones do not express *vg BE-lacZ* or *ct* (not shown) (Table 1). In the wing blade, the activation or repression of wing blade genes is equal to that observed in the *wg* overexpression clones.

In contrast to clones of either *vg* or *wg* alone, *wg-vg* clones in the wing hinge and notum cause transformation phenotypes everywhere. All the cells autonomously differentiate into wing margin and non-autonomously differentiate into wing blade trichomes (Fig. 7C). These transformations are correlated with

Table 1. Effects of *vg*, *wg* or *wg-vg* clones on gene expression patterns in different territories

Genotype	Territory	Tested genes										Transformed tissues (Adult phenotype)	
		<i>nub</i>	<i>bs</i>	<i>vg QE</i>	<i>vg BE</i>	<i>sd-Z</i>	<i>Dll</i>	<i>Hth</i>	<i>wg</i>	<i>ct</i>	<i>ap</i>		<i>en</i>
UAS <i>vg</i>	Wing-hinge	▲▲	▲▲	▲	■	▲	▲	▼	▼	■	■	■	Wing blade without D/V margin
	Notum	■	▲▲	★	■	▲	▲	▼	▲	■	■	Mixed	
	Leg	▲	▲▲	■	■	■	▲	▼	▲	▼	▲	Mixed	
	Eye	▲	■	▲	■	▲	▲	▼	▼	▼	■	■	Wing blade without D/V margin
UAS <i>wg</i> ; UAS <i>vg</i>	Wing-hinge	▲▲	▲▼	▲■	■	★	▲	▲	▼	▲	■	■	D/V margin
	Notum	▲▲	■	▲▲	■	★	▲	▲	▼	■	■	■	D/V margin
	Leg	▲▼	▲■	■	■	★	▼	▲	▲	■	▲	■	Mixed
	Eye	▲	■	▲	■	★	▲	▼	▲	■	■	■	D/V margin
UAS <i>wg</i>	Wing-hinge	▲▲	▼▼	■	▲■	★	▲	★	▲	■	★	★	Not transformed
	Notum	▲▲	■	■	■	★	▲	★	▲	■	★	★	Not transformed
	Leg	★	■	■	■	★	▲	★	▲	■	★	★	Not transformed
	Eye	■	■	■	■	★	★	★	▲	■	★	★	Not transformed
		▲ Autonomous activation	▲ Non-autonomous activation	▼ Autonomous repression	▼ Non-autonomous repression	■ wildtype expression						★ Not studied	

the autonomous and non-autonomous expression of the wing blade genes studied (Fig. 7D,F,G; Table 1). In *wg-vg* clones, the expression of *vg* and other wing blade genes is autonomous and non-autonomous, but, in *wg-vg* clones the non-autonomous expression is extended to larger cell distances surrounding the clone than in *wg* clones (compare Fig. 6C with Fig. 7F and Table 1). In contrast to *vg* clones, the expression of *bs* in *wg-vg* clones is reduced, possibly because of their genetic specification as similar to cells of the wing margin region (Fig. 7G; Table 1).

In imaginal discs other than the wing, the co-expression of *wg-vg* in clones shows ‘mixed’ phenotypes (Fig. 8A,B) and gene expression specificities similar to clones expressing *vg* ectopically (Fig. 8C,D; Table 1), again revealing regional restrictions to the induction of transformations and specific limitations of tissue to activation of wing blade gene expression. In contrast to clones of *wg* alone, *wg-vg* clones show transformation phenotypes, probably because of the presence of *vg* expression. As in *vg* overexpression clones, *wg-vg* clones modify neither *ap* nor *en* expression (Table 1). These results suggest that the co-expression of *wg-vg* remains insufficient to promote a wing developmental program outside the wing imaginal disc.

DISCUSSION

The notion of ‘master gene’, as applied to the gene *ey* (Halder et al., 1995), corresponds to a gene that by itself would trigger a developmental program that is independent of the tissue where it is expressed. Although this definition has been applied to *vg* (Kim et al., 1996), the present results indicate otherwise. The ectopic expression of *vg* elicits certain characteristics of ‘wing blade’ development but is not sufficient for a complete transformation. The effect of *vg* depends on the time and genetic context of the tissue where it is overexpressed. Our results, according to other authors (Klein and Martínez-Arias, 1999), reveal a strong dependence of *vg* on *wg* to initiate a wing blade developmental pathway. *Wg* by itself does not lead to tissue transformations. This cooperative effect between *wg* and *vg* remains insufficient in all tissues analysed, suggesting the existence of additional genes necessary to initiate and drive wing development. We do not know the molecular mechanisms that underlie the interaction between *wg* pathway and *vg*. However, the co-expression of *vg* with a construct of *armadillo* (*arm*) (transcriptional effector of *wg* pathway) using *vg-G4* fails to promote the transformation of eye tissue (preliminary data, not shown). This result suggests that the interaction of *wg* and *vg* takes place upstream of *arm* and, therefore, outside of the cell nucleus. Whereas *vg* requires high levels of *wg* expression to initiate wing development, the clones of *vg* overexpression contain in later stages, low or null levels of *wg* expression. Moreover, *wg-vg* co-overexpression

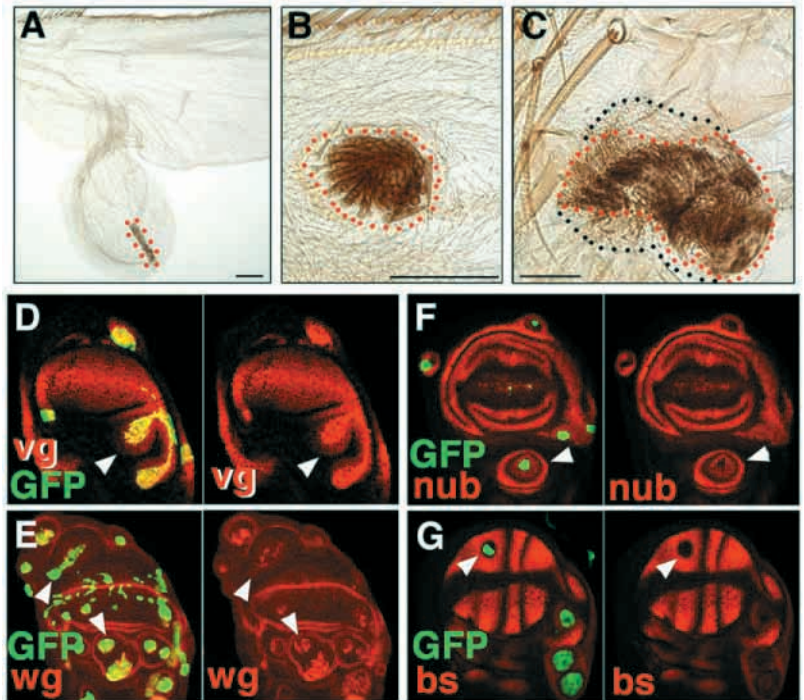


Fig. 7. Adult phenotypes (A-C) and imaginal disc expression patterns (D-G) caused by the co-expression of *wg* and *vg* in clones in the wing imaginal disc. Adult clones are labelled with *f* and delimited by a broken red line. In the imaginal discs, *wg-vg* clones are associated with GFP. Scale bars: 0.1 mm. (A) *wg-vg* clones in the wing blade may induce the appearance of tubular outgrowths. Notice the large non-autonomous growth induced by the clone. The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (B) Clones situated near the wing margin do not induce outgrowths. The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (C) In the notum, all the cells of *wg-vg* clones (delimited by a broken red line) differentiate into wing margin sensory elements and non-autonomously induce cuticular transformation to wing blade (delimited by a broken black line). The age of clone initiation is 36 ± 12 hours AEL. (D) *wg-vg* clones (GFP) induced anywhere within the imaginal disc activate autonomously and non-autonomously the expression of *vg* (red; white arrowhead). The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (E) *wg-vg* (GFP) clones show heterogeneous or low levels of *wg* expression (red; white arrowheads). The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (F) *wg-vg* clones (GFP) autonomously and non-autonomously activate the expression of *nub* (red) anywhere in the imaginal disc. Notice that the non-autonomous expression of *nub* (red) is detected in cells surrounding the clone at long distances. The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. (G) *wg-vg* clones (GFP) in the wing blade autonomously and non-autonomously repress *bs* (red; white arrowhead) expression, but in the wing hinge or in the notum, *bs* is autonomously repressed and non-autonomously induced. The age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL.

clones can also show low levels of *wg*, even when *wg* is also mobilised in G4 territories or in Flip-out clones. These results suggest that *vg* may indirectly reduce *wg* expression once wing development is already initiated, and may explain why the transformed tissue in *vg* clones does not contain wing margin cuticular elements. The late repression of *wg* seems to be important to specify territories of the wing blade depending on *vg* expression outside of the wing margin; if high levels of *Wg* are maintained all cells differentiate into wing margin chaetae. We conclude that *wg* and *vg* activities together specify wing margin territories, but *vg* alone specifies the remaining part of the wing blade.

The ectopic expression of *vg* or *wg-vg* in clones may cause

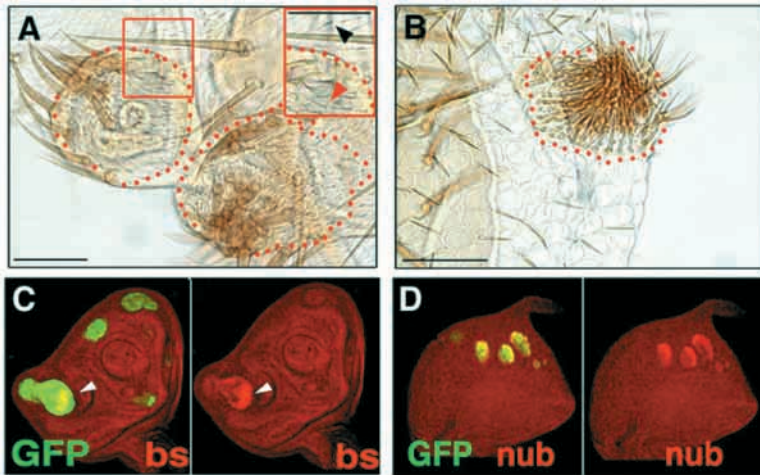


Fig. 8. Adult phenotypes (A,B) and imaginal disc expression patterns (C,D) caused by the ectopic clonal co-expression of *wg* and *vg* in the leg (A,C) and eye (B,E) imaginal discs. Adult clones are labelled with *f* and delimited by a broken red line. In the imaginal discs, clones are associated with GFP. Age of clone initiation is 60 ± 12 hours AEL. Scale bars: 0.1 mm. (A) *wg-vg* clones induce a ‘mixed’ cuticular differentiation pattern in the leg. Notice that in the outgrowth chaetae characteristic of the leg appear mixed with wing blade trichomes in a ‘salt and pepper’ distribution. The inset shows the differences between wing blade trichomes of the clone (red arrowhead) and leg trichomes outside the clone (black arrowhead). (B) In the eye, all cells of the *wg-vg* clones autonomously differentiate into sensory elements of the wing margin. (C) In the leg, *wg-vg* clones activate the expression of wing blade genes such as *bs* (red), only in a subset of cells within the clones (arrowhead). Notice that the expression of *bs* is not detected in all the clones. (D) In the eye, *wg-vg* clones (GFP) autonomously activate the expression of *nub* (red) in all positions.

outgrowths with wing histotypic characteristics or patterning perturbations in the notum, leg or eyes. The transformed tissues show ‘mixed’ phenotypes or ‘mosaic’ territories where, in a ‘salt and pepper’ distribution, wing blade trichomes co-exist with notum or leg chaetae. Adult cuticular ‘mixed’ phenotypes are correlated with the ectopic expression of wing blade genes in particular combinations (Table 1). However, expression of wing blade genes is detected only in some compact groups of cells within the clones. These results indicate that either *vg* or *wg-vg* are insufficient by themselves to displace all endogenous signals of identity, or that reciprocal non-autonomous influences between clonal cells and surrounding cells exist, reducing the expression of wing blade genes to groups of cells within clones. The change of wing blade genes expression in compact groups of cells in the disc and ‘mixed’ (salt and pepper) cuticular phenotypes in the adult could result from cell interactions during patterning and cell rearrangements in pupal stages.

Transformations induced by overexpression of *vg* or *wg-vg* in clones and G4 territories are, as a rule, cell autonomous, except in the wing hinge, notum and corresponding tissues in the haltere. In the wing hinge the cells of the outgrowths outside the *vg* clones differentiate into wing blade territories and show gene expression patterns characteristic of the wing blade cells located between the proximal *vg* expression and the internal ring of *wg* in the wild-type disc. This suggests that the non-autonomous effects in *vg* clones could reproduce the wild-type intercalary growth induced by the confrontation of cells

expressing proximal genes with distal genes. In the notum, *vg* clones located simultaneously in territories expressing and not expressing *ap*, and initiated in the *wg* expression domain, may non-autonomously recruit surrounding cells to express characteristic wing blade genes at long cell distances, as *wg-vg* clones do. Thus, *vg* together with *wg* expression is necessary to induce and extend the transformation over long distances outside the clones. In contrast to *vg* or *wg-vg* clones, *wg* clones do not show non-autonomous transformation phenotypes and expression of wing blade genes at long distances. The issue of whether the recruitment process is caused by *Wg* diffusion, or whether it results from intercalary growth induced by the confrontation between cells expressing proximal genes (genes of the notum) and cells expressing distal genes (wing blade genes), remains unresolved.

The expression of selector genes like *Ubx* and *en* is not modified by overexpression of *vg* or *wg-vg*, but is inherited and maintained. However, the expression of the selector gene *ap* can be modified or inherited in some tissues, such as the legs, to give DV identity.

The comparative analysis of *vg* with other morphogenetic genes suggests that *vg* acts as *Dll*, *pnr* or *iro*, rather than as a ‘master’ or ‘selector of tissue’ gene: *vg* is simply a component of the genetic combination that is necessary to initiate and drive wing blade development where *vg* is normally expressed. Interestingly, the function of *vg*, in addition to conferring territorial identity, may also non-autonomously recruit surrounding cells (‘inductive assimilation’), changing their specific cuticular and gene expression patterns. This is related to its function as a local organiser of growth when it is expressed among cells with different positional or regional fates. Later in development, *vg*, in combination with other genes, activates an inventory of downstream wing genes that specify more discrete territories within the wing blade such as veins, interveins and sensory elements.

We thank S. Cohen, F. Casares, M. Affolter, A. Martínez-Arias, S. Carroll, M. Calleja, J. F. de Celis and the Developmental Studies Hybridoma Bank for providing flies and antibodies. We also thank C. Extavour, J. Resino, R. Barrio and other members of the laboratory for reading and discussing this work. R. Hernández and A. Hernando contributed with skillful technical assistance. This work was supported by grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica and an institutional grant from the F. Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. L. A. B. is a fellow of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) in collaboration with PACISA-GIRALT (I3P-BPD2001-1).

REFERENCES

- Abu-Shaar, M. and Mann, R. S. (1998). Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development. *Development* **125**, 3821–3830.
- Affolter, M. and Mann, R. (2001). Development. Legs, eyes, or wings—selectors and signals make the difference. *Science* **292**, 1080–1081.
- Anand, A., Fernandes, J., Arunan, M. C., Bhosekar, S., Chopra, A.,

- Dedhia, N., Sequiera, K., Hasan, G., Palazzolo, M. J., Vijay Raghavan, K. et al.** (1990). Drosophila enhancer-trap transposants – gene expression in chemosensory and motor pathways and identification of mutants affected in smell and taste ability. *J. Genet.* **69**, 151-168.
- Azpiazu, N. and Morata, G.** (2000). Function and regulation of homothorax in the wing imaginal disc of Drosophila. *Development* **127**, 2685-2693.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Bray, S.** (1999). Drosophila development: Scalloped and Vestigial take wing. *Curr. Biol.* **9**, R245-R247.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G.** (1996). Visualization of gene expression in living adult Drosophila. *Science* **11**, 252-255.
- Calleja, M., Herranz, H., Estella, C., Casal, J., Lawrence, P., Simpson, P. and Morata, G.** (2000). Generation of medial and lateral dorsal body domains by the pannier gene of Drosophila. *Development* **127**, 3971-3980.
- Campbell, G. and Tomlinson, A.** (1998). The roles of the homeobox genes *aristales* and *Distal-less* in patterning the legs and wings of Drosophila. *Development* **125**, 4483-4493.
- Campbell, S., Inamdar, M., Rodrigues, V., Raghavan, V., Palazzolo, M. and Chovnick, A.** (1992). The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in Drosophila. *Genes Dev* **6**, 367-379.
- Casares, F. and Mann, R. S.** (2000). A dual role for homothorax in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in Drosophila. *Development* **127**, 1499-1508.
- Cifuentes, F. J. and Garcia-Bellido, A.** (1997). Proximo-distal specification in the wing disc of Drosophila by the nubbin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11405-11410.
- de Celis, J. F. and Bray, S.** (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the Drosophila wing. *Development* **124**, 3241-3251.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in Drosophila. *Cell* **75**, 741-752.
- Diez del Corral, R., Aroca, P., Gomez-Skarmeta, J. L., Cavodeassi, F. and Modolell, J.** (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in Drosophila. *Genes Dev.* **13**, 1754-1761.
- Fernandez-Funez, P., Lu, C. H., Rincon-Limas, D. E., Garcia-Bellido, A. and Botas, J.** (1998). The relative expression amounts of *apterous* and its co-factor *dLdb/Chip* are critical for dorso-ventral compartmentalization in the Drosophila wing. *EMBO J.* **17**, 6846-6853.
- Garcia-Bellido, A.** (1975). Genetic control of wing disc development in Drosophila. *Ciba Found. Symp.* 161-182.
- Gomez-Skarmeta, J. L., del Corral, R. D., de la Calle-Mustienes, E., Ferre-Marco, D. and Modolell, J.** (1996). Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* **85**, 95-105.
- Gonzalez-Crespo, S., Abu-Shaar, M., Torres, M., Martinez, A. C., Mann, R. S. and Morata, G.** (1998). Antagonism between extradenticle function and Hedgehog signalling in the developing limb. *Nature* **394**, 196-200.
- Gorfinkiel, N., Morata, G. and Guerrero, I.** (1997). The homeobox gene *Distal-less* induces ventral appendage development in Drosophila. *Genes Dev.* **11**, 2259-2271.
- Grillenzoni, N., van Helden, J., Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A.** (1998). The iroquois complex controls the somatotomy of Drosophila notum mechanosensory projections. *Development* **125**, 3563-3569.
- Haerry, T. E., Khalsa, O., O'Connor, M. B. and Wharton, K. A.** (1998). Synergistic signaling by two BMP ligands through the SAX and TKV receptors controls wing growth and patterning in Drosophila. *Development* **125**, 3977-3987.
- Halder, G. and Carroll, S. B.** (2001). Binding of the Vestigial co-factor switches the DNA-target selectivity of the Scalloped selector protein. *Development* **128**, 3295-3305.
- Halder, G., Callaerts, P. and Gehring, W. J.** (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyelless* gene in Drosophila. *Science* **267**, 1788-1792.
- Halder, G., Polaczyk, P., Kraus, M. E., Hudson, A., Kim, J., Laughon, A. and Carroll, S.** (1998). The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in Drosophila. *Genes Dev.* **12**, 3900-3909.
- Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M.** (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in Drosophila. *Development* **120**, 2121-2129.
- Huppert, S. S., Jacobsen, T. L. and Muskavitch, M. A.** (1997). Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for Drosophila wing vein morphogenesis. *Development* **124**, 3283-3291.
- Irvine, K. D. and Vogt, T. F.** (1997). Dorsal-ventral signaling in limb development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 867-876.
- Irvine, K. D. and Wieschaus, E.** (1994). *fringe*, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during Drosophila wing development. *Cell* **79**, 595-606.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. and Yamamoto, D.** (1997). The Drosophila mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761-771.
- Jimenez, F. and Campos-Ortega, J. A.** (1990). Defective neuroblast commitment in mutants of the *achaete-scute* complex and adjacent genes of *D. melanogaster*. *Neuron* **5**, 81-89.
- Karim, F. D. and Rubin, G. M.** (1998). Ectopic expression of activated Ras1 induces hyperplastic growth and increased cell death in Drosophila imaginal tissues. *Development* **125**, 1-9.
- Kassis, J. A., Noll, E., VanSickle, E. P., Odenwald, W. F. and Perrimon, N.** (1992). Altering the insertional specificity of a Drosophila transposable element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1**, 1919-1923.
- Kim, J., Irvine, K. D. and Carroll, S. B.** (1995). Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing Drosophila wing. *Cell* **82**, 795-802.
- Kim, J., Sebring, A., Esch, J. J., Kraus, M. E., Vorwerk, K., Magee, J. and Carroll, S. B.** (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by Drosophila *vestigial* gene. *Nature* **382**, 133-138.
- Klein, T. and Martínez-Arias, A.** (1998). Different spatial and temporal interactions between Notch, *wingless*, and *vestigial* specify proximal and distal pattern elements of the wing in Drosophila. *Dev. Biol.* **194**, 196-212.
- Klein, T. and Martínez-Arias, A.** (1999). The *vestigial* gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in Drosophila. *Development* **126**, 913-925.
- Klein, T., Brennan, K. and Martínez-Arias, A.** (1997). An intrinsic dominant negative activity of *serrate* that is modulated during wing development in Drosophila. *Dev. Biol.* **189**, 123-134.
- Lawrence, P. A., Bodmer, R. and Vincent, J. P.** (1995). Segmental patterning of heart precursors in Drosophila. *Development* **121**, 4303-4308.
- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M.** (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the Drosophila wing. *Nature* **381**, 387-393.
- Lee, J. D. and Treisman, J. E.** (2001). The role of *Wingless* signaling in establishing the anteroposterior and dorsoventral axes of the eye disc. *Development* **128**, 1519-1529.
- Liu, X., Grammont, M. and Irvine, K. D.** (2000). Roles for scalloped and *vestigial* in regulating cell affinity and interactions between the wing blade and the wing hinge. *Dev. Biol.* **228**, 287-303.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M.** (1998). Boundary formation in Drosophila wing: Notch activity attenuated by the POU protein Nubbin. *Science* **281**, 409-413.
- Paumard-Rigal, S., Zider, A., Vaudin, P. and Silber, J.** (1998). Specific interactions between *vestigial* and scalloped are required to promote wing tissue proliferation in Drosophila melanogaster. *Dev. Genes Evol.* **208**, 440-446.
- Royet, J. and Finkelstein, R.** (1997). Establishing primordia in the Drosophila eye-antennal imaginal disc: the roles of decapentaplegic, *wingless* and *hedgehog*. *Development* **124**, 4793-4800.
- Shashidhara, L. S., Agrawal, N., Bajpai, R., Bharathi, V. and Sinha, P.** (1999). Negative regulation of dorsoventral signaling by the homeotic gene *Ultrabithorax* during haltere development in Drosophila. *Dev. Biol.* **212**, 491-502.
- Simmonds, A. J., Brook, W. J., Cohen, S. M. and Bell, J. B.** (1995). Distinguishable functions for engrailed and *invected* in anterior-posterior patterning in the Drosophila wing. *Nature* **376**, 424-427.
- Simmonds, A. J., Liu, X., Soanes, K. H., Krause, H. M., Irvine, K. D. and Bell, J. B.** (1998). Molecular interactions between *Vestigial* and *Scalloped* promote wing formation in Drosophila. *Genes Dev.* **12**, 3815-3820.
- Speicher, S. A., Thomas, U., Hinz, U. and Knust, E.** (1994). The *Serrate* locus of Drosophila and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development* **120**, 535-544.
- Staebling-Hampton, K., Jackson, P. D., Clark, M. J., Brand, A. H. and Hoffmann, F. M.** (1994). Specificity of bone morphogenetic protein-related factors: cell fate and gene expression changes in Drosophila embryos induced by decapentaplegic but not 60A. *Cell Growth Differ.* **5**, 585-593.

- Struhl, G. and Basler, K.** (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* **72**, 527-540.
- Theisen, H., Haerry, T. E., O'Connor, M. B. and Marsh, J. L.** (1996). Developmental territories created by mutual antagonism between Wingless and Decapentaplegic. *Development* **122**, 3939-3948.
- Weatherbee, S. D., Halder, G., Kim, J., Hudson, A. and Carroll, S.** (1998). Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes Dev.* **12**, 1474-1482.
- Williams, J. A., Bell, J. B. and Carroll, S. B.** (1991). Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes Dev.* **5**, 2481-2495.
- Williams, J. A., Paddock, S. W. and Carroll, S. B.** (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* **117**, 571-584.
- Williams, J. A., Paddock, S. W., Vorwerk, K. and Carroll, S. B.** (1994). Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature* **368**, 299-305.
- Wu, J. and Cohen, S. M.** (1999). Proximodistal axis formation in the *Drosophila* leg: subdivision into proximal and distal domains by Homothorax and Distal-less. *Development* **126**, 109-117.
- Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-844.

Wg and Egfr signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in *Drosophila* wing discs

Luis Alberto Baena-López^{*,†}, José Carlos Pastor-Pareja^{*,†} and Jaime Resino^{*}

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Facultad de Ciencias, 28049, Madrid, Spain

^{*}All authors contributed equally to this work

[†]Authors for correspondence (e-mail: abaena@cbm.uam.es and jcpastor@cbm.uam.es)

Accepted 26 September 2003

Development 130, 6497-6506

Published by The Company of Biologists 2003

doi:10.1242/dev.00884

Summary

Imaginal discs contain a population of cells, known as peripodial epithelium, that differ morphologically and genetically from the rest of imaginal cells. The peripodial epithelium has a small contribution to the adult epidermis, though it is essential for the eversion of the discs during metamorphosis. The genetic mechanisms that control the identity and cellular morphology of the peripodial epithelia are poorly understood. In this report, we investigate the mechanisms that pattern the peripodial side of the wing imaginal disc during early larval development. At this time, the activities of the Wingless (Wg) and Epidermal growth factor receptor (Egfr) signalling pathways specify the prospective wing and notum fields, respectively. We show that peripodial epithelium specification occurs in the

absence of Wingless and Egfr signalling. The ectopic activity in the peripodial epithelium of any of these signalling pathways transforms the shape of peripodial cells from squamous to columnar and resets their gene expression profile. Furthermore, peripodial cells where Wingless signalling is ectopically active acquire hinge identity, while ectopic Egfr activation results in notum specification. These findings suggest that suppression of Wg and Egfr activities is an early step in the development of the peripodial epithelium of the wing discs.

Key words: Peripodial epithelium, *Drosophila*, Squamous cells, Imaginal discs, Wing disc, Patterning, Wingless, Egfr

Introduction

The development of *Drosophila* imaginal discs, from which most of the adult epidermis derives, is a classical model for the study of pattern formation. Small groups of cells of the embryonic ectoderm are genetically specified in stereotyped positions to constitute the primordia of imaginal discs (Cohen, 1993). Later on, during larval development, the primordia invaginate and become flat epithelial sacs with two opposing faces enclosing the disc lumen (Cohen, 1993). In mature imaginal discs, both sides present easily noticeable differences in cell morphology and cell density (Fig. 1A), maybe with the exception of genital discs (Littlefield and Bryant, 1979). One side contains most of the cells of the disc in the form of a columnar monolayered epithelium, while the other face (peripodial side) consists of squamous cells, in the peripodial epithelium (PE), surrounded by cubic cells (Fig. 1A) (Auerbach, 1936; Waddington, 1940). The PE is required, together with the cells of the stalk, for the eversion of the discs during metamorphosis (Fristrom and Fristrom, 1993; Milner et al., 1984) (J.C.P.-P., E. Martín-Blanco and A. García-Bellido, unpublished), and their subsequent closure (Agnes et al., 1999; Martín-Blanco et al., 2000; Usui and Simpson, 2000; Zeitlinger and Bohmann, 1999), but has a small contribution to the adult cuticle (J.C.P.-P., E. Martín-Blanco and A. García-Bellido, unpublished). Cubic cells produce adult pleural structures (Bryant, 1978; Sprey and Oldenhave, 1974). The columnar and cubic cells, therefore, are imaginal cells in the strictest sense, as they eventually give rise to all

the adult epidermal structures except for the abdomen (Bryant, 1978).

Cell proliferation in the imaginal discs during larval development is coordinated with progressive, genetically determined territorial segregation. Pattern formation and territorial segregation in imaginal discs have been extensively studied, but little attention has been drawn to the development of the peripodial side of the discs. Cell lineage analyses in the PE of the wing imaginal disc show preferential growth territories associated to gene expression domains, although the anteroposterior border is the only clonal restriction described so far in the PE (Resino et al., 2002). Recent reports suggested that several signalling proteins produced in the PE of the disc, such as Wingless (Wg), Hedgehog (Hh) and Decapentaplegic (Dpp), might be necessary for the proliferation and patterning of imaginal discs, either released by cell contact through transluminal extensions (Cho et al., 2000; Gibson and Schubiger, 2000) or secreted into the disc lumen (Gibson et al., 2002). These findings underline the relevance of exploring the development of the PE in order to understand how the size and pattern of the whole wing disc is established.

At the end of the third instar, the peripodial side of the wing imaginal disc consists of several cell types with different morphology (Fig. 1A) and gene expression profiles (Fig. 1D,F). The central territories in the peripodial side of the wing imaginal disc consist of around 400 squamous cells that constitute its PE. *Ultrabithorax* (*Ubx*) (Fig. 1D) and *puckered* (*puc*), among other genes (Gibson and Schubiger, 2001), are

expressed in the PE territory. *Ubx*, although expressed in all posterior cells of the embryonic primordium of the wing imaginal disc, is later restricted to its peripodial side (Brower, 1987). The cubic distal cells show differential expression of *zinc finger homeodomain 2* (*zfh-2*) (Fig. 1F) and *dachsous* (*ds*) (not shown), while proximal cubic cells express the genes of the *iroquois complex* (*iro-C*) (Fig. 1F). These genes expressed in cubic cells are also expressed in the wing-notum side of the disc, where their contribution to the patterning of the disc has been studied. The expression of *zfh-2* depends on Wg signalling (Whitworth and Russell, 2003) and is required, together with *ds*, for wing hinge specification (Clark et al., 1995; Whitworth and Russell, 2003). The *iro-C* genes, however, specify different territories in the notum (Diez del Corral et al., 1999) and their expression there depends on Epidermal growth factor receptor (Egfr) signalling (Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002).

The complementary and mutually exclusive activities of the Wg and Egfr signalling pathways are responsible for the subdivision of the wing-notum side of the wing disc into proximal (notum) and distal (wing and hinge) territories early during the second larval instar (Baonza et al., 2000; Klein, 2001; Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002). These signalling pathways are activated, respectively, by the diffusible ligands Wg (Ng et al., 1996; Williams et al., 1993) and Vein (Vn) (Simcox et al., 1996). At this stage, the expression domain of *wg* is restricted to a sector of anterior distal cells (Williams et al., 1993), while the expression domain of *vn* is restricted to a central line of proximal cells (Simcox et al., 1996). Loss of function of the Wg pathway prevents the development of distal structures, thus allowing the expansion of Egfr activity to distal territories. Conversely, ectopic Wg activity represses Egfr signalling in the notum, causing wing duplications (Baonza et al., 2000), though loss of Egfr function does not allow expansion of Wg signalling (Wang et al., 2000). Published reports only evaluate the activity of both signalling pathways in the wing-notum side of the disc, despite the diffusive ability of Wg and Vn. The wing field is later subdivided into wing blade and wing hinge territories, by the combined action of Wg signalling and Vestigial (wing blade) (Baena-Lopez and Garcia-Bellido, 2003; Klein and Martínez-Arias, 1999) or Wg signalling alone (wing hinge) (Baena-Lopez and Garcia-Bellido, 2003; Klein, 2001; Whitworth and Russell, 2003).

In this article, we analyse the mechanisms of genetic specification of the wing disc PE. We show that the PE is a third developmental field set in the early development of the wing disc, different from the wing and notum fields, with distinct genetic requirements. We also show that Wg and Egfr signalling pathways are active up to the border between cubic and squamous cells in the peripodial side of the wing disc. Correct development of the PE does not require the activity of these signalling cascades. Furthermore, Wg or Egfr signalling transform the morphology and genetic specification of squamous cells into those characteristic of territories in the wing-notum side.

Materials and methods

Fly strains

We have used the following fly strains: *UAS-E-cadherin^{intra5}* (Sansón et al., 1996), *UAS-wingless^G* (Klein and Arias, 1998), *UAS-Ras^{V12}*

(constitutive activator of the Egfr pathway) (Karim and Rubin, 1998), *UAS-DN Raf^{3.1}* (=UAS-phl.KMRaf3.1) (dominant negative effect on the Egfr pathway) (Martin-Blanco et al., 1999), *UAS-vein* (Schnepp et al., 1998), *UAS-armadillo Δα* (constitutive activator of the Wg pathway, unable to target adherens junctions) (White et al., 1998), *UAS-vestigial^Z* (Paumard-Rigal et al., 1998) and *apterous-Gal4* (Calleja et al., 1996). The *zfh-2^{MS209} GAL4* line (Capdevila and Guerrero, 1994) expresses GAL4 in the same pattern as the gene *zfh-2* (Whitworth and Russell, 2003).

Clonal analysis

Gain-of-function clones were generated by the FLP/FRT technique (Chou and Perrimon, 1992). All the *UAS* fly strains were crossed with *y w hsp70-flp; Act FRT y⁺ FRT Gal4 UAS-GFP* (Ito et al., 1997) and heat shocked for 7 minutes at 37°C at 24-48 or 48-72 hours after egg laying (AEL).

Wg gain-of-function clones were also generated by the MARCM technique (Fig. 3B,E,G) (Lee and Luo, 1999). *y w hsp70-flp Tubulinα1-Gal4 UAS-GFPnls; UAS-wg^G; Tubulinα1-Gal80 FRT2A/FRT2A* (Struhl and Greenwald, 2001) larvae were heat shocked at 37°C for 15 minutes at 48-72 hours AEL.

No less than 20 clones were examined for each genotype.

Immunohistochemistry

Dissected larvae were fixed for 20 minutes in a 4% paraformaldehyde solution in PBT (PBS/0.1% Tween 20) and immunostained with mouse anti-*Ubx* (provided by Ernesto Sanchez-Herrero), rat anti-*Iro-C* (provided by Juan Modolell), rat anti-*Zfh-2* (provided by Martha Lundell), mouse anti-*Armadillo* (Arm) (Hybridoma Bank), mouse anti-*Discs large 1* (*Dlg1*) (Hybridoma Bank), mouse anti-*Wg* (Hybridoma Bank), rabbit anti-*Vg* (provided by Sean Carroll), rabbit anti-*Distalless* (*Dll*) (provided by Sean Carroll), rat anti-*Ds* (provided by Michael Simon), mouse anti-*Nubbin* (*Nub*) (provided by S. Cohen), rat anti-*Tailup* (*Tup*) (provided by Jim Skeath) or guinea pig anti-*Eyegone* (*Eyg*) (provided by Natalia Azpiazu) antibodies in PBT-BSA (PBT/0.3% BSA). Alexa Fluor-488-, -546- (Molecular Probes) or Cy5 (Jackson ImmunoResearch)-conjugated secondary antibodies were used to detect primary antibodies. F-actin staining was performed with Texas Red-coupled phalloidin (Sigma). Cell nuclei were stained for 20 minutes in a 1 mM To-Pro-3 iodide (Molecular Probes) solution in PBT. Imaginal discs were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Inc).

Microscopy and image treatment

Images were acquired in a BioRad 2000 confocal microscope and treated with the Metaview (Universal Imaging) and Photoshop 7.0 (Adobe Corp) image programs.

Results

Early development of the peripodial side of the wing imaginal disc

At the beginning of the second larval instar, all cells of the wing imaginal disc show columnar morphology (Fig. 1B). Soon after, in mid second instar, some proximal cells at the disc peripodial side start to change their shapes from columnar to squamous (Fig. 1C). In the third instar disc, squamous cells fill most of the peripodial side, constituting its PE (Fig. 1D). The differences in cell shape, however, are preceded by differences in gene expression between the two sides of the disc (Fig. 1B). In mid second instar, the squamous cells, as well as surrounding cubic cells in the peripodial side of the disc, express high levels of *Ubx* (Fig. 1C). Later on, in the third instar disc, high levels of *Ubx* are maintained only in squamous cells, while posterior cubic cells show a decreasing gradient of

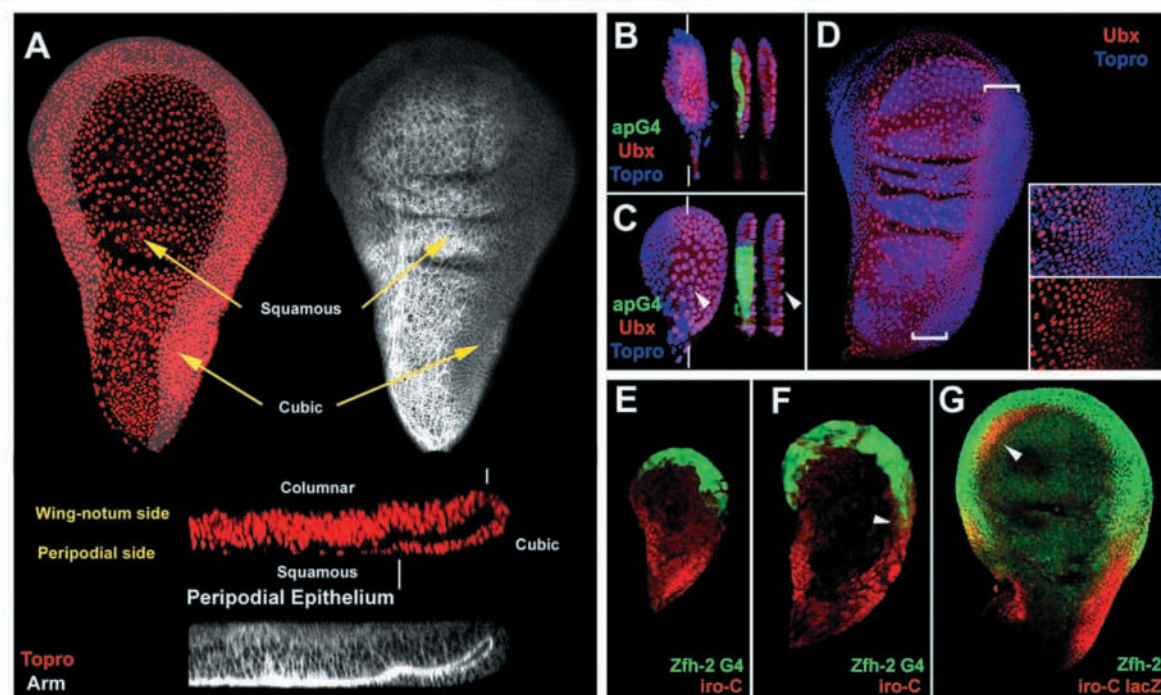


Fig. 1. Development of the peripodial side of the wing disc. (A) PE structure in a third instar wing disc. Characteristic low-density nuclear distribution and squamous cell morphology are noticed in the PE. Nuclei are stained with the DNA dye TO-PRO-3 (red) and Arm localization in the *zonula adherens* (white) reveals cell shape. A white shadow delimits the surrounding cubic cells. The different cell types are described in a transverse section of a disc. (B-D) *Ubx* expression in the developing PE. In mid second instar (B), major differences in cell shape throughout the disc are not observed. In late second instar (C), squamous cells are seen in a proximal territory of the peripodial side of the disc (arrowheads). At this time, the expression of *Ubx* is still in poor correlation with squamous morphology. GFP expression in the wing-notum side of second instar discs, driven by *ap-GAL4*, allows comparison of cell shape between the two sides of the disc in the transversal sections. In third instar discs (D), *Ubx* is expressed in squamous and some cubic cells. Notice the decreasing gradient of *Ubx* expression in cubic cells (brackets and inset at higher magnification). (E-G) *zfh-2* (green) and *iro-C* (red) expression domains in developing wing discs. In early mid second instar (E), *zfh-2*^{MS209} *GAL4* (see Materials and methods) and *iro-C* are expressed in proximal and distal cubic cells, respectively. Note that in early third instar discs (F) *zfh-2* and *iro-C* domains now overlap in cubic posterior cells (arrowhead). During late larval development (G), *iro-C-lacZ* expression appears in some distal cubic cells (arrowhead). Discs are oriented anterior towards the left and distal upwards in all panels and figures.

Ubx expression (Fig. 1D). The expression of *Ubx*, although it is a good genetic marker of the wing disc PE, is not required for PE development, as loss-of-function clones of *Ubx* are normal in size and shape and do not modify peripodial cell morphology (L. de Navas and E. Sanchez-Herrero, personal communication).

Proximodistal (PD) territorial segregation in the wing-notum side of the wing disc proceeds simultaneously to the morphological changes of peripodial cells, and it is driven by the complementary and mutually exclusive activities of the Wg and Egfr signalling pathways (Baonza et al., 2000; Klein, 2001; Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002). In the second instar, cubic cells express *zfh-2* and *iro-C* in distal and proximal domains, respectively (Fig. 1E). The early expression pattern of these genes, which is dependent on Wg and Egfr signalling (Baonza et al., 2000; Klein, 2001; Wang et al., 2000; Whitworth and Russell, 2003; Zecca and Struhl, 2002) suggests that the mechanism of PD segregation is also active in the peripodial side of the disc, although their expression pattern later evolves to overlap in some regions (Fig. 1F,G). In this context, proximal cubic cells would be part of the notum developmental field, whereas distal cubic cells would be part of the wing developmental field. Interestingly, *Zfh-2* and *Iro-C* are not detected in the PE. Also, the limit of expression of

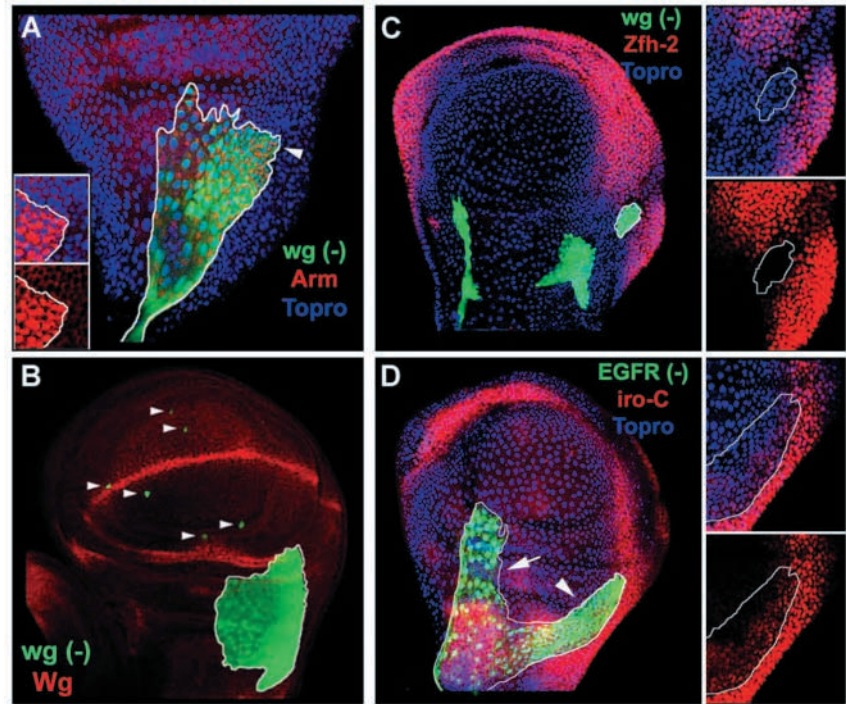
Zfh-2 and *Iro-C* is sharp and coincident with the limit between cubic and squamous cells.

Wg and Egfr signalling activities are not required for PE development

The absence of expression of Wg and Egfr signalling downstream genes suggests that the activity of both signalling pathways might be repressed in the prospective PE from embryonic development or early larval stages in order to generate a difference between the wing and notum fields and the PE of the disc. To evaluate the role of Wg and Egfr signalling in the development of the peripodial side of the wing imaginal disc, we generated loss-of-function clones for both signalling pathways at 24-48 and 48-72 hours after egg laying (AEL).

Clones expressing the intracellular domain of E-cadherin (*E-Cadh*^{intra5}) autonomously lack Wg signalling because of sequestering of Armadillo (Arm) (Sanson et al., 1996), the transcriptional effector of Wg signalling, consistent with the cytoplasmic accumulation of Arm we observe (Fig. 2A). *E-Cadh*^{intra5} overexpression early in the prospective wing field abolishes its development, causing notum duplications and a complete lack of Wg function (Sanson et al., 1996; Sharma and Chopra, 1976). These clones do not survive or are smaller in

Fig. 2. Wg and Egfr signalling pathways are not required for the development of the PE. (A-C) Clones lacking Wg signalling because of E-Cadh^{intra5} overexpression (green). These clones accumulate the Wg signalling transcriptional effector Arm (red) in the cytoplasm (A, 24-48 hours AEL). The arrowhead indicates the region of the clone magnified in the insets. (B) E-Cadh^{intra5} overexpression reduces the proliferation and survival of wing-notum cells (arrowheads), but has no effect in peripodial cells (outlined clone). Wg is detected in red. Clones generated 24-48 hours AEL. (C) These clones also eliminate the expression of *zfh-2* (red) in cubic cells (inset at higher magnification of the outlined clone). Clones generated 48-72 hours AEL. (D) Clones lacking Egfr signalling because of overexpression of DN-Raf^{3.1} (green, 24-48 h AEL) reduce *iro-C* expression (red) in cubic cells (inset at higher magnification of the region pointed by the arrowhead). The same clone does not affect the proliferation and survival of squamous cells (arrow).



size than controls in the wing-notum side of the disc, but are normal in size in the PE (Fig. 2B). In addition, these clones eliminate the expression of *zfh-2* in distal cubic cells of the peripodial side (Fig. 2C).

To analyse the requirement of Egfr signalling, we repressed Egfr activity in clones of cells by overexpressing a dominant-negative form of the Raf protein (DN-Raf^{3.1}) (Martin-Blanco et al., 1999), which is required for the intracellular transduction of the signal. The expression of DN-Raf^{3.1} in early larval development reduces notum territories (Baonza et al., 2000; Wang et al., 2000; Zecca and Struhl, 2002) and causes wing duplications (Baonza et al., 2000). We found that clones lacking Egfr signalling have a normal size in the PE, but show reduced expression of *iro-C* in cubic cells (Fig. 2D).

The above results show that the activities of the Wg and Egfr signalling pathways are required for the normal development of cubic cells, but not for the proliferation, survival and genetic specification of the PE. Finally, we do not observe modifications in cell morphology when E-Cadh^{intra5} and DN-Raf^{3.1} are co-expressed in cubic cells (not shown). This indicates that the development of the PE has specific genetic requirements that preclude an expansion of the peripodial field to adjacent wing and notum territories in the absence of Wg and Egfr activities.

Ectopic Wg signalling transforms the cell morphology and fate of the PE into those of the wing hinge

To further evaluate the role of Wg signalling in the development of the peripodial side of the wing disc, we generated *wg* expressing clones at 24-48 and 48-72 hours AEL. In these clones, the shape of PE cells changes from squamous into the columnar morphology characteristic of cells in the wing-notum side of the disc (Fig. 3A,B,E). The transformation is not only cell autonomous but affects cells non-autonomously within a range

of 7-15 cellular diameters away from the clone (Fig. 3B). The severity of the morphological change decreases with distance to the clone, which suggests a dependence on Wg concentration (Fig. 3B). By contrast, autonomous activation of Wg signalling in ArmΔα overexpressing clones only results in autonomous transformations of the cellular morphology and genetic identity of PE cells (Fig. 3D). The increase in cell density induced by both Wg and ArmΔα in the PE may be due not only to the change in cell shape, but also to a higher rate of proliferation, evident when the size of these clones is compared with controls.

In addition to cell morphology changes, ectopic Wg in the PE induces autonomous and non-autonomous expression of characteristic wing hinge genetic markers such as *ds* (Fig. 3E) and *zfh-2* (Fig. 3F), and represses *Ubx* in the PE (Fig. 3C). Wg-expressing clones never induce the expression of wing blade or notum markers such as *vestigial* (*vg*), *distalless* (*dll*), *iro-C* and *eyegone* (*eyg*) (not shown). These data show that ectopic Wg signalling transforms the PE cells into cells of the wing hinge. Interestingly, ectopic expression of Wg induces autonomous expression of *nubbin* (*nub*), a transcription factor expressed in the proximal hinge and wing blade. However, in contrast to the strictly nuclear wild-type localization of Nub, these clones show high levels of Nub in the cytoplasm of the transformed cells (Fig. 3G). This result points to an incomplete transformation of the PE into wing hinge, which suggests that the PE is refractory to this transformation. The ability of ectopic Wg to transform the PE into wing hinge is independent of the developmental time when the clones are generated, suggesting that repression of Wg activity may be essential for the correct development of the PE. Clones expressing Wg also induce *zfh-2* expression in proximal cubic cells (Fig. 3F) and repress the expression of *iro-C* (not shown), which again suggests that the mechanism that drives PD segregation in the wing-notum side is also active in cubic cells.

Considering a possible transmission of Wg signalling

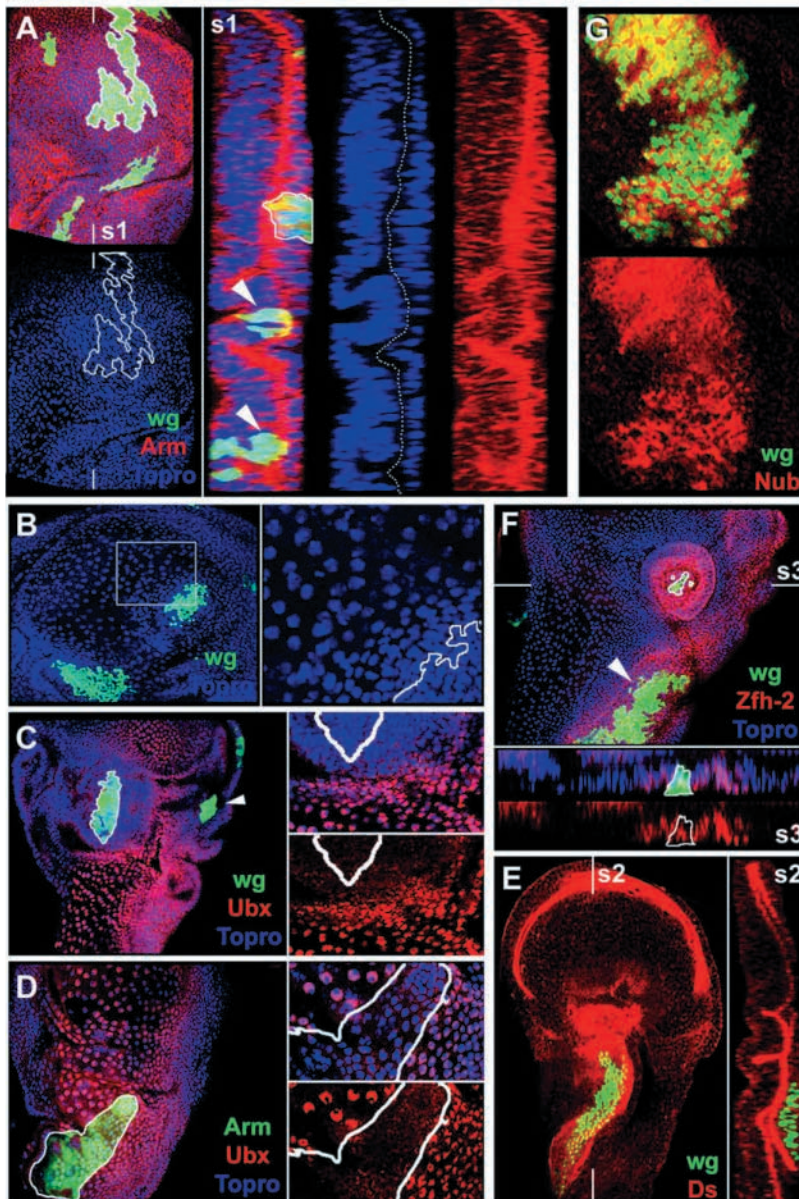


Fig. 3. Ectopic Wg signalling transforms the identity and cell morphology of the PE into wing hinge. (A) *wg*-expressing clones (green, 48-72 hours AEL) transform both cell autonomously and non-autonomously squamous peripodial cells into columnar cells, as seen both in a surface view and a longitudinal section of the outlined clone. Arm (red) and TO-PRO-3 (blue) staining reveal cell shape and tissue structure (apical membranes of both sides of the disc separated by a dotted line in the section s1). The arrowheads in the section indicate clones in the wing-notum side that do not transform the shape of apposed squamous cells. (B) The transformations extend 7-15 cell diameters away from the clone (green, 48-72 hours AEL). The severity of the transformation decreases the further the affected cell is from the clone (see inset). (C) These clones (48-72 hours AEL) eliminate *Ubx* expression (red) in peripodial transformed cells (outlined clone and inset) and cubic cells (arrowhead). (D) By contrast, in *ArmΔα* overexpression clones (24-48 hours AEL) both the transformation in shape and the elimination of *Ubx* expression are only cell autonomous (inset). *wg* expressing clones (green) induce expression of hinge markers in the peripodial side of the wing disc, such as *ds* (E), *zfh-2* (F) and *nub* (G). (E) In these clones *ds* (red) is induced in cells both inside and outside the clone (see longitudinal section s2). Clone generated 24-48 hours AEL. (F) Clones in squamous (outlined clone) and proximal cubic cells (arrowhead) induce cell autonomous (see transversal section s3) and non-autonomous expression of *zfh-2* (red). Clone generated 24-48 hours AEL. (G) Ectopic Wg (48-72 hours AEL), however, induces only autonomous expression of *nub* (red), which is expressed in the wild-type wing blade and proximal hinge. Notice that the expression of Nub induced is mostly cytoplasmic.

through the lumen of imaginal discs (Cho et al., 2000; Gibson et al., 2002; Gibson and Schubiger, 2000; Gibson and Schubiger, 2001), we evaluated whether ectopic expression of Wg in one side of the wing disc affects the opposite side. Ectopic Wg in cells of the wing-notum side does not change the specification (*Ubx* expression) or morphology of squamous cells (not shown). Changes in the reverse direction do not take place either (not shown). This shows that Wg signalling is not transmitted through the lumen of the wing imaginal disc. Finally, the ectopic expression of Wg transforms peripodial cell morphology in the wing, haltere and leg imaginal discs, but does not change the squamosity in the PE of the eye-antenna imaginal disc (not shown).

Ectopic Wg and Vg transform the cell morphology and fate of the PE into those of the wing blade

Cells expressing Wg and Vg in the wing-notum side of the disc acquire the identity of wing blade cells (Baena-Lopez and

Garcia-Bellido, 2003; Klein and Martínez-Arias, 1999). We asked whether PE cells, besides the ability to be transformed into hinge, can acquire the more distal fate of the wing blade. Ectopic expression clones of Vg in the PE do not modify the identity or the morphology of squamous cells (not shown), which reinforces the idea that PE cells lack Wg activity. Peripodial cells co-expressing Wg and Vg, by contrast, acquire the identity of the wing blade, as suggested by the cell-autonomous induction of the wing genetic marker *dll* (Fig. 4C). Wg-Vg co-expression changes the shape of squamous cells into columnar (Fig. 4A,B). The effect of Wg-Vg clones on cell morphology is not only autonomous, expanding more cell diameters away than in clones expressing Wg only. This region of non-autonomous transformation around the clones expresses exclusively wing-hinge genetic markers, such as *zfh-2* (Fig. 4B) or *nub* (Fig. 4A,C). In contrast to clones overexpressing Wg, the autonomous and non-autonomous expression of *nub* induced by Wg-Vg clones is always nuclear (Fig. 4A,C), an indication that Vg might contribute to the translocation or maintenance of Nub into the nucleus.

The induction of genetic markers induced by Wg-Vg co-expression depends on the developmental time when the clones are generated, contrary to what happens in clones

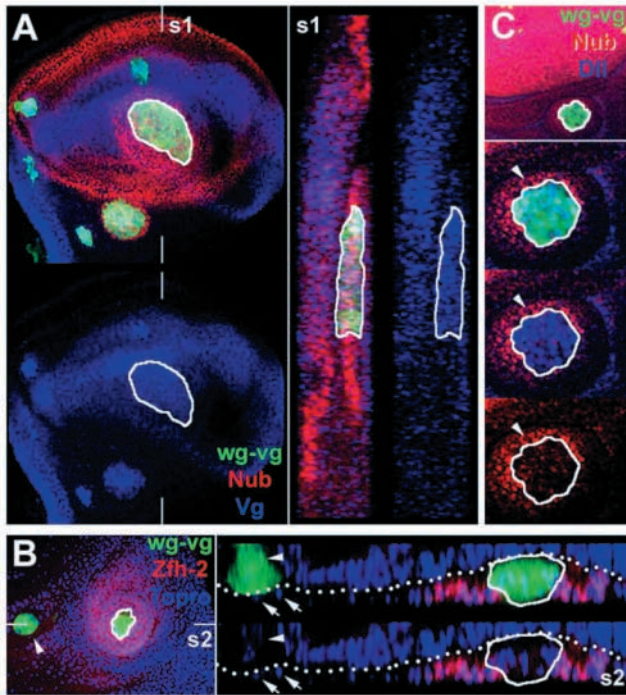


Fig. 4. Ectopic co-expression of *wg* and *vg* transforms the PE into wing blade. (A) *wg-vg* expressing clones (green, 24–48 hours AEL) transform squamous cells into columnar wing blade cells (see longitudinal section s1 through the outlined clone). *Vg* (blue) is present only in cells of the clone, while *nub* (red) is expressed both cell autonomously and non-autonomously. (B) *wg-vg* expressing clones generated 24–48 hours AEL induce the expression of the hinge marker *zfh-2* in an exclusively non-autonomous way (see transverse section s2). The arrowheads indicate a clone in the wing-notum side that neither induces *zfh-2* expression in apposed peripodial cells nor affects their morphology. Note that the clone in the peripodial side does not induce *zfh-2* expression in the wing-notum side either. Arrows indicate untransformed peripodial nuclei. (C) Clones generated 48–72 hours AEL promote autonomous expression of the wing pouch genetic marker *dll*. In contrast to earlier clones, the induced expression of *nub* is exclusively non-autonomous (insets at higher magnification).

overexpressing *Wg*, and also *Ras^{V12}* (see below). Clones generated in early larval development (24–48 hours AEL) express *nub* autonomously and non-autonomously (Fig. 4A), while it is expressed only non-autonomously in clones generated later (48–72 hours AEL) (Fig. 4C). *zfh-2* induction, in turn, is exclusively non-autonomous in early clones (Fig. 4B), while in clones generated late in larval development it is both autonomous and non-autonomous (not shown). These results suggest that early *Wg-Vg* clones are more able to reproduce the developmental program of the wing field than clones induced later, an indication that the PE might acquire a progressive genetic specification during larval development, preventing a more complete transformation in later clones.

Ectopic Egfr signalling transforms the cell morphology and fate of the PE into those of the notum

The role of Egfr signalling in the development of the peripodial side of the wing imaginal disc was studied by generating clones

expressing *Vn*, a diffusible Egfr ligand (Simcox et al., 1996), at 24–48 hours AEL. Eight out of 25 peripodial clones expressing *Vn* showed peripodial cells transformed from squamous into columnar (Fig. 5A), although not all the cells of the clones were affected to the same extent. The transformation also affected non-autonomously some cells outside these eight clones, though, as described for the autonomous transformation, its penetrance is not complete (Fig. 5A). Accordingly, *Ubx* expression is repressed in some peripodial cells (Fig. 5A). It should be noticed that *Vn* overexpression is also unable to induce completely penetrant wing-to-notum transformations when expressed in the prospective wing field (Wang et al., 2000). A fully penetrant transformation, however, is achieved when a constitutively active form of the Ras protein (*Ras^{V12}*) (Karim and Rubin, 1998) is expressed in peripodial cells (Fig. 5B–D). Clones expressing *Ras^{V12}* change the squamous morphology of PE cells both autonomously and non-autonomously (Fig. 5B,C), which suggests that Egfr activation induces *Vn* expression, a positive loop also observed in the expression of *Vn* in the notum (Wang et al., 2000). The increase in cell density observed in *Ras^{V12}* clones may be associated to an excess in cell proliferation.

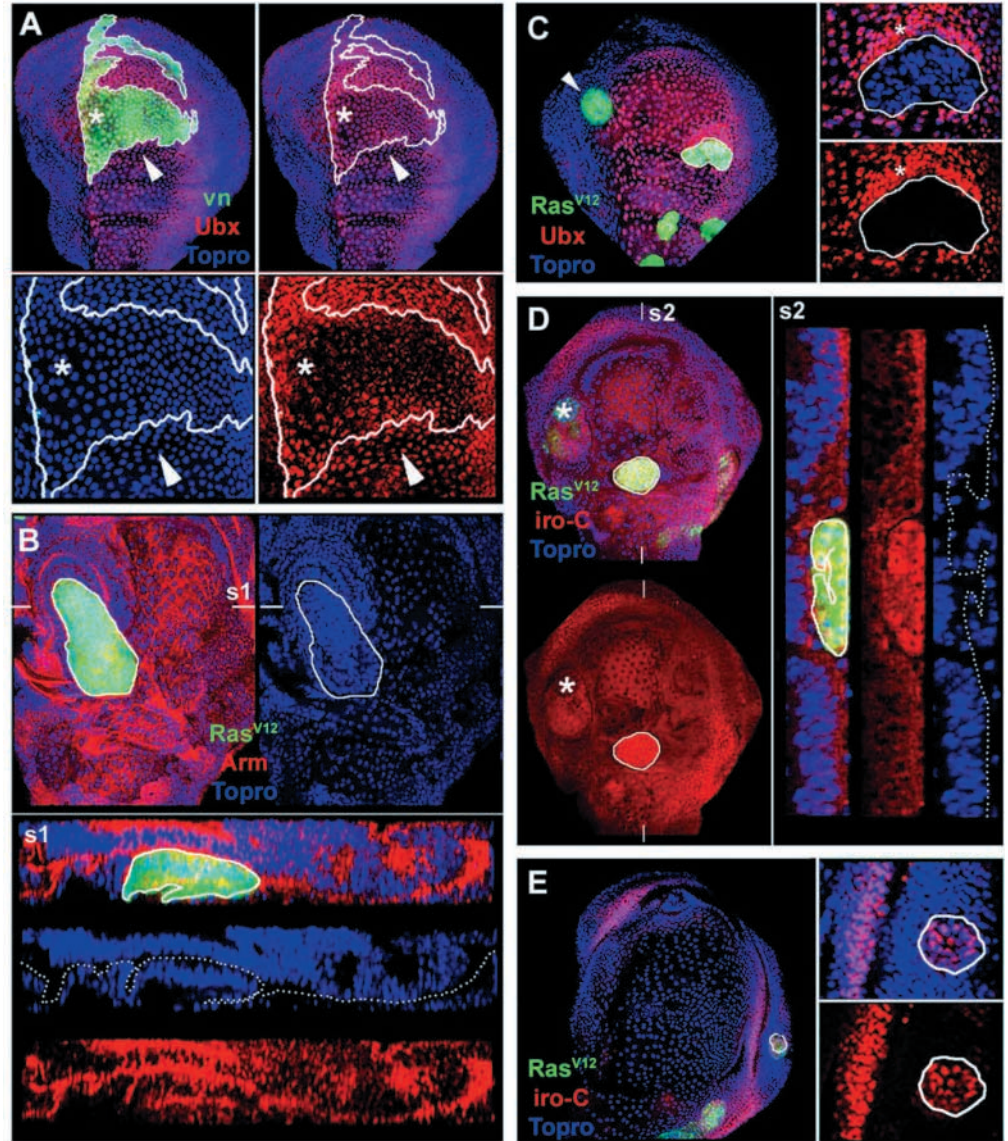
The morphological transformation detected in *Ras^{V12}* clones is only associated with autonomous changes in gene expression. The expression of *Ubx* is only reduced in cells of the clone (Fig. 5C) and that of *iro-C* only autonomously induced (Fig. 5D). The expression of *wg* and wing blade (*vg*, *dll*), wing hinge (*ds*, *zfh-2*) or late notum [*tailup* (*tup*), *eyg*] genetic markers is not induced in these clones (not shown). These results, taken together, suggest that expression of *Ras^{V12}* transforms the PE cells into cells of the notum field. Similar to clones expressing *Wg*, the transformations induced by the expression of *Ras^{V12}* are independent of the developmental time when the clones are generated, suggesting that Egfr signalling in PE cells must be repressed throughout larval development in order to achieve correct specification. *Ras^{V12}* clones reduce the expression of *zfh-2* in distal cubic cells (not shown) and induce the expression of *iro-C* (Fig. 5E), which supports again that the same mechanism driving wing-notum segregation is active in cubic cells. Similar to *Wg*-overexpressing clones, *Vn* expression or autonomous Egfr signalling in the wing-notum side of the disc does not affect the specification or shape of squamous cells (Fig. 5C,D). Translational effects of Egfr signalling when clones were induced in the PE were not observed either (Fig. 5B,D). Expression of *Ras^{V12}* transforms peripodial cell morphology in wing, leg and haltere discs, but not in the eye-antennal disc (not shown), confirmation that the genetic requirements for the development of the PE are not shared by all imaginal discs.

Discussion

Territorial specification and pattern formation in imaginal discs have been the subject of extensive research, but the development of the peripodial side of the discs has been often neglected in these studies. In the present work, we have studied the genetic specification of the PE in the wing imaginal disc, addressing the mechanisms that pattern the peripodial side of the disc and control the morphology of its cells.

The first differences at the morphological level between cells

Fig. 5. Ectopic Egfr signalling transforms the identity and cell morphology of the PE into notum. (A) *vn*-expressing clones (green) transform the cell morphology of peripodial cells in an incompletely penetrant way (asterisk in a region of the clone not transformed). The transformation affects cells outside the clone (arrowhead). *Ubx* expression is repressed in some regions of the clone. (B) Expression of the constitutive Egfr activator Ras^{V12} (clones in green) transforms both cell autonomously and non-autonomously squamous peripodial cells into columnar cells, as seen both in a surface view and a longitudinal section (s1). Arm (red) and TO-PRO-3 (blue) staining reveal cell shape and tissue structure (apical membranes of both sides of the disc separated by a broken line). (C) Ras^{V12} -expressing clones eliminate *Ubx* expression (red) in transformed cells inside, but not outside the clone (inset at higher magnification of the outlined clone). An asterisk marks the region of non-autonomous transformation, not fully penetrant around the clone. The arrowhead indicates a clone in the wing-notum side that does not affect apposed squamous cells. (D) *iro-C* is induced autonomously by Ras^{V12} expression in peripodial cells (longitudinal section s2 of the outlined clone). Asterisk indicates a clone in the wing-notum side of the disc that does not affect apposed squamous cells. (E) Ras^{V12} induces expression of *iro-C* in distal cubic cells (inset at higher magnification of the outlined clone). The clones in all panels were generated 48-72 hours AEL.



of the peripodial and wing-notum side of the wing disc arise during the second larval instar, though a previous genetic heterogeneity may already exist (discussed below). The phenotype of clones lacking Wg and Egfr signalling, as well as the expression patterns of downstream genes (*zfh-2* and *iro-C*) in wild-type discs, indicate that the activity of both signalling cascades is required in the peripodial side of the disc only for normal development of cubic cells surrounding the PE, but not in the PE itself. Ectopic activation in the PE of the Wg or Egfr pathways causes squamous cells to adopt the columnar morphology characteristic of the cells of the wing-notum side (Fig. 6A-C). This transformation does not involve changes in the apicobasal polarity of the cell, as seen by normal localization of Arm (Fig. 3A, Fig. 5B), F-actin and Discs large 1 (Dlg1) (not shown). The transformation induced by ectopic Wg signalling affects exclusively the cells of the clone when this pathway is activated by the expression of the autonomous activator $Arm\Delta\alpha$. However, the transformations are both cell

autonomous and non-autonomous when ectopic activity is induced by the overexpression of the diffusible ligands Wg and Vn, though this latter in a non-fully penetrant way. The transformations induced by Ras^{V12} were also both autonomous and non-autonomous, which may be explained by the fact that these clones could also induce the expression of Vn. The above observations suggest an involvement of both signalling pathways in the control of cell morphology in the imaginal disc.

In addition to the change in cell morphology of the PE cells, their genetic identity is also modified by these clones, as deduced from the loss of the PE marker *Ubx* in the transformed territories. The fate of the territories transformed by either expression of Wg or Egfr activity corresponds to wing hinge and notum, respectively, as suggested by the genetic markers expressed in these clones (Fig. 6A-C). Ectopic Wg signalling induces the expression of *zfh-2*, *ds* and *nub*. The expression of *nub* induced in these cells is localized mostly in the cytoplasm,

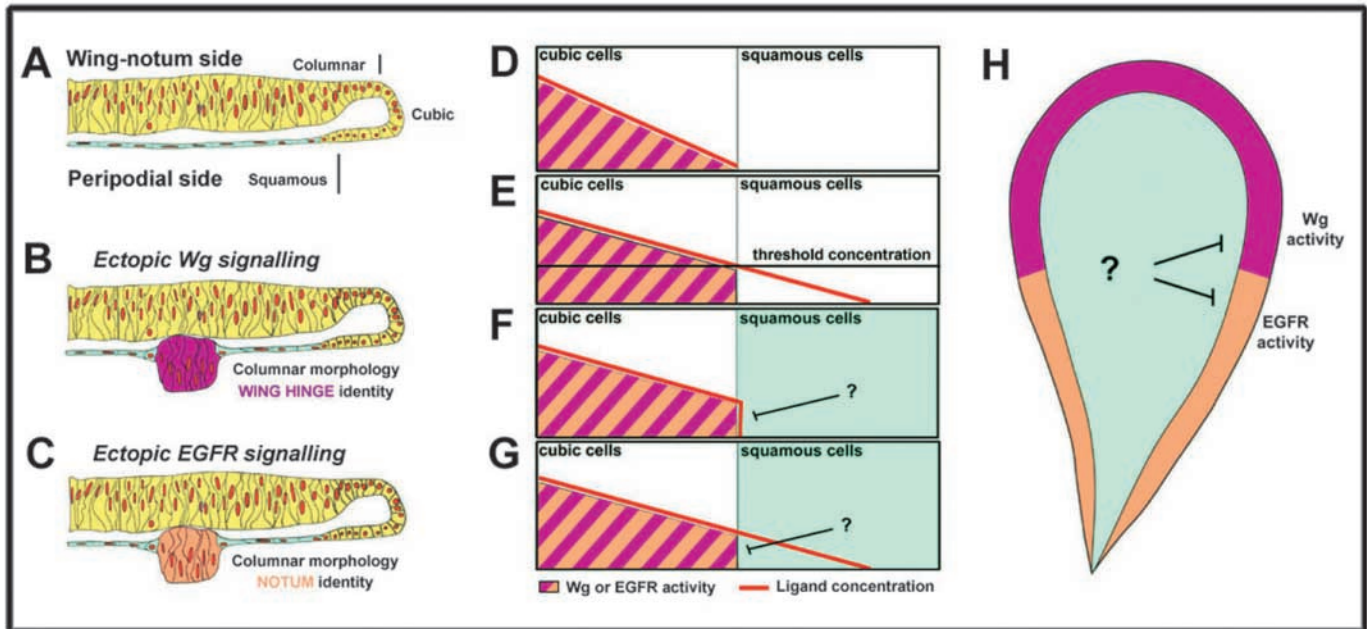


Fig. 6. (A-C) Schematic models of the effects of Wg and Egfr activities in the PE. (A) The squamous morphology and genetic specification of peripodial cells (A) is transformed by ectopic Wg (B) or Egfr (C) signalling. (D-G) Different mechanisms that could account for the absence of Wg and Egfr signalling in the PE (see Discussion). The decay in the concentration of the ligands from their sources in the wing-notum side could lower this concentration down to zero (D) or below a hypothetical activation threshold (E). Alternatively, peripodial cells could be refractory to Wg and Egfr activities because of repression of the signals downstream of the receptor level (F) or decreased diffusive ability of the ligands in peripodial cells (G). These two latter possibilities imply a previous genetic heterogeneity that sets the limits of the peripodial developmental field from early larval stages and implements suppression of Wg and Egfr signalling (H).

contrary to normal expression in hinge territories, which may indicate that the transformation is not complete. This suggests that the PE could be in some way reluctant to suffer this transformation or, alternatively, that additional factors are required for the specification of the wing hinge. Ectopic Egfr signalling changes the fate of peripodial cells towards a notum fate, as inferred from the induction of *iro-C*, but not of wing hinge (*zfh-2* and *nub*) or wing blade (*vg* and *dll*) genetic markers. The lack of induction of other more restricted notum genetic markers, such as *eyg* and *tup*, restricts the putative new fate of these cells to that of the subset of *iro-C*-expressing territories in the notum developmental field. Alternatively, the transformation could be incomplete. Unfortunately, it was not possible to obtain adult clones in order to accomplish a deeper study of the transformed fates.

The ability of Wg and Egfr ectopic signalling to change the fate of peripodial cells is independent of the developmental time when the clones are generated. However the PE must be subject to a progressive genetic specification as larval development proceeds. This is evidenced by the fact that Wg-Vg expression clones generated early are able to reproduce the developmental program of the wing field to a greater extent than the clones induced later, which implies that the PE is less competent to adopt this fate later in development.

Taking together the above results, we conclude that the PE constitutes a developmental field in early wing imaginal discs, different from the wing and notum fields. This peripodial field does not require the activity of the Wg and Egfr signalling pathways. Moreover, ectopic Wg and Egfr signalling are able to expand the wing and notum fields at the

expense of the PE. So, it seems that reduced levels of Wg and Egfr signalling are a prerequisite for the development of the peripodial field. The reduced levels of Wg and Egfr signalling in the PE cannot be explained by absence of the receptors or any other elements required for the transduction of the Wg and Egfr signals, given the ability of the Wg and Vn ligands to induce transformations. Two possible mechanisms could account for the absence of Wg and Egfr activity in the PE. (1) Normal diffusion of the Wg and Vn ligands is unable to activate the pathway in the PE (Fig. 6D). (2) The normal decay of concentration of the ligands from their sources in the wing-notum side could lower this concentration down to zero (Fig. 6D) or below a hypothetical threshold (Fig. 6E). These possibilities, however, are challenged by the fact that Wg and Egfr signalling do not define the limit of the peripodial field, as the PE does not expand when we simultaneously eliminate the activities of the Wg and Egfr pathways in cubic cells. This suggests that a pre-existing genetic heterogeneity sets the limits of the prospective peripodial field. Although our data do not reveal the mechanisms that suppress Wg and Egfr signalling in the PE, they seem to favour a second model in which the PE is refractory to these signals (Fig. 6F-H). This could be due to a barrier to the diffusion of the ligands in the PE (Fig. 6F) or to repression of the signal downstream of the receptor level (Fig. 6G). Both a barrier to diffusion of the ligands and downstream repression could be overcome if the amount of ligand or downstream signalling is experimentally elevated. Suppression of the Wg and Egfr signalling pathways in late embryonic development, in addition, is a necessary step for

the specification of the wing disc primordium and its segregation from the leg disc (Kubota et al., 2000; Kubota et al., 2003). It seems possible, therefore, that the repression of these signalling pathways, inherited from the embryo, is later restricted to the peripodial side of the disc; alternatively, the repression of Wg and Egfr signalling in the PE might arise later as a non-related event. Furthermore, the early repression of these signals in the wing and notum fields could be, from an evolutionary perspective, a suitable mechanism for the generation of a peripodial field in ancestral uninvaginated discs (Svácha, 1992; Truman and Riddiford, 1999).

Some recent reports have focused on a role of the PE of the eye and wing discs in the patterning of the other side of the disc (Cho et al., 2000; Gibson et al., 2002; Gibson and Schubiger, 2000), showing the ability of Dpp and Hh proteins expressed in the PE to affect the development of the other side of the disc. Our results, however, rule out transluminal communication of the Wg and Egfr signals. Transluminal communication of intercellular signals, therefore, is not the simple outcome of the apposition of the two sides of the disc or general secretion of ligands into the disc lumen. On the contrary, transmission of a signal through the disc lumen would require specific mechanisms for every different signalling pathway.

Finally, the comparative analysis among the peripodial epithelia of different imaginal discs shows that the development of each PE has characteristic genetic requirements, at least after their specification, as evidenced by the inability of Wg and Ras^{V12} clones to transform the morphology of peripodial cells in the eye-antenna disc. The possibility of a common mechanism for the generation of the peripodial field in all imaginal discs, however, still remains.

We are grateful to A. García-Bellido for his support and guidance throughout this work. We thank I. Guerrero, E. Sanchez-Herrero, E. Martín-Blanco, J. F. de Celis, R. Barrio, A. Baonza, F. Roch, A. Glavic and members of the laboratory for reading and discussing this work. We also thank J. Modolell, S. Carroll, S. Cohen, E. Sánchez-Herrero, M. Lundell, M. Simon, J. Skeath, N. Azpiazu and the Developmental Studies Hybridoma Bank for providing antibodies. R. Hernández contributed with her skilful technical assistance. This work was supported by grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica and an institutional grant from the F. Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. L.A.B.-L. is a fellow of Consejo Superior de Investigaciones Científicas in collaboration with PACISA-GIRALT (I3P-BPD2002-1), J.C.P.-P. and J.R. are fellows of Comunidad Autónoma de Madrid.

References

- Agnes, F., Suzanne, M. and Noselli, S. (1999). The Drosophila JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development* **126**, 5453-5462.
- Auerbach, C. (1936). The development of the legs, wings and halteres in wild type and some mutants strains of *Drosophila melanogaster*. *Trans. R. Soc. Edinb. LVIII-Part III*-(No. 27).
- Baena-Lopez, L. A. and Garcia-Bellido, A. (2003). Genetic requirements of vestigial in the regulation of *Drosophila* wing development. *Development* **130**, 197-208.
- Baonza, A., Roch, F. and Martin-Blanco, E. (2000). DER signaling restricts the boundaries of the wing field during *Drosophila* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7331-7335.
- Brower, D. L. (1987). Ultrabithorax gene expression in *Drosophila* imaginal discs and larval nervous system. *Development* **101**, 83-92.
- Bryant, P. J. (1978). Pattern formation in imaginal discs. In *Biology of Drosophila*, Vol. 2C (ed. M. Ashburner and T.R.F. Wrigth) pp. 229-235. New York: Academic Press.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **11**, 252-255.
- Capdevila, J. and Guerrero, I. (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J.* **13**, 4459-4468.
- Cho, K. O., Chern, J., Izaddoost, S. and Choi, K. W. (2000). Novel signaling from the peripodial membrane is essential for eye disc patterning in *Drosophila*. *Cell* **103**, 331-342.
- Chou, T. B. and Perrimon, N. (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* **131**, 643-653.
- Clark, H. F., Brentrup, D., Schneitz, K., Bieber, A., Goodman, C. and Noll, M. (1995). Dachsous encodes a member of the cadherin superfamily that controls imaginal disc morphogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev.* **9**, 1530-1542.
- Cohen, S. M. (1993). Imaginal disc development. In *The Development of Drosophila melanogaster*, Vol. II (ed. A. Martínez Arias and M. Bate), pp. 747-841. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Diez del Corral, R., Aroca, P., Gómez-Skarmeta, J. L., Cavodeassi, F. and Modolell, J. (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev.* **13**, 1754-1761.
- Fristrom, D. and Fristrom, J. (1993). The metamorphic development of the adult epidermis. In *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. A. Martínez Arias and M. Bate), pp. 843-897. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gibson, M. C. and Schubiger, G. (2000). Peripodial cells regulate proliferation and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **103**, 343-350.
- Gibson, M. C. and Schubiger, G. (2001). *Drosophila* peripodial cells, more than meets the eye? *BioEssays* **23**, 691-697.
- Gibson, M. C., Lehman, D. A. and Schubiger, G. (2002). Luminal transmission of decapentaplegic in *Drosophila* imaginal discs. *Dev. Cell* **3**, 451-460.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. and Yamamoto, D. (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761-771.
- Karim, F. D. and Rubin, G. M. (1998). Ectopic expression of activated Ras1 induces hyperplastic growth and increased cell death in *Drosophila* imaginal tissues. *Development* **125**, 1-9.
- Klein, T. (2001). Wing disc development in the fly: the early stages. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 470-475.
- Klein, T. and Arias, A. M. (1998). Different spatial and temporal interactions between Notch, wingless, and vestigial specify proximal and distal pattern elements of the wing in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **194**, 196-212.
- Klein, T. and Martínez-Arias, A. (1999). The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in *Drosophila*. *Development* **126**, 913-925.
- Kubota, K., Goto, S., Eto, K. and Hayashi, S. (2000). EGF receptor attenuates Dpp signaling and helps to distinguish the wing and leg cell fates in *Drosophila*. *Development* **127**, 3769-3776.
- Kubota, K., Goto, S. and Hayashi, S. (2003). The role of Wg signaling in the patterning of embryonic leg primordium in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **257**, 117-126.
- Lee, T. and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-461.
- Littlefield, C. L. and Bryant, P. J. (1979). Prospective fates and regulative capacities of fragments of the female genital disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **70**, 127-148.
- Martin-Blanco, E., Roch, F., Noll, E., Baonza, A., Duffy, J. B. and Perrimon, N. (1999). A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **126**, 5739-5747.
- Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. and Garcia-Bellido, A. (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7888-7893.
- Milner, M. J., Bleasby, A. J. and Kelly, S. L. (1984). The role of the peripodial membrane of leg and wing imaginal discs of *Drosophila melanogaster* during evagination and differentiation in vitro. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**, 180-186.
- Ng, M., Diaz-Benjumea, F. J., Vincent, J. P., Wu, J. and Cohen, S. M.

- (1996). Specification of the wing by localized expression of wingless protein. *Nature* **381**, 316-318.
- Paumard-Rigal, S., Zider, A., Vaudin, P. and Silber, J.** (1998). Specific interactions between vestigial and scalloped are required to promote wing tissue proliferation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genes Evol.* **208**, 440-446.
- Resino, J., Salama-Cohen, P. and Garcia-Bellido, A.** (2002). Determining the role of patterned cell proliferation in the shape and size of the *Drosophila* wing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7502-7507.
- Sanson, B., White, P. and Vincent, J. P.** (1996). Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* **383**, 627-630.
- Schnepp, B., Donaldson, T., Grumbling, G., Ostrowski, S., Schweitzer, R., Shilo, B. Z. and Simcox, A.** (1998). EGF domain swap converts a *Drosophila* EGF receptor activator into an inhibitor. *Genes Dev.* **12**, 908-913.
- Sharma, R. P. and Chopra, V. L.** (1976). Effect of the Wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **48**, 461-465.
- Simcox, A., Grumbling, G., Schnepp, B., Bennington-Mathias, C., Hersperger, E. and Shearn, A.** (1996). Molecular, phenotypic, and expression analysis of *vein*, a gene required for growth of the *Drosophila* wing disc. *Dev. Biol.* **177**, 475-489.
- Sprey, E. and Oldenhave, M.** (1974). A detailed organ map of the wing disk of *Calliphora erythrocephala*. *Netherlands J. Zool.* **24**, 291-310.
- Struhl, G. and Greenwald, I.** (2001). Presenilin-mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 229-234.
- Svácha, P.** (1992). What are and What are not imaginal discs: reevaluation of some basic concepts (Insecta, Holometabola). *Dev. Biol.* **154**, 101-117.
- Truman, J. W. and Riddiford, L.** (1999). The origins of insect metamorphosis. *Nature* **401**, 447-452.
- Usui, K. and Simpson, P.** (2000). Cellular basis of the dynamic behavior of the imaginal thoracic discs during *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.* **225**, 13-25.
- Waddington, C. H.** (1940). The genetic control of wing development in *Drosophila*. *J. Genet.* **41**, 75-139.
- Wang, S. H., Simcox, A. and Campbell, G.** (2000). Dual role for *Drosophila* epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev.* **14**, 2271-2276.
- White, P., Aberle, H. and Vincent, J. P.** (1998). Signaling and adhesion activities of mammalian beta-catenin and plakoglobin in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **140**, 183-195.
- Whitworth, A. J. and Russell, S.** (2003). Temporally dynamic response to Wingless directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* **254**, 277-288.
- Williams, J. A., Paddock, S. W. and Carroll, S. B.** (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* **117**, 571-584.
- Zecca, M. and Struhl, G.** (2002). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1357-1368.
- Zeitlinger, J. and Bohmann, D.** (1999). Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development* **126**, 3947-3956.

REGULAR ARTICLE

Constitutive expression of heat shock protein p23 correlates with proneural territories in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*

Jana Alonso^{1,*}, Javier M. Rodríguez^{1,*}, Luis Alberto Baena-López^{1,*},
María Teresa Alonso² and Juan F. Santarén¹

¹ Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

² SIDI, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

2-DE followed by MALDI-TOF was used to purify and identify a *Drosophila* protein (catalogued as SSP 6002) that showed marked differences in the level of expression in the different imaginal discs of third instar larvae. Fingerprinting showed that the spot of interest was the heat shock 23 polypeptide (hsp23). We characterized the kinetics of its induction by heat shock in wing imaginal discs and raised an antiserum against the denatured protein, which recognizes a single unphosphorylated spot on 2-D gels. The difference in its expression in discs was corroborated by analyzing its level in the imaginal discs of *postbithorax* mutants. We also investigated the developmental expression of hsp23 in imaginal discs with antiserum raised against the native protein. Its spatial and temporal pattern of expression is related to the proneural territories and maintained even under heat shock conditions. In addition, its pattern of expression is regulated by transcription factors and signaling pathways (notch and epidermal growth factor receptor) involved in proneural specification.

Received: October 19, 2004
Revised: December 15, 2004
Accepted: December 27, 2004

Keywords:

Drosophila / Heat shock / hsp23 / Imaginal discs / Proneural differentiation

1 Introduction

We use high-resolution 2-DE to analyze aspects of the development, morphogenesis, and genetic variation of the wing imaginal discs of mature larvae of *Drosophila melanogaster* as a model system. For this purpose, we constructed a protein database that was used in a previous study to compare the

standard wing pattern with those of haltere, leg 1, leg 2, leg 3, and eye-antenna imaginal discs of the same developmental stage. We thus defined a set of 17 polypeptides whose levels of expression varied between the different imaginal discs [1]. In the present study, we tried to purify and identify one of those proteins, specifically an acidic protein that was named IEF 41 in the original report and later catalogued as SSP 6002 when computerized quantitative analysis was introduced [2]. By preparative 2-DE and MALDI-TOF, we identified the protein as hsp23, one of the four small heat shock proteins of *Drosophila* (hsp22, hsp23, hsp26, and hsp27), whose genes cluster within 12 kb of DNA at cytological locus 67B. This locus encodes three other genes that were first identified by their expression at specific stages of development [3] and whose transcripts are also activated after heat shock. The beginning of the pupal period is the only stage of *D. melanogaster* development during which these

Correspondence: Dr. Juan F. Santarén, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

E-mail: jfsantaren@cbm.uam.es

Fax: +34-91-4974799

Abbreviations: **shsps**, small heat shock proteins; **hsp23**, heat shock 23 polypeptide; **apG4**, apterous-G4; **dppG4**, decapentaplegic-G4 A.3; **UAS-sc**, UAS-scute; **UAS-N_i**, UAS-Notch_{intra}; **wg**, wingless; **AC-C**, achaete-scute complex; **sc**, scute; **bs**, blistered; **EGFR**, notch (N) and epidermal growth factor receptor; **SMCs**, sensory organ mother cells

* These authors contributed equally.

seven heat shock genes are expressed [4]. Nevertheless, the levels of their transcripts differ widely, ranging from high levels of the hsp23 message, which is as abundant as the mRNA for cytoplasmic actin, to the roughly 100-fold lower levels of the hsp22 transcript [5]. Although the small heat shock proteins (shsps) represent the least conserved subfamily of heat shock proteins, comparison of their predicted amino acid sequences has revealed a highly conserved region of 108 amino acid residues representing 51 to 62% of their lengths [6].

Studies in different experimental systems have revealed a variety of functions for shsps under stress conditions. These include basic chaperone activity [7], cytoskeleton protection [8], and modulation of the apoptotic process [9], all of which are aspects of cellular defense against environmental stresses. The physiological role of these proteins remains largely a matter of conjecture, although it is known that during a heat shock they are found mainly in the nucleus. During the recovery period at 25°C following a heat shock, they tend to redistribute between the nucleus and the cytoplasm, where they appear to aggregate into high molecular weight 20–30S cytoplasmic complexes associated with RNA [10].

In contrast to the classical definition of heat shock proteins induced by stress, cell-specific expression of shsps in the absence of stress has been reported during the development of a wide variety of organisms including *Caenorhabditis elegans* [11], *Drosophila melanogaster* [12], *Xenopus laevis* [13], *Mus musculus* [14], and man [15]. Their characteristic cell-specific pattern of expression has led to the idea that they may be involved in aspects of differentiation. For example, during normal *Drosophila* development, the shsps are under differential control and only a subset are present at certain stages. Thus, expression of hsp26 and hsp27 follows a tissue-specific pattern [16]. Equally, during oogenesis, hsp27 has a stage-specific localization within nurse and follicle cells [17], while hsp23, hsp26, and hsp27 are expressed in different cell types during spermatogenesis [18]. During embryogenesis, hsp27 is associated with cells of the brain and of the ventral nerve cord, while hsp26 is found exclusively in the gonads [19].

Hsp23 has also been described as displaying a cell-specific pattern of expression during embryonic neurogenesis [20], and has recently been shown to be strongly down-regulated following targeted expression of the glial master gene, *gcm* [21]. Its expression in the neuronal and glial lineage of the CNS demonstrates that its expression in the neuroectoderm is closely and autonomously linked to the acquisition of MP2 fate, as it does not require the presence of a functional midline [22]. *In vitro* transactivation assays indicate that the Single-minded, Tango, and Drifter transcription factors, which are all involved in midline determination and differentiation, also regulate *hsp23* promoter activity. Loss of hsp23 appears not to be detrimental to CNS formation.

Information concerning the expression and distribution of these shsps could be useful for correlating their sites of action with possible functions. In this work, we report the

characterization, expression, and location of hsp23 in non-heat-shocked *Drosophila* imaginal discs, using a polyclonal antibody raised against the native protein. We show that its expression varies temporally in a manner dependent on the particular imaginal disc, and, more importantly, seems to be independent of temperature. Furthermore, it is cell-specific and correlates with proneural territories in the various imaginal discs, being regulated by proneural transcription factors and signaling pathways notch (N) and epidermal growth factor receptor (EGFR).

2 Materials and methods

2.1 Fly strains and cell culture

We used a laboratory stock of wild-type *D. melanogaster* (strain Vallecas (Spain)). The GAL 4 strains used to drive UAS-transgenes were *apterous-G4* (*apG4*) [23] and *decapentaplegic-G4 A.3* (*dppG4*) [24]. The UAS-transgene strains used were *UAS-scute* (*UAS-sc*) [25], *UAS-Notch_{intra}* (*UAS-N_i*) [26], *UAS-Notch_{ECN2T5}* (insertion on chromosome II) and *UAS-Notch_{ECN1T2}* (the same construct inserted on chromosome III) (*UAS-N_{ECN}*) [27], *UAS-RasV12* (*UAS-RasV12*) [28], and *UAS-Raf dominant negative 3.1* (*UAS-Raf3.1_{DN}*) [29]. All overexpression experiments were carried out at 25°C. The *neuralized* (*neur*)-*lacZ* A101.IF3 strain that reproduces the wild-type expression pattern of *neuralized* [30] was used as a marker of neuronal differentiation. The mutant *pbx¹/Ubx¹⁰⁹* was obtained from our stock collection.

The established cell line used was derived from wing imaginal discs of mature larvae of *D. melanogaster* (strain Oregon R), and designated CME W2. Cells (3×10^5) were plated in multiwell plates (2 cm²) as described elsewhere [31].

2.2 Preparation of samples and 2-DE

Dissection and labeling of imaginal discs were carried out as described previously [32]. Analytical 2-DE was performed according to O'Farrell [33] with some modifications [32]. Second-dimension separations were carried out on 15% polyacrylamide gels (24 × 24 cm) and run overnight at room temperature (18°C). Gels were processed for fluorography [34], dried, and exposed at -70°C for various periods of time. For preparative gels, the cells from 20 confluent 65 cm² plates of CME W2 cells were used to prepare proteins as previously described [31].

2.3 Computer analysis of 2-D patterns

Four fluorograms, each after different exposure times (4, 24, 96 and 240 h), were made from each gel and digitized at 176 × 176 μm resolution with a pdi scanning densitometer

(Bio-Rad). The resulting 2-D images were merged and analyzed with PDQuest software (version 5.0) running on a SPARC station IPC microcomputer (Sun Microsystems).

2.4 In-gel digestion and MALDI-TOF analysis

Coomassie protein spots were excised from the gel, digested with trypsin and processed as described elsewhere [35]. The peptide solutions were analyzed with the Applied Biosystems 4700 proteomics analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) with TOF/TOF ion optics. MS spectra were obtained in reflectron mode using an acceleration voltage of 1 kV. Desorption and ionization of samples were performed with an Nd:YAG operating at 355 nm. The final mass spectra was produced by averaging 3600 laser shots. The autodigestion products of trypsin were used for internal calibration. MS/MS sequencing analysis was performed with the same equipment.

2.5 Protein identification using the *Drosophila* database

Protein was identified by mass fingerprinting. The mono-isotopic PMF data obtained by MALDI-TOF were used to search the Swiss-Prot/TrEMBL non-redundant protein database.

2.6 Antibodies against Hsp23

We made two antibodies, one (α -hsp23_{Den}) against denatured polypeptide, the other (α -hsp23_{Nat}) against native hsp23. In the former case, the cell contents of 14 confluent 500-cm² trays (Nunc) of CME W2 cells were used to prepare the SSP 6002 polypeptide for immunization. The cell monolayers were washed with Hanks' solution, and scraped off with a rubber policeman in 10 mL of the same. After centrifugation, the cells were sonicated, treated with DNase and RNase, and passed several times through a narrow-gauge needle. The sample was then lyophilized and resuspended in 5 mL of lysis buffer, after which [³⁵S]methionine + [³⁵S]cysteine-labeled proteins from wing imaginal discs were added to identify the polypeptides by autoradiography. One hundred 2-D gels were run as described above, immediately dried (without fixation), and exposed for 4 days. The hsp23 protein was located *via* the autoradiographs and cut out of the gels. The gel pieces were rehydrated and the protein recovered by electroelution. Approximately 150 μ g of this protein was injected into a New Zealand white rabbit, and rabbit sera were tested by immunoblotting against hsp23 as described in Section 2.7. To prepare the antibody against the native hsp23, a cDNA containing the complete ORF was cloned into the pRSET vector (Invitrogen, Leek, The Netherlands), and expressed as a His₆-fusion protein in *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS (Novagen, Madison, WI, USA). Approximately 240 μ g of this protein was purified by NiTA chromatography (Clontech, Palo Alto, CA, USA) and injected into two New Zealand white rabbits.

2.7 Immunoblotting

Proteins resolved by 2-D gels were transferred onto nitrocellulose filters at 130 mA for 6 h, and the filters were incubated for 120 min at room temperature in PBS containing 10% bovine serum and α -hsp23_{Den} diluted to 1:100. The filters were then incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) for 120 min in the same buffer and immunocomplexes visualized with diaminobenzidine as substrate.

2.8 Immunostaining of embryos and imaginal discs

Standard procedures were used for whole-mount immunohistochemistry [36]. Imaginal discs were stained as described previously [37]. The α -Hsp23_{Nat} was used at a 1:2000 dilution in all experiments. Mouse anti-Blistered (provided by M. Affolter), mouse anti-Wingless (Hybridoma Bank), and mouse anti- β gal (Amersham) were also used as primary antibodies. Alexa Fluor-488, Fluor-546 (Molecular Probes), and Cy5 (Jackson ImmunoResearch) were used to detect the primary antibodies.

2.9 Microscopy and image treatment

Imaginal discs were mounted on Vectashield (Vector Laboratories). Images were acquired with a Bio-Rad 2000 confocal microscope and treated with Metaview (Universal Imaging) and Photoshop 7.0 (Adobe) software. To avoid focal problems, we captured and merged at least 15 planes of the various imaginal discs.

3 Results

3.1 Expression of polypeptide SSP 6002 varies in different imaginal discs

Figure 1A shows a representative fluorogram of a 2-D gel of the acidic polypeptides from wing imaginal discs of mature larvae (wild type, strain Vallecas). The gels were analyzed on a computer with the PDQuest system and each polypeptide was assigned a number in the database. In this way we compiled a database of 1492 [³⁵S]methionine + [³⁵S]cysteine-labeled polypeptides (1226 acidic, IEF and 266 basic, NEPHGE). In a previous paper [1], we compared the patterns of protein synthesis in six different imaginal discs. We observed some quantitative differences in 17 polypeptides, one of which was catalogued as IEF 41 in our "manual" database [32], and corresponds to SSP 6002 in the catalogue obtained by computer analysis [2]. In the present study, we quantified the level of expression of this polypeptide in various imaginal discs. To do that, wing, haltere, leg 1, leg 2, leg 3, and eye-antenna imaginal discs were labeled with [³⁵S]methionine + [³⁵S]cysteine, resolved on 2-D gels, and quantified with the PDQuest software. Figure 1B shows a

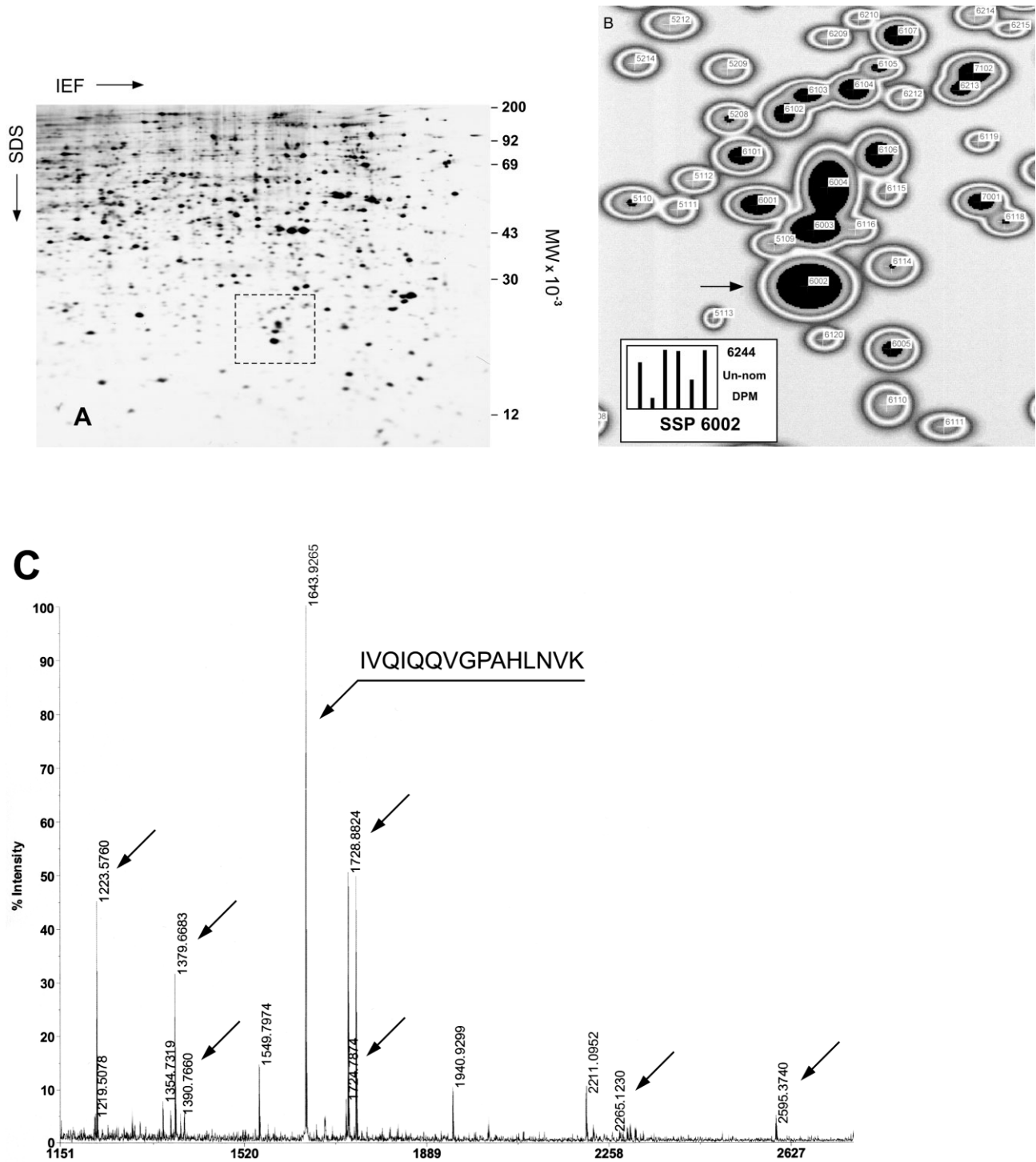


Figure 1. 2-DE (IEF) of total [³⁵S]methionine + [³⁵S]cysteine-labeled polypeptides in wing imaginal discs of late third instar larvae of *Drosophila melanogaster*. (A) The pH ranges from 7.0 (left) to 4.5 (right). The area shown in (B) is boxed. (B) Close-up of the boxed region in (A); polypeptide SSP 6002 is indicated by the arrow. Inset: each bar represents the quantification of the SSP 6002 polypeptide in each gel of the matchset; from left to right the bars represent the wing, haltere, leg 1, leg 2, leg 3, and eye-antenna imaginal discs. The number in the upper right of the histogram is the quantification of the maximum bar in the graph. The other bars are drawn in proportion to the highest bar. (C) MALDI-TOF spectrum of a tryptic digest of SSP 6002. Peaks with arrows represent the peptides matched to *D. melanogaster* hsp23. The MS/MS spectrum of the 1643.92 peptide corresponds to the sequence IVQIQQVGP AHLNVK.

detail of the IEF gel of wing imaginal discs containing this polypeptide and the quantification of its level of expression in the six imaginal discs. Taking the wing imaginal discs as reference, the level of the polypeptide was higher in leg 1, leg 2, and eye-antenna and lower in haltere and leg 3. We therefore focused on the identification and characterization of SSP 6002.

3.2 Identification of SSP 6002 polypeptide as hsp23

In order to identify SSP 6002, we isolated 100 wing imaginal discs and lyophilized and resuspended them in 40 μ L of lysis buffer. To the lysate we added 10^6 cpm of proteins from the wing imaginal discs labeled with [35 S]methionine + [35 S]cysteine and we ran a 2-D gel with this mixture. The gel was stained with Coomassie, dried, and exposed to film for 4 days. The radiolabeled proteins acted as tracers, allowing the identification of polypeptide SSP 6002, which was located on the autoradiograph and later on the stained gel. A new 2-D gel, on this occasion obtained from only 100 wing imaginal discs, was run and stained with Coomassie, and the SSP 6002 spot was excised and processed for MALDI analysis. Figure 1C shows the MALDI-MS spectrum of the tryptic digest obtained. A database search identified SSP 6002 as heat shock protein 23. The ten matching peptides covered 59% of the sequence of the protein. The assignment was corroborated by MALDI-TOF-TOF of ion 1643.93 whose sequence was determined to be IVQIQVGPALHNVK.

3.3 Kinetics of heat shock induction of hsp23

For heat shock experiments, ten wing imaginal discs were incubated at 25°C for 1 h (control, Fig. 2A), or at 37°C for 1 h or more. In all experiments, proteins were labeled with [35 S]methionine + [35 S]cysteine for the last hour of incubation, and analyzed by 2-DE and fluorography. Hsp23 was then identified by computerized gel scanning as described in Section 3.2. Figure 2B illustrates the significant changes visible on typical fluorograms after 2 h of incubation at 37°C. With the heat shock the rate of synthesis of hsp23 increased, reaching a maximal increase of six-fold 2 h after heat stimulation. It then declined, reaching basal level at 5 h (Fig. 2C).

3.4 Hsp23 is a unique and non-phosphorylated polypeptide

In order to further characterize hsp23, we generated a polyclonal antibody against the denatured polypeptide. The specificity of the antibody was demonstrated by Western blotting of 2-D gels. Forty wing imaginal discs were labeled as described, separated on 2-D gels, transferred to a nitrocellulose filter, and exposed to antibody. The anti-hsp23 antibody recognized a single spot at the position of hsp23 (Fig. 3A), showing that hsp23 exists as an unmodified poly-

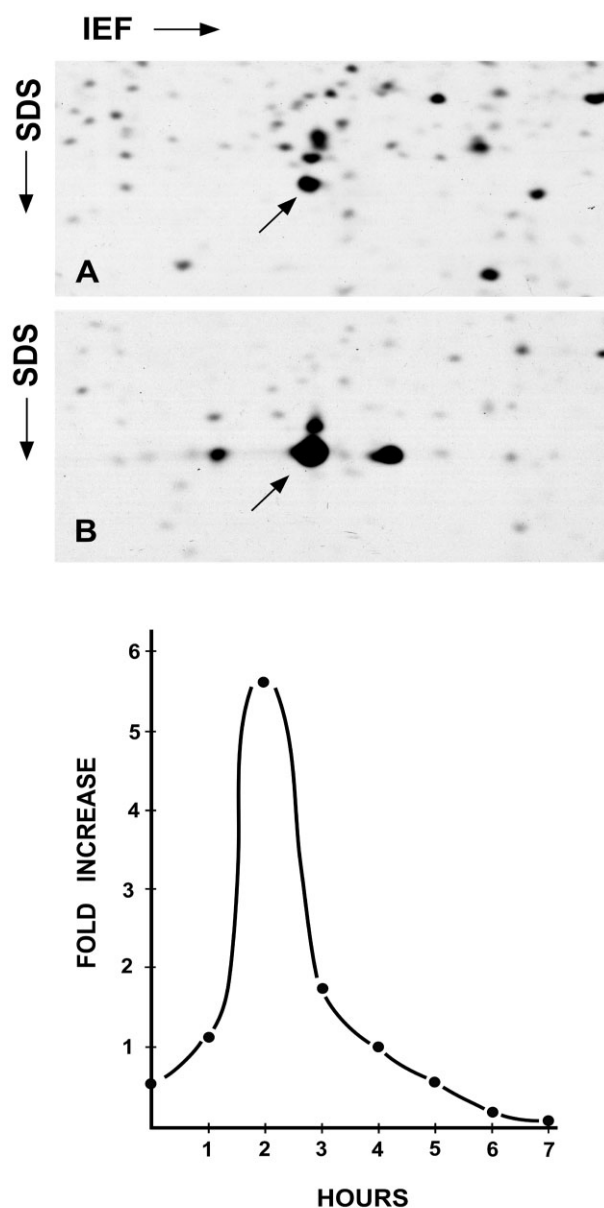


Figure 2. Close-up regions of 2-D gel separations (IEF) showing the effect of heat shock induction of hsp23 in wing imaginal discs of *Drosophila*. (A) Control after 60 min of labeling with [35 S]methionine + [35 S]cysteine at 25°C and (B) induction after 120 min at 37°C. (C) Time course of the induction of hsp23.

peptide. We carried out a similar experiment with [32 P] labeling and did not observe any label in the hsp23 spot, showing that the polypeptide is not phosphorylated.

3.5 Synthesis of hsp23 in pbx¹/Ubx¹⁰⁹ imaginal discs

One of the greatest differences in the level of expression of hsp23 was between wing and haltere imaginal discs (Fig. 1B). In order to confirm this observation we compared the levels of expression of hsp23 in the wing and haltere

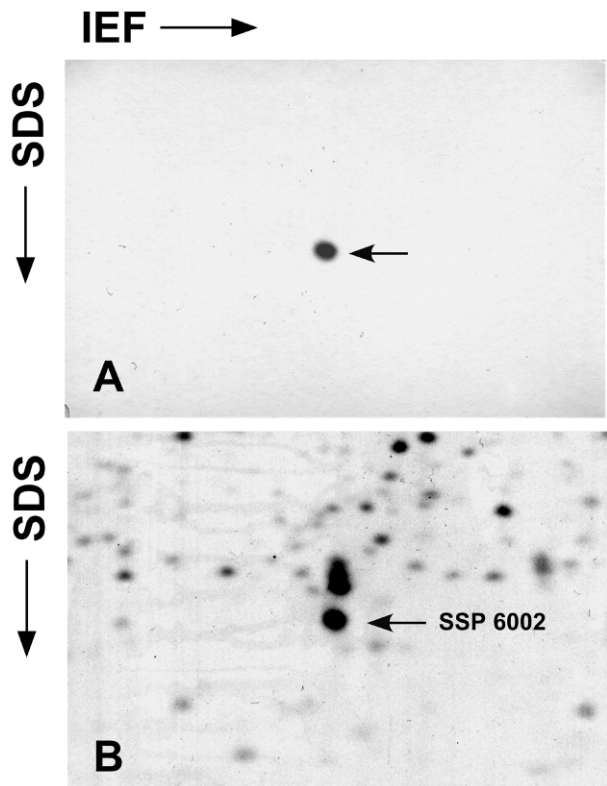


Figure 3. Specificity of the polyclonal antibody against hsp23 polypeptide. Twenty wing imaginal discs of late third instar larvae of *D. melanogaster* were labeled over 60 min, resolved by 2-DE and transferred to nitrocellulose paper. The filter was analyzed with a polyclonal antibody against denatured SSP 6002. (B) Autoradiograph of (A).

imaginal disc of wild-type *Drosophila* flies with those observed in a postbithorax background. Flies homozygous for *pbx¹/Ubx¹⁰⁹* have a homeotic transformation of halteres into wings, showing the classical “four wings” phenotype [38]. Wing and haltere imaginal discs from wild-type and *pbx¹/Ubx¹⁰⁹* third instar larvae were dissected, labeled, and analyzed as before. As expected, hsp23 was present at similar levels in wild-type and mutant wing discs (Fig. 4A and C), whereas it was markedly elevated in the mutant haltere discs (Fig. 4D). These results corroborate and reinforce the differences observed previously between the different imaginal discs.

3.6 Hsp23 has a defined and dynamic constitutive expression pattern during *Drosophila* development

Because of the specificity of the data shown in the preceding sections, we decided to explore the idea that hsp23 does not merely act as a chaperone in imaginal discs. Hence, we analyzed its spatial and temporal pattern of expression in embryos and imaginal discs using a novel antibody against the native protein (α -hsp23_{Nat}) (see Section 2). Figure 5

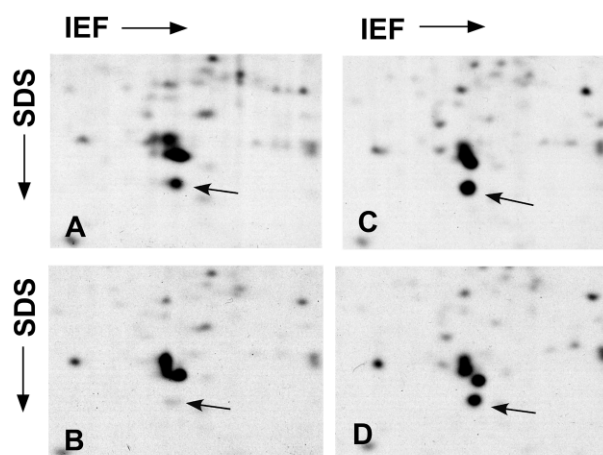


Figure 4. Close-ups of 2-D gels (IEF) of wild-type wing (A) and haltere (B) imaginal discs, and the wing (C) and haltere (D) imaginal discs of a *pbx¹/Ubx¹⁰⁹* mutant. Hsp23 is indicated by an arrow.

summarizes some of the results, in which the red channel always refers to hsp23. During embryonic development we detected similar profiles to those previously described [20]. Hsp23 was detected in the midgut (Fig. 5A) and in neurons within the extended germ band nervous system (Fig. 5B). The antibody also stained the nuclei of the salivary glands (Fig. 5C) and particular areas of the CNS (Fig. 5D) of third instar larvae. However, we focused our analysis on the wing, haltere, leg 1, leg 2, leg 3, and eye-antenna imaginal discs including wingless (*wg*) as a positional marker (green channel) in all the experiments. Wingless encodes a product with frizzled-2 binding activity involved in wing margin morphogenesis and is localized to the cytoplasm. After analyzing a substantial number of samples, some clear-cut conclusions emerged: first, that there was a defined temporally regulated pattern of expression in all cases; the faint and ill-defined expression in young imaginal discs being transformed into a well-defined pattern at the late third instar (red channel). Second, that the expression of hsp23 from the third medium instar onwards seemed to be restricted to proneural territories (proneural clusters) (Fig. 5E–F and H–K). Proneural clusters are defined by the precise spatio-temporal pattern of expression of one of several genes of the achaete-scute complex (AS-C) namely, *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*), *lethal of scute* (*l'sc*), and *asense* (*ase*).

We extended the analysis of wing discs to the pupal period and included *blistered* (*bs*) as a marker (green channel). At that stage the antibody revealed a dynamic, restricted pattern of expression of hsp23 (red channel) that did not only coincide with proneural differentiation: a high level of the protein was present in the interveins during early pupal development and this later became restricted to the central domains of the interveins (Fig. 5G). This suggests that hsp23 has different roles at different stages of the development of imaginal discs.

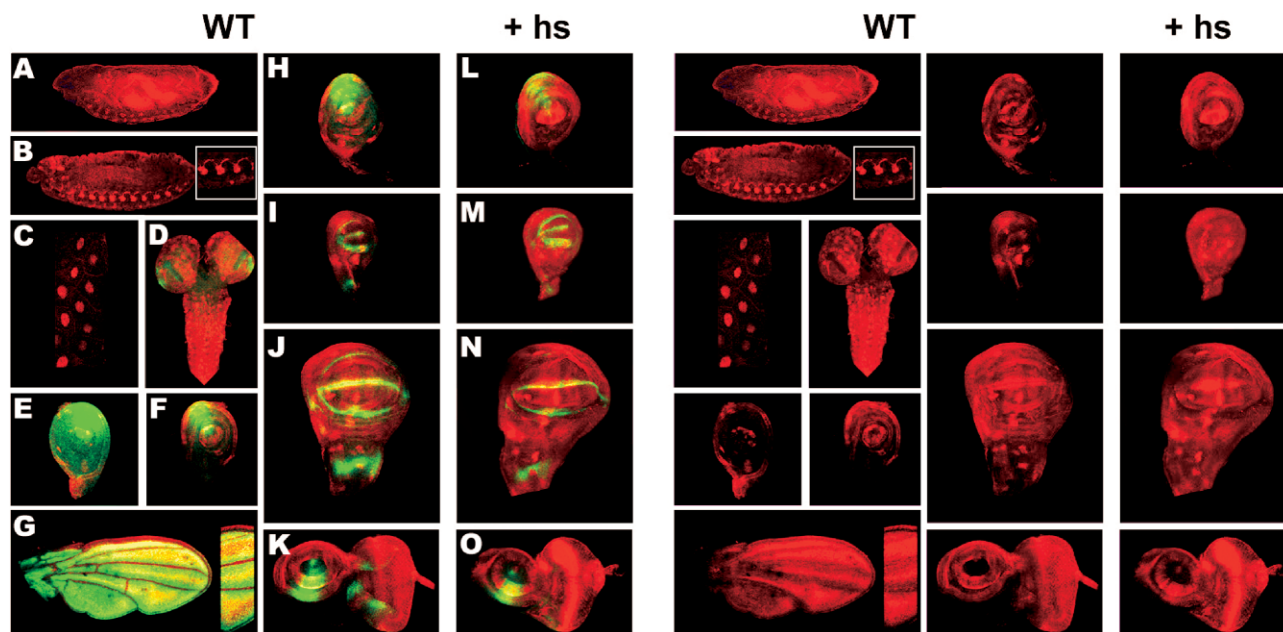


Figure 5. The pattern of Hsp23 is not modified by heat shock treatment. Protein expression pattern of hsp23 during *Drosophila* development in standard conditions (A–K) and after heat shock (L–O). In all cases, expression of hsp23 is shown in the red channel while *wg* (A–F, H–K) or *bs* (G) is shown in the green channel. Hsp23 expression is visualized in the mesoderm (A) and nervous system (B) of the embryo (stage 13). Anterior and dorsal are to the left and top, respectively. Equally, hsp23 stains the nuclei in the salivary glands (C). Hsp23 has a restricted pattern in the CNS (D) and in different imaginal discs from third instar larvae as well as in pupal wings (G). In leg discs 1 (E), 2 (F), and 3 (H) it is expressed in concentric rings and spots that are more intense ventrally (expression domain of *wg*). In the haltere (I), individual groups of cells express hsp23. In the wing, it is expressed in well-defined territories, such as the wing margin and groups of cells in the notum (J). It is also present in the morphogenetic furrow of the eye and in the *wg* domain of the antennae (K). Heat shock increases the levels of expression of hsp23 without altering its pattern (L–O).

Finally, to see whether the cell-specific pattern of expression was retained upon heat shock, third instar imaginal discs were heat-shocked for 2 h at 37°C to induce maximal synthesis of hsp23, and immediately fixed and analyzed with antibody. Surprisingly, although the level of hsp23 increased, its pattern was similar to that observed at 25°C. This result was obtained with wing (Fig. 5N), haltere (Fig. 5M), leg 3 (Fig. 5L), and eye-antenna (Fig. 5O) imaginal discs and suggests that although the amount of hsp23 synthesized is temperature-dependent, its pattern depends on epigenetic factors.

3.7 Hsp23 is strictly regulated by several genetic factors and signaling pathways

The restricted expression of hsp23 described in the previous section suggested that the protein was confined to proneural territories in mature imaginal discs. We therefore tried to demonstrate this by analyzing the co-expression of hsp23 and the neurogenic gene *neuralized*. Indeed, co-expression was clearly observed in all the cells of the proneural clusters, including the single mother cell (Fig. 6A). This result strongly suggests that expression of hsp23 is linked to proneural specification in all the imaginal discs.

An additional experiment was performed to see whether hsp23 could be regulated by proneural genes. To test this idea, we observed its expression in cells expressing *sc* ectopically in *dppG4* territories. In contrast to the heat shock experiments, the *dpp* domains of all the imaginal discs (eyes, legs, halteres, and wings) had a higher level of hsp23 expression, indicated with white arrowheads in Fig. 6B. This demonstrates that proneural genes regulate the expression of hsp23 and also suggests that this expression depends on the signaling pathways specifying the proneural cluster.

After the proneural clusters are specified, their size and integrity are controlled by the antagonistic actions of the N and EGFR signaling pathways [39]. We therefore drove ectopic expression of loss and gain functions of UAS-transgenes for these two signaling pathways with *dppG4*, and monitored expression of hsp23. This rose or fell in all the imaginal discs (eyes, legs, halteres, and wings) depending on loss or gain of N signaling (Fig. 6C and D). However, the EGFR pathway induced (white arrowheads) or repressed (yellow arrows) expression of hsp23 in a disc-dependent manner (Fig. 6E and F). Thus, the absence of EGFR signaling promoted ectopic expression of hsp23 in the wing and haltere while it repressed it in the leg (Fig. 6E). Strikingly, gain of function of EGFR signaling increased expression of hsp23 only in the proneural clusters of the wing and haltere imaginal discs,

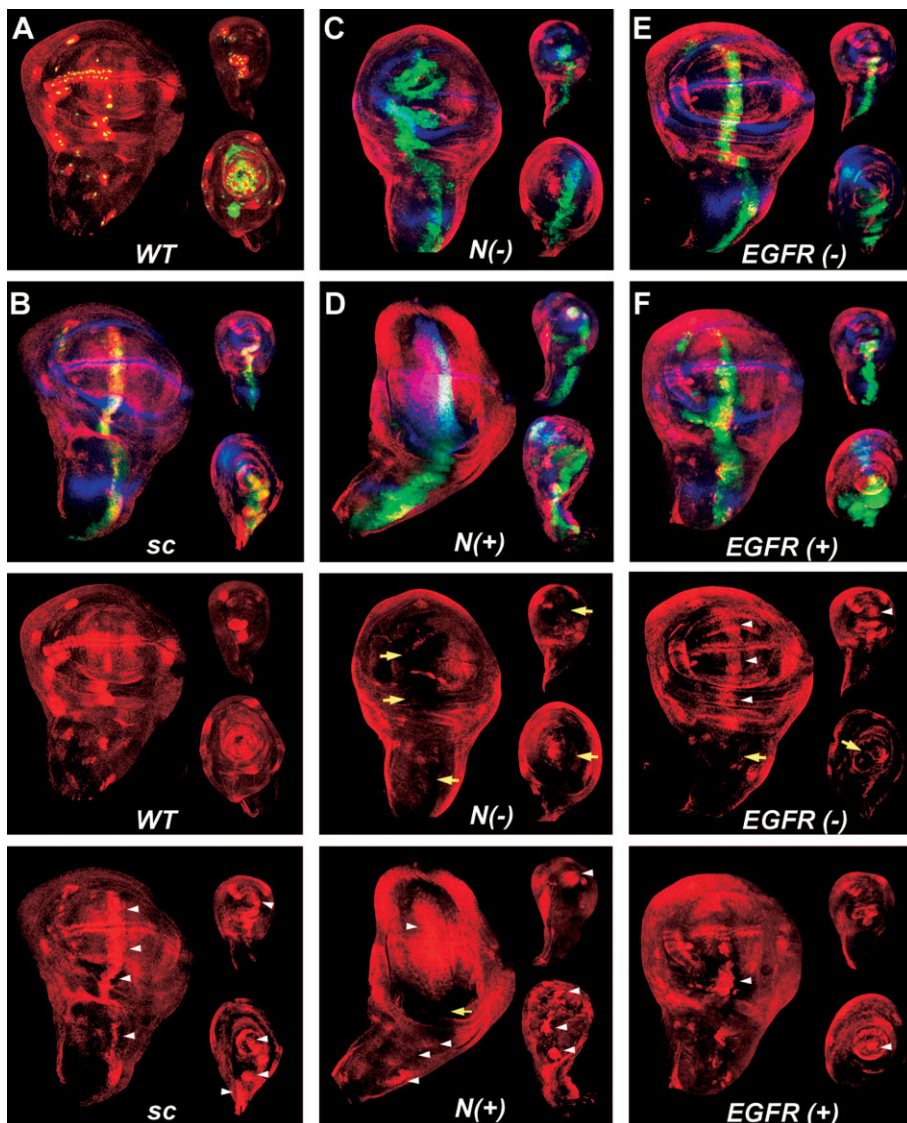


Figure 6. The expression pattern of *hsp23* is dependent on transcription factors and signaling pathways involved in proneural specification. In all cases, expression of *hsp23* is shown in the red channel and *wg* in the blue channel. The green channel shows the expression of *neur-alized-lacZ* in (A) and defines the *dppG4* domain of expression of the UAS-transgenes in (B–F). The imaginal discs monitored are: wing on the left, haltere on the upper right, and leg 3 on the lower right side of the panels. Ectopic expression of proneural genes (*sc*) in the *dppG4* domain increases autonomously the level of *hsp23* in each of the imaginal discs (B). Lack of *N* signaling (overexpression of UAS-*N_{ECN1T2}* and UAS-*N_{ECN2T5}* in the *dpp* domain) (C) reduces expression of *hsp23*, whereas an increase in its activity (overexpression of UAS-*N_{112.1}*) increases levels of *hsp23* in all the imaginal discs (D). Lack of EGFR signaling (overexpression of UAS-DN *Raf_{3.1}* in *dpp* domains) (E), or its increase (overexpression of UAS-*Ras_{V12}* in *dpp* domains) (F), alters the expression of *hsp23* in a context-dependent manner. Arrowheads identify signaling territories with ectopic or high levels of *hsp23* expression, and arrows represent territories with lower levels of *hsp23* expression than in the wild-type.

probably by promoting expression of AS-C genes (Fig. 6F). Together, these results show that *hsp23* expression might be involved in proneural differentiation and is regulated by mechanisms independent of heat shock and specific to each imaginal disc.

4 Discussion

This study is part of an effort of our laboratory to monitor changes in polypeptide synthesis involved in cell proliferation and differentiation in *Drosophila*. We use the wing imaginal discs both as a model system and as a quantitative protein database that can be used for comparative purposes in genetic studies. Here, we focused on the purification of a polypeptide (catalogued as SSP 6002) that showed different levels of

expression in different imaginal discs. Preparative 2-D gels followed by MALDI-TOF analysis revealed that polypeptide SSP 6002 is heat shock protein 23. We confirmed this conclusion by showing that its expression was elevated six-fold 2 h after heat shock. The polypeptide is expressed constitutively in a single unphosphorylated form, as revealed by Western blotting with an antibody against the denatured protein.

Hsp23 attracted attention some time ago, when it was found that tissues from late third instar larvae had much higher levels of this polypeptide than tissues from mid-third instar larvae [40]. This finding led to the suggestion that *hsp23* has a function in normal development as well as in the heat shock response. Over the years, evidence that shsp's in general, and *hsp23* in particular, are involved in processes other than merely heat shock responses has increased, and in fact we encountered this protein during a comparative

study of levels of protein expression in different imaginal discs. Our observations agree with the distinctive tissue-specific and age-dependent expression of hsp23 reported by others, and suggests that this protein may have different functions in different *Drosophila* organs.

We found that expression of hsp23 in imaginal discs from the early third instar is restricted to territories coincident with neural differentiation (proneural clusters). During the third instar larva and early pupal stages, sensory organ mother cells (SMCs) appear in precise positions in the imaginal discs, enabling macrochaetae to emerge at defined positions [41]. All cells in the proneural clusters, including the SMCs (marked by the expression of *neur-alized*), expressed hsp23 throughout imaginal development. Interestingly, the development of sensory organs in *D. melanogaster* and *D. simulans* is controlled by changes in the level of expression of the AC-SC genes associated with differences in the temperature of development [42], strongly suggesting that hsp23 expression is correlated with proneural specification.

Another striking conclusion from our analysis is that the restriction of hsp23 to proneural clusters is independent of temperature. Thus, although heat shock increases the quantity of the protein, it does not alter its pattern of expression. This finding challenges the traditional definition of a heat shock protein and raises the question of whether other hsps are induced by heat shock in those cells in which hsp23 seems not to be expressed.

In contrast to heat shock induction, changes in the expression or activity of transcription factors (*sc*) and signaling pathways (N and EGFR) involved in proneural specification did modify the hsp23 pattern. Thus, the high and autonomous level of hsp23 expression in imaginal discs when *sc* is overexpressed demonstrates the ability of proneural genes to regulate its expression. Nevertheless, unlike AS-C genes expression, which is progressively restricted to SMCs, expression of hsp23 continued during sensory specification and differentiation (from third instar larva to early pupal stages) in the group of cells that constitute the proneural clusters. This result shows that, in addition to its control by the AS-C genes, expression of hsp23 is dependent on the signaling pathways required to specify proneural cluster. Two major candidates are N and EGFR, whose antagonistic activity maintains the integrity and dimensions of proneural clusters needed to specify SMCs after proneural cluster formation.

We have shown that signaling pathways influence hsp23 expression in a context-dependent manner, indicating that there are specific systems of regulation for the different imaginal discs. We suggest that the pattern of hsp23 expression is dependent on specific signaling pathways and transcription factors during development, and further that it is controlled by selector genes such as *Ubx*. We further propose that expression in wing discs is higher than in the haltere in the wild-type condition, as well as in a *Ubx*-defective genetic background, because it is up-regulated by higher levels of *sc*

expression. This hypothesis is supported by the repression of *sc* exercised by *Ubx* in the haltere [43] and the capacity of cells expressing *sc* ectopically to induce ectopic expression of hsp23 in the haltere pouch.

Apart from its restricted expression during imaginal development, hsp23 has a dynamic pattern during the pupal stages that is not associated with neural territories. This finding raises new questions about the function of hsp23 in pupal development and its mechanism of regulation.

In summary, we have shown that hsp23, and probably, by extension, other heat shock proteins, may perform important functions during development. In addition, their expression appears to require precise mechanisms of regulation independent of heat shock.

J.A. is the recipient of a predoctoral fellowship of the Universidad Autónoma de Madrid. L.A.B-L is a fellow student of Consejo Superior de Investigaciones Científicas in collaboration with PACISA-GIRALT (I3P-BPD2002-1). This work was supported by Grant PB87-0449 from Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica and by an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

5 References

- [1] Santarén, J. F., Assiego, R., García-Bellido, A., *Roux's Arch. Dev. Biol.* 1993, 203, 131–139.
- [2] Santarén, J. F., García-Bellido, A., *Dev. Genes Evol.* 1996, 206, 349–354.
- [3] Sirotkin, K., Davidson, N., *Dev. Biol.* 1982, 89, 196–210.
- [4] Mason, P. J., Hall, L. M. C., Gauss, J., *J. Mol. Gen. Genet.* 1984, 194, 73–78.
- [5] Pauli, D., Arrigo, A. P., Vazquez, J., Tonka, C. H., Tissières, A., *Genome* 1989, 31, 671–676.
- [6] Southgate, R., Ayme, A., Voellmy, R., *J. Mol. Biol.* 1983, 165, 35–37.
- [7] Marin, R., Tanguay, R. M., *Chromosoma* 1996, 105, 142–149.
- [8] Lavoie, J. N., Gingras-Breton, G., Tanguay, R. M., Landry, J., *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 3420–3429.
- [9] Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S. *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2000, 2, 645–652.
- [10] Arrigo, A. P., Fakan, S., Tissières, A., *Devel. Biol.* 1980, 78, 86–103.
- [11] Ding, L., Candido, E. P., *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 9510–9517.
- [12] Michaud, S., Marin, R., Westwood, J. T., Tanguay, R. M., *J. Cell Sci.* 1997, 110, 1989–1997.
- [13] Lang, L., Miskovic, D., Fernando, P., Heikkila, J. J., *Dev. Genet.* 1999, 25, 365–374.
- [14] Armstrong, C. L., Krueger-Naug, A.M., Currie, R. W., Hawkes, R., *J. Comp. Neurol.* 2001, 434, 262–274.
- [15] Jantschitsch, C., Kindas-Mugge, I., Metzke, D., Amann, G., Micksche, M., Trautinger, F., *Br. J. Dermatol.* 1998, 139, 247–253.

- [16] Glaser, R. L., Wolfner, M. F., Lis, J. T., *EMBO J.* 1986, 5, 747–754.
- [17] Ayme, A., Tissières, A., *EMBO J.* 1985, 4, 2949–2954.
- [18] Glaser, R. L., Lis, J. T., *Mol. Cell Biol.* 1990, 10, 131–137.
- [19] Marin, R., Valet, J. P., Tanguay, R., *Dev. Gen.* 1993, 14, 69–77.
- [20] Haass, C., Klein, U., Kloetzel, P. M., *J. Cell Sci.* 1990, 96, 413–418.
- [21] Egger, B., Leemans, R., Loop, T., Kammermeier, L., Fan, Y., Radimerski, T., Strahm, M. C. *et al.*, *Development* 2002, 129, 3295–3309.
- [22] Michaud, S., Tanguay, R. M., *BMC Dev. Biol.* 2003, 3, 9.
- [23] Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S., Morata, G., *Science* 1996, 111, 252–255.
- [24] Wilder, E. L., Perrimon, N., *Development* 1995, 121, 477–488.
- [25] Parras, C., Garcia-Alonso, L. A., Rodriguez, I., Jimenez, F., *EMBO J.* 1996, 15, 6394–6399.
- [26] Seugnet, L., Simpson, P., Haenlin, M., *Development* 1997, 124, 2015–2025.
- [27] Klein, T., Brennan, K., Arias, A. M., *Dev. Biol.* 1997, 189, 123–134.
- [28] Karim, F. D., Rubin, G. M., *Development* 1998, 125, 1–9.
- [29] Martin-Blanco, E., Roch, F., Noll, E., Baonza, A., Duffy, J. B., Perrimon, N., *Development* 1999, 126, 5739–5747.
- [30] Huang, F., Dambly-Chaudiere, C., Ghysen, A., *Development* 1991, 111, 1087–1095.
- [31] Santarén, J. F., Van Damme, J., Puype, M., Vandekerckhove, J., Garcia-Bellido, A., *Exp. Cell Res.* 1993, 206, 220–226.
- [32] Santarén, J. F., *Electrophoresis* 1990, 11, 254–267.
- [33] O'Farrell, P. Z., *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 4007–4021.
- [34] Laskey, R. A., Mills, A. D., *Eur. J. Biochem.* 1975, 56, 335–341.
- [35] Alonso, J., Santarén, J. F., *Proteomics* 2005, 5, 474–489.
- [36] Gisselbrecht, S., Skeath, J. B., Doe, C. Q., Michelson, A. M., *Genes Dev.* 1996, 10, 3003–3017.
- [37] Baena-López, L. A., Garcia-Bellido, A., *Development* 2003, 130, 197–208.
- [38] Peifer, M., Karch, F., Bender, W., *Genes Dev.* 1987, 1, 891–898.
- [39] Culi, J., Martín-Blanco, E., Modolell, J., *Development* 2001, 128, 299–308.
- [40] Cheney, C. M., Shearn, A., *Dev. Biol.* 1983, 95, 325–330.
- [41] Cubas, P., de Celis, J. F., Campuzano, S., Modolell, J., *Genes Dev.* 1991, 5, 996–1008.
- [42] Skaer, N., Simpson, P., *Dev. Biol.* 2000, 221, 148–167.
- [43] Weatherbee, S. D., Halder, G., Kim, J., Hudson, A., Carroll, S., *Genes Dev.* 1998, 12, 1474–1482.

Characterization of the *Drosophila melanogaster* Mitochondrial Proteome

Jana Alonso, Javier M. Rodriguez, Luis Alberto Baena-López, and Juan F. Santarén*

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain

Received May 6, 2005

We have combined high-resolution two-dimensional (2-D) gel electrophoresis with mass spectrometry with the aim of identifying proteins represented in the 2-D gel database of *Drosophila melanogaster* mitochondria. First, we purified mitochondria from third instar *Drosophila* larvae and constructed a high-resolution 2-D gel database containing 231 silver-stained polypeptides. Next, we carried out preparative 2-D PAGE to isolate some of the polypeptides and characterize them by MALDI-TOF analysis. Using this strategy, we identified 66 mitochondrial spots in the database, and in each case confirmed their identity by MALDI-TOF/TOF analysis. In addition, we generated antibodies against two of the mitochondrial proteins as tools for characterizing the organelle.

Keywords: *Drosophila* • mitochondria • proteomics • 2D gels • MALDI-TOF

Introduction

Since the early 90s, cataloguing the proteins of single-celled microorganisms, cells, biological fluids, tissue, and whole organisms has been undertaken at a rapid pace as advances are made in protein and peptide separation, detection and identification. This progress is evident from the numerous databases that are available (see for example the directory of 2D databases on the ExPASy server at <http://us.expasy.org/ch2d/>). It has been supported by continual innovation in 2D gel electrophoresis technology and in methods of identification, and the availability of complete genome sequences.

These techniques, however, are not free of limitations, at least for complex eukaryotes where the number of proteins in a single cell is estimated to approach 10 000.¹ This means that proteome analysis on whole cell extracts tends to miss low-abundance proteins. One solution to this problem is to take advantage of the compartmentalization of the eukaryotic cell, and to analyze subcellular organelles. These can be isolated in good yield and the complexity of their protein composition is lower than that of whole cells. Classical cell subfractionation yields four major fractions: nucleus, mitochondria, microsomes and cytosol. Of these, the nucleus and mitochondria contain 5–10% of the total proteins and constitute interesting targets of analysis because they are discrete functional units.

Mitochondria are ubiquitous cytoplasmic organelles that play crucial roles in oxidative phosphorylation, β -oxidation of fatty acids and the Krebs's cycle. They also generate most of the cellular reactive oxygen species and are crucial for calcium signaling.² Given their importance in cellular physiology, it is not surprising that defective mitochondrial biogenesis and

metabolism are involved in a broad range of pathologies. For example, the Human disease catalog lists about one hundred diseases related to mitochondrial dysfunction such as diabetes, obesity, cancer, aging, neurodegeneration, and cardiomyopathy.³ However, many of the nuclear genes involved remain to be identified, and an inventory of such genes is essential for a better understanding of mitochondrial function. As a result there have been several recent efforts to define the mitochondrial proteome in humans and model organism. For example, the mitochondrial proteome of *Arabidopsis thaliana* was analyzed by 2D-PAGE, and 91 proteins were identified by peptide mass fingerprinting and MALDI-TOF mass spectrometry.⁴ Similarly, Pflieger et al.⁵ adopted a LC-MS/MS approach and identified 179 gene products in the yeast mitochondrion. This number was later increased to 750 by Sickmann et al.⁶

Drosophila is a well-established model organism in cellular and developmental biology, and, for the reasons adduced above as well as the need for markers of cellular organelles, we have initiated a project on the mitochondrial proteome. At present, the number of *Drosophila* nuclear genes that encode mitochondrial proteins and whose function has been studied by molecular genetic techniques, is relatively low, presumably because of the difficulty of isolating such genes in conventional genetic screens. In addition, mitochondrial alterations in *Drosophila* mimic some human diseases. For example mitochondrial dysfunction is the earliest manifestation of muscle degeneration and a prominent characteristic of individualizing spermatids in *parkin* mutants. Loss-of-function mutations in *parkin* result in an early onset form of programmed cell death known as autosomal recessive juvenile Parkinsonism.⁷

We have compiled a catalog of the mitochondrial proteome using highly purified mitochondria from *Drosophila* third instar larvae. This provides a basis for identifying novel proteins or

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 34-1-914978447. Fax: 34-1-914974799. E-mail: jfsantaren@cbm.uam.es.

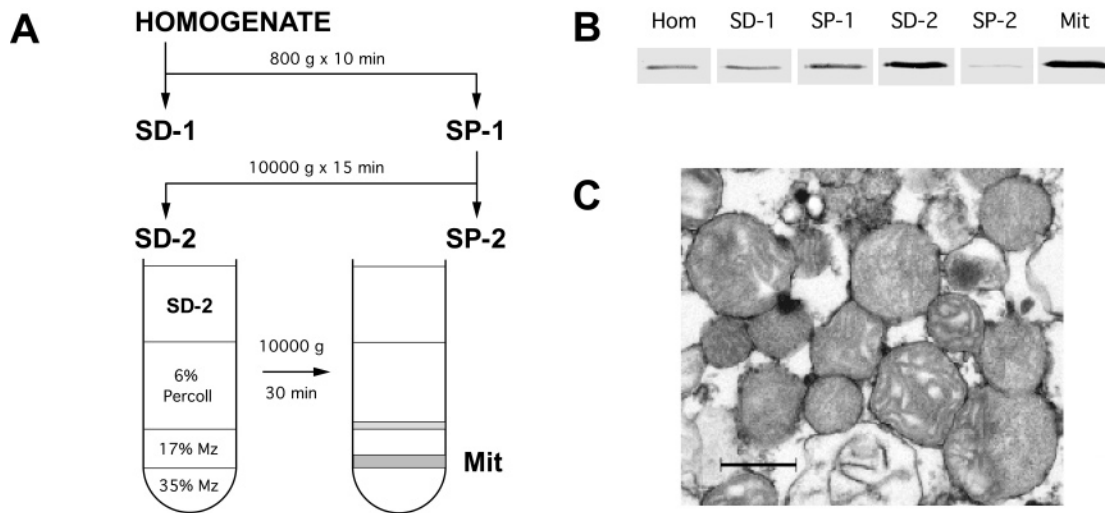


Figure 1. (A) Diagram of the hybrid Percoll/metrizamide discontinuous density gradient used to isolate mitochondria from *Drosophila melanogaster* third instar larvae. Mz, Metrizamide. (B) Western blot of samples of 100 micrograms of total protein from successive steps of the purification, using antibody against the mitochondrial matrix protein P1 precursor. (C) Morphology of the purified mitochondria. The preparation was fixed with 2.0% glutaraldehyde plus 2.0% tannic acid in 0.1 M cacodylate, pH 7.4, for 1 h at room temperature, followed by 1.0% OsO₄ plus 1.0% potassium ferrocyanide for 1 h at 4 °C. Sections were post stained with uranyl acetate and lead citrate. The bar represents 1.0 μm.

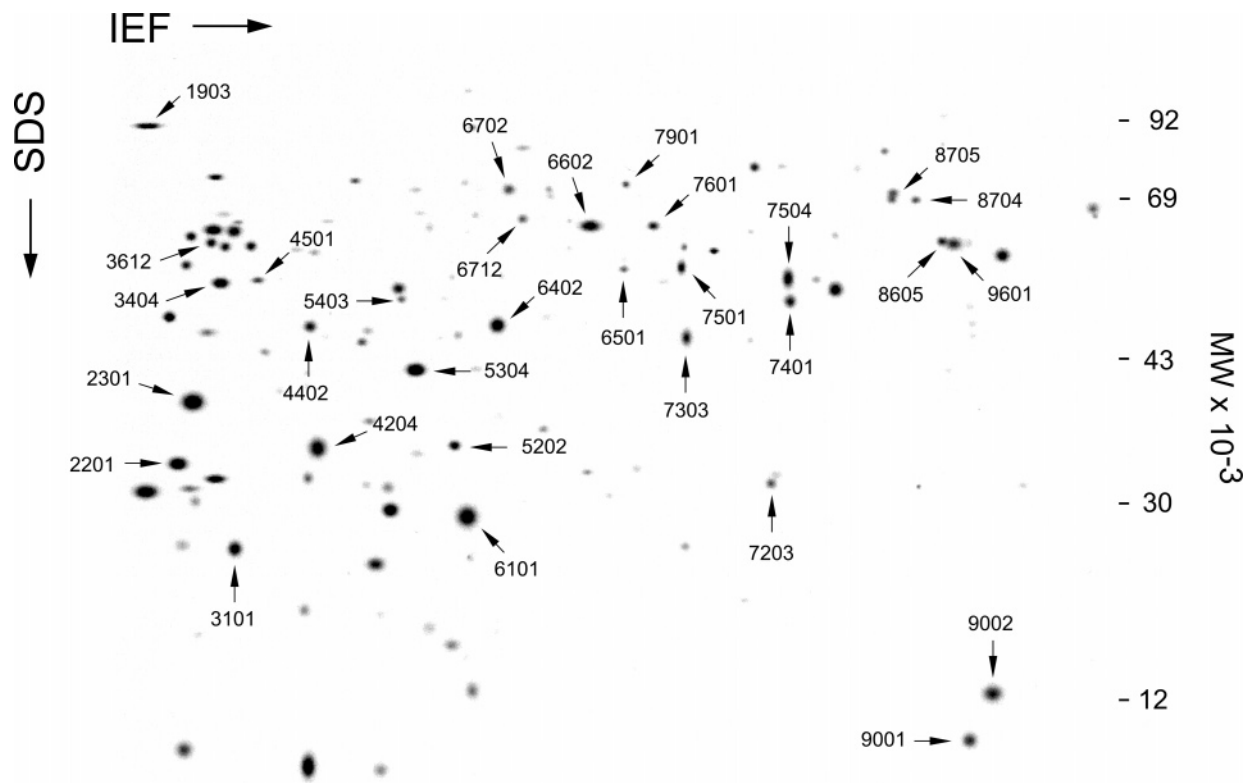


Figure 2. Two-dimensional gel of acidic (IEF) polypeptides from the mitochondria of *Drosophila melanogaster* third instar larvae. A total of 100 micrograms was applied per gel and 143 polypeptides were separated and quantified. The pH ranges from 7.0 (left) to 4.4 (right). Arrows indicate some of the identified polypeptides.

protein isoforms localized to the mitochondrion and can be used in future as a reference to examine the effects of mitochondrial dysfunction on the mitochondrial proteome. In addition, we have generated specific antibodies against two mitochondrial proteins that can be used as markers in a broad set of applications, or as a means of tracking the dynamics of mitochondria during normal or abnormal cellular and developmental processes.

Experimental Section

Procedures. 1. Fly Strains and Cell Culture. Laboratory stocks of wild-type *D. melanogaster* [strain Vallecas (Spain)] were used. We also employed the established Schneider cell line of *D. melanogaster*. These cells were grown in bottles (25 cm²) in 20 mL of M3 medium supplemented with 5% foetal bovine serum.

Table 1. Identification by MALDI-TOF and MALDI-TOF-TOF MS of Acidic Polypeptides (IEF) Recorded in the *Drosophila* Mitochondria Database

SSP no.	KDa/pI	N ^a / % ^b	sequence determined by MS/MS	protein identified	fly base ID FBgn
1407	51.5/8.89	15/34.0	1299.77 ALGVLASLVWDR 1315.64 EAGNNPSEEQLK 1439.81 SGQVVPYGHAVLR 1688.90 ALVTETSVLDADEGIR	I (1) G0030 CG 3861	0026708
1903	85.3/8.49	9/12.3	1457.81 IPFNVTPGSEQIR 1625.76 WVAVGDENYGEQSSR 1854.99 VLYSHLDDPANQDIVR	ACONITASE	0010100
2201	26.5/7.69	12/44.2	1135.58 NGFLLDGFPR 1452.78 QTKPLVDYYGLR 1601.77 SSDVFSTIDSIFQR 2039.07 YEPENIGNAILLGGPPGSGK	ADENYLATE KINASE-2 Adk2	0022708
2301	31.0/7.69	8/30.1	1216.59 DFSVVYDLMK 1329.66 DYAGGFSSALITK 1750.90 DTIFIDSSITISPDLVK 1891.93 QGLDANVFAEIIINSSTGR	CG 15093	0034390
2405	51.5/8.89	13/30.6	1299.74 ALGVLASLVWDR	CG 3861-PA	0026708
3101	24.8/8.88	8/33.5	830.53 GKPLFIR 1019.51 TAAEIETER 2527.35 KGPAPLNLEVP THEFPNEGLLVVG	RIESKE IRON-SULFUR PROTEIN RfeSP	0021906
3404	50.4/7.15	8/20.3	777.43 FEALAAAR 1389.72 SQINFPIGGATER 1600.90 IAELTSLPFVTAPNK 1791.96 VYELALGGTAVGTGLNTR	I(1)G0255 CG 4094-PB	0028336
3612	61.0/8.58	14/31.2	963.50 YNLGLDLR 1059.51 NLNHVSYGR 1232.62 IPVTPSESFQK 1746.89 TFIVQGFNGVGLHTTR 1932.89 ESNYHLLLESVQESLER	GLUTAMATE DEHYDROGENASE (Splice isoform C)	0001098
4101	18.9/6.52	8/48.4	1008.51 ATENWFIK 1031.48 QNWHYQR 1040.48 FEADQQFR 1315.70 MVDNEIVNLR	Pdsw	0021967
4204	30.5/6.44	19/83.0	1461.73 LSLEGNFAPQSGNK 1505.77 VNNASQVGLGYQQK 1687.96 LRDGVTLTLSTLVDGK 1950.87 TSSGIEFNTAGHSNQESGK 2367.13 DFVLHTAVNDGQEFSGSIFQR 2534.28 WNTDNTLTFEAVAQDQLLEGLK	PORIN	0004363
4402	53.9/8.24	8/22	1590.87 ALDQLEAQVYILSK 1613.88 LLQEVDSPFIPVPR 1830.93 GITINVAHVEYQTETPR 2186.17 ELDKPFLLPVENVYSIPGR	ELONGATION FACTOR Tu MITOCHONDRIAL	0024556
4501	50.4/7.15	8/20.5	1257.63 TPVHPNDHVNK	I(1)G0255	0028336
5201	30.5/6.44	19/83.0	984.49 GYNFGLWK 1181.54 YQLDDDASVR 1505.77 VNNASQVGLGYQQK 2367.12 DFVLHTAVNDGQEFSGSIFQR	PORIN	0004363
5202	29.9/7.70	9/44.9	1295.66 DFPLSGYVELR 1352.75 ILTDYGFEGHPQR 1532.74 VVCEPLELAQEFR 1753.82 FDLAPWEQFPNFR	CG 12079	0035404
5301	48.8/8.39	9/24.8	1203.58 YYTQMQTIK 1530.75 GTIAYDIDHIQER 1883.95 GDALPGIWDGMDVLAVR 2474.18 SDAELGVSHLWTDVYSNNLEPK	I (1) G0334 CG 7010-PC	0028325
5304	39.3/7.66	8/29.3	1646.92 SIRPLDTAFIFASVR 1801.90 VFILGEEVAQYDGAYK	CG 11876	0039635
5401	44.0/7.07	11/25.4	1039.56 AFTGFIVER 1174.58 LSAWEIDQGR 1273.65 KGDEWVINGQK 1463.84 TRPPVAAGAVGLAQR	CG 12262	0035811
5403	46.4/6.29	19/50.0	1341.66 TVEAEAAHGTVTR	ISOCITRATE DEHYDROGENASE	0001248
6101	20.2/6.10	13/73.0	1372.77 LVPVAGLVDSFQK 1463.68 SKEQLEAEAQGHH 1545.79 IAQSSINWSALAER 1761.77 SLLPYDQMTMEDYR	ATP SYNTHASE, Subunit d	0016120
6402	38.5/6.96	9/31.6	1166.57 FPEIQFEEK 1189.58 VAEYAFQYAK 1408.73 TLYDDVDVVITR 1574.81 FGIPQAAIDSVNTNK	I (1) G0156	0027291
6403	35.8/6.08	10/37.5	1165.58 DVDNIIISAYR 1530.75 GTIAYDIDHIQER 2474.19 SDAELGVSHLWTDVYSNNLEPK	I (1) G0334	0028325

Table 1. (Continued)

SSP no.	KDa/pI	N ^a / % ^b	sequence determined by MS/MS	protein identified	fly base ID FBgn
6501	40.4/5.18	14/34.0	974.53 FDVPELVR 1590.75 IDFNQFEADIHNK 1790.89 VFSDAYLSDLEQLYK	NADH: UBIQUINONE REDUCTASE 42 KD SUBUNIT PRECURSOR	0019957
6602	57.0/6.37	8/19.2	1070.51 IYDEFVER 1428.78 EEIFGPVQQLIR 1563.71 TIPMDGDFFTYTR	CG 3752	0032114
6702	67.9/6.18	16/36.8	1296.65 HANGQITTADLR 1335.62 GEGGYLINGNGER 1473.84 LGANSLDLVVFGR 1596.86 DHVYLQLHHLPPK 2054.02 NVIDTTLDNEVSTVPPAIR	SUCCINYL COENZIME A SYNTHETASE FLAVOPROTEIN SUBUNIT Scs-fp	0017539
6712	57.0/6.37	14/31.9	962.54 ANYIVGGLR 1070.51 IYDEFVER 1428.78 EEIFGPVQQLIR	CG 3752	0032114
7203	26.7/6.44	9/22.3	1283.71 VAEILQLPNMR 1297.72 GAMIPLLDLAQR 1611.87 RVEAILSYPEGHK	CG 5703 – PA	0030853
7204	30.3/5.55	11/50.0	1349.66 SFGAAGDGLVELR 1485.71 IYTILGQDYDER 1617.85 AVVAQFDAGELITQR	l (2) 37Cc	0002031
7303	45.3/6.28	12/33.1	1097.53 YAAGFLNEGR 1266.73 LAQEIQPLVK 1660.82 VPEENILGTFGHGYK	CG 3902	0036824
7304	45.3/6.28	10/41.3	1097.53 YAAGFLNEGR 1086.52 YYASEVAQR 1173.62 LQEQGVPPFQK 1266.73 LAQEIQPLVK 1660.82 VPEENILGTFGHGYK	CG 3902	0036824
7401	44.4/6.29	8/23.1	936.48 FSWGVANR 1291.71 AIYRDPFKPGK 1505.75 SQFLANSPNTALDK 1835.94 VQATYLVWIDGTGENIR	GLUTAMINE SYNTHETASE 1	0001142
7501	52.9/6.21	12/36.8	1224.67 APGFAHLAALK 1374.67 TYTQALPYFDR 1942.03 NLTNLNFGPQHAAHGVLK 2252.14 LFTQGYQVPPGATYTAIEAPK 2485.22 TEDIGIVTAEALNYGFSGVMLR	CG 1970	0039909
7504	51.8/5.67	13/31.5	1134.63 IPLHELEQR 1290.73 RIPLHELEQR 1467.70 ADLTDYIQTHYK 2150.03 VASEDSGASTATVGLWIDAGSR 2460.19 SQTDLLEVENLGAHLNAYTSR	CG 3731	0038271
7505	51.8/5.67	15/36	1134.64 IPLHELEQR 1413.82 AVELADIQNSK 1467.73 ADLTDYIQTHYK 2150.05 VASEDSGASTATVGLWIDAGSR	CG 3731 – PA	0038271
7601	56.9/6.37	10/19.8	962.55 ANYIVGGLR 1070.52 IYDEFVER 1428.80 EEIFGPVQQLIR	CG 3752	0032114
7901	65.9/6.17	11/27.6	1187.56 DTFSLTGSGR 1215.65 ITHTYTLNPR 1548.76 NPWLSPFQEFQR 1850.93 IPVDNHNLALYEGPEQR	CG 12140	0033465
8201	24.5/5.81	9/42.0	993.47 RYPSGEER 1308.64 EPATINYPFEK	NADH: UBIQUINONE REDUCTASE 23 KD SUBUNIT PRECURSOR ND 23	0017567
8605	50.8/4.93	22/72.6	1439.78 VALTGLTVAEYFR	ATP SYNTHASE BETA CHAIN	0010217
8704	54.6/5.07	13/30.0	1609.89 AAVEEGIVPGGGTALLR	HEAT SHOCK PROTEIN 60 Hsp60	0015245
8705	54.6/5.07	17/41.7	1609.89 AAVEEGIVPGGGTALLR 1910.07 ISSVQSIIPALELANAQR 2038.16 KISSVQSIIPALELANAQR 2365.32 KPLVIAEDIDGEALSTLVVNR	HEAT SHOCK PROTEIN 60 Hsp60	0015245
9001	16.6/5.55	6/47.7	984.59 VNDIALAIR 1074.52 EGIDGWEIR 2881.59 IPTLQELGIPTIEELGYDKPELALK	CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT Va	0019624
9002	16.7/5.73	7/73.9	1041.53 TFYDAAVVR 1482.84 AQAIAVEVAEALVK 1665.88 QIDVPSFSGSFGILAK 2199.25 HVP TLAVLKP GV VQV VVENDGK	l (1) G0230	0028342
9203	28.9/4.98	5/24.7	1008.49 GISQFAEK 1303.72 SKPQFEVDIHK 1676.86 ELVEFLTEEIVAR 2098.08 LSDLATAHEHTSYIGLLEK	CG 6459	0034259

Table 1. (Continued)

SSP no.	KDa/pI	N ^a / % ^b	sequence determined by MS/MS	protein identified	fly base ID FBgn
9405	50.8/4.93	22/72	975.56 IGLFGGAGVVK 1439.77 VALTGLTVAEYFR 1601.79 VALVYQMNEPPGAR 1921.94 DQEGQDVLLFIDNIFR 1988.02 AIAELGIYPVAVDPLDSTSR 2135.05 SLQDIHAILGMDELSEEDK	ATP SYNTHASE BETA (FRAGMENT)	0010217
9601	50.8/4.93	22/67.7	1367.74 IINVIGEPIDER 1406.67 AHGGYSVFAGVGER 1439.78 VALTGLTVAEYFR 1677.92 LVLEVAQHLGENTVR 1921.95 DQEGQDVLLFIDNIFR 2252.06 IPSAVGYQPTLATDMGSMQER	ATP SYNTHASE BETA	0010217

^a N = Number of matched peptides. ^b % = Coverage of full length protein by tryptic peptides.

2. Purification of Mitochondria. We adapted a method described for isolating mitochondria from Chinese hamster ovary cells.⁸ In summary, *Drosophila* third instar larvae were homogenized in 0.25 M sucrose by four strokes with a Potter–Elvehjem homogenizer. The homogenate was filtered through sterile gauze and centrifuged at 800 × g for 10 min. The supernatant was decanted and centrifuged again at 10 000 × g for 15 min. The mitochondrial pellet was resuspended in 0.25 M sucrose and centrifuged in a hybrid Percoll/metrizamide discontinuous gradient at 10 000 × g for 15 min. A band containing purified mitochondria was obtained at the metrizamide interface. The functional integrity of the purified mitochondria was measured by assaying the activity of respiratory chain enzymes and citrate synthase, as described.⁹ Their structural integrity was assayed by electron microscopy. The band of purified mitochondria was resuspended in PBS and centrifuged at 10 000 × g for 15 min. The pellet was fixed with 2.0% glutaraldehyde plus 2.0% tannic acid in 0.1 M cacodylate, pH 7.4, for 1 h at room temperature, followed by 1.0% OsO₄ plus 1.0% potassium ferrocyanide for 60 min at 4 °C. The sections were post stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a JEOL-1010 microscope operating at 80 kV.

3. Two-Dimensional Gel Electrophoresis. Two-dimensional gel electrophoresis was performed as described by O'Farrell^{10,11} with some modifications¹². Briefly, the first dimension for resolving acidic proteins (IEF) was performed on 230 × 2.3 mm 4% (w/v) polyacrylamide gels containing 2% ampholytes (1.6% pH 5–7; 0.4%, pH 3.5–10) at 1200 V for 20 h. Basic proteins (NEPHGE) were resolved on 150 × 2.3 mm 4% (w/v) polyacrylamide gels containing 2% ampholytes (1% pH 7–9; 1% pH 8–9.5) at 400 V for 4.5 h. The second dimension employed a 15% polyacrylamide gel (24 × 24 cm) run overnight at 18 °C. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue and silver nitrate¹³.

4. Computer Analysis of 2D Patterns. The silver stained gels were digitized at 176 × 176 μm resolution with a pdi scanning densitometer, and the resulting 2-D images merged and analyzed with PDQUEST software (Version 5.1).

5. In-Gel Digestion. Coomassie- or silver-stained protein spots were excised and digested with trypsin (Promega, Madison, WI, CA). After washing three times for 40 min with 100 μL 50mM ammonium bicarbonate and 50% methanol, the gel pieces were dried and swollen in digestion buffer (20 mM ammonium bicarbonate and 40 ng/μL trypsin), and incubated at 37 °C for 16 h. Peptides were extracted twice by 20 min incubation in 35 μL of 50% ACN in 0.1% TFA. The resulting peptide extracts were pooled, concentrated in a vacuum centrifuge and stored at –20 °C.

6. Mass Spectrometry. Dried samples were dissolved in 10 μL of 30% ACN and 0.1% TFA. Equal volumes (0.5 μL) of peptide and matrix solution were mixed and crystallized on the sample plate. The matrix solution consisted of 3 mg α-cyano-4-hydroxycinnamic acid dissolved in 1 mL of a solution containing 50% ACN and 0.1% TFA. Peptides were analyzed with an Applied Biosystems 4700 proteomics analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA) with TOF/TOF ion optics. MS spectra were obtained in reflectron mode using an acceleration voltage of 1 kV. Desorption and ionization was performed with an Nd:YAG laser operating at 355 nm, and the final mass spectrum was produced by averaging 3600 laser shots. The products of trypsin autodigestion were used for internal calibration. The following parameters were used for protein identification: 30 ppm error, optional oxidation of methionine and two possible missed cleave site. All MS/MS sequencing analysis were performed using the same equipment.

7. Protein Identification Using the *Drosophila* Database. The first step in protein identification consisted of mass fingerprinting. The mono-isotopic peptide mass fingerprinting data obtained from MALDI-TOF were then used to search for candidates in the SWISS-PROT/TrEMBL no redundant protein database.

8. Antibodies Against Mitochondrial Proteins. We generated an antibody against denatured mitochondrial matrix P1 precursor polypeptide. The contents of 10 confluent 500 cm² trays (Nunc) of Schneider cells were used to prepare the polypeptide for immunization. The cell monolayer were washed with Hanks' solution, and scraped with a rubber policeman into 10 mL of the same medium. After centrifugation, the cells were sonicated, treated with DNase and RNase, and passed several times through a narrow-gauge needle. The sample was then lyophilised and resuspended in 5 mL of lysis buffer, and [³⁵S]methionine + [³⁵S]cysteine labeled proteins from wing imaginal disks were added to identify the polypeptides by autoradiography. One hundred 2-D gels were run as described above, immediately dried (without fixation) and exposed 4 days. The mitochondrial matrix protein P1 precursor was located by autoradiography and cut out of the gels. The gel pieces were rehydrated and the protein recovered by electroelution. Approximately 100 μg of this protein was injected into a New Zealand White rabbit, and its serum were tested by Western blotting, as described below.

To prepare antibody against native hsp60, a cDNA containing the complete open reading frame was cloned into the pRSET vector (Invitrogen, Leek, The Netherlands), and expressed as a His₆-fusion protein in *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS (Novagen, Madison, WI). Approximately 240 μg of this protein

Table 2. Identification by MALDI-TOF and MALDI-TOF-TOF MS of Basic Polypeptides (NEPHGE) Recorded in the *Drosophila* Mitochondria Database

SSP no.	KDa/pI	N ^a / % ^b	sequence determined by MS/MS	protein identified	fly base ID FBgn
1202	13.1/9.82	6/47.0	933.55 LRQEFLK 1335.67 VLSNEEQEFIK 1406.70 VSNYEHFKPTGK 1558.75 HATGEGGTVFDAGLAR	CG 12859	0033961
1302	22.4/9.64	13/55.0	799.43 TIMAAHR 1101.61 DLTALQATIR 1582.88 VDPSIIGGLIVSIGDK 1741.93 FAPATVNLGLLADNGR	OLIGOMYCIN SENSITIVITY CONFERRING PROTEIN Oscp	0016691
1408	24.1/9.35	16/52.0	923.48 WIHAPSGR 1067.55 SYILDGFPR 1127.61 NIAQAEALAAAR 1641.82 VPGKDDVTGEPLMQR 2133.15 EQIDAVITLDRVPHSVIIDR	ADENYLATE KINASE – 3	0042094
1508	34.6/9.81	16/39.5	1074.55 EEGLTALWR 1206.61 NYTNVANALAR 1505.72 LGMYTYLNDLFR 1641.91 EGPLALYQGIGAALLR	CG 1907	0039674
1509	33.0/9.55	16/67.9	956.59 QQVSLIR 1057.53 QVAQQEAQR 1177.63 FNASQLITQR 1743.89 LGGIQSDIYSEGLHVR 2376.21 VLAAVGAAAYGVQSPLYTVEGGHR	l (2) 03709	0010551
2508	35.3/9.20	10/37.2	1205.68 LFGVSTLDVVR 1265.71 GSDVVVIPAGVPR 1318.69 DDLFNVNAGIHK 1492.75 TAGFIGADQLGDSLK	CG 7998	0038587
2608	45.4/9.47	20/71.6	1177.59 NGLGNSIYSPR 1238.55 AASANWYGGDAR 1602.77 NESYDIQGASHLLR 1645.82 NIQQVGGTLTTWGDR 2388.25 YLQDLLQPAFKPWELVDNAK 2540.34 NVLEADALLGAIDGISQSQVQEAAK	CG 4169	0036642
2613	47.1/8.95	21/50.7	934.51 INLGAGAYR 1267.64 GLYSNPPVHGAR 1487.73 DDNTQPFVLPVSR 1511.78 HNVTAQSISGTGALR 2510.24 STWFSEVQMGPDAILGVTEAFK	GLUTAMATE OXALOACETATE TRANSAMINASE 2 Got 2	0001125
2810	79.6/8.96	30/46.8	789.50 GLIALFR 1040.54 GIFLYDGQK 1233.68 ILSTMLSEAIR 1581.82 VVITVGDGPGFYTTR 1836.02 LGLPEVMLGLLPGGGGTVR 1969.98 DQTLASLRPTLDYSDFK	CG 4389	0028479
3413	26.5/7.69	17/64.2	1135.59 NGFLLDGFPR 1204.56 SYHEEFAPPK 1452.78 QTKPLVDYYGLR 1601.77 SSDVFSTIDSIFQR 2004.05 TNLDAVIEFAIDDSLVR	ADENYLATE KINASE – 2 Adk 2	0022708
3708	81.9/8.99	31/39.0	1019.51 GVPEDALR 1122.57 LDTYDILNR 1358.66 AQLEYHLEAER 1412.76 GDDLVAAVLESVPK 1561.78 AVENGENSELWTTLK	CG 6455	0019960
3714	60.9/8.44	23/45.9	1059.53 NLNHVSYGR 1389.60 DAGNYEMITGYR 1537.68 FFDMMVEYFFHR 1746.91 TFIVQGFQGNVGLHTTR 1932.91 ESNYHLLLESVQESLER	GLUTAMATE DEHYDROGENASE Gdh	0001098
3813	85.3/8.49	25/35.0	1102.61 LQLEPFDK 1215.59 NGSWGQVDPVAR 1457.77 IPFNVTGPSEQIR 1625.72 WVAVGDENYEGESSR 1698.90 LNHTLNLDLQIGWFK 1854.94 VLYSHLDDPANQDIVR 2076.94 GFDPGQDTYTAPPPSGENVK	ACONITASE Acon	0010100
4308	18.9/6.52	7/45.9	1040.48 FEADQQFR 1128.53 YGDLGGYANAK 1315.70 MVDNEIVNLR	Pdsw	0021967
4310	24.8/8.88	13/42.6	2527.36 KGPAPLNLEVPTHEFPNEG LLVVG	RIESKE IRON-SULFUR PROTEIN RFeSP	0021906
4409	27.2/7.76	14/61.4	1352.73 IEVISVEDPPVR 2095.12 LAEEVIAVSVGPAQSQEVIR	CG 7834	0039697

Table 2. (Continued)

SSP no.	KDa/pI	N ^a / % ^b	sequence determined by MS/MS	protein identified	fly base ID FBgn
4504	31.0/7.69	10/44.8	1216.58 DFSVYDLMK 1329.66 DYAGGFSSALITK 1750.90 DTIFIDSSTISPDLVK 1891.93 QGLDANVFAEIINSSTGR 2289.22 DLGLASGVANASNSPIPLGSLAHK	CG 15093	0034390
4609	50.4/7.15	25/63.3	989.47 YYGAQTMR 1124.57 VESDTFGELK 1389.74 SQINFPIGGATER 1791.99 VYELALGGTAVGTGLNTR 2027.10 DAMVEVHGVLNTIAVSLMK 1746.91 TFIVQGFQVGLHTR	1(1) G0255	0028336
4703	61.0/8.58	20/37.7	1746.91 TFIVQGFQVGLHTR	GLUTAMATE DEHYDROGENASE Gdh	0001098
4721	59.3/9.09	17/35.0	1026.58 AVDSLVPPIGR 1438.84 GIRPAINVGLSVSR 2365.14 EVAFAQFGSDLLAATQQLNR	BELLWETHER (blw) ATP SYNTHASE ALPHA	0011211
4802	80.4/7.56	21/29.3	855.48 WPIIGNR 1205.68 VIFFLPWQR 1290.69 AILGLDLEQYR 1599.80 IHPEFPYIDAEIR 1858.86 SFGDGDVSGEQLHEILR	CG 8256 1(2) K05713	0022160
5401	30.5/6.44	20/86.0	1505.77 VNNASQVGLGYQQK	PORIN	0004363

^a N = Number of matched peptides. ^b % = Coverage of full length protein by tryptic peptides.

were purified by NiTA chromatography (Clontech, Palo Alto, CA) and injected into a New Zealand White rabbit. The rabbit serum was tested by immunostaining as described below.

9. Immunoblotting. Proteins resolved by 1-D gels were transferred onto nitrocellulose filters at 130 mA for 6 h, and the filters incubated for 120 min at room temperature in PBS containing 10% bovine serum and α -mitochondrial matrix precursor diluted to 1:100. They were then incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) for 120 min in the same buffer and immunocomplexes visualized with diaminobenzidine as substrate.

10. Immunostaining of Imaginal Disks. Standard procedures were used for whole-mount immunohistochemistry.¹⁴ Imaginal disks were stained as described.¹⁵ The α -Hsp60 was used at a 1:2000 dilution in all experiments. Topro was also used to stain nuclei, and Alexa Fluor-488 (Molecular Probes) to detect the primary antibody.

11. Microscopy and Image Treatment. Imaginal disks were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Inc). Images were acquired with a BioRad 2000 confocal microscope and treated with Metaview (Universal Imaging) and Photoshop 7.0 (Adobe Corp.) software. We captured at least 45 planes of the imaginal disks, and later merged planes corresponding to different surfaces of the imaginal disks.

Results

Isolation of Mitochondrial from *Drosophila* Third Instar Larvae. Figure 1 summarizes the method used to purify mitochondria from third instar larvae of *Drosophila melanogaster*. We obtained a yield of 5 mg of mitochondrial protein after homogenizing 5000 third instar larvae. The progress of purification was followed Western blotting with a polyclonal antibody against the mitochondrial matrix protein P1 precursor (Figure 1B). We identified this polypeptide some years ago as IEF 16 in our manual database¹⁶ and have generated an antibody against the denatured peptide (see Materials and Methods). The intensity of the Western bands was 40 times greater in the purified mitochondria than in the initial homogenate. The functional integrity of the purified mitochondria was evaluated by assaying citrate synthase and the individual

complexes of the respiratory chain. Specific activities in the final preparation were always at least 50 times higher than in the initial homogenate. Finally, the structural integrity of the purified mitochondria was confirmed by electron microscopy. Figure 1C shows a small but representative field in which one can see that the majority of mitochondria are intact.

General Pattern of Mitochondrial Protein of *Drosophila*. Four hundred micrograms of mitochondrial protein obtained as described above was lyophilized, resuspended in lysis buffer and analyzed by 2D gel electrophoresis. Figure 2 shows a representative 2-D gel of the silver stained acidic polypeptides of the mitochondria of mature larvae. Gels were analyzed with the PDQUEST system, and each polypeptide was assigned a number in the database. In this way we compiled a database of 231 silver stained polypeptides (143 acidic, IEF and 88 basic, NEPHGE). This constitutes our reference mitochondria database.

Isolation of Proteins for MALDI-TOF. After calibration with Coomassie blue-stained 2-D gels, we ran preparative gels with precise amounts of purified mitochondria from third instar larvae. After staining we picked some of these spots and subjected them to in-gel digestion with trypsin and MALDI-TOF analysis. By this approach we were able to identify 66 spots (44 acidic and 22 basic) in the preparative gels of the database. In all cases analyzed, we were able to confirm the information obtained from the peptide mass fingerprinting by tandem mass spectrometry. A total of 248 MS/MS spectra were analyzed. All the mitochondrial proteins identified in this study are listed in Tables 1 and 2, ordered by SSP number. Molecular weight, isoelectric points, names, identified sequence tags and Flybase accession numbers are also included. As an example, Figure 3A shows, the MALDI-TOF spectrum of the tryptic digest of basic polypeptide SSP 3813 identified as aconitase, and Figure 3B reproduces a detail of the fragmentation spectrum of peak 1457.77 corresponding to the polypeptide IPFNVTGSEQIR.

Mitochondrial Pattern in Imaginal Disks. We generated an antibody against a native mitochondrial protein in order to use it as a cytological marker. Heat shock protein 60 (SSP 8705 in the database) was selected for that purpose and Figure 4 illustrates the specificity of the antibody using the third instar

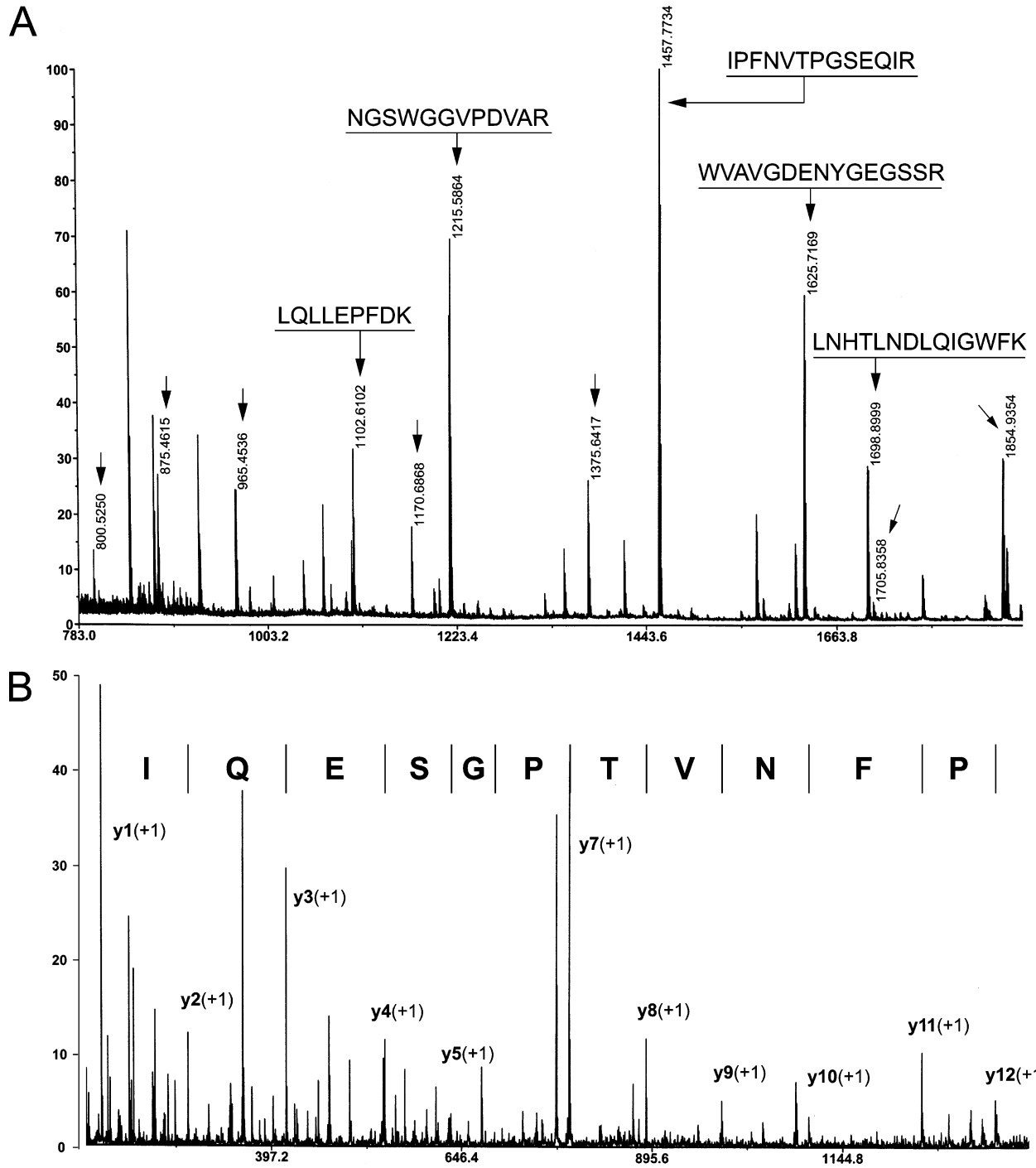


Figure 3. (A) MALDI-TOF MS spectra of the tryptic digest of basic polypeptide SSP 3813. The labeled peaks represent 12 of the 25 peptides matched to *Drosophila melanogaster* aconitase. Some of the peptides analyzed by MALDI-TOF/TOF MS are also indicated with its sequences underlined. (B) A detail of the MS/MS spectrum of peptide 1457.71 Da, matched to the sequence IPFNVTPGSEQIR.

wing imaginal disks, the structure generally used by us as a model. Topro (blue channel) was used to stain nuclei, and it is possible to see well-defined zones of mitochondrial staining (green channel) surrounding the nuclei, both in the epithelial cells (Figure 4A) and in the peripodial epithelium (Figure 4B). The diameters of these cells are highly variable, ranging from the large flat cells of the squamous peripodial epithelium (20–30 μm in diameter) (Figure 4D) to the tall, narrow cells of the columnar epithelium (2–6 μm in diameter) (Figure 4C). Figure 4E,F shows the transverse views of the two epithelial layers making up the disk. The mitochondria are clearly concentrated

toward the apical surface of these cells. Our antibody stained the mitochondria of the salivary glands, central nervous system and all the imaginal disks of third instar larvae and pupae (data not shown).

Discussion

The aim of this study was to create a protein map of the mitochondria of *D. melanogaster* that can serve as reference database for further studies. The present experimental approach has enabled us to identify 66 spots by peptide mass fingerprinting, and to identify them from their MS/MS spectra

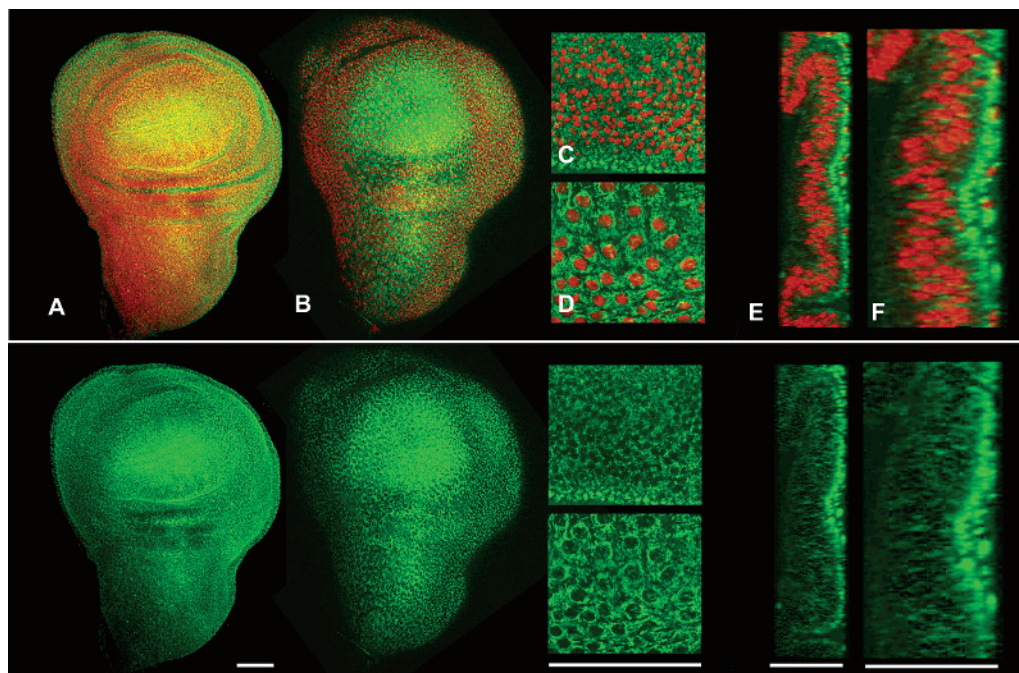


Figure 4. Expression of mitochondrial hsp60 in third instar *Drosophila melanogaster* wing imaginal disks. A, C, and E: general (A), detailed (C) and transverse (E) views of epithelial cells. B, D, and F: general (B), detailed (D) and transverse (F) views of the peripodial epithelium. In all cases expression of hsp60 is shown in the green channel while topro is shown in the blue channel. White bar = 100 μm .

in the *Drosophila* mitochondrial proteome. Tables 1 and 2 list the polypeptides identified in the database and include the corresponding accession numbers in the *Drosophila* genome database (<http://flybase.bio.indiana.edu>), which is possibly the most complete currently available database of any eukaryotic organism, with extensive genetic and molecular information about each polypeptide.

The 66 identified spots represent 28.5% of the 231 polypeptides recorded in the database, but in some cases the same protein was found in several spots. Such multiple spots could stem from highly similar isoforms or, most probably, post-translational modifications. Five instances where two spots contained the same polypeptide were detected among the acidic gels: heat shock protein 60 (hsp60), I(1)G0030, I(1)G0334, CG 3902, and CG 3731. Another five instances where two spots contained the same polypeptide were detected on the acidic and basic gels: aconitase, Rieske iron-sulfur protein, Pdsw, adenylate kinase-2 and CG 15093. Finally, we detected five instances where three spots contained the same polypeptide: ATP synthase beta chain, CG 3752, Porin, I(1)G0255 and glutamate dehydrogenase. In summary, this means that the identified spots actually represent 46 different protein species. We detected only one protein fragment, corresponding to acidic polypeptide SSP 9405, a fragment of the ATP synthase beta fragment. The other 65 identified spots were full-length polypeptides.

Mitochondria contain their own DNA (mtDNA), a covalently closed duplex of about 19 500 base pairs. *Drosophila* mtDNA encodes thirteen hydrophobic polypeptides, which have been identified as subunits of enzyme complexes associated with the inner mitochondrial membrane, a large and small ribosomal RNA and 22 transfer RNAs.¹⁷ The nuclear genes encoding the polypeptides identified in this study mapped over the four *Drosophila* chromosomes in proportions consistent with the

sizes of the latter: 20 polypeptides on chromosome 2, 17 on chromosome 3, 7 on the X chromosome and 2 on chromosome 4.

All mitochondrial locations are represented by the identified polypeptides. The mitochondrial inner membrane is most highly represented with 22 polypeptides, followed by mitochondrial matrix with 21 polypeptides, the mitochondrial outer membrane with two polypeptides and the intermembrane space with one. These data thus validate our methods of sample preparation and extraction.

In most of the analyzed cases, experimental M_r values were in good agreement with the theoretical values. In contrast, the apparent pI values of the proteins tended to be more acidic than predicted, suggesting that the detected polypeptides were highly phosphorylated.

The proteins identified cover a wide spectrum of biological functions. For example, 17 are involved in oxidative phosphorylation (7 in Complex I: NADH ubiquinone oxidoreductase, 4 in Complex III: ubiquinol-cytochrome C oxidoreductase, 1 in Complex IV: cytochrome c oxidase and 5 in Complex V: F₀/F₁ ATP synthase). Nine are involved in carbohydrate metabolism (6 in the tricarboxylic acid pathway and 3 in pyruvate metabolism). Five are involved in amino acid metabolism and four in the metabolism of complex lipids (one in glycerolipid metabolism and three in fatty acid metabolism). Two are involved in nucleotide metabolism and one in DNA metabolism. Three are involved in protein manipulations (one in protein folding and stabilization, one in protein translocation and one in proteolysis). Two are involved in transport and one in cell defense. Finally, one is involved in larval development and another, NEPHGE SSP 3708, is of unknown function. The major benefit of these database is to provide a comprehensive resource for the discovery of novel mitochondrial functions and pathways in *Drosophila*. The database could also be used in

future to analyze the protein alterations associated with mitochondrial diseases. The antibody against native mitochondrial heat shock protein p60 generated in this study, may be a useful complementary tool in such work. For example, it revealed a specific apical localization for the organelles in cells of the wing imaginal disk (Figure 4).

Acknowledgment. We thank Dr. Miguel Angel Martín for his help in measuring mitochondrial enzyme activities. J. A. is the recipient of a predoctoral fellowship of the Universidad Autónoma de Madrid. L.A.B-L is a fellow student of Consejo Superior de Investigaciones Científicas in collaboration with PACISA-GIRALT (I3P-BPD2002-1). This work was supported by Grant PB87-0449 from Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica and by an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

References

- (1) Duncan, R.; McConkey, E. H. How many proteins are there in a typical mammalian cell? *Clin. Chem.* **1982**, *28*, 749–755.
- (2) Balaban, R. S.; Nemoto, S.; Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* **2005**, *120*, 483–495.
- (3) Scharfe, C.; Sacaría, P.; Hoertnagel, K.; Jaksch, M.; Klopstock, T.; Lill, R.; Prokisch, H.; Gerbitz, K. D.; Mewes, H. W.; Meitinger, T. MITOP: database for mitochondria-related proteins, genes and diseases. *Nucl. Acids Res.* **1999**, *27*, 153–155.
- (4) Millar, A. H.; Sweetlove, L. J.; Giege, P.; Leaver, C. J. Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 1711–1727.
- (5) Pflieger, D.; Le Caer, J. P.; Lemaire, C.; Bernard, B. A.; Dujardin, G.; Rossier, J. Systematic identification of mitochondrial proteins by LC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2400–2406.
- (6) Sickmann, A.; Reinders, J.; Wagner, Y.; Joppich, C.; Zahedi, R.; Meyer, H. E.; Schonfisch, B.; Perschil, I.; Chacinska, A.; Guiard, B.; Rehling, P.; Pfanner, N.; Meisinger, C. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 13207–13212.
- (7) Mukhida, K.; Kobayashi, N. R.; Mendez, I. A novel role for parkin in trauma-induced central nervous system secondary injury. *Med. Hypotheses.* **2005**, *64*, 1120–1123.
- (8) Madden, E. A.; Storrie, B. The preparative isolation of mitochondria from Chinese hamster ovary cells. *Anal. Biochem.* **1987**, *163*, 2350–2357.
- (9) Navarro, S.; Del Hoyo, P.; Campos, Y.; Abitbol, M.; Moran-Jimenez, M. J.; Garcia-Bravo, M.; Ochoa, P.; Grau, M.; Montagu-telli, X.; Frank, J.; Garesse, R.; Arenas, J.; de Salamanca, R. E.; Fontanellas, A. Increased mitochondrial respiratory chain enzyme activities correlate with minor extent of liver damage in mice suffering from erythropoietic protoporphyria. *Exp. Dermatol.* **2005**, *14*, 26–33.
- (10) O'Farrell, P. H. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007–4021.
- (11) O'Farrell, P. Z.; Goodman, H. M.; O'Farrell, P. H. High-resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **1977**, *12*, 1133–1142.
- (12) Alonso, J.; Santarén, J. F. Proteomic analysis of wing imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Proteomics*, **2005**, *5*, 474–489.
- (13) Scevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850–858.
- (14) Gisselbrecht, S.; Skeath, J. B.; Doe, C. Q.; Michelson, A. M. heartless encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* **1996**, *10*, 3003–3017.
- (15) Baena-López, L. A.; García-Bellido, A. Genetic requirements of vestigial in the regulation of *Drosophila* wing development. *Development* **2003**, *130*, 197–208.
- (16) Santarén, J. F.; Van Damme, J.; Puype, M.; Vandekerckhove, J.; García-Bellido, A. Identification of *Drosophila* wing imaginal discs proteins by two-dimensional gel analysis and microsequencing. *Exp. Cell Res.* **1993**, *206*, 220–226.
- (17) Garesse, R. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations. *Genetics* **1988**, *118*, 649–663.

PR050130C

The Orientation of Cell Divisions Determines the Shape of *Drosophila* Organs

Luis Alberto Baena-López, Antonio Baonza, and Antonio García-Bellido*

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
Edificio Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid
CX-504
28049 Madrid
Spain

Summary

Organ shape depends on the coordination between cell proliferation and the spatial arrangement of cells during development [1–3]. Much is known about the mechanisms that regulate cell proliferation, but the processes by which the cells are orderly distributed remain unknown. This can be accomplished either by random division of cells that later migrate locally to new positions (cell allocation) [4] or through polarized cell division (oriented cell division; OCD). Recent data suggest that the OCD is involved in some morphogenetic processes such as vertebrate gastrulation [5], neural tube closure [6], and growth of shoot apex in plants [7]; however, little is known about the contribution of OCD during organogenesis. We have analyzed the orientation patterns of cell division throughout the development of wild-type and mutant imaginal discs of *Drosophila*. Our results show a causal relationship between the orientation of cell divisions in the imaginal disc and the adult morphology of the corresponding organs, indicating a key role of OCD in organ-shape definition. In addition, we find that a subset of planar cell polarity genes is required for the proper orientation of cell division during organ development.

Results and Discussion

Drosophila imaginal discs are a classical model system for studying general mechanisms involved in the control of organ growth and patterning [8]. The imaginal discs are epithelial structures that originate from the embryonic ectoderm, and, after a period of cell proliferation during the larval stages, give rise to most adult organs [8]. The wing disc is divided into lineage units known as compartments [9]. The boundaries between compartments play a key role in the control of wing disc growth and patterning [10]. Analysis of mitotic recombination clones in animals and plants allows for tracing the descendants of single marked cells during development [1, 2, 11]. These experiments have shown a clear correlation between the shape of the clones and adult morphology of the organ where the clones are studied, i.e., clone growth defines organ shape [1, 2, 11]. Most clones in the wing blade are very elongated and grow along the proximal-distal (P/D) axis of the

wing, perpendicular to the D/V border (Figures 1A–1D, arrowhead) [1, 2]. In contrast, clones within the wing margin grow along the D/V border (Figures 1B and 1C, arrow) [1, 2]. We have considered the dorsal-ventral (D/V) boundary (Figure 1B) as a reference to measure the orientation of cell divisions during wing disc development (see Supplemental Experimental Procedures available with this article online). We observe a striking relationship between the shape of the clones (Figure 1B) and the orientation of cell divisions (Figure 1E and Figures S1A and S1B). Thus, the majority of cells divide along the proximal-distal (P/D) axis of the wing blade (Figures 1B and 1F); 59.4% ($n = 549$) of mitoses form angles higher than 55° with respect to the D/V boundary, while only 13.8% are lower than 35° (Figure 1H). In contrast, in the wing margin, most cells divide nearly parallel to the D/V boundary (Figures 1B and 1G), forming angles lower than 35° (71.4%; $n = 70$) (Figure 1H). Furthermore, the characteristic shape of each intervein region (Figures 1A and 1B and Figure S1C) [1, 2, 4] is also reflected in the cell-orientation patterns. Thus, 65.8% ($n = 116$) of the mitotic figures studied in intervein regions C and D, where clones are very elongated and grow perpendicular to the wing margin, are nearly perpendicular to the D/V border (Figures S1D and S1F), whereas in regions A and E, where clones are wider and grow parallel to the D/V border, only 50.3% of mitoses ($n = 81$) have this orientation (Figures S1E and S1F).

Early-induced clones also show an elongated shape along the P/D axis of the wing [1]. Accordingly, most of the cell divisions in the second instar wing discs appear with a P/D orientation (Figures 1I and 1J). In everted wings in pupae, most cells also divide preferentially along the P/D axis [12], indicating that the correlation between the orientation of cell divisions and the shape of the clones is maintained throughout development [1, 2].

Interestingly, the orientation of postmitotic daughter cells, analyzed in clones of two cells (Figure 1J), conserve the positions determined by the angle of the OCD (Figure 1K). The orientation of the first cell division tends to be maintained in subsequent divisions, since we observe that 57% ($n = 121$) of clones of four cells form straight lines of one cell width. Although these results suggest that the cell relocation plays a minor role to define the clone shape, we can not rule out that this process might refine clone shapes and therefore organ shape. Finally, we suggest that the width of the clones mainly depends on the general probability of OCD.

To evaluate the general requirement of OCD in organogenesis, we analyzed the patterns of mitotic orientation in other wing disc regions. The thorax shows an isodiametric morphology, and mitotic recombination clones grow isodiametrically (Figure 2A) [2]. Accordingly, we failed to find any preferential orientation of the planar axes of cell divisions (Figures 2B and 2C). In the peripodial epithelium, we also observe that the orientation of cell divisions (data not shown) define the characteristic shape of the clones [2]. As in the wing blade,

*Correspondence: agbellido@cbm.uam.es

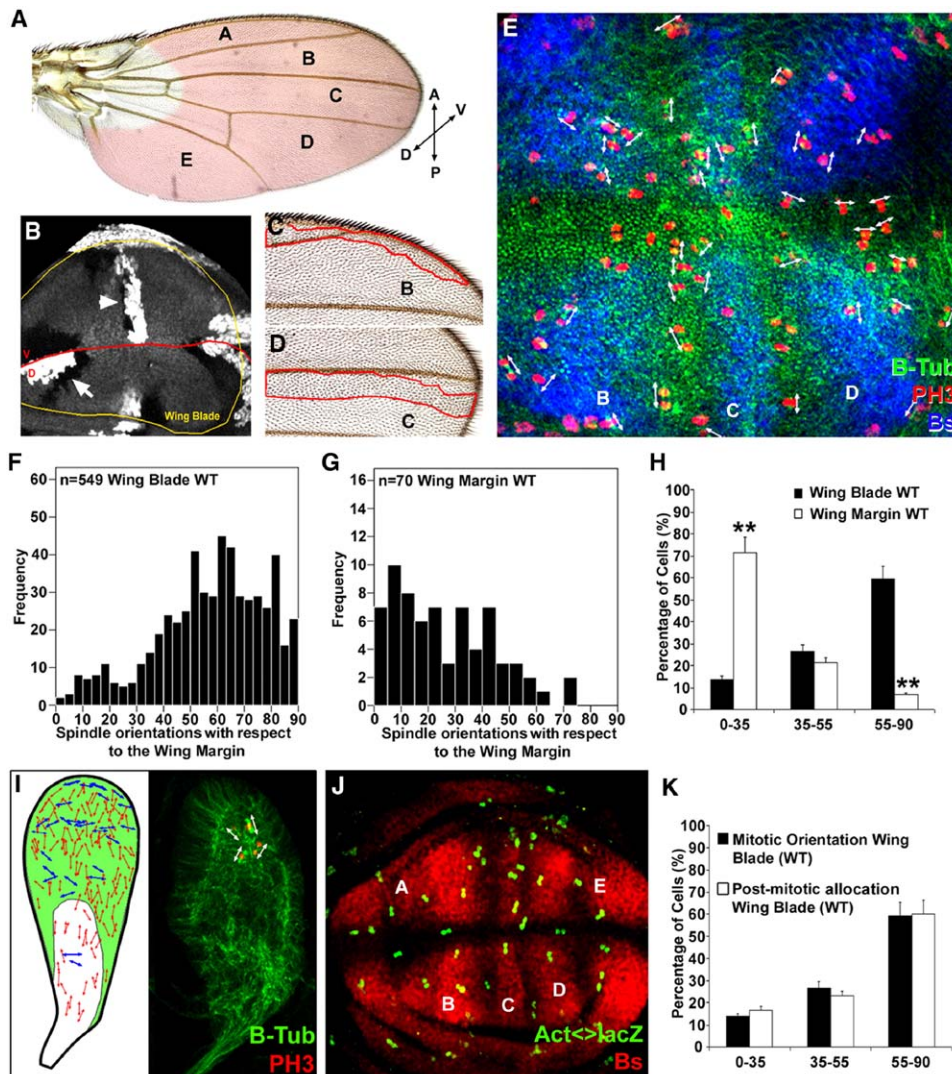


Figure 1. Oriented Cell Divisions Determine the Elongated Shape of the Wing Blade

(A) Adult shape of wing blade (red shadow), intervein territories are named A, B, C, D, E. The cross indicates anterior-posterior (A/P) and dorsal-ventral (D/V) compartments.

(B–D) Clones near the D/V border (red line) grow along the wing margin (C) (arrow in [B]), while in other territories grow preferentially perpendicular to it (D) (arrowhead in [B]). Clones are marked by the absence of GFP and twin spots have two copies of GFP.

(E) Cell divisions in different regions of the wing blade (*blistered* expression in blue marks intervein regions) and other figures of this paper are assessed using phospho-Histone3 (PH3) (red) and β -tubulin (Btub) (green).

(F–H) Quantitative analyses of cell orientations with respect to the wing margin in the wing discs are summarized in histograms (F, G) and a bar plot (H). In bar plot and similar plots of this paper, the angles of cell divisions are grouped in three categories (0°–35°, 35°–55°, 55°–90°), and the significance ($p < 0.01$) of Student's t test is indicated as double asterisk.

(I) Plot of mitotic orientation in second instar wing discs, where green shadow highlights the presumptive wing territories.

(J) Disposition of daughter cells (green nuclei) in clones in the wing blade (*bs* in red).

(K) The postmitotic cell relocation is compared with the mitotic orientation in the wing blade in the bar plot. In all panels, error bars indicate the SD from two independent experiments.

postmitotic cells show the same orientation of previous cell divisions (Figure S1G).

The general requirement of the OCD in the definition of wing disc morphology led us to study the contribution of this process to the development of other organs. We analyzed the pattern of cell-division orientations during eye disc development. The dorsoventral midline of the *Drosophila* eye is known as the equator and defines a line of mirror-image symmetry, with ommatidia

on each side having opposite chirality [13]. This clonal boundary also plays an important role in the patterning and growth of the eye [13, 14]. Clones in the eye grow symmetrically oblique with respect to the equator (Figure 2D) [15]. During eye development, an indentation known as the morphogenetic furrow (MF) marks the front of a wave of differentiation that sweeps from posterior to anterior across the disc (Figure 2D, arrowheads) [13, 16]. We monitored the orientation of cell di-

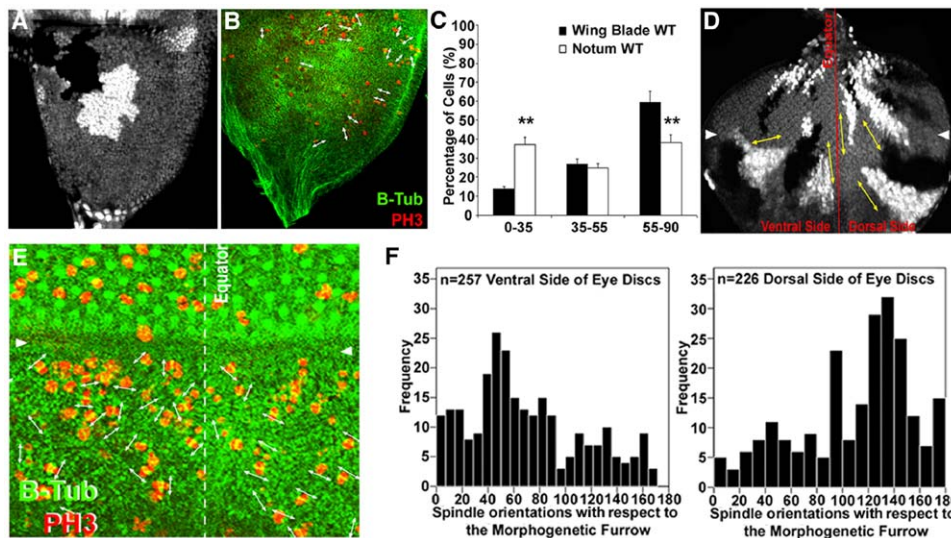


Figure 2. Clones in the Thorax and Eye Imaginal Disc

(A) Isometric growth of clones in the notum. Clones are marked as in Figure 1. (B and C) The distribution of the orientation of cell divisions in the notum is random compared with the wing blade. Error bars indicate the SD from two independent experiments. (D) Clones in the eye disc grow symmetrically on both sides of the equator (red line). (E) The symmetry of clonal growth on both sides of eye imaginal discs is correlated with the orientation of cell divisions. (F) Histograms showing the orientation of cell divisions in the eye discs; we used angles between 0° and 180° counterclockwise with respect to the MF.

visions with respect to the MF in the region anterior to the furrow (Figure 2E). The orientation of mitotic spindles in most mitotic figures in the ventral half of the eye discs form angles between 40° and 60°, whereas in the dorsal half, they form angles between 120° and 140° (Figure 2F). In the eye disc, the postmitotic cell allocation again reflects the orientation of mitosis (Figure S1H). We also tried to measure the orientation of cell divisions in a tube-shaped organ like the leg, but the highly folded epithelial organization of these discs prevented us from reaching any clear conclusion. However, clones in the adult legs appear narrow, running proximodistally over several joints [2]. The results indicate that the OCD may be a general mechanism to generate shape during organogenesis.

One interesting group of genes involved in the orientation of cell divisions during *Zebrafish* gastrulation [5] and growth of shoot apex in *Arabidopsis* [6] are planar cell polarity (PCP) genes. The function of these genes is evolutionary conserved to define the polarity and positional information of the cells within an epithelium [17]. Mutations in the *Drosophila* PCP genes *dachsous* (*ds*) and *fat* (*ft*) cause changes in the shape of different organs: wings (Figure 3A and Figure S2A) [18–20] and eyes (Figure 4 and data not shown) [21] are rounder than the wild-type (Figure 1A and data not shown), whereas legs are wider and shorter (data not shown) [18–20]. The activity of these genes is required upstream of other PCP genes [17] that do not affect adult organ shape such as the core PCP genes [17] *strabismus* (*sbm*), *prickled* (*pk*), and *flamingo* (*fmi*) or the effector PCP gene *multiple wing hair* (*mwh*) (data not shown). We analyzed whether the abnormal organ shapes, observed in *ds* and *ft* mutant backgrounds, are associated with changes in the clone shape and the orientation of cell division.

Mitotic recombination clones in *ds* mutant wing discs show rounded shapes, losing the elongated shape of wild-type clones (Figure 3B). Interestingly, loss-of-function clones for *ds* or *ft* fail to adopt their typical enlarged shape in the wing blade or in the eye, showing a rounder shape than wild-type clones (Figures S2A and S2B and data not shown). In contrast to control wing discs and wild-type clones, we observe that the orientation of cell divisions is randomized in *ds* mutant cells (wing discs or *ds* mutant clones) (Figures 3C–3F and Figures S2A–S2C). Accordingly, postmitotic cells do not show any preferential orientation (Figure S2D). The rounded shape and disturbed OCD is also observed in clones of *ds*- or *ft*-expressing cells (Figure S2E) and in adult wings where *ds* or *ft* is ectopically expressed using the UAS/G4 system [22] (Figures S2F and S2G and data not shown). Similar results are observed in the eye imaginal discs (compare Figure 4 with Figures 2E and 2F). These results suggest that the polarization cues mediated by PCP genes are required for the control of the orientation of cell division and, therefore, are involved in organ shape definition. Our findings show that some of the genes required for PCP are acting in early stages of the development, suggesting that the base for PCP may be established during larval development [23]. The conserved function of PCP genes controlling OCD in different organisms [5, 24] suggests that this process might be an evolutionary mechanism in organ shape definition. Although the mechanistic details underlying the new functions of PCP genes are unknown, it is likely that the asymmetric cell distribution of a classical core of PCP proteins is not required. Finally, we observed similar phenotypes in both the lack and excess of function for *ds* and *ft*, suggesting that the default organ shape is circular when the cell polarization is disrupted.

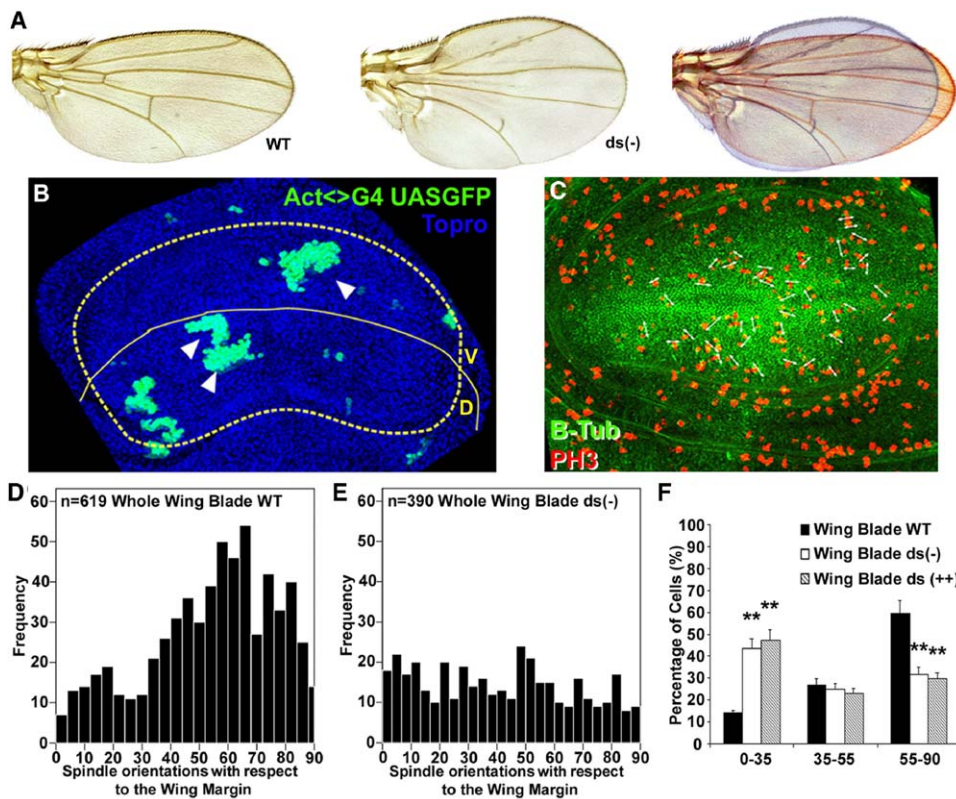


Figure 3. The Lack or Excess of *ds* Changes the Shape of Wing Imaginal Discs

(A) Mutant wings for *ds* are shorter and wider than wild-type.

(B) Mitotic recombination clones (green) in mutant *ds*^{D36}/*ds*^{UA071} background show rounded shapes.

(C) The preferential orientations of cell divisions observed in controls (Figure 1E) is lost in *ds*^{D36}/*ds*^{UA071} wing discs.

(D–F) Distribution of the orientation of cell divisions in control (D) and *ds*^{D36}/*ds*^{UA071} (E) discs. Bar plots summarize and compare mutant conditions for *ds* (*ds*^{D36}/*ds*^{UA071} or *SalG4*^{EPV}/*UAS-ds*^{GS}) with the wild-type (F). Error bars indicate the SD from two independent experiments (F).

To conclude, we propose that the shape of organs can be accounted for by the oriented pattern of cell divisions rather than postmitotic relocation of proliferating cells. However, how the preferential orientation is topologically determined is poorly understood. We speculate that the orientation of cell divisions in different territories during development may result from the integration of signals coming from restriction borders (major references to grow) and territorial local cell interactions. The existence of clusters of cell synchronized, in the same stage of the cell cycle, support the idea of a local control of cell proliferation [4]. We have found that the orientations of cell divisions in these clusters tend to be highly aligned (data not shown), suggesting also a local control of OCD superimposed to more general and long-range signals. Although the signals exchanged between neighboring cells to determine local OCD are still unknown, it is likely that a subset of PCP genes could be involved in this process.

Supplemental Data

Supplemental Data include two figures and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://www.current-biology.com/cgi/content/full/15/18/1640/DC1/>.

Acknowledgements

We are grateful to C. Extavour, J.F. de Celis, P. Lawrence, and S. Campuzano for reading and discussing this work and to R. Barrio,

C. Cruz, J.F. de Celis, I. Rodríguez, and S. Blair for sharing stocks. R. Hernández contributed with her skilful technical assistance. We also thank the Developmental Studies Hybridoma Bank for providing antibodies. This work was supported by grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica and an institutional grant from the F. Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. L.A.B.-L. is a fellow of Consejo Superior de Investigaciones Científicas in collaboration with PACISA-GIR-ALT (I3P-BPD2002-1), and A.B. is supported by the program Ramón y Cajal of MEC.

Received: June 16, 2005

Revised: July 19, 2005

Accepted: July 20, 2005

Published: September 20, 2005

References

- Gonzalez-Gaitan, M., Capdevila, M.P., and Garcia-Bellido, A. (1994). Cell proliferation patterns in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 46, 183–200.
- Resino, J., Salama-Cohen, P., and Garcia-Bellido, A. (2002). Determining the role of patterned cell proliferation in the shape and size of the *Drosophila* wing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7502–7507.
- Meyerowitz, E.M. (1997). Control of cell division patterns in developing shoots and flowers of *Arabidopsis thaliana*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 62, 369–375.
- Milan, M., Campuzano, S., and Garcia-Bellido, A. (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 640–645.
- Gong, Y., Mo, C., and Fraser, S.E. (2004). Planar cell polarity

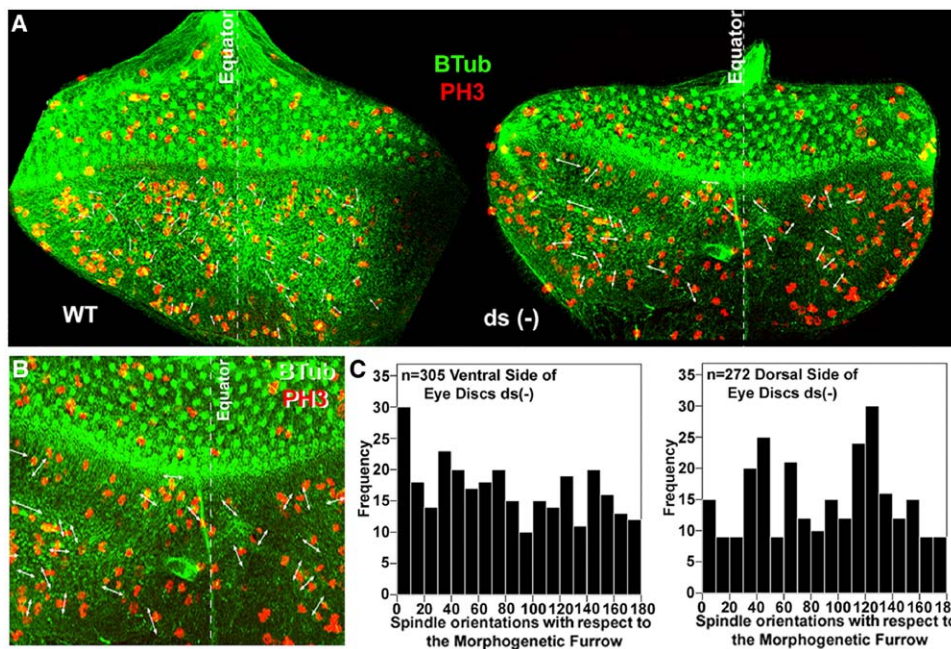


Figure 4. The Lack of *ds* Changes the Shape of Eye Imaginal Discs

(A) The shape of eye discs defective for *ds* (*ds*^{D36}/*ds*^{UA071}) is altered.

(B) The preferential orientations of cell divisions observed in controls (Figure 1E) is lost in *ds*^{D36}/*ds*^{UA071} eye discs.

(C) Distribution of cell orientation in mutant eye discs for *ds* (*ds*^{D36}/*ds*^{UA071}).

- signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* 430, 689–693.
- Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saude, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., and Wilson, S.W. (2000). *Silberblick/Wnt11* mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405, 76–81.
 - Reddy, G.V., Heisler, M.G., Ehrhardt, D., and Meyerowitz, E. (2004). Real-time lineage analysis reveals oriented cell divisions associated with morphogenesis at the shoot apex of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131, 4225–4237.
 - Cohen, S. (1993). *Imaginal Disc Development*, Volume II (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 - Garcia-Bellido, A., Ripoll, P., and Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat. New Biol.* 245, 251–253.
 - Blair, S.S. (1995). Compartments and appendage development in *Drosophila*. *Bioessays* 17, 299–309.
 - Dolan, L., and Poethig, R.S. (1998). Clonal analysis of leaf development in cotton. *Am. J. Bot.* 85, 315–321.
 - Hidalgard, S. (1956). Die Richtungen der Teilungsspindeln auf dem Puppenflügel von *Drosophila* im Verlaufe der mitosenperiode. *Biol. Zent. Bl.* 75, 17–27.
 - Wolf, T., and Ready, D. (1993). *Pattern Formation in the Drosophila Retina*, Volume II (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 - Dominguez, M., and de Celis, J.F. (1998). A dorsal/ventral boundary established by *Notch* controls growth and polarity in the *Drosophila* eye. *Nature* 396, 276–278.
 - Becker, H.J. (1966). Genetic and variegation mosaics in the eye of *Drosophila*. *Curr. Top. Dev. Biol.* 1, 155–171.
 - Ready, D.F., Hanson, T.E., and Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev. Biol.* 53, 217–240.
 - Fanto, M., and McNeill, H. (2004). Planar polarity from flies to vertebrates. *J. Cell Sci.* 117, 527–533.
 - Clark, H.F., Brentrup, D., Schneitz, K., Bieber, A., Goodman, C., and Noll, M. (1995). *Dachsous* encodes a member of the cadherin superfamily that controls imaginal disc morphogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev.* 9, 1530–1542.
 - Rodriguez, I. (2004). The *dachsous* gene, a member of the cadherin family, is required for Wg-dependent pattern formation in the *Drosophila* wing disc. *Development* 131, 3195–3206.
 - Garoia, F., Guerra, D., Pezzoli, M.C., Lopez-Varea, A., Cavicchi, S., and Garcia-Bellido, A. (2000). Cell behaviour of *Drosophila fat* cadherin mutations in wing development. *Mech. Dev.* 94, 95–109.
 - Garoia, F., Grifoni, D., Trotta, V., Guerra, D., Pezzoli, M.C., and Cavicchi, S. (2005). The tumor suppressor gene *fat* modulates the EGFR-mediated proliferation control in the imaginal tissues of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.* 122, 175–187.
 - Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
 - Lawrence, P.A., Casal, J., and Struhl, G. (2004). Cell interactions and planar polarity in the abdominal epidermis of *Drosophila*. *Development* 131, 4651–4664.
 - Walston, T., Tuskey, C., Edgar, L., Hawkins, N., Ellis, G., Bowerman, B., Wood, W., and Hardin, J. (2004). Multiple Wnt signaling pathways converge to orient the mitotic spindle in early *C. elegans* embryos. *Dev. Cell* 7, 831–841.

The Orientation of Cell Divisions Determines the Shape of *Drosophila* Organs

Luis Alberto Baena-López, Antonio Baonza,
and Antonio García-Bellido

Supplemental Experimental Procedures

Fly Strains

All fly strains are described at <http://flybase.bio.indiana.edu> unless otherwise indicated. The $salG4^{EPV}$ (gift from C. Cruz and R. Barrio) was constructed from the sal^{EPV} enhancer (its expression is restricted to sal territories of the wing) [S1]. $UAS-ds^{GS}$ (gift from J.F. de Celis) is a $UAS-EPV$ transposable insertion that induces stronger pheno-

types than the $UAS-ds$ construct [S2]. The null allele for ds^{D36} and $UAS-ft$ was provided by I. Rodríguez [S3] and S. Blair [S4], respectively. Loss-of-function genotypes were ds^{D36}/ds^{UA071} (Figures 3 and 4 and Figure S2E), ft^{18}/ft^{18} , pk^1/pk^1 , and $stbm^6/stbm^6$, fmi^3/fmi^3 , mwh^1/mwh^1 (data not shown). Overexpression genotypes were $salG4^{EPV}/UAS-ds^{GS}$ (Figures S2A and S2B), $nubG4/UAS-ds^{GS}$ (data not shown), $salG4^{EPV}/UAS-ft$ (data not shown), and $nubG4/UAS-ft$ (data not shown). In all experiments, flies were raised at 25°C.

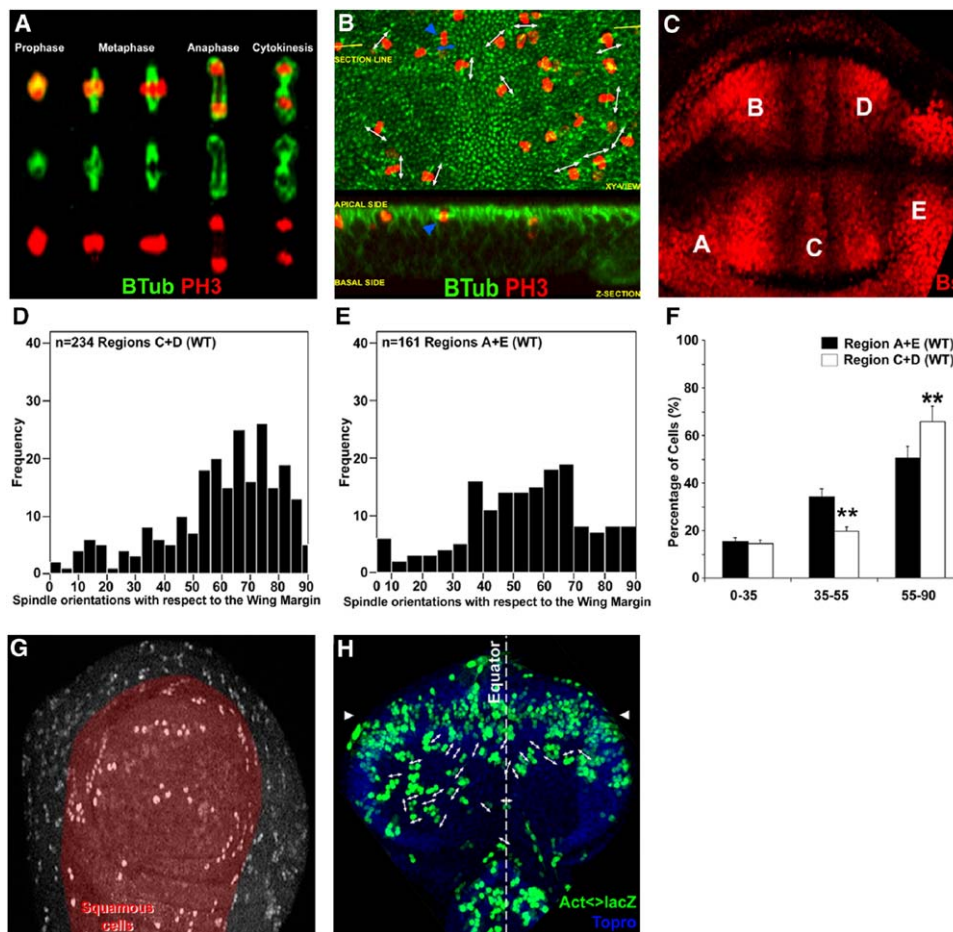


Figure S1. Mitotic Orientation and Postmitotic Cell Relocation of Cell Divisions in Imaginal Discs

(A) Phases of cell mitosis are revealed in imaginal discs of Supplemental Figures with β -tubulin (green, Btub) and phospho-Histone3 (red, PH3).

(B) In imaginal discs, proliferating cells divide in the apical side of the epithelium. Z-section is correlated with the section line (yellow line) in the XY view, whereas dividing cells are marked with blue arrowhead.

(C) Different vein and intervein territories of the wing blade are shown by *blistered* expression (red).

(D–F) In the central regions of the wing blade (C+D) (d), cells divide more perpendicularly than in lateral regions (A+E) (E). Comparative analysis of different interveins regions (F). In bar plot, the angles of cell divisions are grouped in three categories (0° – 35° , 35° – 55° , 55° – 90°), and the significance ($p < 0.01$) of Student's t test is indicated as double asterisk. Error bars indicate the SD from two independent experiments (F).

(G and H) Postmitotic cells in the peripodial epithelium (G) and eye imaginal (H) discs maintain the orientations of cell division. Clones of two cells in the peripodial epithelium (red shadow) are shown in white (G), while in the eye disc they are marked in green using arrows (H). Arrowheads signal the morphogenetic furrow (H). Nuclei of cells are stained with Topro in blue (H).

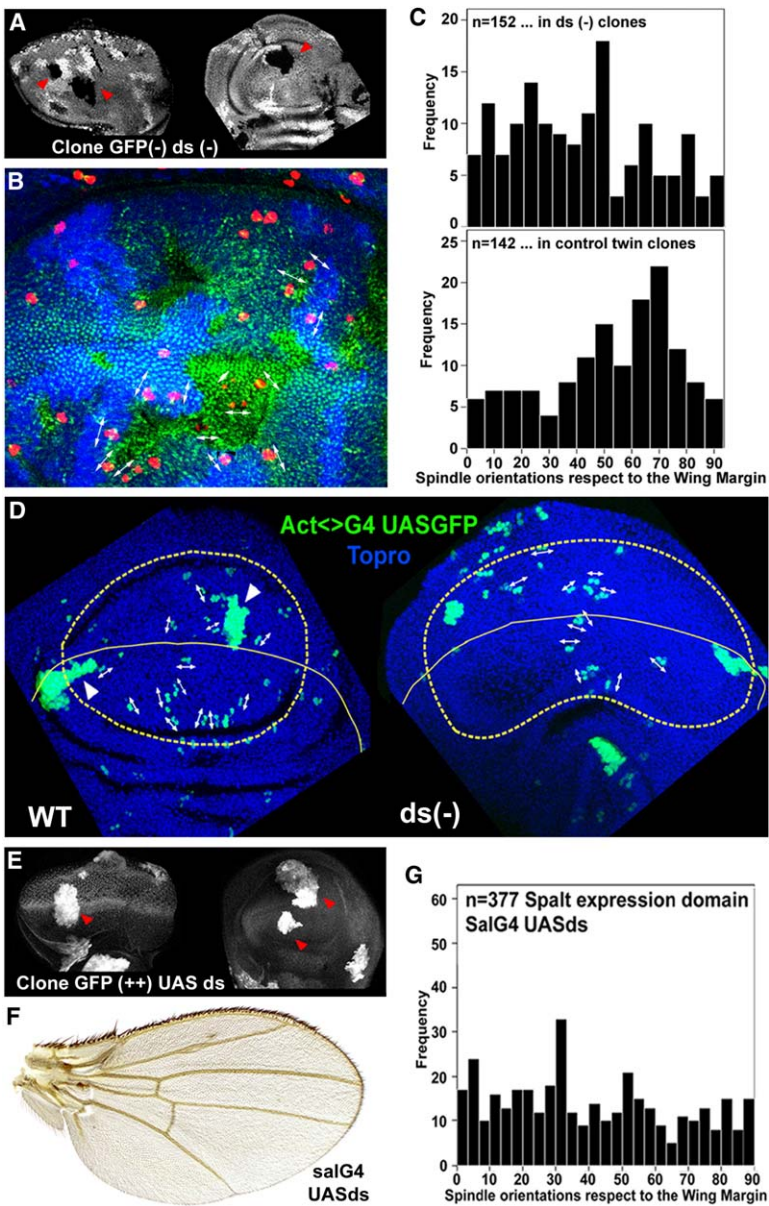


Figure S2. The Lack of or Excess of Function of *ds* Modifies the Orientation of Cell Division in the Imaginal Discs

(A) Loss-of-function clones of *ds*^{D36} (marked by the absence of GFP and red arrowheads) show a rounded shape.

(B and C) OCD is disrupted in loss-of-function clones of *ds*^{D36} (marked by the absence of GFP in blue) with respect to control twins (marked by 2xGFP in blue [B]). White arrows indicate mitotic figures stained with β -tubulin in green and PH3 in red (B).

(D) In contrast to the wild-type, postmitotic orientation (green and white arrows) is randomized in the wing blade mutant for *ds*^{D36}/*ds*^{UA071}.

(E) Clones of *ds*-expressing cells marked with UAS-GFP (red arrowheads in [D]) are more rounded than wild-type ones.

(F and G) Wings expressing *ds* under the control of SalG4^{EPV} are more rounded than wild-type (F) and show altered orientation of cell division in SalG4^{EPV} domain (G).

Immunohistochemistry

Rabbit anti- β galactosidase (Cappel), rabbit anti-phospho-Histone 3 (anti-PH3) (Upstate Biotechnology), mouse monoclonal anti-Blistered, mouse monoclonal anti-elav (Hybridoma Bank), and mouse anti- β -tubulin (Hybridoma Bank) were used as primary antibodies. Imaginal discs were immunostained using the standard procedures for confocal microscopy, except for costaining with double mouse primary antibodies. In this case, we used Zenon Tricolor Kit (Molecular Probes). To detect primary antibodies, we used Alexa Fluor-488-, -546- (Molecular Probes), or Cy5 (Jackson ImmunoResearch)-conjugated secondary antibodies.

Image Capture and Treatment

Images were acquired with a BioRad 2000 confocal microscope and analyzed with Metaview (Universal Imaging) and Photoshop 7.0 (Adobe) image programs. Z-stacks were collected for imaginal discs. At least 20 planes were acquired to separate those planes corresponding to the peripodial side and the proper epithelial side of imaginal discs. Later, planes containing cell divisions were pro-

jected in a flattened image. In flattened images the angle of mitotic spindles was calculated with respect to invariant references.

Analysis of Mitotic Spindle Orientation and Postmitotic Cell Allocation

Measurements of cell orientation were performed in all experiments using the same procedures. All imaginal discs were oriented with respect to the D/V boundary in the wing discs or the MF in the eye discs. Mitosis was detected by labeling cells with anti-PH3 and anti- β -tubulin. A line was drawn between the two daughter nuclei in late steps of mitosis and postmitotic cells or alternatively between the two centrosomes; later, the angle between this line and the references was calculated. 0° was fixed at the wing margin for wing discs and at the morphogenetic furrow for eye discs. In the wing discs, only angles between 0° and 90° were considered. In the eye imaginal discs, angles between 0° and 180° were considered, rotating them counterclockwise. To monitor clones of two or four cells, larvae were dissected 16 or 24 hr, respectively, after heat-shock induction. Statistical analysis and representations were performed using SPSS

12.0. At least two independent experiments were carried out for each different genotype. The standard deviation (SD) of two independent experiments is represented in error bars of bar plots.

Clonal Analysis and Genotypes

Cell lineages, gain-of-function, and loss-of-function clones were generated by the FLP/FRT technique [S4] using standard procedures. Genotypes of clonal analysis were: *w hsp70-flp; Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP/UAS-ds^{GS}* (Figure S2E) [S5]; *w hs-flp^{1,22}; FRT40A ds^{D36}/FRT40A Ubi-GFP* (Figures S2A–S2C) [S4]; *w hs-flp^{1,22}; FRT40A ft¹⁸/FRT40A Ubi-GFP* (data not shown) [S4].

To monitor cell divisions in *ds* mutant clones and control twins (Figures S2B and S2C), larvae were dissected 48 hr after heat-shock induction.

Genotypes of cell lineage analysis were: *w hs-flp^{1,22}; FRT40A +/FRT40A Ubi-GFP* (Figures 1B, 2A, and 2D) [S4]; *w hsp70-flp; Act FRT y+ FRT lacZ* (Figure 1J and Figures S1G and S1I) [S6]; *w hsp70-flp; Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP* (Figure S2D) [S7]; *w hsp70-flp; ds^{UAO71}/ds^{D36}; Act FRT y+ FRT Gal4 UAS-GFP* (Figure S2D) [S7].

Supplemental References

- S1. Barrio, R., and de Celis, J.F. (2004). Regulation of *spalt* expression in the *Drosophila* wing blade in response to the Decapentaplegic signalling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 6021–6026.
- S2. Matakatsu, H., and Blair, S.S. (2004). Interactions between Fat and Dachshous and the regulation of planar cell polarity in the *Drosophila* wing. *Development* *131*, 3785–3794.
- S3. Rodriguez, I. (2004). The *dachshous* gene, a member of the cadherin family, is required for Wg-dependent pattern formation in the *Drosophila* wing disc. *Development* *131*, 3195–3206.
- S4. Xu, T., and Rubin, G.M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* *117*, 1223–1237.
- S5. Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., and Yamamoto, D. (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* *124*, 761–771.
- S6. Struhl, G., and Basler, K. (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* *72*, 527–540.
- S7. Neufeld, T.P., de la Cruz, A.F., Johnston, L.A., and Edgar, B.A. (1998). Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* *93*, 1183–1193.