

Análisis funcional del gen *nab* en el desarrollo de
Drosophila melanogaster

Memoria presentada por

Javier Terriente Félix

Para optar al grado de Doctor en Ciencias
por la Universidad Autónoma de Madrid
Diciembre de 2006

Director de Tesis: Fernando Jiménez Diaz-Benjumea

Tutora de Tesis: Ana Ruiz Gómez

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
(CSIC-UAM)

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

"I should like to work like the archaeologist who pieces together the fragments of a lovely thing which are alone left to him. As he proceeds, fragment by fragment, he is guided by the conviction that these fragments are part of a larger whole which, however, he does not yet know."

Embryonic Development and Induction

Hans Spemann

(1938)

"The number of embryologist working on pattern formation has always been small and they have tended to be eccentric people."

The making of a fly

Peter Lawrence

(1992)

Cuando emprendas tu viaje hacia Ítaca
debes rogar que el viaje sea largo,
lleno de peripecias, lleno de experiencias.
No has de temer ni a los lestrigones ni a los cíclopes,
ni la cólera del airado Poseidón.
Nunca tales monstruos hallarás en tu ruta
si tu pensamiento es elevado, si una exquisita
emoción penetra en tu alma y en tu cuerpo.
Debes rogar que el viaje sea largo,
que sean muchos los días de verano;
que te vean arribar con gozo, alegremente,
a puertos que tú antes ignorabas.
Que puedas detenerte en los mercados de Fenicia,
y comprar unas bellas mercancías.
Acude a muchas ciudades del Egipto
para aprender, y aprender de quienes saben.
Conserva siempre en tu alma la idea de Ítaca:
llegar allí, he aquí tu destino.
Mas no hagas con prisas tu camino;
mejor será que dure muchos años,
y que llegues, ya viejo, a la pequeña isla,
rico de cuanto habrás ganado en el camino.
No has de esperar que Ítaca te enriquezca:
Ítaca te ha concedido ya un hermoso viaje.
Sin ella, jamás habrías partido;
mas no tiene otra cosa que ofrecerte.
Y si la encuentras pobre, Ítaca no te ha engañado.
Y siendo ya tan viejo, con tanta experiencia,
sin duda sabrás ya qué significan las Ítacas."

Ítaca
Konstantínos Kavafis

Agradecimientos

A Fernando por haber sido mi maestro. Espero que su dedicación y valiosos consejos, no sólo profesionales, hayan servido para convertirme en un científico riguroso y en una persona con criterio independiente.

A Ana Ruiz por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A David por aguantar con infinita paciencia todas mis preguntas por estúpidas que fueran, y, sobre todo, por saber responderlas. A Daniel porque sólo enseñando puedes saber cuánto conoces, y por su ayuda. A Marta Magariños, por ser tan maja y porque su experiencia nos ha sido de enorme utilidad.

A todos los moscólogos grandes y pequeños, por vuestra ayuda y consejos. Sin vosotros mi tesis hubiera sido aún más complicada de lo que ya ha sido. Un agradecimiento especial a Ginés Morata por su apoyo cuando más lo necesité. A Antonio Baonza y Joaquín Culí por demostrarme con su ejemplo que un moscólogo puede coger una pipeta y no perder la compostura. Y un recuerdo para los viejos roqueros Magali, Héctor, Paco, Anni, Marco, Pichón, Ainhoa, David F. e Inma, y a mis nuevas conquistas los Maculinos, incluida la abeja reina. Por las risas y bailes que nos hemos echado... y que nos echaremos.

A Juan Pablo Couso, porque en su laboratorio tome la confianza que necesitaba para seguir adelante. A Thomas Scheemann, porque su ayuda fue clave para iniciar esta carrera. A Santiago Carrillo, porque su ayuda fue vital cuando llegue.

A Dioni por ayudarme siempre que se lo pido y siempre con una sonrisa. Al resto de gente del CBM que me ha aportado su experiencia científica y vital.

A los Redondeles por ser mis amigos cuando era un pobre emigrante con maleta de cartón.

A Jose, Irene, Aitor, JuanFra y Laura por ser mi sostén en las largas horas que se pasan aquí, hacerme reír y ayudarme en todo... y un poco más. Aún nos quedan muchos cartuchos que disparar...

A mis Amigos, que son viejos amigos, Paco, Béril, Búlen, Arturo, Carlos, Paula, Sara, Mercedes, Santi, Belen y Lola. Ya me sois imprescindibles. A Alonso, Luisote, Ingrid y Zandu, porque la distancia ha dejado indemne

nuestra amistad. A Manolo y Virtu, porque con las amistades pasa como con los vinos, si son buenos con los años son mejores.

A mi familia nueva, por vuestro cariño y porque no habéis dudado de que era un buen hombre para vuestra Eva.

A Jose Carlos y Fuencis porque os quiero, y porque me disteis cobijo cuando más lo necesité. A mis primos hermanos, y también a sus cónyuges, por ser más hermanos que primos. A la Tata porque ha empezado una vida nueva, y eso no es tan fácil

A mi hermanita chica Paloma por demostrar que la inocencia mueve los corazones. A Anita, por ser tan buena hermana, y sobre todo por ser mi amiga del alma. Os quiero enanas.

A mis padres, por su apoyo continuo, por su amor incondicional, por su generosidad y por haberme dado las herramientas necesarias para ser libre.

Esta tesis va dedicada especialmente a mi mujer, Eva. Sin ti ningún esfuerzo hubiera valido la pena. Has sido un soplo de aire fresco que cada día sigue sorprendiéndome. Con tu amor y confianza se que puedo. Te alobiu mi niña.

No quiero dejar de recordar a mis abuelos, se que os hubierais sentido orgullosos de mi. Os echo de menos.

Indice

SUMMARY	1
ABREVIATURAS Y GLOSARIO	3
INTRODUCCIÓN	5
1. Prefacio	6
2. La identidad celular	7
3. La regulación genética	8
4. Los elementos reguladores	10
5. La maquinaria de transcripción	11
6. Complejo Activador y Represor	12
7. La familia de proteínas Nab	16
MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Materiales y Métodos Genéticos e Histológicos	22
1A. Medios de cultivo	22
1B. Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i> :	22
1C. Generación de nuevos mutantes <i>nab</i> :	22
1D. Análisis clonal:	23
1E. Detección inmunohistoquímica	24
1F. Hibridación <i>In situ</i> de ARN	26
1G. Adquisición y tratamiento de imágenes	27
1H. Generación de líneas transgénicas	28
2. Materiales y Métodos Bioquímicos	29
2A. Materiales y métodos básicos de manipulación de ADN	29
2B. Vectores	30
2C. Construcción de Plásmidos	30
2D. Purificación de las proteínas GST-Nab, GST y 6Xhis-Nab	33
2E. Generación de anticuerpos contra Nab	35
2F. Interacción proteína-proteína	35
2G. Mapeo de Inserciones EP	36
2H. Mapeo molecular de deficiencias <i>nabR#</i>	37
RESULTADOS	38
1. Desarrollo proximodistal del ala de <i>Drosophila melanogaster</i>	41
2. Mutagénesis de Expresión Ectópica	44
3. EP#13 mapea molecular y genéticamente en <i>nab</i>	46

4. <i>nab</i> se expresa en el ala hasta el límite distal del Anillo Interno de <i>wg</i> :	47
5. Caracterización de alelos de falta de función <i>nab</i>	49
6. <i>Nab</i> restringe la expresión de <i>wg</i> en el anillo interno	50
7. <i>nab</i> sólo afecta el elemento regulador del Anillo Interno de <i>wg</i>	51
8. <i>nab</i> depende de <i>vg</i>	53
9. Posible función de <i>zfh2</i> en la especificación de <i>nab</i>	54
10. <i>nab</i> no regula la expresión de <i>zfh2</i>	55
11. <i>nab</i> interacciona genéticamente con <i>rn</i>	56
12. Interacción genética <i>nab/rn</i> en el disco imaginal de ala	58
13. Homología entre las proteínas Rn, Roe y Sqz	59
14. Relación entre <i>nab</i> y <i>roe</i>	60
15. Desarrollo del Sistema Nervioso Central	62
16. Funciones de <i>sqz</i> en el desarrollo del SNC	64
17. Patrón de expresión de <i>nab</i> en el SNC	67
18. Patrón de expresión de <i>nab</i> en el grupo Tv embrionario	68
19. Patrón de expresión de <i>nab</i> en el grupo Tv larvario	69
20. <i>nab</i> colabora con <i>sqz</i> en la especificación del número de neuronas del grupo Tv	70
21. <i>nab</i> colabora con <i>sqz</i> en la activación de FMRFa en la neurona Tv	71
22. <i>nab</i> interacciona físicamente con Rn y Sqz a través del dominio C	72
23. <i>sqz</i> actúa en el desarrollo del ala como un posible represor de <i>rn</i>	74
24. dCtBP podría estar implicado en la función represora de Nab.	77
DISCUSIÓN	79
1. Nab funciona en el desarrollo mediante su interacción con Sqz y Rn	80
2. Papel de Nab en el desarrollo proximodistal del ala	80
3. El desarrollo proximodistal del ala	82
4. Papel de Nab en la especificación de destinos neurales en el SNC	84

5. Otras funciones de Nab en el desarrollo de Drosophila	85
6. Mecanismo molecular de la interacción de Nab con Rn y Sqz	86
7. Consideraciones finales	87
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXO	103

Summary

Nab proteins form an evolutionarily conserved family of transcriptional co-regulators implicated in multiple developmental events in various organisms. They lack DNA binding domains and act by associating with other transcription factors, but their precise roles in development are not known. In this project we analyze the role of *Nab* in *Drosophila* development. By employing genetic and molecular approaches we found that *nab* is required for proximodistal patterning of the wing imaginal discs and also for determining specific neuronal fates in the embryonic Central Nervous System.

We identified two targets of Nab: the products of the zinc finger-encoding genes *rotund* and *squeeze*. Both gene products belong to the Kruppel family, as the vertebrate partners of Nab: the EGR transcription factors. Nab is co-expressed with *squeeze* in a subset of neurons in the embryonic ventral nerve cord and with *rotund* in a circular domain of the distal-most area of the wing disc. Our results indicate that Nab acts as a co-activator of Squeeze, so is required to limit the number of neurons that express the LIM-homeodomain gene *apterous*, and to specify the Tv neuronal fate through the activation of the FMRFa neuropeptide. Conversely, Nab act as a co-repressor of Rotund in wing development, and is required to limit the expression of the gene *wingless/WNT* in the wing hinge, where Wg plays a mitogenic role. We demonstrate the requirement of *vg* in the activation of *nab* in the wing disk, and the limitation of its expression by *zfh2*.

We show by pull-down assays that Nab binds directly to Rotund and Squeeze via their conserved C-terminal domain. Going further in the molecular mechanism underling the repression of the targets of Rn by Nab, we show preliminary results that involve the general corepressor *dCtBP* as a possible partner of Nab.

Abreviaturas y Glosario

ADN: ácido desoxiribonucleico
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
pb: pares de bases
Kb: kilobases
T^a : Temperatura
nt : nucleótido
aa/s: aminoácido/s
ER: elemento regulador (*enhancer*)
ZF: dedos de zinc
SNC: sistema nervioso central
CNV: cuerda nerviosa central
AP: anteroposterior
DV: dorsoventral
PrD: próximodistal
AI: anillo interno
AE: anillo externo
MA: margen del ala
FTG: factores de transcripción generales
HAT: histona acetil transferasa
HDAC: histona deacetil transferasa

Introducción

1. Prefacio

Gran parte de los genes implicados en el desarrollo de *Drosophila melanogaster* están conservados evolutivamente. Un ejemplo de ello lo encontramos en los apéndices de vertebrados. Su desarrollo requiere la acción de los ortólogos de algunos genes necesarios para la formación de extremidades en *Drosophila* (Mercader et al., 1999). Es decir, mediante el estudio de la genética del desarrollo de *Drosophila* aumenta la comprensión sobre el desarrollo de otros organismo (Bilen and Bonini, 2005; Briscoe et al., 2001; Gwack et al., 2006).

Del total de genes que forman el genoma de un organismo, sólo una porción mínima estarán encargados de su desarrollo, y serán miembros o moduladores de un número reducido de rutas de señalización. Este hecho resulta contradictorio, si tenemos en cuenta la enorme cantidad de sucesos que se precisan para la construcción de un organismo adulto desde el embrión. La explicación a esta paradoja la encontramos en que las rutas de señalización multiplican y diversifican sus funciones, a lo largo del desarrollo, ejerciendo distintas labores dependiendo de donde y cuando se activan... o se reprimen. Ello se lleva a cabo en gran medida mediante la presencia de genes moduladores (cofactores). El control temporal y espacial de la expresión génica es clave en el desarrollo de un organismo, pues, aunque todas las células que lo forman comparten los mismos genes, es su expresión selectiva lo que diferencia el destino de una célula o un tejido de otro. Como ejemplo de ello tenemos la regulación de la expresión de la ruta de *wingless/Wnt* a lo largo del desarrollo de *Drosophila*. Su regulación será determinante en el destino de las células que reciben su señalización. En los estadios larvarios, su activación en zonas distintas del disco imaginal de ala está controlada por diferentes elementos reguladores, que responden a combinaciones diversas de factores de transcripción. La ruta ejerce funciones distintas dependiendo de la zona donde se expresa. En la zona que da lugar a la articulación del ala tiene un papel mitogénico: su sobreexpresión provocará un aumento en la proliferación celular, y su falta de función provoca la delección del tejido (Neumann and Cohen, 1996a). Sin embargo, en el margen de ala, tiene un papel inverso al que presenta en la axila, pues controla la parada de

proliferación en las células que reciben una alta cantidad de señal (Johnston and Edgar, 1998) (Fig. 1).

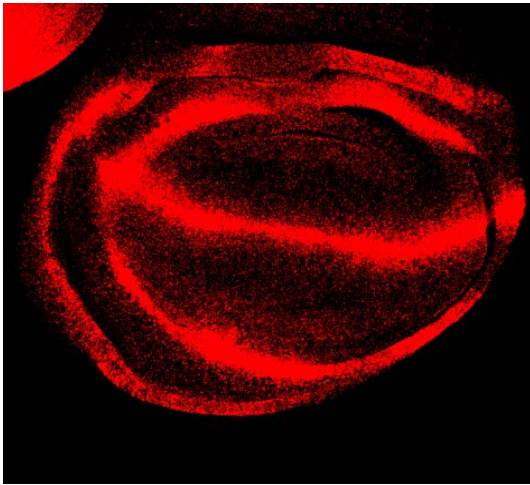


Figura 1.- Expresión de *wingless* en el disco imaginal de ala. Marcado con anticuerpo frente a la proteína (rojo). *wg* se expresa en el ala de *Drosophila* por la activación simultánea de tres elementos reguladores: Margen de ala, anillo interno y anillo externo.

2. La identidad celular

La identidad de las células que forman parte de un tejido depende de manera directa de su *apogenoma* o conjunto de genes activos en una célula. Los patrones espaciales y temporales de expresión de los genes se encuentran regulados de forma precisa. El solapamiento o restricción espacial en la expresión de los distintos genes genera una combinatoria de expresión génica que define la identidad de las células (Fig. 2A).

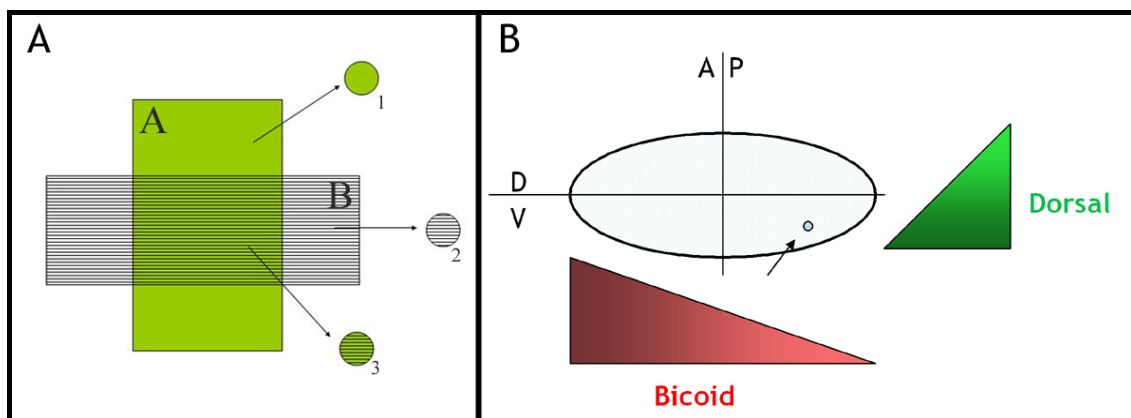


Figura 2.- La identidad celular. A) La identidad de las células 1, 2 y 3 depende respectivamente, de su inclusión en el patrón de expresión A, B o A más B. B) Esquema de un embrión de *Drosophila melanogaster*. Izq. es anterior y arriba es dorsal. La flecha marca una célula con bajos niveles de *bcd* y altos de *dl*, y por tanto, con identidad posterior/ventral.

La identidad, por lo tanto, se asocia con la posición de la célula respecto a las coordenadas espaciales del tejido del que forma parte: anterior/posterior, dorsal/ventral y proximal/distal. Un ejemplo de cómo la acción combinatorial de patrones de expresión génicos da identidad a las células lo encontramos en la formación de ejes en el desarrollo del embrión de *Drosophila*. Desde la fecundación del oocito se establecen unos gradientes de concentración de proteínas que especifican los ejes anteroposterior (AP) y dorsoventral (DV) (Courey and Huang, 1995; St Johnston and Nusslein-Volhard, 1992). La acción combinatorial de estos gradientes generan un mapa bidimensional donde la posición de una célula en cada gradiente define su destino (Fig. 2B). Así, una célula con alta concentración de Dorsal (Dl) (Steward, 1987) y baja de Bicoid (Bcd) (Struhl et al., 1989) (flecha Fig. 2B) adquiere identidad ventral posterior. La alteración de estos gradientes produce en esa célula un cambio de destino.

3. La regulación genética

En los apartados anteriores hemos reflexionado sobre la relevancia de la regulación de la expresión génica en la adquisición del destino celular. Las señales combinadas que definen la actividad de un gen pueden ser activadoras o represoras y afectan al conjunto de procesos biológicos implicados en la síntesis de la proteína codificada por él. Por tanto, los niveles de expresión y la capacidad funcional de una proteína, así como su patrón de expresión, pueden ser controlados en distintas fases (Fig. 3).

La *transcripción* del gen es el nivel básico de regulación de la expresión (1, Fig. 3). En este nivel el control de la expresión depende de la acción de factores de transcripción mediante su unión a secuencias específicas de nucleótidos presentes en el ADN, los *elementos reguladores (enhancers)*, y del reclutamiento de complejos proteicos que les permita llevar a cabo su función activadora o represora. Un ejemplo de la amplia diversidad reguladora que hay en este nivel es la ruta de *wg*. El elemento final de esta ruta es el factor de transcripción codificado por el gen *pangolin/dTCF (pan/dTCF)* (Brunner et al., 1997; van de Wetering et al., 1997). Este puede actuar como activador o

como represor dependiendo de que la ruta este o no activada (Cavallo et al., 1998).

La regulación génica también actúa sobre la *traducción* de la proteína (2, Fig. 3). Un ejemplo de ello es la expresión del gen *hunchback* (*hb*). Su ARN mensajero se encuentra presente de forma ubicua en estadios tempranos del desarrollo del embrión, pero su traducción está controlada por el gradiente de concentración de la proteína Bcd (Houchmandzadeh et al., 2002).

Otro aspecto es el *procesamiento intracelular* (3, Fig. 3), una serie de modificaciones postraduccionales necesarias para la síntesis de una proteína activa. Una muestra de ello es la adición de azúcares a los ligandos del receptor codificado por el gen *Notch* (*N*). Estas modificaciones por adición de azúcares se llevan a cabo en el aparato de Golgi y son necesarias para que los ligandos puedan reconocer al receptor (Fortini, 2001).

La capacidad de las proteínas que se secretan para difundir en el medio extracelular es otro aspecto importante dentro de la regulación de la actividad génica (4, Fig. 3). Este aspecto es muy crítico en aquellas proteínas que actúan como ligandos de rutas de señalización. Un ejemplo de ello es el efecto de las proteínas Division abnormally delayed (Dally) y Dally-like (Dlp) en la estabilidad y difusibilidad en el espacio extracelular de los ligandos Wg, Decapentaplegic (Dpp) y Hedgehog (Hh) (Lum et al., 2003; Takei et al., 2004).

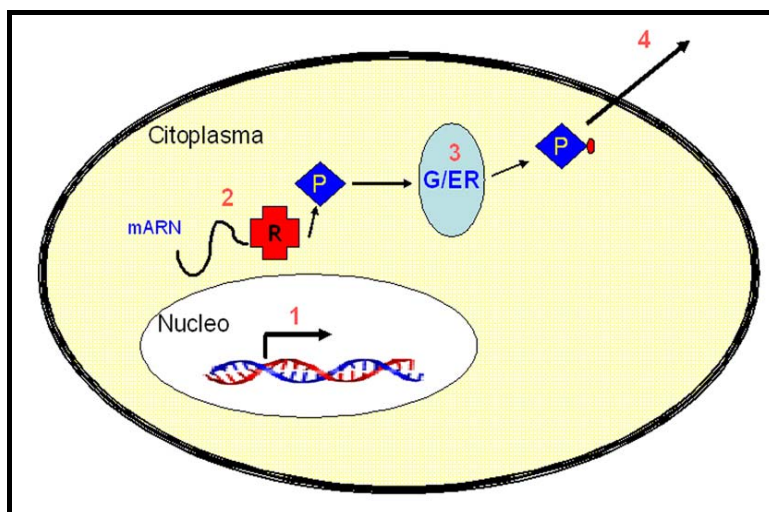


Figura 3.- Fases en la regulación génica. 1) Transcripción de ARNm. 2) Traducción, en el ribosoma (R), del ARNm en proteína (P). 3) Procesamiento de la proteína en el Golgi y Retículo Endoplasmático (G/ER) 4) Interacción con proteínas de membrana y de la matriz extracelular, si la proteína es difusible.

4. Los elementos reguladores

Cada gen se estructura en una región *reguladora* y otra *codificante*. A su vez, la región reguladora se compone de (a) *promotor*, que está 3' del inicio de transcripción del ARN mensajero, y (b) *elementos reguladores*, que se pueden encontrar dispersos a distintas distancias de él, pudiendo estar 3', 5', o incluidos en los intrones de la región codificante (Fig. 4A).

Los elementos reguladores de la transcripción son estructuras modulares. A estos módulos se unen distintas combinaciones de factores de transcripción, lo que permite que un gen se active en un tipo celular, y en una etapa del desarrollo, en función del contexto proteico unido a su región reguladora. Esto ocurre con *dpp*, su activación en el embrión o en los discos imaginales responde a distintas combinaciones de proteínas. Además, los elementos reguladores responsables de una u otra activación se encuentran situados en distintas regiones del gen (Padgett et al., 1987), pudiendo aislarse el elemento regulador responsable de su expresión en discos imaginales del elemento regulador responsable de su activación en el embrión (Staebling-Hampton et al., 1994) (Fig. 4B). También es posible que la expresión de un gen en distintos tejidos dependa de un único contexto proteico, así, si volvemos a la activación de *dpp*, nos encontramos que responde a la ruta de Hh en todos los discos imaginales (Basler and Struhl, 1994). Por el contrario, *wg* sólo se activa por esa ruta en la pata y de manera temprana en ala y halterio, donde su expresión se hará más compleja en estadios más avanzados del desarrollo al estar mediada por otros elementos reguladores independientes de la acción de Hh (Fig. 4B).

En ocasiones patrones de expresión aparentemente compactos están generados por la activación de diferentes elementos reguladores en dominios colindantes. Una muestra de ello es la activación de *vestigial* (*vg*) en el ala. Este gen se activa en el margen del ala por un elemento regulador temprano que responde a la ruta de Notch, el *boundary enhancer*, y por la acción de un elemento regulador tardío, el *quadrant enhancer*, que es activado en el resto del ala por la acción combinada de las rutas de Dpp y Wg (Kim et al., 1996). Ambos patrones dan un patrón de expresión espacialmente continuo. Otro ejemplo es el patrón de expresión del gen *acheate-scute* (*ac-sc*) en el notum.

Este se activa por la acción combinada de elementos reguladores discretos a los que se unen distintos factores de transcripción. La localización de los elemento sensoriales en el notum adulto dependerá de la combinatoria de factores de transcripción que determinan la posición de cada uno de los grupos proneurales en el disco (Fig. 4C) (Gomez-Skarmeta et al., 1995).

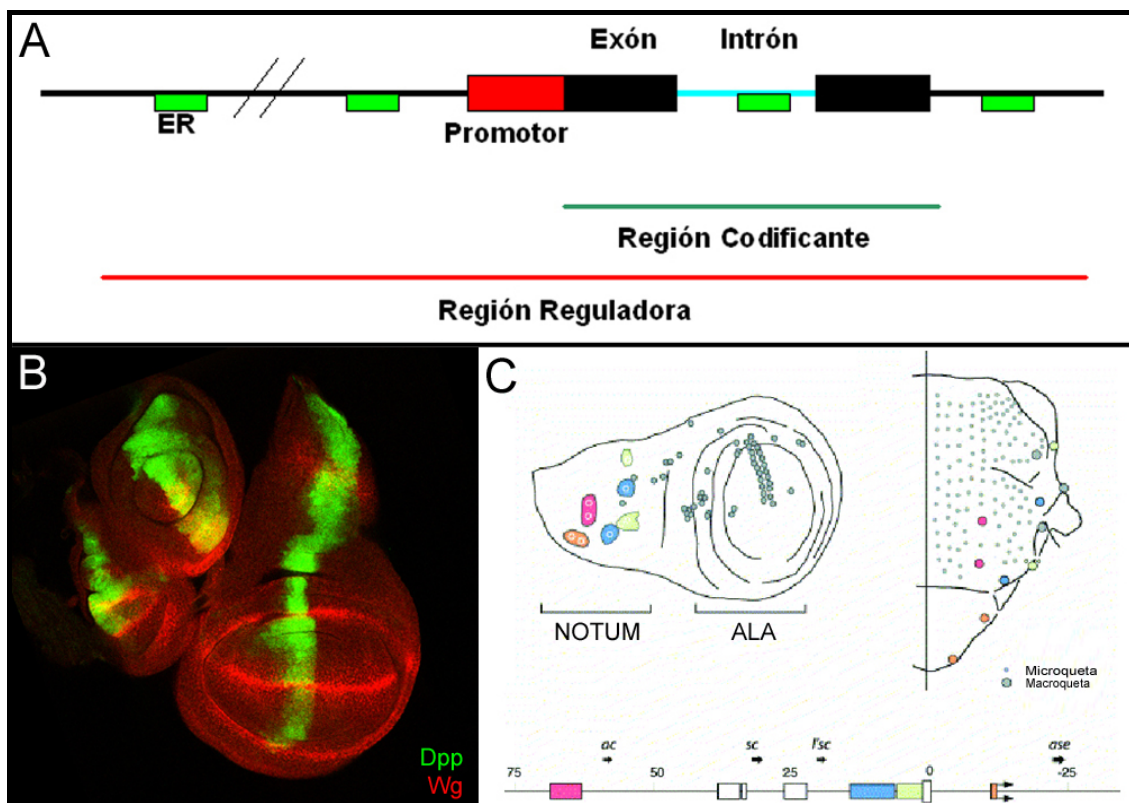


Figura 4.- El Gen y sus Elementos Reguladores (ER). A) Estructura de gen, dividida en Región Reguladora (Promotor y ER) y Región Codificante (Exón e Intrón). B) Patrón de expresión de *wg* y *dpp* en los discos imaginales de ala, halterio y pata de *Drosophila*. *dpp* siempre se expresa en el borde AP por acción de la ruta de Hh, mientras que la activación de *wg*, solo se activa por la misma ruta en pata, y es más compleja en el resto de los tejidos. C) Organización del locus *achaete-scute*, y expresión de *achaete* y *scute* en el disco de ala, acompañado de su correspondencia con el patrón de macroquetas. Adaptado de Gómez-Skarmeta et al. (1995).

5. La maquinaria de transcripción

La *transcripción* es la biosíntesis de ARN mensajero (ARNm) a partir del ADN de la célula. El ARNm servirá como molde para construir la proteína mediante el mecanismo de *traducción*. La transcripción de todo gen comparte una maquinaria proteica basal: el complejo formado por la ARN Polimerasa II (ARN polII) y los Factores de Transcripción Generales (FTG), un ejemplo de estos últimos es la proteína TATA Binding Protein (TBP) (Chen and Struhl, 1988). Los

FTG forman complejos intercambiables que sirven consecutivamente a la ARN polIII en las distintas fases necesarias para la construcción de ARNm. El Complejo Iniciador es necesario para su acoplamiento al promotor, el Complejo de Elongación permite su movimiento sobre la hebra de ADN que codifica el ARNm y el Complejo Terminador para arrancarla del ADN. Pero para que se inicie la transcripción la maquinaria debe ser atraída hacia el promotor. La decisión sobre si se une o no es clave en la regulación génica, pues serán las proteínas encargadas de atraerla o que impidan su unión, respectivamente *Complejo Activador* y *Complejo Represor*, las responsables de que gen y en que momento del desarrollo se transcribirá. Estas proteínas se unirán de manera específica a los elementos reguladores de la transcripción, generando un contexto proteico específico para cada momento y tejido. El resultado de todo ello es que cada gen tiene un patrón de expresión específico y singular, que es regulado de forma precisa a lo largo del desarrollo.

6. Complejo Activador y Represor

El material genético de las células eucariotas se estructura en un complejo nucleoproteico llamado *cromatina* compuesto por la combinación de ADN e histonas. Para que se una la ARN polIII y comience la transcripción se requiere un paso previo de descondensación de la cromatina, es decir, la separación física entre ADN e Histonas. La descondensación de la cromatina necesita la acetilación de las Histonas que se da mediante proteínas con actividad Histona Acetil Transferasa (HAT). Por el contrario la condensación requiere de proteínas con actividad Histona Desacetilasa (HDAC), por tanto, el estudio de la regulación de la transcripción une dos campos que antes eran dominios exclusivos: 1) La estructura de la cromatina y 2) Los factores de transcripción con sitios de unión específicos a ADN.

Se ha comprobado que, tanto la activación como la represión de un gen, comparten un mecanismo común y conservado evolutivamente: Un factor de transcripción se une a una secuencia específica de ADN, con él interacciona una proteína sin dominios de unión a ADN, coactivador o correpresor, que sirve de puente o forma parte de un *complejo de remodelación de la*

cromatina (acetilasas o desacetilasas). Todas estas proteínas forman los complejos activadores y represores. Si el factor de transcripción que se une a ADN es un activador el resultado final será el desenrollamiento de la cromatina y la unión del complejo activador a la maquinaria de transcripción, que así podrá ser atraída al promotor del gen y comenzar su actividad. Si el factor de transcripción es un represor se reclutarán complejos proteicos que condensarán la cromatina, impidiendo la unión de la maquinaria de transcripción. No obstante existen varias excepciones a esta regla, como discutiremos más adelante. Se ha postulado la existencia de dos tipos de represión. Una represión de “*amplio rango*” o *silenciamiento* que incluye el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina que afectan a la activación de varios elementos reguladores, incluso a todo un locus. También una represión de “*corto rango*” o *amortiguamiento (Quenching)*, que ocurre cuando un represor bloquea la unión de un activador a un elemento regulador cercano al promotor, permitiendo la independencia de elementos reguladores más alejados. Este tipo de represión es más flexible que el otro y sólo afecta al grado de expresión de una proteína (Courey and Jia, 2001; Gray and Levine, 1996).

Dentro de los factores de transcripción que se unen directamente a los elementos reguladores, existen varias clases funcionales. Encontramos ejemplos de activadores como Mothers against Dpp (Mad) (Sekelsky et al., 1995), y represores como Brinker (Brk) (Campbell and Tomlinson, 1999; Jazwinska et al., 1999; Minami et al., 1999). Pero, también hay factores de transcripción que pueden comportarse como activadores o como represores, en función del contexto proteico, así actúan *pan*, del que ya hablamos en el apartado 3, o Ventral nervous system defective (Vnd), que actúa como un activador junto a Dichaete (D) (Yu et al., 2005) o como un represor junto a Groucho (Gro) (Weiss et al., 1998).

Pese a que hay algunas evidencias de activadores, que se unen directamente a la maquinaria de transcripción (Lagrange et al., 1996; Zhou et al., 1998), en la mayoría de los casos, la activación de un gen está mediada por su interacción con complejos proteicos coactivadores con actividad HAT. Un ejemplo de este tipo de coactivador es CBP (CREB Binding Protein),

perteneciente a la familia CBP/p300 (Arany et al., 1994), una proteína con actividad HAT, y con capacidad adicional de unirse directamente a la maquinaria de transcripción (Agalioti et al., 2000; von Mikecz et al., 2000), aunque también forma complejos con más proteínas HAT como p/CAF (p300/CBP Associated Factor) (Scolnick et al., 1997), u otras que no son HAT, como ARC (Activator Recruited Factor), que sirven de vínculo con la maquinaria de transcripción (Naar et al., 1998). ARC tiene homología con proteínas del complejo *Mediador* de levaduras. La interacción con todas ellas permite que CBP pueda mediar la acción de un activador, aunque éste se una a una secuencia específica, situada a varias Kb del promotor. Hay múltiples estudios que conceden a CBP un papel central en el desarrollo de *Drosophila*, ejemplos de ello son su papel mediador en la activación de *twist* (*twi*) por DL (Akimaru et al., 1997) o su función en el desarrollo del ojo (Kumar et al., 2004).

Los correpresores más estudiados en *Drosophila melanogaster*, merced a sus fenotipos pleiotrópicos que se corresponden con el gran número de represores con los que interactúan, son dos proteínas que pertenecen a familias conservadas evolutivamente: (a) Groucho, que interacciona con Hairy (H) (Paroush et al., 1994), Pan (Cavallo et al., 1998) o Brk (Zhang et al., 2001) en otras, y (b) dCtBP (drosophila C-terminal Binding Protein) (Nibu et al., 1998; Poortinga et al., 1998), que actúa como correpresor de Brk (Hasson et al., 2001), Tramtrack69 (Ttk69) o Zfh-1 (Postigo and Dean, 2000), entre otros. Gro y dCTBP reprimen la transcripción mediante su relación con complejos HDACs, así ocurre con la interacción entre Gro y Rpd3 (Chen et al., 1999), o la existente entre el homólogo de ratón de dCtBP y las proteínas HDAC-2 y HDAC-3 (Subramanian and Chinnadurai, 2003). Aunque ambas proteínas también reprimen la transcripción con independencia de los complejos HDACs, bien reclutando a proteínas del complejo Polycomb, como hace CtBP (Srinivasan and Atchison, 2004), o interaccionando directamente con histonas como hace Gro (Flores-Saaib and Courey, 2000; Palaparti et al., 1997). En cualquier caso y pese a la importancia en el desarrollo de ambos correpresores existen varios ejemplos donde sus proteínas diana mantienen una cierta acción represora independiente de ellos (Kobayashi et al., 2001;

Nagel et al., 2005; Nibu et al., 2003). En la Figura 5 se muestra un esquema general de la transcripción en organismos eucariotas, donde tienen cabida todas las proteínas y complejos proteicos que hemos introducido.

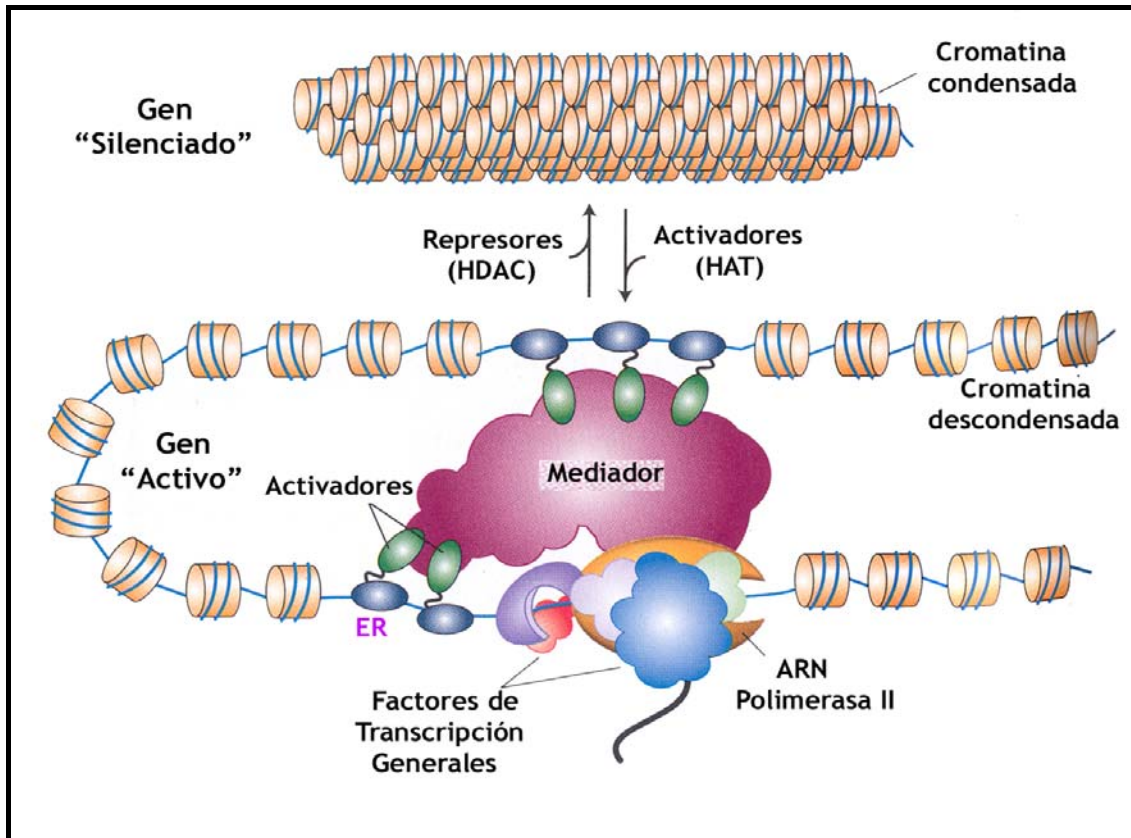


Fig 5.- La Transcripción en organismos eucariotas. Los activadores se unen a la cromatina a través de secuencias de ADN específicas, los ER, e interactúan con complejos coactivadores (HAT), para descondensar el ADN y ensamblar la maquinaria de transcripción (RNA polimerasa II y Factores de transcripción Generales). Los genes silenciados se localizan en zonas condensadas, donde se impide la unión de la Maquinaria de transcripción al promotor. Alternativamente, las proteínas represoras inhiben la iniciación de la transcripción interaccionando con la Maquinaria, o con complejos multiproteicos que condensan la cromatina (HDAC). Adaptado de (Lodish et al., 2003)

Aunque a lo largo de este capítulo hemos descrito muchas de los comportamientos generales y de los elementos implicados en la activación y en la represión transcripcional, de manera simultanea hemos planteado una serie de excepciones a la regla como la posible doble función como activador o represor en función del contexto proteico de algunos factores de transcripción con sitios de unión específicos a ADN, la independencia de algunos activadores respecto a los complejos de proteínas con actividad HAT y la independencia de correpresores respecto a las HDACs o de represores

respecto a los correpresores con los que normalmente funcionan. Estos comportamientos, alejados de la norma, muestran una variabilidad enorme lo que nos lleva a concluir que los estados de represión o de activación de la expresión génica no son nunca estados absolutos.

7. La familia de proteínas Nab

En este trabajo hemos estudiado la función del gen *nab* en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*. El gen *nab* fue originalmente identificado en ratón y su nombre proviene por su capacidad de unión al factor de transcripción NGF1-A (NGF1-A Binding Protein) (Russo et al., 1995), también conocido como Krox-24/EGR1, integrante de la familia de proteínas EGR (Early Growth Factor). La familia EGR la forman factores de transcripción del tipo dedos de zinc de la familia Krüppel. Estos dominios se unen a ADN mediante el reconocimiento de secuencias específicas. Se ha mostrado que los factores EGR están implicados en una variedad de procesos que incluyen proliferación celular (Abdulkadir et al., 2001), apoptosis (Krones-Herzig et al., 2003) y diferenciación celular (Levi et al., 1996). En ratones mutantes para alguno de estos genes se observan defectos en el desarrollo del sistema nervioso y reproductivo, con fenotipos tales como infertilidad femenina (Lee et al., 1996; Topilko et al., 1998), mielinización anormal del sistema nervioso periférico (Topilko et al., 1994) y defectos en la segmentación del cerebro posterior (Schneider-Maunoury et al., 1997; Schneider-Maunoury et al., 1993; Swiatek and Gridley, 1993). Además, el análisis de ratones mutantes en varios genes EGR sugiere que su función es crítica para el desarrollo general del sistema nervioso central (SNC). La búsqueda de *nab* surgió al percibirse que existía una región de 35 aminoácidos que se denominó R1, situada 5' del dominio ZF de EGR1. Mutaciones en esta región producían una sobreexpresión de los genes diana. Se postuló que R1 podría ser un dominio necesario para la unión de un represor (Gashler et al., 1993). Usando esta región como cebo se realizó un ensayo de "doble híbrido" mediante el que se identificó el gen *nab* (Russo et al., 1995). Las proteínas Nab también interaccionan con el otro miembro de la familia EGR que comparte el dominio R1, Krox-20/EGR2, pero no con EGR3 ni con EGR4, que carecen de este dominio (Russo et al., 1995).

En vertebrados existen dos genes *nab*: *nab1* y *nab2* (Svaren et al., 1996). Sólo existe un gen *nab* en *Caenorhabditis elegans* (Svaren et al., 1996) y en *Drosophila melanogaster* (Clements et al., 2003). Las proteínas Nab de invertebrados sólo comparten una alta homología de secuencia en los dominios con actividad conocida de sus ortólogos de vertebrados: NCD1 (78% de homología), que es el dominio a través del cual se une a sus proteínas diana y que también permite su multimerización (Svaren et al., 1998), y NCD2 (59%), que es un dominio necesario para su función como correpresora (Swirnoff et al., 1998) o como coactivadora (Sevetson et al., 2000) (Fig. 6). En Nab1 y Nab2 no se han identificado dominios de unión a ADN, por lo que se piensa que ejercen su función mediante su interacción con las proteínas EGR, aunque en ratones doble mutantes para *nab1* y *nab2* se han descrito fenotipos de hiperplasia epidérmica que no se muestran en mutantes *EGR*. Este hecho sugiere que las proteínas Nab deben tener otras diana distintas a EGR (Le et al., 2005).

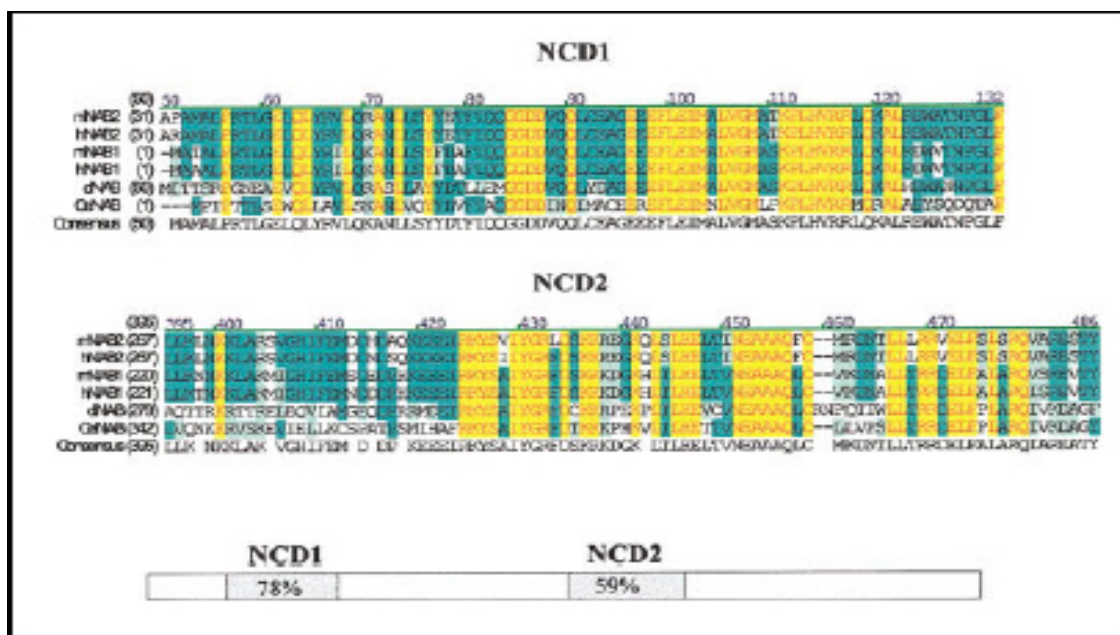


Figura 6.- Comparativa entre las secuencias de aminoácidos entre los dominios NCD1 y NCD2 de las distintas proteínas Nab presentes en el reino animal. Los dominios NCD1 y NCD2, de la proteína Nab de *Drosophila melanogaster*, comparten un 78% y un 59% respectivo de homología con sus ortólogos (Clements et al., 2003).

Los resultados obtenidos en el análisis genético y molecular de las proteínas Nab de vertebrados, tanto en cultivos celulares (Svaren et al., 1996)

como en organismos completos (Mechta-Grigoriou et al., 2000), muestran que actúan como represoras de la actividad EGR. Se ha visto que la represión que ejercen se ve apoyada por su capacidad para unirse al subdominio CHD4 de la proteína NuRD, que es un correpresor transcripcional con actividad HDAC (Srinivasan et al., 2006). Más recientemente se ha encontrado que también pueden actuar como coactivadoras en procesos en los que está implicada la familia EGR. Ejemplos de ello son la coactivación de genes diana de EGR, como la *hormona luteinizante beta (LHbeta)* (Sevetson et al., 2000), o de genes implicados en mielinización (Le et al., 2005).

En *Drosophila melanogaster* existe un único estudio previo donde se identificó al ortólogo de la familia Nab de vertebrados y se mostró su patrón de expresión en el SNC embrionario y en los discos imaginales, pero no consiguieron identificar ninguna función (Clements et al., 2003). En el genoma de *Drosophila* sólo existe un miembro de la familia EGR codificado por el gen *Klumpfuss (klu)* (Klein and Campos-Ortega, 1997; Yang et al., 1997). Su putativo dominio R1 está conservado sólo parcialmente y además su patrón de expresión no es coincidente con el de *nab*. Resultados de ensayos de *doble híbrido* han mostrado que Klu no interacciona físicamente con Nab (Clements et al., 2003). Tampoco hay otras proteínas que, sin ser de la familia EGR, contengan un dominio similar a R1. Por tanto, para analizar las posibles funciones de *nab* en *Drosophila* será necesario conocer en detalle los contextos biológicos en los que Nab tiene una función, el desarrollo próximodistal del ala y el desarrollo del SNC, así como identificar las posibles proteínas a las que puede unirse para ejercer su función.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es la búsqueda, identificación, aislamiento y caracterización de nuevos genes implicados en el desarrollo proximodistal del ala de *Drosophila*. Los pasos que se han realizado son:

1. Mutagénesis para la identificación de nuevos genes. El método utilizado ha sido la expresión ectópica de nuevas inserciones EP portadoras de secuencias UAS y que cuando se combinan con una línea GAL4 activan la transcripción del gen adyacente. Se seleccionaron aquellas líneas que mostraban fenotipos que alteración del patrón proximodistal del ala.
2. Generar las herramientas necesarias para llevar a cabo el proyecto desde un punto de vista genético y molecular: identificación del gen afectado por la inserción, generación de alelos de pérdida de función, caracterización molecular del gen y de los alelos mutantes obtenidos, experimentos de expresión ectópica, purificación de la proteína para estudios *in vitro* y generación de anticuerpos.
3. Análisis del patrón de expresión durante el desarrollo mediante hibridación *in situ* de RNA o mediante inmunomarcaje.
4. Análisis fenotípico de la falta de función mediante clones de recombinación mitótica y de la expresión ectópica mediante clones inducidos por el sistema UAS/GAL4. Este análisis se hará con el estudio de los fenotipos adultos y con el estudio del patrón de expresión de otros genes.
5. Análisis de las interacciones moleculares entre este gen con otros genes involucrados en los mismos procesos.

Materiales y Métodos

1. Materiales y Métodos Genéticos e Histológicos

1A. Medios de cultivo

Todos los cruces se han llevado a cabo en medios de cultivo estándar de *Drosophila* en un incubador a 25°C y 75% de humedad relativa del aire.

1B. Estirpes de *Drosophila melanogaster*:

Para el desarrollo de este trabajo se han usado las siguientes estirpes de moscas ya existentes: *y w*¹¹¹⁸; *CyO*, *EP#720/dpp[d12]* (Rorth et al., 1998); *wg[spd-fg]* (Couso et al., 1994); *spd-LacZ* (Neumann and Cohen, 1996a); *rn[20]* (Agnel et al., 1989); *rn-LacZ*, *rnGAL4* y *UAS-rn* (St Pierre et al., 2002); *nub[1]* (Ng et al., 1995); *nubGAL4[AC62]* y *DllGal4[MD23]* (Calleja et al., 1996); *vg[83b27R]* (Williams et al., 1993); *UAS-vg* (Kim et al., 1996); *yw*; *UAS Zfh2-RNAi/S-T/UAS Zfh2-RNAi* (amablemente cedido por la Dra. M. Suzanne); *dppGAL4* (Staehling-Hampton et al., 1994); *eyeless Gal4* (Bonini et al., 1997); *mas[xs76]* (Murugasu-Oei et al., 1996); *nab[l(3)SH143LacZ]* (Oh et al., 2003), *nab[NP3537GAL4]* y *NabGal4[NP1316]* (Gal4 Enhancer Trap Insertion Database); *sqz[lacZ02102]*, *sqzGal4* y *UASsqz[#7.2]* (Allan et al., 2005); *FRT82 dCtBP[87De-10] / TM6, Tb* (Hilliker et al., 1980); *Canton-S*, *y w[1118]*, *w[1118]*; *Δ2-3*, *Sb/TM2*, *UASGFP*, *y w[1118] hsFLP[122]*; *UbiGFP FRT80/TM2* (Bloomington *Drosophila* Stock Center); *y w hs-FLP122*; *Act>y+>GAL4UAS-GFP / SM6-TM6b* (Ito et al., 1997). *Yw FLP[122]*; *FRT82 M(3R)w ArmLacZ / Tm6, Tb*

Además se han generado las líneas: *UAS-nab*, *nab[EP#13]*, *nab[R52]* y *UAS-RnΔ894*.

1C. Generación de nuevos mutantes *nab*:

Para conseguir deleciones en la región codificante de *nab* hicimos saltar con ayuda de una trasposasa la línea EP#13, que contiene un elemento EP insertado a 86 pb del inicio de la transcripción de *nab*. No todos los saltos, que se reconocen por una reversión hacia *w*, generan deficiencias asociadas, pero habrá una porción de ellos en los que el elemento P no se escinde de manera limpia y arrastra consigo una porción de genoma generando una

delección. Normalmente las delecciones son unidireccionales, es decir, se generan hacia un lado o hacia el otro de la inserción, pero no en ambos. Para identificar la existencia de delección y también su orientación respecto a la inserción, es decir, saber si es un nuevo alelo de *nab* o si lo es de *mas*, lo cruzamos con alelos ya existentes de ambos genes. De esta forma se seleccionaron 3 nuevos alelos de *nab* (*nab*[R]) (Fig. 7)

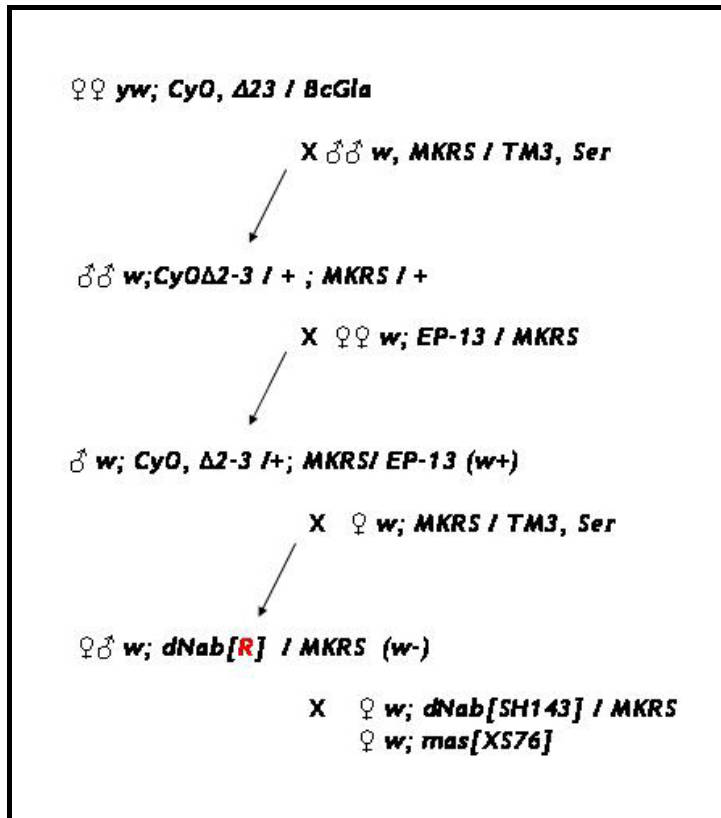


Figura 7. Esquema de cruces para la consecución de nuevos alelos mutantes para el gen *nab*.

1D. Análisis clonal:

1D.1. Clones de Expresión Ectópica:

Para inducir clones de expresión ectópica se utilizó el método *FLP-out* (Struhl and Basler, 1993). Se cruzaron hembras con el genotipo *y w hs-FLP122; Act>y+>GAL4UAS-GFP / SM6-TM6b*, con machos de genotipo correspondiente a cada uno de los análisis realizados: *UAS-vg*, *UAS-rn*, *UAS-nab*. En larvas de entre 24h y 48h de desarrollo se induce la recombinación mitótica mediante choque térmico en baño de agua a 34,5 °C durante 12 minutos.

1D.2. Clones de falta de función:

Los análisis clonales de falta de función se llevaron a cabo mediante el método FLP/FRT (Xu and Rubin, 1993). En larvas entre 24h y 48h se induce la recombinación mitótica mediante choque térmico en baño de agua a 37°C durante 60 minutos. Los genotipos analizados fueron:

- *y w hs-FLP122 ; rn Δ2-2 FRT[80] / Ubi-GFP FRT[80]* para los clones *rn-*.
- *y w hs-FLP122 ; nub 1 FRT[40A] / Ubi-GFP FRT[40A]* para los clones *nub-*.

Los clones homocigóticos mutantes pueden distinguirse en el adulto por la homocigosis para el marcador cuticular *f36a* (*forked*) que altera la morfología de los tricomas y las quetas. En todos los casos los clones en disco imaginal pueden distinguirse por la falta de expresión de GFP (*Green Fluorescent Protein*), que se activa de forma ubicua bajo el control de secuencias reguladoras de gen *ubiquitin* (transgen Ubi-GFP) (Davis et al., 1995)

1E. Detección inmunohistoquímica

Esta técnica es utilizada para detectar la proteína codificada en un gen mediante anticuerpos específicos (anticuerpos primarios), que a su vez, serán detectados con la ayuda de anticuerpos que reconocen su cadena pesada (anticuerpos secundarios). Los anticuerpos secundarios están acoplados a fluoróforos, si la detección se hace mediante microscopía confocal, o a Biotina, si la detección se hace mediante una reacción química visible. Los anticuerpos usados en esta tesis han sido:

- Anticuerpos Primarios: ratón anti-Nub; conejo anti-Nab; conejo anti-Vg (Williams et al., 1991); ratón anti-Wg (Brook and Cohen, 1996); conejo anti-β-Galactosidasa (Cappel); ratón anti-β-Galactosidasa y pollo anti-β-Galactosidasa (Promega); ratón anti-Dl (Hibridoma bank). Oveja- Anti-Digoxigenina (Roche)
- Anticuerpos Secundarios: Biotina-anti-ratón, Biotina-anticonejo y Biotina anti-pollo (Vector); Fluoresceína-anti-ratón y Cy5-anti-ratón (Jackson Immunoresearch); Alexa 488-anti-ratón, Alexa 594-Anti-ratón, Alexa 488-anti-conejo, Alexa 594-anti-conejo, Alexa 594-anti-rata, (Molecular Probes).

La existencia del corion y la membrana perivitelina en embriones hace obligatorio un tratamiento previo (Decorionización y Desvitalización), para obtener una adecuada fijación e hibridación con el/los anticuerpos primario/s. A su vez, para obtener un correcto marcaje con anticuerpos en discos imaginales, se requiere de la rotura de la larva y exposición al medio de los discos (Disección). Una vez finalizado uno u otro tratamiento, el protocolo para la detección inmunohistoquímica es idéntico en embriones y en discos imaginales larvarios:

Sólo en embriones:

- Recogida: Se recogen los embriones de las placas de puesta con un pincel.
- Decorionización: Con lejía comercial 40 s. Se lavan los restos de lejía abundantemente, primero con agua y después con agua + 1 % Tritón.
- Fijación: Se transfieren los embriones a un vial de “centelleo” con 2 ml de Solución de Fijado (180 mM Hepes, 4 mM MgSO₄, 2 mM EGTA, pH 9), 1,4 ml de Formaldehído al 10 % y 5 ml de Heptano. Agitar vigorosamente durante 20 min.
- Desvitelinización: Remover la fase acuosa (abajo). Añadir 10 ml Metanol. Agitar vigorosamente. Quitar la fase de Heptano (arriba). Añadir Metanol y agitar. Los embriones desvitelinizados deberían estar en el fondo. Recoger y llevar a un tubo eppendorf de 1,5 ml.
- Lavado: 3 X 5 min, Metanol.

Sólo en larvas:

- Disección: Las larvas se disecan en PBT (PBS +0'3 % Tween 20) un máximo de 30 min en hielo.
- Fijación: Durante 20 min en formaldehído al 4 % en PBT. A T^a ambiente.

Común a ambos:

- Lavado: 3 x 10 min con BBT 250 (PBT + 0,2 % BSA + 250 mM NaCl). A T^a ambiente.

- Incubación Anticuerpo Primario: Se incuba con anticuerpo primario durante 12h-16h. A 4 °C.
- Lavado: 6 x 10 min con BBT 250. A T^a ambiente.
- Incubación con Anticuerpo Secundario: 2h en BBT 250. A T^a ambiente.
- Lavado: 6 x 10 min con PBT. A T^a ambiente.
- Revelado: Las tinciones con anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos no requieren ningún tratamiento de revelado. El revelado con H₂O₂/DAB requiere una incubación de las larvas en una mezcla equimolecular de estreptavidina y peroxidasa biotinilada. Después se lava y se revela la tinción en H₂O₂ al 0,004 % + DAB 0,5 mg/ml en PBT.
- Montaje: Los discos imaginales se equilibran y se montan en glicerol al 90 %.

1F. Hibridación *In situ* de ARN

Esta técnica permite visualizar, mediante la hibridación con una sonda sintetizada *in vitro*, la expresión de ARNm en un tejido (Tautz and Pfeifle, 1989). Las hibridaciones *in situ* realizadas en los discos imaginales se llevaron a cabo con sondas de ARN marcadas con digoxigenina y se reveló su presencia mediante una reacción química visible.

Construcción de la sonda:

- Linealización: 1 µg de cADN se linealizó mediante digestión con una enzima de restricción.
- Transcripción (en 20 µL): Para el marcaje de la sonda se llevó a cabo una reacción de transcripción a partir del cADN linealizado (1 µg) con la ARN polimerasa correspondiente (Roche, DIG RNA Labelling Kit (SP6/T7), Cat. # 11 175 025 910). 2 hrs. a 37 °C.
- Precipitación y Resuspensión: Añadir 100 µL H₂O, 7.7 µL de ADN de Esperma de salmón, 16 µL LiCl 5M y 600 µL EtOH 100 %. Mezclar y dejar toda la noche a -20 °C. Precipitar 15 min. Lavar con EtOH 70% y resuspender precipitado en 150 µL de Mezcla de Hibridación (50%

Formamida, SSC 5X, 100 µg/ml ADN de esperma de salmón, 50 µg/ml heparina y 0,1% Tween20) (MH)

Hibridación *in situ*:

- Disección: Las larvas se disecan en PBT (PBS + 0.3 % Tween 20) un máximo de 30 min en hielo.
- Fijación: 20 min en formaldehído al 4 % en PBT. A T^a ambiente.
- Lavado: 3 x 10 min en PBT. A T^a ambiente
- Prehibridación: En MH a 55 °C durante un periodo mínimo de 1 hr.
- Hibridación: Con 2 µl de sonda en 100 µl de MH durante toda la noche a 55 °C.
- Lavado: 10 min en MH a 55 °C
- Lavado: 3 x 10 min en PBT:MH (1:3, 1:1 y 3:1). A T^a ambiente
- Lavado: 3 x 10 min en PBT. A T^a ambiente
- Lavado: 2 x 10 min en Tampón 1 (100 mM Tris-HCl pH 7.5 y 150 mM NaCl). A T^a ambiente
- Detección de la sonda: Incubación durante 2 horas a T^a ambiente con anticuerpo Oveja anti-Digoxigenina (Roche) en una dilución 1:4000.
- Lavado: 6 x 10 min en PBT. A T^a ambiente
- Lavado: 2 x 10 min en Solución de Color (100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH 9,5 y 0,1% Tween20). A T^a ambiente
- Revelado: se empleó Solución de Color a la que se añadió NBT y BCIP (Roche). El tiempo de revelado fue entre 5 minutos y 1 hora.
- Lavado: 2 x 10 min en PBT. A T^a ambiente
- Montaje: Los discos imaginales se equilibran y se montan en glicerol al 90 %.

1G. Adquisición y tratamiento de imágenes

Todas las fotografías de discos imaginales están orientadas con la región dorsal hacia arriba y anterior hacia la izquierda excepto si se indica lo contrario. Las fotografías de alas adultas están orientadas con la región anterior hacia arriba y proximal hacia la izquierda. Las imágenes se muestran

a la máxima amplificación posible para identificar los detalles, por lo que las fotografías no están a escala.

Las imágenes de microscopía convencional fueron tomadas en un microscopio Leica DMLB acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon CoolPix 990. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas mediante un sistema confocal *Microradiance* de BioRad acoplado a un microscopio vertical Zeiss Axioskop2 (dos canales) o mediante un sistema confocal *Radiance 2000* de BioRad acoplado a un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100 TV (tres canales). Las imágenes han sido tratadas digitalmente mediante la aplicación Photoshop (Adobe).

1H. Generación de líneas transgénicas

Para generar líneas transgénicas portadoras de las construcciones UAS-*nab* y UAS-*RnΔ894*, se emplearon moscas de genotipo *w* (Spradling and Rubin, 1982). Se realizaron puestas de 30 minutos y los embriones recolectados se decorionaron durante 40 segundos con lejía, lavándose posteriormente con agua. Estos embriones se microinyectaron con 1 μ g de la construcción UAS junto con 0,3 μ g del vector *pUC Δ2-3* como fuente de transposasa. A las 48 horas se recogieron larvas, y los adultos supervivientes se cruzaron con moscas *w*. De la progenie se seleccionaron las moscas transformantes de fenotipo *w*⁺. Para generar líneas estables y discernir en qué cromosoma se ha insertado la construcción UAS, se empleó la estirpe *w; CyO / If; MKRS / TM6b*

2. Materiales y Métodos Bioquímicos

2A. Materiales y métodos básicos de manipulación de ADN

Digestión: Todas las digestiones se realizaron a 37 °C en 50 µL con 1 µL de Enzima de Restricción (ER) durante al menos 2 hrs. Todas las ER son provistas por Roche.

Amplificación de ADN: Se llevo a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Todas las reacciones se generaron siguiendo las instrucciones del fabricante provistas en el High Fidelity PCR Master Kit (Roche, Cat # 2140314), usando la temperatura de hibridación adecuada para cada par de oligos y empleando un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

Ligación: Todas las ligaciones se realizaron con T4 DNA Ligasa (New England Biolabs, Cat # M0202L). A 4 °C toda la noche para las ligaciones de fragmentos de PCR con *pGEM[®]-T Easy* y a 16 °C toda la noche para el resto de los clonajes (ver aptdo. B3).

Análisis de digestión y PCR: Se realizó corriendo el ADN en un gel de 0.9 % de Agarosa en TBE.

Purificación de ADN desde gel y desde PCR: Para la purificación se usaron columnas provistas en el Qiaquick Gel Extraction Kit (Quiagen Cat.# 28704) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Transformación de bacterias: La transformación de plásmidos para su replicación en *E. coli* se realizó en cepas de *XL1-Blue MRF'* { $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, *endA1*, *supE44*, *thi-*, *recA*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, λ -, [*F'*, *proAB*, *lacI^qZAM15*, *Tn10*, (*tet^r*)}}, manipuladas para ser termo-competentes

2B. Vectores

A continuación se enumerarán todos los vectores utilizados y el uso que se les ha dado en el desarrollo de esta tesis:

- *pGEM[®]-T Easy* (Promega, Cat.# A1360): Clonaje de fragmentos de PCR, para ser subclonados posteriormente en otros plásmidos.
- *p[UAS]* (Brand and Perrimon, 1993): Generación de líneas transgénicas de expresión ectópica de *nab* y *Rn Δ 894*.
- *pET-14b* (Novagen, Cat.# 69660-3): Generación de una proteína de fusión de *nab* con a una cola de 6Xhis, con el fin de purificarla para generar un anticuerpo frente a ella.
- *PGEX-4T-2* (Amersham Pharmacia Biotech, Cat.# 27-4581-01): Generación de una proteína de fusión de *nab* con GST, y usar esta proteína de fusión en experimentos de interacción de proteínas (*pull down*).
- *pCDNA3FLAG* (Invitrogen), cedido por la Dra. Maria Navarro: Clonaje de las proteínas *Rn*, *Rn Δ 894* y *Sqz*, para su uso en ensayos de interacción de proteínas.

2C. Construcción de Plásmidos

En este apartado daré cuenta de la metodología que se ha seguido para clonar todos los plásmidos usados en el desarrollo de la tesis y de los oligonucleótidos que han sido necesarios para su construcción. Los cADNs de las genes *nab* y *sqz* se obtuvieron mediante PCR usando como molde los clones de las colecciones del *Berkeley Drosophila Genome Project* (BDGP) *LP2227* y *RE47124* respectivamente. El cADN de *rn* se obtuvo usando como molde el vector *pUAS-Rn*, cedido por el Dr. S. Thor (St Pierre et al., 2002). En todas las PCRs se usaron parejas de oligos que contienen las secuencias de inicio (Forward) y finalización (Reverse) de la transcripción, diseñándose de forma que respetaran el marco de lectura de los péptidos o proteínas (His, GST y Flag) contenidas en los vectores de destino (ver aptdo. 2B). Además, en el oligo se añadió una cola de ADN con una secuencia diana para una enzima de restricción. Esta secuencia diana fue elegida porque no esta presente en el

interior del cADN y si en el “Sitio Múltiple de Clonaje” (MCS) del vector donde se insertará finalmente el cADN. Una vez realizada cada PCR, el fragmento obtenido se clonó en el vector *pGEM[®]-T Easy*. Cuando se seleccionó un clon positivo, marcado por la ausencia de actividad *B-Galactosidasa* (colonia blanca) y confirmado posteriormente mediante digestión y secuenciación, se cortó con las enzimas de restricción cuyas dianas estaban presentes en la pareja de oligos y se subclonó en el vector correspondiente, cortado con las mismas enzimas (Fig. 8).

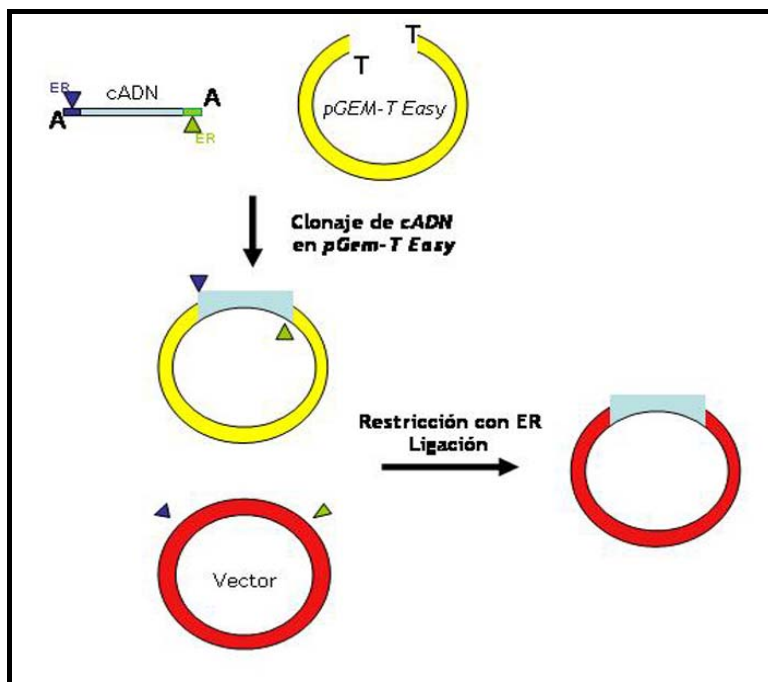


Figura 8.- Protocolo para el clonaje de plásmidos. El cADN amplificado se clona en el vector *pGem-T Easy*. Una vez clonado, se usa este vector como fuente para amplificar el inserto y clonarlo en el vector de destino.

La nomenclatura de los oligos usados hace referencia al gen que amplifican, y a la diana que contienen:

Clonaje de *nab* en *pET-14b*: Para su clonaje en *pGEM-T Easy* se usaron los oligos:

NabF_NdeI(His): ATCATATGCATTTTCGTCCTGGTTCTTTGTG

NabR_EcoRI(His): ATGAATTCTAAGTCTCTGGTGAAGCAGC

Posteriormente *nab* se clonó en *pET-14b* a partir del plásmido *pGemT Easy nabHis*. Se cortaron vector y fuente de inserto con *NdeI* y *EcoRI* para su ligación. La cola 6Xhis se situó en el extremo N terminal.

Clonaje de *nab* en *pGEX-4T-2* y *pUAS*: Para su clonaje en *pGEM[®]-T Easy* se usaron los oligos:

NabF_EcoRI(GST): ATGAATTCTAATGCATTTTCGTCCTGGTTCTTTG

NabR_Sall(GST): ATGTCGACCTAAGTCTCTGGTGAAGCAGCACTC

Después *nab* se clonó en *pGEX-4T-2* y *pUAS* a partir del plásmido *pGemT Easy nabGST*. Se cortaron vector y fuente de inserto con EcoRI y Sall para su ligación. La proteína GST se situó en el extremo N terminal.

Clonaje de *rn* en *pCDNA3FLAG*: Para su clonaje en *pGEM[®]-T Easy* se usaron los oligos:

RnF_Xbal: AATCTAGACATGGTACCTGGTACAAGGG

RnR_Sall: ATGTCGACCTATCCCTTGTCTTCCCAG

A continuación *rn* se clonó en *pCDNA3FLAG* a partir del plásmido *pGem-T Easy rn*. Se cortaron vector y fuente de inserto con Xbal y Sall para su ligación. La etiqueta FLAG se situó en el extremo N terminal.

Clonaje de *sqz* en *pCDNA3FLAG*: Para su clonaje en *pGEM[®]-T Easy* se usaron los oligos:

SqzF_Xbal: AATCTAGACCCAGCGGCGATTATCTG

SqzR_Sall: ATGTCGACCTATTGCGCCTTTTCTTTGGC

Posteriormente *sqz* se clonó en *pCDNA3FLAG* a partir del plásmido *pGem-T Easy sqz*. Se cortaron vector y fuente de inserto con Xbal y Sall para su ligación. La etiqueta FLAG se situó en el extremo N terminal.

Mutagénesis dirigida para generar la proteína truncada Rn Δ 894: La proteína se generó cambiando los aminoácidos Asn894 y Lys895 del cADN de *rn* por dos codones de parada. Se usó como molde *pCDNA3FLAG_rn*, de forma que el plásmido resultante fuera idéntico excepto en la zona mutagenizada, y así poder usarlo en experimentos de interacción proteína-proteína y, que además sirviera también como molde para clonar *rn Δ 894* en *pGEM[®]-T Easy (pGEM-T Easy rn Δ 894)*, usando de nuevo los oligos *RnF_Xbal* y *RnF_Sall*.

Para clonar el plásmido con la proteína truncada y diseñar los oligos necesarios se siguieron las instrucciones de “QuickChange[®]Site-Directed

Mutagénesis Kit” (Stratagen Cat. #200519) (Fig. 9). En negrita se marcan los nucleótidos que difieren de la cadena original y que al ser intercambiados generan un cambio de codón:

RnStopF: GCCATCAGCTTCCCG**TAGT**AGAACGTGAACCAGAACCAACG

RnStopR: CGTTGTTCTGGTTCACGTTCT**ACT**ACGGGAAGCTGATGGC

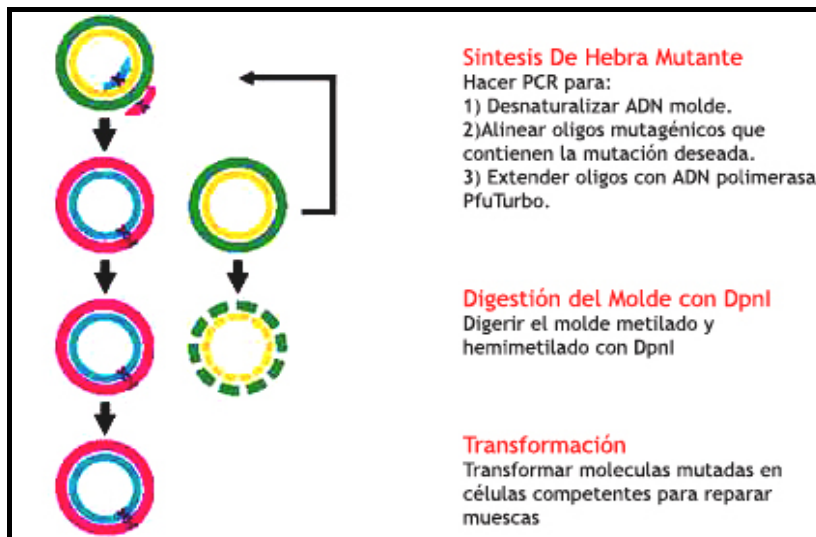


Figura 9.- Esquema del protocolo “en un día” de mutagénesis dirigida para un cambio de codón. Adaptado del manual de instrucciones de “QuickChange® Site-Directed Mutagénesis Kit”

Clonaje de *RnΔ894* en *pUAS*: *rnΔ894* se clonó en *pUAS* a partir del plásmido *pGem-T Easy rnΔ894*. Se cortó el vector con XhoI y la fuente de inserto con Sall para su ligación, ambas enzimas dan extremos protuberantes y compatibles entre sí.

2D. Purificación de las proteínas GST-Nab, GST y 6Xhis-Nab

Los pasos iniciales de inducción y purificación son comunes para todas las proteínas, así como los análisis de concentración, tamaño y grado de purificación de todas las proteínas purificadas, que se realizaron en geles al 10 % de SDS PAGE.

Inducción Común:

- Transformación: En cepas *E. coli* BL-21 {*F*, *ompT*, *hsdS_B*(*r_B⁻m_B⁻) gal*, *dcm(DE3)*}
- Inoculación: Se inocula una colonia en 10 mL de LB + Ampicilina + 40 mM Glucosa. La Glucosa se añade para evitar expresión de proteína, ya

que cuando la bacteria expresa proteína decae su tasa de proliferación. Toda la noche a 30 °C.

- Crecimiento del cultivo: Se crece el cultivo mediante la adición de 4 mL del inóculo anterior a 200 mL de LB + Amp (1/50). A 30 °C hasta D.O. = 0.6-0.8.
- Inducción de la proteína: Se añade 0.5 mM IPTG. 2 hrs. A 30 °C.
- Precipitación: Se centrifugan los 200 mL de cultivo a 6000 rpm durante 15 min.

6Xhis-Nab: El gen *nab* se clonó en el vector *pET-14b*. La proteína se purificó para obtener un anticuerpo policlonal frente a ella. Se usó el péptido de 6Xhis pues permite su purificación incluso en condiciones desnaturizantes, evitándose la necesidad de que deba ser soluble para poder purificarla, como sí ocurre con las proteínas de fusión con GST. De esta forma pueden conseguirse, con mayor facilidad, las altas cantidades requeridas para la obtención de un anticuerpo. La purificación de 6Xhis-Nab se continúa, después de la precipitación del cultivo, mediante las instrucciones provistas por el fabricante para la purificación de proteínas de fusión insolubles (Página 90, The QIAexpressionist™), y merced a su capacidad de unión a bolas de Ni-NTA Agarosa (Quiagen, Cat #1018244). No se eluye la proteína de las bolas.

GST-Nab: El gen *nab* se clonó en el vector *pGEX-4T-2*. Se utilizó la proteína de fusión unida aún a las bolas de Sefarosa Glutathion (Amersham Biosciences, Cat # 17-5279-01) necesarias para su purificación, con el fin de usarla como cebo en experimentos de interacciones proteína-proteína. Posterior a la precipitación del cultivo se siguieron los siguientes pasos para su purificación:

- Resuspensión: En 10 ml de Tampón STE (10 mM tris-HCl pH 8, 1mM EDTA y 150 mM NaCl).
- Incubación: Añadir 100 µL de Solución de Lisozima (10 mg/ml en H₂O). Incubar 15 min en hielo
- Sonicación: Añadir 1.4 ml de 10 % Sarkosyl (Sigma, Cat # L9150) y sonicar 6 X 10 s.
- Centrifugación: a 16000 rpm en un rotor SS34.

- Incubación: Transferir el sobrenadante a un tubo hermético de 50 ml (Falcon, Cat # 352098). Añadir 4 ml de Tritón X-100 y llegar hasta 20 ml con Tampón STE. Incubar 30 min a T^a ambiente.
- Incubación: Añadir 1 ml bolas de Sefarosa Glutation preparadas en PBS (Precipitar 2 ml de las bolas suministradas por el fabricante a 2000 rpm, lavarlas con 50 ml de PBS, precipitarlas a 2000 rpm y resuspenderlas en 1 ml de PBS). Incubar a T^a ambiente durante 1 hr en agitación.
- Lavado: 3 X 50 ml de PBS
- Almacenaje y Uso: Resuspender las bolas unidas a Nab-GST con 1 ml PBS. Guardar con 10 % Glicerol a -70 °C.

GST: Se uso como control negativo en experimentos de interacción proteína-proteína. Se purificó de la misma manera que Nab-GST.

2E. Generación de anticuerpos contra Nab

La proteína 6Xhis-Nab, unida a las bolas de agarosa Ni NTA (ver Apto. 2D), se desnaturalizó y separó de las bolas en Tampón de Carga para geles de SDS PAGE. Se resolvió en un gel de 10 % con un único pocillo. Una vez fijado y teñido el gel, se recortó la banda de la proteína y se homogenizó para inyectarse directamente a los conejos que iban a ser inmunizados. Para obtener el anticuerpo frente a Nab se inmunizaron dos conejos distintos con 70 µg Proteína/inyección. Se practicaron tres inmunizaciones, la primera mezclando el antígeno 1:1 con adyuvante completo (Freund's Adjuvant, Complete, Sigma, Cat # F5881), y las dos restantes a intervalos de 15 días mezclándolo con adyuvante incompleto (Freund's Adjuvant Incomplete, Sigma, Cat # F5506). 10 días después de la última inyección se sangraron los conejos y se extrajo el suero inmune.

2F. Interacción proteína-proteína

Se realizaron ensayos de interacción molecular entre las proteínas GST-Nab/FLAG-Rn, GST-Nab/FLAG-Sqz, y GST-Nab/FLAG-Rn Δ 894. La proteína GST-Nab fue el cebo, purificada y unida a bolas de Sepaharosa-Glutation (ver aptdo. 2D), y el resto la presa, obteniéndose *in vitro* mediante el "TNT T7

Coupled Reticulocyte Lysate Kit” (Promega, Cat #L4600), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello se usó el promotor T7 que se encuentra aguas arriba de la etiqueta FLAG en el vector *pCDNA3FLAG*. En su traducción se usó [³⁵S]Met, por lo que únicamente las proteínas traducidas están marcadas radiactivamente. Protocolo a seguir en el ensayo:

- Incubación: 15 µL de GST-Nab + 5 µL de Presa en 200 µL de Tampón A (20 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl), 300 mM KCl y 0.1 % (v/v) TX100). Durante 2 hr a 4 °C
- Precipitación: Se precipitan las bolas, cualquier proteína no unida debería permanecer en el sobrenadante
- Lavados: 4 X 1.5 ml Tampón A.
- Elución: Se desnaturalizan todas las proteínas unidas a las bolas, mediante Tampón de carga para geles de SDS-PAGE.
- Detección: Se cargan en un gel y se detectan la presencia de proteínas mediante auto radiografía.

Como control positivo de la transcripción/traducción de las presas se cargó en el gel un 5 % de la cantidad de extracto de TnT con que se incubó el cebo. Como control negativo, para demostrar que la unión es específica, se repitieron todos los ensayos incubando las presas con bolas unidas sólo a GST.

2G. Mapeo de Inserciones EP

Para la identificación del sitio de inserción del elemento EP#13 se extrajo ADN genómico de 30 moscas y se resuspendió en 70 µl de H₂O, siguiendo la metodología estándar de extracción de ADN de la BDGP (<http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>). Para asegurarnos un mayor porcentaje de éxito se hicieron en paralelo dos reacciones distintas de PCR inversa. La mitad del ADN genómico (35 µL) se cortó con la ER *HinPI* y la otra mitad con la ER *MspI*. Las reacciones de restricción se llevaron a cabo durante 4 horas y las enzimas se inactivaron durante 20 minutos a 65 °C. Se aumentó el volumen hasta 250 µl para su ligación, que se llevo a cabo a 4 °C toda la noche y se precipitó y limpió de sales mediante EtOH, resuspendiéndose el precipitado en 30 µl. Para cada reacción de PCR inversa se usaron 5 µl de ligación en un volumen final de 50µl, tal que: 95°C/5 min;

35 ciclos: 95°C/45 s., 55°C/1 min y 72°C/2 min; y 72°C/10 min Se utilizaron los oligonucleótidos específicos del extremo 3' del elemento-EP:

Pry1: CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT

Pry4: CAATCATATCGCTGTCTCACTCA

Se secuenciaron con el oligonucleótido:

Spep1: GACTCAGAATACTATTC

Con la secuencia obtenida, se realizó una búsqueda para identificar la región de ADN adyacente al elemento EP mediante el programa BLAST, en el genoma de *D. melanogaster* (<http://flybase.net/blast/>).

2H. Mapeo molecular de deficiencias *nabR#*

Para conocer el alcance de la deficiencia generada en los revertiente *nabR#* se extrajo ADN genómico de embriones homocigóticos, que se utilizó como molde para amplificar mediante PCR las regiones genómicas adyacentes al sitio de inserción del elemento-P *l(3)SH143*, que se encuentra insertado en el primer exón de *nab*. Se diseñaron oligos que amplifican regiones de 5, 10 y 15 Kb a la izquierda de la inserción, enfrentándose siempre al mismo oligo del lado derecho (*Nab_rev*), según la dimensión de la delección.

Nab_rev: TTGCCCCGGCTGATAGAAAACG

Nab5Kb: TTTCGCAGAGACCTGCAAGTAACAAG

Nab10Kb: TTATCCCATTTAGAAATCAAGGAGTGTGC

Nab15Kb: AACTGCAAATTCAATTTAAATCAATGCC

El máximo tamaño de ADN amplificable mediante “High Fidelity PCR Master Kit” es 5 Kb, así, si no se amplifica ADN mediante el primer par de oligos (*Nab_rev*: *Nab5Kb*), se intenta con el siguiente (*Nab_rev*: *Nab10Kb*), y así consecutivamente. El DNA amplificado se secuenció con *Nab_rev*. Con la secuencia obtenida, se realizó una búsqueda, para identificar la región de ADN adyacente al elemento *p{LacW}* que ha sido deleccionada, mediante el programa BLAST en el genoma de *Drosophila* (<http://flybase.net/blast/>)

Resultados

En el desarrollo del ala participan todas las rutas de señalización necesarias para el desarrollo general, por ello es un buen modelo para estudiar el desarrollo de extremidades, pero también para encontrar nuevos genes incluidos en esas rutas y comprender la interacción entre ellas (Irvine and Rauskolb, 2001; Klein, 2001; Lawrence and Struhl, 1996). Las células que formarán el ala comienzan su desarrollo como un primordio de disco que se especifica durante la embriogénesis (Cohen et al., 1993), proliferan durante los estadios larvarios y sufren metamorfosis en el estadio pupal. Una vez especificado el disco imaginal de ala, formado por un epitelio plano pseudoestratificado de células columnares, se producen en él interacciones genéticas que generan dos restricciones de linaje que resultan en cuatro *compartimentos*, fenómeno producido cuando el patrón de expresión de un gen, que se heredará por linaje, define a un grupo de células con un comportamiento, que las difiere y separa del resto impidiendo su mezcla (Garcia-Bellido et al., 1973). Estas restricciones marcarán las coordenadas tridimensionales futuras del ala y notum adultos (Basler, 2000; Brook et al., 1996). La primera restricción separa las células con destino anterior de las posteriores, se realiza durante la embriogénesis, y requiere la expresión del complejo *engrailed/invected* para la determinación del destino posterior (Garcia-Bellido and Santamaria, 1972; Lawrence and Morata, 1976; Morata and Lawrence, 1975). La segunda se produce en segundo estadio larvario, separa las células dorsales de las ventrales y requiere la expresión del gen *apterous (ap)* para la determinación del destino dorsal (Cohen et al., 1992; Diaz-Benjumea and Cohen, 1993). También se ha postulado la existencia de otras restricciones de linaje proximal/distal y notum/ala (Cifuentes and Garcia-Bellido, 1997), pero estudios posteriores no han permitido confirmar estos resultados. De esta forma, el dominio ala se subdivide en diferentes subdominios caracterizados por una diferente combinación de factores de transcripción, dándonos un nuevo ejemplo en el desarrollo, de la importancia que tiene la combinatoria entre patrones de expresión. Una de las consecuencias más importantes que tiene esta subdivisión en dominios de expresión génica, es la interacción entre células en las *fronteras* de los compartimentos, un fenómeno de gran importancia en el desarrollo, pues

permite la activación localizada de genes, que actuarán como *morfógenos* (Wolpert and Gingell, 1968), llamados así pues determinan la proliferación y morfología de las células adyacentes, en función a su distancia a la fuente de expresión (Dahmann and Basler, 1999; Irvine and Rauskolb, 2001; Lawrence and Struhl, 1996).

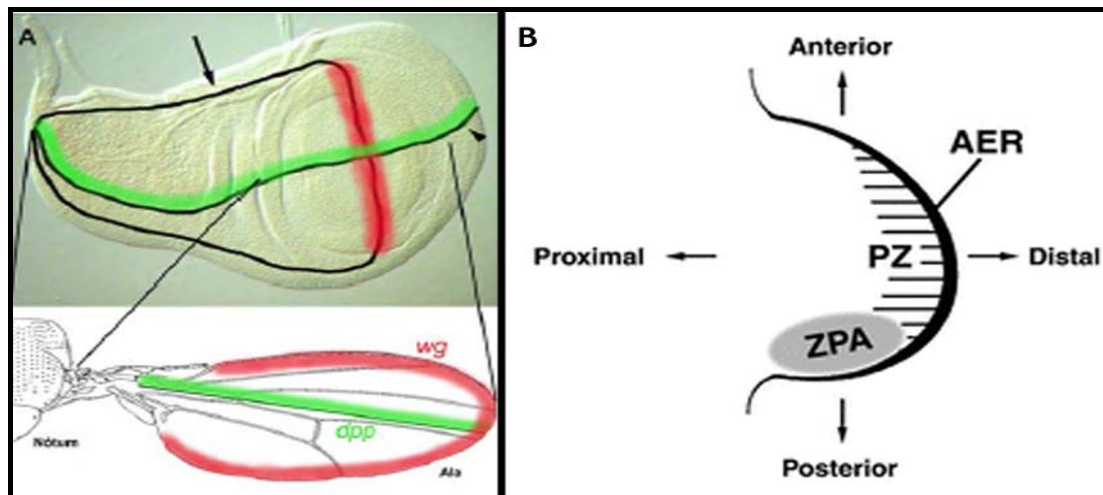


Fig 10.- Organizadores de extremidades. A) Organizadores del ala en *Drosophila*. Arriba. Disco de ala de tercer estadio larvario (anterior hacia arriba y dorsal hacia la izquierda). La subdivisión del disco imaginal en compartimentos induce la aparición de organizadores asociados a los bordes. Así, en el borde antero-posterior (cabeza de flecha) se localiza la expresión de *dpp* (verde). En el borde dorsoventral (flecha) se activa *wg* en la región del *ala* (rojo). Tanto Wg como Dpp son morfógenos y pueden difundir a larga distancia especificando el patrón en ambos ejes. Abajo. Representación esquemática de los tejidos adultos derivados del disco de ala (anterior hacia arriba). En rojo y verde se muestran las localizaciones aproximadas de los organizadores en el adulto. B) Organizadores en extremidades de vertebrados. Vista dorsal del primordio de pata, se compone de células mesenquimales, cubiertas por una capa de ectodermo. Existen zonas específicas que dan patrón a lo largo de los ejes AP, DV, y PrD. La ZPA (Zona de Actividad Polarizante, en sus siglas en inglés) especifica el eje AP. La AER (Cresta Ectodérmica Apical) mantiene la proliferación de la extremidad, manteniendo a las células mesenquimales de la zona PZ (Zona de Progreso) en un estado desdiferenciado.

En el borde AP se activan el gen *decapentaplegic* (*dpp/TGF β*) (Basler and Struhl, 1994) y en el borde DV *wingless/WNT* (*wg*) (Diaz-Benjumea and Cohen, 1995). Ambos genes tienen una función primordial en el desarrollo del disco (Fig. 10A). La interacción entre los dos bordes organizadores permitirá la distinción del tejido ala frente al de notum, y también la especificación del eje próximodistal (PrD), que se sitúa ortogonal al plano formado por ambos. Este proceso ocurre de forma similar en las patas (Campbell et al., 1993; Diaz-Benjumea et al., 1994). El eje PrD sólo empezará a ser percibido a partir

del estadio pupal, cuando el ala comienza a evertir. Sin embargo en las extremidades de vertebrados, su eje próximo-distal no se especifica desde un plano bidimensional, sino que se define desde el comienzo, en un sentido tridimensional, dado que en el embrión ya existen varias capas celulares superpuestas que interactúan entre sí: el ectodermo y el mesodermo (Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001) (Fig. 10B).

1. Desarrollo proximodistal del ala de *Drosophila melanogaster*

Nuestros trabajos previos (del Alamo Rodríguez et al., 2004; del Alamo Rodríguez et al., 2002) se centran en el estudio de desarrollo proximodistal, y específicamente en la regulación de los genes que dan destino al territorio que donde se forma la articulación del ala, la axila. El desarrollo de la axila presenta un gran interés porque su morfología es muy compleja, y su especificación necesita de una regulación genética muy precisa. En el desarrollo proximodistal nos encontramos con dos parámetros, (a) territorial, donde dividimos el ala y axila adulta en zonas que van de distal a proximal, y que atienden a la morfología del tejido, pero también a la expresión de los genes necesarios para que ese tejido alcance su forma y tamaño final (Fig. 11A). También distinguimos (b) el aspecto temporal, donde dividimos la formación del ala, y más concretamente de la axila, en cuatro fases, dando gran importancia a la activación del anillo interno de *wg*, pues esta proteína será determinante para el correcto desarrollo proximodistal de la articulación (Fig. 11B y 11C) (del Alamo Rodríguez et al., 2002; Klein and Arias, 1998; Neumann and Cohen, 1996a; Whitworth and Russell, 2003):

1.- Distinción entre tronco y extremidad: En el segundo estadio larvario, todas las extremidades toman su destino mediante la represión de los genes selectores del destino tronco, *teashirt* (*tsh*) y *homothorax* (*hth*) (Wu and Cohen, 2002; Zirin and Mann, 2004), esto se consigue mediante la activación sinérgica por *wg* y *dpp*, del complejo *elbow / no ocelli* (*el/noc*) (Dorfman et al., 2002; Weihe et al., 2004). *Wg* y *Dpp* también activan al gen selector de extremidad: *distalless* (*dll*) en las patas (Cohen et al., 1989; Gorfinkiel et al., 1997) y *vg* en ala y halterio (Cohen, 1996; Kim et al., 1997; Kim et al., 1996; Williams et al., 1991; Williams et al., 1994).

2.- Vg promueve el desarrollo proximodistal del ala: Al final del segundo estadio larvario, Vg activa de forma no autónoma a una serie de genes (del Alamo Rodriguez et al., 2002; Liu et al., 2000): *rotund (rn)* (St Pierre et al., 2002), *nubbin (nub)* (Ng et al., 1995), *defective proventriculus (dve)* (Kolzer et al., 2003; Nakagoshi et al., 2002), o *four-jointed (fj)* (Cho and Irvine, 2004; Villano and Katz, 1995), que tienen un patrón de expresión concéntrico a *vg*, y que ayudarán a definir los distintos subdominios presentes en el plano proximodistal (Klein and Arias, 1998; Ng et al., 1995; Simmonds et al., 1998).

3.- Activación del anillo interno de *wg*: Los genes *rn* y *nub* se expresan en dos dominios circulares concéntricos de diferente amplitud (Fig. 11G y 11H). Su expresión esta controlada por Vg, y ha de estar mediada por una señal extracelular, pues se activan en células que no expresan *vg* (del Alamo Rodriguez et al., 2002; Liu et al., 2000). Como resultado de la generación de estos subdominios próximo distales, se activa la expresión de un elemento regulador de *wg*, llamado *spade*, en un anillo de células dentro del territorio que dará lugar a la axila (Anillo Interno) (flecha negra, Fig. 11B, 11C y 11D).

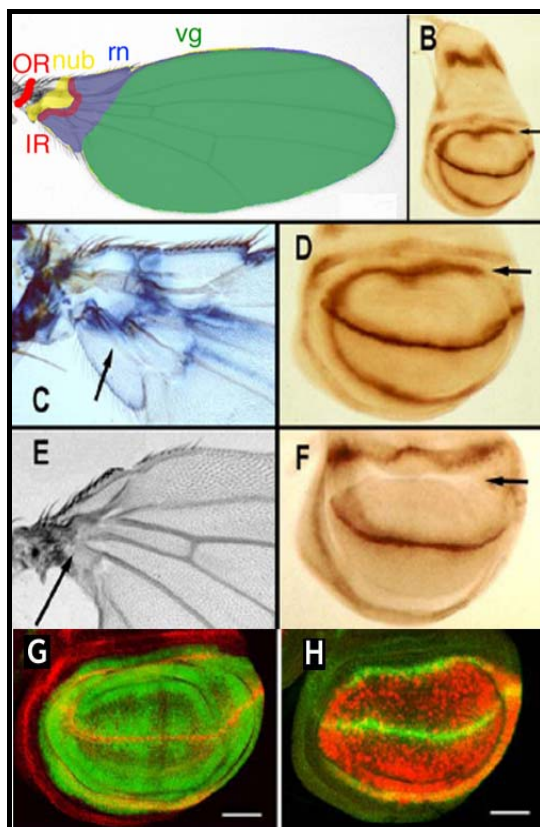


Figura 10.- La especificación de la articulación del ala. A) Patrones de expresión de genes importantes en el desarrollo proximodistal de ala y axila. La expresión de *vg* (verde) delimita el ala, *rn* (morado) la axila distal y *nub* (amarillo) la axila proximal. *wg* (rojo) marca la división entre ambas zonas de axila con su expresión del anillo interno. B) Disco de ala con la expresión de Wg detectada con anticuerpo. La flecha señala al anillo interno. C) Axila mostrando la expresión de *wg* con X-Gal. D) Región ampliada del disco mostrado en (B). E) En individuos homocigóticos *wg[spd-Flag]* se delecciona tejido de la axila distal (flecha). F) En discos de ala de individuos homocigóticos *wg[spd-Flag]* desaparece la expresión de *wg* en el anillo interno G) Patrón de expresión de *nub* (verde) y de *wg* (rojo), en tercer estadio larvario tardío. El dominio de expresión de *nub* se extiende proximal al anillo interno. H) Expresión de *rn* (rojo) y *vg* (verde) en tercer estadio larvario tardío. El anillo interno se expresa coincidiendo con el límite proximal del dominio de *rn*.

En mutantes de falta de función para *rn* y de *nub*, la axila está delecionada, y el anillo interno no se activa (Fig. 11F), de forma que en la articulación del ala este fenotipo es indistinguible del fenotipo del mutante *wg[spade-Fl]* (Fig. 11E). Del análisis funcional se concluye que los genes *vg*, *rn* y *nub* se requieren para la activación inicial de *wg* al principio del tercer estadio larvario.

4.- Proliferación mediada por *wg* de la zona axila: La activación de *wg* en el anillo interno, ejerce en las zonas colindantes una función mitogénica (Neumann and Cohen, 1996a), promoviendo el crecimiento hacia proximal de los dominios de expresión concéntricos de los genes dependientes de *Vg*, que habían sido generados en las fases anteriores. Por tanto, *Wg* será imprescindible en el control del tamaño y la morfología de la axila adulta. A pesar de la proliferación de esa zona del disco, el anillo de células donde se expresa *wg* mantiene su grosor, aunque sí se desplaza proximalmente, generándose un vano con las células que expresan *vg*.

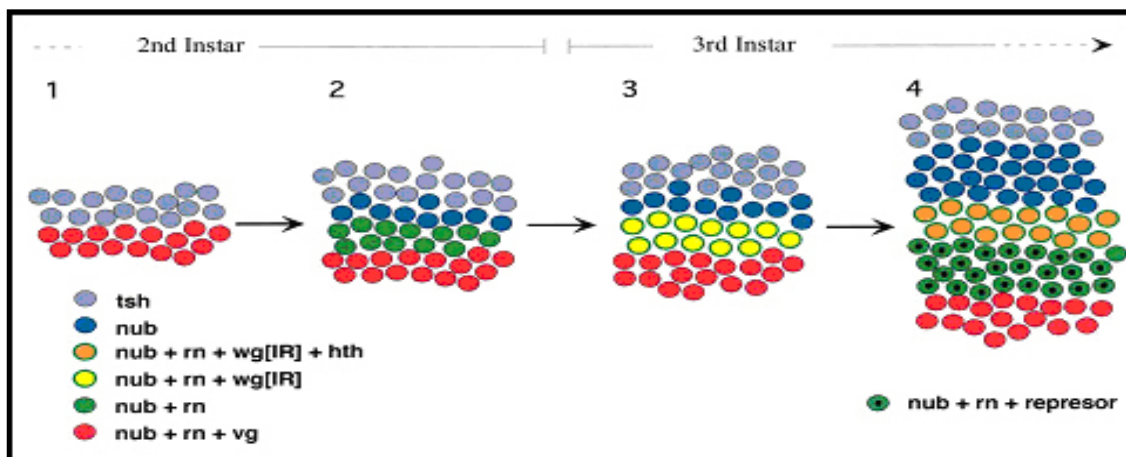


Figura 12.- Modelo para el desarrollo de la región proximal del ala. En segundo estadio larvario *Vg* activa la expresión de *rn* y *nub* de forma autónoma y no autónoma celular. Las células que expresan *rn* y *nub* pero no expresan *vg* son competentes para recibir una señal dependiente de *vg* que activa la expresión del anillo interno de *wg* en tercer estadio temprano. *Wg* es un factor mitogénico en esta región y la proliferación causa, por un lado la expansión de los dominios de expresión de *nub* y *rn* y, por el otro, la intercalación de células entre el anillo interno y el dominio de expresión de *vg*, fuente de la señal activadora. La expresión del anillo interno continúa, a pesar de alejarse de la señal activadora, mediante un circuito de autorregulación mediado por *hth*.

En este estadio el mantenimiento de la expresión de *wg* se hace independiente de *Vg* y requiere la expresión del gen *homothorax* (*hth*). La activación inicial de *hth* requiere *Wg*, por lo que se piensa que la expresión de

wg se mantiene por un mecanismo de autorregulación mediado por Hth (del Alamo Rodriguez et al., 2002). El límite proximal de la expresión de *wg* lo define la expresión de *rn* y se ha propuesto que el límite distal lo define un gen que estaría reprimiendo la continua activación de *wg* dependiente de Vg (del Alamo Rodriguez et al., 2002). El modelo que engloba todas las fases temporales, y dominios espaciales de los genes implicados en el desarrollo proximodistal del ala puede consultarse en la Figura 12.

2. Mutagénesis de Expresión Ectópica

Para encontrar nuevos genes que estuvieran implicados en el desarrollo próximo-distal del ala, llevamos a cabo una mutagénesis de expresión ectópica, mediante la movilización de un elemento EP (Rorth, 1996) (Fig. 13)

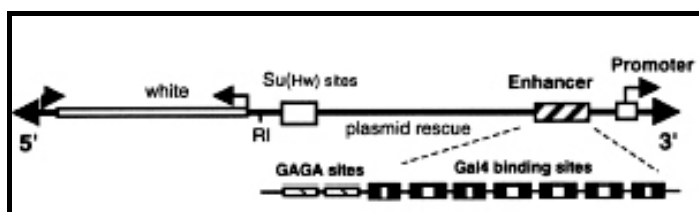


Figura 13.- El elemento EP (Rorth, 1996)

El elemento EP contiene:

- Secuencias UAS: Reconocidas de manera específica por el factor de transcripción de levaduras GAL4, lo que permite la activación del gen que se transcribe 5' de donde este inserto el elemento EP, mediante su cruce con una línea que exprese Gal4 en un patrón determinado (Brand and Perrimon, 1993).
- Gen *w*: Permite la selección de las líneas donde se ha insertado.
- Secuencias de reconocimiento de la trasposasa: Necesarias para hacerlo saltar a través del genoma.

En la mutagénesis que hemos desarrollado, seleccionamos las nuevas líneas EP por el fenotipo que mostraban cuando se cruzaban con *nubGal4* en F1 (Fig. 14A). Usamos este Gal4 porque se expresa en todo el territorio ala, y apenas en el resto de las extremidades, así pudimos seleccionar individuos con un fenotipo que afecta al eje proximodistal, observando la falta o malformación de estructuras características de ese eje, como son las

crosvenas (Fig. 14C) ó la axila (Fig. 14E). Además, encontramos también fenotipos no adscritos a ese eje, como defectos en el eje AP (Fig. 14B), o de adhesión celular (Fig. 14C).

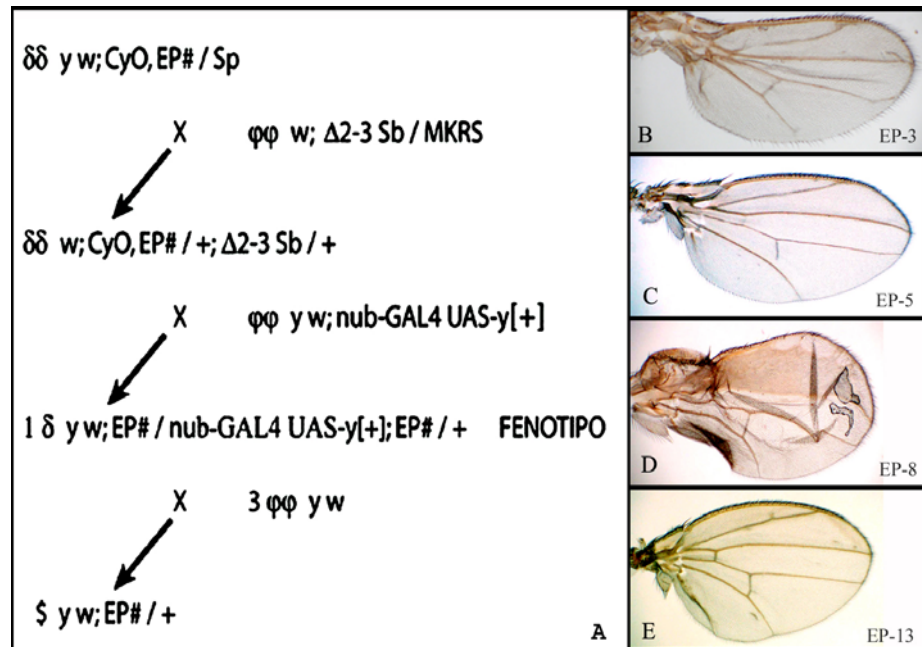


Figura 14.- Mutagénesis de expresión ectópica para localizar nuevos genes implicados en el desarrollo proximodistal del ala. A) esquema de cruces para la obtención de nuevos alelos que afecten al desarrollo proximodistal del ala. Ejemplos de la expresión ectópica de diversas líneas obtenidas esta mutagénesis mediante su cruce con *nub Gal4*: B) EP#3, defectos en el eje AP. C) EP#5, falta de crosvenas. D) EP#8, adhesión celular defectuosa. E) EP#13, falta de axila.

Hasta que la mutagénesis alcanzó su saturación, es decir, cuando comenzaron a repetirse inserciones en un mismo gen, obtuvimos 28 inserciones distintas, con una amplia diversidad fenotípica. El reducido número de líneas con fenotipo (n=28) comparado con el número de inserciones que analizamos (n=69000) se explica por dos motivos, (1) el elemento-EP se inserta con mayor preferencia en unos sitios y no en otros del genoma (Liao et al., 2000), y (2) la sobre-expresión mediante *nubGal4* genera una alta letalidad, debido, posiblemente, a que dirige la expresión también en una porción de células del SNC. Esta alta letalidad fue confirmada mediante el cruce de *nubGal4* con nuestra colección de elementos pUAS, donde comprobamos que sólo sobrevivió la progenie de un 30 % de los cruces.

Para realizar un estudio funcional en detalle seleccionamos la línea *EP#13* (Fig. 14E), porque su fenotipo es la pérdida de gran parte de la axila, lo que recuerda al fenotipo de falta de función del alelo *wg[spd-Fl]*, que afecta específicamente a la expresión de *wg* en el anillo interno (Couso et al., 1994). Esto podría implicar que el gen sobreexpresado actuaría como un represor transcripcional de ese elemento regulador de *wg*. Además, si esto fuera cierto, debería ser específico de solo ese elemento regulador, pues la formación del margen de ala no se ve afectada (Couso et al., 1994), a pesar de que, mediante la activación por *nub-Gal4*, *EP#13* también se co-expresa con los activadores de *wg* en su elemento regulador del margen (Diaz-Benjumea and Cohen, 1995).

3. *EP#13* mapea molecular y genéticamente en *nab*

El elemento-EP, inserto en la línea *EP#13*, se encuentra entre los genes *nab* (Clements et al., 2003) y *masquerade (mas)* (Murugasu-Oei et al., 1995), a una distancia de 86 pb del inicio de la transcripción del primero. Ambos genes están situados en el brazo cromosómico 3L, en la posición citológica 64A8 (Fig. 15A).

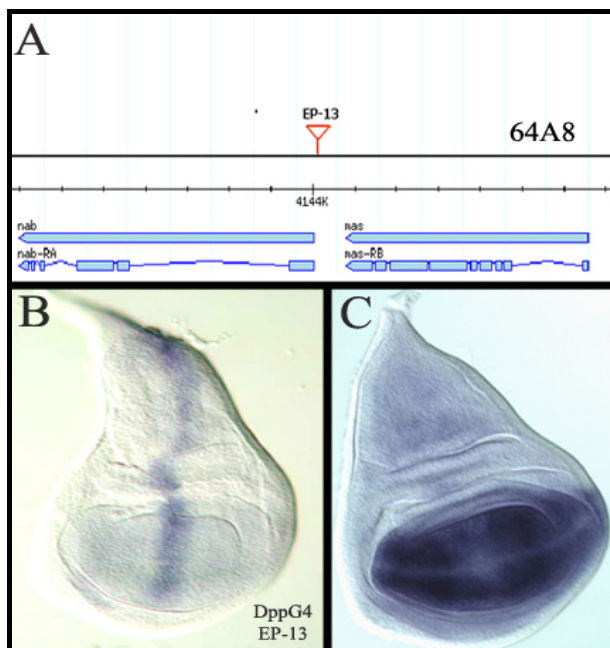


Figura 15.- La línea *EP#13* está insertada en *nab*. A) La línea *EP#13* está insertada en 64A8 entre los genes *nab* y *mas*, a 86 pb del inicio de transcripción de *nab*. Hibridación *in situ* con una sonda frente a *nab* de discos imaginales de ala de B) *EP#13* x *Dpp-Gal4* y C) larvas silvestres

La orientación del elemento EP, que solo contiene secuencias UAS en uno de los extremos (Fig. 13) (Rorth, 1996), muestra a *nab* como el candidato más probable de ser sobreexpresado en la línea EP#13. Para asegurarnos de ello, realizamos una hibridación *in situ*, en discos imaginales de ala, usando una sonda frente al ARNm de *nab*, en moscas *DppGal4/EP#13* (Fig 15B), donde se observa una expresión ectópica de *nab* en el borde AP, si la comparamos con de tinción de discos silvestres, que muestra un patrón de expresión que se restringe al territorio presuntivo de ala y axila (Fig. 15C).

4. *nab* se expresa en el ala hasta el límite distal del Anillo Interno de *wg*:

Como se observa en tinción *in situ* del panel 15C, *nab* se expresa en el disco imaginal en el ala, y con una expresión más débil, en el notum, separada esta expresión de la de ala-axila por un vano. Su límite de expresión proximal en el ala, se corresponde con el pliegue 2, es decir, limita con la expresión de *wg* anillo interno (del Alamo Rodriguez et al., 2002) (Fig. 16A).

La hipótesis de nuestro trabajo es que *nab* actúa como un represor transcripcional del elemento regulador *wg[spd-fl]*, y por tanto debe limitar en distal la expresión de *wg* en el anillo interno, sin que sus expresiones solapen en ninguna célula. Para certificar esta suposición, y analizar en detalle la expresión general de *nab*, generamos un anticuerpo específico contra su proteína. Si observamos una triple tinción inmuno-histoquímica frente a Wg, Nab y Rn, comprobamos que *nab* comienza su expresión al inicio del tercer estadio larvario (72 hrs. AEL) (Fig. 16C), y desde entonces; en tercer estadio medio (96 hrs. AEL) (Fig. 16D); y hasta el final del desarrollo larvario (120 hrs. AEL) (Fig. 16E), mantiene una expresión que limita proximalmente con la expresión distal del anillo interno de *wg*, sin que se solapen nunca ambas expresiones. Además, el límite proximal de la expresión de *rn* coincide célula a célula con el límite proximal del anillo interno, ambos aspectos pueden comprobarse también en el corte en el eje z del territorio ala-axila que se acompaña en los paneles 16D y 16E. Así, la co-expresión de *rn* y *nab* en el disco de ala de tercer estadio, muestra un grupo de células *rn* “positivas” y *nab* “negativas” que coinciden exactamente con las células que expresan *wg* (flecha 16E). Por tanto, tenemos la expresión del anillo interno limitada

proximalmente por la expresión de *rn*, que es uno de sus activadores (del Alamo Rodriguez et al., 2002), y limitada distalmente por una posible represión por *nab*. Queremos resaltar que cuando la expresión de *nab* aun no ha comenzado, en segundo estadio tardío (60 hrs. AEL) (Fig. 16B), la expresión de *wg* en el anillo interno aun no está refinada, es decir, no existe un vano nítido entre su expresión en el anillo interno y en el margen de ala, como sí lo habrá a partir de tercer estadio, cuando comienza la expresión de *nab*.

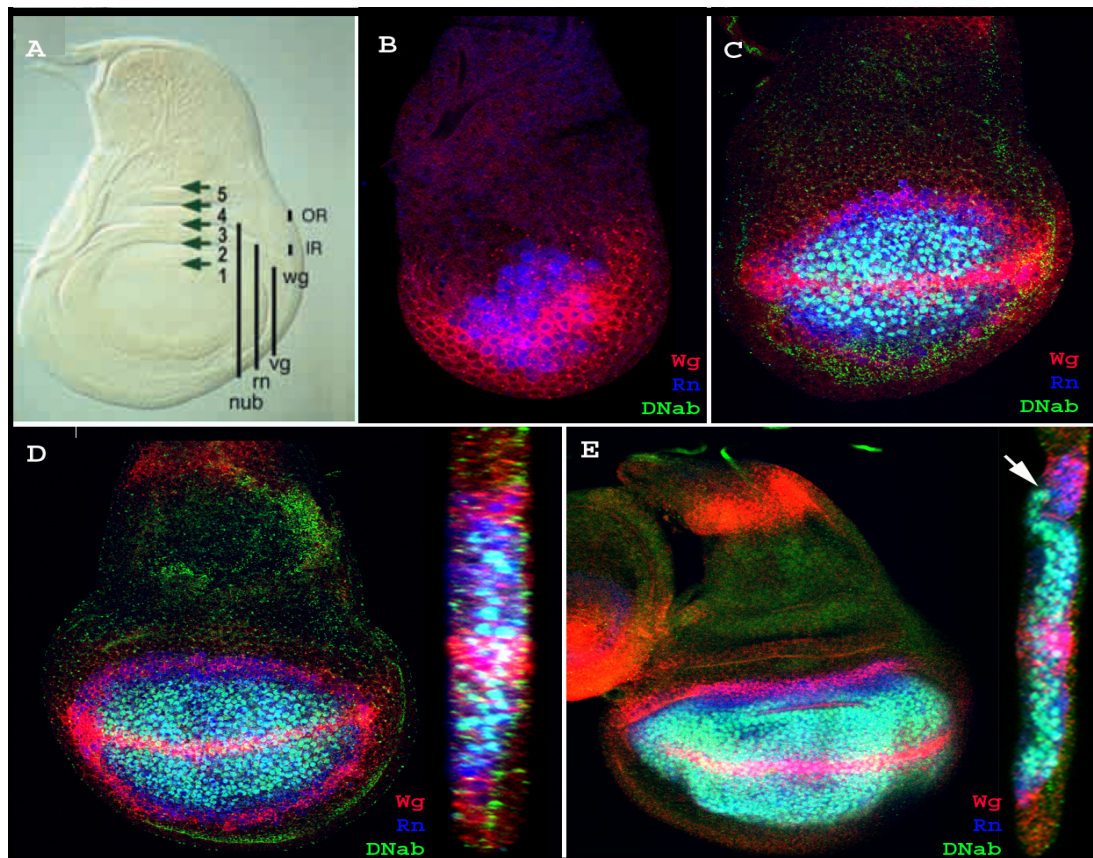


Figura 16.- Patrón de expresión de *nab* en el disco imaginal de ala. A) Esquema de la expresión de *nub*, *rn*, *vg* y *wg*, así como la nomenclatura de los distintos pliegues existentes en ala y axila (del Alamo Rodriguez et al., 2002). Patrón de expresión a lo largo del tiempo en el disco imaginal de ala silvestre, marcado con anticuerpos frente a Wg (rojo), Nab (verde) y Rn LacZ (azul) en: B) Segundo estadio tardío, aún no se expresa *nab* C) Tercer estadio temprano, *nab* comienza su expresión D) Tercer estadio medio, acompañado de un corte en el eje z del territorio ala. E) Tercer estadio tardío, acompañado de un corte en el eje z del territorio ala, la flecha remarca el grupo de células que no expresan *nab* y sí *rn* y *wg*.

Debido a este conjunto de datos preliminares, nos interesa conocer en más detalle su función, y también los genes implicados en su activación en el disco de ala.

5. Caracterización de alelos de falta de función *nab*

Dado que los únicos alelos disponibles de *nab* eran inserciones lacZ y Gal4 (Fig. 17A), y era necesario obtener nuevos alelos que pudieran usarse en combinación con reporteros distintos a los insertados en *nab*, desarrollamos una mutagénesis para generar deleciones en la región codificante, mediante el salto impreciso del elemento EP#13, que está a 86 pb del inicio de la transcripción (Fig. 17A). Una vez seleccionados los 3 nuevos alelos *nab* (R36, R43 y R52), se procedió a su mapeo molecular mediante PCR, usando como molde el ADN genómico obtenido de individuos homocigóticos mutantes para cada una de las deleciones generadas (el proceso entero puede consultarse en Materiales y Métodos). Las deleciones R52, R43 y R36 son de 2.89 Kb, 0.95 Kb y 1.01 Kb respectivamente. Elegimos el alelo R52, para usarlo en futuros experimentos de pérdida de función, por ser el que presentaba la deficiencia más grosera, delecionándose completamente el primer exón y gran parte del primer intrón (Fig. 17A).

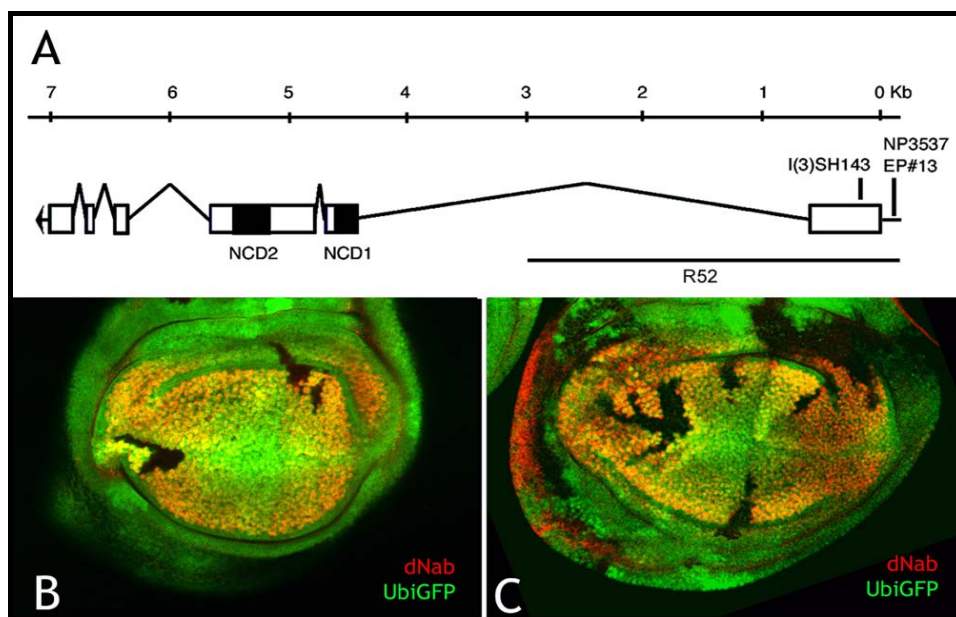


Figura 17.- Caracterización y Análisis de alelos *nab*. A) Representación gráfica del gen *nab* incluyendo los lugares aproximados de inserción para los elementos I(3)SH143, NP3537 y EP#13, así como el tamaño de la deficiencia existente en el alelo *nab*[R52]. Expresión de *nab* (rojo) en clones de falta de función en el ala marcados por la ausencia de GFP para los alelos: B) *nab*[SH143] y C) *nab*[R52]. *nab* desaparece completamente en todos los clones para ambos alelos

Para saber si los alelos *nab*[R52] y *nab*[SH143], los dos alelos que hemos usado en este trabajo, eran nulos, hicimos clones de falta de función en los que observamos la presencia de proteína Nab. Ni en clones de falta de función *nab*[SH143] (Fig. 16B), ni de *nab*[R52] (Fig. 16C) es posible apreciar ningún rastro de proteína Nab, por tanto asumimos que ambos alelos son nulos para el gen.

6. Nab restringe la expresión de *wg* en el anillo interno

Siguiendo con la hipótesis de una posible función de Nab como represor del anillo interno de *wg*, realizamos análisis de pérdida y ganancia de función de *nab*, observando cómo se afecta el patrón de expresión de *wg*. Cuando se hacen clones de falta de función, marcados por la falta de GFP, aparece expresión ectópica de *wg* de forma autónoma celular (flechas, Fig. 18A), aunque la expresión ectópica no se da en todos los clones (29%, n=78), y la mayoría de los expresan *wg* están situados en las zonas laterales y en las más cercanas al margen y al anillo interno, siendo la zona central refractaria a la derrepresión de *wg*. Ambos datos nos hacen pensar que existe redundancia funcional con otros genes, cuyo patrón de expresión quizás esté limitado en las zonas donde hay una mayor penetrancia del fenotipo, posibilidad sobre la que volveremos mas adelante.

La expresión ectópica de *nab*, dirigida por *nubGal4*, reprime la expresión de *wg* en el anillo interno de manera específica (flecha, Fig. 18C), como puede comprobarse, si lo comparamos con la expresión silvestre (flecha, Fig. 18B). Este fenotipo es reproducido, si ahora dirigimos la expresión de *nab* mediante clones de ganancia de función, marcados con GFP (cuadros blancos, Fig. 18D), donde de nuevo se observa que la expresión de *wg* desaparece. Cuando observamos con detalle estos clones (Fig. 18D'), se comprueba que la represión es autónoma celular, y además sólo se ve afectado ese elemento regulador. Con todo ello podemos asumir que *nab* actúa como un represor transcripcional de la activación de *wg* en el elemento regulador del anillo interno, aunque creemos necesario verificar que la expresión ectópica de *wg*, en clones de falta de función, se debe a la activación única de ese elemento regulador, y no de cualquier otro.

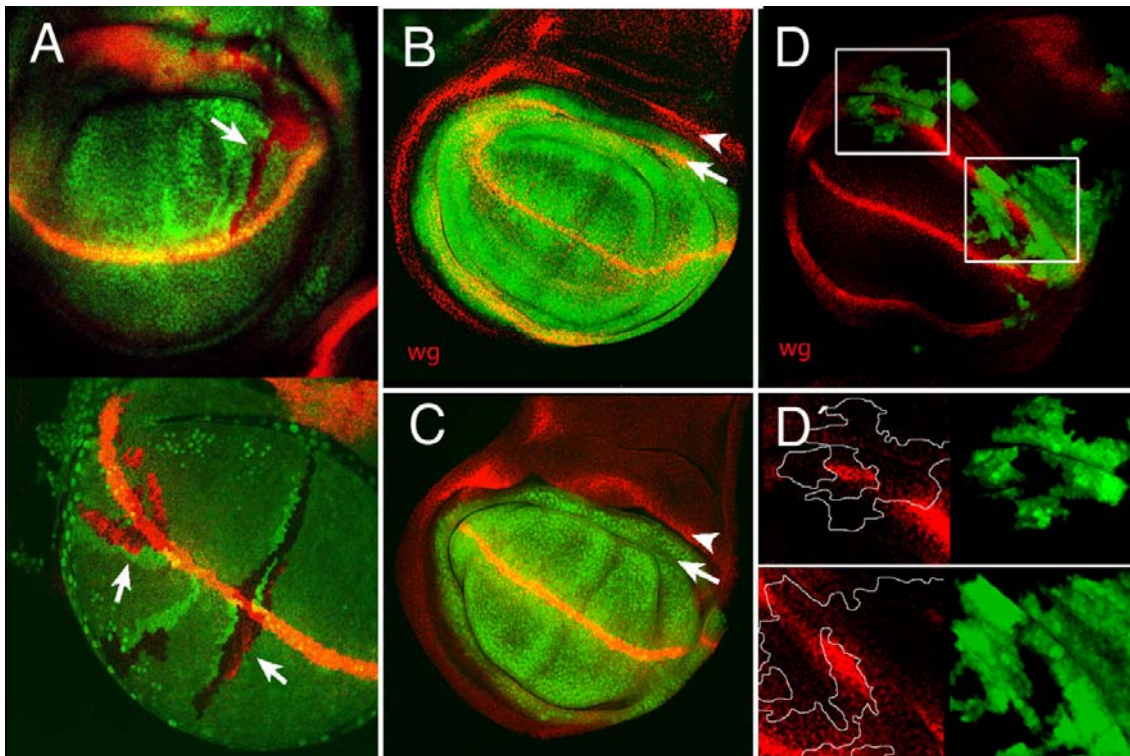


Figura 18.- Nab actúa como un represor del anillo interno de *wg*. A) Clones de falta de función de *nab*[*SH143*] en discos imaginales de ala, marcados por la falta de GFP en verde y teñidos con anticuerpo frente a Wg en rojo. *wg* se expresó ectópicamente en estos clones (flecha). Discos de ala teñidos con anticuerpo frente a Wg (rojo) de: B) *nubGal4/UASGFP* y C) *nubGal4/UASGFP; UASNab/+*. La sobre-expresión de *nab* impide la activación del anillo interno de *wg*. La flecha indica el anillo interno y la cabeza de flecha el anillo externo. D) Clones de expresión ectópica de *nab* (verde): *y w hsFLP¹²²; Act5C>y⁺Gal4 UASGFP/+; UASNab/+*. La expresión de *wg* (rojo) en el anillo interno es reprimida de forma autónoma celular. D') Áreas seleccionadas en D) mostrando ambos canales separados.

7. *nab* sólo afecta el elemento regulador del Anillo Interno de *wg*

En el ala de *Drosophila*, *wg*, además de responder al elemento regulador del anillo interno, se activa por la ruta de *N* en el margen del ala (Diaz-Benjumea and Cohen, 1995) y por la ruta de las Jun-quinasas en células en apoptosis (del Alamo Rodriguez et al., 2004; Perez-Garijo et al., 2004). Para comprobar que la expresión de *wg* en los clones de falta de función de *nab* se debía exclusivamente a la activación del elemento regulador del anillo interno, hicimos clones de falta de función y realizamos dobles tinciones con anticuerpos contra Wg y contra: (1) Cut (*ct*), que es un gen que también se

activa por la ruta de *N* en el margen del ala (Micchelli et al., 1997; Neumann and Cohen, 1996b) (Fig. 19A), y (2) la forma activada de la Caspasa-3 (*casp-3*), que es una proteína que se expresa de manera específica en células apoptóticas (Mancini et al., 1998) (Fig. 19B). Puede comprobarse, en cualquiera de los clones de falta de función de *nab*, donde se observa que *wg* se activa de forma ectópica (marcados con flechas blancas en ambos paneles) que tanto *ct*, como *casp-3* no se expresan, de forma ectópica, junto a *wg*. Así, podemos confirmar que la ruta de *N* no se activa en fondo un mutante para *nab*, y tampoco se produce apoptosis, por tanto, la expresión ectópica de *wg*, sólo puede deberse a la activación del elemento regulador del anillo interno.

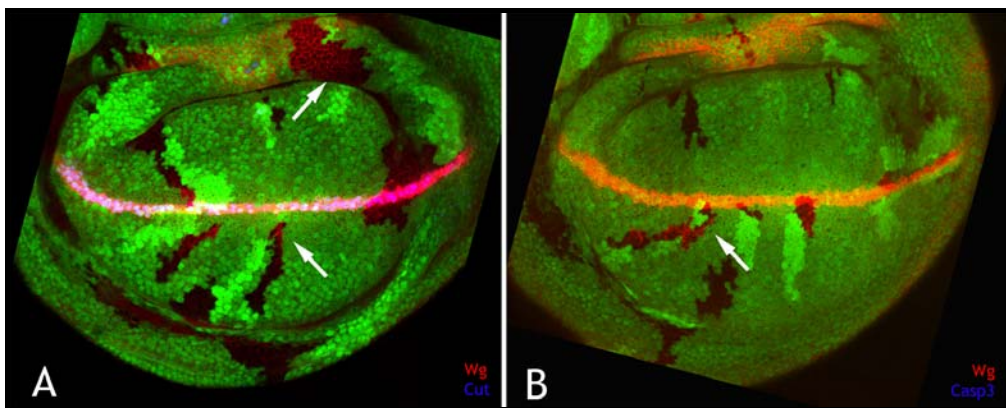


Figura 19.- Nab sólo afecta a la especificación del anillo interno de *wg*. Clones de falta de función de *nab*[*SH143*], marcados por la falta de GFP, tiñendo con anticuerpos frente a: A) Wg (Rojo) y Ct (Azul) y B) Wg (Rojo) y Casp-3 (Azul). Ninguno de los clones que expresan *wg* de forma ectópica, alguno de ellos marcado con flechas blancas en ambas imágenes, expresa también alguno de los otros marcadores.

Una vez comprobado el papel de Nab en la regulación del anillo interno de *wg*, se plantea otra cuestión: Conocer si Vg dirige la expresión de *nab* en el ala, al igual hace con los otros genes implicados en su especificación, como *rn* y *nub* (del Alamo Rodriguez et al., 2002). También es preciso saber si Vg lo hace a través de la activación de una ruta de señalización no autónoma, que se le ha predicho (del Alamo Rodriguez et al., 2002; Liu et al., 2000).

8. *nab* depende de *vg*

Dado que el patrón de expresión de *nab* es concéntrico al de *vg*, y al de sus genes diana: *rn* y *nub* (del Alamo Rodriguez et al., 2002), todos ellos implicados en la activación del anillo interno de *wg*, comprobamos si, al igual que ocurre con ellos, *nab* depende de *Vg* para su activación. Para verificar este supuesto, analizamos la expresión de *nab* en un fondo de falta de función y de expresión ectópica de *vg*. En discos imaginales de ala homocigóticos para el alelo nulo *vg[83b27]*, la expresión de *nab* desaparece completamente del ala, permaneciendo únicamente su expresión tenue del notum (Fig. 20A). Además, la expresión ectópica de *Vg* activa la expresión de *nab* fuera de su dominio natural (Fig. 20B-B'). En ambos ejemplos de expresión ectópica de *Vg* (ver recuadros ampliados de las Figuras 20B y 20B'), se puede ver como la expresión de *nab* (azul) tiene un área mayor que la del clon (verde), es decir *Vg* activa a *nab* a través de un mecanismo no autónomo celular. Al estar marcada simultáneamente la expresión de *wg* (rojo), se puede comprobar como el vano que se genera entre ésta y el clon de *vg*, un fenómeno ya mostrado en estudios previos (del Alamo Rodriguez et al., 2002; Liu et al., 2000), se encuentra relleno por la expresión de *nab*, esto evidencia aún mas su función como represor del anillo interno.

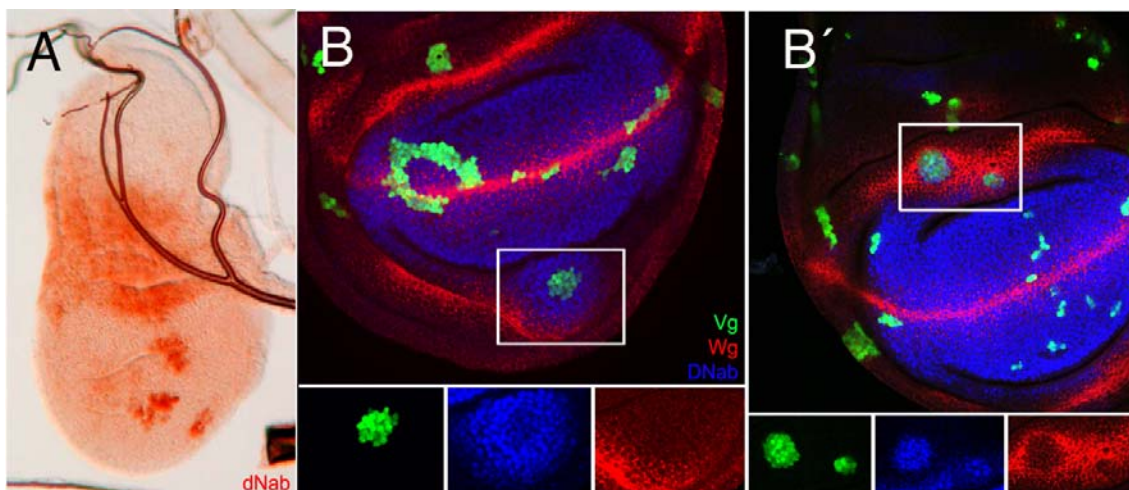


Figura 20.- Activación de *nab* por *vg*. A) Discos de ala homocigóticos para *vg[83b27]*. La expresión de *nab* en el ala desaparece, marcado su anticuerpo mediante la reacción de la peroxidasa. B-B') Clones de expresión ectópica de *vg* (verde): y *w hsFLP¹²²*; *Act5C>y⁺>Gal4 UASGFP/UAS vg*. La expresión de *nab* (azul) se activa de forma no autónoma dentro y alrededor del clon, la expresión de *wg* (rojo) en el anillo interno se reprime de forma autónoma celular en todas las células que ahora expresan ectópicamente *nab* (ver recuadros adjuntos para mayor detalle)

9. Posible función de *zfh2* en la especificación de *nab*

En el capítulo anterior hemos demostrado que el patrón de expresión de *nab* en el ala se controla por *vg*, pero existen, al menos, dos razones para pensar que su regulación depende también de otros factores: (1) su expresión comienza en tercer estadio, mientras que la activación de otros genes diana de *vg* comienza horas antes, lo que implica que, quizás existe algún gen que limita temporalmente su activación, y (2) en tercer estadio tardío existe un vano entre su expresión en el ala y su expresión débil en el notum, lo que puede implicar que exista un gen que lo reprime en esa zona intermedia. Siguiendo estos indicios, y suposiciones, llegamos al gen *Zn finger homeodomain 2 (zfh2)*, cuya expresión, cuando empieza en segundo estadio, se extiende por toda el ala y luego, desde tercer estadio temprano, se restringe a una expresión anular que cubre parte de la zona presuntiva de axila en el disco imaginal (Whitworth and Russell, 2003). Este patrón de expresión dinámico podría coincidir con el de un posible represor de *nab*: (1) impidiendo que comience su activación mientras se expresa por toda el ala en segundo estadio, y (2) cuando su expresión ya es anular, reprimiendo su expresión en el vano existente en la axila. Observando la expresión conjunta de *nab* y *zfh2* se comprueba, en segundo estadio larvario, que mientras *zfh2* aún se expresa en la zona presuntiva de ala, *nab* aun no ha comenzado su expresión (Fig. 21A), y sólo cuando *zfh2* desaparece del centro del ala, a principios del tercer estadio, se activa *nab* (Fig. 21B). Mas tarde en el desarrollo, se observa cómo sus expresiones solapan únicamente en células fronterizas que apenas expresan ambos genes (Fig. 21C, ver también corte en el eje Z adjunto). Para continuar estudiando el posible efecto represor de *zfh2* sobre la expresión de *nab* en el desarrollo del ala, sería necesario ver que ocurre cuando eliminamos o expresamos ectópicamente *zfh2*. El problema es que las herramientas genéticas disponibles, para estudiar la función de *zfh2*, son escasas; por dos razones: su pertenencia al cromosoma 4, donde no existen inserciones FRT, y por el enorme tamaño de la proteína que codifica, que hace inviable la construcción de una línea UAS, que permita su activación ectópica. Las únicas herramientas disponibles son algunos alelos de falta de función hipomorfos y una construcción para sobreexpresar ARN interferente

(*UAS zfh2-ARNi*). Generando clones de ARNi, dentro del dominio silvestre de *zfh2*, se puede comprobar cómo el patrón de expresión de *nab* se expande de forma autónoma celular (recuadro blanco, Fig. 21D). Los clones pueden observarse detalladamente en el panel 21D´.

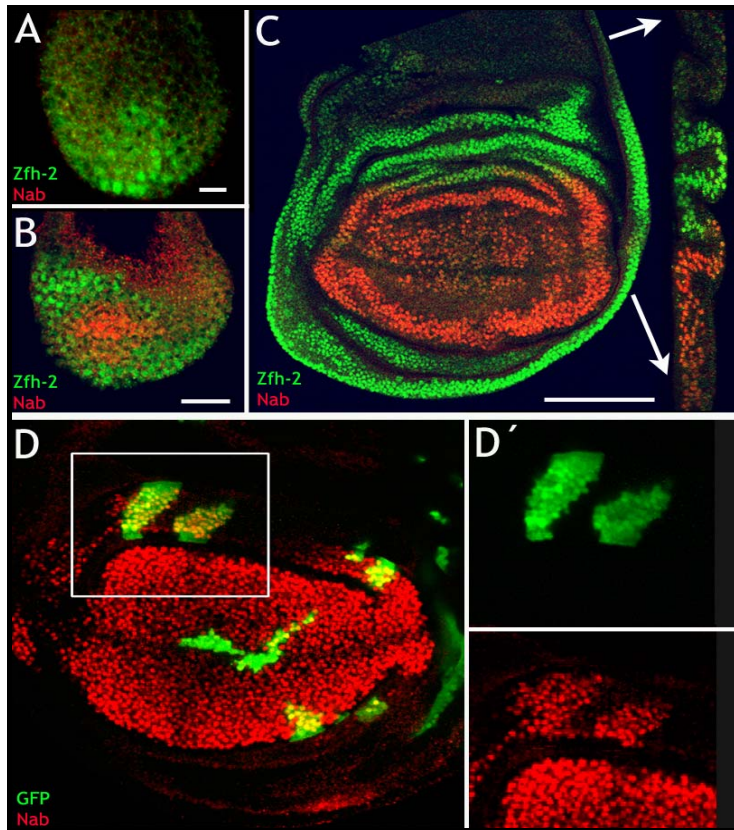


Figura 21.- Relación entre *nab* y *zfh2*. A-C) Patrón de expresión en discos imaginales de ala de *zfh2* (verde) y *nab* (rojo): (A) segundo estadio tardío, *nab* aún no se expresa, (B) tercer estadio temprano, *nab* comienza su expresión en las mismas células donde ya no se expresa *zfh2*, y (C) tercer estadio tardío, sus expresiones se mantienen complementarias, ver corte en el eje Z adjunto. D-D´) Clones de expresión ectópica de *zfh2-ARNi* (verde) mirando *nab* (rojo): y *w^{hsFLP}122; Act5C>y⁺>Gal4 UASGFP/UAS zfh2-ARNi*, D) observar como se expande la expresión de *nab* en el territorio clonal (recuadro blanco), D´) clones con mayor detalle y separados por canales.

Las expresiones complementarias de ambos genes, a lo largo del desarrollo imaginal, y la expansión de *nab*, mostrada en el ensayo de falta de función de *zfh2*, sugieren que la hipótesis inicial puede ser cierta, pero se requieren más experimentos, para asegurar con rigor que *Zfh2* actúa como un represor de *nab* en el ala.

10. *nab* no regula la expresión de *zfh2*

Una de las preguntas que sugiere la visión de las expresiones complementarias de *nab* y *zfh2*, es la posibilidad de que *nab* actúe a su vez como un represor de *zfh2* en el ala. Para evaluar esa posibilidad realizamos experimentos de expresión ectópica de *nab*, observando *zfh2* (rojo) y *wg* (azul) (Fig. 22). La expresión ectópica de *Nab*, marcada con una flecha, reprime de

manera autónoma el anillo interno de *wg*, pero es incapaz de inhibir la activación de *zfh2* (ver canales separados en la zona izquierda del panel). Sólo se percibe una depleción en la expresión, que quizás es debida a la insuficiencia de *wg*, que se ha postulado como uno de sus activadores en el ala (Whitworth and Russell, 2003). Podemos afirmar, respecto a la relación entre ambos genes, que hay bastantes indicios de que *Zfh2* restringe la expresión de *nab* en el ala, pero no ocurre así en el sentido inverso.

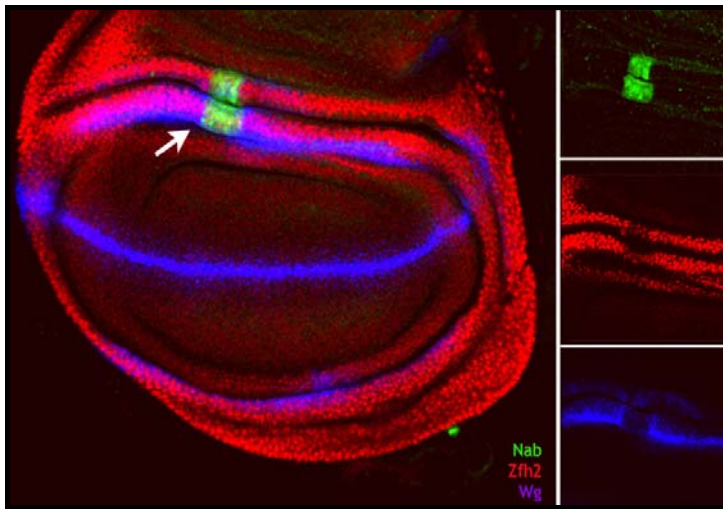


Figura 22.- *nab* no limita la expresión de *zfh2* en el ala. Clon de expresión ectópica de *nab* (verde) observando *zfh2* (rojo) y *wg* (azul). A la derecha se puede ver en detalle la separación por canales. En el territorio clonal (flecha blanca) se reprime de forma autónoma celular la expresión de *wg*, pero no la de *zfh2*.

11. *nab* interacciona genéticamente con *rn*

Teniendo en cuenta el mecanismo de acción descrito para las proteínas Nab en vertebrados, que interaccionar con los factores de transcripción EGR, para ejercer su función, y dado que *nab* actúa como represor en el ala, quizás lo hace a través de su interacción con alguno de los activadores del anillo interno de *wg*. Siguiendo esta argumentación pensamos que *rn* era el candidato mas factible, pues además de ser un activador del anillo interno de *wg* (del Alamo Rodriguez et al., 2002), es también un factor de transcripción del tipo Kruppel ZF, como las proteínas EGR (St Pierre et al., 2002). *Rn* se expresa en el ala en un dominio concéntrico, pero más amplio que el de *nab* (Fig. 16B-16E) y también se expresa en los tarsos 2 a 4 de la pata, donde *nab* no lo hace. Los fenotipos de la falta de función de *rn* (*rn[5]/rn[20]*), son las deleciones de gran parte de la axila y de los tarsos 2 a 4 (del Alamo Rodriguez et al., 2002; St Pierre et al., 2002) (Fig. 23B).

Si *nab* está interaccionando con *rn*, e impidiendo la activación de sus genes diana, la expresión de *nab* en todas las células que expresan *rn* debería tener el mismo fenotipo que la falta de función de *rn*. Para comprobarlo expresamos ectópicamente *nab* en todos los dominios donde *rn* se expresa, (*rnGal4/EP#13*). Las alas y patas adultas, de esta combinación genética (Fig. 23C), presentan el mismo fenotipo, de delección de tejido, que la falta de función *rn* (Fig. 23B), si las comparamos con alas y patas silvestres (Fig. 23A).

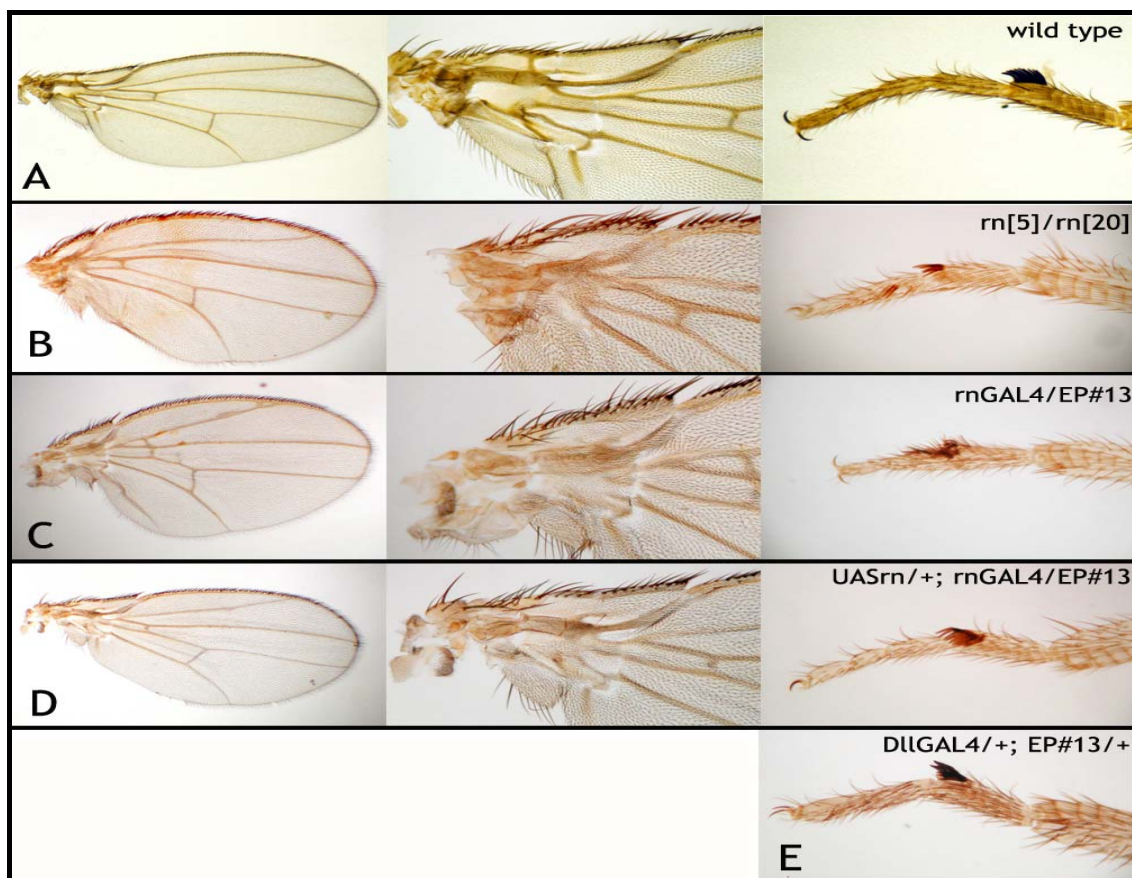


Figura 23.- Análisis en adultos de la interacción genética ente *nab* y *rn*. A-D) Patas, alas y una ampliación de la zona de la axila para: A) moscas silvestres, B) *rn[5]/rn[20]*, C) *rnGal4/EP#13* y D) *UASrn/+; rnGal4/EP#13*. E) Patas de *DIIGal4/+; EP#13/+*. Los fenotipos de falta de función *rn* mostrados en (B) y los de sobre-expresión de *nab* en (C) son idénticos, los tarsos se han perdido o están muy reducidos y la axila está deleccionada. En (D) las patas y alas mostradas en (C) están parcialmente rescatadas por la sobre-expresión de *UASrn*. Comprobar que aunque *nab* en (E) está activado en un dominio más amplio (todos los tarsos y mitad de tibia) que en (C) el fenotipo es el mismo y se restringe a la misma zona.

Cuando expresamos junto con Nab, mas cantidad de Rn, mediante la adición de una copia de *UAS rn* (*UAS rn/+; rnGal4/EP#13*), encontrábamos que hay una reversión parcial de los fenotipos (Fig. 23D). Es decir, Rn es capaz de

activar a sus genes diana, si se sobrepasa la cantidad de Rn que Nab es capaz de anular. Para asegurarnos de que el fenotipo de expresión ectópica de *nab* en patas, era específico del dominio de expresión de *rn*, activamos ectópicamente *nab* en un dominio mas amplio que el de *rn*, mediante la línea *DistallessGal4 (DllGal4)*, que se expresa en todos los tarsos y gran parte de la tibia (Calleja et al., 1996). El fenotipo de esta combinación genética (*DllGal4/+; EP#13/+*) (Fig. 23E) era idéntico al observado en la expresión ectópica de *nab* restringida al dominio *rn* (Fig. 23C). Es decir, fuera del dominio *rn*, *nab* no ejerce ninguna función.

12. Interacción genética *nab/rn* en el disco imaginal de ala

Para estudiar de forma mas precisa cómo se producen estos fenotipos, es necesario conocer cómo se expresan las proteínas implicadas. Comparando discos imaginales de ala donde solo se sobreexpresa *nab* (*rnGal4/EP#13*) (Fig. 24A), con discos donde simultáneamente expresamos más *rn* (*UASrn/+; rnGal4/EP#13*) (Fig. 24B), podemos comprobar que la reversión parcial del fenotipo hacia silvestre, se debe a que hay una recuperación en la expresión de *wg* (rojo) en su elemento regulador del anillo interno (flecha). Así, en los cortes en el eje Z, que se adjuntan en la figura 23B, se observa incluso, que existiendo co-expresión entre *wg* y *nab* (azul), una mayor cantidad de Rn (verde), permite soslayar el efecto represor que provoca Nab en el elemento regulador de anillo interno.

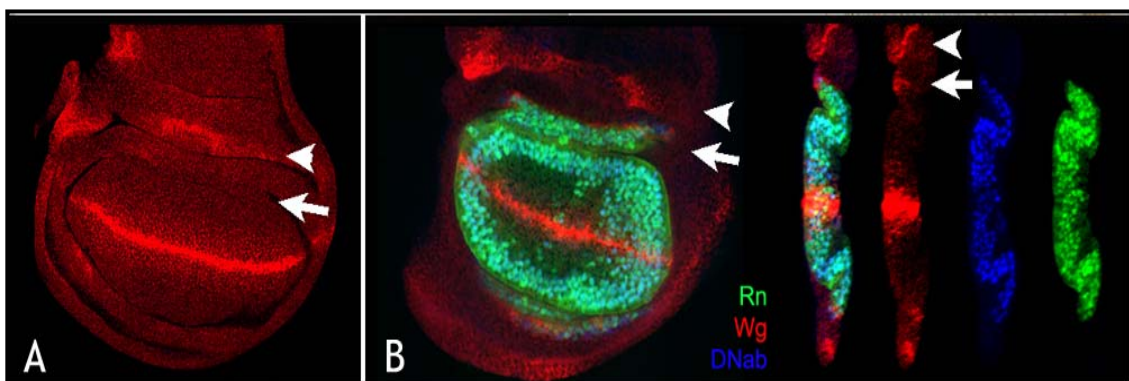


Figura 24. Análisis en disco imaginal de la interacción genética entre *nab* y *rn*. A-B) Anticuerpos contra Wg (rojo), Nab (azul) y RnGal4 UASGFP (verde) en discos de ala de (A) *rnGal4 UAS GFP/EP#13* y (B) *UASrn/+; rnGal4 UASGFP/EP#13*. Las flechas blancas indican el anillo interno y las cabezas de flecha el externo. Observar cómo en (A) la expresión de *wg* in el anillo interno se ha perdido. La sobre-expresión simultanea de Rn y Nab mostrada en (B) rescata parcialmente la expresión de *wg* en el anillo interno. En el panel de la derecha se ven los distintos canales de un corte en el eje Z donde se muestra como en este genotipo existe co-expresión entre *wg* y *nab*.

13. Homología entre las proteínas Rn, Roe y Sqz

En los capítulos precedentes hemos demostrado que Nab actúa como un represor de la activación del anillo interno de *wg*, a través de su interacción con *rn*. Sin embargo, encontramos una paradoja: moscas homocigóticas para mutaciones de falta de función de *rn*, muestran fenotipos en alas y patas, pero sobreviven hasta la edad adulta (St Pierre et al., 2002), por el contrario, individuos homocigóticos, para mutaciones de falta de función de *nab*, mueren a comienzos de su ciclo larvario. Esta contradicción implica que *nab* debe tener más funciones en el desarrollo, y por tanto más socios a través de los cuales ejecutarlas.

Dado que *rn* es el único gen conocido con el que interacciona, pensamos que quizás los genes *roughened eye (roe)* y *squezze (sqz)* (St Pierre et al., 2002), que tienen gran homología con *rn*, y que han sido implicados respectivamente, en el desarrollo del ojo (St Pierre et al., 2002) y del SNC (Allan et al., 2003), podrían ser esos socios en el resto de los procesos. Se puede comprobar, gracias a un alineamiento entre sus secuencias proteicas, realizado mediante el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Fig. 25A), la alta homología entre las tres proteínas, tanto el dominio Zinc Finger (ZF), con un 90%, como en un dominio C-Terminal de 33 aa, al que llamaremos C, con un 88%; subrayados ambos en amarillo. El dominio ZF es muy parecido al existente en otras proteínas de la familia *Kruppel*. Sin embargo, el dominio C no tiene homología con algún dominio presente en otras proteínas de *Drosophila*, o de vertebrados, incluyendo proteínas ortólogas de Rn (P.Ej.: CIZ, *Rattus novargicus*). Aunque sí, lo hemos localizado en sus ortólogos de otros insectos (P.Ej.: GA18968, *Anopheles gambiae*). Esta conservación evolutiva parcial, quizás indica que C pueda tener cierta relevancia biológica en la función de Rn, Sqz y Roe. Las homologías entre las tres proteínas, se esquematiza en la figura 25B, marcando el dominio ZF en azul, y el dominio C en verde.

En los siguientes capítulos trataremos de demostrar si la letalidad temprana de *nab*, o sus posibles funciones alternativas al desarrollo del ala, se deben a su verosímil relación con *roe* y/o *sqz*.

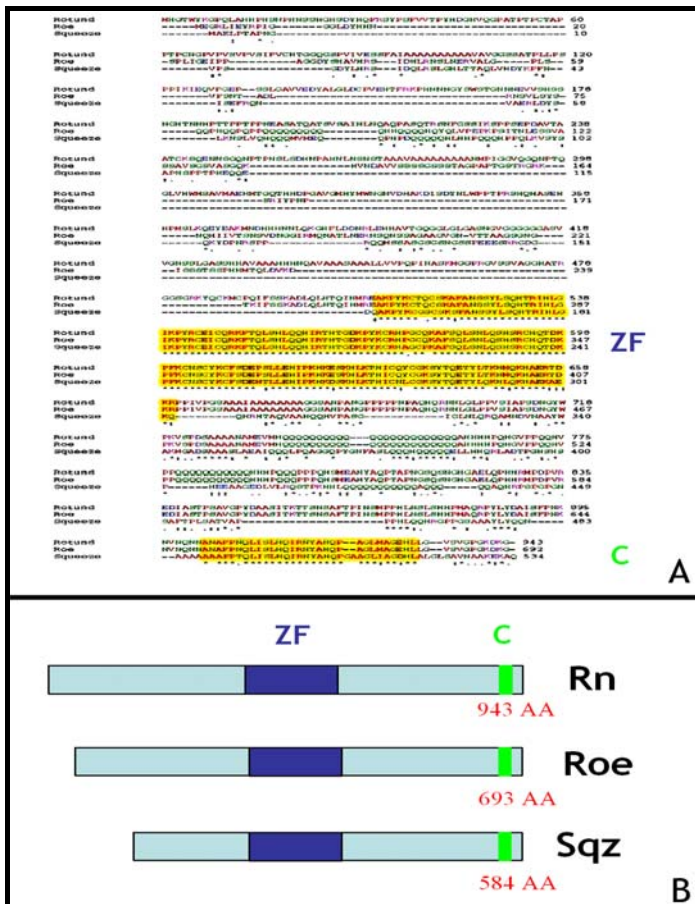


Figura 25.- Los dominios conservados ZF y C. Alineamiento de secuencias de proteínas de Rn (arriba), Roe (centro) y Sqz (abajo), mostradas como: A) Secuencias alineadas mediante ClustalW. En amarillo se marcan las regiones conservadas entre las tres proteínas: ZF y C. los símbolos bajo el alineamiento significan: (*) aa idénticos, (:) sustitución conservada y (.) sustitución sem.-conservada. B) Diagrama donde se marcan aproximadamente las dos regiones conservadas, ZF en azul y C en verde.

14. Relación entre *nab* y *roe*

Los genes *rn* y *roe* forman una unidad transcripcional compleja, pues tienen inicios de transcripción distintos, pero comparten sus dos exones C-terminales, que incluyen los dominios ZF y C. Además, su regulación hace que sus expresiones nunca se solapen: *rn* se expresa en ala, pata y antena, mientras *roe* solo se expresa en ojo; (St Pierre et al., 2002).

La falta de función de *roe*, tanto en clones, como en individuos homocigóticos, da un fenotipo de ojos rugosos, que se corresponde con un menor número de fotorreceptores (Fig. 26B) (St Pierre et al., 2002), si son comparados con ojos silvestres (Fig. 26A). *roe* se expresa en el surco morfogenético del disco imaginal de ojo, como puede comprobarse mediante hibridación *in situ* (punta de flecha negra, Fig. 26D), pero se desconoce quién lo activa y cuales son sus posibles genes diana (St Pierre et al., 2002). Nos ha llamado la atención que *nab* se expresa también en el disco imaginal de ojo, de manera similar a *roe* (Fig. 26E), y que su expresión ectópica, mediante un Gal4 específico de ojo, *eyeless Gal4* (*ey GAL4*), da un fenotipo parecido al de

la falta de función *roe* (Fig. 26C). Estos experimentos podrían indicar que Nab esté actuando como un represor de la función *roe*, al igual que hace con *rn* en el desarrollo del ala. Pero no podemos afirmarlo con rigor, pues nos faltan evidencias que demuestren una relación entre *nab* y *roe*, similar a la existente con *rn*: desconocemos si sus expresiones son coincidentes a nivel celular, y no sabemos como se afecta el ojo en mutantes de falta de función para *nab*. En cualquier caso, la letalidad temprana de los individuos mutantes para *nab* tampoco podría deberse a su interacción con *roe*, pues los individuos mutantes para *roe* sobreviven también hasta estadio adulto (St Pierre et al., 2002).

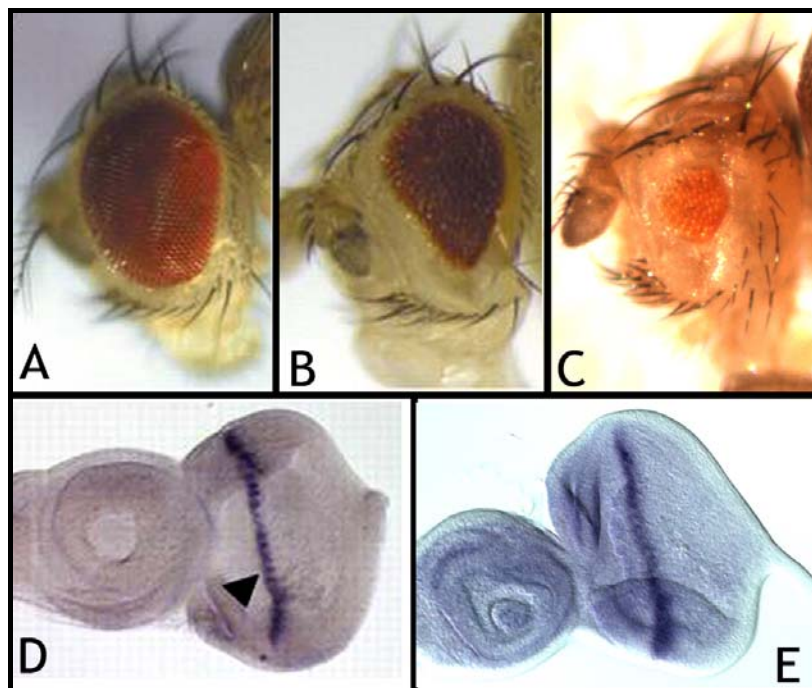


Figura 26.- Relación entre *nab* y *roe*. Ojos de individuos: A) silvestres, B) combinación alélica nula para *roe* (*rn*[16]/*rn*[20]), y C) *ey GAL4/UAS nab*. Obsérvese la disminución de fotorreceptores y rugosidad de los fenotipos mostrados en (B) y (C) si se comparan con (A). Hibridación *in situ* en discos imaginales de ojo usando sondas contra D) *roe* y E) *nab*. Sus patrones de expresión son muy similares. Las fotos A, B y D se han tomado de (St Pierre et al., 2002)St Pierre et al., (2002)

En los capítulos siguientes introduciremos el desarrollo del SNC, que es el único tejido donde se ha descrito alguna función para *sqz*. De esta forma podremos entender, si *nab* colabora de alguna manera, en la regulación de los genes diana de *Sqz*.

15. Desarrollo del Sistema Nervioso Central

El SNC de *Drosophila* se divide en lóbulos cerebrales y Cuerda Nerviosa Ventral (CNV). Hablaremos del desarrollo de la Cuerda Nerviosa Ventral por ser el tejido donde se conocen funciones a Sqz. La CNV está formada en su etapa adulta por unas 10000 células, divididas en 400 por hemisegmento. Estas células serán generadas, desde el embrión, después de múltiples rondas de división celular, a partir de un número muy reducido de precursores neurales, los neuroblastos. Se conoce, relativamente bien, cuales son los mecanismos genéticos, que hay detrás de la especificación, de cada uno de los neuroblastos a partir de un tejido indiferenciado. Pero los genes que intervienen en el posterior desarrollo, para generar y dar identidad a toda la diversidad neural postmitótica: interneuronas, motoneuronas y células neurosecretoras, se desconocen en su mayoría.

El desarrollo de la CNV comienza, cuando las señales que especifican las coordenadas del eje antero-posterior y el dorso-ventral del embrión: los genes de *polaridad segmental* (Bhat and Schedl, 1997; Skeath et al., 1995) y los *columnares* (*msh*, *ind*, *vnd*) (von Ohlen and Doe, 2000; Weiss et al., 1998), solapan entre si, generando una malla proteica que se traduce en un patrón fijo de *sectores proneurales* (Doe, 1992) (Fig. 27A y B): Llamados así, por su capacidad neurocompetente. Cada sector proneural se refinará en treinta neuroblastos por hemisegmento, de forma cada neuroblasto se distingue por su posición respecto al eje AP y DV (Urbach and Technau, 2003). Cada uno de estos neuroblastos, será progenitor de un conjunto celular concreto del SNC (Schmid et al., 1999).

La especificación del neuroblasto, dentro del sector proneural, se da mediante un mecanismo de *inhibición lateral* (Heitzler and Simpson, 1991; Lu et al., 2000), dependiente de la ruta de N (Skeath and Carroll, 1992). La inhibición lateral consiste en que todas las células del grupo expresen *Delta* (*Dl*) (Vassin et al., 1987), uno de los ligandos de N. Cuando Dl se une a N se activa el complejo *enhancer of split* (*e-spl*) (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Kopan, 2002), que reprime a los genes selectores de especificación neural: el complejo *acheate-scute* (*ac-sc*) (Skeath and Carroll, 1994; Skeath and Doe,

1996; Villares and Cabrera, 1987) en todas las células, excepto en la célula que expresó mayores niveles de DL.

Una vez se especificado el neuroblasto, se invagina (Fig. 27C), y comienza a dividirse de forma asimétrica, dando lugar a una célula madre neural (*Ganglion Mother Cell, GMC*), y otro neuroblasto (Fig. 27D) (Wang and Chia, 2005). Se dan cuatro divisiones más, acompañadas por la expresión consecutiva, en cinco ventanas temporales de cinco factores de transcripción: *Krupel*, *hunchback*, *pdm* [*nubbin (nub)* y *pdm2*], *castor* y *grainyhead* (Brody and Odenwald, 2000; Grosskortenhaus et al., 2005; Isshiki et al., 2001). En el primer neuroblasto, y en su célula hija neural, se expresa *Krupel*, que activa a *hunchback* en el neuroblasto hijo. A su vez, *Krupel*, activo en el neuroblasto padre, se reprime en el hijo. Este mismo proceso se repite en las siguientes divisiones asimétricas, para el resto de los genes (Fig. 27E). De esta forma, nos encontramos con amplias poblaciones celulares del SNC, que derivarán de cada uno de los cinco neuroblastos genéticamente distintos que se establecen (Fig. 27F) (Brody and Odenwald, 2005; Skeath and Thor, 2003).

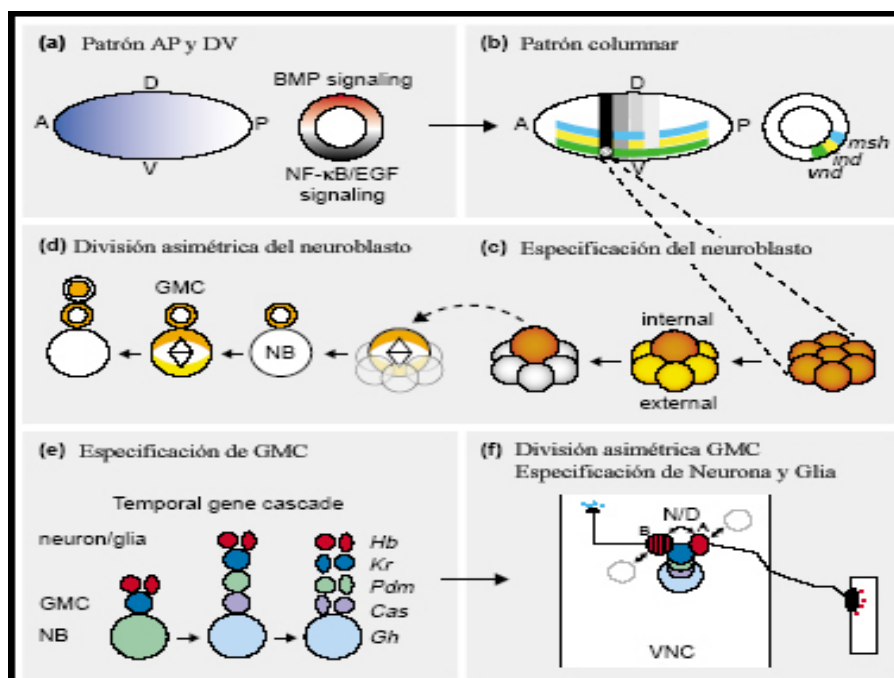


Figura 27.- Desarrollo del SNC. A) Ejes primarios AP y DV en el embrión. B) Generación de los distintos territorios proneurales en la intersección de los patrones de expresión de los genes *segment-polarity* y columnares. C) Inhibición lateral e invaginación del neuroblasto seleccionado. D) División asimétrica del neuroblasto en una GMC y un nuevo neuroblasto. E) Expresión secuencial de los genes que dan identidad a cada uno de los neuroblastos y a las células que de ellos derivan. F) Especificación de las células que forman la VNC. Adaptado de Skeath and Thor (2003)

16. Funciones de *sqz* en el desarrollo del SNC

Cuando se ha producido el conjunto de neuronas post-mitóticas, se distinguen unas de otras, por su pertenencia a grupos cuya nomenclatura depende de: (a) su posición dentro de la CNV, (b) la expresión en el grupo de algún gen específico, y (c) la función que desempeña ese grupo. Siguiendo estas reglas, encontramos que a partir del estadio 16 de la embriogénesis, comienza a especificarse, en cada uno de los seis hemisegmentos torácicos, el grupo Tv, formado por 4 neuronas que expresan *ap*, aunque a veces se observan 5 neuronas en los grupos del segmento T1 (Tv1).

El grupo Tv se caracteriza por: (a) su posición ventro-lateral específica, (b) la expresión de *ap* en las cuatro neuronas que lo forman y (c) una de sus funciones es expresar el neuropéptido FMRFa, en una de sus neuronas, denominada también Tv. En la Figura 28 se observa, desde un punto de vista ventral, una CNV de larva de segundo estadio, marcada con *ap LacZ* (rojo). En la imagen se distinguen los grupos vAp, enfrentados bilateralmente en todos los segmentos, y formados, cada uno de ellos, por dos células. Los vAp se encuentran en una posición más ventral que los grupos Tv, que sólo están en los hemisegmentos torácicos, en una posición más lateral. El cuadro blanco marca uno de los dos grupos Tv1.

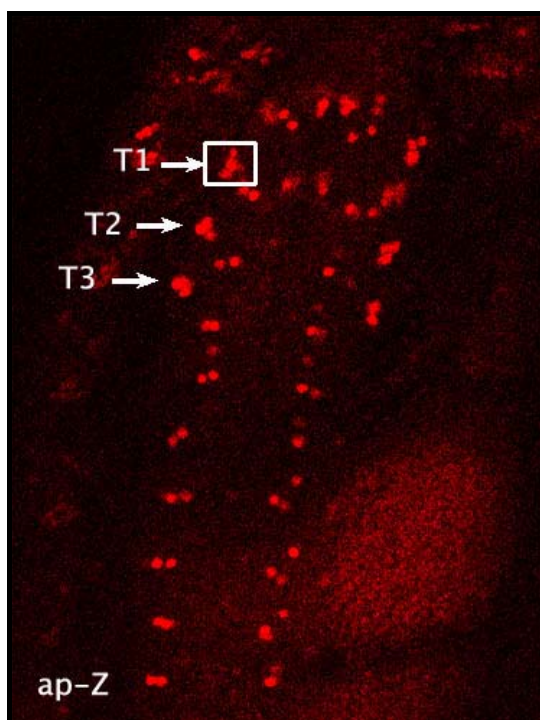


Figura 28.- Patrón de expresión de *ap* en la CVN. Cuerda Ventral Nerviosa (CVN) de una larva de segundo estadio, marcada con *ap-LacZ*. En las zonas más laterales de los hemisegmentos torácicos encontramos los grupos Tv. El recuadro blanco rodea al grupo izquierdo Tv, del segmento T1 (Tv1).

FMRFa se expresa sólo en 44 células de las 10000 que forman la CNV adulta, incluyendo las 6 neuronas Tv. En cada uno de los tipos celulares donde se expresa tiene una regulación diferente (O'Brien et al., 1991; Schneider et al., 1991; Schneider et al., 1993). Una de las funciones, en insectos, de la familia de péptidos FMRF es promover la eficacia sináptica en la unión neuromuscular, regulando la intensidad de la contracción muscular (Robb and Evans, 1994), esto tiene implicaciones en motilidad, alimentación y puesta de huevos (Wang et al., 1995) En vertebrados, se ha propuesto, además de esta función (Nishimura et al., 2000), el control en la respuesta a opiáceos (Kavaliers, 1990). Desde las neuronas Tv, los péptidos FMRFa, se secretan hasta el órgano neurohemal (ONH). La función de este órgano es almacenar neuropéptidos, y secretarlos a la hemolinfa, es decir, a través del ONH, FMRFa actúa de forma sistémica, como lo haría una hormona, y no focalmente a un músculo concreto, como lo hace un neuropéptido al uso.

Las funciones de *sqz* que se conocen en el desarrollo de la CNV se centran en el grupo Tv, y se relacionan primero con la especificación del número de neuronas que forman el grupo, y después con la activación transcripcional en la neurona Tv del neuropéptido FMRFa:

1.- Especificación del grupo Tv: Los seis grupos Tv expresan *ap*, pero su función no es especificarlos, si no dar identidad a sus células, es decir, en embriones y larvas que carecen de *ap* las células del grupo sobreviven, y mantienen sus propiedades morfológicas, pero tienen problemas en fascicular sus axones entre si (Lundgren et al., 1995), y también en expresar FMRFa (Benveniste et al., 1998). Sin embargo, la especificación del grupo, depende, al menos en parte, de *sqz*. *Sqz* actúa, en el estadio 16/17 de la embriogénesis, restringiendo el número de células que forman el grupo, quizás a través de un mecanismo de inhibición lateral vía N, aunque el único indicio de ello es que la falta de función de *sqz* fenocopia a la de N: en ambos mutantes el número de neuronas, marcadas por la presencia de *ap*, pasa de ser 4/5 a 6/7 (Allan et al., 2005).

2.- Activación de FMRFa en la neurona Tv del grupo Tv: Una vez se ha especificado el número de neuronas que forman el grupo Tv, la activación de FMRFa se da en dos fases. La primera es la iniciación (estadio 16), donde se

requiere la expresión simultánea, y acción combinatorial, en la neurona Tv, de varias proteínas: *ap* que se expresa en las 4 células, *dimmed (dim)* que es un gen específico de células neuropeptidérgicas, que sólo se expresa en las neuronas Tv y Tvb, y actúa amplificando la activación transcripcional de neuropéptidos (Hewes et al., 2003). *Dachshund (dac)*, que se expresa en las neuronas Tv, Tva y Tvc (Miguel-Aliaga et al., 2004). Y *sqz* que se activa fuertemente en la Tv, y débilmente en Tvb y Tva (Allan et al., 2003). Todos son necesarios y actúan en este proceso como co-activadores. Una vez ha comenzado la activación de *FMRFa*, comienza la siguiente fase, la activación retrograda (estadio 17): *FMRFa* se secreta al ONH, desde el axón de la neurona Tv. En el ONH se activa *glass bottom boat (gbb)*, un ligando de la familia BMP, que interaccionará con su receptor, *wishful thinking (wit)*, presente en el axón de la neurona Tv. Esta interacción genera una activación retrograda y de refuerzo de *FMRFa* en la neurona Tv (Allan et al., 2005; Allan et al., 2003; Marques et al., 2003). En esta segunda fase también actúa *eyes absent (eya)*, que es necesario para la correcta guía axonal hacia el ONH (Miguel-Aliaga et al., 2004) (Fig. 29, tomada de Miguel-Aliaga et al. (2004)).

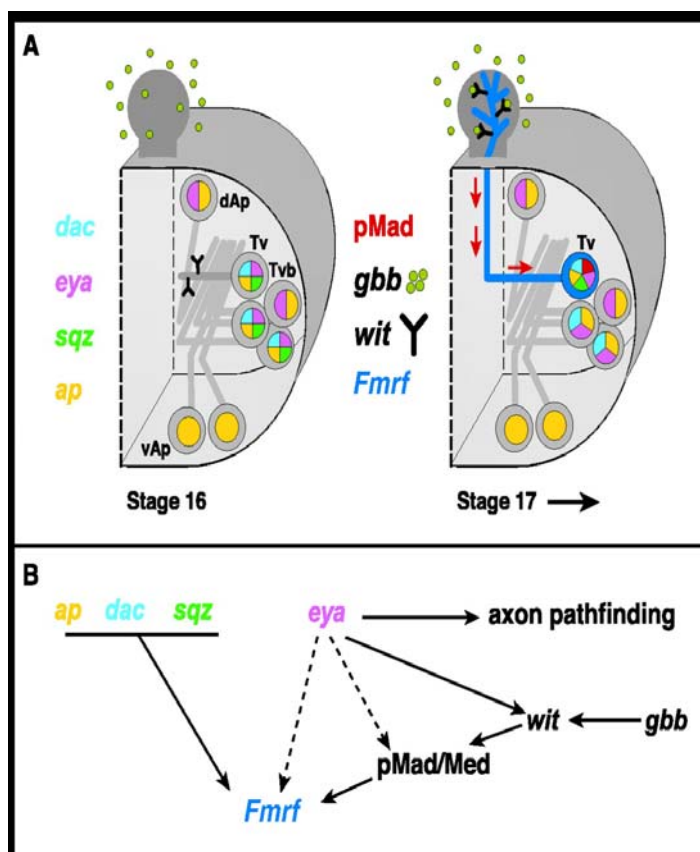


Figura 29.- Activación de *FMRFa* en la neurona Tv. A) Hemisegmento torácico donde se muestran los tres grupos que expresan *ap* (amarillo), *dAp* (arriba), *Tv* (centro) y *vAp* (abajo). Fase de Iniciación: En el estadio 16 la combinación de *ap* (amarillo), *sqz* (verde) y *dac* (azul) activa a *FMRFa*. Fase de Activación retrograda: En el estadio 17 esta expresión se refuerza mediante la acción de *gbb* en el DNH, que interacciona con *wit* activándose *pMad* (rojo) en la neurona Tv, en este proceso colabora *eya* (morado), para una correcta guía axonal. B) Modelo de las interacciones entre todas las proteínas requeridas en la activación de *FMRFa*. (Miguel-Aliaga et al., 2004)

En los capítulos siguientes demostraremos que Nab es necesario en la fase de especificación del grupo Tv y, también, en la activación de *FMRFa* en la neurona Tv, a través de su colaboración con Sqz.

17. Patrón de expresión de *nab* en el SNC

nab comienza su expresión en el estadio 16 embrionario en un elevado número de neuronas de la CNV y los lóbulos cerebrales, con un patrón muy similar en todos los segmentos (Fig. 30). Si observamos su patrón de expresión, junto al de *sqz* (verde), desde un punto de vista ventral (Fig. 30A) o lateral (Fig. 30B), se percibe como ambas proteínas coinciden en un alto número de neuronas (amarillo), pero no en todas. En los paneles derechos, donde se ven ampliaciones de los cuadros blancos mostrados en los paneles izquierdos (Fig. 30A y B), se puede comprobar esta coincidencia parcial.

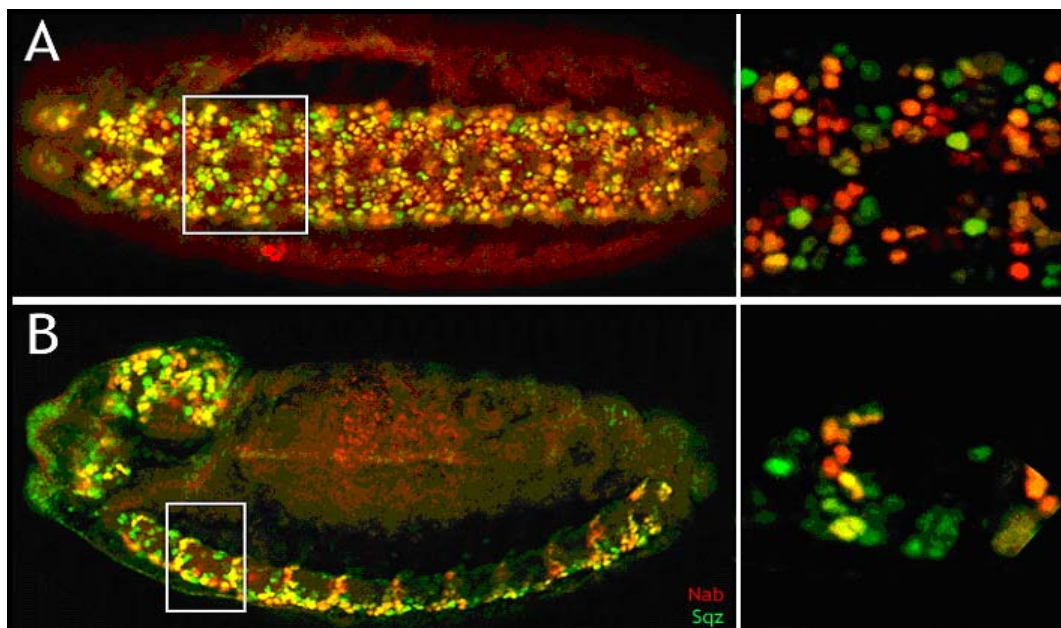


Figura 30.- Expresión en la CVN embrionaria de *nab* y *sqz*. Patrón de expresión de las proteínas Nab (rojo) y Sqz (verde) en un embrión de estadio 17, anterior a la izquierda, desde un punto de vista: A) ventral y B) lateral. Los cuadros blancos de los paneles izquierdos se encuentran ampliados en los paneles derechos. La expresión de ambas proteínas en la CVN, se solapa en algunas neuronas. Si tomamos la línea media entre hemisegmentos, como punto de referencia, se observa como sigue un patrón similar en todos los segmentos.

Para saber si *nab* está implicado en los mismos procesos que *sqz*, hay que comprobar si se coexpresan en las neuronas donde Sqz tiene una función conocida: el grupo Tv.

18. Patrón de expresión de *nab* en el grupo Tv embrionario

En el embrión, *sqz* tiene un papel en la especificación del número de neuronas que forman el grupo Tv (Allan et al., 2005). Para saber si *nab* tiene una función en ese proceso, hay que saber si se expresa en esos grupos. En la Figura 31 se ve, en un embrión de estadio 17 con una orientación ventro-lateral, la triple tinción de anticuerpos frente a Nab (rojo), Sqz (verde) y Ap (azul), de esta manera podemos marcar los grupos Tv, que expresan *ap*, y observar en ese contexto la expresión de *nab* y *sqz*.

Si nos centramos en un grupo Tv2, remarcado en blanco, y observamos en canales separados y con un mayor nivel de detalle, las expresiones de las tres proteínas (paneles derechos), podemos ver cómo, de las cuatro células que expresan *ap*, sólo las neuronas 1, 2 y 3 expresan, de manera coincidente, *sqz* y *nab*. Es decir, no hay ninguna célula *sqz* positiva en el grupo Tv que no exprese también *nab*.

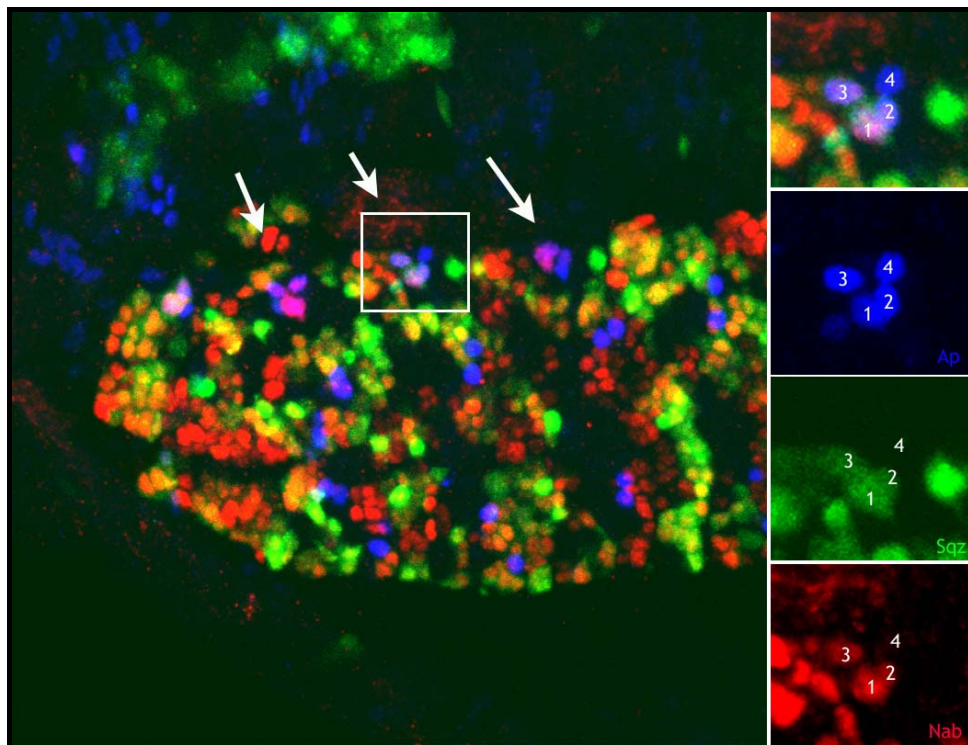


Figura 31.- Expresión de *nab* en el grupo Tv embrionario. Embrión de estadio 17, observado desde un punto de vista ventro-lateral, anterior a la izquierda, marcado con anticuerpos frente a: *Ap-LacZ* (azul), *sqzGal4 UASGFP* (verde), y Nab (rojo). Panel izquierdo: Las flechas sitúan los tres grupos Tv, el cuadro blanco remarca el grupo Tv2. Panel Derecho: ampliación del grupo Tv2 remarcado en el panel izquierdo, de arriba a abajo: tres canales, *ap*, *sqz* y *nab*. Las cuatro neuronas del grupo Tv están numeradas. Se observa como Sqz y Nab colocalizan en las neuronas 1,2 y 3, pero ninguna de las dos

19. Patrón de expresión de *nab* en el grupo Tv larvario

La segunda función conocida de *sqz* es la activación de *FMRFa* en la neurona Tv del grupo Tv (Allan et al., 2003). En la Figura 32, se muestra, en un cerebro larvario de segundo estadio, la triple tinción contra Nab (rojo), *FMRFa* (verde) y Ap (azul). Se observa cómo la expresión de *nab* en el grupo Tv se ha restringido. De las tres células en las que se expresaba en el embrión, ahora sólo se expresa en una: la neurona Tv. En la neurona Tv se coexpresa con *FMRFa*, y también, aunque aquí no se muestre, con *sqz*, que se expresa en esa célula y también en las neuronas Tva y Tvb (Allan et al., 2003). El cuadro blanco rodea un grupo Tv1, en la parte derecha del panel se muestra en detalle y separado por canales.

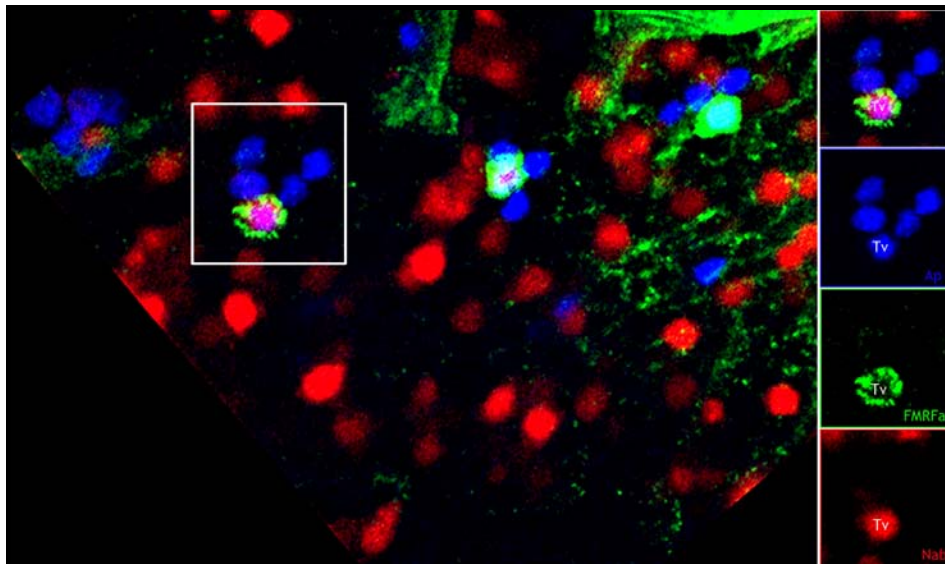


Figura 32.- Expresión de *nab* en el grupo Tv larvario. Cerebro de larva II silvestre visto desde un punto de vista lateral, anterior a la izquierda. Triple tinción con anticuerpos frente a: Ap LacZ (azul), *FMRFa* (verde) y Nab (rojo). Panel izquierdo: Los tres grupos Tv expresan *FMRFa* en la neurona Tv. El cuadro blanco marca el grupo Tv1. Panel izquierdo: La neurona Tv está rotulada con su nombre. Grupo Tv1 separado por canales, de arriba a abajo: Tres canales, Ap, *FMRFa* y Nab. Nab se coexpresa con *FMRFa* en la neurona Tv del grupo Tv, marcado por Ap.

Los resultados previos nos parecen difíciles de entender, si partimos de la hipótesis de que la función de *nab* debería ser actuar como un correpressor de *sqz*, al igual que hace junto a *rn*, que sólo ejercería su función como activador del anillo interno de *wg*, en las células donde *nab* no se expresa. Resulta imposible mantener esa lógica en este proceso, pues en embrión no

hay ninguna célula del grupo Tv donde sólo se exprese *sqz* sin *nab*. Y en la etapa larvaria, *nab* se restringe a una única neurona, que es precisamente la que expresa FMRFa, un gen diana de *sqz*. Por tanto, la expresión de *nab* coincide más con un posible papel de coactivador de *sqz*, que de correpresor.

20. *nab* colabora con *sqz* en la especificación del número de neuronas del grupo Tv

En el apartado 17 hemos comprobado que *nab* co-localiza con *sqz* en 3 de las células del grupo Tv, en el estadio embrionario. La falta de función de *sqz* en ese estadio, aumenta el número de neuronas, marcadas por la expresión de *ap*, que forman el grupo Tv, existiendo un mayor grado de penetrancia en los grupos Tv1 (Allan et al., 2005). Para conocer si Nab colabora de alguna forma en este proceso, es necesario ver que ocurre con el número de neuronas *ap* en un fondo de falta de función. Así, observamos cómo en embriones homocigóticos mutantes para *nab*[SH143] (Fig. 33B), hay una media de 6,2 neuronas ($n = 15$), frente a las 4,9 ($n = 15$) que forman los grupos Tv de un embrión silvestre (Fig. 33A). Este fenotipo es casi idéntico al obtenido en embriones mutantes para *sqz* (6,1 neuronas, $n = 11$) (ver Tabla 1), y al que ya se obtuvo en el mismo ensayo en Allan et al. (2003). Nosotros, hemos reproducido el ensayo en un fondo mutante *sqz*, para asegurarnos de que el contexto, en el que obteníamos nuestros resultados, era fiable.

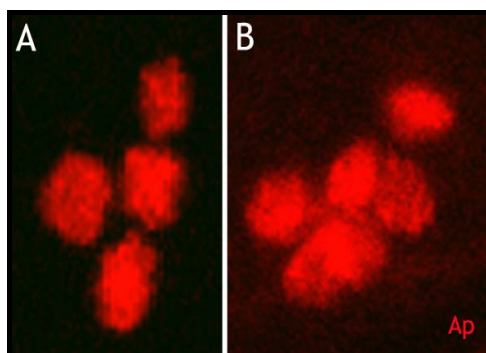


Figura 33.- *nab* es necesario para la especificación del número de neuronas que forman el grupo Tv. Grupo Tv1 de estadio 17 de embrión, con anticuerpo contra *Ap*, de individuos: A) Silvestres, hay cuatro neuronas. B) Mutantes *nab*[SH143], seis neuronas.

	n	x	δ
Silvestre	15	4,9	0,26
<i>sqz</i>	11	6,1	0,54
<i>nab</i>	15	6,2	0,94

Tabla 1.- Comparación del número de neuronas, en grupos Tv1, de larvas silvestres y mutantes para *sqz* y *nab*. n = total de individuos. x = número medio de neuronas por grupo Tv1. δ = desviación estándar

El hecho de que el fenotipo de *nab* sea idéntico al de *sqz* implica que en este proceso *nab* no actúa como un co-represor de *sqz*, como sí hace en el desarrollo proximodistal del ala con *rn*, si no que actúa como un co-activador, pues una función inversa a la de *sqz* supondría una disminución, y no un aumento, del número de neuronas que forman el grupo Tv.

21. *nab* colabora con *sqz* en la activación de *FMRFa* en la neurona Tv

El segundo proceso, en el que se ha implicado a *Sqz*, es la activación de *FMRFa* en la neurona Tv. Si desapareciera la expresión de *FMRFa* en un fondo de falta de función para *nab*, sería la confirmación de que, en este segundo proceso, *Nab* también actúa como un co-activador de *Sqz*. Para responder a esta pregunta hicimos una tinción frente a *FMRFa* de cerebros larvarios de segundo estadio. En el total de grupos Tv, encontramos, en un fondo silvestre (Fig. 34A), una media de 5,7 neuronas *FMRFa* positivas ($n = 14$), y en un fondo mutante, larvas *nab[SH143]* homocigóticas (Fig. 34B), hay 3,3 neuronas de media ($n = 39$). Es decir, hay una disminución significativa de neuronas Tv que expresan *FMRFa* entre ambas condiciones. Los datos adjuntos en la Tabla 2, nos indican cómo esta disminución es incluso menor a la que ocurre en cerebros de larvas mutantes para *sqz*: 4,5 neuronas de media ($n = 64$) (Allan et al., 2003), esto quizás se debe a que el alelo *sqz[lacZ02102]*, no es nulo, mientras que *nab[SH143]* sí lo es. No hemos creído necesario reproducir los datos, ya conocidos (Allan et al., 2003), sobre el número de neuronas que expresan *FMRFa*, en un fondo de falta de función para *sqz*, pues en el apartado anterior, ya verificamos sus datos con los nuestros.

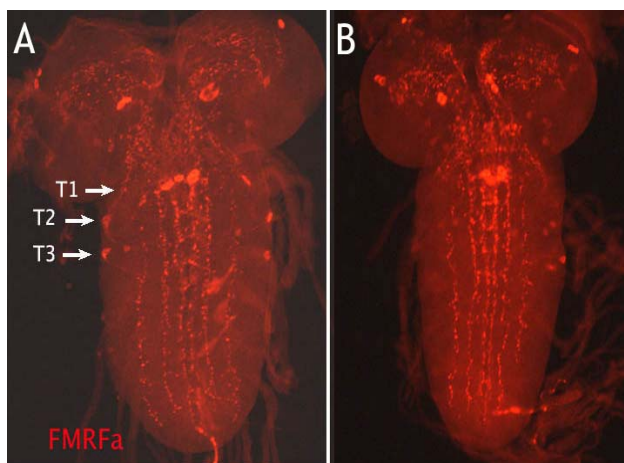


Figura 34.- *nab* es necesario para la activación de *FMRFA* en la neurona Tv. Neuronas Tv de segundo estadio larvario marcado con anticuerpo frente a *FMRFa* de individuos: A) Silvestres, B) Mutantes para *Nab[SH143]*. Notar como en (B) desaparecen cuatro neuronas *FMRFa* “positivas” respecto a las seis presentes en (A).

	n	x	δ
Silvestre	14	5,7	0,6
sqz (*)	64	4,5	0,9
nab	39	3,3	1,6

(*) Allan et al, 2003

Tabla 2.- Comparación del número de neuronas *FMRFa* “positivas” en grupos Tv de cerebros larvarios silvestres y mutantes para *sqz* y *nab*. n = total de individuos. x = número medio de neuronas por cerebro. δ = desviación estándar

Es decir, Nab actúa como un coactivador de Sqz en el desarrollo del grupo Tv. En la especificación del número de neuronas que lo forman y en la activación de *FMRFa* en la neurona Tv.

22. *nab* interacciona físicamente con Rn y Sqz a través del dominio C

Los apartados anteriores han mostrado las funciones de *nab* desde un punto de vista genético, así hemos comprobado que actúa reprimiendo la activación del anillo interno de *wg* en el desarrollo proximodistal del ala. Y que afecta a los grupos Tv de dos maneras: especificando el número de neuronas que los forman y activando al neuropéptido *FMRFa* en una de esas neuronas. Hemos visto que estas funciones se dan respectivamente por su relación como co-represor de *rn*, y como co-activador de *sqz*. Para asegurarnos de que esta relación es directa es necesario hacer ensayos de interacción proteína-proteína. Se ha descrito que las proteínas Nab de vertebrados se unen a las proteínas EGF a través de un dominio llamado R1 (Russo et al., 1995), siguiendo esta lógica pensamos que si Nab se unía a Rn y Sqz, quizás lo hacía a través de su interacción con el dominio C (Fig. 35A), común a ambos, y del que no se ha descrito ninguna función previa. La comparación entre las secuencias C-terminales de Rn y Sqz, nos muestra en detalle el dominio C, que comienza en el aa 902 de Rn y 488 de Sqz, y en el que comparten un 84% de homología en la secuencia (Fig. 35B).

En la figura 35C mostramos un ensayo de interacción proteína-proteína (pull-down), donde hemos usado la proteína heteróloga Nab-GST como cebo para atrapar a Rn (arriba), Sqz (centro), y Rn ^{Δ 894} (abajo), que han sido traducidas *in vitro* (ver Materiales y Métodos). Como control negativo usamos GST. Rn ^{Δ 894} es una proteína truncada para el dominio C de Rn, fue diseñada para sustituir sus aas 894 y 895 por sendos codones de parada, y construida

con el fin de comprobar si el dominio C era importante en su posible unión a Nab. El resultado de estos ensayos nos muestra cómo Rn y Sqz se unen a Nab, sin embargo Rn^{Δ894} pierde en gran medida su capacidad para unirse, lo que nos indica que el dominio C es necesario para la correcta interacción entre ambas proteínas. Sin embargo, ninguna de las tres proteínas se une a GST, lo que nos permite dar validez a los resultados. Opinamos que repetir el ensayo frente a una proteína truncada para el dominio C de Sqz no es necesario, pues la pregunta sobre la importancia de este dominio ya se ha contestado con el ensayo frente a Rn^{Δ894}.

Para verificar si el dominio C tiene realmente una relevancia biológica, pensamos que era necesario comprobar si la expresión ectópica de Rn^{Δ894} en el disco de ala, era capaz de activar a *wg* en el anillo interno, evitando la represión que ejerce *nab* sobre la proteína completa. Comparamos las expresiones ectópicas, activadas mediante la línea *dpp Gal4*, de la proteína completa Rn (Fig. 35D) y la proteína truncada Rn^{Δ894} (Fig. 35E). En el primer caso no existe ninguna activación ectópica de *Wg* en el ala, si acaso existe un ensanchamiento de su expresión hacia proximal, fuera del dominio de mayor expresión de *dpp*, pero esta deformación debe ir acompañada de un ensanchamiento simultáneo en la expresión de *nab* distal al anillo interno, pues éste mantiene su grosor de dos/tres células de radio. Este fenotipo quizás se debe a que la zona de tejido *rn* “positivo” *vg* “negativo” se encuentra ampliado de alguna manera por acción de la mayor cantidad de proteína Rn. Sin embargo, en la Figura 35E, se observa cómo en la expresión ectópica de Rn^{Δ894} aparece proteína *Wg* ectópica dentro del patrón *dpp*, lo curioso es que la expresión de *Wg* sólo aparece en la zona más distal del ala y en la más cercana al anillo interno, pero al igual que ocurre con los clones de falta de función *nab*, no salta en la zona central del ala (corchete blanco, Fig. 35E), lo que de nuevo nos lleva a la conclusión de que el otro supuesto represor debe tener un patrón de expresión complementario a las zonas donde *wg* no se activa de forma ectópica. Otro dato interesante es que el tejido que hay entre el anillo interno (flecha) y el externo (punta de flecha) de *wg* está sobrecrecido, lo que es una muestra más del efecto que tiene la

activación ectópica de *wg* en esa zona del disco de ala (Neumann and Cohen, 1996a).

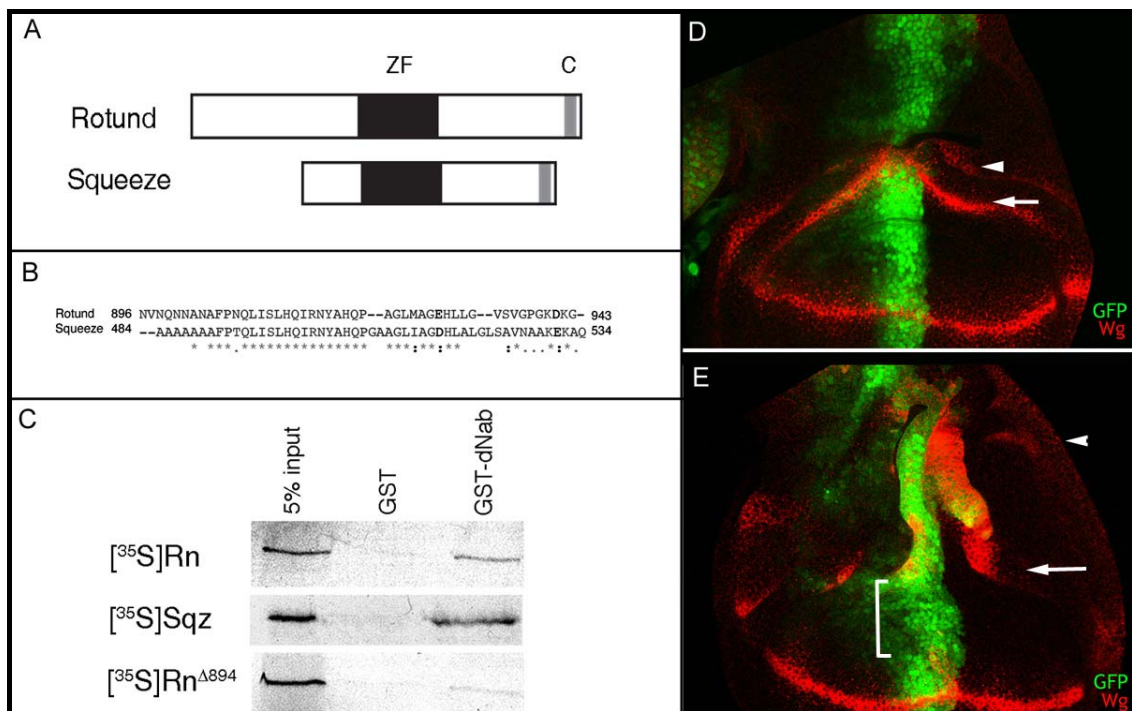


Figura 35.- El dominio C es necesario para la interacción física entre Nab y Rn y Sqz. A) Comparación esquemática entre las proteínas Rn y Sqz, las cajas representan sus zonas homólogas: dominio ZF (negro), dominio C (gris). B) Comparación entre las secuencias de aas de Rn y Sqz en el dominio C. C) Ensayos de interacción con GST (carril central), como control negativo, y Nab (carril derecho) de: Rn (arriba), Sqz (centro) y Rn^{Δ894} (abajo). El carril izquierdo muestra la traducción *in vitro* de las tres proteínas. Se observa como Rn y Sqz se unen a Nab, mientras que Rn^{Δ894} pierde en gran medida su capacidad de unión. Ninguna de las tres proteínas interacciona con GST.

Disco de ala de tercer estadio tardío, marcado con anticuerpo frente a Wg (rojo) de los genotipos *DppGal4 UASGFP* (verde) D) *UAS Rn* y E) *UAS Rn^{Δ894}*. En (D) no se observa expresión ectópica de Wg, lo que contrasta con (E), donde se observa expresión ectópica en la zona distal y proximal del ala, pero no en la central (corchete blanco). La expresión ectópica de Wg en (E) hace proliferar el tejido que hay entre el anillo interno (flecha) y el externo (punta de flecha).

23. *sqz* actúa en el desarrollo del ala como un posible represor de *rn*

sqz se expresa en el disco de ala con un patrón similar al de *nab*, tanto si lo mostramos mediante hibridación *in situ* (Fig. 36A), como si detectamos su expresión mediante *sqzGal4>UASGFP* (Fig. 36B). Aunque la tinción del Gal4 no recapitula todas las células donde *sqz* se expresa en la hibridación *in situ*, si permite sugerir un patrón solapante con *nab* en su expresión proximal, y que decrece en intensidad conforme nos acercamos al margen de ala y a las zonas laterales. Esta expresión podría coincidir con la descripción que ya

dábamos en el capítulo 6 del posible patrón de expresión que debería tener un represor de la activación del anillo interno de *wg* redundante con Nab. En la Figura 36B también mostramos la expresión de *wg*, lo que nos sirve para demostrar que *sqz*, al igual que *nab*, tiene un patrón complementario al anillo interno, esto se puede confirmar en el corte en el eje Z adjunto (Fig. 36B').

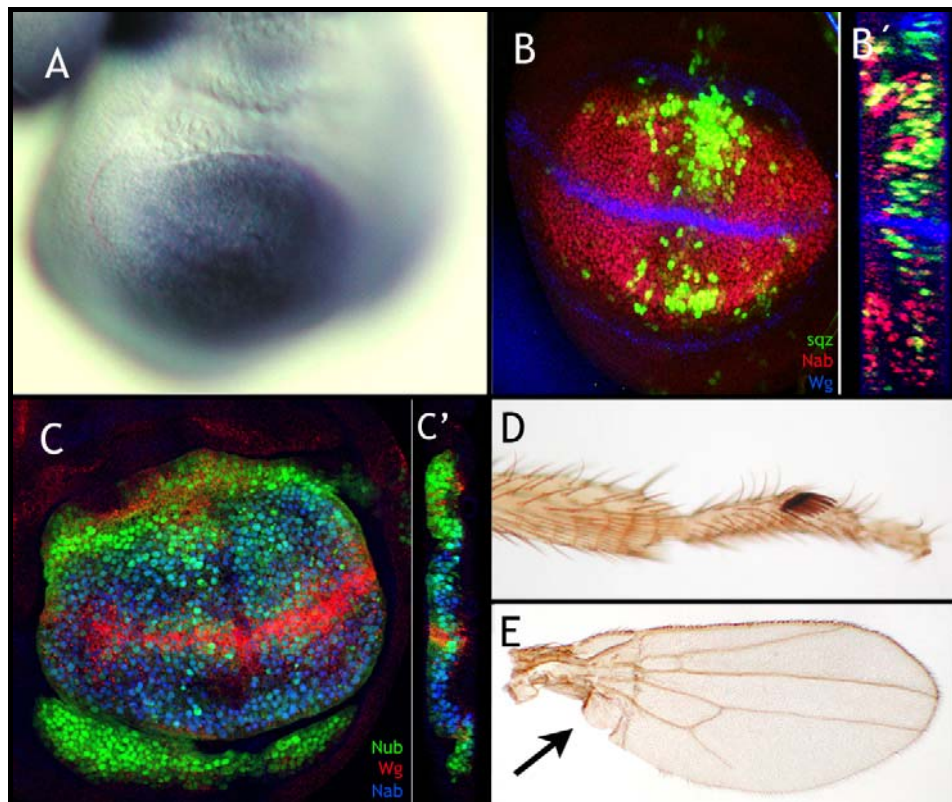


Figura 36.- *Sqz* es un posible represor de la función Rn en el desarrollo del ala. Expresión de *sqz* en el disco de ala mediante: A) Hibridación *in situ*, B-B') tinción inmunohistoquímica, la expresión de *sqz* (verde) se detecta mediante *sqzGal4/UASGFP*, Nab (rojo) y Wg (azul) se detectan con anticuerpos contra ambas proteínas. Aunque el patrón de *sqz* no es muy compacto recuerda al de *nab*, ambos solapan entre si y son complementarios a la expresión del anillo interno de *wg*. B') Corte en el eje Z del disco mostrado en (B). C-C') Disco de ala *nubGal4 UAS GFP/UAS sqz* (verde), mostrando la tinción con anticuerpos frente a Nab (azul) y Wg (rojo). La expresión de *wg* en el anillo interno se reduce por acción de la sobre-expresión de *sqz*, la expresión de *nab* no cambia. C') Corte en el eje Z del disco mostrado en (C). D y E) Pata y ala de moscas *UAS sqz/+; rnGal4/+*. La pata muestra delección del tejido tarsal. La axila (flecha) también está parcialmente deleccionada.

Para determinar si *sqz* juega un papel en el desarrollo proximodistal del ala, analizamos los fenotipos en clones mutantes, inducidos por recombinación mitótica. Estos clones no tienen ningún fenotipo adulto, ni alteran la expresión de *wg*. Dado que *Sqz* y *Rn* comparten el dominio ZF y el

dominio C, pero se diferencian en sus zonas N-terminales, nos preguntamos si Sqz podría estar reprimiendo la actividad de Rn de forma redundante a Nab, quizás mediante un mecanismo de competición por sus sitios diana de unión a ADN. Para probar esta hipótesis analizamos el efecto de la sobreexpresión de *sqz* en el dominio de expresión de *rn*. Moscas con genotipo *UAS sqz/; rnGAL4 UASGFP/+* muestran delecciones en axila y tarsos (Fig. 36D y E), un fenotipo que nos recuerda, tanto a la sobreexpresión de *nab* en el mismo dominio, como a los fenotipos mutantes *rn* (compararlo con las Figuras 23B-C). Consistente con estos resultados, la expresión de *wg* casi ha desaparecido en discos de ala *nubGAL4/UASsqz* (Fig. 36C), lo que puede verse en detalle en el corte en el eje Z adjunto (Fig. 36C'), además también marcamos la expresión de *nab*, que no se activa fuera de su dominio silvestre, es decir, la activación de *nab* es independiente de *sqz*, lo que implica además que la represión de *wg* por *sqz* ocurre de manera independiente a *nab*.

Es de esperar que si Sqz y Nab actúan en el ala, reprimiendo ambas la función de *rn*, exista redundancia funcional, lo que explicaría la baja penetrancia fenotípica de los clones mutantes de *nab*, y también la falta de fenotipo en los clones *sqz*. Dado que ambos genes mapean en brazos cromosómicos distintos, es imposible hacer clones doble-mutantes. Aunque sí se pueden conseguir clones mutantes *nab* en un fondo heterocigótico para *sqz* (*nab[sh143] FRT80 sqz[lacZ]/+*). En esta condición genética la frecuencia fenotípica sube de un 29% a un 38% (n=55). Además, la mayoría de clones con fenotipo se encuentran en zonas laterales y distales, que es donde se detecta un nivel de expresión más bajo de *sqz*.

Todos estos datos apoyan la hipótesis de que Nab y Sqz tienen un rol similar en el desarrollo del ala, pero a través de mecanismos distintos: Nab como correpresor de Rn a través de su dominio C, y Sqz quizás compitiendo por sus sitios de unión a ADN. Esta función de Sqz en el ala sería diferente a la que ejerce en el desarrollo del SNC, y además, los resultados muestran que es independiente de Nab.

24. dCtBP podría estar implicado en la función represora de Nab.

El papel de Nab1 y Nab2 de ratón, como correpresores transcripcionales de la familia EGR, está mediado por su interacción con las subunidades CH3 y CH4, que tiene actividad de remodelación del nucleosoma, y forman parte del complejo multiproteico correpresor NuRD, que también se compone de subunidades con actividad HDAC. Esta interacción ocurre fuera del dominio NCD2, en una zona C-Terminal de Nab denominada CID (CH3/CH4 Interacting Domain) (Srinivasan et al., 2006). El dominio CID no está presente en la proteína Nab de *Drosophila*, pero eso no significa que el mecanismo de represión no esté conservado, por lo tanto, Nab podría estar interaccionando con algún correpresor transcripcional conocido. Para validar esta hipótesis llevamos a cabo, sobre su secuencia de aas, una búsqueda *in silico* de los sitios de unión conservados de algunos correpresores, así determinamos que el sitio de interacción de *gro* (WRPW/Y) no estaba presente en su secuencia, pero sí encontramos un posible sitio de unión de CtBP (P-DLS-K), aunque ligeramente modificado (P-DLS---K). Esta posible diana está C-Terminal al dominio NCD2 (Fig. 37A). Una vez identificada, buscamos si estaba conservada evolutivamente en el resto de sus ortólogos conocidos. No estaba presente en ningún Nab2, pero sí en todas las proteínas Nab1 identificadas, excepto en la de pez zebra. En vertebrados la diana está entre los dominios NCD1 y NCD2, distinguiéndose de la posición que ocupa en la proteína de mosca, pero la secuencia consenso intra-familiar (P-DL-E-K), sugiere que este dominio podría tener una función biológica (Fig. 37B).

Para saber si *dCtBP* está de veras implicado en los mismos procesos que *nab*, hemos comenzado la aproximación experimental. Aunque, todavía no disponemos de datos sobre su posible interacción física, o su posible relación con el desarrollo de las neuronas que forman los grupos Tv, si hemos analizado clones de falta de función de un alelo nulo de *dCtBP* en el ala (flecha, Fig. 37C). Tuvimos que realizar este ensayo en un fondo *Minute*, porque *dCtBP* es letal celular, seguramente por su relación con otras proteínas implicadas en el desarrollo del ala. Estos clones muestran un fenotipo de expresión ectópica de *wg*, muy similar al que encontramos en los clones de falta de función de *nab* (flecha blanca), incluida la baja penetrancia

en general, y la activación en las zonas proximales y laterales en particular, como puede observarse en el resto de los clones de este disco, donde no se detecta ninguna activación ectópica de *wg*. Los clones que si muestran un fenotipo pueden verse en detalle, y separados los canales, en los recuadros adjuntos del panel 37C.

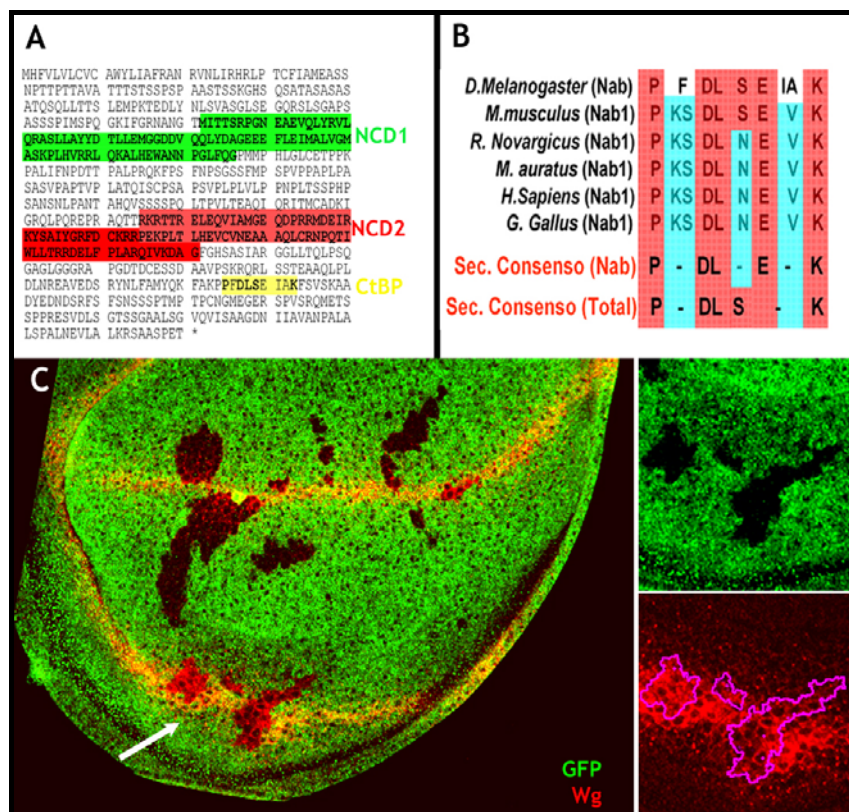


Figura 37.- Relación de Nab con CtBP. A) Localización del posible sitio de unión de CtBP a Nab (amarillo). Está fuera de los dominios activos NCD1 (rojo) y NCD2 (verde). B) Comparación entre las dianas predichas de CtBP encontradas en la familia Nab (sólo en la proteína Nab1 de vertebrados). En rojo se marcan los aas conservados entre las proteínas Nab, o que están en la secuencia consenso de unión a CtBP, en azul se marcan los aa divergentes entre las proteínas de la familia o con la secuencia consenso. C) Clones de falta de función CtBP en un fondo heterocigótico Minute (*ywFlp[122]; FRT82 M(3R)w ArmZ/FRT82 CtBP[87De-10]*). Los clones se marca por la ausencia de Arm (verde), Wg se detecta con anticuerpo (rojo). La flecha indica un grupo de clones proximales, donde se detecta activación ectópica de *wg*. En los paneles derechos se observan esos clones separados por canales.

Aunque el papel de *dCtBP* necesita estudiarse con más detalle, el resultado mostrado en el ala, unido a la conservación evolutiva de la secuencia consenso de unión, sugiere que la interacción de Nab con CtBP puede ser necesaria para la función de Nab en el desarrollo de *Drosophila*, y quizás a lo largo de la escala evolutiva en el papel de Nab1.

Discusión

1. Nab funciona en el desarrollo mediante su interacción con Sqz y Rn

El contexto proteico es el conjunto de moduladores expresados, de manera específica, en un tejido o una célula individual, y provoca que la actividad de un gen dependa de donde se exprese. En este trabajo hemos estudiado las funciones en el desarrollo de *Drosophila* de uno de estos moduladores: el gen *nab*.

Para analizar la función de *nab* ha sido necesario localizar a los genes con los que interacciona, demostrando su interacción desde un punto de vista genético y molecular. A través de ellos hemos comprendido simultáneamente sus funciones: En el desarrollo proximodistal del ala actúa como un correpresor de Rn y en la especificación de los grupos de neuronas Tv, presentes en los segmentos torácicos del SNC, actúa como un coactivador de Sqz. Rn y Sqz son proteínas homólogas entre si: Comparten con alta homología el dominio ZF, necesario para su unión a ADN; y el dominio C, necesario para su interacción con Nab. La función del dominio C es equivalente a la del dominio R1, presente en las proteínas EGR1 y EGR2, que son los socios de Nab en el desarrollo de vertebrados.

2. Papel de Nab en el desarrollo proximodistal del ala

El análisis de la función de *nab* se inició tras su localización en una mutagénesis de expresión ectópica, diseñada para encontrar genes implicados en el desarrollo proximodistal del ala. Su expresión ectópica presentaba un fenotipo de delección de la axila idéntico al observado en moscas mutantes *wg[spd-Flag]*. El interés de este fenotipo nos hizo estudiar su expresión y posibles funciones en el disco imaginal de ala. *nab* se expresa, desde tercer estadio temprano, con un patrón circular. Este patrón es concéntrico al patrón de expresión, de mayor diámetro, de *rn* y complementario a la expresión del anillo interno de *wg*. De hecho, el vano existente al final del desarrollo larvario, entre las expresiones de *wg* del anillo interno y del margen de ala, no se genera hasta el momento en que *nab* comienza su expresión. El fenotipo adulto de delección de axila, que encontramos en la mutagénesis, se corresponde con la represión autónoma celular de la expresión de *wg* en el anillo interno, producida por la activación ectópica de

Nab. Esta expresión ectópica no afecta a la especificación del resto de elementos reguladores de *wg* en el ala. La falta de función de *nab* provoca la activación ectópica de *wg*. La no activación ectópica de otros marcadores, como *cut* y *casp3*, que se asocian con la activación de *wg* en el margen del ala o en células apoptóticas, respectivamente, confirma la función de *nab* como represor específico del elemento regulador del anillo interno.

Una vez demostrado el papel de Nab como represor transcripcional del anillo interno de *wg*, fue necesario localizar al gen sobre el que actuaba. Rn es junto con Nub un activador del anillo interno de *wg* (del Alamo Rodriguez et al., 2002). El hecho de que *rn* carezca de función en las células donde se coexpresa con *nab*; que su función se restrinja al anillo de células que no expresan *nab*; y que, al igual que los socios de Nab en el desarrollo de vertebrados, pertenezca a la familia Kruppel de Dedos de Zinc, hizo que pensáramos en él como una posible diana del efecto represor de Nab. Para demostrar esta hipótesis realizamos distintos ensayos de interacción entre ambos genes: (1) La expresión ectópica de Nab, en los dominios de expresión silvestres de *rn* en ala y pata, produce fenotipos idénticos a los observados en la falta de función de *rn*: delección de la axila y de los segmentos tarsales 2 a 4. (2) Aunque *nab* se exprese ectópicamente en dominios mas extensos, el fenotipo se restringe a las células donde Rn ejerce su función. (3) La sobreexpresión de *rn* en sus dominios silvestres es capaz de rescatar la represión ejercida por la activación ectópica de Nab. La reversión del fenotipo se observa en el adulto y también en la recuperación de la expresión de *wg* en el anillo interno. El conjunto de datos confirma la hipótesis de que Nab es un represor de los genes diana de Rn.

Otro aspecto analizado sobre la función de *nab* en el ala es la baja penetrancia fenotípica observada en sus clones de falta de función. Los alelos con los que hemos trabajado son nulos y no existe ningún homólogo en el genoma de *Drosophila*. Lo que lleva a la conclusión de que existe redundancia funcional con otro gen. Hemos analizado a *sqz* como un posible candidato. Los datos que apoyan esta posibilidad son: (1) su expresión silvestre en el ala ejemplifica el patrón del represor redundante, pues está debilitada en las zonas donde la falta de función de *nab* tiene mayor penetrancia; (2) su

expresión ectópica mimetiza los fenotipos de expresión ectópica de *Nab*; y (3), la penetrancia fenotípica de los clones de falta de función *nab* aumenta un 9 % en un fondo mutante heterocigótico *sqz*. Proponemos un modelo en el que *Nab* y *Sqz* actuarían sobre los genes diana de *Rn* de forma independiente y mediante mecanismos distintos: *Nab* uniéndose a *Rn*, e impidiendo la activación del anillo interno de *wg*, y *Sqz* compitiendo con *Rn* por sus sitios de unión en el elemento regulador del anillo interno. En cualquier caso, mientras acumulamos más datos que apoyen esta hipótesis, estamos analizando a otros posibles candidatos, como *dve*, que ya ha sido implicado en la regulación del elemento regulador del margen de ala de *wg* (Nakagoshi et al., 2002), y cuyo patrón de expresión colocaliza con el de *nab* en el disco imaginal de ala (datos no mostrados).

Nab tiene un papel clave en el desarrollo proximodistal, pues entrelaza dos factores indispensables: control de la proliferación y formación de patrón. Determina, a través de la represión que ejerce sobre *rn*, el grosor del anillo interno evitando su ensanchamiento hacia distal. El control de la expresión de *wg* en el anillo interno, así como su correcto posicionamiento, son esenciales para el desarrollo de la articulación del ala, ya que su falta provoca su desaparición, y su exceso genera la proliferación desmedida de las células que forman ese tejido (Neumann and Cohen, 1996a).

3. El desarrollo proximodistal del ala

Al inicio de los Resultados planteábamos un modelo en el que varios genes, con patrones de expresión circulares de distinto diámetro, definían los subdominios en los que se divide el territorio en el plano proximodistal (Fig. 12). Cada uno de estos subdominios marca el destino de las células que los forman. Los subdominios se diferencian unos de otros por las diversas combinatorias de genes activos. Ejemplos de estos subdominios, si nos movemos de distal a proximal, son el subdominio que expresa *nub*, *rn* y *nab*; al que sigue el que expresa *rn* y *nub*, pero no expresa *nab*. En este último se activa el anillo interno (Fig. 38A). Este modelo está en consonancia con la formación progresiva de subdominios génicos, que dan destino a las células en el desarrollo proximodistal de la pata (Galindo et al., 2002). Hemos

demostrado que muchos de los genes que forman los subdominios se activan mediante una ruta de señalización no autónoma dependiente de Vg (del Alamo Rodriguez et al., 2002). Así ocurre también con *nab*, que desaparece en discos homocigóticos de falta de función *vg*, y se activa ectópicamente, incluso fuera del clon, en clones de expresión ectópica. Se desconocen los genes que forman parte de esta ruta de señalización no autónoma, y tampoco sabemos bien como se consigue que la expresión de sus genes diana tenga límites proximales distintos. Barajamos varias hipótesis: (1) La ruta actúa a través de un morfógeno cuyo gradiente de concentración marca las distintas expresiones. (2) Los genes diana de Vg aparecen de manera secuencial en el tiempo, de forma que los primeros en activarse alcanzan un patrón de expresión más amplio. (y 3) Todos tienen el mismo potencial de activación, pero existen otros genes cuya expresión podrían limitar proximalmente la activación de alguno de los genes diana de Vg, permitiendo la expresión en solitario de otros. Siguiendo las dos últimas hipótesis llegamos a *zfh2*, que parece limitar la expresión proximal de *nab*.

zfh2 tiene un patrón de expresión dinámico. Hasta tercer estadio se expresa en toda el ala y después limita su expresión a un anillo situado en la zona presuntiva de la axila. Los datos de los que disponemos no nos permiten aún distinguir las posibles funciones de *zfh2* respecto a *nab*: (a) Función tardía, donde la expresión de *zfh2* en un anillo complementario al patrón de *nab* limita proximalmente su expresión. (b) Función temprana, en el que la expresión de *zfh2* en el centro del ala reprime temporalmente la activación de *nab*, de forma que una vez ha desaparecido *zfh2* del centro del ala, se activa *nab*, pero *rn* y *nub*, al haber comenzado su expresión en segundo estadio tardío, ya se expresan con un patrón más amplio que el de *nab*. (c) Ambas funciones son ciertas. (d) Ninguna lo es. Aún carecemos de datos que nos inclinen por una u otra posibilidad. Tampoco sabemos como se limitan proximalmente las expresiones de *rn* o *nub*. Pero los resultados de la falta de función de *zfh2* nos inclinan por las funciones a y b. Otro aspecto interesante, ahora que sabemos que *nab* no está implicado en la regulación de *zfh2*, es conocer que genes si lo están. El esquema de los genes necesarios para el posicionamiento del anillo interno de *wg* se muestra en la Figura 38B.

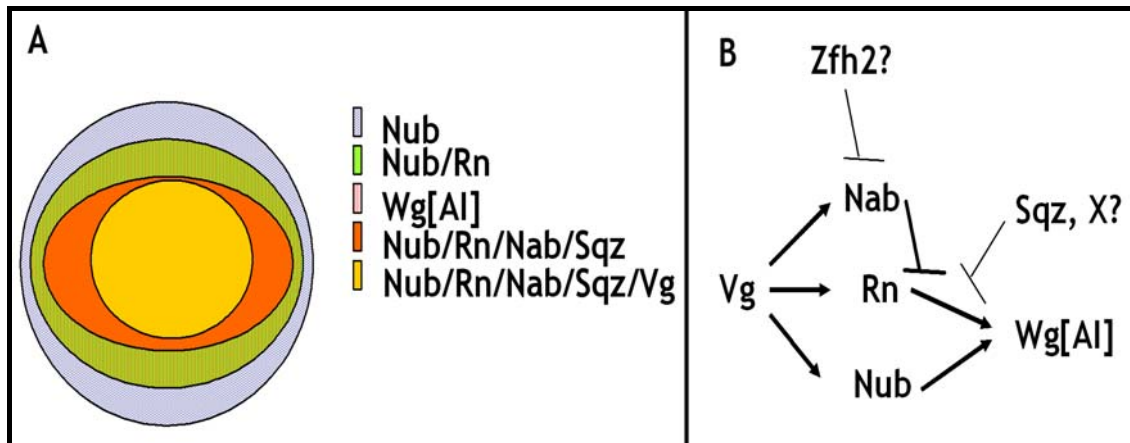


Figura 38.- El desarrollo proximodistal del ala de *Drosophila melanogaster*. A) Esquema de la expresión, en tercer estadio tardío, de los genes dependientes de *vg*, implicados en la formación de los distintos subdominios territoriales en el eje proximodistal. B) Modelo de la regulación de los genes necesarios para la activación y correcto posicionamiento del anillo interno de *wg* (*Wg[AI]*).

4. Papel de Nab en la especificación de destinos neurales en el SNC

Las neuronas no desaparecen, pero, al cambiar la combinatoria de proteínas presentes en ellas, su destino muta. Por eso es necesario conocer en profundidad la función de los genes presentes en el SNC, pues el entramado que forman las distintas expresiones define el destino de cada neurona, y cualquier variación puede afectar a la viabilidad del organismo. La expresión de *nab* en el SNC, donde *rn* no se expresa, nos llevó a la conclusión de que podían existir otros socios de Nab en el desarrollo. Esta hipótesis nos condujo a *sqz*, un gen homólogo a *rn*. *sqz* se expresa en todos los segmentos de la CNV, pero sólo se conoce su función en seis grupos torácicos de células que expresan *ap*, denominados Tv. En los estadios 16/17 embrionarios, *Sqz* especifica el número de neuronas que lo forman, quizás en relación con un mecanismo de inhibición lateral mediado por la ruta de N, del que no hay pruebas fehacientes, excepto que la falta de función *N* fenocopia a la de *sqz* (Allan et al., 2005). Además de esa función, *sqz* forma parte de la combinación de proteínas que se necesita para especificar la neurona Tv, que está marcada por la expresión de *FMRFa*.

nab se expresa, como *sqz*, en todos los segmentos de la CNV, coincidiendo con él en una fracción de las células que expresan ambos. Si nos centramos en el grupo Tv, se observa, en la fase embrionaria, que *nab* se

expresa en las mismas células que *sqz* y que se restringe, en la fase larvaria, a una única neurona, la Tv, donde *Sqz* coactiva a *FMRFa*. Los fenotipos de falta de función de *nab* son el aumento del número de neuronas *ap* que forman el grupo Tv, y la falta de expresión de *FMRFa*, ambos fenotipos son idénticos a los de *sqz*. Es decir, *nab*, en este contexto, ejerce una función coactivadora.

Una vez determinada la interacción genética con *sqz*, quedan algunas incógnitas, relativas a la especificación de las neuronas Tv, que *nab* podría ayudar a contestar, como la posible relación de la ruta de N con el complejo *Sqz-Nab*; o la existencia de otros coactivadores implicados en las funciones de *Sqz*, como podría ser *dCTBP*. Además, los resultados abren la puerta a futuros estudios, que se centrarían en distintos aspectos. Nos parece significativo que *nab* tenga el mismo papel que *sqz* en sus dos funciones conocidas en el SNC. El hecho de que *sqz*, en la activación de *FMRFa*, solo tenga fenotipo en la neurona donde se expresa *nab*, a pesar de que se expresa en dos neuronas más dentro del grupo Tv, nos indica que es *nab* quien parece cualificar a *Sqz* para ejercer su función. Este dato puede servir para localizar al resto de neuronas donde *Sqz* es necesario, que no serán otras que las que también expresan *nab*. También nos parece interesante conocer la búsqueda de genes implicados en la regulación espacial y temporal de *nab* en el SNC. Otro aspecto de interés es que *nab* se expresa en muchas neuronas que no expresan *sqz*, y quizás ejerce alguna función independiente de éste a través de su interacción con otros socios. Esto tiene sentido si recordamos que en vertebrados se ha propuesto que la familia Nab tiene funciones que no pueden explicarse por su interacción con las proteínas EGR

5. Otras funciones de Nab en el desarrollo de *Drosophila*

nab, además de expresarse en el disco imaginal de ala, se expresa en el surco morfogenético del disco de ojo. Se expresa en la misma zona que *roe*, que es un gen homólogo a *rn*, cuyos fenotipos de falta de función son una reducción en el número de omatidias, el mismo fenotipo que presenta la expresión ectópica de Nab en el ojo. Este resultado puede recordar a la función correpresora que ejerce con Rn, aunque dado el parecido entre *Roe* y Rn, podría ser también un fenotipo artefactual, debido a una interacción que en

condiciones silvestres no ocurre realmente. En cualquier caso, pese a que carecemos de datos suficientes para conocer si Nab tiene un papel real en el ojo, también hemos observado que *sqz* se expresa en algunos rabdómeros (datos no mostrados), lo que da interés al análisis de los tres genes en la formación del ojo.

6. Mecanismo molecular de la interacción de Nab con Rn y Sqz

Una vez demostrada la interacción genética de *nab* con *rn* y *sqz*, y determinada su función como correpresor en el desarrollo proximodistal del ala y coactivador en el desarrollo del SNC, fue necesario definir el mecanismo molecular a través del cual actuaba. El mecanismo de acción de las proteínas Nab en vertebrados, que se unen al dominio R1 de las proteínas EGR, pero no impiden su unión a ADN, nos sirvió de modelo para entender el comportamiento de Nab en *Drosophila*. Hemos demostrado, mediante un ensayo de interacción de proteínas *in vitro*, que Nab se une a Sqz y a Rn, y que el dominio C, presente en ambos, es necesario para esta interacción física, pues su carencia debilita esta unión. Además, hemos determinado *in vivo* que este dominio tiene relevancia biológica. La expresión ectópica de la proteína Rn truncada para C activa a *wg* en los dominios donde la proteína completa, que sí puede unirse a Nab, no es capaz.

La secuencia de Nab contiene un sitio putativo de unión a *dCtBP*. Este dominio está conservado en las proteínas Nab1 de vertebrados. La falta de función de *dCtBP* produce expresión ectópica de *wg* en el ala, en los mismos lugares, y con una penetrancia similar a la mostrada en la falta de función *nab*. Se conocen varias funciones de *dCtBP* en el desarrollo del ala: unirse a Brk para colaborar en la represión de los genes diana de Dpp (Hasson et al., 2001); o a Hairless para impedir la activación de los genes diana de N, cuando éste no está en el núcleo interaccionando con Su(H) (Nagel et al., 2005). Ninguna de esas funciones puede dar cuenta de los fenotipos de expresión ectópica de *wg* que hemos observado.

Nab actúa como un correpresor de “corto rango”, pues sólo impide la activación del elemento regulador del anillo interno de *wg*, es decir, su presencia no silencia todo el locus, dato que está en consonancia con su

posible relación con *dCtBP*, que ha sido propuesto en múltiples procesos como colaborador de otros represores de “corto rango” (Nibu et al., 1998).

Sqz actúa en el SNC como un activador en presencia de Nab, lo que implica que Nab no impide su unión a ADN. Creemos que su unión a Rn tampoco lo hace, al igual que ocurre con su papel como correpressor en vertebrados, pero sí podría interferir en su interacción con otros activadores del anillo interno de *wg*, como *nub*, aunque carecemos de datos que demuestren esta posible interacción física (Fig. 39).

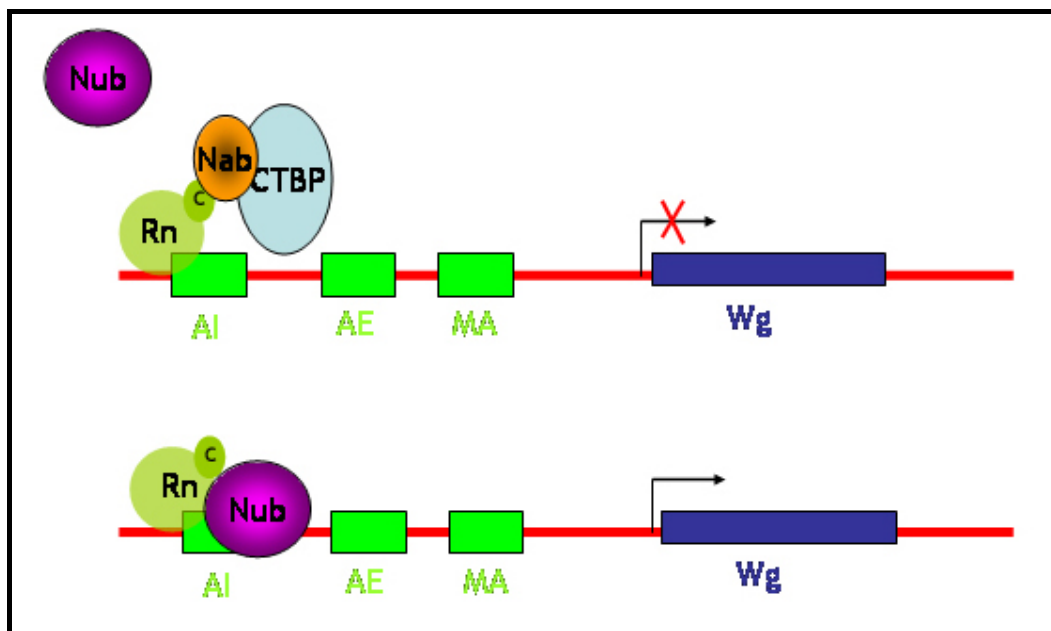


Figura 39.- Modelo del mecanismo molecular que controla la expresión del anillo interno de *wg*. El gen *wg* se expresa en el disco de ala de tercer estadio larvario, por la acción de distintos elementos reguladores, que se regulan por combinaciones distintas de factores de transcripción, y tienen una activación independiente los unos de los otros: Anillo interno (AI), Anillo Externo (AE) y Margen de Ala (MA). El elemento regulador *wg*[AI] se activa, en ausencia de Nab, por la acción combinada de los genes *rn* y *nub*, quizás interaccionando físicamente (abajo). La presencia de Nab, y su posible colaboración con *dCtBP*, reprime la activación de *wg*[AI], quizás impidiendo la formación del dímero Rn-Nub (arriba).

7. Consideraciones finales

En este trabajo hemos identificado nuevos socios y funciones, previamente desconocidas, de la familia Nab en el desarrollo de vertebrados. Hemos demostrado su implicación en el desarrollo proximodistal del ala de *Drosophila*, a través de su función como correpressor transcripcional de la ruta de *wg*. En vertebrados se ha demostrado un papel en la condriogénesis de las

extremidades, pero, se desconoce si tiene alguna función más temprana en la especificación de éstas, o alguna relación con la ruta de Wnt.

También hemos mostrado en el SNC su función en la especificación de destinos neurales postmitóticos concretos, mientras que en vertebrados tiene un papel temprano en la formación de los rombómeros 3 y 5; y en la especificación de células schwann, pero no se sabe si tiene alguna función similar a la que descubrimos nosotros.

Demostramos que las proteínas Rn y Sqz son sus socios en el desarrollo de *Drosophila*. Ambas proteínas tiene ortólogos en otros organismos, y quizás su relación con Nab esté conservada evolutivamente. También identificamos un nuevo dominio proteico de interacción con Nab distinto al dominio R1, lo que abre la posibilidad de que Nab en vertebrados pueda interactuar con otras proteínas no pertenecientes a la familia EGR. Junto a estos resultados, también sugerimos la posibilidad de que dCtBP sea un socio en la función represora de la familia Nab, y que Zfh2 tenga un papel en la regulación de su expresión, ambas genes están conservados en la escala evolutiva.

Todos los datos que aportamos abren la puerta a futuros trabajos no sólo en *Drosophila*, sino también en vertebrados, y completan el conocimiento global sobre los mecanismos de acción de la familia Nab como correpresores o coactivadores en función del contexto proteico.

Conclusiones

1. Nab se expresa en el disco de ala en un dominio distal. Su expresión comienza al inicio del tercer estadio larvario y se mantiene hasta el final del estadio pupal.
2. La activación de *nab* en el disco de ala requiere *vg*.
3. La función de Nab en el desarrollo del ala es restringir el dominio de activación de *wg* por *Rotund* a un anillo proximal. Así, Nab actúa como correpressor de *Rn*.
4. Nab se expresa en el SNC embrionario desde el estadio 16 en un patrón segmental que solapa parcialmente con la expresión de *sqz*.
5. Nab actúa como coactivador de *Sqz* restringiendo el número de neuronas que expresan *ap* en el grupo *Tv* y especificando el destino de la neurona *Tv*.
6. Nab interacciona físicamente con *Rn* y *Sqz* a través del dominio C terminal presente en ambos.

Bibliografía

- Abdulkadir, S. A., Carbone, J. M., Naughton, C. K., Humphrey, P. A., Catalona, W. J. and Milbrandt, J. (2001). Frequent and early loss of the EGR1 corepressor NAB2 in human prostate carcinoma. *Hum Pathol* 32, 935-9.
- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T. and Thanos, D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* 103, 667-78.
- Agnel, M., Kerridge, S., Vola, C. and Griffin-Shea, R. (1989). Two transcripts from the rotund region of *Drosophila* show similar positional specificities in imaginal disc tissues. *Genes Dev* 3, 85-95.
- Akimaru, H., Hou, D. X. and Ishii, S. (1997). *Drosophila* CBP is required for dorsal-dependent twist gene expression. *Nat Genet* 17, 211-4.
- Allan, D. W., Park, D., St Pierre, S. E., Taghert, P. H. and Thor, S. (2005). Regulators acting in combinatorial codes also act independently in single differentiating neurons. *Neuron* 45, 689-700.
- Allan, D. W., St Pierre, S. E., Miguel-Aliaga, I. and Thor, S. (2003). Specification of neuropeptide cell identity by the integration of retrograde BMP signaling and a combinatorial transcription factor code. *Cell* 113, 73-86.
- Arany, Z., Sellers, W. R., Livingston, D. M. and Eckner, R. (1994). E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators. *Cell* 77, 799-800.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. and Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science* 268, 225-32.
- Basler, K. (2000). EMBO Gold Medal 1999. Waiting periods, instructive signals and positional information. *Embo J* 19, 1168-75.
- Basler, K. and Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* 368, 208-14.
- Benveniste, R. J., Thor, S., Thomas, J. B. and Taghert, P. H. (1998). Cell type-specific regulation of the *Drosophila* FMRF-NH2 neuropeptide gene by Apterous, a LIM homeodomain transcription factor. *Development* 125, 4757-65.
- Bhat, K. M. and Schedl, P. (1997). Requirement for engrailed and invected genes reveals novel regulatory interactions between engrailed/invected, patched, gooseberry and wingless during *Drosophila* neurogenesis. *Development* 124, 1675-88.
- Bilen, J. and Bonini, N. M. (2005). *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annu Rev Genet* 39, 153-71.
- Bonini, N. M., Bui, Q. T., Gray-Board, G. L. and Warrick, J. M. (1997). The *Drosophila* eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development* 124, 4819-26.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-15.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T. M. and Struhl, G. (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 7, 1279-91.
- Brody, T. and Odenwald, W. F. (2000). Programmed transformations in neuroblast gene expression during *Drosophila* CNS lineage development. *Dev Biol* 226, 34-44.
- Brody, T. and Odenwald, W. F. (2005). Regulation of temporal identities during *Drosophila* neuroblast lineage development. *Curr Opin Cell Biol* 17, 672-5.

- Brook, W. J. and Cohen, S. M. (1996). Antagonistic interactions between wingless and decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* Leg. *Science* 273, 1373-7.
- Brook, W. J., Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M. (1996). Organizing spatial pattern in limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 161-80.
- Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L. and Basler, K. (1997). pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* 385, 829-33.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 274, 252-5.
- Campbell, G. and Tomlinson, A. (1999). Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of *Drosophila*: Regulation of Dpp targets by *brinker*. *Cell* 96, 553-562.
- Campbell, G., Weaber, T. and Tomlinson, A. (1993). Axis specification in the developing *Drosophila* appendage: The role of *wingless*, *decapentaplegic*, and the homeobox gene *aristaless*. *Cell* 74, 1113-1123.
- Capdevila, J. and Izpisua Belmonte, J. C. (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 87-132.
- Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., Peifer, M. and Bejsovec, A. (1998). *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395, 604-8.
- Cifuentes, F. J. and Garcia-Bellido, A. (1997). Proximo-distal specification in the wing disc of *Drosophila* by the *nubbin* gene. *PNAS* 94, 11405-11410.
- Clements, M., Duncan, D. and Milbrandt, J. (2003). *Drosophila* NAB (dNAB) is an orphan transcriptional co-repressor required for correct CNS and eye development. *Dev Dyn* 226, 67-81.
- 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, B., Simcox, A. A. and Cohen, S. M. (1993). Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development* 117, 597-608.
- Cohen, S. M. (1996). Controlling growth of the wing: vestigial integrates signals from the compartment boundaries. *Bioessays* 18, 855-8.
- Cohen, S. M., Bronner, G., Kuttner, F., Jurgens, G. and Jackle, H. (1989). *Distal-less* encodes a homoeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* 338, 432-4.
- Courey, A. J. and Huang, J. D. (1995). The establishment and interpretation of transcription factor gradients in the *Drosophila* embryo. *Biochim Biophys Acta* 1261, 1-18.
- Courey, A. J. and Jia, S. (2001). Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev* 15, 2786-96.
- Couso, J. P., Bishop, S. A. and Martinez Arias, A. (1994). The wingless signalling pathway and the patterning of the wing margin in *Drosophila*. *Development* 120, 621-36.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S. and Courey, A. J. (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* 13, 2218-30.

- Chen, W. and Struhl, K. (1988). Saturation mutagenesis of a yeast his3 "TATA element": genetic evidence for a specific TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2691-5.
- Cho, E. and Irvine, K. D. (2004). Action of fat, four-jointed, dachsous and dachs in distal-to-proximal wing signaling. *Development* 131, 4489-500.
- Dahmann, C. and Basler, K. (1999). Compartment boundaries: at the edge of development. *Trends Genet* 15, 320-6.
- Davis, I., Girdham, C. H. and O'Farrell, P. H. (1995). A nuclear GFP that marks nuclei in living *Drosophila* embryos; maternal supply overcomes a delay in the appearance of zygotic fluorescence. *Dev Biol* 170, 726-9.
- del Alamo Rodriguez, D., Terriente Felix, J. and Diaz-Benjumea, F. J. (2004). The role of the T-box gene *optomotor-blind* in patterning the *Drosophila* wing. *Dev Biol* 268, 481-92.
- del Alamo Rodriguez, D., Terriente, J., Galindo, M. I., Couso, J. P. and Diaz-Benjumea, F. J. (2002). Different mechanisms initiate and maintain wingless expression in the *Drosophila* wing hinge. *Development* 129, 3995-4004.
- Diaz-Benjumea, F. J., Cohen, B. and Cohen, S. M. (1994). *Drosophila* eyes. *Nature* 372, 175-179.
- 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, 741-52.
- Diaz-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.
- Doe, C. Q. (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116, 855-63.
- Dorfman, R., Glazer, L., Weihe, U., Wernet, M. F. and Shilo, B. Z. (2002). Elbow and Noc define a family of zinc finger proteins controlling morphogenesis of specific tracheal branches. *Development* 129, 3585-96.
- Flores-Saaib, R. D. and Courey, A. J. (2000). Analysis of Groucho-histone interactions suggests mechanistic similarities between Groucho- and Tup1-mediated repression. *Nucleic Acids Res* 28, 4189-96.
- Fortini, M. E. (2001). Sugar-coated pathways for developmental patterning. *Nat Cell Biol* 3, E229-31.
- Galindo, M. I., Bishop, S. A., Greig, S. and Couso, J. P. (2002). Leg patterning driven by proximal-distal interactions and EGFR signaling. *Science* 297, 256-9.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* 245, 251-3.
- Garcia-Bellido, A. and Santamaria, P. (1972). Developmental analysis of the wing disc in the mutant *engrailed* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 72, 87-104.
- Gashler, A. L., Swaminathan, S. and Sukhatme, V. P. (1993). A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol Cell Biol* 13, 4556-71.
- Gomez-Skarmeta, J. L., Rodriguez, I., Martinez, C., Culi, J., Ferrer-Marco, D., Beamonte, D. and Modollet, J. (1995). Cis-regulation of *achaete* and

- scute*: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *GENES & DEVELOPMENT* 9, 1869-1882.
- Gorfinkiel, N., Morata, G. and Guerrero, I. (1997). The homeobox gene *Distal-less* induces ventral appendage development in *Drosophila*. *Genes Dev* 11, 2259-71.
- Gray, S. and Levine, M. (1996). Transcriptional repression in development. *Curr Opin Cell Biol* 8, 358-64.
- Grosskortenhaus, R., Pearson, B. J., Marusich, A. and Doe, C. Q. (2005). Regulation of temporal identity transitions in *Drosophila* neuroblasts. *Dev Cell* 8, 193-202.
- Gwack, Y., Sharma, S., Nardone, J., Tanasa, B., Iuga, A., Srikanth, S., Okamura, H., Bolton, D., Feske, S., Hogan, P. G. et al. (2006). A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature*.
- Hasson, P., Muller, B., Basler, K. and Paroush, Z. (2001). *Brinker* requires two corepressors for maximal and versatile repression in *Dpp* signalling. *Embo J* 20, 5725-36.
- Heitzler, P. and Simpson, P. (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083-92.
- Hewes, R. S., Park, D., Gauthier, S. A., Schaefer, A. M. and Taghert, P. H. (2003). The bHLH protein *Dimmed* controls neuroendocrine cell differentiation in *Drosophila*. *Development* 130, 1771-81.
- Hilliker, A. J., Clark, S. H., Chovnick, A. and Gelbart, W. M. (1980). Cytogenetic analysis of the chromosomal region immediately adjacent to the *rosy* locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 95, 95-110.
- Houchmandzadeh, B., Wieschaus, E. and Leibler, S. (2002). Establishment of developmental precision and proportions in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 415, 798-802.
- Irvine, K. D. and Rauskolb, C. (2001). Boundaries in development: formation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 189-214.
- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. and Doe, C. Q. (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* 106, 511-21.
- Ito, K., Sass, H., Urban, J., Hofbauer, A. and Schneuwly, S. (1997). GAL4-responsive UAS-*tau* as a tool for studying the anatomy and development of the *Drosophila* central nervous system. *Cell Tissue Res* 290, 1-10.
- Jazwinska, A., Kirov, N., Wieschaus, E., Roth, S. and Rushlow, C. (1999). The *Drosophila* gene *brinker* reveals a novel mechanism of *Dpp* target gene regulation. *Cell* 96, 563-573.
- Johnston, L. A. and Edgar, B. A. (1998). *Wingless* and *Notch* regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* 394, 82-84.
- Kavaliers, M. (1990). Inhibitory influences of mammalian FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-amide)-related peptides on nociception and morphine- and stress-induced analgesia in mice. *Neurosci Lett* 115, 307-12.
- 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. *Current Opinion in Genetics & Development* 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 Campos-Ortega, J. A. (1997). klumpfuss, a *Drosophila* gene encoding a member of the EGR family of transcription factors, is involved in bristle and leg development. *Development* 124, 3123-34.
- Kobayashi, M., Goldstein, R. E., Fujioka, M., Paroush, Z. and Jaynes, J. B. (2001). Groucho augments the repression of multiple Even skipped target genes in establishing parasegment boundaries. *Development* 128, 1805-15.
- 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.
- Kopan, R. (2002). Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci* 115, 1095-7.
- Krones-Herzig, A., Adamson, E. and Mercola, D. (2003). Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3233-8.
- Kumar, J. P., Jamal, T., Doetsch, A., Turner, F. R. and Duffy, J. B. (2004). CREB binding protein functions during successive stages of eye development in *Drosophila*. *Genetics* 168, 877-93.
- Lagrange, T., Kim, T. K., Orphanides, G., Ebright, Y. W., Ebright, R. H. and Reinberg, D. (1996). High-resolution mapping of nucleoprotein complexes by site-specific protein-DNA photocrosslinking: organization of the human TBP-TFIIA-TFIIB-DNA quaternary complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10620-5.
- Lawrence, A. P. and Struhl, G. (1996). Morphogens, Compartments, and Pattern: Lessons from *Drosophila*? *Cell* 85, 951-961.
- Lawrence, P. A. and Morata, G. (1976). Compartments in the wing of *Drosophila*: a study of the engrailed gene. *Dev Biol* 50, 321-37.
- Le, N., Nagarajan, R., Wang, J. Y., Svaren, J., LaPash, C., Araki, T., Schmidt, R. E. and Milbrandt, J. (2005). Nab proteins are essential for peripheral nervous system myelination. *Nat Neurosci* 8, 932-40.
- Lee, S. L., Sadovsky, Y., Swirnoff, A. H., Polish, J. A., Goda, P., Gavrillina, G. and Milbrandt, J. (1996). Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 273, 1219-21.
- Levi, G., Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Lasagna, M., Mantero, S., Cancedda, R. and Charnay, P. (1996). Defective bone formation in Krox-20 mutant mice. *Development* 122, 113-20.
- Liao, G. C., Rehm, E. J. and Rubin, G. M. (2000). Insertion site preferences of the P transposable element in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3347-51.
- 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. *Developmental Biology* 228, 287-303.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipurski, S. L. and Darnell, J. (2003). Molecular Cell Biology. Fifth Edition.

- Lu, B., Jan, L. and Jan, Y. N. (2000). Control of cell divisions in the nervous system: symmetry and asymmetry. *Annu Rev Neurosci* 23, 531-56.
- Lum, L., Yao, S., Mozer, B., Rovescalli, A., Von Kessler, D., Nirenberg, M. and Beachy, P. A. (2003). Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science* 299, 2039-45.
- Lundgren, S. E., Callahan, C. A., Thor, S. and Thomas, J. B. (1995). Control of neuronal pathway selection by the *Drosophila* LIM homeodomain gene *apterous*. *Development* 121, 1769-73.
- Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciola-Rosen, L. A. and Rosen, A. (1998). The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 140, 1485-95.
- Marques, G., Haerry, T. E., Crotty, M. L., Xue, M., Zhang, B. and O'Connor, M. B. (2003). Retrograde Gbb signaling through the Bmp type 2 receptor wishful thinking regulates systemic FMRFa expression in *Drosophila*. *Development* 130, 5457-70.
- Mechta-Grigoriou, F., Garel, S. and Charnay, P. (2000). Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain. *Development* 127, 119-28.
- Mercader, N., Leonardo, E., Azpiazu, N., Serrano, A., Morata, G., Martinez, C. and Torres, M. (1999). Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature* 402, 425-9.
- Micchelli, C. A., Rulifson, E. J. and Blair, S. B. (1997). The function and regulation of *cut* expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and serrate. *Development* 124, 1485-1495.
- Miguel-Aliaga, I., Allan, D. W. and Thor, S. (2004). Independent roles of the *dachshund* and *eyes absent* genes in BMP signaling, axon pathfinding and neuronal specification. *Development* 131, 5837-48.
- Minami, M., Kinoshita, N., Kamoshida, Y., Tanimoto, H. and Tabata, T. (1999). *brinker* is a target of Dpp in *Drosophila* that regulates Dpp-dependent genes. *Nature* 398, 242-246.
- Morata, G. and Lawrence, P. A. (1975). Control of compartment development by the engrailed gene in *Drosophila*. *Nature* 255, 614-7.
- Murugasu-Oei, B., Balakrishnan, R., Yang, X., Chia, W. and Rodrigues, V. (1996). Mutations in *masquerade*, a novel serine-protease-like molecule, affect axonal guidance and taste behavior in *Drosophila*. *Mech Dev* 57, 91-101.
- Murugasu-Oei, B., Rodrigues, V., Yang, X. and Chia, W. (1995). *Masquerade*: a novel secreted serine protease-like molecule is required for somatic muscle attachment in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 9, 139-54.
- Naar, A. M., Beurang, P. A., Robinson, K. M., Oliner, J. D., Avizonis, D., Scheek, S., Zwicker, J., Kadonaga, J. T. and Tjian, R. (1998). Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev* 12, 3020-31.
- Nagel, A. C., Krejci, A., Tenin, G., Bravo-Patino, A., Bray, S., Maier, D. and Preiss, A. (2005). Hairless-mediated repression of notch target genes requires the combined activity of Groucho and CtBP corepressors. *Mol Cell Biol* 25, 10433-41.

- Nakagoshi, H., Shirai, T., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F. (2002). Refinement of wingless expression by a wingless- and notch-responsive homeodomain protein, defective proventriculus. *Dev Biol* 249, 44-56.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M. (1996a). Distinct mitogenic and cell fate specification functions of *wingless* in different regions of the wing. *Development* 122, 1781-1789.
- Neumann, C. J. and Cohen, S. M. (1996b). A hierarchy of cross-regulation involving *Notch*, *wingless*, *vestigial*, and *cut* organizes the dorsal/ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* 122, 3477-3485.
- Ng, M., Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M. (1995). *nubbin* encodes a protein required for proximal-distal patterning in the *Drosophila* wing. *Development* 121, 589-599.
- Nibu, Y., Senger, K. and Levine, M. (2003). CtBP-independent repression in the *Drosophila* embryo. *Mol Cell Biol* 23, 3990-9.
- Nibu, Y., Zhang, H. and Levine, M. (1998). Interaction of short-range repressors with *Drosophila* CtBP in the embryo. *Science* 280, 101-4.
- Nishimura, M., Ohtsuka, K., Takahashi, H. and Yoshimura, M. (2000). Role of FMRFamide-activated brain sodium channel in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 35, 443-50.
- O'Brien, M. A., Schneider, L. E. and Taghert, P. H. (1991). In situ hybridization analysis of the FMRFamide neuropeptide gene in *Drosophila*. II. Constancy in the cellular pattern of expression during metamorphosis. *J Comp Neurol* 304, 623-38.
- Oh, S. W., Kingsley, T., Shin, H. H., Zheng, Z., Chen, H. W., Chen, X., Wang, H., Ruan, P., Moody, M. and Hou, S. X. (2003). A P-element insertion screen identified mutations in 455 novel essential genes in *Drosophila*. *Genetics* 163, 195-201.
- Padgett, R. W., St Johnston, R. D. and Gelbart, W. M. (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* 325, 81-4.
- Palaparti, A., Baratz, A. and Stifani, S. (1997). The Groucho/transducin-like enhancer of split transcriptional repressors interact with the genetically defined amino-terminal silencing domain of histone H3. *J Biol Chem* 272, 26604-10.
- Paroush, Z., Finley, R. L., Kidd, T., Wainwright, S. M., Ingham, P. W., Brent, R. and Ish-Horowicz, D. (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with Hairy-Related proteins. *Cell* 79, 805-815.
- Perez-Garijo, A., Martin, F. A. and Morata, G. (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* 131, 5591-8.
- Poortinga, G., Watanabe, M. and Parkhurst, S. M. (1998). *Drosophila* CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *Embo J* 17, 2067-78.
- Postigo, A. A. and Dean, D. C. (2000). Differential expression and function of members of the *zfh-1* family of zinc finger/homeodomain repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6391-6.
- Robb, S. and Evans, P. (1994). THE MODULATORY EFFECT OF SCHISTOFLRFamide ON HEART AND SKELETAL MUSCLE IN THE LOCUST SCHISTOCERCA GREGARIA. *J Exp Biol* 197, 437-42.

- Rorth, P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12418-22.
- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansorge, W. et al. (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* 125, 1049-57.
- Russo, M. W., Severson, B. R. and Milbrandt, J. (1995). Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6873-7.
- Scolnick, D. M., Chehab, N. H., Stavridi, E. S., Lien, M. C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S. L. and Halazonetis, T. D. (1997). CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 57, 3693-6.
- Schmid, A., Chiba, A. and Doe, C. Q. (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* 126, 4653-89.
- Schneider-Maunoury, S., Seitanidou, T., Charnay, P. and Lumsden, A. (1997). Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of Krox-20 mouse mutants. *Development* 124, 1215-26.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitanidou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C. and Charnay, P. (1993). Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* 75, 1199-214.
- Schneider, L. E., O'Brien, M. A. and Taghert, P. H. (1991). In situ hybridization analysis of the FMRamide neuropeptide gene in *Drosophila*. I. Restricted expression in embryonic and larval stages. *J Comp Neurol* 304, 608-22.
- Schneider, L. E., Roberts, M. S. and Taghert, P. H. (1993). Cell type-specific transcriptional regulation of the *Drosophila* FMRamide neuropeptide gene. *Neuron* 10, 279-91.
- Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H. and Gelbart, W. M. (1995). Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139, 1347-58.
- Severson, B. R., Svaren, J. and Milbrandt, J. (2000). A novel activation function for NAB proteins in EGR-dependent transcription of the luteinizing hormone beta gene. *J Biol Chem* 275, 9749-57.
- 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.
- Skeath, J. B. and Carroll, S. B. (1992). Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* 114, 939-46.
- Skeath, J. B. and Carroll, S. B. (1994). The achaete-scute complex: generation of cellular pattern and fate within the *Drosophila* nervous system. *FASEB J* 8, 714-21.
- Skeath, J. B. and Doe, C. Q. (1996). The achaete-scute complex proneural genes contribute to neural precursor specification in the *Drosophila* CNS. *Curr Biol* 6, 1146-52.
- Skeath, J. B. and Thor, S. (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol* 13, 8-15.

- Skeath, J. B., Zhang, Y., Holmgren, R., Carroll, S. B. and Doe, C. Q. (1995). Specification of neuroblast identity in the *Drosophila* embryonic central nervous system by gooseberry-distal. *Nature* 376, 427-30.
- Spradling, A. C. and Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341-7.
- Srinivasan, L. and Atchison, M. L. (2004). YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP. *Genes Dev* 18, 2596-601.
- Srinivasan, R., Mager, G. M., Ward, R. M., Mayer, J. and Svaren, J. (2006). NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *J Biol Chem* 281, 15129-37.
- St Johnston, D. and Nusslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68, 201-19.
- St Pierre, S. E., Galindo, M. I., Couso, J. P. and Thor, S. (2002). Control of *Drosophila* imaginal disc development by rotund and roughened eye: differentially expressed transcripts of the same gene encoding functionally distinct zinc finger proteins. *Development* 129, 1273-81.
- Staehling-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, 585-93.
- Steward, R. (1987). Dorsal, an embryonic polarity gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel. *Science* 238, 692-4.
- Struhl, G. and Basler, K. (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* 72, 527-40.
- Struhl, G., Struhl, K. and Macdonald, P. M. (1989). The gradient morphogen bicoid is a concentration-dependent transcriptional activator. *Cell* 57, 1259-73.
- Subramanian, T. and Chinnadurai, G. (2003). Association of class I histone deacetylases with transcriptional corepressor CtBP. *FEBS Lett* 540, 255-8.
- Svaren, J., Sevetson, B. R., Apel, E. D., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C. and Milbrandt, J. (1996). NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol* 16, 3545-53.
- Svaren, J., Sevetson, B. R., Golda, T., Stanton, J. J., Swirnoff, A. H. and Milbrandt, J. (1998). Novel mutants of NAB corepressors enhance activation by Egr transactivators. *Embo J* 17, 6010-9.
- Swiatek, P. J. and Gridley, T. (1993). Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. *Genes Dev* 7, 2071-84.
- Swirnoff, A. H., Apel, E. D., Svaren, J., Sevetson, B. R., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C. and Milbrandt, J. (1998). Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol Cell Biol* 18, 512-24.
- Takei, Y., Ozawa, Y., Sato, M., Watanabe, A. and Tabata, T. (2004). Three *Drosophila* EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparan sulfate proteoglycans. *Development* 131, 73-82.
- Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98, 81-5.

- Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A. B., Seitanidou, T., Babinet, C. and Charnay, P. (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371, 796-9.
- Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Trembleau, A., Gourdji, D., Driancourt, M. A., Rao, C. V. and Charnay, P. (1998). Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol Endocrinol* 12, 107-22.
- Urbach, R. and Technau, G. M. (2003). Segment polarity and DV patterning gene expression reveals segmental organization of the Drosophila brain. *Development* 130, 3607-20.
- van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A. et al. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell* 88, 789-99.
- Vassin, H., Bremer, K. A., Knust, E. and Campos-Ortega, J. A. (1987). The neurogenic gene Delta of Drosophila melanogaster is expressed in neurogenic territories and encodes a putative transmembrane protein with EGF-like repeats. *Embo J* 6, 3431-3440.
- Villano, J. L. and Katz, F. N. (1995). four-jointed is required for intermediate growth in the proximal-distal axis in Drosophila. *Development* 121, 2767-77.
- Villares, R. and Cabrera, C. V. (1987). The achaete-scute gene complex of D. melanogaster: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to myc. *Cell* 50, 415-24.
- von Mikecz, A., Zhang, S., Montminy, M., Tan, E. M. and Hemmerich, P. (2000). CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus. *J Cell Biol* 150, 265-73.
- von Ohlen, T. and Doe, C. Q. (2000). Convergence of dorsal, dpp, and egfr signaling pathways subdivides the drosophila neuroectoderm into three dorsal-ventral columns. *Dev Biol* 224, 362-72.
- Wang, H. and Chia, W. (2005). Drosophila neural progenitor polarity and asymmetric division. *Biol Cell* 97, 63-74.
- Wang, Z., Lange, A. B. and Orchard, I. (1995). Coupling of a single receptor to two different G proteins in the signal transduction of FMRFamide-related peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 212, 531-8.
- Weihe, U., Dorfman, R., Wernet, M. F., Cohen, S. M. and Milan, M. (2004). Proximodistal subdivision of Drosophila legs and wings: the elbow-no ocelli gene complex. *Development* 131, 767-74.
- Weiss, J. B., Von Ohlen, T., Mellerick, D. M., Dressler, G., Doe, C. Q. and Scott, M. P. (1998). Dorsoventral patterning in the Drosophila central nervous system: the intermediate neuroblasts defective homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes Dev* 12, 3591-602.
- 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.
- 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. and Gingell, D. (1968). Cell surface membrane and amoeboid movement. *Symp Soc Exp Biol* 22, 169-98.
- Wu, J. and Cohen, S. M. (2002). repression of Teashirt marks the initiation of wing development. *Development* 129, 2411-2418.
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117, 1223-37.
- Yang, X., Bahri, S., Klein, T. and Chia, W. (1997). Klumpfuss, a putative *Drosophila* zinc finger transcription factor, acts to differentiate between the identities of two secondary precursor cells within one neuroblast lineage. *Genes Dev* 11, 1396-408.
- Yu, Z., Syu, L. J. and Mellerick, D. M. (2005). Contextual interactions determine whether the *Drosophila* homeodomain protein, Vnd, acts as a repressor or activator. *Nucleic Acids Res* 33, 1-12.
- Zhang, H., Levine, M. and Ashe, H. L. (2001). Brinker is a sequence-specific transcriptional repressor in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 15, 261-6.
- Zhou, J., Zwicker, J., Szymanski, P., Levine, M. and Tjian, R. (1998). TAFII mutations disrupt Dorsal activation in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13483-8.
- 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

Spitz/EGFr signalling via the Ras/MAPK pathway mediates the induction of bract cells in *Drosophila* legs

David del Álamo, Javier Terriente and Fernando J. Díaz-Benjumea*

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa-C.S.I.C., Facultad de Ciencias-CV, Universidad Autónoma-Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

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

Accepted 16 January 2002

SUMMARY

In the development of *Drosophila*, the activation of the EGFr pathway elicits different cellular responses at different times and in different tissues. A variety of approaches have been used to identify the mechanisms that confer this response specificity. We have analysed the specification of bract cells in *Drosophila* legs. We observed that mechanosensory bristles induced bract fate in neighbouring epidermal cells, and that the RAS/MAPK pathway mediated this induction. We have identified Spitz

and EGFr as the ligand and the receptor of this signalling, and by ubiquitous expression of constitutively activated forms of components of the pathway we have found that the acquisition of bract fate is temporally and spatially restricted. We have also studied the role of the *poxn* gene in the inhibition of bract induction in chemosensory bristles.

Key words: *Drosophila*, Leg, Bract, EGFr, *spitz*, *poxn*

INTRODUCTION

In the development of multicellular organisms, intercellular signalling plays a major role in both the control of cell proliferation and in the determination of different cell fates. So far only a small number of signal translation pathways have been confirmed to be involved in these processes. The role of epidermal growth factor receptor (EGFr) signalling through the RAS/MAPK cascade is particularly relevant (reviewed by Moghal and Sternberg, 1999). In *Drosophila*, the EGFr is required for the control of cell proliferation and/or cell viability in imaginal disc cells. EGFr signalling also plays a role in the specification of many cell types: in the eye it is the main trigger for the differentiation of all cell types, and in the thorax its function is required in the specification of wing veins and notum bristles. The EGFr is also required in oogenesis and in early embryo development (reviewed by Schweitzer and Shilo, 1997).

One of the main objectives of the analysis of cell signalling is to understand how the reiterative activation of a receptor in different tissues and at different times can elicit different cellular responses. The experimental evidence does not suggest a simple answer, and rather indicates a high complexity in the mechanisms involved. In *C. elegans*, the LET-23 tyrosine kinase receptor is required in several tissues and it has recently been revealed to signal through the RAS/MAPK in some tissues, but via inositol triphosphate in the germline (Cladinin et al., 1998). In PC12 cells, stimulation by EGF results in a transient activation of MAPK, but stimulation by NGF results in prolonged activation and triggers different responses

(Marshall, 1995). In *Drosophila*, different thresholds of MAPK activation in the embryo (Greenwood and Struhl, 1997) and in the developing eye (Halfar et al., 2001) also trigger different cellular responses. The integration of signals from several pathways provides another mechanism for conferring specificity. The Delta/Notch and RAS/MAPK pathways act in combination to specify R7 fate in the *Drosophila* eye (Tomlinson and Struhl, 2001), but antagonistically to specify bristles in the notum (Culi et al., 2001). EGFr signalling also acts antagonistically to Wg signalling in larval epidermis (O'Keefe et al., 1997), and to Dpp signalling to establish distinct cell fates in tracheal placodes (Wappner et al., 1997). Finally, the expression of tissue-restricted transcription factors provides developmental contexts that confer specific responses. This is the case for *LIN-31* in *C. elegans*, which is specifically involved in vulva development (Tan et al., 1998), and for the *Drosophila* gene *yan*, an inhibitory ETS transcription factor required in the eye disc but not in other imaginal discs (Lai and Rubin, 1992).

In this report, we describe a new model of cell fate determination in development involving the RAS/MAPK pathway: the specification of bract cells in the *Drosophila* epidermis. The cuticle of the adult fly is covered by an array of different kinds of sensory organs. Most of these are large or small bristles that are arranged in very precise patterns. They can also be classified according to their sensitivity to external stimuli as mechanosensory (MB) or chemosensory (ChB) bristles. In the legs and in the proximal costa of the wing, MB occur in association with a cell called bract (Hannah-Alava, 1958). Bracts are clearly distinguishable from the trichomes

Different mechanisms initiate and maintain *wingless* expression in the *Drosophila* wing hinge

David del Álamo Rodríguez¹, Javier Terriente¹, Máximo I. Galindo², Juan Pablo Couso² and Fernando J. Díaz-Benjumea^{1,*}

¹Centro de Biología Molecular-Severo Ochoa/C.S.I.C., Facultad de Ciencias-CV, Universidad Autónoma-Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

²School of Biological Sciences, University of Sussex, Falmer, Brighton BN1 9QG, UK

*Author for correspondence (e-mail: diazbenjumea@cblm.uam.es)

Accepted 6 June 2002

SUMMARY

The *Drosophila* gene *wingless* encodes a secreted signalling molecule that is required for many patterning events in both embryonic and postembryonic development. In the wing *wingless* is expressed in a complex and dynamic pattern that is controlled by several different mechanisms. These involve the Hedgehog and Notch pathways and the nuclear proteins Pannier and U-shaped. In this report, we analyse the mechanisms that drive *wingless* expression in the wing hinge. We present evidence that *wingless* is

initially activated by a secreted signal that requires the genes *vestigial*, *rotund* and *nubbin*. Later in development, *wingless* expression in the wing hinge is maintained by a different mechanism, which involves an autoregulatory loop and requires the genes *homothorax* and *rotund*. We discuss the role of *wingless* in patterning the wing hinge.

Key words: *Drosophila*, Pattern formation, *wingless*, Wing hinge

INTRODUCTION

Members of the Wnt family of secreted glycoproteins are involved in numerous developmental events in many organisms, from the nematode *C. elegans* to mammals. Among functions provided by Wnt proteins are embryonic patterning, cell fate specification, cell polarity, cell proliferation and pattern-organising activity (Cadigan and Nusse, 1997).

In *Drosophila* the best characterised Wnt gene is *wingless* (*wg*), one of the first members of this gene family to be identified (Sharma and Chopra, 1976; Baker, 1987; Rijsewijk et al., 1987). *Wg* function is required throughout development in a wide range of patterning events at different times and in different tissues. These include the development of embryonic epidermis, the head, the CNS, midgut, the heart, muscles and malpighian tubules (reviewed by Cadigan and Nusse, 1996). In imaginal discs, *wg* is expressed in a very complex pattern (Couso et al., 1993), and one interesting feature is that distinct enhancers control the different expression domains; enhancers that are themselves activated by different signalling pathways. In ventral discs (legs and antenna), *wg* is expressed in a sector that corresponds to ventral/anterior cells. The secreted protein Hedgehog activates the enhancer that drives this expression domain, which defines ventral fate and provides organising activity for the development of the proximodistal axis (Struhl and Basler, 1993; Basler and Struhl, 1994; Díaz-Benjumea et al., 1994). In the wing disc *wg* shows a very dynamic pattern of expression. In second instar larvae, *wg* is expressed in a ventral/anterior sector in a pattern similar to that displayed in

the leg. This early expression is required for the specification of wing fate (Morata and Lawrence, 1977) and is under the control of Hedgehog signalling pathway (J. D.-B., unpublished). Unlike in the leg, this expression later fades away and *wg* starts to be expressed in a wide stripe that corresponds to the presumptive wing margin. The Notch signalling pathway also controls this enhancer. In this way, *Wg* is involved in the specification of the wing margin, which is required for the promotion of cell proliferation and patterning of wing cells (Phillips and Whittle, 1993; Díaz-Benjumea and Cohen, 1995; Zecca et al., 1996; Neumann and Cohen, 1997). In the mesothorax, *wg* is expressed in an anterior/posterior stripe, and is required for the specification of dorsocentral bristles. The enhancer that positions this stripe seems to be controlled by the GATA protein Pannier and the zinc-finger protein U-shaped (García-García et al., 1999). *wg* is also expressed in two concentric rings that surround the wing pouch. The inner ring (IR) is activated in early third instar, and the outer ring (OR) is activated in late third instar. These two rings define the wing bases (also called wing hinge), which is the region that joins the wing and thorax. This region has a complex structure that is required for the fluttering of the wing. In some *wg* mutants, this region is deleted and the wing is joined directly to the thorax. The enhancer that drives *wg* expression in the IR has been identified within a 1.2 kb DNA fragment located about 9 kb 5' of the *wg* promoter (Neumann and Cohen, 1996). This fragment is sufficient to direct reporter gene expression in the IR. *wg* alleles that specifically affect this enhancer have been

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Developmental Biology 268 (2004) 481–492

DEVELOPMENTAL
BIOLOGYwww.elsevier.com/locate/ydbio

The role of the T-box gene *optomotor-blind* in patterning the *Drosophila* wing

David del Álamo Rodríguez, Javier Terriente Felix, and Fernando J. Díaz-Benjumea*

Centro de Biología Molecular-C.S.I.C., Universidad Autónoma de Madrid-Cantoblanco, Madrid E-28049, Spain

Received for publication 10 September 2003, revised 19 December 2003, accepted 9 January 2004

Abstract

The development of the *Drosophila* wing is governed by the action of two morphogens encoded by the genes *decapentaplegic* (*dpp*; a member of the BMP gene family) and *wingless* (*wg*; a member of the WNT gene family), which promote cell proliferation and pattern the wing. Along the anterior/posterior (A/P) axis, the precise expression of *decapentaplegic* and its receptors is required for the transcriptional regulation of specific target genes. In the present work, we analyze the function of the T-box gene *optomotor-blind* (*omb*), a *decapentaplegic* target gene. The wings of *optomotor-blind* mutants have two apparently opposite phenotypes: the central wing is severely reduced and shows massive cell death, mainly in the distal-most wing, and the lateral wing shows extra cell proliferation. Here, we present genetic evidence that *optomotor-blind* is required to establish the graded expression of the *decapentaplegic* type I receptor encoded by the gene *thick veins* (*tkv*) to repress the expression of the gene *master of thickveins* and also to activate the expression of *spalt* (*sal*) and *vestigial* (*vg*), two *decapentaplegic* target genes. *optomotor-blind* plays a role in wing development downstream of *decapentaplegic* by controlling the expression of its receptor *thick veins* and by mediating the activation of target genes required for the correct development of the wing. The lack of *optomotor-blind* produces massive cell death in its expression domain, which leads to the mis-activation of the Notch pathway and the overproliferation of lateral wing cells.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Drosophila*; T-box; *optomotor-blind*; *decapentaplegic*; *thickveins*; *master of thickveins*; *spalt*; *vestigial*

Introduction

Members of the T-box family of transcription factors have been identified in many different vertebrate and invertebrate organisms. In vertebrates, T-box genes play essential roles in early development, including specification of the mesoderm, and heart and limb morphogenesis (reviewed in Wilson and Conlon, 2002). *Tbx* genes share a DNA-binding domain of 200 amino acids (Pflugfelder et al., 1992a), the T-box, and, with the exception of *Tbx2* and *Tbx3*, they are transcriptional activators. It is not clear what functions T-box genes have, and few target genes have been identified (reviewed in Tada and Smith, 2001). In *Drosophila*, at least eight different T-box genes have been identified (Brook and Cohen, 1996; Kispert et al., 1994; Pflugfelder et al., 1992b; Porsch et al., 1998; Reim et al., 2003; Statho-

poulos et al., 2002). *optomotor-blind* (*omb*), the best-characterized T-box gene in the fly, has been implicated in the development of the optic lobe (Pflugfelder and Heisenberg, 1995) and, in addition, strong loss-of-function *omb* alleles die as pharate adults and show severe defects in distal wing patterning. It has been suggested that *omb* may play a role in proximal/distal (P/D) patterning (Grimm and Pflugfelder, 1996).

The *Drosophila* wing is patterned by the action of two secreted molecules, encoded by the genes *decapentaplegic* (*dpp*) and *wingless* (*wg*). These two genes are expressed at the borders of the anterior/posterior (A/P) and the dorsal/ventral (D/V) compartments, respectively, which subdivide the wing primordium into two orthogonal axes (reviewed in Brook et al., 1996). Dpp/BMP signals through binding to a receptor complex composed of two serine–threonine kinase components: the type I receptor encoded by the gene *thick veins* (*tkv*), and the type II receptor encoded by the gene *punt* (*put*). Dpp regulates the expression of many target genes in a concentration-dependent manner. Among them,

* Corresponding author. Fax: +34-91-497-4799.

E-mail address: diazbenjumea@cbm.uam.es (F.J. Díaz-Benjumea).