

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias



Universidad Autónoma
de Madrid

**Estudio de la función del gen Hox
Ultrabithorax en la morfogénesis del
halterio de *Drosophila melanogaster*.**

Tesis Doctoral
Celia García Cortés
Madrid, 2020

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias



Universidad Autónoma
de Madrid

Estudio de la función del gen Hox
Ultrabithorax en la morfogénesis del
halterio de ***Drosophila melanogaster***.

Autor: Celia García Cortés.

Director de tesis: Dr. Ernesto Sánchez-Herrero Arbide.

Tutor de tesis: Ana Ruiz Gómez.

Madrid, 2020

Trabajo realizado en el **Centro de Biología Molecular Severo Ochoa**

Índice de contenidos

■ Resumen/Abstract.....	3
■ Abreviaturas.....	9
■ Introducción.....	13
1. La Biología del Desarrollo.....	15
2. <i>Drosophila melanogaster</i>	16
3. Anatomía de <i>Drosophila melanogaster</i>	17
4. Definición del eje antero-posterior de <i>Drosophila melanogaster</i>	18
5. Los genes homeóticos.....	20
6. El gen Hox <i>Ultrabithorax</i>	21
7. El halterio como modelo de estudio de la influencia de los genes Hox en la organogénesis.....	23
8. La membrana basal y su función durante la morfogénesis de órganos.....	27
9. Integrinas y proteínas asociadas a integrinas (IAPs).....	30
■ Objetivos.....	33
■ Materiales y métodos.....	37
1. Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizadas.....	39
2. Disección y fijación de discos imaginales de larva y pupa.....	41
3. Tinciones inmunohistoquímicas y montaje de muestras.....	43
4. Anticuerpos.....	44
5. Tinciones con Xgal.....	45
6. Montaje de discos ex vivo y visualización de la eversión.....	45
7. Hibridación In Situ.....	46
8. Adquisición y tratamiento de imágenes.....	49
9. Mediciones y análisis estadístico.....	49
10. Análisis computacional de los sitios de unión del factor de transcripción DSRF a genes diana.....	51

Resultados	53
1. <i>Ubx</i> evita que el halterio adquiera morfología plana.....	55
2. Los elementos que componen la membrana basal persisten más tiempo en el disco de halterio que en el disco de ala en etapa de pupa temprana.	59
3. <i>Ubx</i> regula negativamente la expresión de <i>Mmp1</i> , retrasando la degradación de Vkg-GFP en el disco de halterio en etapa de pupa temprana.	64
4. <i>Mmp1</i> y <i>Timp</i> regulan la presencia de Vkg-GFP y la morfogénesis de los discos y apéndices dorsales.....	69
5. Las integrinas se localizan de manera diferente en disco imaginal de ala y halterio. .	74
6. La expresión del gen <i>blistered</i> está regulada negativamente por <i>Ubx</i> en disco de halterio.....	82
7. El factor de transcripción codificado por <i>bs</i> regula la expresión de Mys-GFP.....	85
8. La expresión de la proteína Tensina está regulada negativamente por el gen <i>Ubx</i> . ..	86
9. La expresión de la proteína Tensina está regulada por DSRF.	90
10. El gen <i>mys</i> posee putativos sitios de unión para DSRF, mientras que <i>by</i> no.	90
11. La expresión de <i>mys</i> se requiere en el capitulo del halterio a partir de las 35h-40h DFP.....	92
Discusión	97
<i>Ubx</i> y la regulación de la dinámica de la membrana basal.....	99
<i>Ubx</i> , regulación de la matriz extracelular y forma de los apéndices.	100
Dinámica de la expresión de Integrinas y proteínas asociadas en los discos pupales de ala y halterio.....	102
<i>Ultrabithorax</i> , <i>blistered</i> y regulación de Integrinas y Tensina.....	104
Conclusiones/Conclusions	107
Bibliografía	113
Agradecimientos	127
Anexo 1: Publicaciones	133



Resumen/Abstract

A lo largo de la evolución, órganos provenientes del mismo ancestro adquieren formas diferentes, y las formas óptimas para la supervivencia son las que permanecen, siendo estos órganos homólogos. Pero cómo la presión selectiva influye en las bases genéticas de la organogénesis aún no se conocen. En esta Tesis hemos estudiado los mecanismos que determinan la forma de dos órganos homólogos en *Drosophila melanogaster*, el ala y el halterio, que provienen de discos imaginales muy similares en forma hasta la pupación, pero que dan lugar a órganos adultos con formas completamente diferentes: mientras que el ala es plana, el halterio es globular. Esta diferencia viene dada por la expresión de un único gen: el gen Hox *Ultrabithorax*, que se expresa en el disco de halterio y no en el de ala. Hemos comparado el desarrollo de los discos imaginales de ala y halterio en las primeras etapas de pupa, mostrando que en el disco de halterio no existe aposición de las superficies dorsal y ventral, mientras que en el disco de ala ésta tiene lugar y se produce también una expansión del tejido, todo lo cual en última instancia le proporciona la forma plana al órgano.

Hemos observado que el gen *Ultrabithorax* reprime la expresión de *Metaloproteasa 1* y activa la expresión del gen *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*, que inhibe la actividad de Metaloproteinasas, en etapas tempranas de la pupación. Esta regulación retrasa la eliminación de la membrana basal en el disco de halterio y evita así la aposición de superficies dorsal y ventral. En el disco de ala, en cambio, la actividad de Metaloproteasa 1 y la ausencia de expresión de *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* permite la unión de los dos epitelios. La actividad ectópica de Metaloproteasa 1 en el disco de halterio produce halterios más alargados y planos y la inhibición de metaloproteasas en el disco de ala, alas más cortas e hinchadas.

Tras la etapa de aposición en el disco de ala se da la etapa de adhesión entre estas superficies dorsal y ventral, la cual tampoco ocurre en el disco de halterio. La adhesión está llevada a cabo por Integrinas, que hemos observado poseen una expresión más restringida en el disco de halterio respecto al disco de ala, durante gran parte de la pupación. Igual ocurre con una proteína asociada a integrinas, Tensina, y en ambos casos la represión de la expresión en el disco de halterio depende de *Ultrabithorax*. Integrinas y Tensina son reguladas positivamente por el factor de transcripción codificado por el gen *blistered* en la parte distal del disco de ala, mientras que este gen no se transcribe en la correspondiente parte del disco de halterio. Esto sugiere que *Ultrabithorax* podría reprimir la expresión de Integrinas y Tensina a través de *blistered*. El gen *Ultrabithorax*, por tanto, regula la adhesión dorso-ventral y la forma del halterio a través de distintos mecanismos durante la pupación.

Throughout evolution, organs originating from a common ancestor acquire different shapes. The shapes more suitable for the function are the ones which succeed in nature, known as homologous organs. But how selective pressure impact organogenesis genetic is still unclear. In this work we have studied the mechanism which determine the shape of two homologous organs in *Drosophila melanogaster*, wing and haltere. Both come initially from similarly shaped imaginal discs but will give rise to completely different adult organs shape: wings are flat and halteres are globular. Those different identities are defined by a single gene: the Hox gene *Ultrabithorax (Ubx)*, specifically expressed in haltere.

We compared the development of wing and haltere imaginal discs during early pupal stage. We showed that apposition between the dorsal and ventral surfaces and tissue expansion takes place in the wing disc to establish its flat shape in the adult organ. and that this process does not occur in haltere disc. We observed that the gene *Ubx* downregulates the expression of *Metalloprotease 1* and upregulates the expression of *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* which in turn inhibits the Metalloproteases activity in early pupa stages. This regulation delays the degradation of the basal membrane in haltere disc, preventing the apposition of the dorsal and ventral surfaces. Nevertheless, in the wing disc the activity of Metalloprotease 1 and the absence of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases allows the dorso-ventral adhesion. Ectopic expression of *Metalloprotease 1* produces more elongated and flatter halteres, and the inhibition of Metalloproteases in the wing disc, produce bloated and shorter wings.

After the apposition stage in wing disc, there is another stage called adhesion, which does not occur in haltere. The adhesion is ensured by Integrins, which have a more restricted expression in haltere discs compare to wing discs during pupal stage. The protein Tensin, one of the Integrin associated proteins, has a similar expression pattern than integrins in haltere disc. Both Integrins and Tensin are downregulated in haltere by *Ultrabithorax*. On the other hand, Integrins and Tensin are upregulated by the transcription factor Drosophila Serum Response Factor coded by the *blistered* gene in the distal part of the wing disc, while in the same part of the haltere disc this gene is not expressed. This suggest that *Ultrabithorax* gene repress the expression of Integrins and Tensin through *blistered*. The *Ultrabithorax* gene is, therefore, regulating the dorso-ventral adhesion and the shape of the haltere through different mechanisms during the pupal stage.



Abreviaturas

A1a/p	Segmento A1 anterior/posterior
<i>abx</i>	<i>anterobithorax</i>
<i>bs</i>	<i>blistered</i>
<i>by</i>	<i>blistery</i>
<i>bx</i>	<i>bithorax</i>
<i>bx-d</i>	<i>bithoraxoid</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
<i>Cg25C</i>	<i>Collagen at 25C</i>
DE-cad	DE-cadherina
Df	Deficiencia
DFP	Después de la formación del pupario
ds	"Double stranded" (Doble cadena)
Fit	Fermitina
GFP	"Green fluorescent protein"
HM	<i>Haltere-mimic</i>
IAP	Proteína asociada a integrinas
<i>if</i>	<i>inflated</i>
Larva III	Larva de tercer estadio
MB	Membrana basal
<i>mew</i>	<i>multiple edematous wing</i>
MEC	Matriz Extracelular
Mmp1	Metaloproteasa 1
Mmp2	Metaloproteasa 2
<i>mys</i>	<i>myspheroid</i>
<i>pbx</i>	<i>postbithorax</i>
Ph	"Phalloidine" (Faloidina)
PS	"Position Specific"
<i>rn</i>	<i>rotund</i>
RNAi	Ácido ribonucleico interferente
<i>sd</i>	<i>scalloped</i>
SH	Solución de Hibridación
T1a/p	Segmento T1 anterior/posterior
T2a/p	Segmento T2 anterior/posterior
T3a/p	Segmento T3 anterior/posterior
<i>Timp</i>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteases</i>
<i>trol</i>	<i>terribly reduced optic lobes</i>
TOPRO	TO-PRO-3
Tub-Gal80 ^{ts}	Tubulina Gal80 termosensible
<i>Ubx</i>	<i>Ultrabithorax</i>
<i>vkg</i>	<i>viking</i>



Introducción

1. La Biología del Desarrollo.

Desde que el ser humano tiene uso de razón se ha preguntado cómo los seres vivos son capaces de desarrollarse, cómo de dentro de un huevo puede salir un pollito, o cómo de un gusano acuático puede salir un mosquito. Han sido muchas las hipótesis al respecto, por parte de científicos, filósofos y teólogos, que nos han llegado de la antigüedad. No fue hasta el siglo XVII, sin embargo, cuando lo que pareciera magia en un principio, acabara cobrando sentido. La clave simplemente estaba en mirar más de cerca, literalmente. La fabricación del microscopio sirvió para algo más que para probar la calidad de las telas de un ávido comerciante; fue el principio de la teoría celular. Más adelante, en el siglo XVIII, se observaron los primeros tejidos compuestos por numerosas células, a primera vista idénticas, y a base de experimentos y observación, nació el concepto de pluricelularidad que ha llegado hasta nuestros días. Somos pues, los seres vivos pluricelulares, un conjunto de células diferenciadas que realizan funciones especializadas según el tejido en el que se encuentran.

Actualmente estamos en el punto de intentar explicar cómo los seres vivos pluricelulares nos desarrollamos a partir de una sola célula. Hoy en día sabemos que esa primera célula tiene capacidad de dividirse en células similares, lo que conocemos con el nombre de proliferación, hasta que esas células, además de dividirse, comienzan a especializarse para tomar una identidad cada vez más específica, llamándose a este proceso diferenciación. ¿Y cómo es posible que, a partir de una célula, se desarrollen otras células completamente diferentes entre sí hasta dar lugar a un organismo? La respuesta viene dada por dos conceptos: genética e interacción. La genética establece la acción, y la interacción entre células establece el momento y el modo. Cada ser vivo de cada especie es diferente debido a la información genética que esa primera célula lleva y que determina tamaño y forma final del individuo, pero sin coordinación entre las diferentes células no sería posible el desarrollo del organismo.

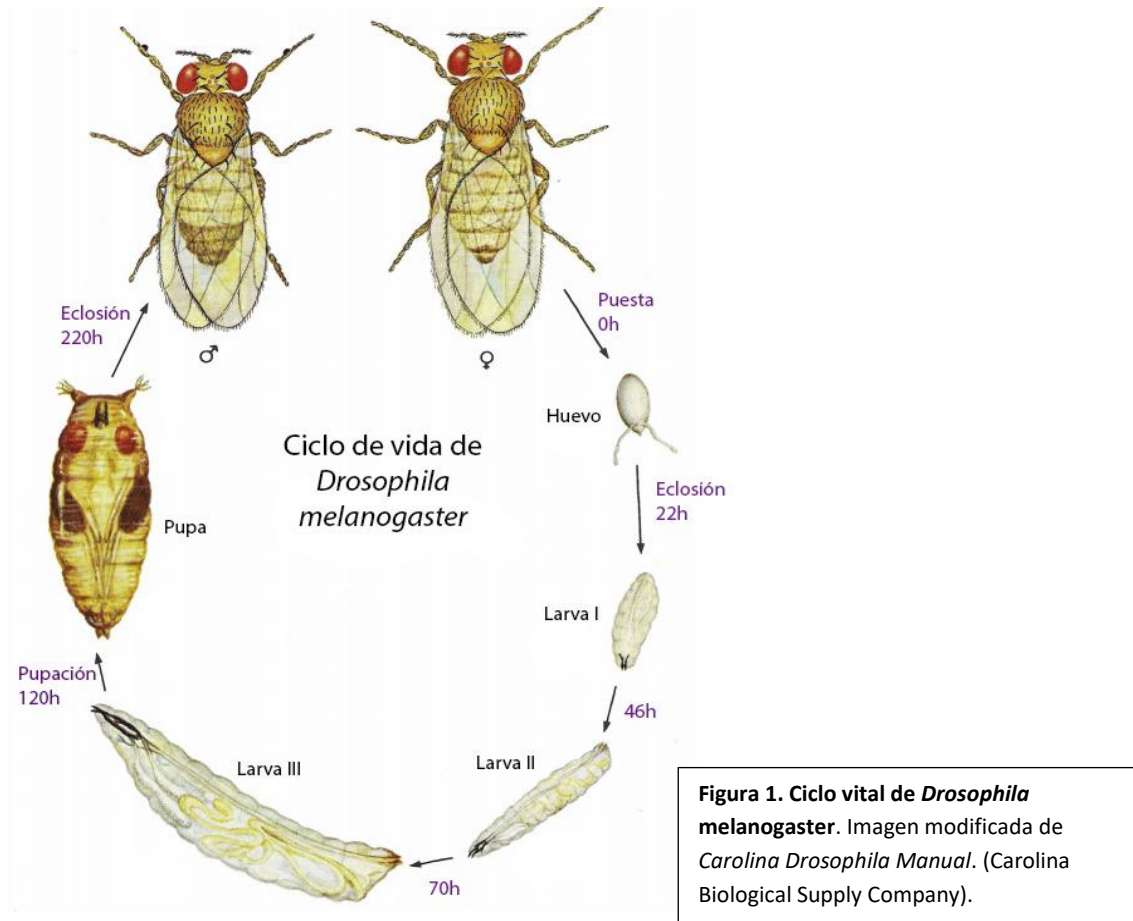
Así pues, y para resumir, podemos definir la Biología del desarrollo como el estudio de los procesos que hacen posible que una célula individual dé lugar a un organismo adulto pluricelular. La Biología del desarrollo está en consonancia con otra rama de la Biología, llamada Evo-Devo, que establece líneas filogenéticas y evolutivas de los seres vivos a partir de cómo se desarrollan. Así es como sabemos que los seres vivos empleamos los mismos tipos de genes para controlar procesos del desarrollo similares, es decir, que en última instancia, la base genética del desarrollo está conservada filogenéticamente.

Esta información es lo que nos ha llevado a utilizar organismos modelo para estudiar el desarrollo de los seres vivos. Dependiendo del proceso a estudiar se pueden utilizar desde vegetales como *Arabidopsis thaliana* hasta vertebrados como *Mus musculus*. En nuestro caso en este trabajo, el organismo modelo utilizado ha sido la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*.

2. *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster es el organismo modelo más estudiado en la Biología del desarrollo desde que, a principios del siglo XX, fuera adoptado como animal de experimentación genética por Thomas Morgan. Trabajar con este organismo modelo aporta numerosas ventajas. Entre ellas destacan: su pequeño tamaño y por tanto su facilidad para la cría en cautividad a bajo coste, su fácilmente reconocible dimorfismo sexual, su rápido ciclo vital de unos 10 días a 25°C y su organización cromosómica sencilla, ya que sólo tiene cuatro pares de cromosomas. Otra ventaja muy notable es que su ADN está completamente secuenciado (Adams et al., 2000), albergando su genoma alrededor de 13.600 genes. Además, durante los últimos años se han desarrollado numerosas herramientas genéticas (como el sistema Gal4/UAS) y moleculares que permiten controlar espacio-temporalmente la expresión de los genes, facilitando así el estudio de los factores implicados en su desarrollo. Cerca del 75% de genes humanos vinculados con enfermedades, tienen su homólogo en el genoma de la mosca de la fruta (Reiter et al., 2001), lo cual lo hace un organismo modelo perfecto también para el estudio de patologías humanas.

Como insecto holometábolo, sufre una metamorfosis completa durante el desarrollo. Después de la fecundación, la embriogénesis es seguida de tres estadios larvarios que finalizan alrededor de las 120 horas después de la puesta, y tras los cuales se forma la pupa. En este estadio permanece durante 4-5 días, en los cuales se está produciendo el desarrollo de los tejidos adultos (Fig. 1).



3. Anatomía de *Drosophila melanogaster*.

Durante los 10 días que dura el desarrollo de *Drosophila*, van tomando forma las estructuras que componerán el individuo adulto. En el embrión ya existen ciertos grupos de células que se singularizan en su epidermis y comienzan a expresar los genes que determinarán, al menos en parte, distintas estructuras cuticulares del adulto. Esos primordios embrionarios darán lugar en el embrión y durante el desarrollo posterior, a los discos imaginales (Cohen et al., 1993) y a los nidos de histoblastos. Los discos imaginales son estructuras epiteliales en forma de saco que se encuentran adheridas a la cara interna de la pared larvaria y que formarán durante la metamorfosis, los distintos órganos de la mayor parte del adulto. En la larva de *D. melanogaster* hay 9 pares de discos imaginales más un disco imaginal impar. Estos discos formarán la cutícula de la cabeza, tórax, genitalia y analia (Fig. 2). Los histoblastos, por su parte, son conjuntos de células agrupados en nidos y presentes en el abdomen larvario que darán lugar a la cutícula abdominal del adulto. Los discos imaginales proliferan durante el desarrollo larvario, mientras que los histoblastos lo hacen durante el periodo pupal (Madhavan y Schneiderman, 1977; Ashburner, 1989).

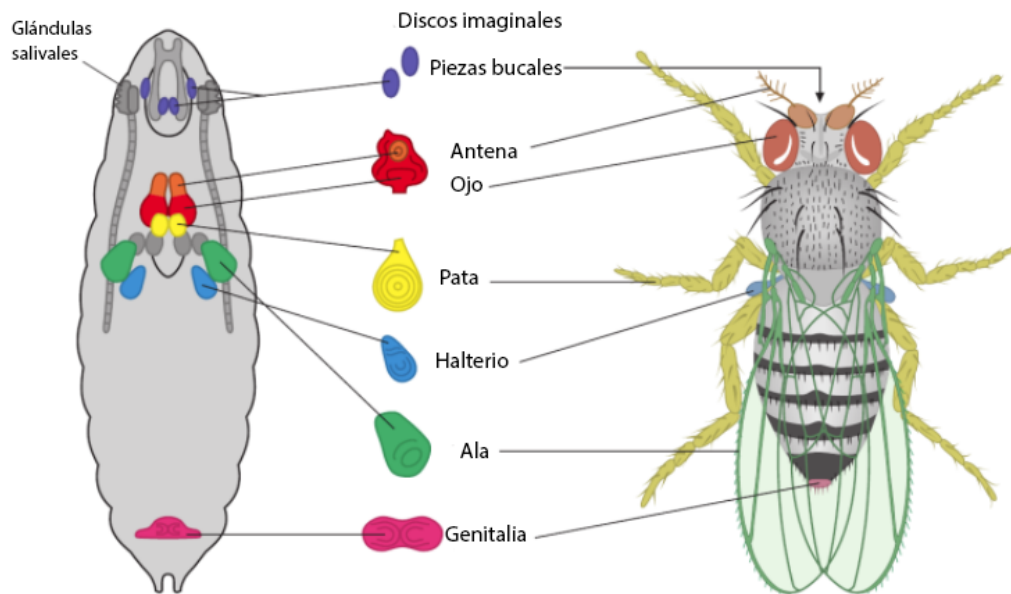


Figura 2. Localización de los discos imaginales en larva y estructuras a las que darán lugar en el adulto. Modificado de Wolpert et al., 2011.

4. Definición del eje antero-posterior de *Drosophila melanogaster*.

El estudio de los mecanismos genéticos que definen los ejes espaciales básicos en el desarrollo de *D. melanogaster* ha dado lugar a algunos de los descubrimientos más relevantes en Biología del desarrollo. En *D. melanogaster*, la determinación inicial del eje anteroposterior comienza antes de la fertilización, ya que en cada oocito, que desciende de una célula germinal de la hembra, se sintetizan ARN mensajeros (ARNm) como *bicoid* y *nanos* que se localizan de manera diferencial en su eje antero-posterior debido a su interacción con el citoesqueleto (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980; Frohnhöfer et al., 1986; Nüsslein-Volhard, 1991; Morisato, 1995). Tras la fecundación, esos ARNm se traducen dando lugar a proteínas reguladoras que se distribuyen en gradientes opuestos desde ambos extremos del embrión y activan o reprimen la expresión de determinados genes cigóticos, definiendo así por primera vez su eje anteroposterior (Driever y Nüsslein-Volhard, 1988; Wang y Lehmann, 1991). Los genes que primero determinan los ejes del embrión y se transcriben en el oocito se conocen como genes de efecto materno. A su vez, los genes cigóticos activados por las proteínas codificadas por los genes de efecto materno se llaman genes *gap* (revisado en Akam, 1987; Ingham, 1988; Lawrence, 1992), los cuales codifican para factores de transcripción que a su vez regulan a los genes *pair-rule*. Estos genes se expresan en 7 bandas a lo largo del eje antero-posterior del blastodermo. Los factores de transcripción codificados por estos genes activan a su vez a los genes de polaridad de segmento, cuyos productos, ARNm y proteínas, dividen al

embrión en 14 segmentos. Estos genes se expresan durante toda la vida del individuo estableciendo una división fundamental repetida a lo largo del eje antero-posterior, mediante la cual las células de cada unidad metamérica se dividen en dos compartimentos, el anterior y el posterior. Los compartimentos son unidades de linaje celular que se definen por la expresión mutuamente excluyente de los genes de polaridad segmental, *cubitus interruptus* (*ci*) en anterior y *engrailed* (*en*) en posterior. Los compartimentos anterior y posterior se observan también en los discos imaginales y en los grupos de histoblastos de cada segmento abdominal. De esta manera, todas las células provenientes del compartimento anterior o posterior quedarán determinadas genéticamente, sin mezclarse con las de otro compartimento (García-Bellido et al., 1973; Morata y Lawrence, 1975; Lawrence y Morata, 1976; Kornberg et al., 1985; Eaton y Kornberg, 1990; Mann y Morata, 2000).

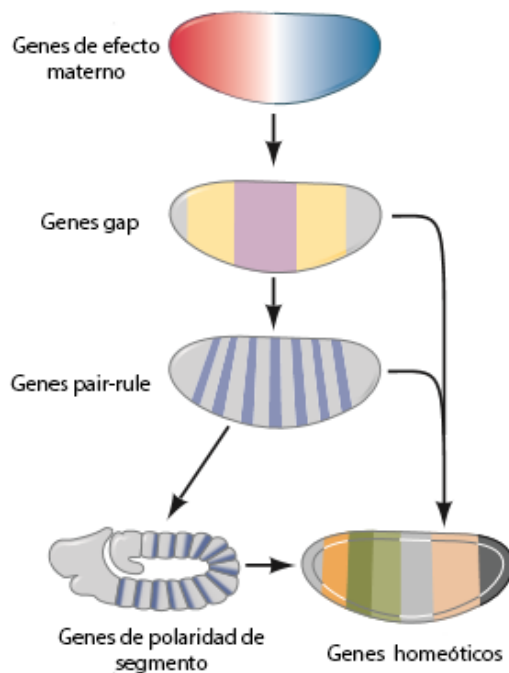


Figura 3. Modelo de especificación segmental antero-posterior en *Drosophila melanogaster*. Los genes de efecto materno codifican proteínas que forman gradientes y activan a diferentes genes *gap* según la posición respecto al eje antero-posterior. Una vez que los genes *gap* se traducen en factores de transcripción, que además se localizan en posiciones concretas por represión mutua, activan a los genes *pair-rule*. Estos genes colaboran entre ellos y con los genes *gap* estableciendo un patrón de expresión de los genes de polaridad de segmento que a su vez establecen, junto con los dos anteriores, el patrón interno de cada segmento individual. Imagen modificada de Gilbert et al., 2016.

Al mismo tiempo, las proteínas producidas por los genes *gap*, *pair-rule* y de polaridad de segmento interaccionan para regular otro tipo de genes, los llamados genes homeóticos, cuya transcripción determina el destino de cada segmento formado por la expresión de los genes de polaridad de segmento. Los genes homeóticos se expresarán también durante toda la vida del individuo, manteniendo la información posicional relativa en el eje antero-posterior. Así pues, se establece una secuencia jerárquica de expresión de genes que dividen al embrión en regiones cada vez más pequeñas y específicas y que poseen su propia identidad (Fig. 3)

(Kornberg et al., 1985; Ingham y Martínez-Arias, 1986; Akam, 1987; Harding y Levine, 1988; Ingham, 1988; Heemskerk et al., 1991).

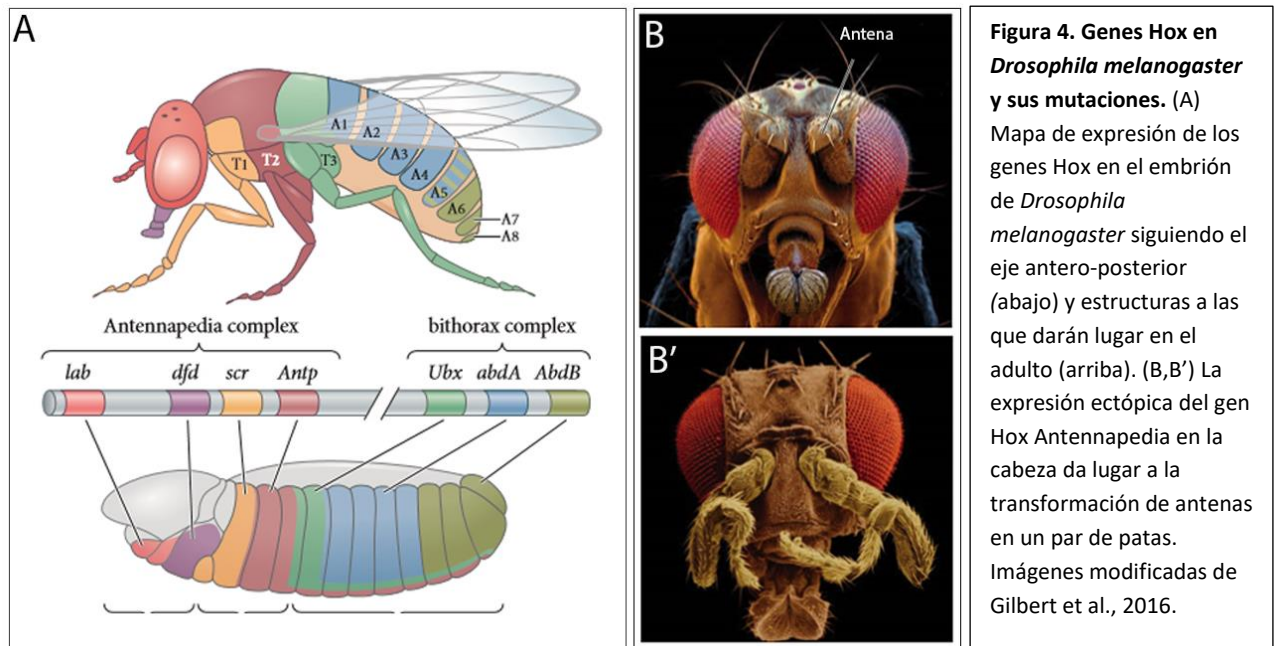
5. Los genes homeóticos.

Como ya hemos dicho, después de formarse los segmentos, los genes pair-rule y gap interaccionan para regular la expresión de los genes homeóticos o genes Hox, los cuales especifican el eje anteroposterior del embrión, larva y adulto, definiendo las características morfológicas de cada segmento (Lewis, 1978). Los genes homeóticos de *Drosophila melanogaster* se agrupan en dos complejos: el complejo Antennapedia, que contiene los genes homeóticos *labial*, *Antennapedia*, *Sex comb reduced*, *Deformed* y *proboscipedia*, que especifican los segmentos de la cabeza y del tórax (Wakimoto et al., 1984; Kaufman et al., 1990), y el complejo Bithorax, que contiene los genes *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal A (abd-A)* y *Abdominal B (Abd-B)*, los cuales son responsables de la identidad segmental de segmentos torácicos y abdominales (Lewis, 1978; Sánchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985; Maeda y Karch, 2009) (Fig. 4A). Esta agrupación en complejos génicos está conservada evolutivamente, con pocas excepciones (Duboule, 2007; Negre et al., 2005). La expresión restringida de estos genes es necesaria y suficiente para determinar las diferentes estructuras del cuerpo. Por ejemplo, la proteína Antennapedia especifica el segundo segmento torácico de la mosca, pero si se expresa de forma ectópica en la cabeza, crecen patas en lugar de antenas (Struhl, 1981; Frischer et al., 1986; Schneuwly et al., 1987) (Fig. 4B, B').

Una característica sorprendente de los genes Hox es que presentan colinearidad, es decir, su orden en el cromosoma se corresponde con los dominios de expresión que abarcan dichos genes a lo largo del eje antero-posterior del organismo (Lewis, 1978; Tschopp y Duboule, 2011). Presentan también una secuencia de 180 nucleótidos muy conservada a nivel evolutivo (la secuencia *homeobox*) (McGinnis et al., 1984; Scott y Weiner, 1984), que codifica para un dominio proteico u homeodominio, a través del cual las proteínas Hox se unen al ADN y ejercen su función como factores de transcripción, activando o reprimiendo un gran número de genes implicados en diversos procesos del desarrollo tales como la proliferación, diferenciación o muerte celular. Existe asimismo una relación entre genes homeóticos conocida como jerarquía transcripcional, por la que cada gen Hox está regulado transcripcionalmente de manera negativa por genes expresados en la parte posterior respecto a ellos (Hafen et al., 1984; Struhl y White, 1985). Además, la función de genes posteriores

domina sobre la de genes anteriores, lo que se conoce como “supresión fenotípica” o “prevalencia posterior” (González-Reyes et al., 1990; González-Reyes y Morata, 1990; Duboule, 1991; Duboule y Morata, 1994;).

Como ya hemos dicho, los genes Hox se requieren a lo largo de todo el desarrollo, y por ello existen mecanismos para mantener los dominios de actuación de estos genes de manera que se encuentren en estado activo donde deben actuar y permanezcan silenciados donde no son requeridos. Esta tarea viene dada por los genes de los grupos *Polycomb* (Pc-G) y *Trithorax* (trx-G), los cuales son reguladores epigenéticos y tienen capacidad para unirse a ciertas secuencias de ADN, en el caso del complejo Pc-G para impedir que los genes se transcriban y en el caso de trx-G al contrario, es decir, para activar la transcripción (Mazo et al., 1990; Breen y Harte, 1991; Simon et al., 1993; Kennison, 1995; McCall y Bender, 1996; Pirrota, 1997; Brown et al., 1998; Francis et al., 2001; Dejardin y Cavalli, 2004; Batignes y Cavalli, 2006).



6. El gen Hox *Ultrabithorax*.

El gen Hox *Ultrabithorax* (*Ubx*) es un gen perteneciente al complejo Bithorax (Fig. 5A) y especifica desde el compartimento posterior del segundo segmento torácico (T2p) al compartimento anterior del primer segmento abdominal (A1a), ambos inclusive (aunque se

expresa, al menos en el embrión, también en segmentos abdominales posteriores al A1) (Lewis, 1963; Morata y Kerridge, 1981; Hayes et al., 1984; Akam y Martinez-Arias, 1985; Beachy et al., 1985; White y Wilcox, 1985). El segundo segmento torácico (T2) desarrolla un par de alas además de un par de patas, y el tercero (T3) desarrolla, además de un par de patas, un par de órganos balanceadores llamados halterios.

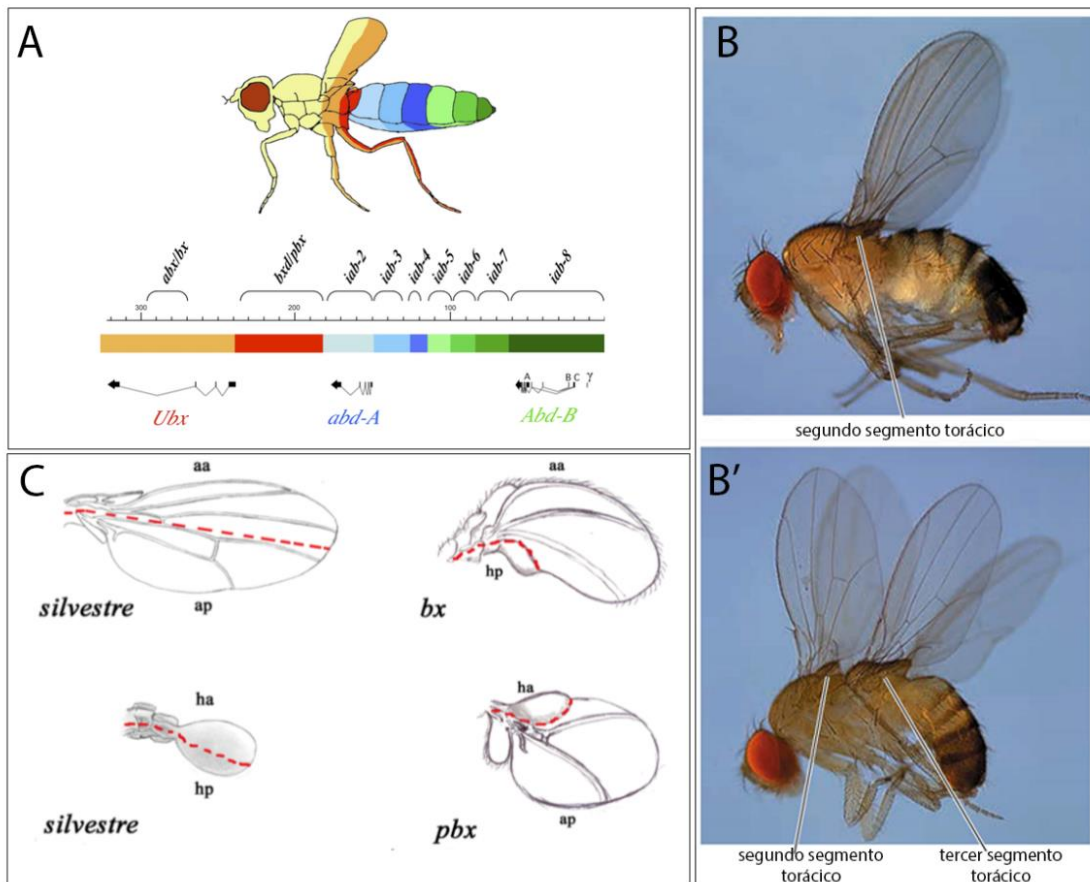


Figura 5. Secuencias reguladoras del gen *Ubx* y fenotipos de sus mutaciones. (A) esquema del complejo Bithorax de *Drosophila*. Se encuentran señaladas las regiones reguladoras del gen *Ubx*: *abx/bx* en naranja y *pbx/bxd* en rojo (Modificada de Maeda y Karch, 2006). (B,B') La pérdida de función en el gen *Ubx* da lugar a la transformación del tercer segmento torácico en otro segundo segmento, resultando en un individuo con cuatro alas. Imagen modificada de Gilbert et al., 2016. (C) Transformaciones *bx* y *pbx*. Los mutantes *bx* tienen el compartimiento anterior transformado en ala y los mutantes *pbx* el compartimiento posterior. La línea discontinua señala la división entre el compartimiento anterior y el posterior. a= ala anterior, ap= ala posterior, ha=halterio anterior y hp= halterio posterior. Tomado de manuscrito de tesis de Luis De Navas, 2006.

En mutantes homeóticos las identidades segmentales pueden ser cambiadas de manera que, por ejemplo, al eliminar la expresión del gen *Ultrabithorax* el tercer segmento torácico se transforma en otro segundo segmento torácico. El resultado es una mosca con cuatro alas en vez de dos (Fig. 5B, B') (Lewis, 1963). Además, la expresión ectópica de *Ubx* en el disco de ala

es suficiente para transformar el ala en halterio (Lewis, 1963; Cabrera et al., 1985; White y Akam, 1985). Esto indica que el gen *Ubx* es necesario y suficiente para llevar a cabo la diferenciación del segmento T3.

Existen distintas mutaciones en diversas secuencias reguladoras responsables de la correcta expresión de *Ubx* a lo largo del desarrollo. Estas mutaciones en las secuencias reguladoras pueden agruparse en dos clases: las mutaciones *anterobithorax* y *bithorax* (*abx/bx*) y las mutaciones *postbithorax* y *bithoraxoid* (*pbx/bxd*). Las mutaciones *abx/bx* producen la transformación del compartimento posterior del segundo segmento torácico (T2p) en el correspondiente del primer segmento del tórax (T1p) y del compartimento anterior del tercer segmento torácico (T3a) en el correspondiente del segundo segmento (T2a). Esto demuestra que estas secuencias reguladoras son las responsables de la expresión de *Ubx* en T2p y T3a. Las mutaciones *pbx* producen la transformación de T3p en T2p y las *bxd*, además de ésta, la transformación de A1 en T3a, siendo por lo tanto responsables de la expresión y función de *Ubx* en dichos compartimentos (Fig. 5C) (Lewis, 1963; Garcia-Bellido et al., 1976; Morata y Kerridge, 1981; Bender et al., 1985; Hayes et al., 1984; Casanova et al., 1985; Peifer y Bender, 1986). Estas transformaciones ocurren tanto en discos ventrales (de pata) como dorsales (de halterio). En este trabajo estudiamos solo la función de *Ubx* en la determinación del apéndice metatorácico dorsal, el halterio.

7. El halterio como modelo de estudio de la influencia de los genes Hox en la organogénesis.

En la naturaleza encontramos especies animales con determinadas morfologías que los hacen diferenciarse de otros animales. La forma de los órganos resulta de la presión evolutiva y ambiental que favorece los cambios genéticos que resultan más ventajosos en ese momento y lugar. Es por eso que encontramos estructuras en la naturaleza que, proviniendo de órganos con una estructura básica similar, acaban teniendo formas diferentes según las necesidades del entorno, favoreciéndose la expansión de formas más adecuadas para la supervivencia. (Fig. 6A, B). Estos órganos son conocidos como órganos homólogos.

Para estudiar de qué manera los genes influyen en la evolución de la forma de los órganos homólogos *Drosophila melanogaster* es un buen candidato, debido a las ventajas que presenta

este organismo modelo (explicadas más arriba) y a la presencia de órganos homólogos cuya diferente morfología se debe a la función de genes Hox (como explicamos antes para el caso de *Antennapedia*, las antenas y las patas). En nuestro trabajo nos hemos centrado en los dos apéndices torácicos dorsales de la mosca, alas y halterios, que son estructuras homólogas. El halterio proviene de la evolución de un par de alas trasero, ya que los insectos voladores “más primitivos” poseían (y poseen) dos pares de alas (Fig. 6C, D) y la teoría es que este segundo par se transformó en un par de halterios, que son órganos que favorecen el vuelo del insecto.

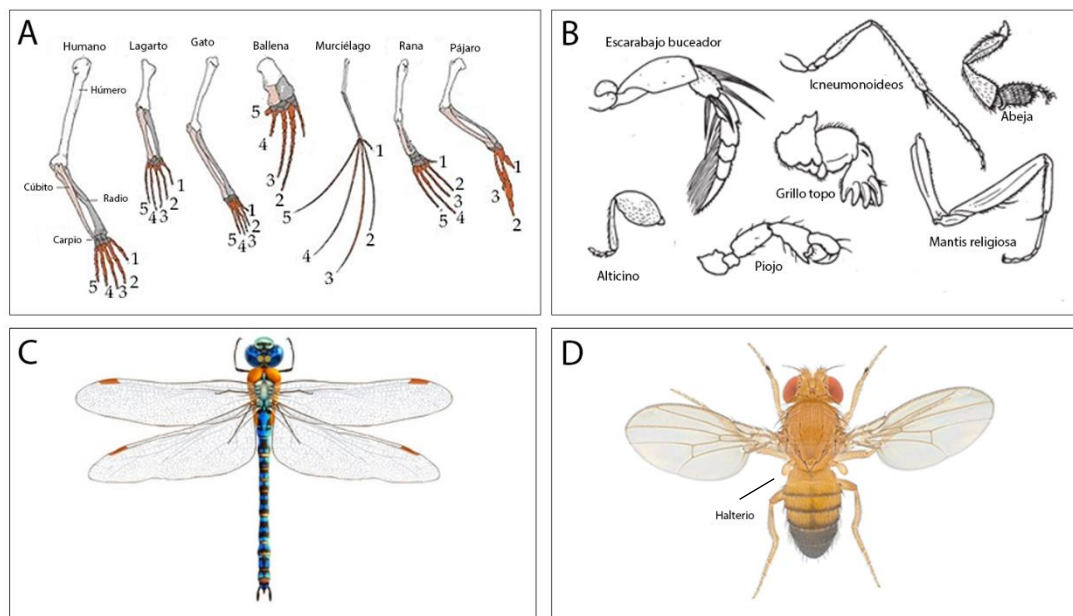


Figura 6. Ejemplos de la diversidad de órganos homólogos encontrados la naturaleza. (A) Ejemplos de estructuras homólogas encontradas en diferentes especies de vertebrados. (B) Estructuras homólogas encontradas en diferentes especies de artrópodos. (C) Ejemplo de un insecto volador con cuatro alas (anisóptero). (D) Imagen de *Drosophila melanogaster* mostrando un par de alas y un par de halterios.

Las alas de *Drosophila melanogaster* se localizan en el segundo segmento torácico, y derivan de discos imaginales de ala. Son considerablemente más grandes que los halterios, que se localizan en el tercer segmento torácico y derivan de discos imaginales de halterio. Además de diferenciarse en el tamaño, también llama la atención la disparidad en cuanto a la forma: mientras que las alas son planas, los halterios tienen forma de maza, con una parte distal globular llamada capitelo, una parte en forma de asta llamada pedicelo, y una parte que une tórax con pedicelo, llamada escabelo (Fig. 7B, D). Los halterios son estructuras cuya función consiste en estabilizar el vuelo de los insectos (Dickinson, 1999), ya que vibran arriba y abajo durante el vuelo, de forma contraria al movimiento de las alas. De esta manera, cuando el

insecto rota durante el vuelo, los halterios están sujetos a una inercia proporcional a la velocidad angular del cuerpo. Este movimiento resulta en una variación de la tensión en la base del halterio, donde existen sensilas campaniformes que traducen esta información como rotación del cuerpo, y el insecto puede corregirla.

Los discos imaginales de ala y halterio se componen de diferentes partes. La parte que en el disco de ala da lugar al ala en sí, y en disco de halterio al capitelo se llama *pouch*. La parte que da lugar a la zona más proximal del ala, que es el lugar de unión entre el ala y el tórax se llama *hinge*, y en disco de halterio esta parte da lugar al pedicelo y al escabelo. Por último la parte que da lugar tanto en disco de ala como en disco de halterio a la parte torácica del tercer segmento se llama *notum* (Fig. 7E).

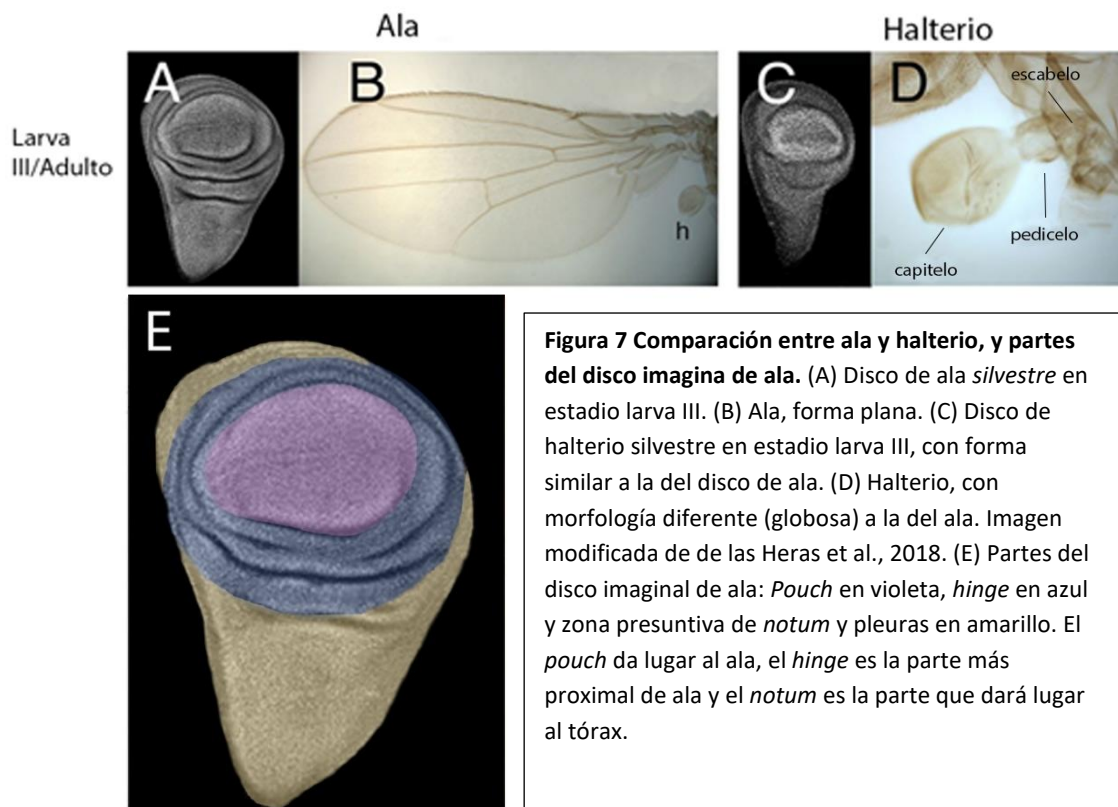


Figura 7 Comparación entre ala y halterio, y partes del disco imagina de ala. (A) Disco de ala *silvestre* en estadio larva III. (B) Ala, forma plana. (C) Disco de halterio *silvestre* en estadio larva III, con forma similar a la del disco de ala. (D) Halterio, con morfología diferente (globosa) a la del ala. Imagen modificada de de las Heras et al., 2018. (E) Partes del disco imaginal de ala: *Pouch* en violeta, *hinge* en azul y zona presuntiva de *notum* y pleuras en amarillo. El *pouch* da lugar al ala, el *hinge* es la parte más proximal de ala y el *notum* es la parte que dará lugar al tórax.

Al comparar los precursores de estos dos apéndices, es decir, los discos imaginales de ala y halterio, durante la etapa de larva tardía, es evidente la gran similitud de forma entre ambos, aunque en tamaño sean diferentes, ya que el disco de ala es más grande que el disco de halterio (Fig. 7A, C). Esto conduce a pensar que la morfología diferencial entre ala y halterio, ocurre durante la etapa de pupa.

El desarrollo pupal del disco de ala ha sido ampliamente estudiado a lo largo del tiempo (Fristrom y Fristrom, 1975, 1993; Fristrom, 1976; Aldaz et al., 2010; Díaz-de-la-Loza y Thompson, 2017). Al comienzo de la metamorfosis, el disco de ala evierte a través de la membrana peripodial, la región del *pouch* se expande, y las superficies dorsal y ventral se aponen. Este proceso se completa alrededor de las 8h después de la formación de pupario (DFP) (Fig. 8A). Tras esta primera adhesión ambas superficies, dorsal y ventral, se separan, y se vuelven a aponer hacia las 25h DFP, pasando por un segundo proceso de adhesión dorso-ventral y dando así lugar a lo que conocemos como el ala del adulto (Fig. 8B). Por otro lado, el desarrollo pupal del disco de halterio no ha sido sujeto de un estudio exhaustivo. Lo que sí se ha descrito es que, en el disco de halterio, las superficies dorsal y ventral no se aponen en la parte del capitelo, y el *pouch* permanece como una cavidad durante todo el desarrollo (Roch y Akam, 2000).

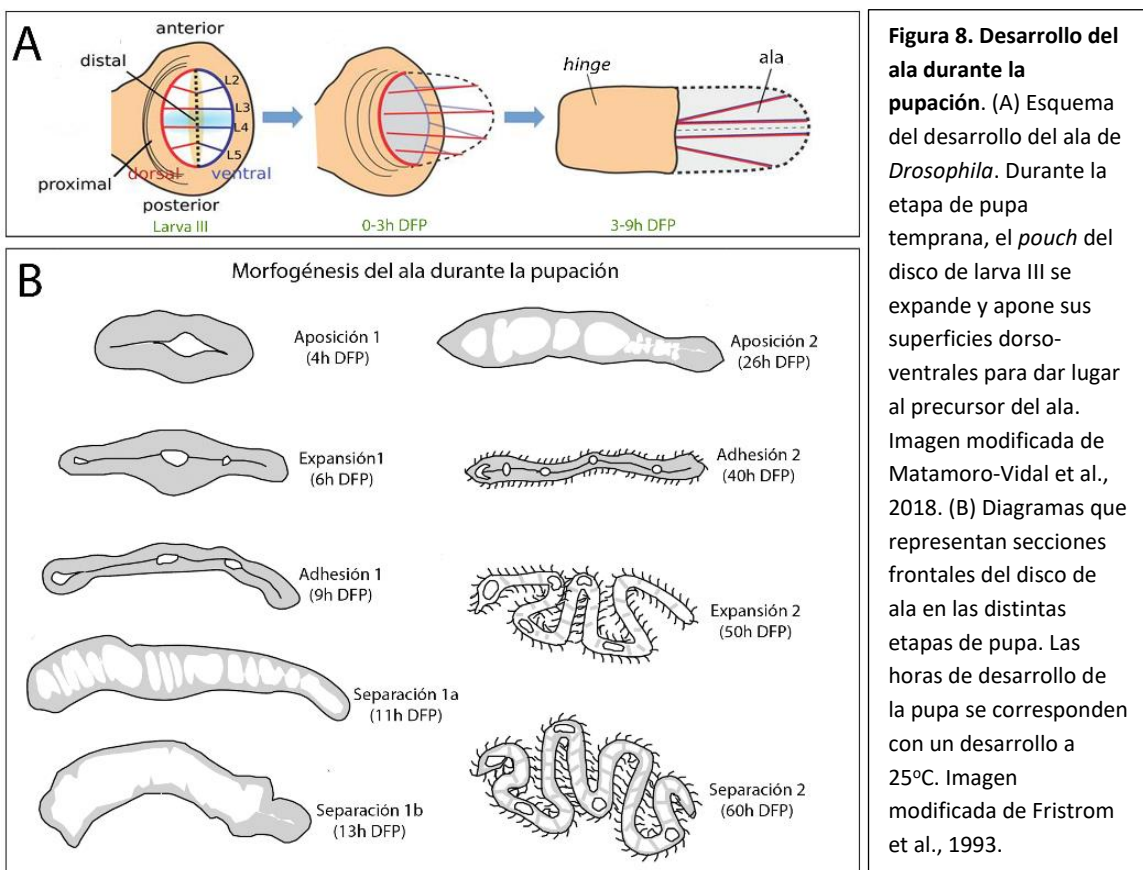


Figura 8. Desarrollo del ala durante la pupación. (A) Esquema del desarrollo del ala de *Drosophila*. Durante la etapa de pupa temprana, el *pouch* del disco de larva III se expande y apone sus superficies dorso-ventrales para dar lugar al precursor del ala. Imagen modificada de Matamoro-Vidal et al., 2018. (B) Diagramas que representan secciones frontales del disco de ala en las distintas etapas de pupa. Las horas de desarrollo de la pupa se corresponden con un desarrollo a 25°C. Imagen modificada de Fristrom et al., 1993.

El gen Hox *Ultrabithorax* es un factor de transcripción y por lo tanto su función es la de controlar la expresión de distintos genes *downstream* que especifican tamaño, forma y diferenciación de distintas estructuras. En el disco imaginal de halterio *Ubx* controla la

actividad de distintas vías de señalización para determinar que su crecimiento y diferenciación sean diferentes a las del disco de ala (Weatherbee et al., 1998; Shashidhara et al., 1999; Prasad et al., 2003; Mohit et al., 2006; de Navas et al., 2006; Crickmore y Mann, 2006; Makhijani et al., 2007). Sin embargo, el cómo *Ubx* está regulando la forma específica del halterio, en oposición a la del ala, aún no se ha estudiado. Esta tesis va dirigida al estudio del gen Hox *Ultrabithorax* y su papel en la organogénesis del halterio.

8. La membrana basal y su función durante la morfogénesis de órganos.

La membrana basal (MB) es una matriz extracelular (MEC) especializada, que se sitúa en la superficie basal de las células epiteliales, rodeando los órganos, y tiene un papel importante en morfogénesis, señalización, compartimentalización y mantenimiento de los tejidos (Timpl, 1989; Yurchenco y Schittny, 1990). Su remodelación durante la organogénesis ha sido objeto de estudio en diferentes estructuras, demostrándose que es un elemento crucial para la correcta formación de distintos órganos (Hynes, 2009; Haigo y Bilder, 2011; Pastor-Pareja y Xu, 2011; Crest et al., 2017).

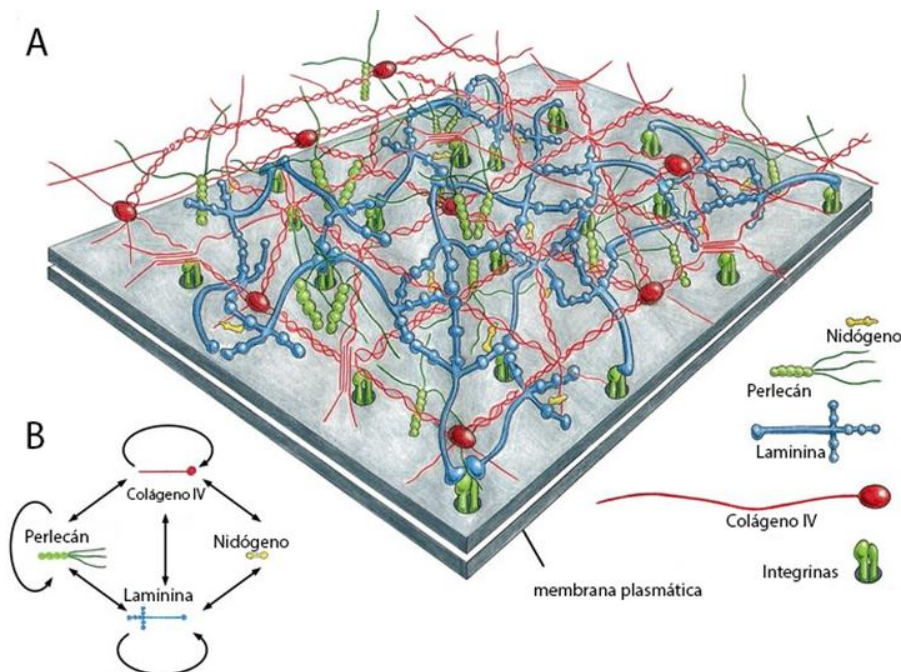


Figura 9. Estructura de la lámina basal. (A) La lámina basal se forma a través de uniones entre las proteínas Laminina, Colágeno IV, Nidógeno y Perlecán. Las integrinas se encargan de mediar la unión entre la membrana basal y el medio intracelular, concretamente el citoesqueleto de actina. (B) Las flechas muestran las interacciones que se dan entre las proteínas de la membrana basal para conferirle su estructura final. Imagen modificada de Alberts et al., 2015.

Se trata de un polímero formado por proteínas, entre las cuales destaca principalmente el Colágeno IV, por ser el más abundante (alrededor del 50% de las proteínas encontradas en la

MB). El Colágeno IV se compone de tres cadenas α que se unen al resto de proteínas por interacciones con dominios laterales y finales (Yurchenco y Ruben, 1987). El Colágeno IV se encuentra en todos los animales, desde esponjas a humanos, lo cual indica que tiene un papel importante en el desarrollo de organismos (Hynes y Zhao, 2000). *Drosophila* tiene dos genes que codifican para las cadenas α del Colágeno IV, llamados *viking* (*vkg*) y *Collagen at 25C* (*Cg25C*) (Le Parco et al., 1986; Natzle et al., 1982; Rodriguez et al., 1996; Yasothornsrikul et al., 1997). En *Drosophila* el Colágeno IV es imprescindible para el desarrollo, ya que la pérdida de función de ambos genes causa letalidad en el embrión (Borchiellini et al., 1996; Rodriguez et al., 1996).

Aparte del Colágeno IV, existen otros tres componentes en la membrana basal, que son Laminina, Nidógeno y Perlecán, los cuales están conservados en *Drosophila* también (Hynes y Zhao, 2000) (Fig. 9) La laminina es el más abundante después del Colágeno, e interacciona con el resto de los elementos de la membrana basal (Cognato y Yurchenco, 2000). Junto con estos dos elementos encontramos en la membrana basal de *Drosophila* otras dos proteínas menos abundantes, el Nidógeno codificado por el gen *Nidogen* que une la Laminina con el Colágeno IV (Mann et al., 1988; Fox et al., 1991; Reinhardt et al., 1993; Ries et al., 2001), y el Perlecán, codificado por el gen *terribly reduced optic lobes* (*trol*), que regula la constricción ejercida por el Colágeno en la superficie basal de las células (Pastor-Pareja y Xu, 2011).

A través de numerosos estudios, se ha demostrado el papel de la membrana basal en la correcta morfología de diversos órganos, como el disco imaginal de ala o la glándula salival (Fig. 10A-D). Esto se debe principalmente a la tensión ejercida por la membrana basal en las células, estrechándolas por la base y dándoles así una forma columnar, diferenciándolas de la forma cuboidal que adquieren en su ausencia (Fig. 10E).

Puesto que se ha demostrado el papel de la MB en la determinación de la forma de distintos órganos, pretendemos investigar el posible papel que podría desempeñar el gen *Hox Ultrabithorax* en la regulación de la membrana basal en el disco de halterio, tratando de comprender los mecanismos que llevan a la divergencia morfológica existente entre las formas finales de ala y halterio. En 2011 se llevó a cabo un análisis de genes regulados por el gen *Ubx* comparando la expresión de genes inducidos o reprimidos tras expresión ectópica de este gen en el disco de ala con los genes propios del disco de ala silvestre en etapas larvaria tardía y pupales (Pavlopoulos y Akam, 2011).

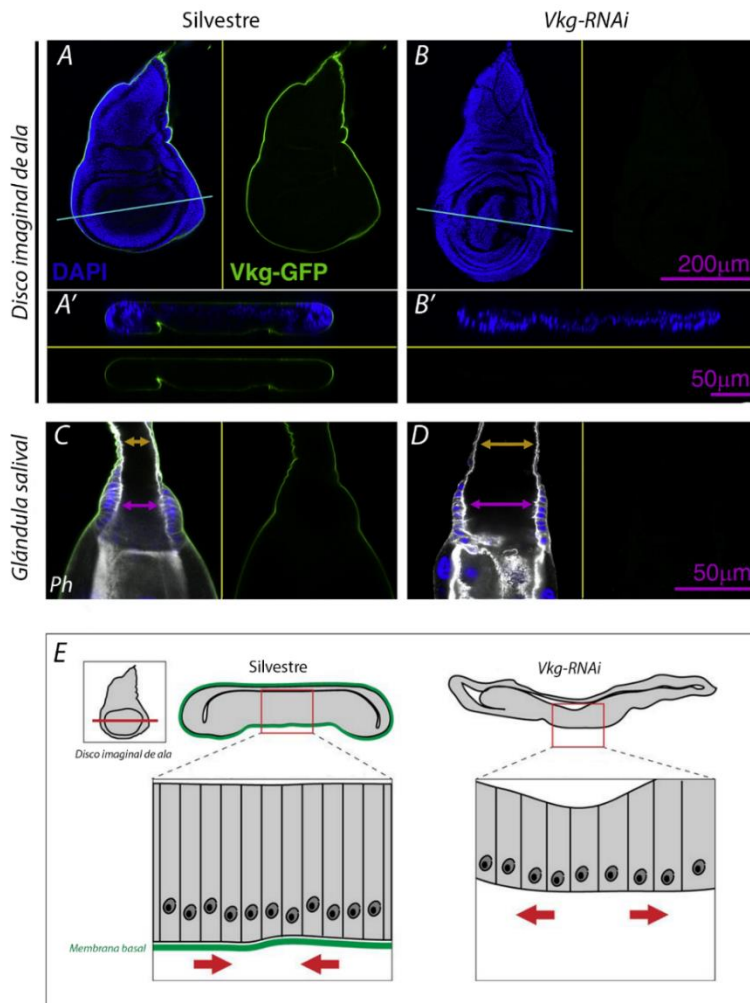


Figura 10. Efecto de la membrana basal en la morfología de órganos. (A,B) Imágenes de la forma del disco y localización de Vkg-GFP en discos de ala de larva III de *Drosophila* silvestre (A) y en mutantes para el gen *vkg* (B). A' y B' muestran secciones transversales de los mismos discos, observándose en B' una disposición celular desordenada y una expansión del tejido respecto al disco silvestre en A'. (C,D) Imágenes mostrando la forma de la glándula salival de *Drosophila* en etapa de larva III en un individuo silvestre (C) y en un individuo mutante para el gen *vkg* (D). Las flechas indican la expansión del lumen del ducto (naranja) y del anillo imaginal (rosa). Imágenes extraídas y modificadas de Pastor-Pareja y Xu, 2011. (E) Esquema de cómo la membrana basal influye en la forma celular del disco imaginal de ala. Las flechas rojas indican hacia dónde se está ejerciendo la fuerza que lleva a la compactación del epitelio, comparando el silvestre con el individuo mutante para *vkg*, cuyas células son más cortas y amplias en superficie. Imagen modificada de Morrissey y Sherwood, 2015.

Este trabajo identificó como dianas del gen *Ubx*, entre otros, numerosos genes que codificaban para proteínas relacionadas con la MEC y la adhesión. Además de mostrar elementos que pertenecen a la propia matriz extracelular, como el gen *LamininA*, también se identificaron genes que codifican para proteínas relacionadas con la dinámica de la membrana basal. Estas proteínas eran: Matrix metalloproteinase 1 (Mmp1), Matrix metalloproteinase 2 (Mmp2) y su inhibidor Tissue inhibitor of metalloproteinases (Timp). Las metaloproteasas tienen como función la remodelación del tejido degradando la matriz extracelular (Srivastava et al., 2007), y Timp inhibe a estas metaloproteasas uniéndose a ellas e inactivándolas (Fig. 11) (Brew et al., 2000). Ambas Mmps pueden aparecer difundiendo en el medio o ancladas a la membrana celular (Lafever et al., 2017). En *Drosophila* existen solamente estas dos metaloproteasas (Llano et al., 2000, 2002) y un único inhibidor Timp (Godenschwege et al., 2000) que anula completamente la actividad de estas dos metaloproteasas (Page-McCaw et al., 2003). En cambio, en mamíferos existen alrededor de 20 isoformas de Mmps (Nagaset et al., 1999) y 4 isoformas de Timp (Brew y Nagase, 2001).

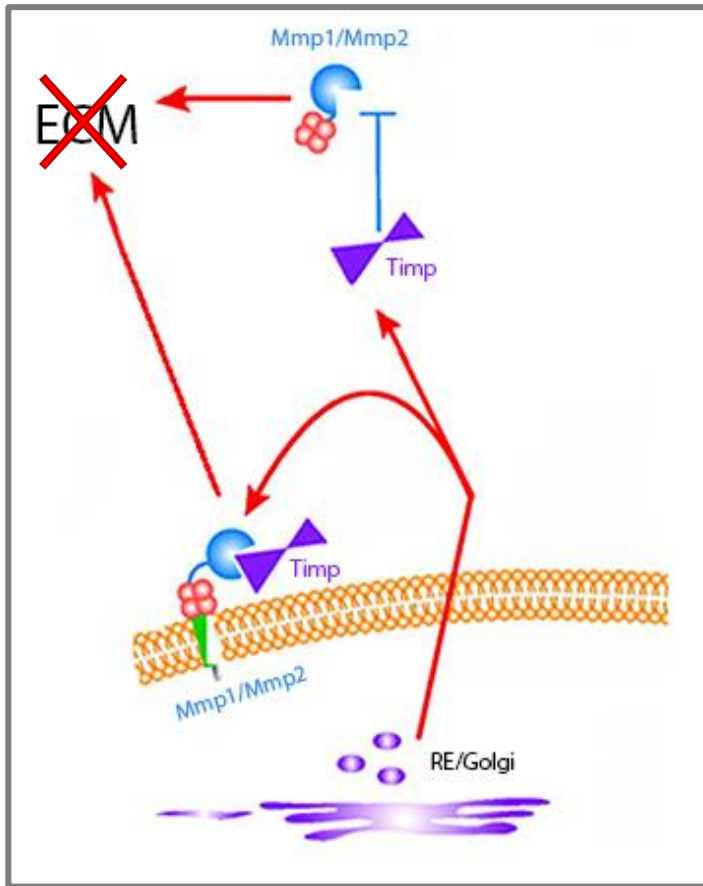


Figura 11. Esquema del mecanismo de acción de los elementos del metabolismo de membrana basal. Las metaloproteasas se pueden encontrar tanto diluidas en el medio (a) como ancladas a la membrana celular (b). La función de las metaloproteasas Mmp1 y Mmp2 es degradar los elementos que conforman la matriz extracelular. La proteína Timp (c) se une a las metaloproteasas y las inhibe, impidiendo la degradación de la matriz extracelular. Imagen modificada de Baker et al., 2002.

9. Integrinas y proteínas asociadas a integrinas (IAPs).

Un factor importante por describir es cómo la membrana basal se une a las células epiteliales. Este proceso se lleva a cabo principalmente a través de las integrinas. Las integrinas son proteínas transmembrana que conectan estructuralmente el medio externo e interno celular. Se necesitan para multitud de funciones durante el desarrollo, tales como diferenciación, proliferación y adhesión (Bökel y Brown, 2002; Watt, 2002). La amplitud de funciones que llevan a cabo viene dada principalmente por la variedad de ligandos externos por los que tienen afinidad, en vertebrados desde Inmunoglobulinas y D-Cadherinas a elementos de la matriz extracelular, como Fibronectina o Laminina. Cada integrina es un heterodímero, compuesto de una cadena α y una β , cada una de las cuales constituye una proteína transmembrana de paso único tipo I, conteniendo además un dominio citoplasmático muy corto por el cual se une al citoesqueleto de actina (revisado en Juliano y Haskill, 1993; Humphries et al., 1993.) (Fig. 12A). Las subunidades α y β deben unirse entre sí para hacer el receptor extracelular funcional (Cheresh y Spiro, 1987; Kishimoto et al., 1987; Leptin et al., 1989). En *Drosophila* existen 5 tipos de subunidades α de integrinas (α -PS1-5), y 2 subunidades

β (β PS y β v). La primera subunidad descrita en *Drosophila* fue a raíz de una mutación descubierta de forma casual en el gen que codificaba para α -PS2, y que causaba alas hinchadas. A este gen se le llamó *inflated* (*if*) por el fenotipo observado (Weinstein, 1918). Posteriormente se hallaron otros genes que codificaban para subunidades de integrinas, como el gen *mysospheroid* (*mys*), que codifica para la β PS (Wright, 1960) (Fig. 12C), o el gen *multiple edematous wings* (*mew*), que codifica para la α -PS1 (Leptin et al., 1987), y cuyas mutaciones daban como resultado también alas hinchadas.

En 1989 se observó por primera vez que las integrinas PS1 (α -PS1 β PS) y PS2 (α -PS2 β PS) tenían un patrón de expresión muy específico en el disco de ala de larva III. Mientras que PS1 se expresa en la parte dorsal, PS2 lo hace en la ventral (Brower et al., 1984), y esta distribución conduce a una correcta adhesión entre las dos superficies del ala en la etapa de metamorfosis (Brower y Jaffe, 1989) (Fig. 12B). Estas dos integrinas, necesarias para la adhesión en disco de ala, comparten la misma subunidad β , que es β PS.

Las integrinas, como hemos descrito anteriormente, son las encargadas de la comunicación entre el medio externo con el medio interno, concretamente con el citoesqueleto de actina de la célula. Como ligando extracelular únicamente se han identificado tres en *Drosophila*, y dos de ellos son lamininas, elemento de la membrana basal comentado en el apartado anterior. A su vez, su conexión intracelular con el citoesqueleto no es directa, sino a través de un amplio número de proteínas intracelulares que tienen afinidad por el dominio citoplasmático de las integrinas (Fig. 12A). Estas proteínas son llamadas proteínas asociadas a integrinas (IAPs) y la mayoría están conservadas en *Drosophila* (Hynes y Zhao, 2000). No todas participan en procesos de adhesión, ya que las integrinas tienen además otras funciones, como migración celular o señalización. En procesos de adhesión destacan Talina, PINCH, Vinculina o Tensina. Concretamente la función de la Tensina, codificada por el gen *blister* (*by*), parece ser únicamente en la estabilización de las adhesiones focales, ya que se requiere durante la formación de estructuras adultas, como alas y músculos para el vuelo, los cuales están sujetos a altos niveles de estrés y grandes fuerzas mecánicas. (Torgler et al., 2004; Green et al., 2018).

Dado que las integrinas son las encargadas de la adhesión de las superficies dorso-ventrales del ala, nos resultó interesante estudiar si su expresión era diferente en el disco de halterio respecto del disco de ala, y si *Ubx* era responsable de su regulación para evitar esta adhesión

en el halterio. Así pues, en nuestro estudio de cómo *Ubx* produce una diferente forma (globular) en la parte distal del halterio respecto al ala (plana) nos hemos centrado en el análisis de la regulación de la matriz extracelular e integrinas por el gen *Hox Ubx*.

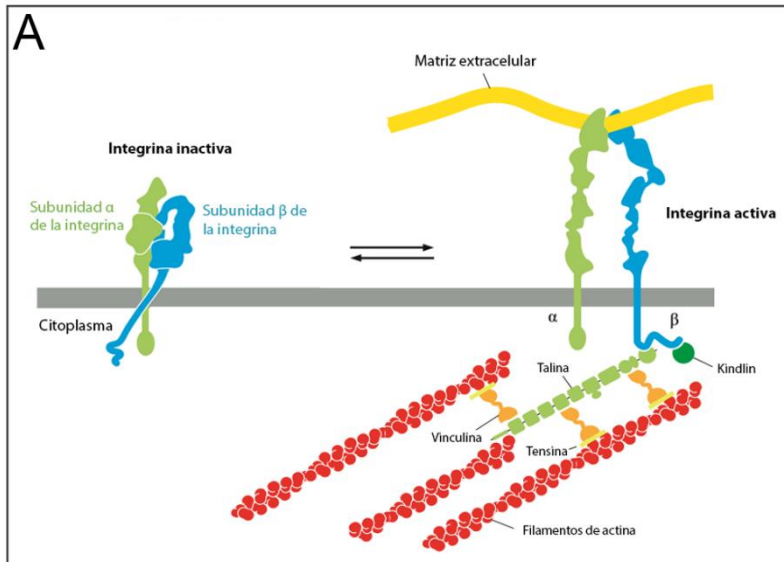
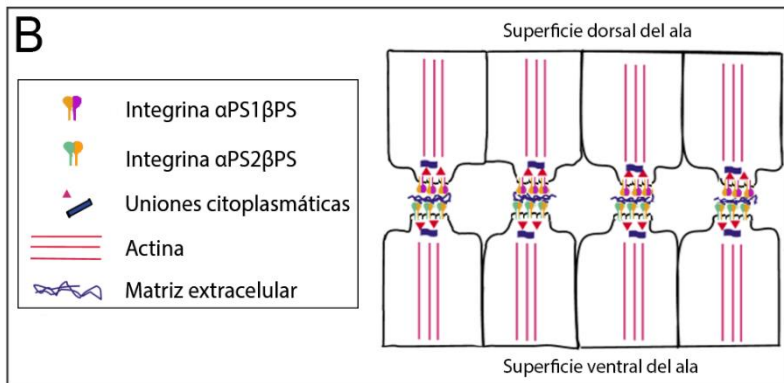


Figura 12. Mecanismo de acción de las integrinas, y su disposición en el disco de ala de *Drosophila*. (A) Las integrinas existen en dos conformaciones, inactivas y activas. Las integrinas activadas pueden unirse a la membrana basal en su dominio extracelular y al citoesqueleto de actina intracelularmente. Su unión al citoesqueleto no es directa, sino que depende de las proteínas asociadas a integrinas (IAPs), a las cuales se une a través del extremo C-terminal de la subunidad β . Imagen modificada de Alberts et al., 2015. (B) Distribución de las integrinas α -PS1 β PS y α -PS2 β PS en el disco de ala de *Drosophila* durante la etapa de pupa. La integrina α -PS1 β PS se localiza en la superficie dorsal, mientras que α -PS2 β PS lo hace en la superficie ventral. Esta distribución permite la adhesión dorsoventral de ambas superficies. Imagen modificada de Brower, 2003. (C) Ejemplo de sobreexpresión de un dominante negativo del gen *mys* en un fondo mutante para el mismo gen. *mys* codifica la subunidad β PS, común a PS1 y PS2. Imagen extraída de Domínguez-Giménez et al., 2007.





Objetivos

En esta Tesis hemos estudiado el papel del gen *Ultrabithorax* en la morfogénesis del halterio, de acuerdo con los siguientes objetivos:

- Estudiar las diferencias entre el desarrollo de los discos imaginales de ala y halterio en la etapa de pupa temprana, el papel de la dinámica de la membrana basal en la regulación de la forma del halterio y del ala, y su regulación por el gen *Ultrabithorax*.
- Analizar la distribución de Integrinas y Tensina en los discos de ala y halterio en etapa de pupa, estudiar su regulación por el gen *Ultrabithorax* y su posible implicación en la morfogénesis del halterio.

Materiales y métodos

1. Líneas de *Drosophila melanogaster* utilizadas.

1.1 Mutantes:

Se utilizaron las siguientes líneas mutantes: *pbx*¹ (Lewis, 1963), *DfUbx*¹⁰⁹ (Lewis, 1978), *Hm* (Lewis, 1982), *bs*^{P1292} (Karpen y Spradling, 1992), *bs*¹³ y *bs*¹⁴ (Fristrom et al., 1994).

1.2 Líneas LacZ:

El gen LacZ es uno de los tres genes presentes en el operón lactosa de eubacterias, y codifica para la enzima β-galactosidasa. Este gen se utiliza como herramienta para localizar expresión génica, incluyéndolo dentro de elementos P, que a su vez se insertan en el gen de interés (O'Kane y Gehring, 1987). Así pues, cuando el gen de interés se exprese, se expresará también el elemento P-LacZ inserto en él. Para observar después la expresión del gen se utiliza el compuesto orgánico X-gal, que en contacto con la enzima β-galactosidasa, da coloración azul.

Se utilizó la siguiente línea LacZ: *bs*^{P1292} [lac-Z, rosy+], inserción I(2)03267 (Karpen y Spradling, 1992).

1.3 Construcciones:

Se utilizaron las siguientes construcciones para ver expresión de proteínas mediante microscopio de fluorescencia: *Vkg-GFP* (*vkg*^{G454}) y *Trol-GFP* (*trol-GFP*^{ZCL1700}) (Morin et al., 2001), DE-cadherin-Tomato (Huang et al., 2009), *mew-GFP* (Kyoto Stock Center, Kyoto Institute of Technology, línea 115183), DE-cadherin-GFP (Huang et al., 2009), *mys-GFP* (Vienna Drosophila Research Center, línea 318285), *Tensin-GFP* (Torgler et al., 2004), *Fit1-GFP* y *Fit2-GFP* (donados por el laboratorio de Nick Brown, Cambridge).

1.4 Expresión de genes o construcciones de ARN interferente:

Una herramienta muy precisa y eficaz para la expresión ectópica de genes o expresión de ARN interferente en *Drosophila* es el sistema Gal4/UAS. Esta técnica consiste en cruzar una línea parental que tiene una secuencia activadora UAS insertada delante de un ADN complementario

(cDNA) del gen de interés, con otra línea que posee el transgén Gal4, que reconoce secuencias UAS y se expresa según las secuencias reguladoras cercanas a su punto de inserción. De esta manera la descendencia poseerá tanto el transgén Gal4 como la secuencia UAS unida al gen de interés. El transgén Gal4 codifica para la proteína Gal4, que a su vez reconoce a las secuencias UAS a las cuales se une, activando a través de éstas la transcripción del gen de interés con el patrón temporal y espacial con los que la proteína Gal4 se esté expresando (Fig. 13A) (Brand y Perrimon, 1993; Elliot y Brand, 2008).

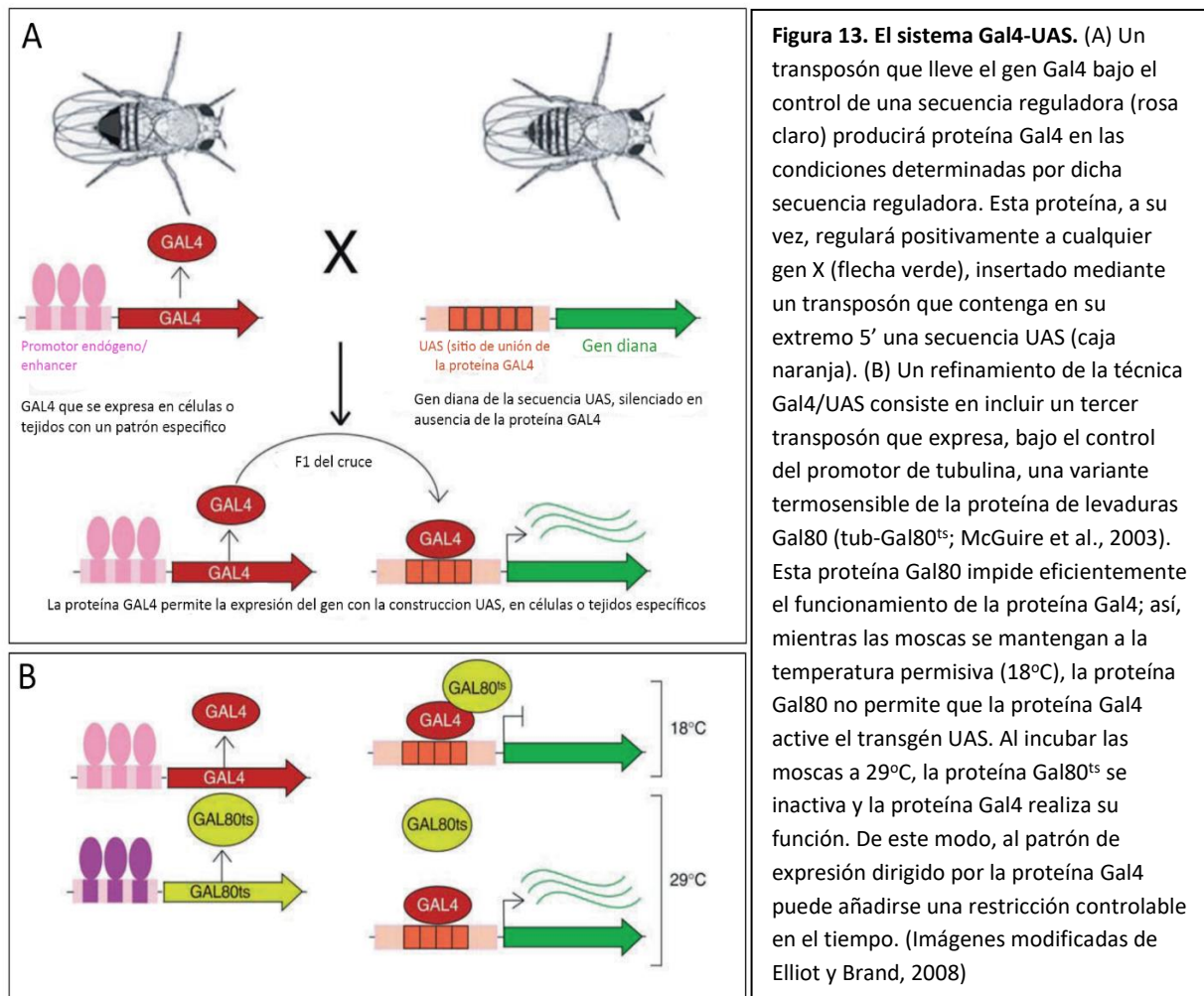
1.4.1 Líneas Gal4:

sd-Gal4 (Calleja et al., 1996), *rn-Gal4* (St. Pierre et al., 2002).

1.4.2 Líneas UAS:

UAS-dsUbx (Monier et al., 2005), *UAS-Mmp1* y *UAS-Timp* (Page-McCaw et al., 2003), *UAS-bs* (Montagne et al., 1996), *UAS-GFP* (Ito et al., 1997), *UAS-Mys-RNAi* (*Bloomington Drosophila Stock Center*, línea 33642), *UAS-by-RNAi* (*Vienna Drosophila Resource Center*, línea 22823), *UAS-Mmp1-RNAi* (*Vienna Drosophila Resource Center*, línea 101505), *UAS-bs-RNAi* (*Vienna Drosophila Resource Center*, línea 100609),

Para aumentar la precisión del sistema, y controlar en qué momento del desarrollo se expresa el gen de interés, se ha añadido un tercer transposón que incluye un cDNA de tubulina que codifica una proteína Gal80 termosensible (*tub-Gal80^{ts}*; McGuire et al., 2003). Esta proteína actúa inactivando la proteína Gal4 y por tanto impidiendo que ésta se una a la secuencia UAS. Dado que la proteína es termosensible, permanece activada a una temperatura alrededor de los 18°C y, por tanto, a esta temperatura la proteína Gal4 no actuaría sobre la secuencia UAS. Sin embargo, al alcanzar una temperatura de 29°C la proteína Gal80^{ts} se inactiva y la proteína Gal4 puede realizar su función (Fig. 13B).



2. Disección y fijación de discos imaginales de larva y pupa.

Para poder observar en el microscopio los discos imaginales de ala y halterio, tanto de larva como de pupa, se han utilizado los siguientes procedimientos, según la etapa del desarrollo estudiada.

2.1 Datación de pupas:

- Los tiempos en pupación se calculan considerando la pupa blanca como tiempo 0 de la pupación. En los experimentos de cambio de temperatura de 17°C a 29°C con tubGal80^{ts} se seleccionaban pupas blancas (tiempo 0 de la pupación), tras realizarse todo el crecimiento a 17°C, y se dejaban desarrollar después a 17°C por el tiempo requerido hasta cambiarlas a 29°C. Se calculó el tiempo de desarrollo a 25°C como la mitad del que tenía lugar a 17°C. Los tiempos que se dan de desarrollo pupal en estos experimentos se

muestran tras esta conversión. Aunque en la literatura se suele referir al estadio de 0-9/11h tras el comienzo de la pupación como prepupa hemos preferido denominar pupas tempranas a estos especímenes (y tardías a las posteriores).

- La datación de pupas tardías se realizó de acuerdo a Chyb y Gompel, 2013.

2.2 Larvas estadio III y pupas de 3h a 9h DFP (Después de la Formación de Pupario):

- Para diseccionar las larvas se pasan a un portaobjetos excavado con PBS 1X y colocado sobre hielo. Seguidamente se agarra de la parte anterior de la larva con unas pinzas y con otras pinzas se tira de su parte media para desgarrarla por la mitad y poder extraer los discos imaginales de la parte anterior (entre los que se encuentran los de ala y halterio) dándole la vuelta a la larva a modo de calcetín.

Para diseccionar las pupas, se colocan en un celo de doble cara y con una cuchilla de afeitar se realiza un corte longitudinal en su parte media para facilitar el limpiado de los tejidos internos y la exposición de los discos para su posterior fijación. Tras realizar el corte se pasan las pupas a un portaobjetos excavado con PBS 1X y colocado sobre hielo para su limpieza.

- Se fija a continuación con paraformaldehído 4% durante 30' a temperatura ambiente con agitación.

- Se realiza después 1 lavado de 10' con PBT 0,1% Tween20, y 2 lavados de 10' en PBS 1X a temperatura ambiente.

2.3 Pupas de 10h DFP a 50h DFP:

- Se diseccionan las pupas como se indicó en el apartado anterior. Acto seguido se extrae la cutícula transparente en cuyo interior se encuentran los discos y todo el conjunto se sumerge directamente en la solución de fijación.

- Se fijan con paraformaldehído 4% toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Se fija tanto tiempo para que la cutícula transparente se vuelva más dura y se facilite así la extracción de los discos de su interior.

- Se realiza 1 lavado de 10' con PBT 0,1% Tween20 y 2 lavados de 10' en PBS 1X a temperatura ambiente.

3. Tinciones inmunohistoquímicas y montaje de muestras.

3.1 Larvas estadio III y pupas de 3h a 9h DFP:

- Después de la fijación y lavado, se bloquea 2 veces con una solución PBT-BSA (albúmina de suero bovino) 1% durante 20' a temperatura ambiente.
- Se incuba con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C.
- Se retira el anticuerpo primario y se realiza 1 lavado de 10' con PBT 0,1% Tween20, y 2 lavados de 10' en PBS 1X a temperatura ambiente.
- Se añade el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y se incuba 2h a temperatura ambiente.
- Junto con el anticuerpo secundario se añade, si procede, faloidina (*TRITC-phalloidin*, *Sigma Aldrich*, 1:200 o *Phalloidin-Atto 647N*, *Life Technologies*, 1:200) o ToPro-3, (*Life Technologies*, 1:500).
- Se realiza 1 lavado de 10' con PBT 0,1% Tween20 y 2 lavados de 10' en PBS 1X a temperatura ambiente.
- Se monta en la solución *Vectashield* (*Vector Laboratories*, Inc.). Para no aplastar los discos se crea en el portaobjetos un pocillo con celo de doble cara (Fig. 14) y se coloca *Vectashield* en el interior. Las preparaciones siempre se montan poniendo cuidado en emparejar ala y halterio del mismo lado de la pupa.

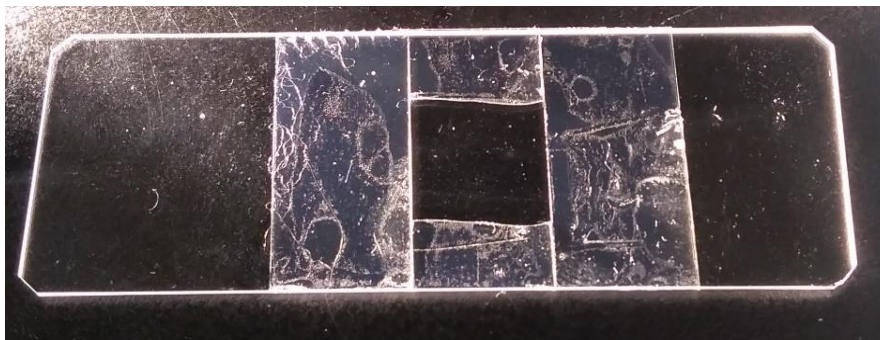


Figura 14. Procedimiento de montaje de muestras. Se crea un pocillo en el portaobjetos con fragmentos de celo de doble cara para evitar el aplastamiento de los discos. En su interior se coloca el *Vectashield* y a continuación las muestras.

3.2 Pupas de 10h DFP a 50h DFP:

- Después de la fijación y lavado, dado que la cutícula transparente dificulta la entrada tanto de

anticuerpo como de faloidina, se realiza una incisión en la misma en la parte donde se encuentran los discos de interés.

- Se bloquea 2 veces con una solución PBT-BSA (albúmina de suero bovino) 1% durante 20' a temperatura ambiente.
- Se incuba con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C.
- Se retira del anticuerpo primario y se realiza 1 lavado de 10' con PBT 0,1% Tween20 y 2 lavados de 10' en PBS 1X a temperatura ambiente.
- Se añade el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y se incuba 2h a temperatura ambiente.
- Junto con el anticuerpo secundario se añade, si procede, faloidina al 0.5%.
- Se realiza 1 lavado de 10' con PBT 0,1% Tween20, y 2 lavados de 10' en PBS 1X a temperatura ambiente.
- Se extraen los discos de dentro de la cutícula transparente con la ayuda de agujas enmangadas, con cuidado de no tocar los mismos.
- Se monta en la solución *Vectashield* siguiendo el mismo procedimiento explicado en el apartado anterior.

4. Anticuerpos.

Para la detección de proteínas en los discos imaginales de ala y halterio se han utilizado los siguientes anticuerpos:

- Anti-Mmp1, desarrollado en ratón, compuesto de una mezcla de anticuerpos monoclonales (Page-McCaw et al., 2003; *Developmental Studies Hybridoma Bank*, 3A6B4, 3B8D12 and 5H7B11, 1:50).
- Anti-If, desarrollado en ratón (Brower y Jaffe, 1989; *Developmental Studies Hybridoma Bank*, CF.2C7, 1:20).
- Anti-Ubx, desarrollado en ratón (*Developmental Studies Hybridoma Bank*, FP3.38, 1:20)

Para detectar los anticuerpos primarios se han utilizado los anticuerpos secundarios Alexa 555 contra ratón desarrollado en burro (*Thermofisher*, A-31570, 1:200) y Alexa 488 contra ratón desarrollado en burro (*Thermofisher*, A-21202, 1:200).

5. Tinciones con Xgal.

Para la tinción Xgal, se diseccionan, fijan y lavan los discos de la misma manera que se ha descrito anteriormente según la etapa del desarrollo a observar.

Se prepara una mezcla de tinción consistente en:

- 500 µl de ferrocianuro potásico
- 500 µl de ferricianuro potásico
- 8.44 mL de PBS 1X
- 300 µl de tritón X100 al 10%.
- 10 µl de X-Gal (8% en dimetilformamida).

Esta mezcla se preincuba 30' a 37°C. Una vez atemperada, se sumergen los discos en su interior y se deja toda la noche a 37°C.

6. Montaje de discos ex vivo y visualización de la eversión.

Para la realización de películas ex vivo se siguió el siguiente protocolo (Prasad et al., 2007; Aldaz et al., 2010):

- Se seleccionan pupas blancas, y se dejan a 25°C durante 3 horas, para diseccionar así pupas que correspondan al periodo en el cual los discos de ala y halterio están en proceso de eversión (3h DFP).

- Para diseccionar las pupas, se colocan en un celo de doble cara y con una cuchilla de afeitar se realiza un corte longitudinal en el medio. Para extraer los discos, las medias pupas obtenidas se pasan a una placa con un pocillo de 35 mm en el medio recubierto de poli-lisina (P35GC-1.5–10-C *Mattek Corporation*) en el cual hemos puesto el siguiente medio de cultivo:

- Medio Schneider's (11720–034, *Invitrogen*) como base
- 15% Suero Fetal Bobino (10106–169, *Invitrogen*)
- 0,5% Penicilina-estreptomina (15140–122, *Invitrogen*)
- 0,1 µg de 20-Hidroecdisona (H5142, *Sigma-Aldrich*) para impulsar la eversión de los discos.

- Una vez los discos han sido extraídos del pupario, se retira de la placa el medio de disección y se añade el medio viscoso, cuya composición es igual a la del medio de disección, pero añadiendo metilcelulosa (M0387-100G, *Sigma*) al 0.4% para evitar que el disco se mueva mucho durante la eversión y salga del plano de enfoque del microscopio.
- Para tomar las películas se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM 510 invertido, durante un periodo de tiempo de 14h. Hay que tener en cuenta que el tiempo de desarrollo observado ex vivo no se corresponde exactamente con el tiempo de desarrollo dentro de la pupa. Por ello, para analizar la presencia de Vkg-GFP y Trol-GFP se tomó como referencia la eversión del disco que ocurre sobre las 4h DFP in vivo.

7. Hibridación In Situ.

Para la visualización del mRNA del gen *Timp* se llevó a cabo una hibridación in situ siguiendo el protocolo recogido en Wolff (2000). Para ello se utilizó el cDNA GH26186 de la colección de *expression sequence tags (ESTs)* de *Berkeley Drosophila Genome Project*.

7.1 Purificación del cDNA:

- Se diluye 1µg de cDNA, en 100µl de agua destilada.
- Se añaden 200µl de Fenol-Cloroformo, y se agita con el vórtex.
- Se centrifuga durante 1' a temperatura ambiente. A continuación, se recoge el sobrenadante (fase acuosa).
- A este sobrenadante se le añaden 2 volúmenes de Fenol-Cloroformo y se agita con el vórtex.
- Se centrifuga durante 1' a temperatura ambiente y se recoge el sobrenadante.
- Al sobrenadante se le añade 10% de Na⁺HAc⁻ 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla se coloca 30' a -70°C.
- Tras estos 30', se centrifuga dos veces durante 15', retirando el etanol absoluto y añadiendo nuevo entre cada centrifugación.
- Se retira todo el etanol posible con la pipeta y se coloca el tubo abierto en el *speed vacuum* para que se elimine todo el etanol.
- Se resuspende el sobrenadante en 6 µl de agua destilada.

7.2 Conversión del cDNA en RNA y marcaje del RNA con digoxigenina:

-Se realiza la siguiente mezcla de reacción:

- 1µg de cDNA purificado
- 1µl de Buffer Transcriptasa 10x
- 1µl de mezcla de NTPs marcados con digoxigenina
- 1 µl de inhibidor de la RNAsa (40U/µl)
- 1µl de RNA polimerasa SP6.

-Esta mezcla se incuba durante 2 horas a 37°C.

- Tras las 2 horas, se añaden 2µl de EDTA a la mezcla para parar la reacción, se deja 30' a -20°C.

- Se centrifuga la mezcla 20' a 4°C.

- Se desecha el sobrenadante y se lava el pellet con 70% etanol absoluto. Se vuelve a centrifugar 5' a 4°C y se retira el etanol.

- Se deja el tubo abierto toda la noche a 37°C, tapado con *Parafilm* agujereado.

- Se resuspende con 150µl de solución de hibridación (SH), la cual se compone de 50% de formamida, 25% SSC 20X (NaCl y citrato sódico), 1% DNA esperma de salmón 10mg/mL, 0.05% heparina 100mg/mL, 1% Tween20 al 10%.

7.3 Preparación del tejido y prehibridación:

- Se diseccionan las larvas/pupas en PBS.

- Se fijan los tejidos en paraformaldehído 4% durante 20' a temperatura ambiente.

- Se realizan 3 lavados en PBS durante 5' a temperatura ambiente.

- Se prepara el tejido haciendo secuencias de lavados de 5' que contienen diferentes concentraciones de PBT/solución de hibridación: 70/30 → 50/50 → 30/70 → Sólo solución de hibridación.

- Se guardan las muestras en SH a -70°C durante al menos 72 horas.

- Tras este periodo de tiempo se retira el SH anterior y se coloca uno nuevo, y se prehibridan las muestras 1h a 55°C.

- Durante este proceso, por otro lado, se incuba durante 10' la sonda a 80°C, poniendo entre 1 y 2µl de sonda en 50µl de SH. Tras los 10', se coloca en hielo.

- Se lava la muestra de tejido y se le añade la mezcla de SH y sonda. Se deja hibridando toda la noche a 55°C.
- Al día siguiente, se precalientan 1,5mL de SH a 55°C para lavar posteriormente la muestra.
- Se guarda la sonda para reutilizarla en otro experimento de hibridación *in-situ* ya que ocurre a veces que cuanto más se utiliza, más limpia queda la tinción al reducirse la señal inespecífica.
- Se lavan las muestras a temperatura ambiente con el SH precalentado, con un primer lavado de 2', y otros dos lavados de 15'.
- A continuación se realiza una mezcla 50/50 de PBT/SH y se colocan en ella las muestras dejándolas 15' a temperatura ambiente.
- Se lavan las muestras con PBT 3 veces durante 15' a temperatura ambiente.
- El siguiente paso es el marcaje con anticuerpo α -*Digoxigenin* (Roche, Ref. 11093274910) 1/2000, en PBT. Se incuba durante 1h30' a temperatura ambiente.
- Tras este proceso, se lavan las muestras con PBT 3 veces durante 15' a temperatura ambiente.
- Se prepara la solución de color, que contiene 0,2mL de NaCl 5M, 0,5mL de MgCl₂ 1M, 1mL de Tris HCL 1M, 0,1mL de Tween20 al 10%, y se completa con agua destilada hasta 10mL. Se incuba la muestra con esta solución dos veces durante 5' a temperatura ambiente.
- Por último, se realiza una mezcla que contiene 500µl de solución de color, 4,5µl de NBT (Nitroazul de tetrazolio), y 3,5µl de X-fosfato, y se sumergen en él las muestras para el revelado. Esto se realiza a temperatura ambiente preferiblemente en un pocillo de cristal para controlar el revelado visualmente.
- Una vez que se ha revelado la sonda en las muestras se para la reacción con tres lavados con PBT durante 15' a temperatura ambiente.
- Se montan las muestras en glicerol al 80%.

8. Adquisición y tratamiento de imágenes.

- Adquisición:

- Las imágenes de microscopía convencional, es decir, discos sometidos a tinciones Xgal y a hibridación *in situ*, se obtuvieron en un microscopio Leica acoplado a una cámara

digital *Leica* 480 ó 580.

- Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron utilizando los siguientes microscopios de fluorescencia: *Zeiss* LSM 510 vertical, *Zeiss* LSM 510 invertido, *Zeiss* LSM 710 vertical, y *Zeiss* LSM 710 Invertido multifotón.

- Tratamiento de imágenes:

- Las imágenes de microscopía convencional se analizaron y montaron con el programa *Helicon Focus* (*Helicon Soft* Ltd.).

- Las imágenes de microscopía confocal se analizaron y trataron con el programa *Fiji/ImageJ* (NIH).

9. Mediciones y análisis estadístico.

Para cuantificar los niveles de Mmp1 y Vkg-GFP en discos imaginales de ala y halterio, se ha seguido el siguiente protocolo:

- Se han seleccionado pupas de la etapa 3h DFP.

- Se han fijado siguiendo el protocolo antes descrito para esta etapa.

- En el caso de cuantificación para Mmp1 se ha utilizado anticuerpo anti-Mmp1 y faloidina. Para el caso de Vkg-GFP solamente se ha añadido faloidina.

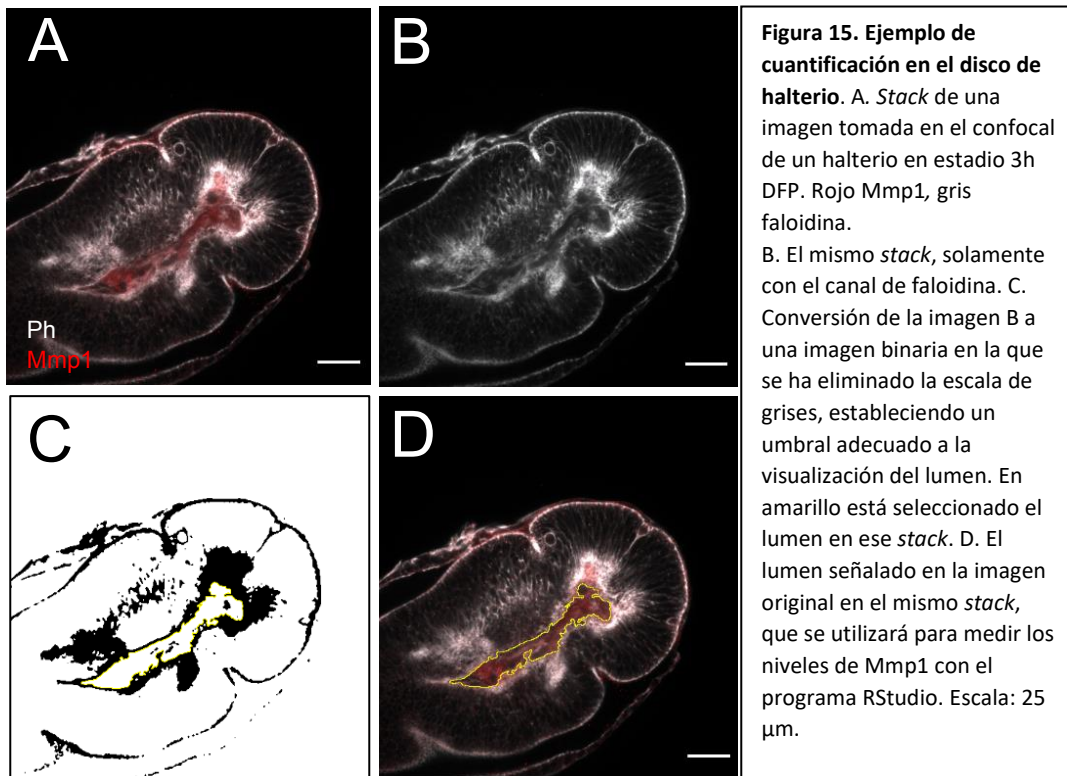
- A la hora de montar, se ha tenido especial cuidado en emparejar alas y halterios del mismo lado de la pupa.

- Se han obtenido las imágenes con el microscopio confocal *Leica* LSM 710 vertical.

- Para analizar las imágenes se ha utilizado el programa *Fiji*. En estas imágenes se ha separado primeramente el canal de faloidina del resto de canales, y éste se ha convertido a una imagen en binario estableciendo un umbral en el cual se observaran claramente los límites de separación entre lumen y epitelio. Seguidamente se han segmentado los lúmenes usando una macro del programa *Fiji* llamada *segmentation*. Se han seleccionado los lúmenes en todos los *stacks* de la imagen para limitar la zona.

- A continuación, se han guardado los datos de la posición del lumen en cada *stack*, y se han extrapolado a la imagen completa con el canal con Mmp1 o Vkg-GFP, según lo que se estuviera analizando. De esta manera, se ha analizado la intensidad en el lumen del marcaje de la proteína a estudiar (Fig. 15).

- Los datos obtenidos se han analizado con el programa *RStudio* con ayuda de una macro generada para normalizar y generar un ratio entre discos de ala y halterio, y más tarde se ha utilizado el programa *Excel (Microsoft)* para generar las gráficas de las cuantificaciones. Para la comparación estadística de los valores obtenidos hemos utilizado la prueba de la U de Mann-Whitney, hecha con entre seis y ocho pares de discos para cada proteína y condición.



10. Análisis computacional de los sitios de unión del factor de transcripción

DSRF a genes diana.

- Primero se busca en la base de datos para factores de transcripción JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) el factor de transcripción SRF. Esta base de datos da la secuencia de ADN del factor de transcripción que se une al ADN de los genes que regula. Esta secuencia ha sido analizada a través de la técnica SELEX (*Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) (Tuerk y Gold, 1990; Ellington y Szostak, 1990).
- Por otro lado, se buscan las secuencias de los genes candidatos a ser regulados por este factor de transcripción, en flybase.org.
- Se trasladan estas secuencias al programa *MacVector (MacVector, Inc)* y se busca la

secuencia de unión al ADN de SRF en los genes estudiados.

- El programa nos proporciona algunas bases más seguras que otras. Así pues para ampliar las probabilidades de encontrar la secuencia de unión real, se estableció una búsqueda en los genes diana de dos secuencias diferentes: siendo la secuencia obtenida CCATATATGG (Fig. 16), se utilizó como criterio de búsqueda que una de las secuencias tuviera siempre las bases más repetidas en la secuencia consenso y el resto de las bases fuera una base A o T aleatoriamente (en este caso sería CCWWATWWGG, siendo W A o T), dado que en el análisis han aparecido más frecuentemente esas bases A y T como variaciones de la secuencia consenso. Por otro lado, se realizó el análisis con una secuencia en la que se cambiase aleatoriamente una sola base de la secuencia consenso (CCATATATGG).

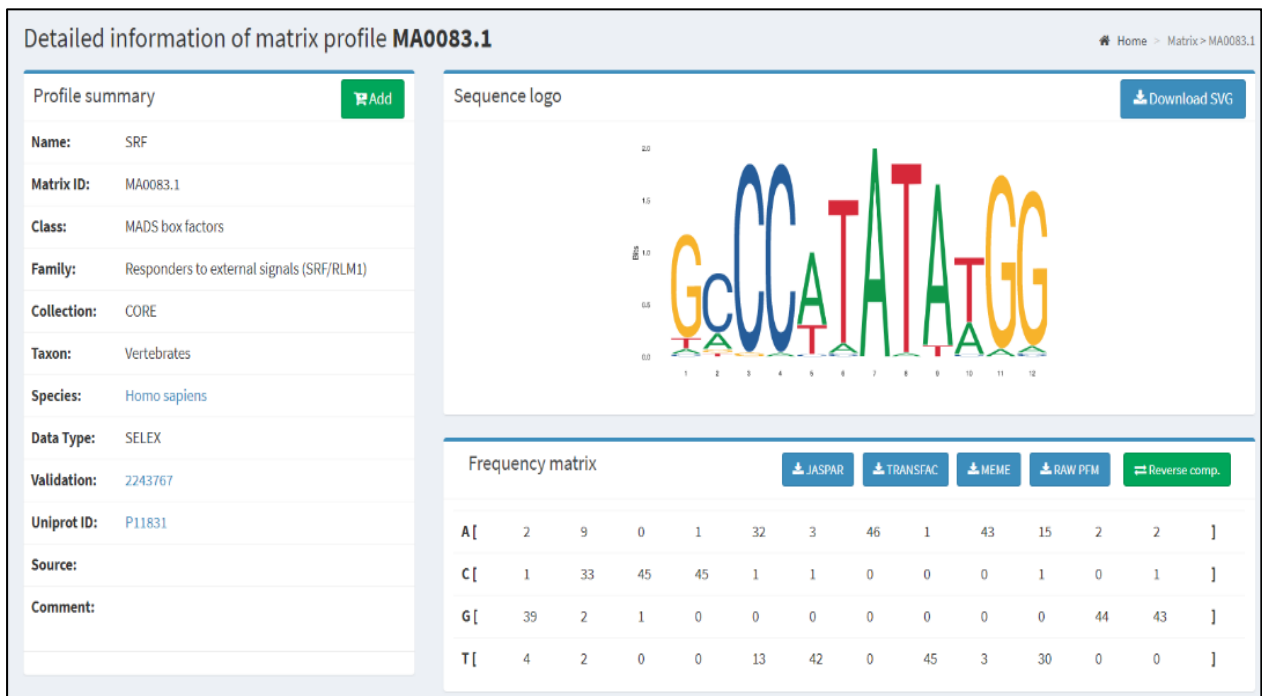


Figura 16. Secuencia de unión al ADN del factor de transcripción SRF en la base de datos JASPAR. La secuencia ha sido analizada con el sistema SELEX y tiene algunas bases encontradas en todos los análisis que se corresponden con las de mayor tamaño, y debajo en la tabla se indica el número de veces que ha aparecido cada base en el análisis de un total de 46 veces que se ha desarrollado el programa.



Resultados

1. *Ubx* evita que el halterio adquiriera morfología plana.

Como ya hemos comentado en la Introducción, durante la etapa de larva, los discos de ala y halterio tienen una forma similar, pero al llegar a adulto los apéndices derivados de ellos, el ala y el halterio (nos referimos a halterio queriendo indicar su parte más distal, el capitelo), presentan una forma completamente diferente (Fig. 17A-D). Por tanto, la divergencia morfogenética se debe establecer durante el desarrollo pupal. Se sabe que la forma final del ala de *Drosophila* resulta de la aposición de sus epitelios dorsal y ventral, los cuales se alinean en el disco imaginal en las primeras horas de la pupación (Fristrom et al., 1993; Fristrom y Fristrom, 1993; Aldaz et al., 2010).

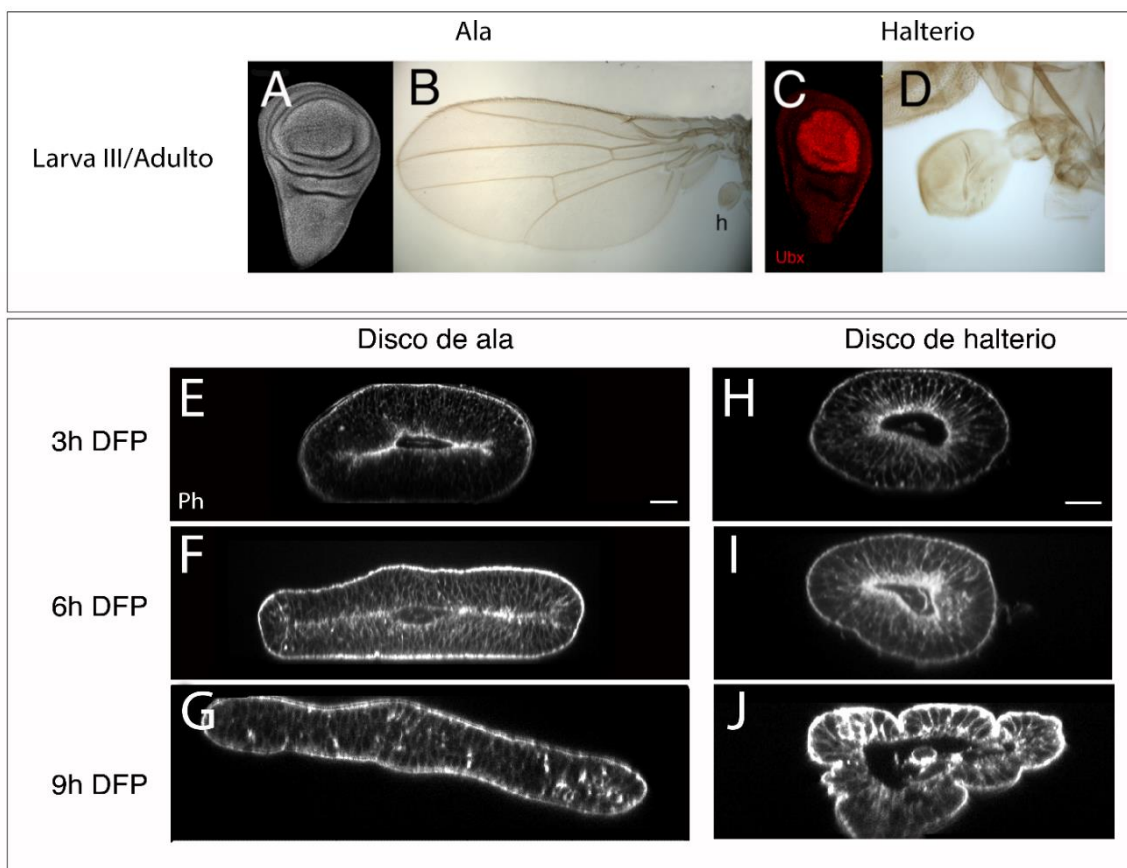
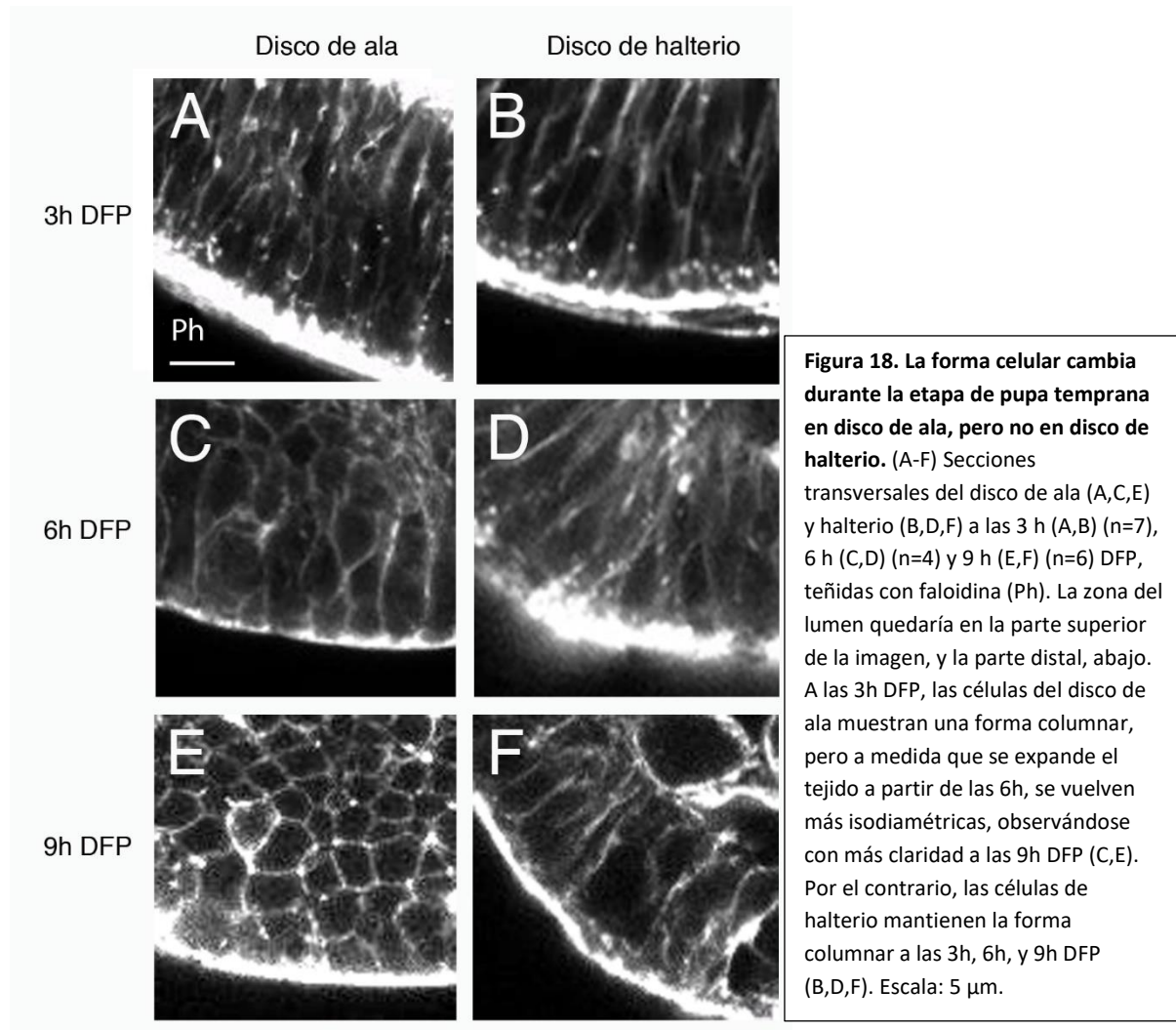


Figura 17. Estudio del desarrollo morfológico de los discos de ala y halterio en etapa de pupa temprana. (A) Disco de ala silvestre en estadio larva III. (B) Ala, forma plana. (C) Disco de halterio silvestre en estadio larva III, con forma similar a la del disco de ala y tinción de *Ubx* (rojo), expresado en todo el disco imaginal. (D) Halterio, con morfología diferente (globosa) a la del ala. Imagen modificada de de las Heras et al., 2018. (E-J) Secciones transversales ópticas de las partes distales de los discos de ala (E-G) y halterio (H-J) a las 3h (E,H) ($n=35$), 6 h (F,I) ($n=20$) y 9 h (G,J) ($n=15$) DFP, teñidas con faloidina (Ph). El disco de ala apone las superficies dorsal y ventral y se expande a medida que se desarrolla la pupa, mientras que el disco de halterio no apone ambas superficies y no se expande. Escala: 25 μ m.

Así pues, en primer lugar decidimos estudiar el desarrollo del halterio en esta misma etapa, comparando las partes distales o *pouches* de los discos imaginales de ala y halterio utilizando un marcaje de F-actina (Fig. 17E-J). Para la observación más clara de las diferencias morfológicas entre los *pouches* de los discos imaginales de ala y halterio, decidimos mostrar secciones frontales de las imágenes obtenidas de los mismos. De esta manera se puede ver el interior de los lúmenes y cómo van modificando su forma a lo largo del desarrollo de pupa temprana.

En las imágenes de la Figura 17 vemos que a las 3 horas DFP (después de la formación de pupario) las capas dorsal y ventral del disco de ala se van aponiendo excepto en la región central, que dará lugar a la vena L3 (Fristrom et al., 1994) (Fig. 17E). Tres horas después de la eversión del disco el tejido se va expandiendo y la superficie de aposición aumenta (Fig. 17F). A las 9h DFP la superficie dorsal y ventral ya están completamente apuestas. (Fristrom y Fristrom, 1993; Fristrom et al., 1994; Blair, 2007) (Fig. 17G). En cambio, en el disco de halterio se observa un patrón diferente de desarrollo. A las 3h DFP las superficies dorsal y ventral no se alinean, dando lugar al lumen que se mantendrá en el capitulo del halterio (Fig.17H). A las 6h DFP no hay aposición dorso-ventral y tampoco expansión epitelial (Fig. 17I). A las 9h DFP, dado que no ha habido aposición ni expansión del tejido, no se da la adhesión que observamos en el disco de ala en esta etapa (Fig. 17J).

Si observamos más atentamente la morfología celular en los discos, vemos que las células del disco de ala parten de una disposición columnar pseudoestratificada y a medida que se expande el tejido, van adquiriendo una forma más isodiamétrica (Domínguez-Jiménez et al., 2007) (Fig. 18A, C, E). En cambio, las células del disco de halterio muestran una forma columnar que no cambia a lo largo de este estadio de pupa temprana (Fig. 18B, D, F).



Para visualizar mejor estas diferencias utilizamos la combinación mutante *pbx/DfUbx¹⁰⁹*, en la cual la expresión de *Ubx* se reduce fuertemente en la parte posterior del disco de halterio debido a la combinación transheterocigótica de una mutación en una secuencia reguladora que reduce la transcripción del gen en el compartimento posterior (*pbx*) y una deficiencia del mismo (Lewis, 1963; 1978). De esta manera, en la parte anterior se expresa *Ubx* normalmente y se desarrolla como halterio, mientras que la posterior se desarrolla sin la actividad de *Ubx* y lo hace en forma de ala (Fig. 19A). Esta herramienta es muy útil a la hora de observar cambios llevados a cabo por *Ubx* porque permite observar diferencias dentro del mismo disco imaginal.

En estas pupas mutantes observamos dentro del disco mutante de halterio de 9h DFP que, mientras que la parte anterior de halterio muestra células en forma columnar y el disco no apone las superficies dorsal y ventral, las células de la parte posterior de ala tienen una forma más isodiamétrica y el disco apone ambas superficies (Fig. 19B, C).

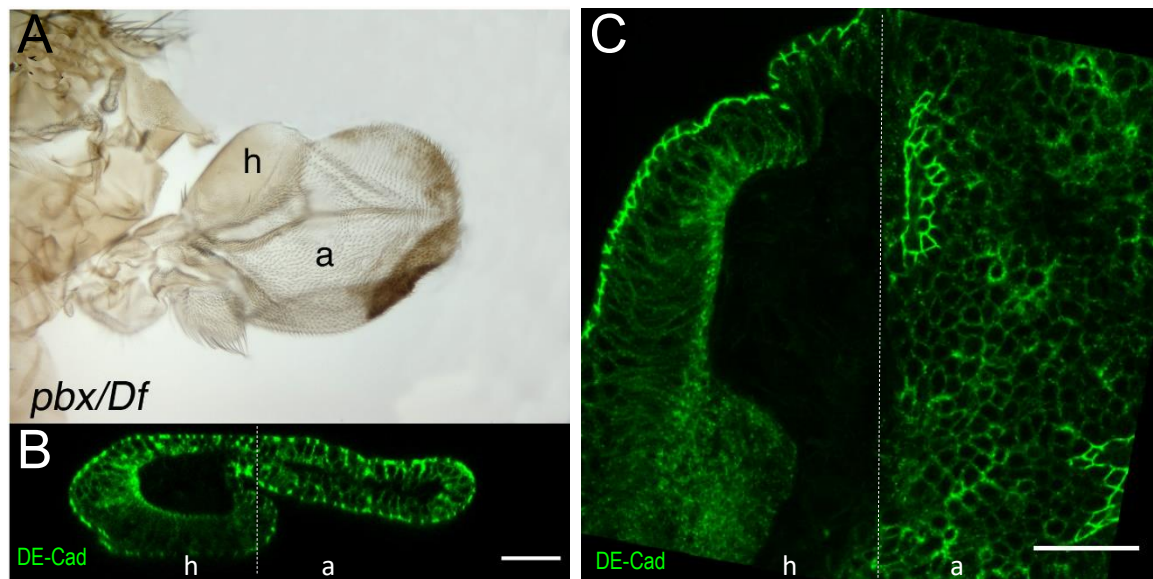


Figura 19. Morfología de apéndice y disco imaginal de halterio en el mutante *pbx/DfUbx¹⁰⁹*. (A) Halterio de un mutante *pbx* donde se diferencian la parte de halterio (h; anterior) de la de ala (a, posterior). (B) Sección transversal de un disco de halterio mutante *pbx* a las 9h DFP, utilizando para su observación un reportero GFP de DE-Cadherina (DE-Cad). Se han separado con una línea discontinua la parte de halterio (h) de la parte de ala (a). Obsérvese la diferente morfología celular, más evidente en el panel C y cómo se aponen las superficies dorsal y ventral solo en la parte posterior (ala) (C) Sección longitudinal de un disco de halterio mutante *pbx* a las 9h DFP en el cual podemos apreciar mejor la diferencia de morfología celular entre la parte de halterio (h) y la parte de ala (a). (n=2). Escala: 25 μ m.

Así pues, comparando el desarrollo en pupa temprana de discos de ala y halterio se observan tres diferencias principales: (1) Hay aposición de las superficies dorsal y ventral en el disco de ala, pero no en el disco de halterio; (2) La etapa de expansión que acontece en el disco de ala tras la aposición de ambas superficies, está ausente en el disco de halterio; y (3) Las células del disco de ala, pero no las del de halterio, se vuelven más isodiamétricas a medida que las superficies del disco se aponen y expanden.

Para comprobar que *Ubx* era el responsable de las diferencias de morfología entre ala y halterio, además de los experimentos anteriores con el mutante *pbx*, decidimos analizar la forma del disco de ala en un mutante *Haltere-Mimic* (Hm), en el cual *Ubx* se expresa ectópicamente en el disco de ala, y por tanto las alas se transforman en halterios (Lewis, 1982) (Fig. 20A). En la imagen 20B vemos cómo en este mutante el disco de ala no es capaz de aponer las superficies dorsal y ventral y muestra una morfología similar a la descrita en el disco de halterio en esta etapa (6h DFP) (comparar con Fig. 17I).

Con estos datos pudimos concluir que el responsable de evitar la aposición en disco de halterio es el gen *Ubx*, que es necesario y suficiente para definir la forma del disco de halterio en estadio de pupa temprana. El siguiente paso era saber a través de qué factores lo lleva a cabo.

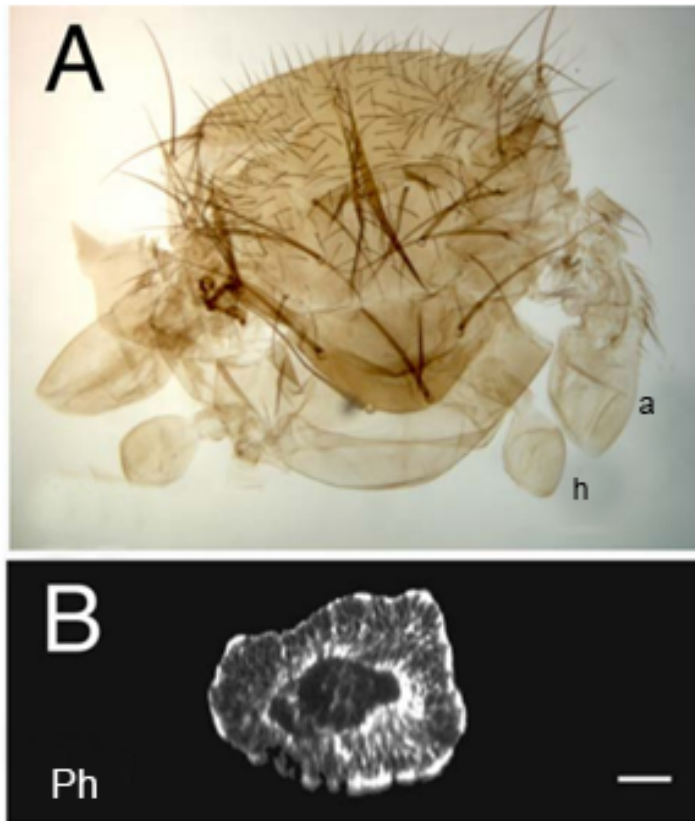


Figura 20. Fenotipo del mutante *Haltere mimic*. (A) Morfología adulta del mutante *Haltere mimic*, en el cual *Ubx* se expresa de manera ectópica en el disco de ala, transformándose las alas (a) en halterios (h). (B) Sección transversal de un disco de ala de un mutante *Haltere mimic* a las 6h DFP marcado con faloidina. Su morfología es similar a la del disco de halterio silvestre (Fig. 17I). (n=8). Escala: 25 μ m.

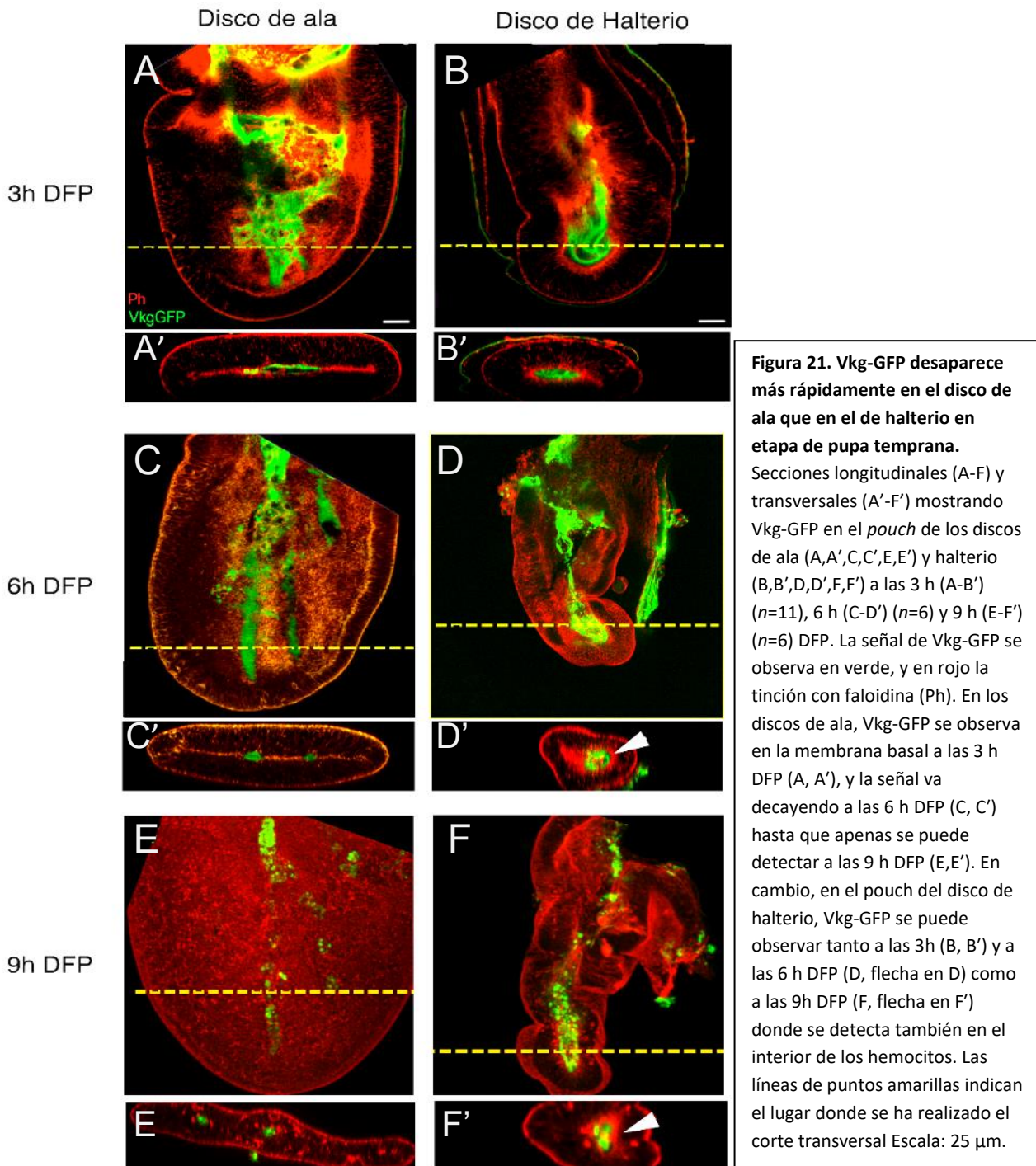
2. Los elementos que componen la membrana basal persisten más tiempo en el disco de halterio que en el disco de ala en etapa de pupa temprana.

Sabemos que el proceso principal y que diferencia morfológicamente los discos de ala y halterio es la aposición y consiguiente adhesión basal de las superficies dorsal y ventral en el disco de ala y la ausencia de estas en el de halterio. Por ello, estudiamos el posible papel de la membrana basal en establecer estas diferencias en ambos discos. La membrana basal (MB) es necesaria para diversos procesos de integridad epitelial, y está formada por una matriz extracelular (MEC) densa que recubre las superficies basales en tejidos epiteliales (Timpl, 1989; Yurchenco y Schittny, 1990). Además su composición y remodelación es clave para definir la morfología de los órganos (Hynes, 2009; Haigo y Bilder, 2011; Pastor-Pareja y Xu, 2011; Crest et al., 2017). Una posible implicación de la MB en los procesos que hemos descrito en los

discos de ala y halterio se sugería a partir de un análisis de microarrays en el que se identificaban los genes regulados por *Ubx* comparando la expresión de los mismos en discos de ala silvestres y aquéllos con expresión ectópica de *Ubx* durante estadios larvarios tardío y pupales (Pavlopoulos y Akam, 2011). En este estudio se identificaron varios genes reguladores de elementos de la matriz extracelular que se expresaban de manera diferente en el disco de ala silvestre y tras inducir *Ubx* en el mismo. Por ello decidimos profundizar en el estudio de la membrana basal y analizar comparativamente tanto componentes de la misma como sus reguladores en pupa temprana.

Hay cuatro elementos principales que componen la membrana basal de *Drosophila*: Colágeno IV que es el más abundante, Laminina, Perlecán y Nidógeno (LeBleu et al., 2007). Decidimos analizar primero la distribución del Colágeno IV, dado que además de ser el más abundante en la lámina basal, existe una construcción GFP *protein-trap* bien caracterizada (Morin et al., 2001) insertada en el gen *viking* (*vkg*), que codifica para la cadena $\alpha 2$ de la proteína Colágeno IV (Yasothornsriikul et al., 1997). Para el análisis de la distribución de estas proteínas en ala y halterio llevamos a cabo estudios tanto de discos imaginales fijados como también estudios *ex vivo*.

Para realizar el análisis de la línea Vkg-GFP en tejido fijado, seleccionamos pupas de 3h, 6h y 9h DFP. Como se puede observar en la Figura 21A, A' en el disco imaginal de ala a las 3h DFP hay acumulación basal de Vkg-GFP asociada principalmente con el lumen que dará lugar en última instancia a la vena L3. Pasadas 3 horas, cuando el disco ya ha evertido, la señal de Vkg-GFP empieza a eliminarse del lumen (Fig. 21C, C'), y a las 9h DFP es prácticamente indetectable (Fig. 21E, E'). En el disco de halterio, a las 3h DFP vemos mayor acumulación de Vkg-GFP en el lumen respecto al de ala en la misma etapa (Fig. 21B, B'). A las 6h DFP, en contraste con lo observado en el disco de ala, los niveles de Vkg-GFP continúan siendo elevados en el lumen (Fig. 21D, D'). A las 9h DFP, los niveles de Vkg-GFP en halterio bajan, y se observa la proteína principalmente dentro de los hemocitos que están en el lumen (Fig. 21F, F').



Esta pérdida de Vkg-GFP a las 6h DFP en el *pouch* del disco de ala se visualiza mejor analizando la presencia de la proteína en la combinación mutante *pbx/DfUbx*¹⁰⁹. Como hemos descrito, los individuos con este genotipo presentan la parte posterior del halterio (y de su disco imaginal) transformados en ala (o en disco de ala) por la pérdida de *Ubx*. En la Figura 22, un disco de halterio mutante, se puede observar la diferencia de acumulación de Vkg-GFP entre las dos partes del disco (mucho mayor en el compartimento anterior, halterio).

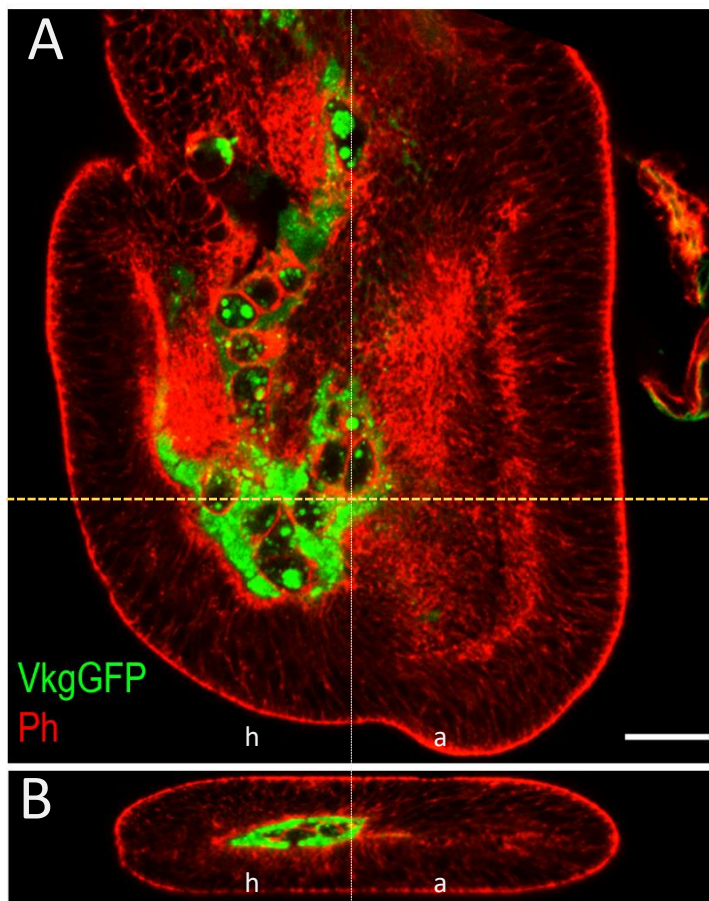


Figura 22. Señal de Vkg-GFP en un disco mutante *pbx/DfUbx¹⁰⁹* a las 6h DFP.

(A) Corte longitudinal de un disco mutante *pbx* a las 6h DFP. La línea blanca indica el límite entre la parte anterior (halterio, h) y la parte posterior (ala, a). La línea amarilla indica por dónde se ha realizado el corte longitudinal óptico (B) para comparar el interior del disco. En este corte longitudinal se puede ver cómo en la parte de halterio hay más Vkg-GFP que en la parte de ala. Se ha teñido con faloidina para ver el contorno del disco. (B) Corte transversal del mismo disco en el cual se puede apreciar con mayor nitidez la diferencia de intensidad de Vkg-GFP comparando la parte de halterio (h) con la parte de ala (a). (n=4) Escala: 25 μ m.

Para seguir mejor el proceso de pérdida de Vkg-GFP en el disco de ala y su persistencia en el de halterio durante la etapa de pupa temprana, procedimos a utilizar una técnica de cultivo de discos *ex vivo* y su observación al microscopio confocal a través de un *time-lapse* realizado durante alrededor de 16 horas. Para ello seleccionamos y diseccionamos pupas de 3h DFP, extrajimos los discos y los cultivamos en un medio adecuado para que los discos continuaran su desarrollo durante al menos, toda la etapa de pupa temprana. En las películas obtenidas vemos la misma dinámica que la observada en los discos fijados, es decir, que tras la eversión de los discos, Vkg-GFP desaparece del de ala mientras que persiste más tiempo en el de halterio (Fig. 23A, B). Con el fin de analizar otras proteínas de la MEC, y su posible diferente expresión en los dos discos estudiados, realizamos *time-lapses* para observar la distribución de la proteína Perlecán, otra proteína presente en la MEC, cuya expresión en *Drosophila* viene codificada por el gen *terribly reduced optic lobes (trol)* (Voigt et al., 2002), y para la que, de la misma manera que para Vkg-GFP, existe una construcción *protein-trap* bien caracterizada (Park et al., 2003). El resultado para Trol-GFP es el mismo que para Vkg-GFP: tras la eversión del disco de ala, la proteína Trol-GFP desaparece, mientras que en el disco de halterio permanece durante más tiempo (Fig. 23C, D).

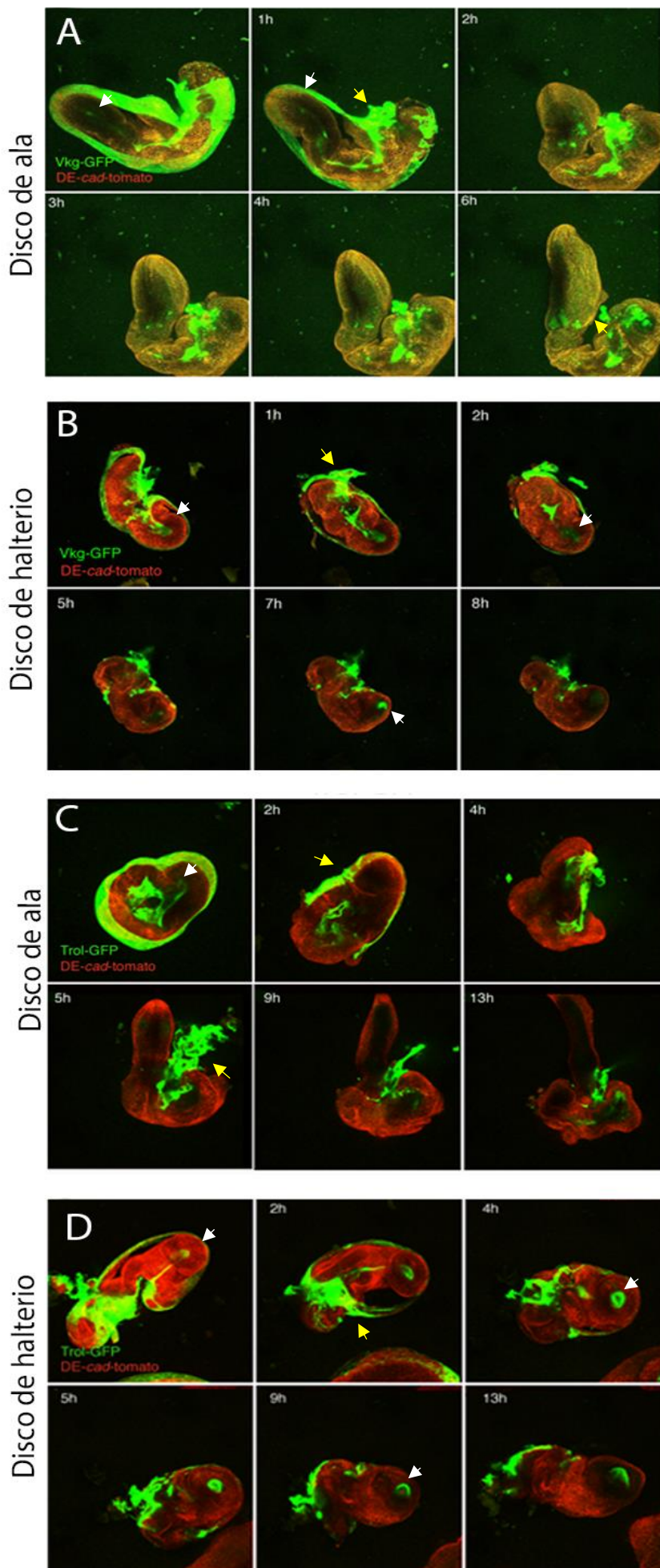


Figura 23. Imágenes tomadas de películas ex vivo de discos de ala y halterio localizando Vkg-GFP y Trol-GFP. (A,B) Imágenes de las películas realizadas mostrando Vkg-GFP en discos imaginales de ala y halterio. En ellos se ve que, mientras que Vkg-GFP desaparece del lumen de ala durante la eversión del disco (A) en disco de halterio permanece después de la eversión (B). (C,D) Imágenes de las películas realizadas marcando Trol-GFP en discos imaginales de ala y halterio donde se observa que Trol-GFP desaparece en el lumen del ala tras la eversión (C) mientras que permanece en el disco de halterio (D). Las flechas blancas indican la MB que se encuentra en el interior del lumen, mientras que las amarillas muestran la matriz extracelular perteneciente a la membrana peripodial.

Con estos resultados podemos concluir que la eliminación de proteínas de la MB (al menos Colágeno y Perlecán) durante la etapa de pupa temprana es mucho más acusada en el disco de ala que en el de halterio.

3. *Ubx* regula negativamente la expresión de *Mmp1*, retrasando degradación de Vkg-GFP en el disco de halterio en etapa de pupa temprana.

Las conclusiones presentadas en el anterior apartado sugieren que *Ubx*, presente en el disco de halterio y no en el de ala, es responsable del retraso en la eliminación de la MB en halterio respecto de ala. Dados estos resultados, cabría esperar que existiera una regulación génica del Colágeno y Perlecán por parte de *Ubx* en disco de halterio. Sin embargo, tanto Colágeno como Perlecán se sintetizan en las células que componen el cuerpo graso que, además de servir como reservorio energético, codifica proteínas y péptidos implicados directamente en el desarrollo de órganos y tejidos. Tras ser sintetizados, Colágeno y Perlecán se secretan a la hemolinfa y se incorporan a la membrana basal (Pastor-Pareja y Xu, 2011). Así pues, no es posible que el gen *Ubx* regule directamente la transcripción de los genes *vkg* o *trol* en el disco de halterio, ya que no se sintetizan en las propias células del disco.

Como hemos comentado en la introducción, el gen *Ubx* regula la transcripción de genes que codifican para proteínas implicadas en la dinámica de la matriz, Matrix metaloproteinasas *Mmp1* y *Mmp2*, y su inhibidor Tissue inhibitor of metaloproteinasas (*Timp*). Recordamos que las metaloproteasas tienen como función la remodelación del tejido degradando la matriz extracelular, y a su vez *Timp* inhibe a estas metaloproteasas uniéndose a ellas e inactivándolas (Fig. 11) (Brew et al., 2000).

Observamos en el trabajo al que antes nos hemos referido (Pavlopoulos y Akam, 2011), que, en el disco de ala que expresa *Ubx*, mientras que *Mmp1* está regulado negativamente por *Ubx*, *Mmp2* y *Timp* están regulados positivamente. Con estos datos nos dispusimos a analizar si efectivamente el gen *Ubx* podría estar controlando indirectamente, a través de la regulación de estos genes, el retraso en la eliminación de la MB en el disco de halterio con respecto al de ala.

En primer lugar, analizamos la expresión de *Mmp1* y *Mmp2* en discos de ala y halterio en pupa temprana, concretamente a las 3h DFP, que es cuando empieza a degradarse la MEC en el

disco de ala. La expresión de Mmp2 pudo ser analizada gracias a una línea Mmp2::GFP construida como proteína de fusión (Deady et al., 2015). La señal GFP se distribuye de manera no uniforme en los discos de ala y halterio (Fig. 24 A, B), y parece haber mayor expresión de Mmp2 en una parte del disco de ala con respecto a la correspondiente de halterio, pero fundamentalmente es en una zona periférica y no en las células que están en contacto con el lumen. Para observar mejor estas diferencias y a su vez localizar la expresión de Mmp2, estudiamos la expresión de la proteína en un disco de halterio mutante *pbx/DfUbx¹⁰⁹* donde, como dijimos anteriormente, la parte posterior del halterio está transformada en ala. Como vemos en la Figura 24 C, C', parece haber más proteína Mmp2 en la parte del disco de ala, pero en las células alejadas del lumen. Lo que nosotros buscábamos era expresión de metaloproteasas cerca del lumen, donde pudieran estar actuando para degradar la MB, así que decidimos considerar menos relevante esta metaloproteasa para el proceso estudiado.

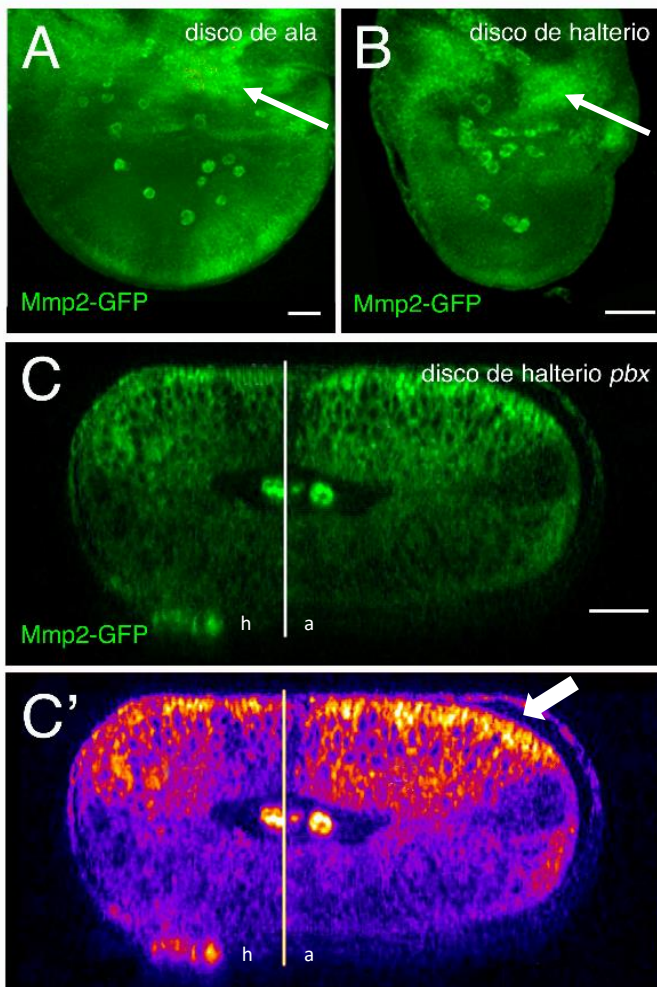


Figura 24. Distribución de Mmp2-GFP en discos imaginales de ala y halterio. (A,B) Secciones longitudinales de discos de ala (A) y halterio (B). En ellos, la distribución de Mmp2-GFP se observa con más intensidad en partes alejadas del lumen (flechas blancas) (n=4) (C) Sección transversal óptica del lumen de un halterio mutante *pbx/DfUbx¹⁰⁹* con Mmp2-GFP y (C') la misma imagen con un filtro de intensidad que resalta las partes donde la expresión de Mmp2-GFP es mayor. En ellas vemos que la distribución de Mmp2-GFP es homogénea entre ala (a) y halterio (h) y que, en la parte de ala, hay mayor intensidad en células dorsales (flecha blanca) pero localizadas lejos del lumen (n=3). Escala: 25 μ m.

Sin embargo, al estudiar la expresión de Mmp1 con un anticuerpo anti-Mmp1, obtuvimos un resultado muy diferente: el lumen del disco de ala muestra niveles de proteína Mmp1 mucho

más elevados que el lumen del de halterio en la misma etapa del desarrollo pupal (Fig. 25A, B). Al comparar simultáneamente la expresión de Vkg-GFP y Mmp1 en ambos discos a las 3h DFP notamos que en el de ala los niveles de Mmp1 son más altos (Fig. 25A, A'') mientras que los de Vkg-GFP son más bajos (Fig. 25 A', A''), y lo contrario ocurre para el disco de halterio, es decir, hay bajos niveles de Mmp1 (Fig. 25B, B'') y altos para Vkg-GFP (Fig. 25B', B''). Para precisar estas diferencias recurrimos a la cuantificación de los niveles de ambas proteínas en 8 discos de ala y halterio, seleccionados por parejas de una misma prepupa a las 3h DFP. Estas cuantificaciones dieron como resultado que la cantidad de proteína Mmp1 en el disco de ala es el doble que en el de halterio, mientras que los niveles de Vkg-GFP son alrededor de un 40% más bajos. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por el Dr. Shashidhara (IISER, Pune): Su grupo encontró en experimentos de ChIP-seq y RNA-seq que *Mmp1* era diana directa de *Ubx* (S. Khan y L.S.S., comunicación personal).

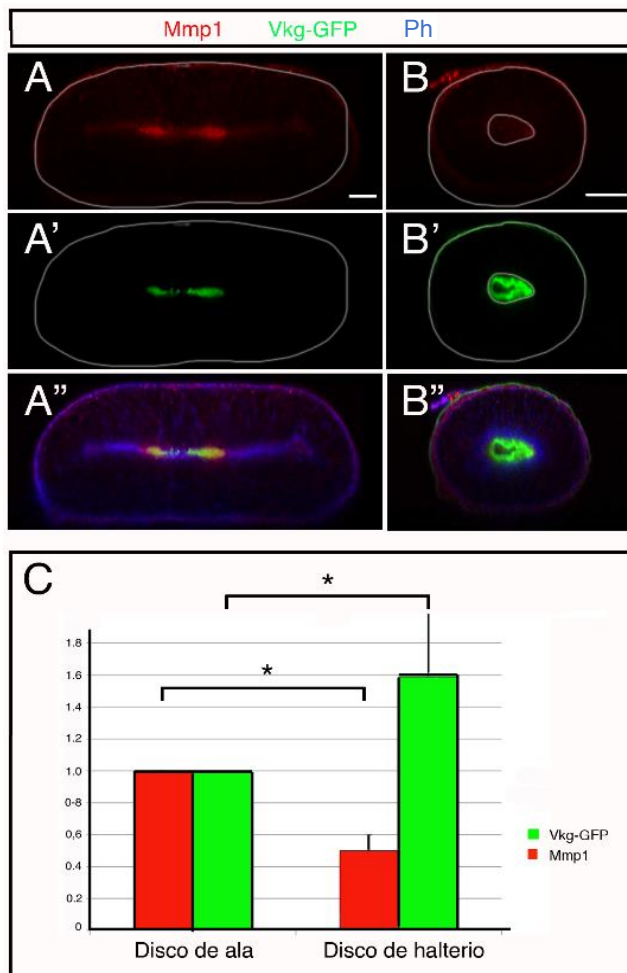


Figura 25. Cuantificación de Mmp1 y Vkg-GFP en discos de ala y halterio silvestre a las 3h DFP.

(A,B) Secciones transversales ópticas de discos de ala y halterio a las 3h DFP, que muestran que la cantidad de Mmp1 (rojo) es (A,A'',B,B''), pero la de Vkg-GFP menor (A',A'',B',B'') en el disco de ala que en el de halterio. La faloidina (Ph) se muestra en azul. (n=8) Escala: 25 μ m. (C) Cuantificación de los niveles de Mmp1 y Vkg-GFP en discos de ala y halterio silvestres. La expresión en el disco de ala se ha normalizado a 1 (unidades arbitrarias) (n=8) Los datos se han analizado con la media \pm d.e. * P <0.01.

Las diferencias de expresión de Vkg-GFP y Mmp1 en los discos de ala y halterio sugieren una regulación por *Ubx* de la expresión de estos genes y por tanto de la dinámica de la membrana basal en el disco de halterio. Para confirmar esta inferencia, realizamos experimentos de

ganancia o pérdida de función del gen *Ubx*, es decir, sobreexpresando *Ubx* en disco de ala, y eliminándolo en el de halterio, y cuantificamos las proteínas Mmp1 y Vkg (Vkg-GFP). Para ello analizamos individuos Haltere-Mimic, en los cuales *Ubx* se expresa de forma ectópica en el disco de ala (Lewis, 1982), y otros en los que esta expresión disminuía grandemente mediante la combinación de la línea *sd-Gal4*, que se expresa en los *pouches* de los discos tanto de ala como de halterio (Klein et al., 1997) y una construcción UAS-*UbxRNAi* recombinada con una deficiencia para el gen, UAS-*dsUbx DfUbx¹⁰⁹* (Monier et al., 2005). En el disco de halterio analizamos la presencia de Vkg-GFP y de Mmp1, tanto a las 3h como a las 6h DFP. Tal y como se observa en la Figura 26, en el disco de halterio *sd-Gal4 UAS-dsUbx DfUbx¹⁰⁹* hay más cantidad de Mmp1 y menos cantidad de Vkg-GFP comparado con discos de halterio silvestre de las mismas edades (Fig. 26A, B).

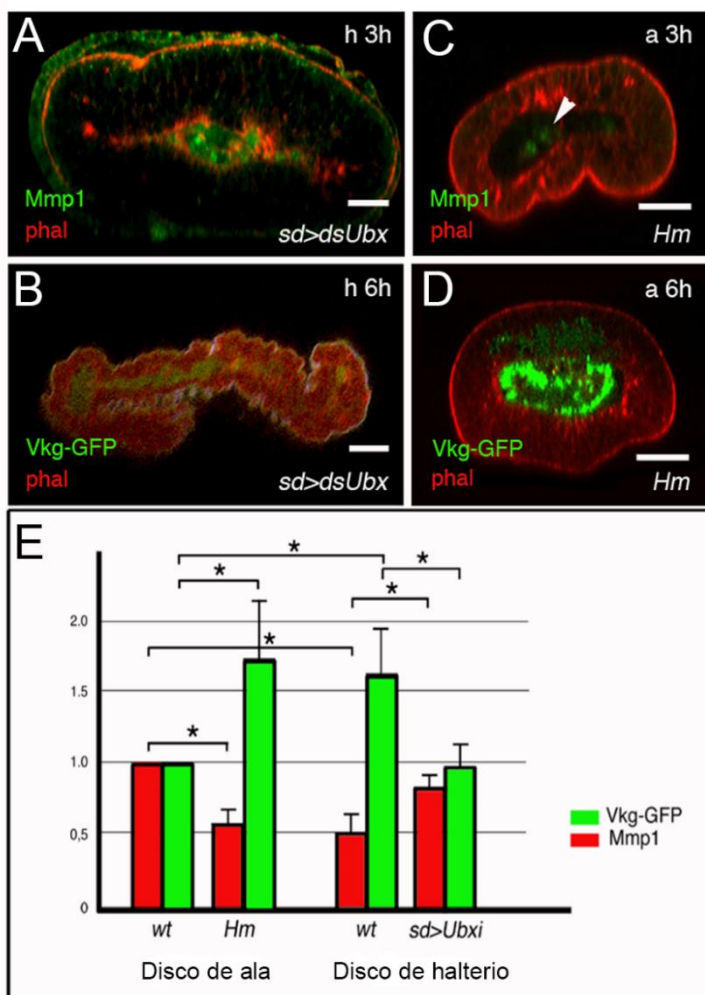


Figura 26. Cuantificación de Mmp1 y Vkg-GFP en mutantes para *Ubx*. (A,B) Secciones transversales ópticas de discos imaginales de halterios *sd-Gal4 UAS-dsUbx DfUbx¹⁰⁹* a las 3h (A) y 6h (B) DFP, mostrando un aumento de la expresión de Mmp1 (A) ($n=7$) y una disminución de Vkg-GFP (B) ($n=6$) respecto a los discos silvestre. Además observamos aposición de las superficies dorsal y ventral a las 6h DFP. (C,D) Secciones transversales de discos de ala con la mutación *Haltere mimic* a las 3h y 6h DFP. En ellos, la expresión de Mmp1 (C) se reduce drásticamente, observándose algunas trazas de señal en el interior de hemocitos (flecha blanca) ($n=7$), mientras que la señal de Vkg-GFP (D) aumenta respecto al disco silvestre a las 6h DFP. (E) Cuantificación de los niveles de Mmp1 y Vkg-GFP a las 3h DFP en discos de ala (silvestre y mutantes *Haltere-mimic*) y halterio (silvestre y *sd-Gal4 UAS-dsUbx DfUbx¹⁰⁹*). Cabe destacar que las imágenes mostradas para Vkg-GFP corresponden a discos de 6h DFP, pero la cuantificación se ha realizado en discos de 3h APF. La expresión en el disco de ala ha sido normalizada a 1 (unidades arbitrarias). Los datos son las medias \pm d.e $*P<0.01$. Escala: 25 μ m.

Por contra, en el mutante *Haltere-mimic* observamos que la expresión de Mmp1 se veía reducida y la señal de Vkg-GFP aumentada significativamente (Fig. 26C, D). Estos datos fueron

cuantificados y comparados con los datos ya obtenidos de la concentración de proteína en discos de ala y halterio silvestre (Fig. 26E).

Analizamos también la expresión de *Timp* en discos de ala y halterio a las 3h DFP mediante hibridación *in situ*, dado que no existen anticuerpos ni reporteros para la proteína.

Como vemos en la Figura 27, el RNA de *Timp* está distribuido en pequeños parches en el disco de ala de 3h DFP, pero ninguno de ellos cerca del lumen del *pouch* (Fig. 27A, flecha roja) al contrario que en el disco de halterio, donde se aprecian dos zonas de expresión de *Timp* en células cercanas al lumen (Fig. 27B, flecha negra). Para certificar la regulación de *Timp* por *Ubx*, realizamos la hibridación *in situ* en un mutante *Haltere-Mimic*. En el mutante también se pueden apreciar en el disco de ala estos parches cerca del lumen, con la misma distribución que en el disco de halterio (Fig. 27C, flecha negra), reforzando así la conclusión de que *Ubx* es el responsable de la diferente distribución de *Timp* en los dos discos.

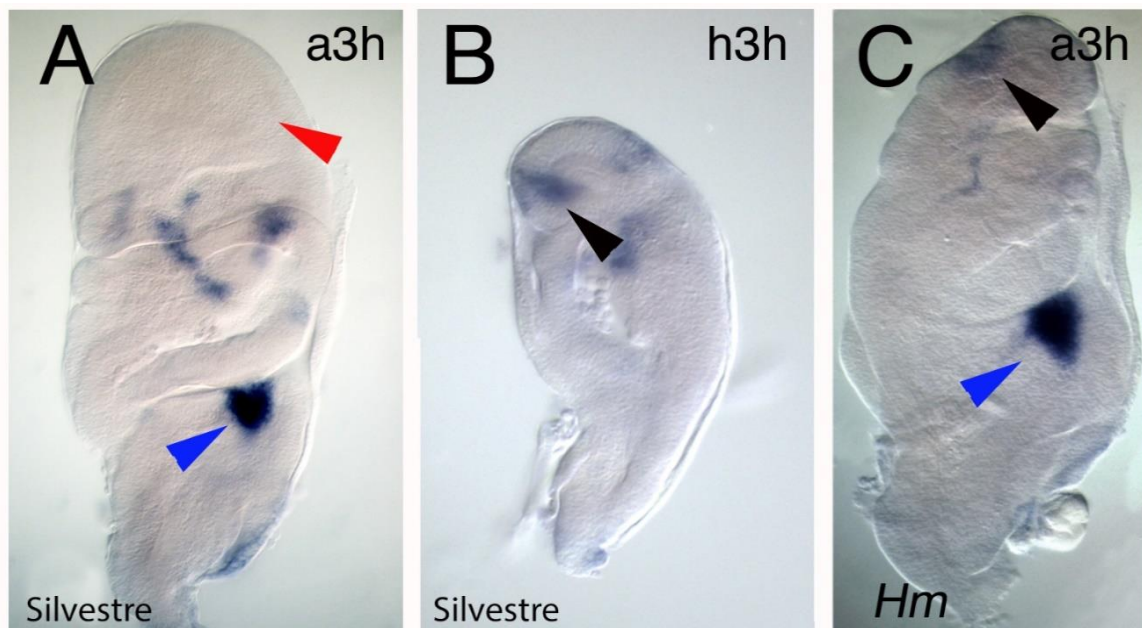


Figura 27. Expresión de *Timp* en discos de ala y halterio a las 3h DFP. (A,B) Hibridación *in situ* del RNA del gen *Timp* en disco de ala (A) y halterio (B) mostrando que la expresión de *Timp* en el disco de ala se encuentra alejada del lumen (flecha roja) mientras que en el de halterio se encuentra próxima al mismo (flecha negra). (C) Disco de ala en mutante *Haltere-mimic* en el que se observa una región de expresión cerca del lumen con el mismo patrón que en el halterio silvestre. En la parte proximal del disco, observamos el mismo parche que en el ala silvestre (flecha azul en A,C) dado que en estos mutantes, no se expresa ectópicamente *Ubx* en la parte proximal. Nótese también la reducción del tamaño del *pouch* del disco de ala. (n=27)

Sin embargo, al no existir un medio para localizar la proteína, la posible diferencia de

distribución entre los dos discos y, por tanto, la posible inhibición de Mmp1 en el lumen, no se puede evaluar.

4. Mmp1 y Timp regulan la presencia de Vkg-GFP y la morfogénesis de los discos y apéndices dorsales.

En apartados anteriores hemos mostrado que la expresión de Mmp1 y Vkg-GFP aparece de manera inversa en disco de ala respecto del disco de halterio, y también que la disminución de los niveles de Colágeno IV (Vkg-GFP) en disco de ala se correlacionan con un cambio morfológico en el mismo. El siguiente paso fue analizar en qué medida, cambios en la actividad de Mmp1 eran responsables de una presencia diferencial de Vkg-GFP y si estos cambios producían una morfología anómala en los discos de ala y halterio y en los apéndices derivados de ellos. Para ello sobreexpresamos el gen *Timp* en el *pouch* con el sistema Gal4-UAS utilizando *sd-Gal4* como *driver*. El resultado de esta sobreexpresión en el disco de ala es que Vkg-GFP no comienza a eliminarse de la parte basal de las células a las 3h DFP, impidiendo así la aposición de los epitelios dorsal y ventral. Los discos mostrados en la Figura 28 corresponden a las 6h DFP, es decir, cuando debería darse la expansión del disco de ala silvestre y la unión de epitelios dorsal y ventral. Como se aprecia, la morfología es muy distinta, con separación dorsal-ventral y no expansión, asemejándose al disco de halterio silvestre de las mismas horas (Fig. 28A comparar con Fig. 17F y 21C').

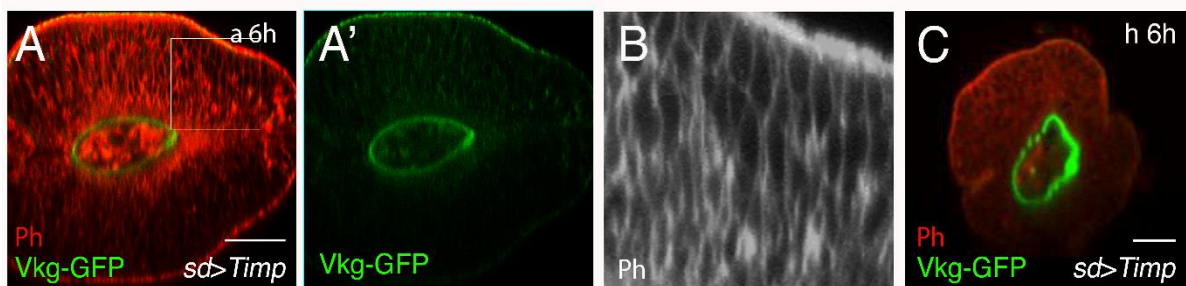


Figura 28. La reducción de actividad de las Mmps modifica la morfología del disco de ala, pero no la del disco de halterio. (A,A') Sección transversal óptica de un disco de ala de 6h DFP en el que se ha sobreexpresado *Timp* (*sd-Gal4 Vkg-GFP UAS-Timp*). Como vemos en la imagen, Vkg-GFP no se degrada, y el disco muestra una forma globular, no existiendo aposición ni expansión de las capas dorsal y ventral (comparar con Figs. 17F y 21C'). (B) Ampliación de la imagen (A) para observar la forma celular, la cual se muestra más elongada que en el disco de ala silvestre de la misma edad similar a la forma encontrada en células de halterio en la misma etapa (comparar con Fig. 18C, D) (n=7). (C) Sección transversal óptica de un disco de halterio de 6h DFP en el que se ha sobreexpresado *Timp* (*sd-Gal4 Vkg-GFP UAS-Timp*). La morfología del disco no cambia respecto del silvestre (comparar con Fig. 17I) (n=4). Escala: 25 μ m.

Además, las células del disco de ala que sobreexpresan el gen *Timp* muestran una forma más columnar, propia del disco de halterio en esta etapa de 6h DFP, y no más isodiamétrica como hemos observado en el disco de ala silvestre (Fig. 28B comparado con Fig. 18C). Así pues, podemos afirmar que en estas condiciones mutantes, el disco de ala adopta características del disco de halterio. En cambio al sobreexpresar *Timp* en el disco de halterio, no se observan cambios significativos ni a las 3h ni a las 6h DFP, aunque la morfología es algo más redonda que en el silvestre (Fig. 28C).

Dados estos resultados, decidimos observar posibles efectos morfológicos de la sobreexpresión de *Timp* en adultos. Al aumentar la expresión de *Timp* en el disco de ala durante todo el desarrollo, las alas aparecen más cortas y completamente hinchadas, lo cual concuerda con lo observado en los discos, ya que al no desaparecer Vkg-GFP, las superficies dorsal y ventral no se aponen, y por tanto, no se adhieren para dar una forma final plana como en el adulto silvestre (Fig. 29B, comparar con el genotipo silvestre en 29A). Los halterios de un gran porcentaje de los individuos analizados (28/39) presentaban un capitelo más globular que el adulto silvestre (Fig. 29E, comparar con 29D). Para saber en qué momento del desarrollo del disco de ala el gen *Timp* era necesario para una correcta morfogénesis, utilizamos una estirpe en la que se combinaba la línea *sd-Gal4* y la construcción *tubGal80^{ts}*, la cruzamos con la línea *UAS-Timp* e indujimos, en la descendencia, la sobreexpresión de este gen en distintos momentos del desarrollo mediante el cambio de 17°C a 29°C (sistema *Gal4/Gal80^{ts}*, McGuire et al., 2003). Realizando este cambio en larvas de estadio III obtuvimos adultos con un fenotipo similar al observado cuando se induce la sobreexpresión de *Timp* todo el desarrollo, indicando que la proteína Mmp1 está implicada en la morfogénesis del ala a partir de esta etapa (Fig. 29C, F). Sin embargo, al cambiar las pupas de esta F1 a 29°C a las 12h DFP, el fenotipo tanto de alas como de halterios es completamente silvestre (Fig. 29D, G). Así pues, podemos concluir que la regulación de Mmp1 es primordial para el correcto desarrollo de los órganos después de larva III tardía pero antes de las 12h DFP, es decir, en la etapa de pupa temprana.

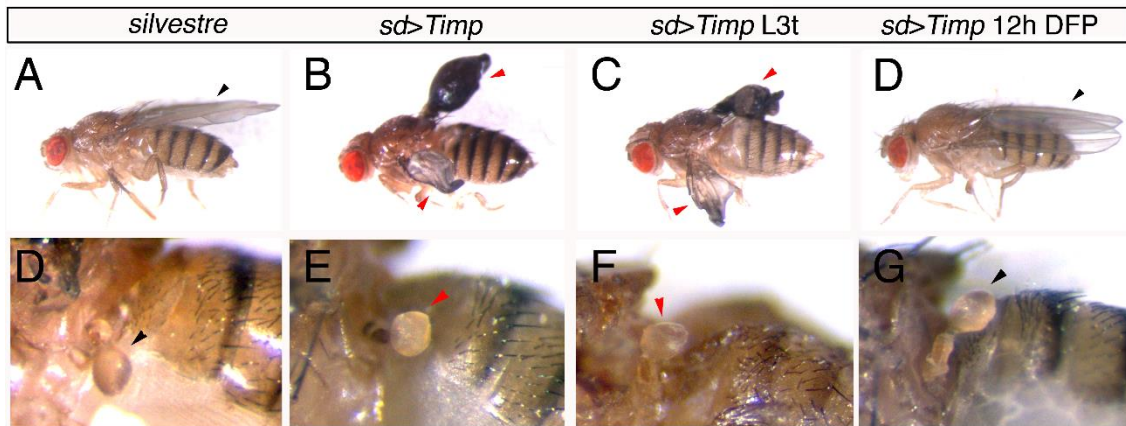
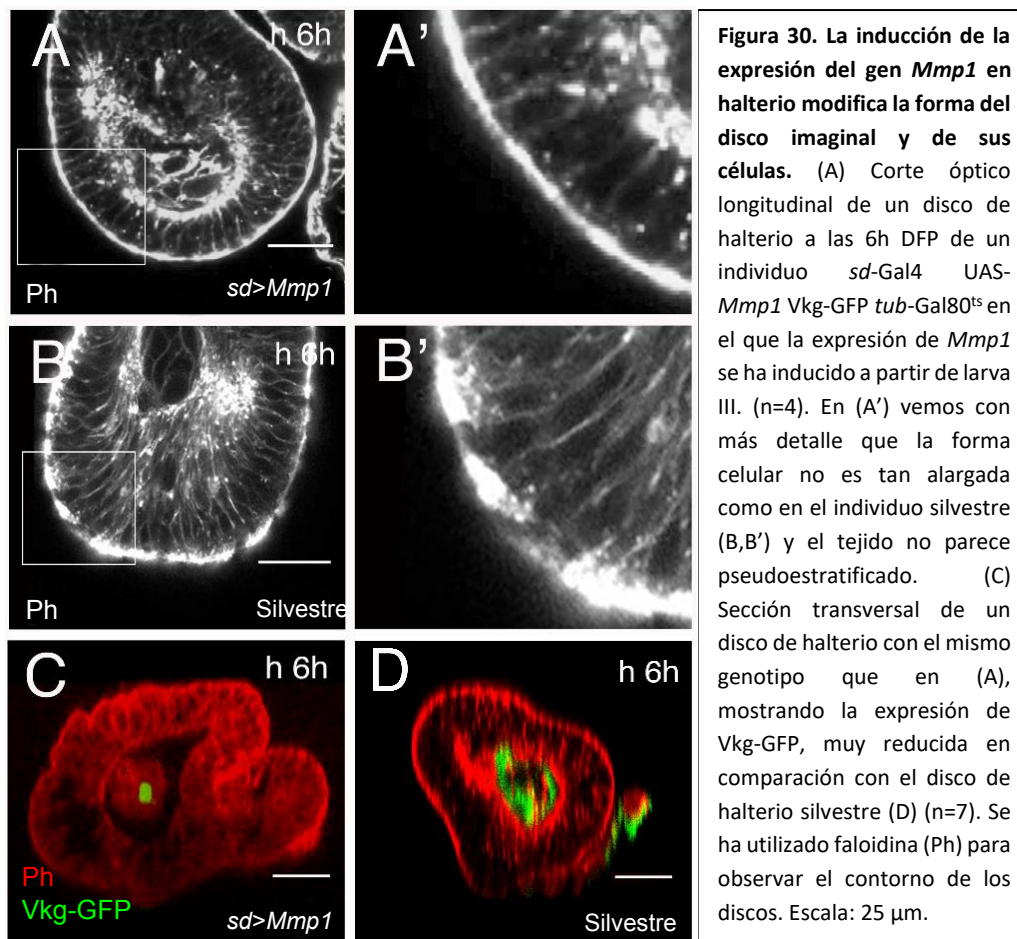


Figura 29. Fenotipos de adultos observados al sobreexpresar *Timp*. (A) Individuo silvestre y detalle del halterio (D). (B) Individuo *sd-Gal4 UAS-Timp* que ha permanecido a 29°C todo el desarrollo; las alas son más cortas y no aponen sus superficies dorsal y ventral, con lo cual tienen apariencia hinchada (36/39 casos). El halterio de este individuo (E) tiene forma globular, estando un poco más hinchado que el silvestre. (C) En individuos *sd-Gal4 UAS-Timp tub-Gal80^{ts}* en los cuales el gen se activa a partir de la etapa de larva III tardía, el fenotipo es similar al observado en (B,E) con alas hinchadas y halterios (F) un poco más redondeados que en el silvestre (34/36 casos). (D) En individuos *sd-Gal4 UAS-Timp tub-Gal80^{ts}* en los cuales la expresión del gen se induce a partir de las 12h DFP, tanto las alas como los halterios (G) muestran fenotipo silvestre (n=8). Las flechas negras indican desarrollo normal, las flechas rojas indican desarrollo anormal.

Para reforzar esta conclusión realizamos experimentos recíprocos, sobreexpresando el gen *Mmp1* y observando el fenotipo tanto de discos imaginales como de adultos mutantes. La sobreexpresión de *Mmp1* durante todo el desarrollo dio como resultado una alta mortalidad por lo que decidimos utilizar el sistema Gal4/Gal80^{ts} con cambios de temperatura entre 17°C y 29°C. Al realizar el cambio a partir de las 24h del desarrollo la mortalidad se ve disminuida, haciendo posible observar los discos imaginales en la etapa de pupa temprana. Dado que el experimento anterior de sobreexpresión de *Timp* acotaba la etapa en la cual *Mmp1* era importante para determinar la forma de los discos y apéndices, los experimentos de sobreexpresión de este último fueron llevados a cabo a partir de la etapa de larva III, haciendo en este momento el cambio de temperatura de 17°C a 29°C. Los resultados observados en discos imaginales de 6h DFP muestran una morfología celular del epitelio del disco de halterio más isodiamétrica que en el individuo silvestre, estructura propia del disco de ala silvestre en esta etapa (Fig. 30A' compárese con 30B', disco de halterio silvestre de edad similar). Además, se observa una eliminación casi total de la expresión de Vkg-GFP en el disco de halterio de este estadio respecto al silvestre (Fig. 30C compárese con silvestre 30D). Sin embargo no hay aposición dorso-ventral, como cabría esperar si la eliminación de la membrana basal fuera el único factor necesario para este fin.



Para analizar los adultos con sobreexpresión del gen *Mmp1* realizamos cambios de temperatura con el sistema Gal4/Gal80^{ts} similares a los establecidos para la observación de los discos imaginales, es decir, sobreexpresión del gen a partir de larva III, pero en este caso diferenciamos entre la etapa de larva III temprana y tardía. En aquellos adultos en los cuales se indujo la sobreexpresión en larva III tardía, las alas presentan un fenotipo similar al de mutantes *dumpy* (gen que codifica una proteína perteneciente a la MEC apical, Díaz-de-la-Loza et al., 2018), en el cual los extremos distales de las mismas aparecen achatados, pero las alas son siempre planas (Fig. 31A). En el caso de los halterios, más de un 50% (8/18) de los individuos analizados presentan una forma de estos órganos más aplanada y alargada (Fig. 31D comparar con el silvestre en Fig. 29D). Curiosamente, al sobreexpresar *Mmp1* a partir de larva III temprana, el capitulo de los halterios puede verse, en la mayoría de los casos analizados (7/11), mucho más aplanado y elongado comparado con el halterio silvestre (Fig. 31E). Las alas correspondientes a este fenotipo se observan arrugadas, pero no hinchadas (Fig. 31B). Por último, y secundando el caso de sobreexpresión de *Timp*, al forzar la expresión de *Mmp1* después de las 12h DFP, tanto alas como halterios se desarrollan de manera normal. (Fig. 31C, F).

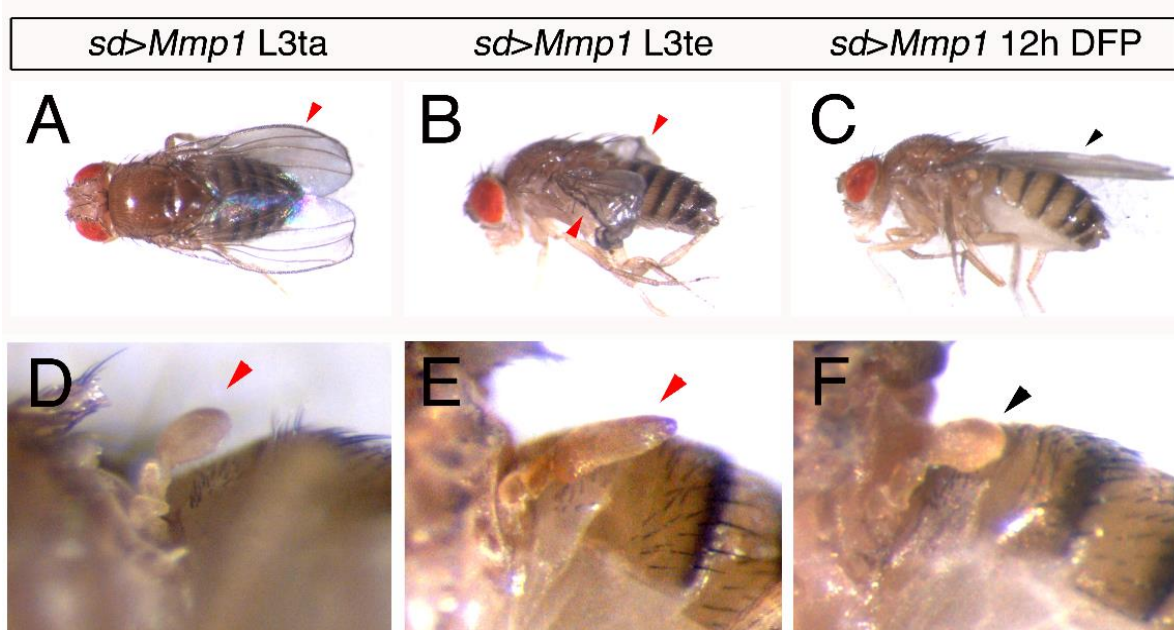


Figura 31: Fenotipos resultantes de la sobreexpresión de *Mmp1*. (A) Individuos con el genotipo *sd-Gal4 UAS-Mmp1 tub-Gal80^{ts}* en los que *Mmp1* se induce en la etapa de larva III tardía (n=18) muestran un fenotipo *dumpy*, caracterizado por presentar los extremos de las alas romos. Alrededor de la mitad de estos individuos (8/18) muestran halterios ligeramente más planos en el capitulo (D) respecto del silvestre (Fig 19D). (B) En individuos con el mismo genotipo en los cuales la inducción de la expresión de *Mmp1* se hizo a partir de larva III temprana, las alas se muestran deformadas (n=11) y los halterios (E) en su mayoría (7/11) se muestran muy aplanados y alargados. (C) Sin embargo en individuos con el mismo genotipo, inducidos a partir de las 12h DFP, tanto las alas como los halterios (F) muestran un fenotipo *silvestre* (n=15). Las flechas negras indican desarrollo normal, las flechas rojas indican desarrollo anormal.

También realizamos experimentos silenciando la expresión del gen *Mmp1* a través de un UAS-*Mmp1*-RNAi, utilizando el mismo promotor *Sdgal4*, dando como resultado un fenotipo silvestre, con lo cual decidimos descartar esos experimentos dado que es probable que el RNAi no estuviera funcionando de manera correcta.

En este punto realizamos un experimento de epistasia en el disco de halterio, a fin de observar si los cambios en la expresión de Vkg-GFP cuando se modifica la expresión de *Ubx*, están mediados por la actividad de las metaloproteasas. Para ello expresamos en larvas simultáneamente el gen *Timp* y la combinación genética que reducía la expresión de *Ubx* con la línea *sdGal4 (sd-Gal4 UAS-dsUbx Df109 UAS-Timp)*. En los discos de halterio analizados a las 6h DFP (Fig. 32B), observamos que tanto la forma que poseen como el anillo de Vkg-GFP en la parte basal recuerda a halterios silvestre de esta edad (Fig. 32B compárese con Fig. 21D') más que a discos de halterio que únicamente reducen la expresión de *Ubx (sd-Gal4 UAS-dsUbx Df109)* (Fig. 32A). El hecho de que el fenotipo obtenido se asemeje al resultante de la sobreexpresión de *Timp* (similar al silvestre) y no al resultante de la eliminación de *Ubx* (fenotipo de disco de ala) sugiere que *Ubx* regula la expresión de Vkg-GFP y la morfología del

halterio a través del control de las metaloproteasas.

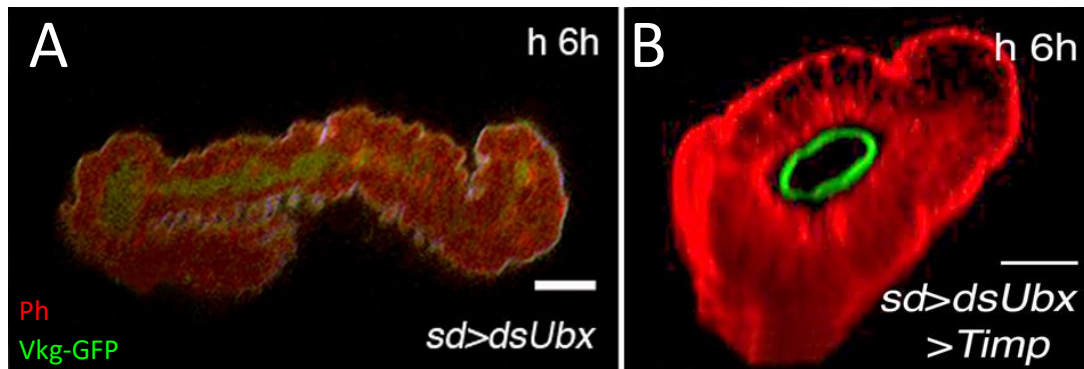


Figura 32. Fenotipo del disco de halterio *sd-Gal4 UAS-dsUbx DfUbx¹⁰⁹* al sobreexpresar simultáneamente *Timp*. (A) Sección transversal óptica de un disco de halterio de 6h DFP con genotipo *sd-Gal4 UAS-dsUbx DfUbx¹⁰⁹*, en el cual vemos una transformación evidente hacia fenotipo de ala y una menor expresión de Vkg-GFP. (B) Sección transversal óptica de un disco de halterio de 6h DFP con genotipo *sd-Gal4 UAS-dsUbx DfUbx¹⁰⁹ UAS-Timp*, donde se observa una morfología característica de halterio silvestre y una recuperación de la señal de Vkg- GFP (similar también a la de discos de halterio *sd-Gal4 UAS-Timp*, ver Fig. 28C). (n=10). Escala: 25 μ m.

Así pues, los resultados obtenidos hasta aquí indican que: (1) Los niveles de Mmp1 en el lumen del disco de ala son significativamente más altos que en el lumen del disco de halterio a las 3h después de la formación del pupario; (2) La expresión de Mmp1 se corresponde negativamente con los niveles de la proteína Vkg-GFP en la membrana basal del disco de ala a las 6h DFP, siendo más bajos que aquéllos presentes en el disco de halterio en esta misma etapa del desarrollo; (3) *Ubx*, gen que solo se expresa en el disco de halterio, mantiene los niveles de Vkg-GFP en el lumen del halterio durante más tiempo, regulando negativamente, probablemente de manera directa, la expresión de *Mmp1*; y (4) los cambios en la actividad de Mmp1 tienen impacto tanto en la forma de los discos imaginales como en la de los órganos adultos, ya que los halterios se elongan y aplanan al aumentar la expresión de Mmp1, mientras que las alas se hinchan y acortan si la actividad de Mmp1 se reduce.

5. Las integrinas se localizan de manera diferente en disco imaginal de ala y halterio.

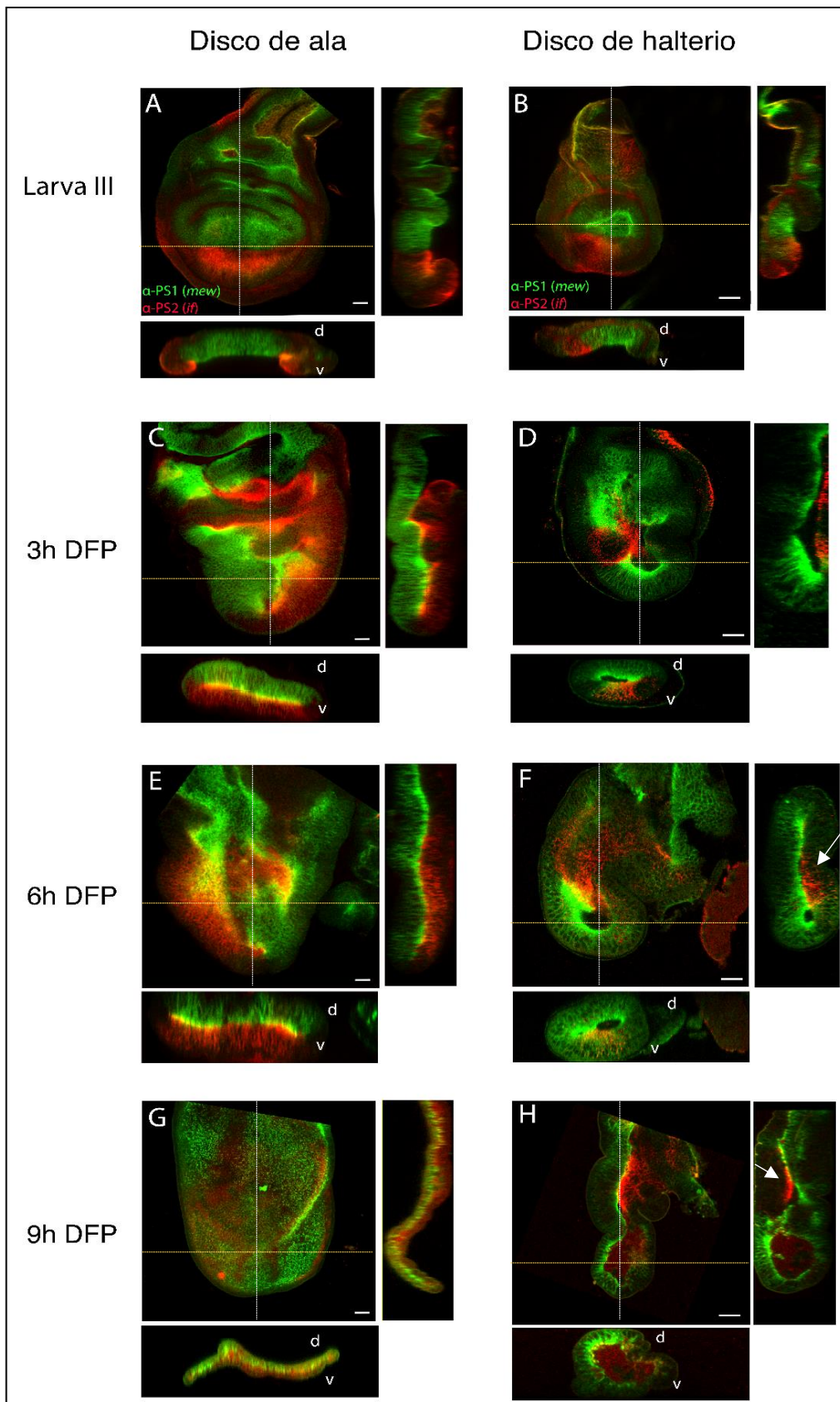
Como ya hemos visto en la primera parte, la eliminación de la membrana basal en el disco de ala es imprescindible para dar lugar a la aposición de las superficies dorsal y ventral, a la expansión del disco y, en última instancia, a un órgano plano. Si éste fuera el único factor necesario para la generación de un halterio plano, al eliminar la membrana basal a través de la

sobreexpresión de *Mmp1*, éste debería haber adquirido esta morfología. Sin embargo, como hemos observado en la Figura 30C, aunque Vkg-GFP está prácticamente ausente, las superficies dorsal y ventral del disco siguen sin adherirse.

Un factor imprescindible para la adhesión de las superficies dorsal y ventral en el disco de ala es la presencia de integrinas PS1 y PS2, colocándose PS1 en la superficie dorsal y PS2 en la basal (Fig. 12B) (Brower y Jaffe, 1989). La integrina PS1 se compone de α PS1 β PS, y la integrina PS2 de α PS2 β PS, siendo α PS1 codificada por el gen *mew*, α PS2 codificada por el gen *if* y β PS por el gen *mys* (Brower et al., 1984; Wilcox et al., 1984). En primer lugar nos propusimos comparar la distribución de las dos subunidades α de estas dos integrinas en los discos de ala y halterio, cubriendo la etapa de pupa temprana, desde larva III hasta las 9h DFP.

En las imágenes obtenidas (Fig. 33) vemos que, en todas las etapas analizadas, en el disco de ala α -PS1 se localiza en la superficie dorsal y α -PS2 en la ventral (Fig. 33A, C, E, G), tal y como está descrito (Brower y Jaffe, 1989). En el disco de halterio, sin embargo, aunque en la etapa de larva III la localización de ambas integrinas es similar a la del disco ala (Fig. 33B), al adentrarnos en la etapa de 3h DFP, mientras que α -PS1 se encuentra en la superficie dorsal, como en el disco de ala, α -PS2 parece no localizarse a lo largo de toda la superficie ventral, sino formando un parche en la zona central (Fig. 33D). A las 6h DFP la señal de α -PS1 se acumula en la parte basal de células de la superficie dorsal, y la señal de α -PS2 se dispersa aún más del lado ventral, siendo prácticamente indetectable en el capitulo presuntivo, y siendo más visible en la parte del futuro pedicelo (Fig. 33F). Esta localización se hace más notable a las 9h DFP, donde la señal aparece claramente en la parte del presuntivo pedicelo, siendo indetectable cerca del lumen del disco, mientras que α -PS1 sigue localizándose en la superficie dorsal (Fig. 33H).

Figura 33. Estudio de la distribución de las subunidades α -PS1 y α -PS2 en discos de ala y halterio en etapas de larva III y pupa temprana. En la etapa de larva III, tanto en disco de ala como de halterio, la subunidad α -PS1 se localiza en la superficie dorsal y α -PS2 en la ventral (A,B) (n=5). Al adentrarnos en la etapa de pupa, mientras que en el disco de ala α -PS1 sigue situándose en la superficie dorsal y α -PS2 en la ventral en todas las etapas de pupa temprana (C,E,G), en el disco de halterio la expresión de α -PS1 se localiza en dorsal, pero la de α -PS2 aparece en forma de parches que no cubren toda la superficie ventral a las 3h DFP (D) (n=11), y de forma más evidente a las 6h DFP, expresándose en este momento en zona proximal del disco (F, flecha blanca) (n=5); α -PS1 se concentra en la parte basal de las células de la superficie dorsal en estas etapas. A las 9h DFP se observa expresión de α -PS1 en la parte dorsal del disco, y α -PS2 únicamente en la zona del futuro pedicelo. (H, flecha blanca) (n=8). Se muestran secciones sagitales (a la derecha) y frontales (debajo) para cada disco y edad. Escala: 25 μ m.



Para demostrar que el gen *Ubx* era el responsable de las diferentes distribuciones de estas integrinas en los discos de ala y halterio analizamos la expresión de α -PS1 y α -PS2 en un mutante *Haltere-mimic* a las 3h DFP (Fig. 34). Observamos que en la zona correspondiente al lumen del disco de ala *Haltere-mimic* (Fig. 34C) α -PS2 no se localiza a lo largo de toda la superficie ventral, tal y como ocurre en el disco de ala silvestre (Fig. 34A), sino que su distribución es similar a la observada en el disco de halterio silvestre (Fig. 34B). Los niveles de expresión y distribución de α -PS1 también se asemejan más a los propios del disco de halterio que a los del disco de ala silvestres.

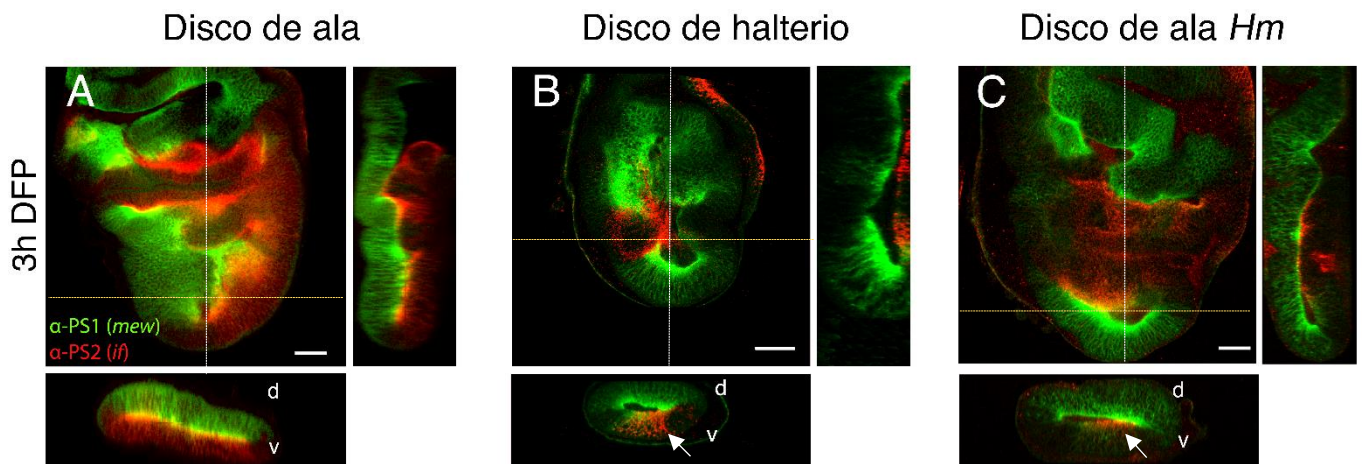


Figura 34. Localización de las subunidades α -PS1 y α -PS2 en un disco de ala del mutante *Haltere-mimic* a las 3h DFP. La distribución de α -PS2 en el disco de ala del mutante *Haltere-mimic* (C, flecha blanca) se asemeja más a la expresión observada en el disco de halterio silvestre (B) que a la observada en ala silvestre en la misma etapa (A). (n=3) Escala: 25 μ m.

Las integrinas PS1 y PS2, recordamos, se componen de α PS1 β PS y α PS2 β PS, respectivamente. Es decir, estas dos integrinas comparten la subunidad β . Es por ello que, para unificar los resultados y hacer más sencilla la comparación entre los discos de ala y halterio, nos propusimos estudiar la distribución de esta subunidad β en ambos discos. Dados los resultados obtenidos para las subunidades α , nos preguntamos también cómo se expresarían estas integrinas en el disco de halterio más allá de la etapa de pupa temprana, y si seguirían estando presentes únicamente en el presunto pedicelo durante la morfogénesis posterior del apéndice. Por eso extendimos nuestro análisis a etapas posteriores pupales. La proteína β PS está codificada por el gen *myospheroid* (*mys*) y para el estudio de su distribución hemos utilizado una construcción de la proteína con un reportero GFP (Sarov et al., 2016).

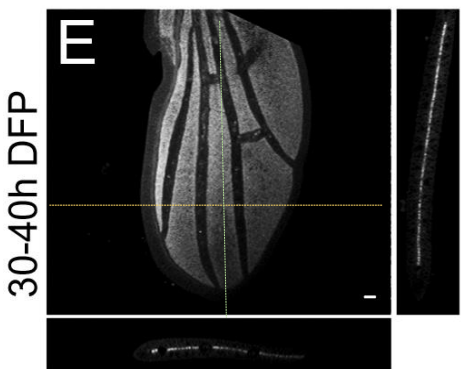
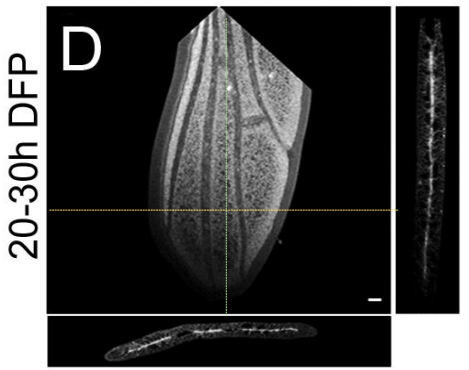
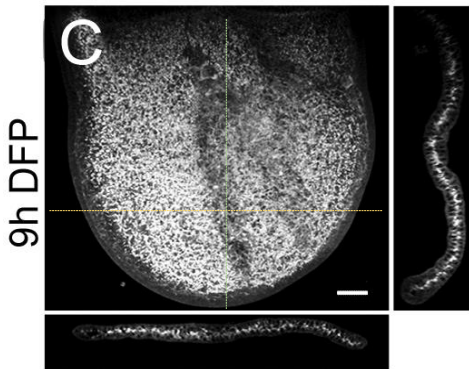
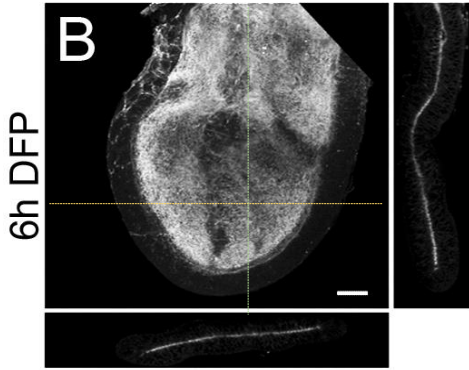
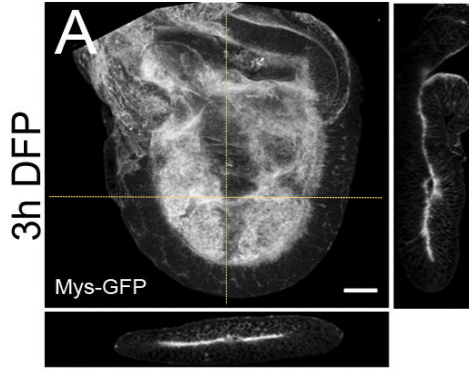
Con respecto al disco de ala, sabemos que la proteína β PS se sitúa durante la pupación en la parte basal de las células en las superficies dorsal y ventral durante las etapas de adhesión 1

(9h DFP) y adhesión 2 (30h-40h DFP), haciendo posible la unión de las superficies dorsal y ventral (Fristrom et al., 1993; Brabant et al., 1996).

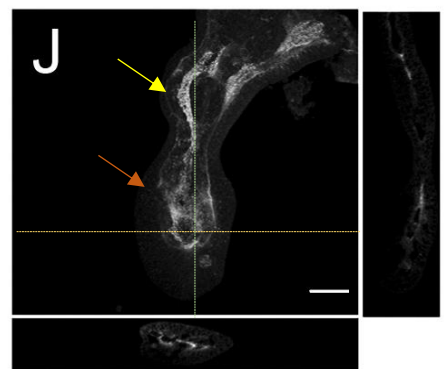
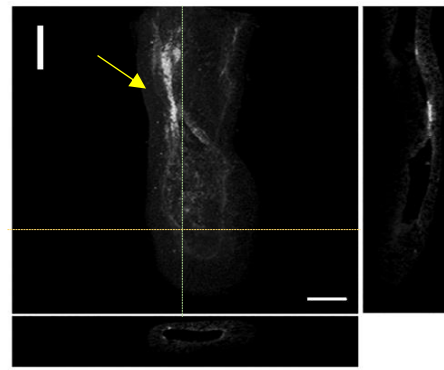
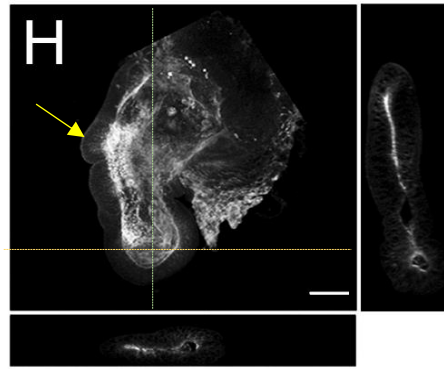
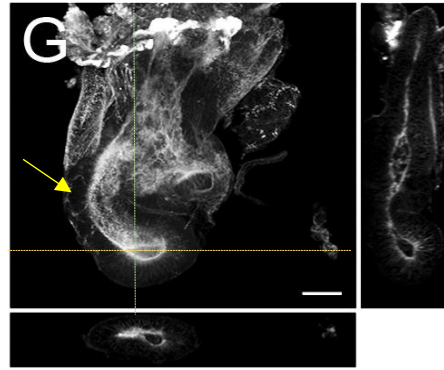
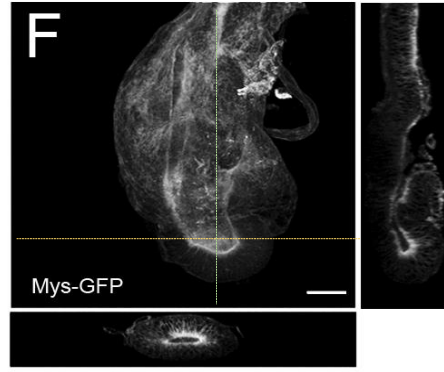
En la Figura 35 corroboramos que, durante la etapa de pupa temprana, Mys-GFP se localiza en la parte basal de las superficies dorsal y ventral del disco de ala (Fig. 35A, B, C). Entre las 10h y 20h DFP se da la etapa de separación de ambas superficies del disco de ala, y los niveles de integrinas disminuyen drásticamente en la zona central del disco de ala, como se describe en la literatura (Fristrom et al., 1993; Brabant et al., 1996) (no mostrado). Entre las 20h y las 30h DFP las integrinas se observan con expresión más clara en las intervenas en la etapa de aposición 2 (Fig. 35D), y en la etapa de adhesión 2 (30-40h DFP) encontramos integrinas únicamente en la zona de las intervenas, estando completamente ausentes en las zonas de presuntas venas (Fig. 35E). En cambio, la distribución de Mys-GFP en el disco de halterio se observa en la parte basal de las células que rodean el lumen durante las primeras etapas de pupa temprana (Fig. 35G, H), pero a las 6h DFP (flecha amarilla en G), y sobre todo a las 9h DFP, comienza a haber una señal más fuerte en la zona proximal, donde se concentra una alta cantidad de proteína (Fig. 35H, flecha amarilla). Esto coincide con los resultados obtenidos en el análisis de la distribución de las subunidades α -PS1 y α -PS2, donde se veía también una alta acumulación de ambas en la zona del presunto pedicelo a partir de las 9h DFP (Fig. 33H). Entre las 10 y 20h DFP los niveles de expresión de Mys-GFP disminuyen de forma drástica (no mostrado) y a las 20-30h DFP se ve señal en la parte del presunto pedicelo (Fig. 35I, flecha amarilla). Por último, entre las 30 y 40h DFP aparece señal de integrinas en la zona presuntiva del capitelo (Fig. 35J, flecha naranja) mientras que la señal en el presuntivo pedicelo aumenta (Fig. 35J, flecha amarilla).

Figura 35. Estudio comparativo de la distribución de la subunidad β PS entre los discos de ala y halterio durante la metamorfosis. En el disco de ala en la etapa de pupa temprana, es decir, de 3h a 9h DFP, Mys-GFP se localiza en la parte basal de las superficies dorsal y ventral (A-C) (n=2). Tras la etapa de separación, se da la etapa de adhesión II que ocurre entre las 20h y las 40h DFP, y en la que Mys-GFP se observa en las intervenas, siendo más evidente esta distribución a medida que nos adentramos en esta etapa (D,E) (n=8; n=6). En el disco de halterio, durante las primeras horas de la etapa de pupa temprana Mys-GFP se encuentra rodeando el lumen (F,G) (n=2). Al alcanzar las 9h DFP, la expresión de Mys-GFP empieza a ser más evidente en la parte del presunto pedicelo (H, flecha amarilla) (n=2). Entre las 20h y las 30h DFP, reaparece la expresión principalmente en la zona del presunto pedicelo (I) (n=8). Entre las 30h y las 40h, la expresión en el presuntivo pedicelo se hace más notable (J, flecha amarilla), mientras que aparece también expresión en el futuro capitelo (J, flecha naranja) (n=5). Se muestran secciones sagitales (a la derecha) y frontales (debajo) para cada disco y edad. Escala: 25 μ m.

Disco de ala



Disco de halterio



Vemos por tanto una diferencia grande en la distribución de integrinas entre los discos de ala y halterio, especialmente en la etapa de adhesión II (a partir de 20h DFP). Aun así, para comparar más fácilmente las dos expresiones dentro del mismo disco imaginal, procedimos a estudiar la expresión de Mys-GFP en el disco de halterio de mutantes *pbx/DfUbx¹⁰⁹* (Fig. 36). Nos hemos centrado en analizar la distribución de la proteína entre las 20-30h y 30-40h DFP donde es más evidente la diferencia de expresión entre ambos discos.

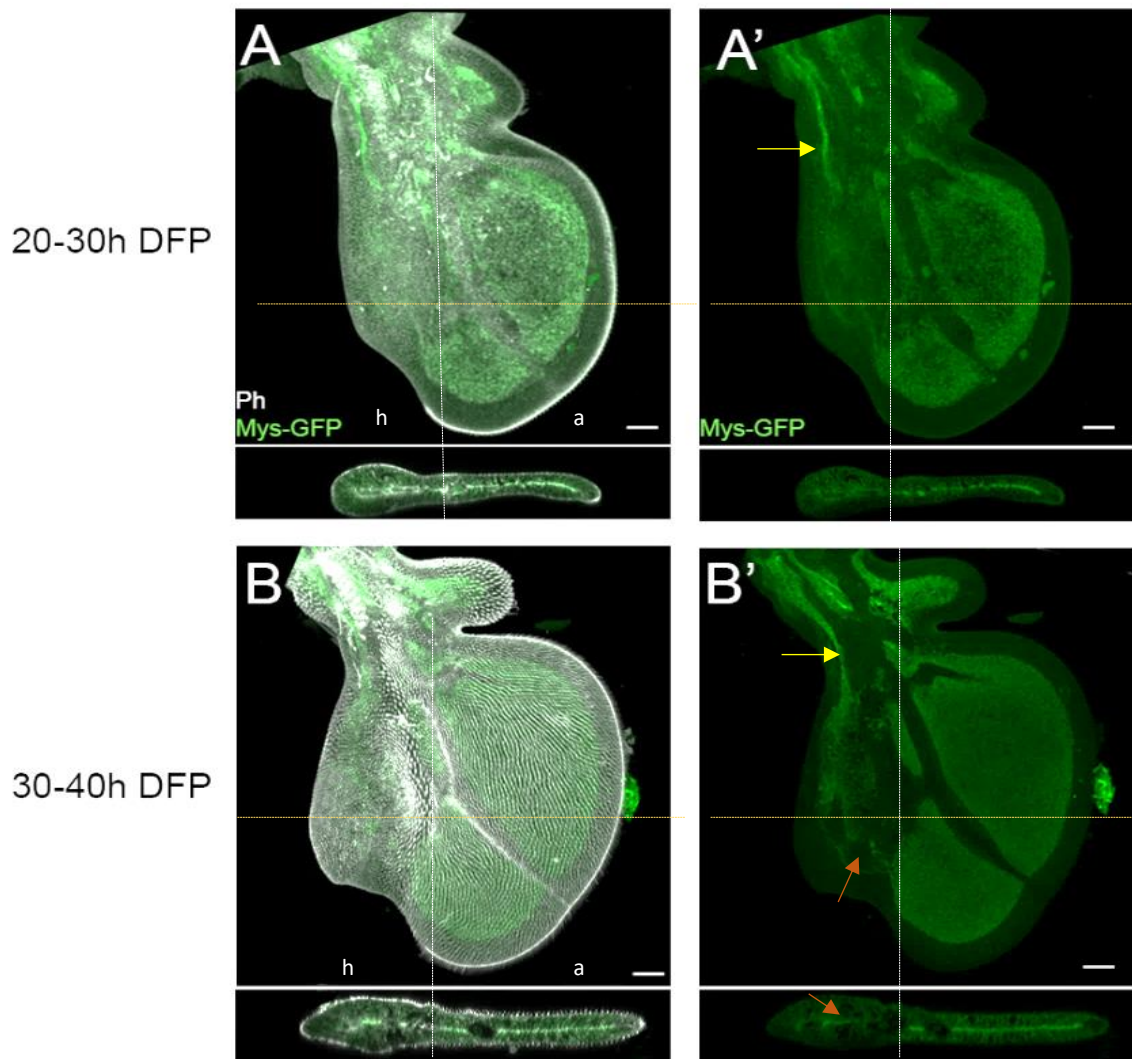


Figura 36. Estudio de la localización de Mys-GFP en un disco de halterio mutante *pbx/DfUbx¹⁰⁹* entre las 20h y las 40h DFP. (A,A') Disco de halterio mutante *pbx/DfUbx¹⁰⁹* entre las 20h y las 30h DFP, etapa de segunda adhesión de las superficies dorsal y ventral. En la imagen vemos que, mientras que en el compartimento que se corresponde a disco de ala (a) Mys-GFP se coloca en la parte basal de las dos superficies, en el compartimento que corresponde al disco de halterio (h) la expresión se encuentra más definida en la parte que corresponderá al presunto pedicelo (A', flecha amarilla) aunque hay una expresión débil también en el futuro capitulo. (n=6) (B,B') Disco de halterio mutante *pbx/DfUbx¹⁰⁹* en etapa desde las 30h hasta las 40h DFP, donde se muestra en el compartimento posterior transformado en disco de ala (a), una expresión de Mys-GFP localizada en las uniones dorsoventrales en intervenas, como en el disco de ala silvestre, mientras que en el compartimento de halterio (h), la expresión se concentra en la parte del presunto pedicelo (B', flecha amarilla) aunque en la zona del capitulo observamos también expresión débil de Mys-GFP (B', flechas naranjas) (n=2). Escala: 25 μ m.

Como se puede observar en la imagen (Fig. 36A,A'), entre las 20h y 30h DFP, en la parte posterior del disco de halterio, transformado en disco de ala, Mys-GFP se coloca en la parte basal de las superficies dorsal y ventral en la zona distal del disco, mientras que en el compartimento anterior, que corresponde al disco de halterio, ésta se localiza en la parte que equivaldría al presuntivo pedicelo (Fig. 36A', flecha amarilla), encontrando apenas expresión en el presuntivo capitulo. Entre las 30 y las 40h DFP, en el compartimento que se corresponde al disco de ala se define la localización de Mys-GFP en las zonas de intervena, mientras que en la parte del disco de halterio la expresión empieza a hacerse presente en la parte distal (Fig. 36B', flechas naranjas), con mayor expresión en el futuro pedicelo, tal y como veíamos en el individuo silvestre (Fig. 36B', flecha amarilla). Así pues, concluimos que *Ubx*, como era de esperar, determina la diferente distribución de Mys-GFP en los discos de halterio y ala.

Decidimos también observar el fenotipo adulto al eliminar la expresión del gen *mys*, utilizando como promotor *rn-Gal4* (Fig. 37). En estos individuos podemos observar que las alas están hinchadas (Fig. 37B), mientras que los halterios presentan una forma algo más alargada respecto del halterio silvestre (Fig. 37D compárese con C)

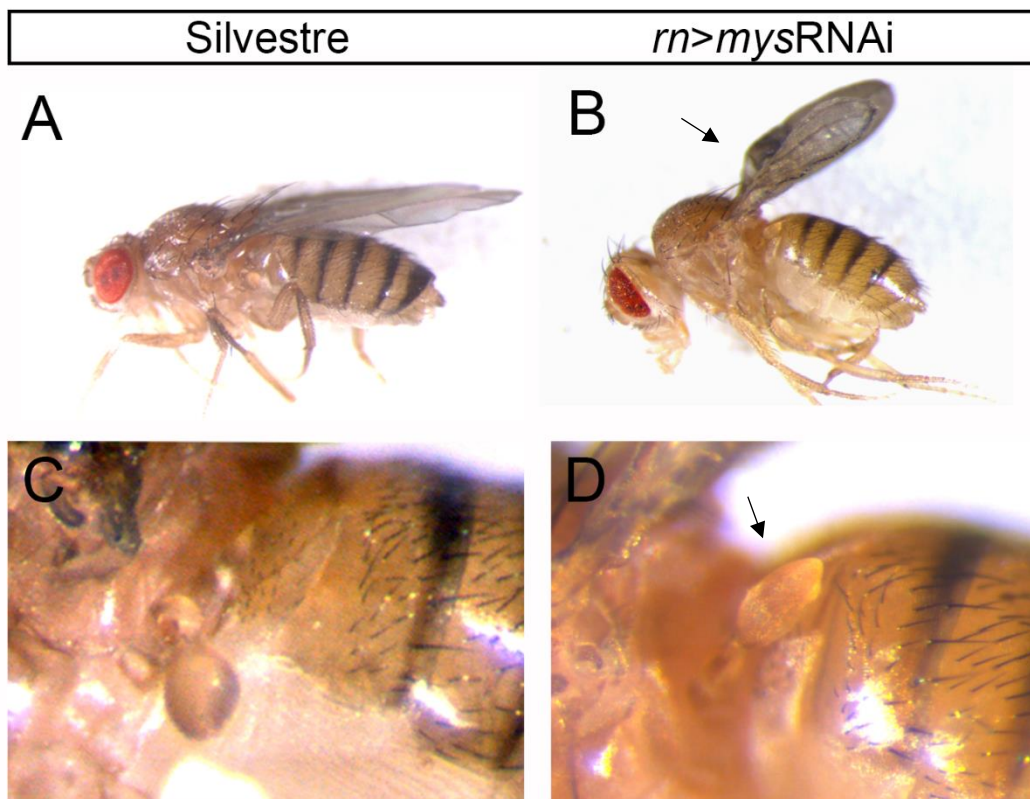


Figura 37. Fenotipo adulto de individuos *mysRNAi*. (A,C) Individuo silvestre donde se muestran las alas planas (A) y el halterio silvestre globular (C). (B,D) Individuo expresando *mysRNAi* bajo el control de la línea *rn-Gal4*, donde se muestran las alas hinchadas (B, flecha negra), y los halterios con forma algo más aplanada respecto al halterio silvestre (D, flecha negra comparado con C) (n=18).

6. La expresión del gen *blistered* está regulada negativamente por *Ubx* en disco de halterio.

Aunque hemos demostrado que *Ubx* regula negativamente la expresión de las integrinas en el disco de halterio, notamos que los genes que codifican estas proteínas no aparecían en el trabajo en el que se usaron *microarrays* para detectar genes regulados por *Ubx* desde larva III hasta pupa de entre 20h y 30h (Pavlopoulos y Akam, 2011). Así pues, buscamos un candidato que pudiera estar *upstream* de integrinas y *downstream* de *Ubx*. Seleccionamos el gen *blistered* (*bs*), ya que codifica para un factor de transcripción, su patrón de expresión en disco de ala se localiza en las zonas de intervena y su eliminación da pie a la formación de ampollas en el ala semejantes a las producidas en mutantes de integrinas (Fristrom et al., 1994; Montagne et al., 1996; Roch et al., 1998; Walsh y Brown, 1998). Este gen codifica para un factor de transcripción llamado Drosophila Serum Response Factor (DSRF) (Affolter et al., 1994) perteneciente a la familia de factores de transcripción MADS, los cuales poseen una secuencia MADS-box (Treisman y Ammerer, 1992) con la cual se unen al ADN para regular su transcripción, y está altamente conservada en la evolución (Revisado en Shore y Sharrocks, 1995). Este factor de transcripción, llamado Serum Response Factor (SRF) en mamíferos, ha sido relacionado con la remodelación de citoesqueleto de actina y además con la regulación de proteínas implicadas en adhesiones focales, como Talina o la β 1-Integrina (Schratt et al., 2002).

Primeramente, decidimos comparar la expresión del gen entre los discos de ala y halterio, tanto en larva III tardía como en pupa, temprana y tardía. Para ello utilizamos una construcción P-lacZ *enhancer trap* (*bs*^{P212}, o *bs-lacZ*) inserta en el gen *bs*. Como observamos en la Figura 38, y como ha sido descrito previamente (Roch et al., 1998), en el disco de ala, en la etapa de larva III, *bs-LacZ* presenta un patrón de expresión que se localiza en regiones que parecen corresponder a las zonas de intervena, no habiendo expresión en los espacios que darán lugar a las venas en adulto (Fig. 38A). Esta expresión única o mayoritariamente en zona de intervenas se mantiene y acentúa en todo el periodo pupal (Fig. 38B-E).

La expresión de *bs-LacZ* en disco de halterio en la etapa de larva III no muestra ningún patrón parecido al del disco de ala, habiendo parches de expresión cerca del lumen (Fig. 38F, Roch et al., 1998). En la etapa de 3h DFP hay una expresión difusa en una zona cercana al lumen del disco (Fig. 38G) y a las 9h DFP la expresión parece centrarse en la zona del lumen y en la parte del presunto pedicelo (Fig. 38H, flechas naranja y negra). Entre las 20h y las 30h DFP la

expresión aparece en la zona del presunto pedicelo (Fig. 38I, flecha negra), siendo más intensa entre las 30h y las 40h DFP (Fig. 38J, flecha negra) y en este último estadio aparece además una zona de expresión débil en el capitulo presuntivo (Fig. 38J, flecha naranja).

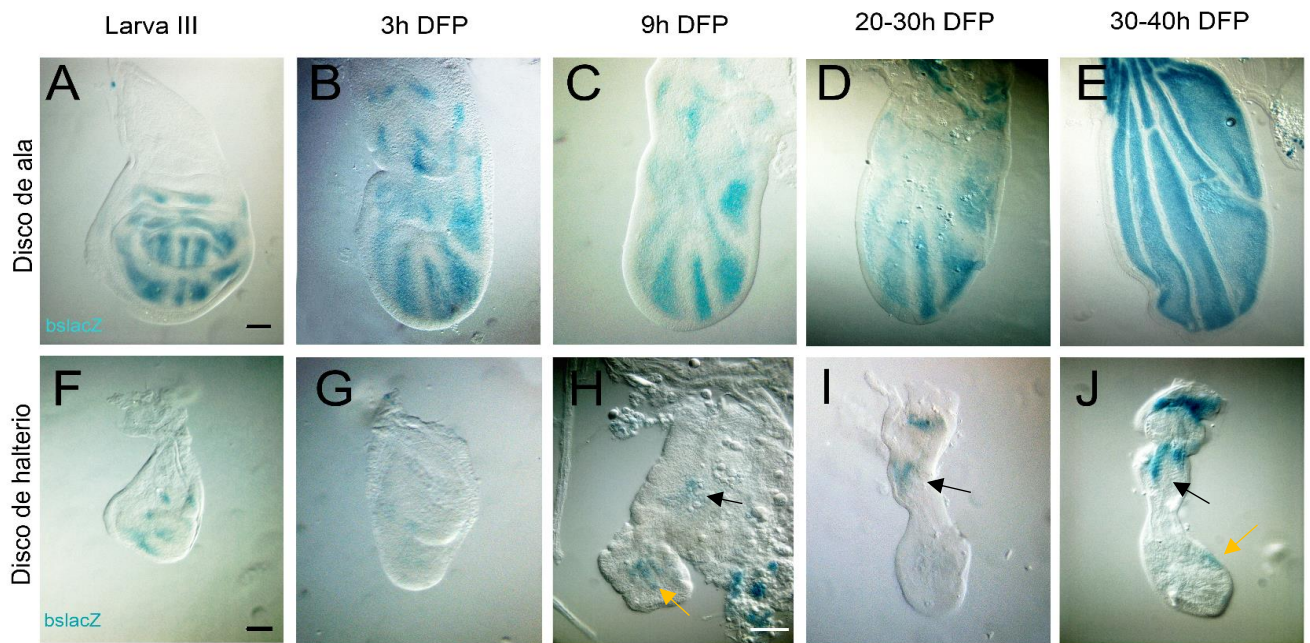
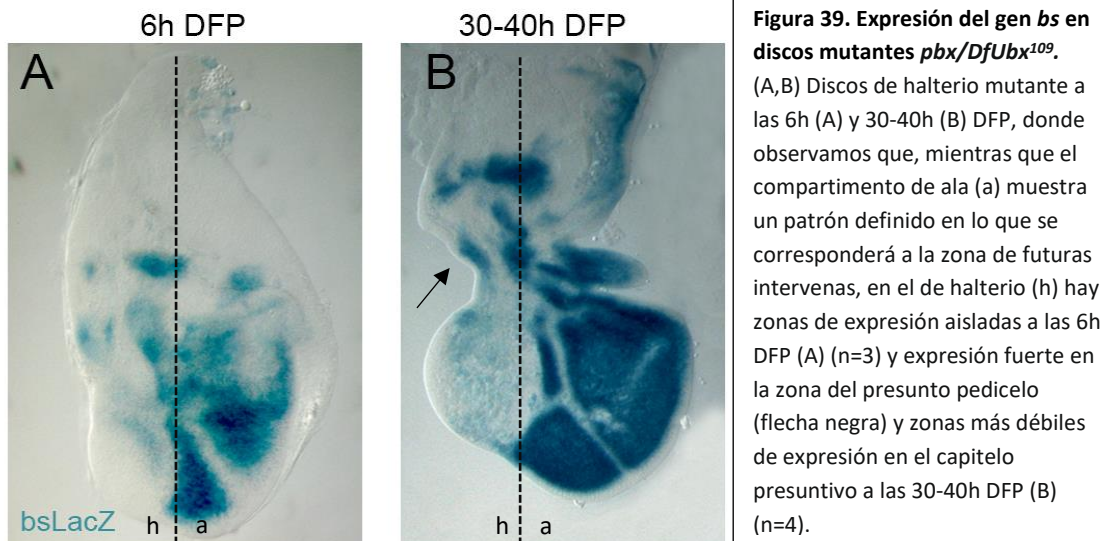


Figura 38. Estudio de la expresión de *bs* en disco de ala y halterio entre la etapa de larva III y las 40h DFP. (A-E) En el disco de ala, durante larva III tardía y la metamorfosis, la expresión del gen *bs* se puede encontrar formando un patrón que se centra en la formación de las futuras intervenas, no habiendo expresión en las zonas que formarán las presuntas venas (n=5). (F-J) Sin embargo, en el disco de halterio la expresión es diferente, formando parches en larva III cerca del lumen (F), siendo menos evidentes a las 3h DFP (G) y haciéndose más visibles a las 9h DFP (H) donde la expresión se observa cerca del lumen (H, flecha naranja y en la parte del presunto pedicelo flecha negra). En la etapa de 20h-30h DFP la expresión de *bs* se encuentra en la zona del presunto pedicelo (I, flecha negra) y entre las 30h y las 40h DFP esta expresión se hace más fuerte en esta zona (J, flecha negra), pudiéndose ver parches de expresión también en el capitulo presuntivo (J, flecha naranja (n=5).

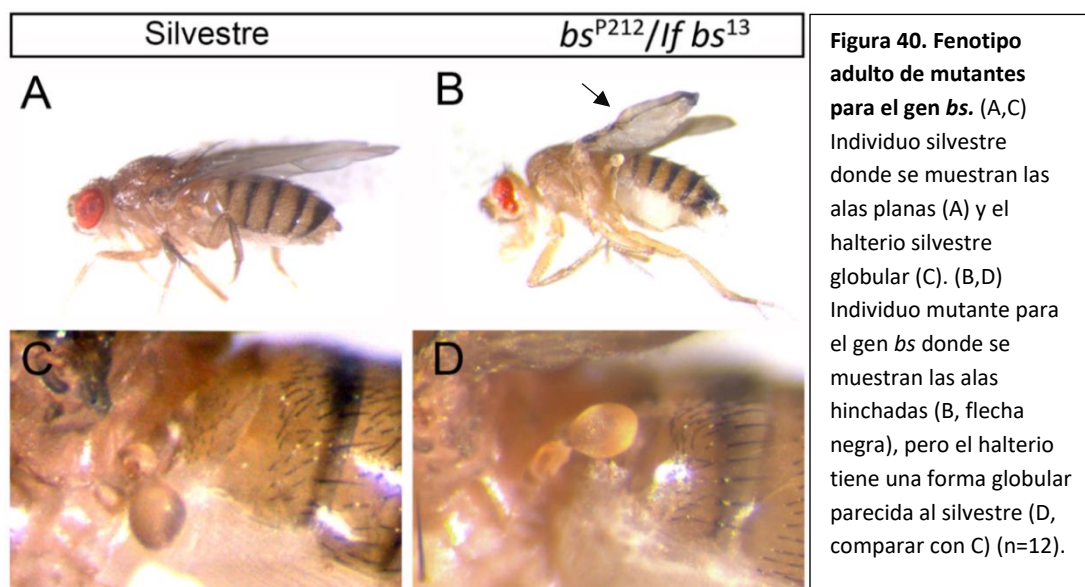
Como podemos observar, la expresión de *bs* en el disco de ala presenta similitudes con la de *Mys-GFP*, mostrada en la Figura 35, especialmente desde las 20h hasta las 40h DFP. En el disco de halterio la expresión de *bs* también se localiza, desde las 9h a las 40h DFP, en regiones similares a donde observamos la expresión de *Mys-GFP*, como la del pedicelo presuntivo (Fig. 38H-J, flecha negra, compárese con Fig. 35H-J, flecha amarilla).

Para asegurarnos de que efectivamente es *Ubx* quien está regulando la expresión del gen *bs* y además comparar en el mismo disco las diferencias de expresión, analizamos la señal de *bs-lacZ* en mutantes *pbx/DfUbx¹⁰⁹*. En la Figura 39 se observan discos de halterio mutantes en dos distintas etapas del desarrollo: en ambos se observa, como era de esperar, que la parte mutante (compartimento posterior, disco de ala) muestra un patrón de expresión en las zonas

de presuntas intervenas, mientras que en el compartimento anterior (disco de halterio) no vemos expresión, o es mínima, en la zona del capitulo presuntivo y es más acusada en la zona del presunto pedicelo (Fig. 39B). *Ubx*, por tanto, regula negativamente *bs* en el disco de halterio.



La falta o escasa expresión de *bs* en la zona presuntiva del capitulo del disco de halterio se corresponde con la falta de fenotipo en los halterios de mutantes *bs*. La inserción *bs^{P212}* (*bs-lacZ*) es un mutante nulo para *bs* (Roch et al., 1998) y en homocigosis no se obtienen adultos. Sin embargo, en la combinación de este alelo con un alelo fuertemente hipomorfo, *bs¹³*, se observa el fenotipo de alas hinchadas, como se ha descrito (Fristrom et al., 1994; Roch et al., 1998) (Fig. 40B), mientras que el halterio parece tener un fenotipo silvestre (Fig. 40D).



7. El factor de transcripción codificado por *bs* regula la expresión de Mys-GFP.

Como hemos descrito, los patrones de expresión de *bs* y Mys-GFP en los discos de ala y halterio presentan similitudes a partir de las 9h DFP. Ya que *bs* codifica un factor de transcripción (Affolter et al., 1994) nos preguntamos por tanto si podría estar regulando la expresión de *mys*. Para ello estudiamos la expresión de Mys-GFP en la combinación de mutantes transheterocigóticos nulos *bs*^{P1292}/*bs*¹⁴ (Fristrom et al., 1994). Estos individuos llegan hasta pupa de entre 40h y 50h DFP, pero no alcanzan la etapa de eclosión. Principalmente nos centramos en analizar disco de ala, ya que la expresión de Mys-GFP es más fuerte que en el disco de halterio, tiene un patrón más sencillo de identificar y nos permite concentrarnos en la zona presuntiva del apéndice, en la que estamos más interesados. El estudio también nos permite describir los fenotipos mutantes *bs* en el disco de ala.

Según vemos en la Figura 41, ya a las 9h DFP el ala mutante para *bs* no muestra adhesión entre las capas dorsal y ventral y además no vemos señal de Mys-GFP en las mismas (Fig. 41B, B'), mientras que en el disco silvestre Mys-GFP se localiza en las superficies basales de ambas capas (Fig. 41A, A'). Entre las 20h y las 30h DFP el ala mutante para *bs* no es capaz de reaponer las capas, debido probablemente a que no ha habido primera adhesión, o que se necesita también posteriormente a esta, y Mys-GFP está ausente (Fig. 41D, D') igual que a las 30-40h DFP (Fig. 41F, F'), en contraste con la expresión silvestre que ocurre donde se unen las superficies dorsal y ventral (Fig. 41C, C', E, E'). Concluimos que la expresión de Mys-GFP estaría regulada por el factor de transcripción *bs* y que el fenotipo *bs* podría deberse, al menos en parte, a la ausencia de expresión de integrinas.

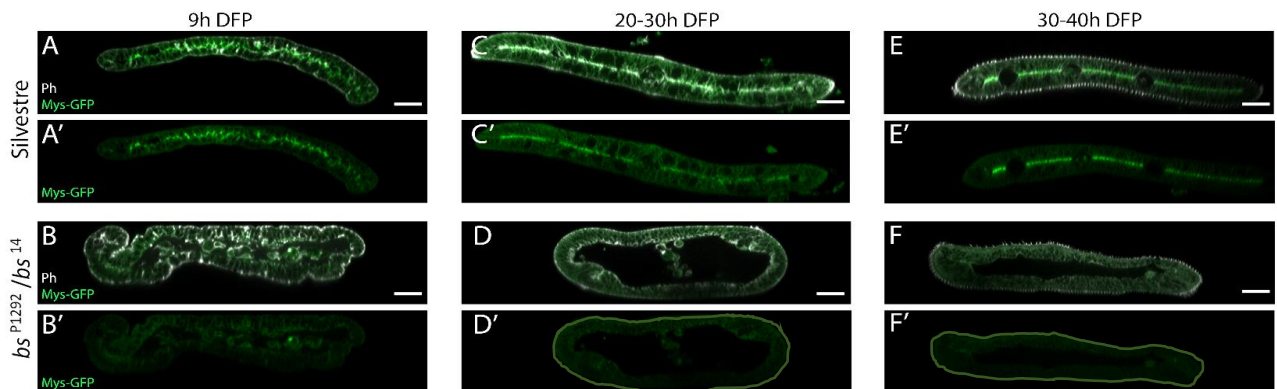


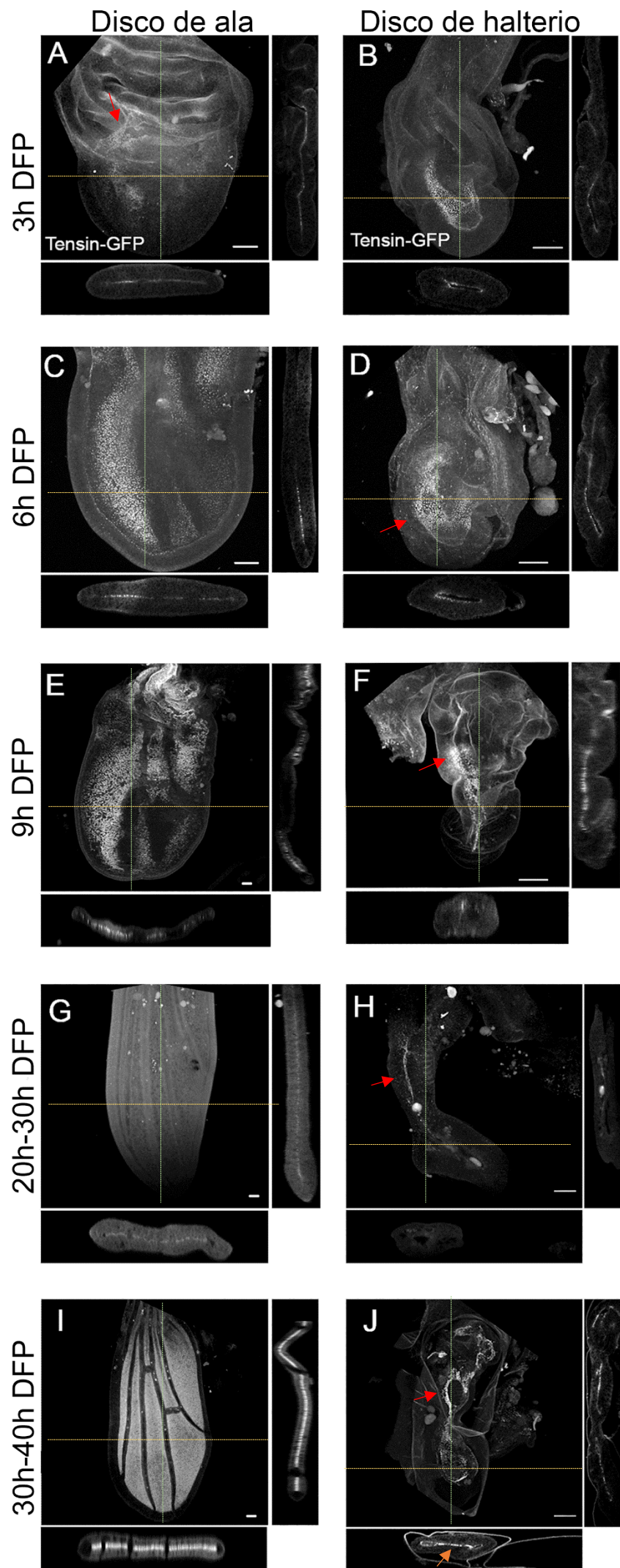
Figura 41. Distribución de Mys-GFP en discos de ala mutantes para el gen *bs*. En discos imaginales silvestres de 9h DFP, Mys-GFP se sitúa en la superficie basal de la unión de las capas dorsales y ventrales (A,A'), mientras que en el mutante para *bs* esta acumulación en la superficie basal no ocurre, no habiendo además adhesión dorso-ventral (B,B') (n=3). Entre las 20h y las 30h (D,D') (n=3) o 30h y 40h DFP (F, F') (n=4), en contraste con la situación silvestre (C,C', E,E'), no se observa expresión GFP y las superficies dorsal y ventral continúan sin adherirse). Tanto D' como F' están rodeados con una línea verde dibujada para indicar el contorno del disco. Los discos están marcados también con faloidina (Ph). Escala: 25 μ m

8. La expresión de la proteína Tensina está regulada negativamente por el gen *Ubx*.

Sabemos que las integrinas son responsables de la unión dorso-ventral de las superficies del ala durante la metamorfosis. Las integrinas se encargan de unir la membrana basal con el citoesqueleto de actina, pero no es una unión directa, sino que existen una serie de proteínas adaptadoras intracelulares que se encargan de esta conexión. Estas proteínas son las Proteínas Asociadas a Integrinas (IAPs) (Revisado en Green y Brown, 2019). Puesto que hemos mostrado que *mys* está regulado negativamente en el disco de halterio por el gen *Ubx*, quizás a través del gen *bs*, nos preguntamos si estas IAPs pudieran estar también reguladas por el gen *Hox* y tener un papel diferente en los discos de ala y halterio. Sin tener ninguna indicación de qué IAP pudiera tener mayor importancia en el proceso que estudiamos, elegimos la proteína Tensina, codificada por el gen *blistery (by)*, que está relacionada directamente con la unión de los epitelios dorsal y ventral en el desarrollo del ala, transformando las adhesiones focales en adhesiones fibrilares, mucho más estables (Torgler et al., 2004).

Primeramente, estudiamos la distribución de Tensina en los discos de ala y halterio en pupas silvestres (Fig. 42). Esta expresión ha sido estudiada únicamente en el disco de ala alrededor de las 50h DFP (Torgler et al., 2004), donde observaron acumulación de Tensina en el lugar de unión de las superficies dorsal y ventral. En nuestro estudio a las 3h DFP observamos en el disco de ala una expresión más abundante en el *hinge*, aunque comienza a aparecer señal en una parte del disco cercana al lumen (Fig. 42A).

Figura 42. Estudio comparativo de la expresión de la proteína Tensina en discos de ala y halterio durante la metamorfosis. (A, C, E, G, I) La expresión de Tensin-GFP en el disco de ala en la etapa de 3h DFP se sitúa principalmente en la zona del *hinge* (A, flecha roja) aunque empieza a verse una expresión más débil en la parte anterior del *pouch* (n=6). A las 6h DFP (C) se observa en disco de ala una distribución principalmente hacia la parte anterior del disco (n=5). A las 9h DFP (E) en disco de ala vemos cómo la expresión se acentúa en la parte anterior del disco, mientras que en el compartimento posterior es más débil (n=4). Entre las 20h y 30h DFP (G) la expresión de tensina está deslocalizada de la parte basal de las superficies dorso-ventral, pudiendo verse un principio de acumulación en la misma (n= 9). Entre las 30h y las 40h DFP (I), la expresión de Tensin-GFP se localiza principalmente en la superficie basal de las capas dorsal y ventral (n=10). (B, D, F, H, J) La expresión de Tensin-GFP en disco de halterio a las 3h DFP (B) se sitúa principalmente rodeando el lumen (n=6). A las 6h DFP (D) continúa rodeando el lumen pero la expresión se extiende hacia el presunto capitulo (flecha roja) (n=5). A las 9h DFP (F) apenas encontramos expresión en el capitulo, estando concentrada la proteína en la parte del presunto pedicelo (F, flecha roja) (n=4). Entre las 20h y las 30h DFP (H), se observa una expresión débil de Tensin-GFP en el presunto pedicelo del disco de halterio (H, flecha roja) (n=9), y entre las 30h y las 40h DFP (J) aparece expresión de Tensin-GFP en el capitulo (J, flecha naranja), mientras que la expresión en el presunto pedicelo se hace más evidente (J, flecha roja) (n=10). Se muestran secciones frontales, sagitales (a la derecha) y frontales (debajo) para cada disco y edad. Escala: 25 μ m.



A las 6h DFP la expresión de Tensin-GFP se localiza principalmente en una zona anterior (identificada morfológicamente) del *pouch* del disco (Fig. 42C), como lo hace a las 9h DFP (Fig. 42E). Una doble tinción con un anticuerpo contra Engrailed, expresado únicamente en el compartimento posterior, confirma esta zona de alta expresión como anterior (Fig. 43A). Entre las 10h y las 20h DFP no hay expresión de Tensina en el disco de ala (ni en el de halterio; no mostrado), ya que a partir de las 10-11 horas DFP comienza la etapa de separación de las superficies dorsal y ventral (Fristrom et al., 1993) y la Tensina se localiza únicamente en las zonas con adhesión focal estable (Fig. 8B). A las 20-30h DFP la expresión parece estar en todo el disco de ala (Fig. 42G). Por último a las 30h-40h DFP, Tensin-GFP se concentra en las zonas basales de las células situadas en las futuras intervenas, que es donde las adhesiones focales se han estabilizado (Fig. 42I). En el disco de halterio a las 3h DFP la expresión de la proteína se ubica únicamente en las células que rodean al lumen (Fig. 42B) y a las 6h DFP continúa viéndose expresión en esta región (Fig. 42D, flecha roja). A las 9h DFP la expresión se empieza a localizar más fuertemente en la región del presunto pedicelo (Fig. 42F, flecha roja). Entre las 20h y las 30h se puede apreciar una fina línea de expresión a lo largo de todo el presunto pedicelo (flecha roja) mientras que no hay expresión en la zona distal del disco (Fig. 42H). Por último entre las 30h y las 40h DFP, podemos observar una expresión débil de la proteína en el presuntivo capitelo (Fig. 42J, flecha naranja) y una mayor intensificación de la señal en la zona del presunto pedicelo (Fig. 42J, flecha roja). Estas expresiones, tanto la de ala como la de halterio, son similares a las expresiones estudiadas de *bs* y Mys-GFP, principalmente entre las 20h y las 40h DFP.

Resulta curioso cómo entre las etapas de 6h y 9h DFP, la línea Tensin-GFP se expresa en el compartimento anterior y no en el posterior del disco de ala de pupa temprana, lo que no pudimos observar al analizar la distribución de Mys-GFP. Por ello pensamos que quizás nuestro reportero Tensin-GFP podría no estar dando una señal que se correspondiera con la propia de la proteína. Para contrastar este hecho analizamos la distribución de otras dos IAPs en discos de ala de las mismas etapas. En este caso elegimos las proteínas Fermitin1-GFP y Fermitin2-GFP (Revisado en Green y Brown, 2019) (Fig. 43). Como se puede observar en la Figura, los discos de ala analizados para ambas proteínas tienen este patrón de expresión únicamente en el compartimento anterior y no en el posterior. Así pues, podemos concluir que, al menos las tres IAPs analizadas poseen este mismo patrón de expresión y por tanto Tensin-GFP es probablemente un reportero válido para el estudio de la distribución de esta proteína.

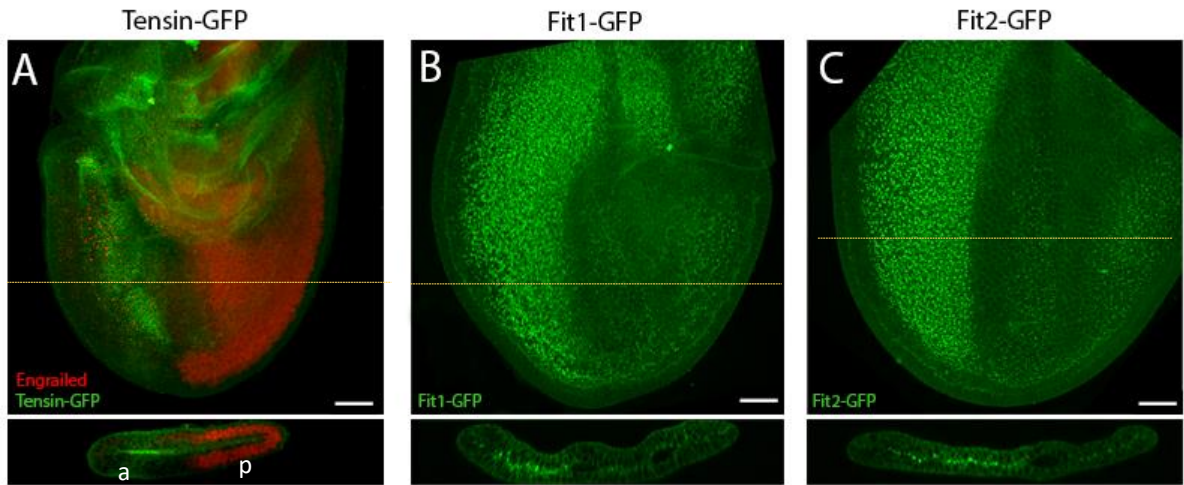


Figura 43. Estudio de la distribución de distintas IAPs en disco de ala de 6h-9h DFP. (A) Disco de ala de 6h DFP doblemente marcado con Tensin-GFP (en verde) y anti-Engrailed (en rojo, indica compartimento posterior, p) que muestra que Tensin-GFP se expresa fuertemente en compartimento anterior (a) (n=5). (B,C) Discos de ala de 9h DFP en los que se muestra la expresión de Fit1-GFP (B) y Fit2-GFP (C) en la parte anterior del disco (n=4 y n=2, respectivamente). Escala: 25 μ m.

Para confirmar que las diferencias de expresión de Tensina en los dos discos se deben a *Ubx*, analizamos la expresión de la proteína en mutantes *pbx/DfUbx*¹⁰⁹. Hemos seleccionado únicamente mutantes para las horas 30-40h DFP, ya que en pupa temprana la expresión en el disco de ala es más fuerte en anterior (donde en la combinación mutante el tejido es halterio), y a las 20h-30h, como hemos visto en el silvestre, la expresión de Tensina-GFP aún se está estableciendo.

Como vemos en la Figura 44, a las 30-40h DFP la expresión de Tensin-GFP en el compartimento anterior, halterio, se limita a una línea que iría desde el capitulo al pedicelo (Fig. 44A' flecha amarilla) y en el posterior, correspondiente a ala, se localiza en la parte basal de las células de intervena (Fig. 44A, A'). *Ubx*, por tanto, está regulando negativamente la expresión de Tensin-GFP.

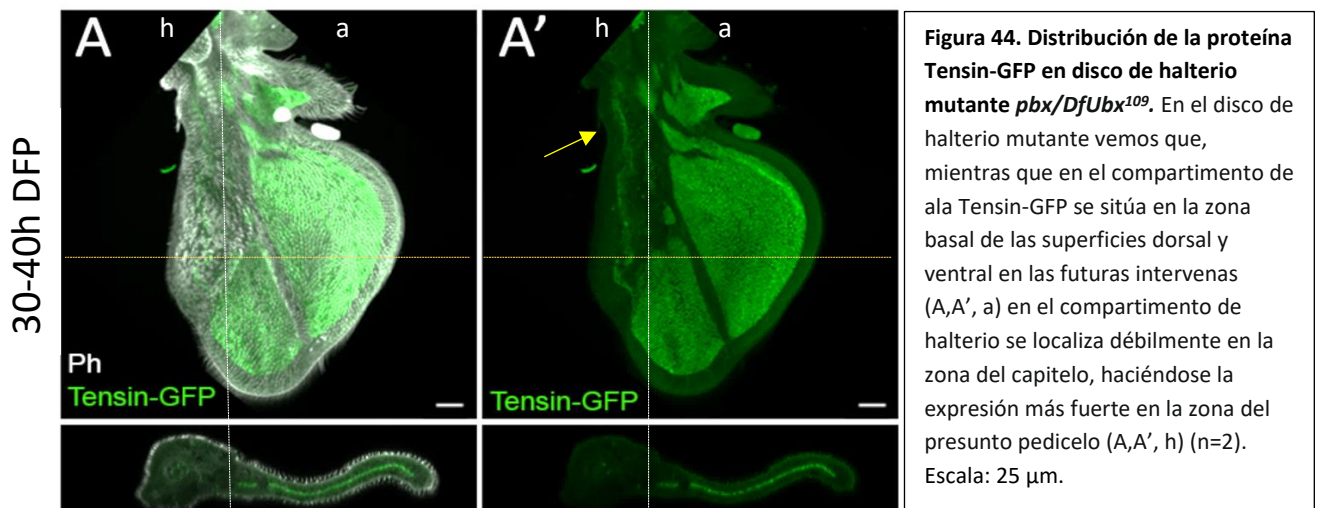


Figura 44. Distribución de la proteína Tensin-GFP en disco de halterio mutante *pbx/DfUbx*¹⁰⁹. En el disco de halterio mutante vemos que, mientras que en el compartimento de ala Tensin-GFP se sitúa en la zona basal de las superficies dorsal y ventral en las futuras intervenas (A,A', a) en el compartimento de halterio se localiza débilmente en la zona del capitulo, haciéndose la expresión más fuerte en la zona del presunto pedicelo (A,A', h) (n=2). Escala: 25 μ m.

9. La expresión de la proteína Tensina está regulada por DSRF.

El gen *Ubx* parece estar regulando la proteína Tensin-GFP. Decidimos también analizar la expresión de Tensin-GFP en mutantes para *bs*, ya que *Ubx* podría regular la proteína de manera indirecta a través del factor de transcripción DSRF. Como podemos observar en la Figura 45, en mutantes transheterocigóticos bs^{P1292}/bs^{14} no hay señal de Tensin-GFP a las 9h (B, B'), 20-30h (D, D') o 30-40h (F, F') DFP, en contraposición al individuo silvestre (A, A', C, C', E, E', respectivamente). Concluimos pues que *bs* regula la expresión de Tensin-GFP.

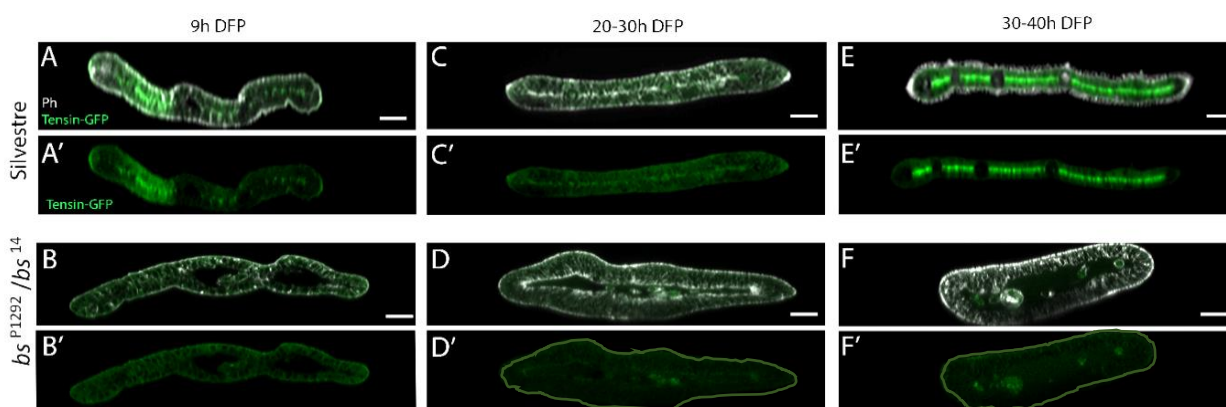


Figura 45. Distribución de la proteína Tensin-GFP en mutantes para el gen *bs*. (A,A', C,C, E,E'). Expresión de Tensin-GFP a las 9h DFP (A,A', mayor en la zona anterior del disco (n=4), 20-30h DFP (C,C', con distribución homogénea en todo el disco, n=9) y 30-40h DFP (E,E', mas concentrada en las zonas de adhesión) del individuo silvestre. (B,B, D,D', F,F'). En el mutante *bs* la expresión de Tensin-GFP está muy reducida o ausente (n=2, 3 y 2, respectivamente). Faloidina (Ph) está en blanco. D' y F' tienen una línea verde dibujada que rodea al disco para marcar el contorno. Escala: 25 µm.

10. El gen *mys* posee putativos sitios de unión para DSRF, mientras que *by* no.

Tras observar la expresión de las proteínas Mys-GFP y Tensin-GFP en mutantes para *bs*, quisimos saber si la regulación por parte del factor de transcripción pudiera ser directa o indirecta y para ello recurrimos a un análisis computacional. Recordamos que *bs* codifica para el factor de transcripción DSRF, perteneciente a la familia de factores de transcripción MADS, los cuales se caracterizan por tener una secuencia de unión al DNA del tipo MADS-box, muy conservada en todos los eucariotas. Este factor de transcripción DSRF es homólogo al factor de transcripción SRF de humanos, y al compararse los motivos MADS-box de ambos genes se vio que éstos comparten 53 de los 55 aminoácidos en la región de unión al ADN (Affolter et al., 1994).

Para nuestro estudio computacional, utilizamos la secuencia de unión del factor de transcripción SRF de humanos al ADN. Esta secuencia fue extraída de una base de datos de secuencias de unión a ADN de factores de transcripción (JASPAR).

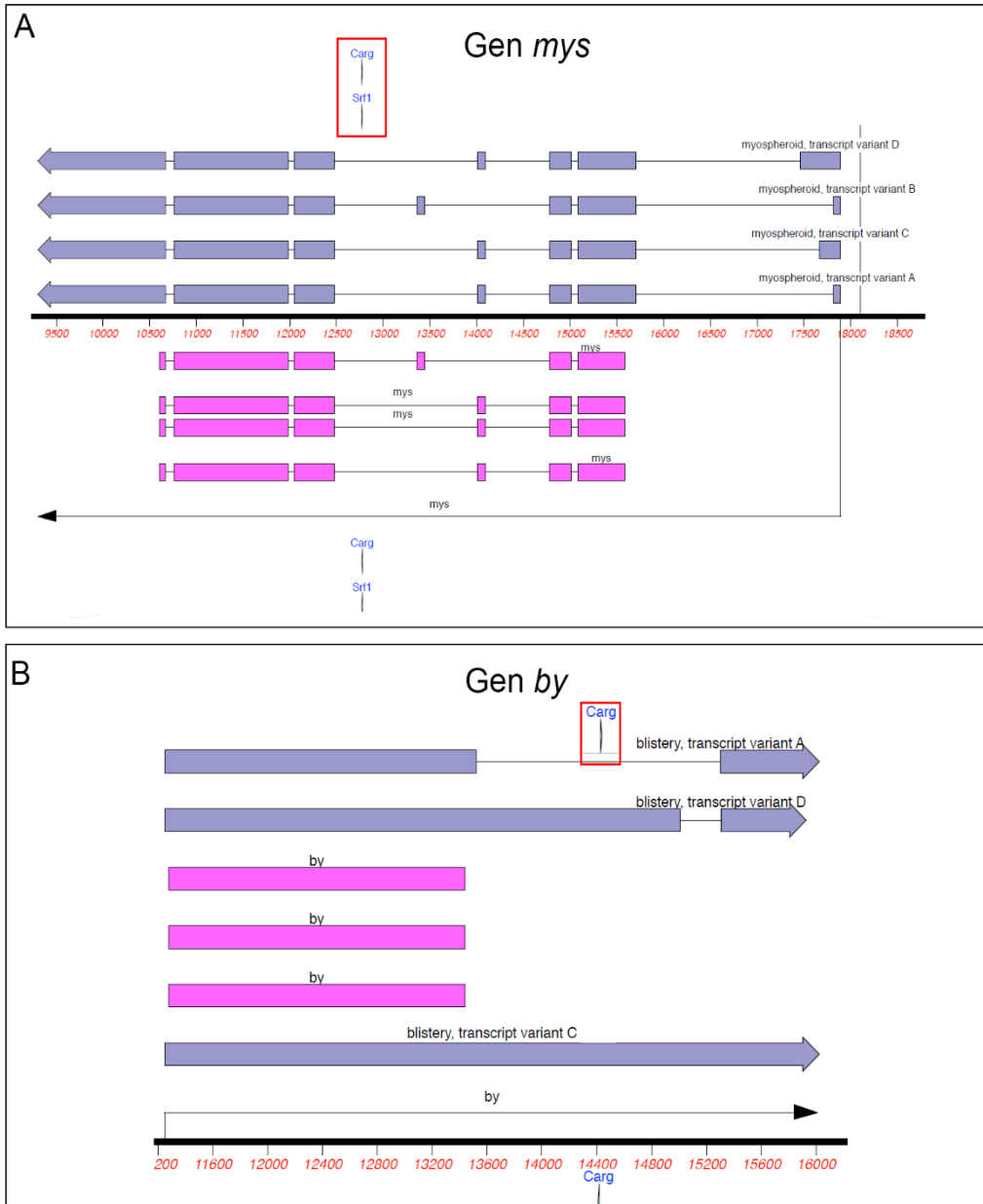


Figura 46. Estudio computacional de unión del factor de transcripción SRF en los genes *mys* y *by*. (A) Para el gen *mys* encontramos una secuencia de unión del factor de transcripción SRF, localizada en un intrón, en la cual coinciden Carg y Srf1. Esto sugiere que, aunque haya únicamente un sitio de unión, el gen *mys* podría estar regulado por el factor de transcripción DSRF. (B) Para el gen *by* encontramos solo un lugar de unión Carg, con lo que quizás es más probable que la transcripción del gen *by* no esté regulado por DSRF. En morado se encuentran los diferentes transcritos encontrados para estos genes (*flybase.org*), y en rosa la región codificante de los genes (CDS, coding sequence) (*flybase.org*).

Al haber en la secuencia pares de bases más y menos probables de formar parte de la secuencia consenso, de acuerdo con esta base de datos, decidimos utilizar las diferentes variantes de la secuencia para la búsqueda de posibles sitios de unión de la proteína DSRF y ampliar así las posibilidades de encontrarlos. Siendo la secuencia consenso obtenida para SRF CCATATATGG, utilizamos una secuencia que tuviera siempre las bases más conservadas (Fig. 16) y al resto le asignamos una base A o T aleatoriamente (en este caso sería CCWWATWWGG), y a esta secuencia la llamamos Carg. Por otro lado, establecimos una secuencia de unión del factor de transcripción con las bases más frecuentes de la matriz (CCATATATGG) pero que aleatoriamente cambiase una de ellas y a esta la llamamos Srf1. Analizamos pues la presencia de estas secuencias de unión de SRF en los genes *mys* y *by* (Fig. 46). En esta Figura se muestran en morado los posibles transcritos del ADN para cada gen analizado y en rosa las regiones codificantes para la proteína.

Para la secuencia del gen *mys*, aparece un putativo sitio de unión para Carg en un intrón, que coincide con una secuencia Srf1 lo cual hace más probable que exista una secuencia de unión para SRF. Esto indica que la proteína DSRF tiene probablemente una secuencia putativa de unión en el gen *mys* y, por tanto, podría regular directamente su transcripción (Fig. 44A). Si analizamos sin embargo la secuencia del gen *blistery* (que codifica para Tensina), observamos que únicamente tendría un sitio de unión Carg al ADN del gen, no coincidiendo con Srf1. Con la información obtenida parece que es más probable que DSRF no regule de manera directa la transcripción del gen *by* (Fig. 44B), aunque estos datos obtenidos, tanto en el caso de *mys* como de *by* deben ser confirmados mediante pruebas directas de unión de DSRF al ADN.

11. La expresión de *mys* se requiere en el capitulo del halterio a partir de las 35h-40h DFP.

Como hemos podido observar, parece que la expresión de Mys-GFP en la parte distal del disco de halterio es menor comparada con la del disco de ala durante las 9h-30h DFP. Sin embargo, un dato curioso que hemos observado es que hay expresión de Mys-GFP (y Tensin-GFP) en la zona presuntiva del capitulo alrededor de las 40h DFP y durante nuestro trabajo pudimos ver también que el lumen de esta región del disco de halterio en esa etapa del desarrollo no siempre era un espacio vacío. Por ello decidimos estudiar el desarrollo del halterio desde las 30h y analizar si la expresión de Mys-GFP pudiera tener alguna función (Fig. 47, Fig. 48). En este estudio pudimos observar que el disco de halterio pasa por una fase de adhesión que

comienza alrededor de las 30h DFP, donde una pequeña parte de las células que rodean el lumen comienza a acercarse (Fig. 47A, flecha amarilla) y así comenzará el contacto en algunas zonas (Fig. 47B, flecha amarilla).

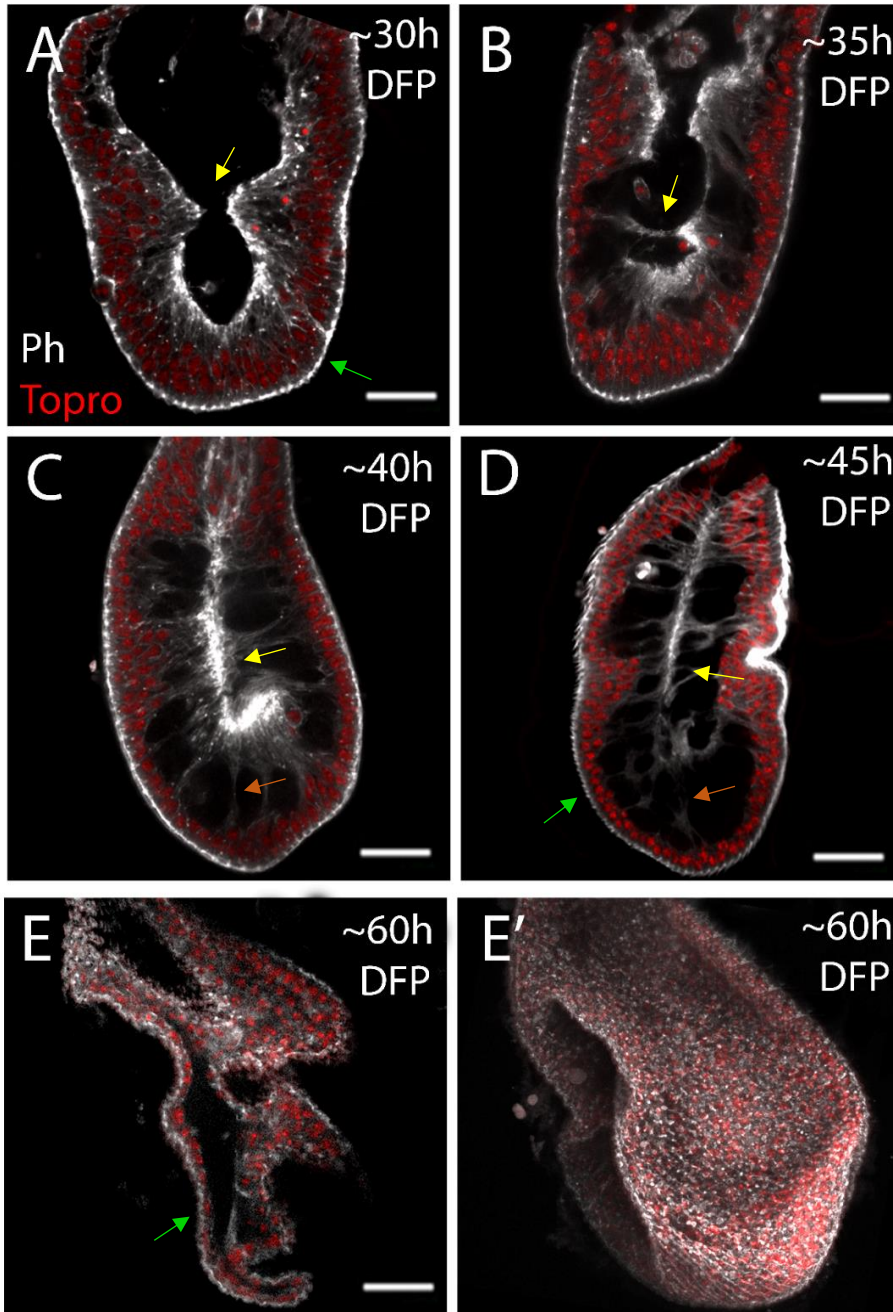
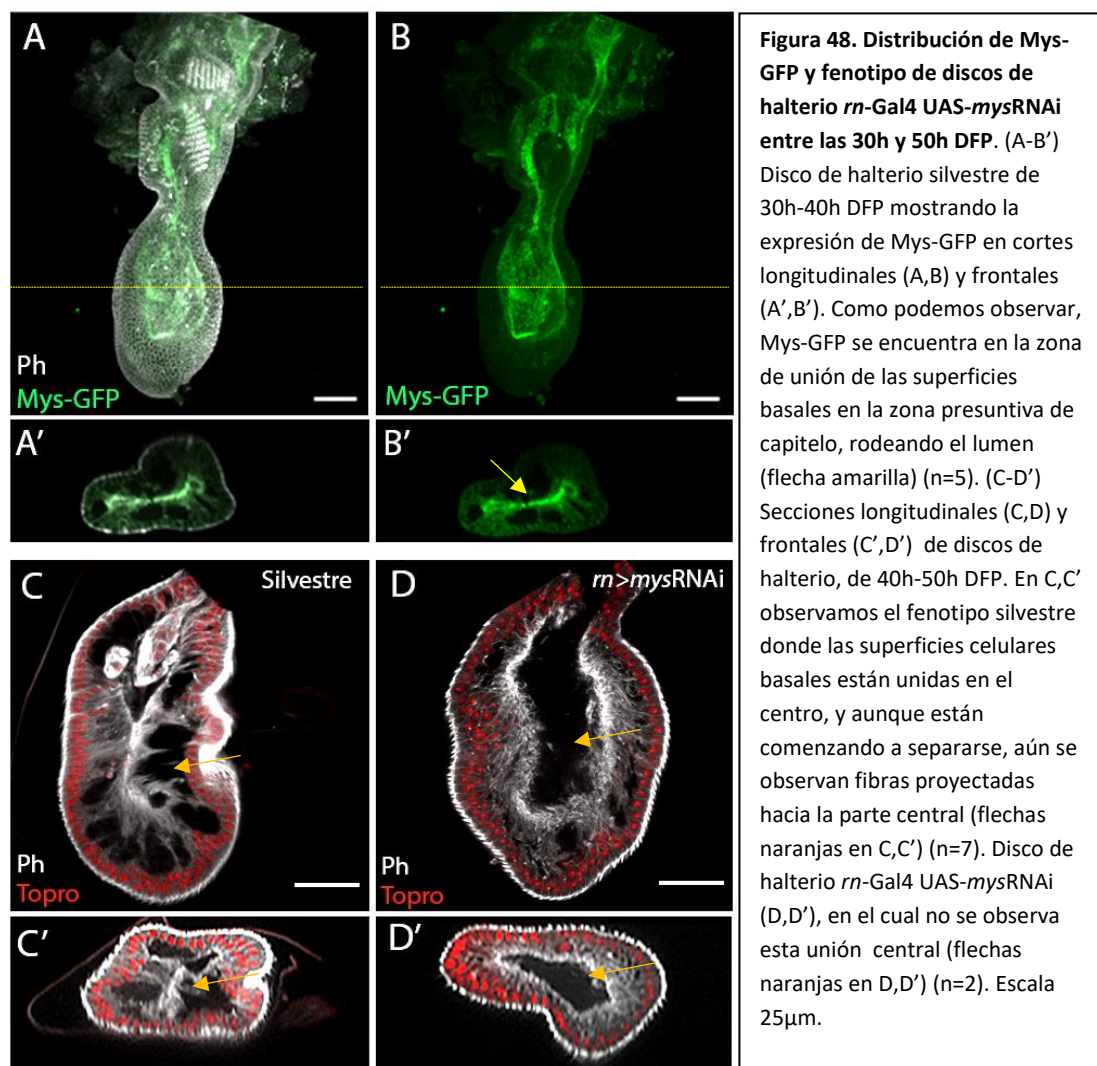


Figura 47. Estudio del desarrollo del capitulo del disco de halterio silvestre entre las 30h y las 60h DFP. (A-E) Cortes longitudinales del capitulo de halterio. (A) Alrededor de las 30h DFP comienzan a unirse las superficie basales (flecha amarilla) y el epitelio es pseudoestratificado (flecha verde). (B) Sobre las 35h DFP las uniones empiezan a hacerse efectivas en algunas zonas (flecha amarilla). (C) A las 40h DFP las superficies basales se han unido por completo en la zona central del presunto capitulo, habiendo una acumulación de actina en esta zona (flecha amarilla), y aparecen fibras de actina que parecen ir desde el epitelio hacia el centro (flecha naranja). (D) Sobre las 45h DFP, la acumulación de actina en la unión central se hace menos evidente (flecha amarilla), las fibras de actina que van del epitelio a la parte central parecen romperse (flecha naranja) y el epitelio se hace más fino, apareciendo zonas monoestratificadas (flecha verde). (E,E') Alrededor de las 60h DFP el lumen del halterio se encuentra sin actina, y el epitelio es completamente monoestratificado (flecha verde). En E' vemos una proyección del halterio completo para ver su forma final (n=4-7 casos para cada estadio). Escala 25µm.

Además es importante fijarse en que el tejido es pseudoestratificado inicialmente (Fig. 47A, flecha verde). Sobre las 40h DFP el contacto entre ambas superficies se ha realizado por completo, habiendo lo que parece una acumulación de actina en la parte central (Fig. 47C, flecha amarilla) y prolongaciones de actina finas que van desde las células de alrededor hacia

esta parte central (Fig 47C, flecha naranja). Alrededor de las 45h DFP la acumulación central de actina desaparece, y las prolongaciones de actina parece que empiezan a romperse (Fig. 47D, flecha naranja, comparar con C, flecha naranja). Finalmente sobre las 60h, el lumen aparece vacío, y la capa de tejido es completamente monoestratificada (Fig. 47E, flecha verde).

Para estudiar si las integrinas podrían estar involucradas en esta unión dorso-ventral en la zona distal del disco de halterio estudiamos esta unión en discos en los cuales reducimos la expresión de *mys* (*rn-Gal4 UAS-mysRNAi*) alrededor de las 45h DFP (Fig. 48).



En discos de genotipo silvestre de esta edad se ve, como describimos anteriormente, señal de Mys-GFP en la parte presuntiva del capitulo donde se estarían uniendo las superficies basales (Fig. 48A, B). En los discos mutantes parece no haber unión de ambas superficies, y no se

observan las fibras marcadas con faloidina (Fig. 48D, flecha naranja comparar con el silvestre en C, flecha naranja) sugiriendo que las integrinas se requieren para este proceso.

El hecho de que exista una cierta adhesión o conexión entre epitelios en la zona del capitulo del halterio a partir de las 35h-40h DFP nos hizo pensar que quizás este hecho se relacionara, no solo con la expresión observada de Mys-GFP y Tensin-GFP (y mucho más débil, de *bs*) en esta zona y tiempo (Figs. 35J, 38J y 42J) sino también con una función menor de *Ubx* (que no reprimiría completamente la expresión de estos genes). Nosotros decidimos realizar un estudio para saber en qué momento se deja de requerir *Ubx* para la morfología del capitulo del halterio, es decir, en qué momento al eliminar *Ubx*, el halterio mantiene su forma globosa. Utilizamos el promotor *rn-Gal4* con *UAS-dsUbx Df¹⁰⁹* y además utilizamos *tub-Gal80^{ts}* para controlar los tiempos en los que eliminábamos *Ubx* mediante la transferencia de pupas de distintos momentos del desarrollo de 17°C a 29°C (Fig. 50).

Como vemos en la Figura 49, al realizar el cambio de temperatura en la etapa de larva III tardía, el halterio aparece de un tamaño mayor que el control, pero plano (Fig. 49B, B', comparar con el control en A). Si realizamos el cambio de temperatura a las 24h DFP a 17°C que correspondería aproximadamente a 12h DFP a 25°C, el halterio es de un tamaño solo algo mayor que el control, pero sigue apareciendo plano (Fig. 49C, C'). A las 48h DFP a 17°C que corresponde aproximadamente a 24h DFP a 25°C, sin embargo, la mayor parte de los halterios tienen tamaño y forma semejante al control (Fig. 49D). La ausencia de requerimiento de *Ubx* puede ser, sin embargo, más tardía, ya que la actividad se elimina probablemente varias horas después del cambio de temperatura.

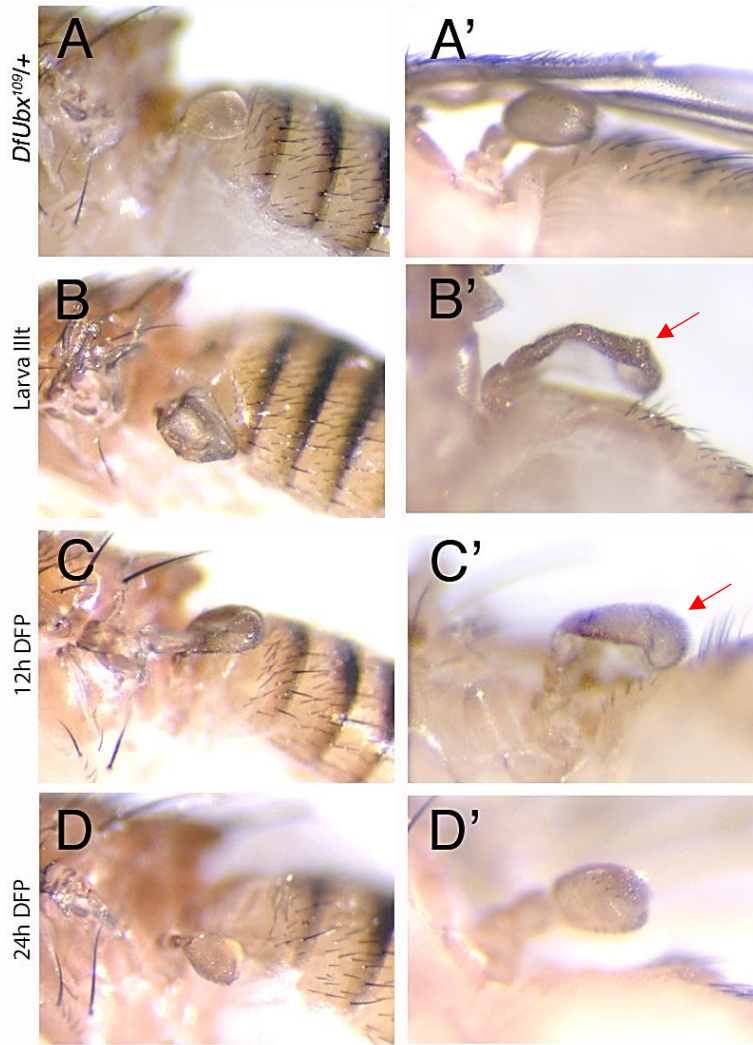


Figura 49. Estudio del requerimiento del gen *Ubx* para la forma del halterio. (A) Utilizamos como control el fenotipo del mutante *DfUbx¹⁰⁹*, (siendo el experimental *rn-Gal4 UAS-dsUbx Df109*) que presenta un tamaño mayor al halterio silvestre (n=10). (B) Al realizar el cambio de temperatura de 17°C a 29°C en la etapa de larva III tardía, el halterio tiene un tamaño mayor comparado con el control (A compárese con B) pero tiene forma plana (B', flecha roja) (n=16). (C) Al realizar el cambio de temperatura de 17°C a 29°C a las 24h DFP que correspondería a 12h DFP a 25°C, el halterio es más grande que el control (C compárese con A) pero menos comparado con (B), y sigue siendo plano (C', flecha roja) (11/16). (D) Al realizar el cambio de temperatura a las 48h DFP que correspondería a 24h DFP a 25°C, el halterio tiene forma globular y tamaño similar al control (D, D' compárese con A, A') (17/19). Los paneles A'-D' no son ampliaciones de A-D, sino tomados de otros ejemplares con la orientación adecuada de los halterios.



Discusión

El gen homeótico *Ubx* es uno de los genes mejor caracterizados como regulador de elementos implicados en la morfogénesis, ya que su expresión es necesaria y suficiente para especificar la forma del halterio en contraposición a la del ala (Lewis, 1963, 1978; White y Akam, 1985). Aunque se han identificado varios genes diana de *Ubx*, el cómo cada elemento contribuye a determinar la forma, tamaño y estructura del halterio aún no está descrito en su totalidad. Al ser *Ubx* necesario para diferenciar los dos apéndices, el estudio de su actividad es un factor importante para saber qué elementos están interactuando en la organogénesis de ala y halterio.

En esta Tesis hemos caracterizado algunos elementos que determinan cómo *Ubx* está controlando la formación del halterio para adquirir forma globular frente a forma plana del ala. En primer lugar, hemos descrito que la presencia de *Ubx* controla la dinámica de la membrana basal en el lumen de halterio en etapa de pupa temprana a través de la regulación, probablemente directa, del gen que codifica para la Metaloproteasa 1 (*Mmp1*). Esta regulación determina en gran medida la expansión y aposición observada en el lumen de ala y contribuye quizás a dar la forma globular que el halterio posee al final de la metamorfosis.

Ubx y la regulación de la dinámica de la membrana basal.

Estudios previos han demostrado la presencia de la proteína Colágeno IV y otros elementos de la membrana basal en el disco imaginal de ala en la etapa de pupa (Fristrom et al., 1993; Murray et al., 1995). Utilizando líneas *protein trap* con GFP para observar la dinámica de la membrana basal durante la etapa de pupa temprana, hemos mostrado que tanto Colágeno como Perlecán se eliminan del lumen del disco de ala durante las primeras 9h DFP debido a la actividad de la proteína *Mmp1*. Sin embargo, en el disco de halterio los niveles de elementos de la membrana basal analizados permanecían estables debido a una regulación negativa del gen *Mmp1* por parte de *Ubx* en esta etapa de pupa temprana. La contribución de la proteína *Mmp2* a la diferente regulación de la dinámica de la membrana basal en los discos de ala y halterio, dada su localización en ambos, es probablemente menor, aunque no se ha realizado un estudio exhaustivo para comprobarlo. Otro factor que nos hace pensar que *Mmp2* está implicada en otro proceso diferente a la eliminación de la MB en la zona del *pouch* del disco de halterio es que en el trabajo de Pavlopoulos y Akam, 2000 indican que los niveles de *Mmp2*

aumentan, junto con los de *Timp*, al expresar ectópicamente *Ubx* en disco de ala, mientras que los de *Mmp1* bajan. Sin embargo, hay que señalar que el estudio de los niveles de *Mmp2* lo realizan solo en discos de larva III. Tanto para *Timp* como para *Mmp1* hemos comprobado en esta Tesis que están relacionados con la dinámica de la membrana basal y la organogénesis, pero el papel de *Mmp2* es quizás menor y no está tan bien definido. Hemos demostrado también que *Ubx* activa la expresión de *Timp* en el disco de halterio, lo que contribuye a inactivar las *Mmps* y mantener la membrana basal en pupa temprana.

También hemos comprobado que la presencia de la membrana basal provoca en las células una morfología columnar, frente a la forma isodiamétrica que adquieren al eliminarla. Estos resultados son consistentes con estudios previos, en los cuales se muestra que la membrana basal constriñe las células dando lugar a su forma columnar, y un epitelio pseudoestratificado, y que al eliminarla ocurre una transición hacia epitelio cuboidal y una expansión del tejido (Domínguez-Jiménez et al., 2007; Pastor-Pareja y Xu, 2011). Este hecho es el que observamos en disco imaginal de ala silvestre durante la etapa de pupa temprana. Así pues, la eliminación rápida de la membrana basal en el disco imaginal de ala conduce a dos eventos: primero, el tejido se expande y la forma celular cambia de epitelio columnar a cuboidal; segundo, las superficies dorsal y ventral se aponen. Si se elimina en el disco de ala la expresión o actividad de *Mmp1* sobreexpresando *Ubx* o *Timp* (que también inactiva *Mmp2*), el Colágeno IV no se degrada, y no hay aposición dorso-ventral ni expansión, haciendo que el disco de ala se desarrolle de manera similar al disco de halterio (Fig. 28).

Ubx, regulación de la matriz extracelular y forma de los apéndices.

Hemos encontrado una relación entre actividad de *Mmp1* y forma de los apéndices dorsales. Si sobreexpresamos *Mmp1* obtenemos un fenotipo adulto con halterios más aplanados y alargados y alas arrugadas. Si esta sobreexpresión se lleva a cabo en diferentes tiempos desde la etapa de larva III a 9h DFP, el fenotipo de halterio más aplanado se observa al sobreexpresar *Mmp1* en la etapa de larva III temprana. De manera contraria, si reducimos la actividad de *Mmp1* (y *Mmp2*) a través de la sobreexpresión de *Timp*, los halterios son más redondeados y las alas adquieren también una morfología más globosa. Estos fenotipos se observan tanto en ala como en halterio únicamente si se expresa *Timp* antes de las 12h DFP. Así pues, estos resultados coinciden hasta cierto punto con los obtenidos con *Mmp1*, mostrando que *Timp* está actuando durante la etapa de larva III tardía-pupa temprana, momento en el que *Mmp1*

regula la presencia de Vkg-GFP. Sin embargo, el momento en que la expresión de *Mmp1* ejerce mayor efecto en la morfología del halterio es en una etapa anterior.

El papel de la MB en la correcta morfogénesis de órganos ya se había observado en otros trabajos, como en Pastor-Pareja y Xu, 2011, donde estudiaban en *Drosophila* el efecto producido por la ausencia del Colágeno IV en la organogénesis del disco de ala, las glándulas salivales y el sistema nervioso central en larva III. También se ha estudiado cómo las propiedades mecánicas de la membrana basal proporcionan la forma a los folículos de *Drosophila* (Crest et al., 2017). Pero el papel de la MB en organogénesis no se limita únicamente a este organismo modelo, ya que se ha demostrado que la deposición y degradación de la MB juega un papel clave en la morfogénesis de ramificaciones epiteliales en diversos órganos de mamíferos, como son las tráqueas pulmonares o los ductos de las glándulas salivares, entre otros (Varner y Nelson, 2014).

Además de la matriz extracelular basal, se han descrito proteínas de la matriz extracelular apical, como Dumpy, que contribuyen al mantenimiento de la forma celular columnar en el disco de ala en pupa temprana. Estas proteínas también se eliminan en este estadio en ala pero no en halterio y este proceso también depende de *Ubx* (Díaz-de-la-Loza et al., 2018).

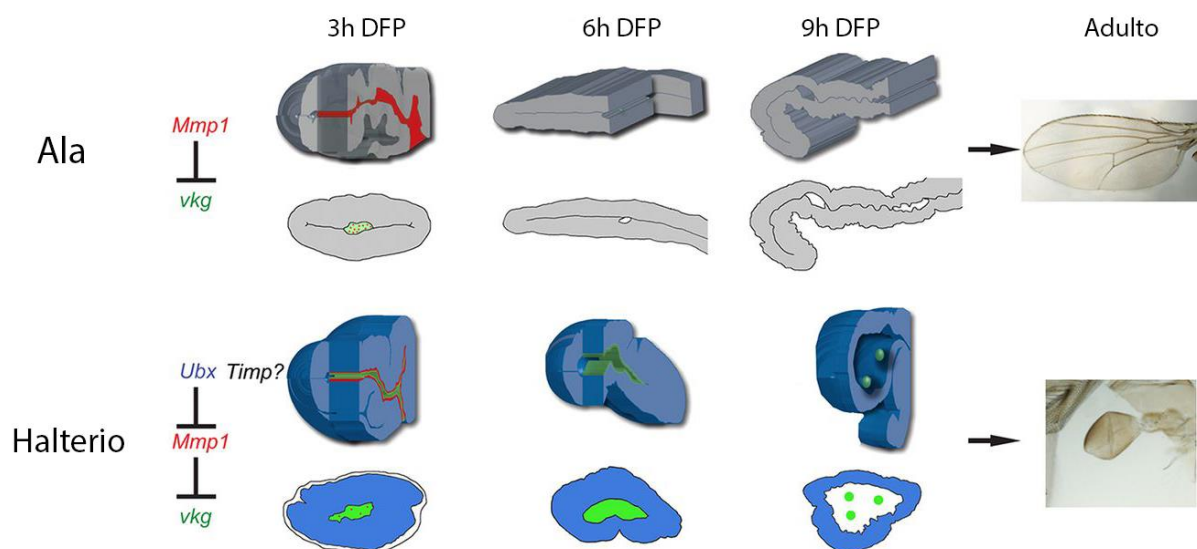


Figura 50. Esquema de la regulación de la dinámica de la MB en ala y halterio. Esquema simplificado del desarrollo de los discos de ala y halterio y el papel del gen *Ubx* en el disco de halterio. En el *pouch* de ala, la expresión de *Mmp1* a las 3h DFP degrada Vkg-GFP y permite el desarrollo del ala plana. En el *pouch* del halterio, *Ubx* regula negativamente la expresión de *Mmp1* a las 3h DFP, y por tanto Vkg-GFP no se degrada. Por esta razón, la expansión del disco y la aposición de sus superficies dorsal y ventral, observadas en el disco de ala, no ocurren. *Timp* probablemente esté regulado positivamente por el gen *Ubx* en el *pouch* del halterio colaborando en este proceso.

Dinámica de la expresión de Integrinas y proteínas asociadas en los discos pupales de ala y halterio.

Nuestros resultados mostraban que la eliminación de la membrana basal en el disco de halterio no era suficiente para cambiar su morfología a la de un disco con aposición de superficies dorsal y ventral. Eso nos llevó a estudiar la expresión de integrinas, dado el papel que desempeñan las mismas en la adhesión de las superficies dorsal y ventral del ala (Brower y Jaffe, 1989), en el disco de halterio. En el disco de ala se distribuyen de forma complementaria las integrinas PS1, en la superficie dorsal, y PS2, en la ventral (Brower et al., 1984). En el disco de halterio, en la etapa de larva III, estas integrinas siguen la misma distribución que en el disco de ala. Sin embargo, en la etapa de pupa temprana, que es cuando ocurre la etapa de adhesión dorso-ventral en el disco de ala, la expresión de PS2 disminuye de forma significativa en la parte distal del disco de halterio, y se localiza a las 9h DFP únicamente en la parte del presunto pedicelo. La distribución de PS2 en el disco de halterio fue estudiada en Roch y Akam, (2000) donde analizaban únicamente las etapas de 6h DFP y 44h-48h DFP. A las 6h DFP veían expresión en todas las células de la parte ventral del capitelo, a diferencia de nosotros, que vemos una expresión que no cubre toda la superficie ventral. A las 44h-48h observaban expresión en la superficie ventral basal del capitelo, donde decían que se unía a la matriz extracelular central, y también vieron, como nosotros, expresión en la parte del presunto pedicelo donde decían había unión entre las superficies dorsal y ventral.

Así pues, después del estudio realizado creemos que la represión de la expresión de PS2 por parte de *Ubx* podría tratar de alguna manera de asegurar que no haya adhesión entre sus epitelios en caso de un acercamiento de las superficies dorsal y ventral de halterio, por ejemplo, por una reducción en Colágeno IV en la parte del capitelo. De esta manera, tanto la regulación de la degradación de Colágeno IV como de la expresión de PS2 asegurarían que en el disco de halterio no se apongan y adhieran las superficies dorsal y ventral, como ocurre en el disco de ala, contribuyendo así a que la forma final del apéndice no sea plana.

Posteriormente a las 9h la expresión de integrinas (Mys-GFP) disminuye en el disco de ala, quizás debido a la separación de epitelios dorsal y ventral que ocurre en ese momento y reaparece más tarde en la zona de intervenas, donde se unen las dos superficies (Fristrom et al., 1993) siendo indispensables para mantener la unión dorso-ventral del ala y su forma plana. En el disco de halterio desaparece la expresión de integrinas en la parte distal tras las primeras

horas de pupación, al menos hasta las 30-40h DFP, sugiriendo que *Ubx* reprime esta expresión para impedir la unión de epitelios dorsal y ventral.

Curiosamente, aunque la expresión de integrinas (*Mys*-GFP) en la zona presuntiva de capitulo desaparece tras las 6h DFP, reaparece hacia las 30-40h DFP. Quizás haya una relación entre esta expresión, la adhesión entre superficies del disco y la forma final del halterio, aunque nuestros experimentos no permiten una conclusión definitiva. Hemos visto que el disco de halterio sufre unas uniones entre epitelios en la etapa que coincide aproximadamente con la adhesión II del disco de ala, hacia las 40h DFP (Fristrom et al., 1993) y además tras esta etapa el epitelio pasa de ser pseudoestratificado a monoestratificado, hecho que posiblemente esté relacionado con esta unión y separación. Esta unión y separación posterior podría contribuir a dar la forma final globular del halterio, ya que antes de formarse estas uniones el capitulo del disco presenta una forma más bien rectangular, y al final del proceso, es más redondeado. Roch y Akam (2000) como hemos comentado anteriormente veían que la integrina PS2 se encontraba en la superficie ventral del presunto pedicelo y de una parte del capitulo entre las 44h y las 48h DFP. Decían que su presencia era para unir la superficie ventral del disco con la matriz central del futuro capitulo. Sin embargo, según nuestras observaciones son los epitelios dorsal y ventral del disco de halterio los que se unen en la parte central del lumen, para luego separarse, rompiendo los puentes de actina creados en la unión. El disco de halterio presenta en este estadio una morfología que hace difícil determinar las superficies dorsal y ventral. Aunque no hemos hecho una tinción con un marcador dorsal, como *apterous-lacZ*, creemos que son efectivamente los epitelios dorsal y ventral los que muestran unas uniones marcadas con faloidina que luego desaparecen. Este hecho coincide temporalmente con la reanudación de la expresión de *Mys*-GFP en el pouch del disco de halterio, y con una expresión débil de *bs-LacZ* en un grupo de células de esta región. La reducción de la expresión de *mys* impide esta unión dorso-ventral y produce halterios ligeramente más aplanados, sugiriendo quizás una relación entre expresión tardía de *mys* y morfología, aunque no sabemos si el fenotipo adulto se debe a la expresión de este gen en las 30-40h DFP o en algún otro momento del desarrollo, ni podemos explicar por qué la unión entre las superficies dorsal y ventral se requeriría para la forma final del apéndice (si es así). Haría falta quizás inactivar integrinas con otros RNAsi o mutantes, y ver si el halterio se modifica de la misma forma y determinar el momento en que se requiere *mys* para este fenotipo.

Como ya sabemos, las integrinas se encargan de comunicar la membrana basal con el citoesqueleto de actina, y lo hacen a través de una red de proteínas llamadas Proteínas

Asociadas a Integrinas (IAPs), como la Tensina. La expresión de Tensin-GFP se asemeja a la de Mys-GFP en varias características en ambos discos: en el disco de ala, expresión en zonas de presuntas intervenas en las 30-40h DFP; en el disco de halterio, fuerte señal en la zona presuntiva del pedicelo y reaparición de la señal en la zona presuntiva del capitulo hacia las 30-40h DFP. Sin embargo, una diferencia notable es que Tensin-GFP (y otras dos IAPs) se dispone en el disco de ala de manera diferente en los compartimentos anterior y posterior hacia las 6-9h DFP. Hacia las 10h DFP el disco de ala comienza una etapa de separación dorso-ventral, y dado que Tensina se localiza en estructuras donde se necesiten adhesiones focales maduras, quizás se necesita que la adhesión no sea tan robusta en algunas zonas para comenzar esta separación, pero no sabemos por qué debería ser uno u otro compartimento.

Ultrabithorax, blistered y regulación de Integrinas y Tensina.

Con todos los experimentos realizados podemos plantear la siguiente hipótesis de regulación por *Ubx* de *bs*, integrinas y Tensina (Fig. 51). *Ubx* regula negativamente la transcripción del gen *bs* en el disco de halterio. *bs* codifica para el factor de transcripción DSRF, y se sabe que inhibe al gen *rhomboid* en las zonas de intervena en el disco de ala, el cual a su vez determina la formación de venas (Fristrom et al., 1994). En este estudio demostramos además que *bs* regula positivamente, posiblemente de manera directa, la transcripción de *mys* en la parte distal del disco de ala. Por otro lado, *bs* también regula positivamente la expresión del gen *by*, aunque el estudio computacional sugiere que podría ser de forma indirecta.

Lo que no entraría dentro de nuestra teoría sería por qué en el mutante *bs* el halterio tiene forma globular (silvestre) y en el individuo *rn-GAL4 UAS-mysRNAi*, en el que se elimina *mys*, forma algo aplanada, si *bs* regula *mys*. Esto podría ser a causa de que los mutantes *bs* utilizados son hipomorfos (la combinación amorfa utilizada para estudiar los discos no llega a adulto), no eliminando por tanto completamente la expresión de *bs*. También intentamos utilizar una línea *UAS-bs-RNAi*, para poder controlar la expresión de *bs* en espacio y tiempo y eliminar su expresión únicamente en los discos ala y halterio, evitando así la muerte del individuo antes de la eclosión. Sin embargo, no obtuvimos fenotipo ni en ala ni en halterio. Una forma de comprobar si el factor de transcripción *bs* está regulando *mys* en este proceso en disco de halterio, sería observar si la expresión de *mys* hacia las 30-40h DFP se elimina en mutantes *bs* y si en estos mutantes hay adhesión dorso-ventral en el disco de halterio en esta etapa.

También puede ser que *Ubx* regule *mys* independientemente de *bs* en esta etapa. Hemos visto que la actividad de *Ubx* para mantener el halterio globoso se requiere como mínimo hasta aproximadamente las 24h DFP. Hay que tener en cuenta para evaluar estos datos, que hemos estudiado el requerimiento de *Ubx* con experimentos de cambio de temperatura utilizando *tub-Gal80^{ts}*. Por ello habría que contar con el tiempo que tarda la proteína Gal4 en degradarse, el tiempo que tarda en transcribirse el UAS RNAi y eliminar *Ubx*, que a su vez depende del promotor Gal4 utilizado, y la estabilidad de la proteína *Ubx* presente al iniciar el cambio de temperatura (unas pocas horas, según Roch y Akam, 2000). Si tras unas horas después del cambio de temperatura a las 24h DFP, *Ubx* deja de estar activo quizás *mys* se vuelva a expresar, como vemos hacia las 30-40h DFP. La expresión de *bs-lacZ* en este momento, en la parte presuntiva de capitelo, es muy débil, menor que la que vemos de *Mys-GFP* o *Tensin-GFP*. Quizás *bs-lacZ* no refleje totalmente la expresión de *bs* en este momento o no se pueda mantener la expresión incluso si *Ubx* no está activo.

Está publicado (Roch y Akam, 2000) que *Ubx* se expresa en el disco de halterio durante el desarrollo pupal pero que la diferenciación celular característica del disco de halterio, distinta a la que ocurre en el disco de ala, no depende de *Ubx* durante pupa. Sin embargo, en este trabajo no se analizó si la forma general del disco requiere la presencia de *Ubx* durante este periodo. En nuestros experimentos hemos visto que la forma globular del halterio requiere *Ubx* hasta al menos 24h DFP, que esta forma requiere preservar la MB en las primeras horas de la pupación, inactivando *Mmps*, y quizás la actividad de integrinas y proteínas asociadas en estadios posteriores.

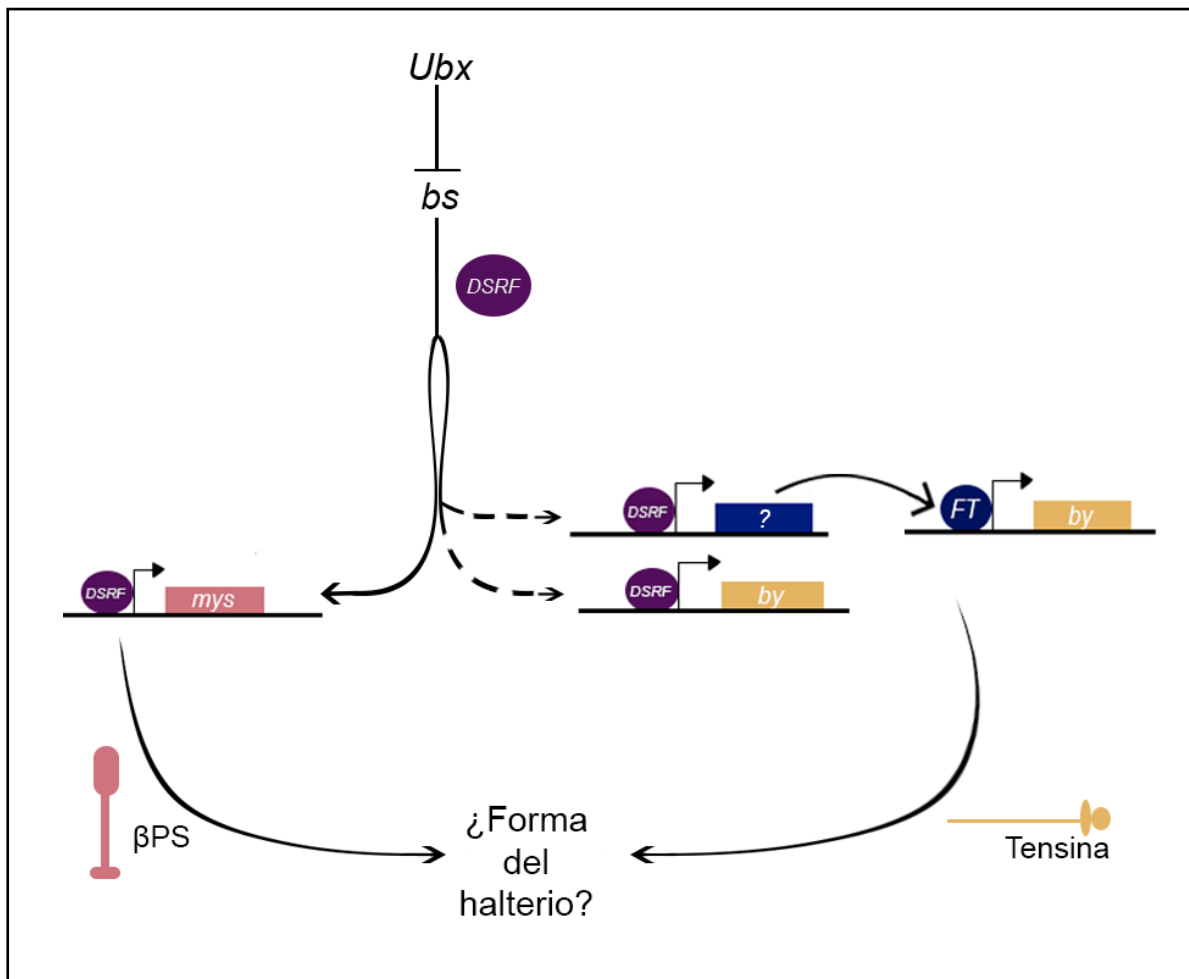


Figura 51. Esquema de la regulación de genes implicados en adhesión por el gen Hox *Ultrabithorax*. *Ubx* en halterio regula negativamente al gen *bs*, que codifica para el factor de transcripción DSRF. Este a su vez regularía la transcripción de dos genes, el gen *mys* y el gen *by*, a este último directa o indirectamente a través de la regulación de otro factor de transcripción (FT). El gen *mys* codifica la proteína β PS, y el gen *by* codifica para la proteína Tensina, ambas implicadas en la generación y estabilización de adhesiones focales.

Conclusiones/Conclusions

1. El disco de halterio no sufre aposición ni adhesión de sus superficies dorsal y ventral durante la etapa de pupa temprana, al contrario de lo que ocurre en el disco de ala, debido a la expresión del gen *Ultrabithorax*.
2. Las proteínas que componen la membrana basal se degradan más tarde en el disco de halterio que en el disco de ala durante la etapa de pupa temprana, debido a la expresión del gen *Ultrabithorax*.
3. La expresión de la Metaloproteasa 1, que degrada a los componentes de la membrana basal, está regulada de manera negativa en el disco de halterio por el gen *Ubx* en la etapa de pupa temprana. La expresión del inhibidor de Metaloproteasas (*Timp*), en cambio, está regulada de forma positiva. Estas regulaciones hacen que la membrana basal persista más horas en el disco de halterio que en el de ala.
4. La expresión ectópica de Metaloproteasa 1 en el disco de halterio produce halterios algo más alargados y aplanados que en el individuo silvestre, mientras que la inactivación de las dos Metaloproteasas en el disco de ala, al expresar *Timp*, produce alas globosas y algo más pequeñas.
5. La proteína β PS codificada por el gen *mysospheroid* (*mys*) y la proteína Tensina codificada por el gen *blisterly* (*by*) se localizan de manera diferente en la parte distal de los discos de ala y halterio en la etapa de pupa, habiendo menos expresión en el disco de halterio.
6. El factor de transcripción Drosophila Serum Response Factor (DSRF) codificado por el gen *blistered*, no se expresa, o lo hace muy débilmente, en la parte distal del disco de halterio durante la pupación. En el disco de ala este factor regula positivamente la transcripción de los genes *mysospheroid* y *blisterly*.
7. *blistered*, *mysospheroid* y *blisterly* están regulados negativamente por el gen *Ultrabithorax*.

1. The haltere disc dorsoventral layers do not go under apposition nor adhesion process during the early pupa stage because of the *Ultrabithorax* gene expression.
2. The proteins that compound the basal membrane degrade later in haltere pouch imaginal disc compare to wing disc during the early pupa stage, because of the *Ultrabithorax* gene expression.
3. The expression of Metalloprotease 1, which degrades basal membrane components, is downregulated in the haltere imaginal disc by the *Ubx* gene in the early pupa stage. Nevertheless, the expression of *Tissue Inhibitor of Metalloproteases (Timp)* gene is upregulated in haltere imaginal disc. Because of these regulations, the basal membrane perdure more in the haltere disc than in the wing disc.
4. The ectopic expression of Metalloprotease 1 in the haltere imaginal disc produce halteres more elongated and flatter than in the wild type, while the inactivation of the two Metalloproteases in the wing disc, because of the overexpression of *Timp*, produce bloated and more little wings.
5. The β PS protein coded by *mysospheroid (mys)* gene and Tensin protein coded *blistery (by)* gene are localized in a different pattern in the distal part of the wing and haltere imaginal discs in pupal stage, finding less protein expression in the haltere disc.
6. The Drosophila Serum Response Factor (DSRF) coded by *blistered* gene is barely expressed in the distal part of the haltere disc during the pupal stage. This factor in the wing upregulates the transcription of *mysospheroid* and *blistery* genes.
7. *blistered*, *mysospheroid* and *blistery* genes are downregulated by the *Ultrabithorax* gene.

Bibliografía

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Craig Venter, J. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287(5461), 2185–2195.
- Affolter, M., Montagne, J., Walldorf, U., Groppe, J., Kloter, U., LaRosa, M., & Gehring, W. J. (1994). The *Drosophila* SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Development*, 120(4), 743–753.
- Akam, M. (1987). The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. In *Development* (Vol. 101, Issue 1, pp. 1–22).
- Aldaz, S., Escudero, L. M., & Freeman, M. (2010). Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14217–14222.
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila. A laboratory handbook*.
- Baker, A. H., Edwards, D. R., & Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: Biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*, 115(19), 3719–3727.
- Bantignies, F., & Cavalli, G. (2006). Cellular memory and dynamic regulation of polycomb group proteins. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 275–283).
- Beachy, P. A., Helfand, S. L., & Hogness, D. S. (1985). Segmental distribution of bithorax complex proteins during *Drosophila* development. *Nature*, 313(6003), 545–551.
- Bender, W., Weiffenbach, B., Karch, F., & Peifer, M. (1985). Domains of cis-interaction in the bithorax complex. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 50, 173–180.
- Blair, S. S. (2007). Wing Vein Patterning in *Drosophila* and the Analysis of Intercellular Signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 293–319.
- Borchiellini, C., Coulon, J., & Le Parco, Y. (1996). The function of type IV collagen during *Drosophila* muscle development. *Mechanisms of Development*, 58(1–2), 179–191.
- Brabant, M. C., Fristrom, D., Bunch, T. A., & Brower, D. L. (1996). Distinct spatial and temporal functions for PS integrins during *Drosophila* wing morphogenesis. *Development*, 122(10), 3307–3317.
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401–415.
- Breen, T. R., & Harte, P. J. (1991). Molecular characterization of the trithorax gene, a positive regulator of homeotic gene expression in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 35(2), 113–127.

- Brew, K and Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803(1), 55–71.
- Brew, K., Dinakarandian, D., & Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. In *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* (Vol. 1477, Issues 1–2, pp. 267–283).
- Brower, D. L.; Jaffe, S. M. (1989). Requirement for integrins during *Drosophila* wing development. *Nature*, 342, 285–287.
- Brower, D. L., Wilcox, M., Piovant, M., Smith, R. J., & Reger, L. A. (1984). Related cell-surface antigens expressed with positional specificity in *Drosophila* imaginal discs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(23 1), 7485–7489.
- Brower, D. L. (2003). Platelets with wings: The maturation of *Drosophila* integrin biology. In *Current Opinion in Cell Biology* 15(5), 607–613.
- Brown, J. L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M. L., & Kassis, J. A. (1998). The *Drosophila* polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Molecular Cell*, 1(7), 1057–1064.
- Cabrera, C. V., Botas, J., & Garcia-Bellido, A. (1985). Distribution of Ultrabithorax proteins in mutants of *Drosophila* bithorax complex and its transregulatory genes. *Nature*, 318(6046), 569–571.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S., & Morata, G. (1996). Visualization of Gene Expression in Living Adult *Drosophila*. *Science*, 274, 252–255.
- Casanova, J., Sánchez-Herrero, E., & Morata, G. (1985). Prothoracic transformation and functional structure of the Ultrabithorax gene of *Drosophila*. *Cell*, 42(2), 663–669.
- Casares, F., & Mann, R. S. (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature*, 392(6677), 723–726.
- Cheresh, D. A., & Spiro, R. C. (1987). Biosynthetic and functional properties of an Arg-Gly-Asp-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry*, 262(36), 17703–17711.
- Chyb, S., & Gompel, N. (2013). Wild-type morphology. In *Atlas of Drosophila Morphology* (pp. 1–23).
- Clark, K. A., McGrail, M., & Beckerle, M. C. (2003). Analysis of PINCH function in *Drosophila* demonstrates its requirement in integrin-dependent cellular processes. *Development* 130(12), 2611–2621.
- Cohen, SM, Di Nardo, S. (1993). Wingless: From embryo to adult. *Trends Genet*, 9(6), 189–192.
- Colognato, H., & Yurchenco, P. D. (2000). Form and function: The laminin family of heterotrimers. In *Developmental Dynamics* (Vol. 218, Issue 2, pp. 213–234).

- Crest, J., Diz-Muñoz, A., Chen, D. Y., Fletcher, D. A., & Bilder, D. (2017). Organ sculpting by patterned extracellular matrix stiffness. *ELife*, 6.
- Crickmore, M. A., & Mann, R. S. (2006). Hox control of organ size by regulation of morphogen production and mobility. *Science*, 313(5783), 63–68.
- de Navas, L., Foronda, D., Suzanne, M., & Sánchez-Herrero, E. (2006). A simple and efficient method to identify replacements of P-lacZ by P-Gal4 lines allows obtaining Gal4 insertions in the bithorax complex of *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 123(11), 860–867.
- Déjardin, J., & Cavalli, G. (2004). Chromatin inheritance upon Zeste-mediated Brahma recruitment at a minimal cellular memory module. *EMBO Journal*, 23(4), 857–868.
- Diaz-de-la-Loza, M. C., & Thompson, B. J. (2017). Forces shaping the *Drosophila* wing. *Mechanisms of Development*, 144, 23–32.
- Diaz-de-la-Loza, M. del C., Ray, R. P., Ganguly, P. S., Alt, S., Davis, J. R., Hoppe, A., Tapon, N., Salbreux, G., & Thompson, B. J. (2018). Apical and Basal Matrix Remodeling Control Epithelial Morphogenesis. *Developmental Cell*, 46(1), 23-39.e5.
- Dickinson, M. H. (1999). Haltere-mediated equilibrium reflexes of the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354(1385), 903–916.
- Domínguez-Giménez, P., Brown, N. H., & Martín-Bermudo, M. D. (2007). Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the *Drosophila* wing epithelium. *Journal of Cell Science*, 120(6), 1061–1071.
- Driever, W., & Nüsslein-Volhard, C. (1988). The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell*, 54(1), 95–104.
- Duboule, D. (2007). The rise and fall of Hox gene clusters. *Development* 134(14), 2549–2560.
- Duboule, D. (1991). Patterning in the vertebrate limb. *Curr Opin Genet Dev*, 1(2), 211–216.
- Duboule, D., & Morata, G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends in Genetics*, 10(10), 358–364.
- Eaton, S., & Kornberg, T. B. (1990). Repression of ci-D in posterior compartments of *Drosophila* by engrailed. *Genes and Development*, 4(6), 1068–1077.
- Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818–822.
- Elliott, D. A., & Brand, A. H. (2008). The GAL4 system: a versatile system for the expression of genes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 420(6), 79–95.
- Fox, J. W., Mayer, U., Nischt, R., Aumailley, M., Reinhardt, D., Wiedemann, H., Mann, K., Timpl, R., Krieg, T., & Engel, J. (1991). Recombinant nidogen consists of three globular domains

- and mediates binding of laminin to collagen type IV. *The EMBO Journal*, 10(11), 3137–3146.
- Francis, N. J., Saurin, A. J., Shao, Z., & Kingston, R. E. (2001). Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Molecular Cell*, 8(3), 545–556.
- Frischer, L. E., Hagen, F. S., & Garber, R. L. (1986). An inversion that disrupts the Antennapedia gene causes abnormal structure and localization of RNAs. *Cell*, 47(6), 1017–1023.
- Fristrom, D., Wilcox, M., & Fristrom, J. (1993). The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in Drosophila wing development. *Development*, 117(2), 509–523.
- Fristrom, D., & Fristrom, J. W. (1993). The metamorphic development of the adult epidermis. *The Development of Drosophila Melanogaster*, 2, 843–897.
- Fristrom, D. (1976). The mechanism of evagination of imaginal discs of Drosophila melanogaster. III. Evidence for cell rearrangement. *Developmental Biology*, 54(2), 163–171.
- Fristrom, D., & Fristrom, J. W. (1975). The mechanism of evagination of imaginal discs of Drosophila melanogaster. I. General considerations. *Developmental Biology*, 43(1), 1–23.
- Frohnhofer, H. G., Lehmann, R., & Nusslein-Volhard, C. (1986). Manipulating the anteroposterior pattern of the Drosophila embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 97(SUPPL.), 169–179.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P., & Morata, G. (1976). Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of Drosophila. *Developmental Biology*, 48(1), 132–147.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P., & Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of drosophila. In *Nature New Biology* (Vol. 245, Issue 147, pp. 251–253).
- Gervais, L., & Casanova, J. (2011). The Drosophila homologue of SRF acts as a boosting mechanism to sustain FGF-induced terminal branching in the tracheal system. *Development*, 138(7), 1269–1274.
- Godenschwege, T. A., Pohar, N., Buchner, S., & Buchner, E. (2000). Inflated wings, tissue autolysis and early death in tissue inhibitor of metalloproteinases mutants of Drosophila. *European Journal of Cell Biology*, 79(7), 495–501.
- Gonzalez-Reyes, A., Urquia, N., Gehring, W. J., Struhl, G., & Morata, G. (1990). Are cross-regulatory interactions between homoeotic genes functionally significant? *Nature*, 344(6261), 78–80.
- González-Reyes, A., & Morata, G. (1990). The developmental effect of overexpressing a Ubx product in Drosophila embryos is dependent on its interactions with other homeotic products. *Cell*, 61(3), 515–522.
- Green, H. J., & Brown, N. H. (2019). Integrin intracellular machinery in action. In *Experimental Cell Research* 378(2), 226–231.

- Green, H. J., Griffiths, A. G. M., Ylänne, J., & Brown, N. H. (2018). Novel functions for integrin-associated proteins revealed by analysis of myofibril attachment in *Drosophila*. *ELife*, 7(e35783).
- Hafen, E., Kuroiwa, A., & Gehring, W. J. (1984). Spatial distribution of transcripts from the segmentation gene *fushi tarazu* during *Drosophila* embryonic development. *Cell*, 37(3), 833–841.
- Haigo, S. L., & Bilder, D. (2011). Global tissue revolutions in a morphogenetic movement controlling elongation. *Science*, 331(6020), 1071–1074.
- Harding, K., & Levine, M. (1988). Gap genes define the limits of antennapedia and bithorax gene expression during early development in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 7(1), 205–214.
- Hayes, P. H., Sato, T., & Denell, R. E. (1984). Homoeosis in *Drosophila*: The Ultrabithorax larval syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(21), 545–549.
- Heemskerk, J., DiNardo, S., Kostriken, R., & O'Farrell, P. H. (1991). Multiple modes of engrailed regulation in the progression towards cell fate determination. *Nature*, 352(6334), 404–410.
- Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A. M., & Hong, Y. (2009). Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(20), 8284–8289.
- Humphries, M. J., Mould, A. P., & Tuckwell, D. S. (1993). Dynamic aspects of adhesion receptor function — integrins both twist and shout. In *BioEssays* (Vol. 15, Issue 6, pp. 391–397).
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. In *Science* (Vol. 326, Issue 5957, pp. 1216–1219).
- Hynes, R. O., & Zhao, Q. (2000). The evolution of cell adhesion. *Journal of Cell Biology*, 150(2).
- Ingham, P. W. (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. In *Nature* (Vol. 335, Issue 6185, pp. 25–34).
- Ito, K., Sass, H., Urban, J., Hofbauer, A., & Schneuwly, S. (1997). GAL4-responsive UAS-tau as a tool for studying the anatomy and development of the *Drosophila* central nervous system. *Cell and Tissue Research*, 290(1), 1–10.
- Juliano, R. L., & Haskill, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. In *Journal of Cell Biology* (pp. 577–585).
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A., & Olsen, G. (1990). Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Advances in Genetics*, 27(C), 309–362.
- Kennison, J. A. (1995). The Polycomb and Trithorax Group Proteins of *Drosophila*: Trans-Regulators of Homeotic Gene Function. *Annual Review of Genetics*, 29(1), 289–303.

- Kishimoto, T. K., Hollander, N., Roberts, T. M., Anderson, D. C., & Springer, T. A. (1987). Heterogeneous mutations in the β subunit common to the LFA-1, Mac-1, and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. *Cell*, *50*(2), 193–202.
- Kornberg, T., Sidén, I., O’Farrell, P., & Simon, M. (1985). The engrailed locus of drosophila: In situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell*, *40*(1), 45–53.
- Lafever, K. S., Wang, X., Page-Mccaw, P., Bhave, G., & Page-Mccaw, A. (2017). Both Drosophila matrix metalloproteinases have released and membrane-tethered forms but have different substrates. *Scientific Reports*, *7*.
- Lawrence, P. (1992). *The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design*. Blackwell Scientific Publication.
- Lawrence, P. A., & Morata, G. (1976). Compartments in the wing of Drosophila: A study of the engrailed gene. *Developmental Biology*, *50*(2), 321–337.
- Le Parco, Y., Knibiehler, B., Cecchini, J. P., & Mirre, C. (1986). Stage and tissue-specific expression of a collagen gene during Drosophila melanogaster development. *Experimental Cell Research*, *163*(2), 405–412.
- LeBleu, V. S., MacDonald, B., & Kalluri, R. (2007). Structure and function of basement membranes. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 232, Issue 9, pp. 1121–1129).
- Leptin, M., Aebersold, R., & Wilcox, M. (1987). Drosophila position-specific antigens resemble the vertebrate fibronectin-receptor family. *The EMBO Journal*, *6*(4), 1037–1043.
- Leptin, M., Bogaert, T., Lehmann, R., & Wilcox, M. (1989). The function of PS integrins during Drosophila embryogenesis. *Cell*, *56*(3), 401–408.
- Lewis, E. B. (1963). Genes and developmental pathways. *Genes, Development, and Cancer: The Life and Work of Edward B. Lewis*, *56*, 199–228.
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Genes, Development, and Cancer: The Life and Work of Edward B. Lewis*, 229–242.
- Lewis, E. B. (1982). Control of body segment differentiation in Drosophila by the bithorax gene complex. *Embryonic Development, Part A: Genetic Aspects*, 269–288.
- Llano, E., Pendas, A. M., Aza-Blanc, P., Kornberg, T. B., & Lopez-Otin, C. (2000). Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from Drosophila with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 275, Issue 46, pp. 35978–35985).
- Maeda, R. K., & Karch, F. (2009). Chapter 1 The Bithorax Complex of Drosophila. An Exceptional Hox Cluster. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 88, pp. 1–33).
- Makhijani, K., Kalyani, C., Srividya, T., & Shashidhara, L. S. (2007). Modulation of Decapentaplegic gradient during haltere specification in Drosophila. *Developmental Biology*, *302*(1), 243–255.

- Mandaravally Madhavan, M., & Schneiderman, H. A. (1977). Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 183(4), 269–305.
- Mann, K., Deutzmann, R., & Timpl, R. (1988). Characterization of proteolytic fragments of the laminin-nidogen complex and their activity in ligand-binding assays. *European Journal of Biochemistry*, 178(1), 71–80.
- Mann, R. S., & Morata, G. (2000). The Developmental and Molecular Biology of Genes that Subdivide the Body of *Drosophila*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 243–271.
- Matamoro-Vidal, A., Huang, Y., Salazar-Ciudad, I., Shimmi, O., & Houle, D. (2018). Quantitative morphological variation in the developing *Drosophila* wing. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(7), 2399–2409.
- Mazo, A. M., Huang, D. H., Mozer, B. A., & Dawid, I. B. (1990). The trithorax gene, a trans-acting regulator of the bithorax complex in *Drosophila*, encodes a protein with zinc-binding domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(6), 2112–2116.
- McCall, K., & Bender, W. (1996). Probes of chromatin accessibility in the *Drosophila* bithorax complex respond differently to Polycomb-mediated repression. *The EMBO Journal*, 15(3), 569–580.
- McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A., & Gehring, W. J. (1984). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*, 308(5958), 428–433.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K., & Davis, R. L. (2003). Spatiotemporal Rescue of Memory Dysfunction in *Drosophila*. *Science*, 302(5651), 1765–1768.
- Mohit, P., Bajpai, R., & Shashidhara, L. S. (2003). Regulation of Wingless and Vestigial expression in wing and haltere discs of *Drosophila*. In *Development* (Vol. 130, Issue 8, pp. 1537–1547).
- Mohit, P., Makhijani, K., Madhavi, M. B., Bharathi, V., Lal, A., Sirdesai, G., Reddy, V. R., Ramesh, P., Kannan, R., Dhawan, J., & Shashidhara, L. S. (2006). Modulation of AP and DV signaling pathways by the homeotic gene Ultrabithorax during haltere development in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 291(2), 356–367.
- Monier, B., Astier, M., Sémériva, M., & Perrin, L. (2005). Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart. *Development*, 132(23), 5283–5293.
- Montagne, J., Groppe, J., Guillemin, K., Krasnow, M. A., Gehring, W. J., & Affolter, M. (1996). The *Drosophila* Serum Response Factor gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to blistered. *Development*, 122(9), 2589–2597.

- Morata, G., & Kerridge, S. (1982). The role of position in determining homoeotic gene function in *Drosophila*. *Nature*, *300*(5888), 191–192.
- Morata, G., & Kerridge, S. (1981). Sequential functions of the bithorax complex of *Drosophila*. *Nature*, *290*(5809), 778–781.
- Morata, G., & Lawrence, P. A. (1977). Homoeotic genes, compartments and cell determination in *Drosophila*. In *Nature* (Vol. 265, Issue 5591, pp. 211–216).
- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M., & Chia, W. (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(26), 15050–15055.
- Morisato, D. (1995). Signaling Pathways that Establish the Dorsal-Ventral Pattern of the *Drosophila* Embryo. *Annual Review of Genetics*, *29*(1), 371–399.
- Morrissey, M. A., & Sherwood, D. R. (2015). An active role for basement membrane assembly and modification in tissue sculpting. *Journal of Cell Science*, *128*(9), 1661–1668.
- Murray, M. A., Fessler, L. I., & Palka, J. (1995). Changing distributions of extracellular matrix components during early wing morphogenesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, *168*(1), 150–165.
- Nagaset, H., & Woessner, J. F. (1999). Matrix metalloproteinases. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 274, Issue 31, pp. 21491–21494).
- Natzle, J. E., Monson, J. M., & McCarthy, B. J. (1982). Cytogenetic location and expression of collagen-like genes in *Drosophila*. *Nature*, *296*(5855), 368–371.
- Negre, B., Casillas, S., Suzanne, M., Sánchez-Herrero, E., Akam, M., Nefedov, M., Barbadilla, A., De Jong, P., & Ruiz, A. (2005). Conservation of regulatory sequences and gene expression patterns in the disintegrating *Drosophila* Hox gene complex. *Genome Research*, *15*(5), 692–700.
- Nüsslein-Volhard, C. (1991). Determination of the embryonic axes of *Drosophila*. *Development*, *112*(1), 1–10.
- Nüsslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, *287*(5785), 795–801.
- O’Kane, C. J., & Gehring, W. J. (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(24), 9123–9127.
- Ouweneel, W. J., & van der Meer, J. M. (1973). Differentiation capacities of the dorsal metathoracic (halter) disc of *Drosophila melanogaster* - I. Normal organ map. *Wilhelm Roux Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*, *172*(2), 149–161.
- Page-McCaw, A. (2008). Remodeling the model organism: Matrix metalloproteinase functions in invertebrates. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 14–23).

- Page-McCaw, A., Serano, J., Santé, J. M., & Rubin, G. M. (2003). Drosophila matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Developmental Cell*, 4(1), 95–106.
- Park, Y., Rangel, C., Reynolds, M. M., Caldwell, M. C., Johns, M., Nayak, M., Welsh, C. J. R., McDermott, S., & Datta, S. (2003). Drosophila Perlecan modulates FGF and Hedgehog signals to activate neural stem cell division. *Developmental Biology*, 253(2), 247–257.
- Pastor-Pareja, J. C., & Xu, T. (2011). Shaping Cells and Organs in Drosophila by Opposing Roles of Fat Body-Secreted Collagen IV and Perlecan. *Developmental Cell*, 21(2), 245–256.
- Peifer, M., & Bender, W. (1986). The anterobithorax and bithorax mutations of the bithorax complex. *The EMBO Journal*, 5(9), 2293–2303.
- Pirrotta, V. (1997). Chromatin-silencing mechanisms in Drosophila maintain patterns of gene expression. In *Trends in Genetics* (Vol. 13, Issue 8, pp. 314–318).
- Plaza, S., Prince, F., Jaeger, J., Kloter, U., Flister, S., Benassayag, C., Cribbs, D., & Gehring, W. J. (2001). Molecular basis for the inhibition of Drosophila eye development by Antennapedia. *EMBO Journal*, 20(4), 802–811.
- Prasad, M., Jang, A. C. C., Starz-Gaiano, M., Melani, M., & Montell, D. J. (2007). A protocol for culturing drosophila melanogaster stage 9 egg chambers for live imaging. *Nature Protocols*, 2(10), 2467–2473.
- Reinhardt, D., Mann, K., Nischt, R., Fox, J. W., Chu, M. L., Krieg, T., & Timpl, R. (1993). Mapping of nidogen binding sites for collagen type IV, heparan sulfate proteoglycan, and zinc. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15), 10881–10887.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. *Genome Research*, 11(6), 1114–1125.
- Ries, A., Göhring, W., Fox, J. W., Timpl, R., & Sasaki, T. (2001). Recombinant domains of mouse nidogen-1 and their binding to basement membrane proteins and monoclonal antibodies. *European Journal of Biochemistry*, 268(19), 5119–5128.
- Roch, F., & Akam, M. (2000). Ultrabithorax and the control of cell morphology in Drosophila halteres. *Development*, 127(1), 97–107.
- Roch, F., Baonza, A., Martín-Blanco, E., & García-Bellido, A. (1998). Genetic interactions and cell behaviour in blistered mutants during proliferation and differentiation of the Drosophila wing. *Development*, 125(10), 1823–1832.
- Rodriguez, A., Zhou, Z., Tang, M. L., Meller, S., Chen, J., Bellen, H., & Kimbrell, D. A. (1996). Identification of immune system and response genes, and novel mutations causing melanotic tumor formation in Drosophila melanogaster. *Genetics* 143(2), 929–940.
- Schneuwly, S., Klemenz, R., & Gehring, W. J. (1987). Redesigning the body plan of Drosophila by ectopic expression of the homoeotic gene Antennapedia. *Nature*, 325(6107), 816–818.

- Schratt, G., Philippar, U., Berger, J., Schwarz, H., Heidenreich, O., & Nordheim, A. (2002). Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *Journal of Cell Biology*, *156*(4), 737–750.
- Scott, M. P., & Weiner, A. J. (1984). Structural relationships among genes that control development: Sequence homology between the antennapedia, ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(13 I), 4115–4119.
- Shashidhara, L. S., Agrawal, N., Bajpai, R., Bharathi, V., & Sinha, P. (1999). Negative regulation of dorsoventral signaling by the homeotic gene Ultrabithorax during haltere development in *Drosophila*. *Developmental Biology*, *212*(2), 491–502.
- Shore, P., & Sharrocks, A. D. (1995). The MADS-Box Family of Transcription Factors. *European Journal of Biochemistry*, *229*(1), 1–13.
- Simon, J., Chiang, A., Bender, W., Shimell, M. J., & O’connor, M. (1993). Elements of the *Drosophila* bithorax complex that mediate repression by polycomb group products. *Developmental Biology*, *158*(1), 131–144.
- Srivastava, A., Pastor-Pareja, J. C., Igaki, T., Pagliarini, R., & Xu, T. (2007). Basement membrane remodeling is essential for *Drosophila* disc eversion and tumor invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(8), 2721–2726.
- St. Pierre, S. E., Galindo, M. I., Couso, J. P., & 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*(5), 1273–1281.
- Struhl, G. (1981). A gene product required for correct initiation of segmental determination in *Drosophila*. *Nature*, *293*(5827), 36–41.
- Struhl, G., & White, R. A. H. (1985). Regulation of the Ultrabithorax gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. *Cell*, *43*(2 PART 1), 507–519.
- Timpl, R. (1989). Structure and biological activity of basement membrane proteins. *European Journal of Biochemistry*, *180*(3), 487–502.
- Torgler, C. N., Narasimha, M., Knox, A. L., Zervas, C. G., Vernon, M. C., & Brown, N. H. (2004). Tensin stabilizes integrin adhesive contacts in *Drosophila*. *Developmental Cell*, *6*(3), 357–369.
- Treisman, R., & Ammerer, G. (1992). The SRF and MCM1 transcription factors. *Current Opinion in Genetics and Development*, *2*(2), 221–226.
- Tschopp, P., & Duboule, D. (2011). A regulatory “landscape effect” over the HoxD cluster. *Developmental Biology*, *351*(2), 288–296.
- Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, *249*(4968), 505–510.

- Varner, V. D., & Nelson, C. M. (2014). Cellular and physical mechanisms of branching morphogenesis. In *Development (Cambridge)* (Vol. 141, Issue 14, pp. 2750–2759).
- Voigt, A., Pflanz, R., Schäfer, U., & Jäckle, H. (2002). Perlecan participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Developmental Dynamics*, 224(4), 403–412.
- Wakimoto, B. T., Turner, F. R., & Kaufman, T. C. (1984). Defects in embryogenesis in mutants associated with the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 102(1), 147–172.
- Walsh, E. P., & Brown, N. H. (1998). A screen to identify *drosophila* genes required for integrin-mediated adhesion. *Genetics*, 150(2), 791–805.
- Wang, C., & Lehmann, R. (1991). Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell*, 66(4), 637–647.
- Weatherbee, S. D., Halder, G., Kim, J., Hudson, A., & Carroll, S. (1998). Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes and Development*, 12(10), 1474–1482.
- Wehrli, M., DiAntonio, A., Fearnley, I. M., Smith, R. J., & Wilcox, M. (1993). Cloning and characterization of α PS1, a novel *Drosophila melanogaster* integrin. *Mechanisms of Development*, 43(1), 21–36.
- Weinstein, A. (1918). Coincidence of Crossing over in *Drosophila melanogaster* (*Ampelophila*). *Genetics*, 3(2), 135–172.
- White, R. A. H., & Akam, M. E. (1985). Contrabithorax mutations cause inappropriate expression of Ultrabithorax products in *Drosophila*. *Nature*, 318(6046), 567–569.
- White, R. A. H., & Wilcox, M. (1985). Regulation of the distribution of Ultrabithorax proteins in *Drosophila*. *Nature*, 318(6046), 563–567.
- Wilcox, M., Brown, N., Piovant, M., Smith, R. J., & White, R. A. (1984). The *Drosophila* position-specific antigens are a family of cell surface glycoprotein complexes. *The EMBO Journal*, 3(10), 2307–2313.
- Wilkin, M. B., Becker, M. N., Mulvey, D., Phan, I., Chao, A., Cooper, K., Chung, H. J., Campbell, I. D., Baron, M., & MacIntyre, R. (2000). *Drosophila* Dumpy is a gigantic extracellular protein required to maintain tension at epidermal-cuticle attachment sites. *Current Biology*, 10(10), 559–567.
- Wolff, T. (2000). Histological techniques for the *Drosophila* eye. Part I: Larva and pupa. In *Drosophila Protocols* (pp. 201–227).
- Wolpert, L. (2011). *Principles of development* (4th ed.). Oxford University Press.
- Wright, T. R. F. (1960). The phenogenetics of the embryonic mutant lethal myospheroid, in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*, 143(1), 77–99.

- Yasothornsrikul, S., Davis, W. J., Cramer, G., Kimbrell, D. A., & Dearolf, C. R. (1997). Viking: Identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene*, *198*(2 JAN), 17–25.
- Yurchenco, P. D., & Ruben, G. C. (1987). Basement membrane structure in situ: Evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *Journal of Cell Biology*, *105*(6 I), 2559–2568.
- Yurchenco, P. D., & Schittny, J. C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. In *FASEB Journal* (Vol. 4, Issue 6, pp. 1577–1590).

Agradecimientos

Bien es sabido por cualquiera que se haya embarcado en una Tesis, que ante todo es un momento de tu vida en el que te conoces a ti mismo. Empiezas a conocer tus límites, tus debilidades y fortalezas, tu paciencia y tu capacidad para trabajar bajo presión. Todo este proceso implica también que la gente de tu alrededor te vea en esos momentos en los que estás arriba y en los que estás abajo (en los cuales haces más ruido, por lo menos en mi caso).

Esta Tesis va dedicada a los que estuvieron a las duras y a las maduras, en lo bueno y en lo malo. A la familia que no se elige, pero que si se pudiera elegir no la cambiaría por nada del mundo. A mi madre, que tantas veces intentó entender con mucha paciencia y dibujos qué hacía con las moscas, y me intentaba ofrecer las del patio de San Cebrián, único lugar del mundo en el que las moscas “muerden”. A mi padre, que siempre estaba preocupado a ver qué iba a ser de las moscas en mis vacaciones, y que desgraciadamente no me ha podido ver convertida en doctora. Allá donde estés espero que te sientas orgulloso de mi aunque nunca lo dijeras en alto. A mis hermanas, que también intentaban proponerme nuevos experimentos con moscas que, aunque imposibles, tenían su gracia. Por las catastróficas reuniones familiares, por las risas, el desestrés, los recuerdos. Gracias de corazón. A M.Ángela, siempre pendiente de mí, siempre presta a ayudarte en todo, por esa cara de felicidad cada vez que me ves, imposible de describir con palabras. Gracias por tu cariño y por el apoyo que siempre has dado a la familia. Es un orgullo tenerte como madrina, y podríamos decir, como segunda madre.

También tengo que agradecer a la gente que me ha rodeado laboralmente durante estos cuatro años, porque sin ellos me habría vuelto aún más loca de lo que he acabado. A Ernesto, por toda la ayuda y el conocimiento que me has brindado, por estar siempre disponible para hablar de ciencia y no ciencia, por esa memoria prodigiosa para conocer todas y cada una de las referencias de Pubmed, nunca dejará de sorprenderme. Por ser sabio hasta decir basta, eres un espejo en el que mirarse. A Paloma, que siempre has intentado poner paz en mi lucha unilateral con la gente que me hacían boicot, especialmente en el confocal. Por las risas, por la comprensión ante ciertas situaciones que solo comprende alguien que se pasa la vida en el laboratorio, y por el desahogo que me ha supuesto infinidad de veces. A Foronda, por esos momentos del café que me han dado la vida, porque el airecito con una buena charleta no científica siempre despeja la cabeza, incluso siendo poesía que no entiendo, o chistes, que tampoco. Por los consejos de la vida y tu sabiduría en la ciencia. A ver quién te despierta ahora en los seminarios... A Nuri, que siempre has estado ahí para hablar de todo, porque siempre he podido abrirme, sabiendo que me ibas a entender a la perfección. Por la fortaleza, para mí has sido un ejemplo de que con trabajo y empeño todo se consigue. Y por supuesto por las risas, que tan bien venían en los momentos de mayor tensión. A Delia, por el ambiente que creas allá donde vas, siempre feliz y zen. No te imaginas lo que ayuda una sonrisa en los malos momentos, y sobre todo lo que acompaña en los buenos. Espero que sigas igual de feliz rodeada de naturaleza, aunque no tengo ninguna duda. A Rafa, por tu humor inteligente y a veces jesuiano (o al contrario), tu amor por la música y tu compañerismo en el laboratorio. Espero que tu carrera científica continúe, y nos encontremos pronto en algún congreso de mosquitas. A Luis, porque aunque no hayamos coincidido mucho, las veces que lo hemos hecho han sido clarificadoras para mí, y porque aunque no lo sepas tu tesis me ha ayudado mucho en el momento síndrome “página en blanco”.

No me olvido del laboratorio hermano, los gineses. A Ginés, padre de todos ellos, de muchas generaciones de buenos científicos que han crecido bajo su ala. Un sabio como la copa de un pino y a la vez tremendamente humilde. Tus anécdotas en la hora de la comida siempre me han soltado una carcajada, especialmente la de la puerta de cristal... En resumen, un grande en

todos los aspectos. A Angélica, la persona más alegre que he conocido en mi vida. Siempre sabe cómo sacarte una sonrisa, y a su vez cómo sacarte de un apuro encontrando algún reactivo del año 87. Te voy a echar mucho de menos, ya sabes que en Cambridge tienes refugio. A Izarne, mi coetánea los últimos años, mi confidente con la que he hablado de todo y más, siendo más bien poco discretas. Por las risas, por los desahogos, por todo, eres genial y ya sabes que me encanta tu sinceridad... ¡No cambies nunca! A Rosa, un amor de persona, siempre resplandeciente y dejando todo a un lado por ayudarte en un apuro. A Noe, con la que se puede hablar de manera coherente, y exponer tus opiniones sin ser juzgado. Por tus buenas ideas durante los seminarios, eres una científica de aúpa. A Manolo, por su paciencia conmigo invadiendo su lupa, por sus visitas al laboratorio que alegran cualquier situación, y su ¡COJONES! que me hace tanta gracia. A Natalia, porque es una científica increíble y siempre dispuesta a ayudarte con cualquier cosa que necesites. A Luna, porque aunque no hemos coincidido tanto como me hubiera gustado, siempre la he visto con una sonrisa en la cara y transmitiendo paz, es un ser de luz.

A toda la gente de moscas del CBM, porque sois una gran familia y siempre me consideraré parte de ella. Y a la gente de la cuarta, a Guada, a Ana, a Alicia, por esas conversaciones (principalmente en el baño), porque siempre alegra hablar con gente que entiende lo que sientes, porque lo ha pasado, lo está pasando, o lo va a pasar. Al servicio del SMOC por estar ahí en todo momento, por ayudarte con cualquier cosa que necesites con una sonrisa. A la gente de administración, especialmente Javi, porque te resuelve cualquier papeleta en dos segundos y siempre con buen humor y paciencia.

I want to thank too to Nick and Goli's lab in Cambridge. I only spent 4 months there but is incredible how my life changed after that stay. It gave me confidence in myself, the one I needed to have if I wanted to continue in the academy. It made me grow as scientist and still as person. To Nick, because you took me in the lab without knowing anything about me, and even knowing my English level was mostly poor as you checked in our first Skype conversation. Because you are a great scientist but humble and close at the same time, you showed me I was a valuable scientist in the moment I needed the most, and maybe I can continue showing you that you were right. To Goli, whose smile is always present, always in a good mood, and scientifically speaking with a broadened mind with great ideas to give. A Silvia, porque desde el primer momento que llegué has estado disponible para cualquier duda o pregunta por absurda que fuera, y siempre contestando de buena fe. Por las conversaciones en la fly, y las propuestas de planes por aquellos lares que eran totalmente nuevos para mí. Porque me sigo sorprendiendo de las ideas que tienes para llevar a cabo experimentos. Una persona a la que admirar en todos los aspectos. A Cecilia, porque me acogiste en tu casa sin pensártelo dos veces, por tu comprensión y tu ayuda. Es un detalle que jamás se me va a olvidar, eres muy grande. To John, because I have never seen anybody more passionate by photography and car races and is great that you took your time sharing both with me. For your funny jokes and your ham sandwiches with or without tomato. To Stavros, Juliette and Patricia, younger but not less wise and hard workers. I wish I have been like you when I was your age. And in the last position, to the love of my life, Jérôme. When I first met you I couldn't imagine what would you become for me, with that serious face and a bit cold personality. I felt attracted for that but I didn't give it importance till I realized I was completely fallen in love with you. Nowadays you are my support and the best person in the world. I admire your patience with me, (especially when I am hungry) and your capacity to learn Spanish that fast. I see you as a reference of scientific, and I hope you are always with me so I can keep learning from you in all the aspects. I love you.

I want to thank too to Arnaud and Lucy, two incredible persons which have shared with me tons of great moments I spent in Cambridge. We have still pending a barbecue, and I hope it happens soon.

También quiero agradecer a mis amigos, que han estado ahí durante toda esta etapa de mi vida, y seguirán. A mis Brunas, Mer, Brade, Regle, Maza, mi segunda familia. Vuestros consejos siempre tan útiles, que me han hecho abrir la mente en todos los aspectos. Si he cambiado hacia bien, es en gran parte gracias a vosotras. Por estar SIEMPRE ahí. Sois increíbles, no puedo decir más. Y por muchísimos años más yendo al Manduka a beber cervezas, con el bastón si hace falta.

Al grupo de la uni, Nush, los Carlis, Eva. Porque me acogisteis y aunque llegué tarde me sentí como en casa. Porque aunque vivamos en ciudades diferentes, o nos veamos menos, siempre que nos encontramos volvemos a los 20. Por vuestro apoyo incondicional, y por las fiestas descontroladas cada vez que nos reunimos, LILILI. Un apartado especial a Gocho, porque compartimos Erasmus, y fue de lo más increíble que me ha pasado en la vida. Una experiencia que todo el mundo debería probar, que te regresa a la adolescencia pero a la vez te hace crecer como persona sin darte cuenta. Por las fiestas del limón, por serpiente en el suelo, por el Pelure d'Oignon que nos redujo el IQ en 20 puntos por lo menos, por Widdy y Conard el del abrigo, y millones de chorradas más. Lo mejor de todo es que no se quedó ahí, porque seguimos acumulando experiencias y anécdotas, seguimos riendo y quejándonos de todo, seguimos compartiendo nuestras vidas y espero que para siempre. Eres la mejor.

A Chache y Adri, por ser unos amigos de 10, siempre disponibles para lo bueno y lo malo, para jugar al fútbol o tomar diez cañas (y unos colacaos) y hablar de todo un poco. Porque siempre puedo contar con vosotros, y siempre deben quedar pendientes unos nachos con guacamolsio para la próxima vez, y así hasta el infinito.

A mis raposillos, a Juaco, Óscar, Marta, Raquel, Jorge. Porque hemos crecido juntos, hemos jugado, nos hemos atizado, nos hemos reído y sobre todo nos hemos querido como hermanos. Echo de menos esos veranos eternos de ir a cazar renacuajos al río y jugar a polis y cacos, echo de menos cuando crecimos un poco más, las noches en el frontón, y echo de menos veros más a menudo, porque entre nosotros nos entendemos. Y en general a la familia de raposos. Para mí, pasar el cartel de San Cebrián es rejuvenecer en ese mismo momento, despejar mi mente de todo lo que me agobia y que solo haya cabida en ella para el buen rollo, la amistad y muchos buenos momentos, y es todo gracias a vosotros.

También quiero agradecerle a Juan, que me estuvo aguantando día a día durante 3 años del doctorado, con toda la paciencia que eso conlleva. Aunque las cosas no salieran como lo habíamos planeado en un principio, que sepas que te llevo en el corazón.

Y por último pero no menos importante, a mis pucelanas Lau y Lu, con las que tantas confidencias y risas he compartido. Porque pesar de estar cada una en una ciudad y no vernos tanto como antaño, sé se siempre puedo contar con vosotras.

Y bueno, seguro que me dejo a alguien, por eso quiero agradecer en general a todo el mundo con el que me he cruzado estos cuatro años, ya sea para bien o para mal. Entre todos me habéis enseñado cosas, no siempre en el mejor contexto pero bueno, al final son experiencias. Si solo tuviéramos buenos momentos, no sabríamos apreciarlos tanto como lo hacemos.

Anexo 1: Publicaciones

RESEARCH ARTICLE

The *Drosophila* Hox gene *Ultrabithorax* controls appendage shape by regulating extracellular matrix dynamics

José M. De las Heras^{1,*‡}, Celia García-Cortés¹, David Foronda¹, José Carlos Pastor-Pareja², L. S. Shashidhara³ and Ernesto Sánchez-Herrero^{1,‡}

ABSTRACT

Although the specific form of an organ is frequently important for its function, the mechanisms underlying organ shape are largely unknown. In *Drosophila*, the wings and halteres, homologous appendages of the second and third thoracic segments, respectively, bear different forms: wings are flat, whereas halteres are globular, and yet both characteristic shapes are essential for a normal flight. The Hox gene *Ultrabithorax* (*Ubx*) governs the difference between wing and haltere development, but how *Ubx* function in the appendages prevents or allows flat or globular shapes is unknown. Here, we show that *Ubx* downregulates *Matrix metalloproteinase 1* (*Mmp1*) expression in the haltere pouch at early pupal stage, which in turn prevents the rapid clearance of Collagen IV compared with the wing disc. This difference is instrumental in determining cell shape changes, expansion of the disc and apposition of dorsal and ventral layers, all of these phenotypic traits being characteristic of wing pouch development. Our results suggest that *Ubx* regulates organ shape by controlling *Mmp1* expression, and the extent and timing of extracellular matrix degradation.

KEY WORDS: *Drosophila*, Extracellular matrix, Hox genes, Matrix metalloproteinases, Ultrabithorax, Organ shape

INTRODUCTION

Animal species are characterized by particular morphologies that distinguish them from other animals. The form of distinct organs is the result of evolutionary forces that determine how genetic pathways are implemented to regulate size and shape. How the shape of a structure is determined is an interesting biological problem, as the form of an organ is frequently related to its function.

Drosophila melanogaster is an organism well suited for this analysis. The knowledge of genetic pathways and cell properties in the fruitfly (and other organisms) has allowed the identification of some mechanisms needed to confer shape (Gilmour et al., 2017). These have been analyzed mostly in adult derivatives of imaginal discs: groups of cells that grow during the larval period and

differentiate in pupal stages (Cohen, 1993). A well-studied example is the development of the wing. This appendage derives from a region of the wing disc known as the wing pouch, and undergoes a complex series of morphogenetic processes leading to the adult shape (Baena-López et al., 2005; Etournay et al., 2015; Guirao et al., 2015; Diaz de la Loza and Thompson, 2017).

The mechanisms that establish differences in shape between organs are perhaps more amenable to be investigated when comparing homologous structures, such as the two *Drosophila* dorsal thoracic appendages, wings and halteres. Wings, which are derived from wing imaginal discs, emanate from the second thoracic segment and are considerably larger than halteres, which are small appendages that arise from the third thoracic segment and are derived from haltere imaginal discs. Difference in size, however, is not the only obvious distinction between wings and halteres: wings are flat, whereas halteres have end-knob morphology, with a distal part (capitellum) that is globular in nature. Importantly, this structural difference has been shown to be crucial for a stable flight (Dickinson, 1999). At the end of the larval period, wing and haltere discs differ in size but are morphologically similar, both at the cellular and disc levels. It is thus clear that the two structures acquire characteristic flat (wing) and globular (haltere) shape during the subsequent pupal development.

At the start of metamorphosis, the wing disc everts through its peripodial membrane. The pouch region expands to form the wing blade, dorsal and ventral surfaces appose, and the constituent epithelial cells change from columnar to cuboidal. These events are completed by 8 h after puparium formation (APF). Ventral and dorsal surfaces separate and appose again by 18–20 h APF. Different processes of morphogenesis and differentiation take place afterwards, ending up with the formation of the adult wing (Fristrom and Fristrom, 1975, 1993; Fristrom, 1976; Aldaz et al., 2010; Diaz de la Loza and Thompson, 2017). Development of the pupal haltere disc has not been described in as much detail. Nevertheless, it has been reported that the morphology of epithelial cells of the haltere disc starts to diverge from that of the wing disc cells at 32–36 h APF, and that dorsal and ventral surfaces do not appose in the distal haltere disc, with the pouch remaining hollow throughout development (Roch and Akam, 2000).

The Hox gene *Ultrabithorax* (*Ubx*) is the master regulator of haltere identity (Lewis, 1963). *Ubx* is present in the haltere disc, but not in the wing disc, and *Ubx* function is necessary to generate halteres. Furthermore, ectopic expression of *Ubx* in the wing disc is sufficient to transform wings into halteres (Lewis, 1963; Cabrera et al., 1985; White and Akam, 1985). Therefore, the distal globular form of halteres depends on *Ubx* activity. Although this distinct cellular architecture emerges during pupal development (Roch and Akam, 2000), the precise identity of *Ubx* targets that control this morphogenetic process is currently unknown. It is also unclear when *Ubx* regulates haltere identity by preventing wing

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Nicolás Cabrera 1, Cantoblanco, Madrid 28049, Spain. ²School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China. ³Indian Institute of Science Education and Research Pune, Dr Homi Bhabha Road, Pune, Maharashtra 411008, India. *Present address: Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR 3215, INSERM U934, 75248 Paris, France.

‡Authors for correspondence (jose.de-las-heras-ches@curie.fr; esherrero@cblm.csic.es)

© J.M.D.H., 0000-0001-5421-8169; D.F., 0000-0003-2598-7852; E.S.-H., 0000-0001-5688-2303

development in the haltere primordia, although Hox input appears to be continuously needed until the beginning of differentiation (Morata and García-Bellido, 1976; Roch and Akam, 2000).

To better understand how *Ubx* is generating haltere morphology, we have undertaken a detailed analysis of the early pupal development of both wing and haltere discs, and analyzed the role of *Ubx* in generating the morphogenetic distinctions between the two structures. We report here that *Ubx* engineers haltere morphogenesis in the pre-pupal stage by inhibiting three important phenotypic traits diagnostic of wing development: changes in cell shape, control of adhesion competence between cell layers and regulation of organ expansion. *Ubx* achieves this by downregulating *Matrix metalloproteinase 1 (Mmp1)* expression in the haltere disc, thus delaying elimination of the basal extracellular matrix (ECM). Our results suggest that *Ubx* prevents haltere discs from acquiring the flat wing morphology, at least in part, by controlling the elimination of ECM in the first hours of pupal development.

RESULTS

The different shape between wings (flat; Fig. 1B) and halteres (end-knob structures; Fig. 1D) is acquired during the pupal stage, as larval wing and haltere discs have similar shapes (Fig. 1A,C). We therefore analyzed the morphogenetic events leading up to the generation of the adult structures after the larval stage.

Ubx prevents the haltere pouch from acquiring wing pouch-like morphology and cellular architecture

The *Drosophila* wing blade structure results from the apposition of the basal side of two epithelial monolayers. Previous studies have shown that ventral and dorsal surfaces of the wing disc align in the first hours of pupariation (Fristrom et al., 1993, 1994; Fristrom and Fristrom, 1993; Aldaz et al., 2010). Therefore, we decided to compare at this stage the development of the distal part of the wing and haltere discs, the wing and haltere pouches, using phalloidin staining to visualize F-actin. In most of our experiments we have focused on analyzing frontal sections of the distal wing or haltere discs in order to observe the basal ECM distribution in the lumen and to illustrate

differences in morphology and gene expression. At about 3 h APF there is incipient apposition of dorsal and ventral layers in the wing pouch, except in its central region, the presumptive L3 pre-vein (Fristrom et al., 1994) (Fig. 1E). Three hours later, after disc eversion, the tissue expands and the region of apposition increases (Fig. 1F). At 9 h APF, the dorsal and ventral layers are tightly apposed (Fristrom and Fristrom, 1993; Fristrom et al., 1994; Blair, 2007) (Fig. 1G).

A different pattern is observed in the haltere disc. At about 3 h APF dorsal and ventral surfaces do not start to align, and a large lumen is observed in the distal part, corresponding to the presumptive capitellum (Fig. 1H). Three hours later (6 h APF), epithelial expansion is absent and so is dorso-ventral apposition (Fig. 1I). Similar observations with respect to the absence of dorso-ventral apposition have previously been described at late pupal stages (Roch and Akam, 2000). At 9 h APF, the tight apposition and zippering that takes place in the wing pouch are not observed in the haltere pouch (Fig. 1J).

Close inspection of the discs at different time points indicated a change in cell shape in the wing disc at late stages. In transverse sections of the distal wing pouch, at 3 h APF, the epithelium shows a columnar pseudostratified disposition (Fig. 2A); however, the cells of the epithelium show a more isodiametric shape at 6 h APF and, more clearly, at 9 h APF, as the wing disc expands (Fig. 2C,E). At 3 h APF, the haltere disc cells show an elongated shape, similar to that of the wing disc at the same stage (Fig. 2B). However, in contrast to the wing disc, cells in the haltere primordium do not change shape at 6 h or 9 h APF, thus keeping a columnar epithelial organization (Fig. 2D,F).

Therefore, when comparing prepupal development of distal wing and haltere discs, three main differences can be observed: (1) there is apposition of dorsal and ventral layers in the wing pouch but not in the haltere pouch; (2) the expansion observed in the wing pouch is absent in the corresponding region of the haltere disc; and (3) wing disc cells, but not haltere disc cells, become more isodiametric as the disc expands and tightly apposes ventral and dorsal surfaces.

As the presence of *Ubx* is a crucial molecular distinguisher between haltere and wing discs, we decided to analyze prepupal disc

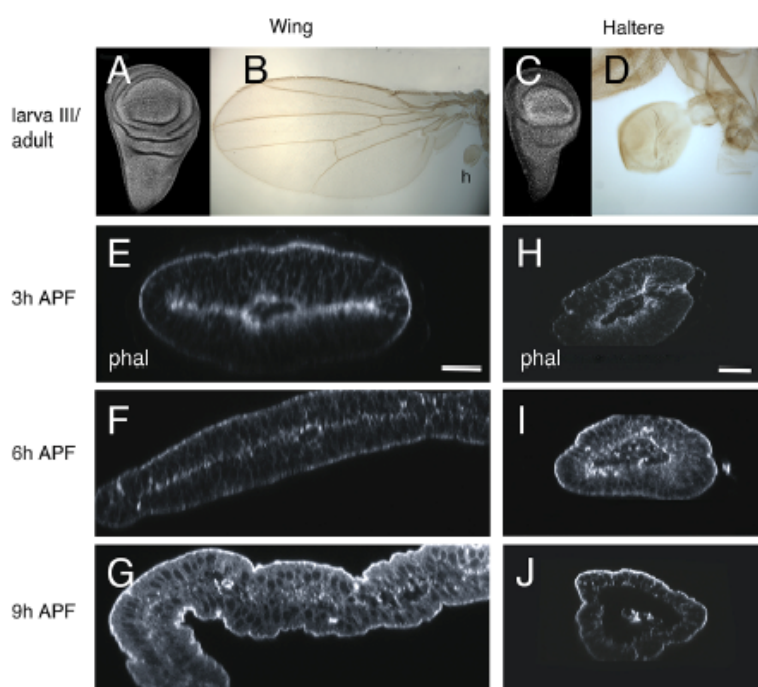


Fig. 1. Wing and haltere discs acquire different shapes in early pupa. (A) Third instar wing disc. (B) Adult wing. h, haltere. (C) Third instar haltere disc. Note the similar shape of both discs. (D) Haltere. Its globular shape differs from the flat wing. (E–J) Optical frontal sections of the distal part of wing (E–G) and haltere (H–J) discs at 3 h (E,H) ($n=35$), 6 h (F,I) ($n=20$) and 9 h (G,J) ($n=15$) APF, stained with phalloidin. The wing disc apposes dorsal and ventral surfaces, and extends as the pupa develops (F,G), whereas the haltere disc remains unexpanded, and dorsal and ventral surfaces do not appose (H–J). Scale bars: 25 μm .

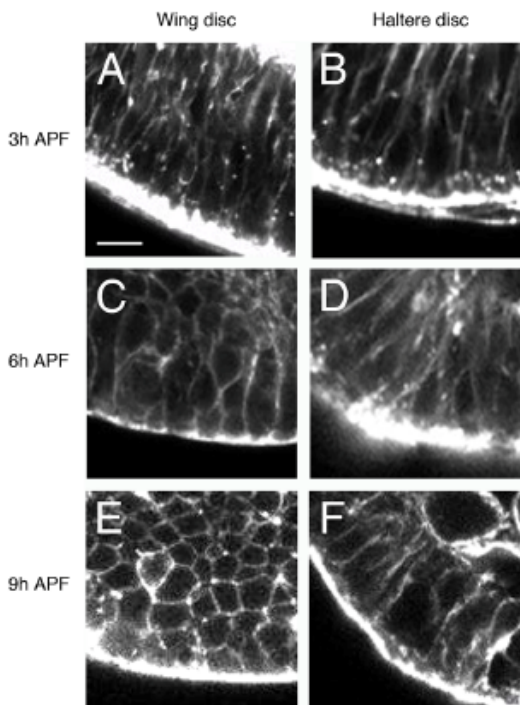


Fig. 2. Changes in cell shape occur in the prepupal wing disc but not in the haltere disc. (A–F) Optical transverse sections of the distal wing (A,C,E) and haltere (B,D,F) discs at 3 h (A,B) ($n=7$), 6 h (C,D) ($n=4$) and 9 h (E,F) ($n=6$) APF, stained with phalloidin. The distal part of the appendage is at the bottom. At 3 h APF, cells of the distal wing region show the columnar shape of the third instar imaginal disc (A), but show a more isodiametric shape at 6 h and 9 h APF (C,E) as the disc extends. By contrast, haltere pouch cells maintain the elongated shape at 3 h, 6 h and 9 h APF (B,D,F). Scale bar: 5 μ m.

morphology in *Haltere-mimic* (*Hm*) mutants, in which *Ubx* is derepressed in the wing disc and wings are transformed into halteres (Lewis, 1982; Fig. S1A). In *Hm* animals, the wing disc fails to display the characteristic expansion or the apposition of dorsal and ventral surfaces, and resembles a haltere disc (Fig. S1B). Then, we decided to focus on how *Ubx* activity suppresses disc elongation, surface apposition and cell shape changes in the haltere disc.

Components of the basal ECM persist longer in the prepupal haltere pouch than in the wing pouch

Some of the differences observed between the two disc structures appear to be related to basal adhesion, suggesting a possible role of basal lamina proteins in differentiating haltere and wing disc development. In fact, ECM composition and remodeling has been shown to be a key element in defining organ morphology (Hynes, 2009; Haigo and Bilder, 2011; Pastor-Pareja and Xu, 2011; Crest et al., 2017). Furthermore, the analysis of genes regulated by *Ubx* in the pupa has uncovered a small group of genes coding for proteins that affect ECM turnover (Pavlopoulos and Akam, 2011). We therefore wondered whether regulation of the ECM could prove to be crucially different between the two appendages. We decided to analyze ECM elements and their regulators in early pupal wing and haltere discs.

There are four main basement membrane components in *Drosophila*: Collagen IV (the most abundant one), Laminin, Perlecan and Nidogen (LeBleu et al., 2007). We decided to analyze the distribution of two of these components, Collagen IV and Perlecan, for which there are well-characterized GFP protein

traps (Morin et al., 2001) inserted in the genes *viking* (*vkg*), coding for one Collagen IV α chain (Yasothornsrikul et al., 1997), and *terribly reduced optic lobes* (*trol*), coding for Perlecan (Voigt et al., 2002; Park et al., 2003). We have followed Vkg-GFP and Trol-GFP dynamics in fixed and *ex-vivo* imaginal discs.

At 3 h APF, there is an accumulation of Vkg-GFP basally, which is mainly associated with the lumen (presumptive L3 vein), in the distal region of the wing disc (Murray et al., 1995) (Fig. 3A,A'). Three hours later, when the discs have everted, Vkg-GFP is hardly detected in the lumen of the wing disc (Fig. 3C,C') and its presence disappears completely by 9 h APF (Fig. 3E,E'). In the 3 h APF haltere disc, Vkg-GFP accumulation is associated exclusively with the lumen and the levels are considerably higher than in the wing disc (Fig. 3B,B'; see also Fig. 4A,B). At 6 h APF, and in contrast to what is observed in the wing disc, there are still high levels of Vkg-GFP in the basal side of the haltere pouch cells (Fig. 3D,D'). The Vkg-GFP signal is almost completely lost from the basement membrane at 9 h APF, when Collagen IV can be seen associated to hemocytes inside the lumen (Fig. 3F,F').

To further assess the dynamics of the ECM remodeling, we decided to employ time-lapse imaging. In *ex vivo* cultures of prepupal wing discs we observed that Vkg-GFP is lost in the wing pouch before the complete retraction of the peripodial membrane, which takes place before 6 h of prepupal development (Movie 1; Fig. S2). In contrast, high amounts of Vkg-GFP are detected in the pouch of haltere discs even after the eversion of the disc (Movie 2; Fig. S3). The expression of a Trol-GFP protein trap follows similar dynamics to Vkg-GFP in both discs: the Trol-GFP signal in the wing pouch is lost during retraction of the peripodial membrane (Movie 3; Fig. S4), whereas GFP expression is still observed in 6 h APF haltere discs, after the eversion concludes (Movie 4; Fig. S5). The correlation of Trol-GFP and Vkg-GFP expression is expected as *vkg* is required for Perlecan deposition in the basement membranes of imaginal discs (Pastor-Pareja and Xu, 2011). Taken together, our results indicate that the elimination of basal ECM components in the haltere disc of the prepupa is delayed when compared with the wing disc of the same age.

Ubx downregulates *Mmp1* expression and delays Vkg degradation in the prepupal haltere pouch

The analysis presented in the preceding sections suggests that *Ubx* (present in the haltere disc and absent in the wing disc) delays Vkg and Perlecan degradation in the prepupal haltere pouch when compared with the wing pouch. These ECM components are synthesized in the fat body, secreted into the hemolymph and incorporated into the basement membrane of the discs (Pastor-Pareja and Xu, 2011). Thus, it is unlikely that *Ubx* regulates *vkg* or *trol* transcription in the haltere pouch in a disc-autonomous manner. Because Matrix metalloproteinases (Mmps) and Tissue inhibitor of metalloproteinases (Timp) control ECM turnover (Page-McCaw, 2008), we hypothesized that *Ubx* might regulate ECM remodeling indirectly by controlling the expression of these proteins. There are two genes coding for metalloproteinases in *Drosophila*, *Mmp1* and *Mmp2*. Although it was initially thought that *Mmp1* codes for a secreted protein and *Mmp2* codes for a protein tethered to the membrane (Llano et al., 2000, 2002; Page-McCaw et al., 2003; Page-McCaw, 2008), both membrane-anchored and secreted isoforms of both proteins have recently been reported (LaFever et al., 2017).

Metalloproteinases are inhibited by Timp, and the *Drosophila* genome harbors a single gene coding for Timp (Godenschwege et al., 2000; Wei et al., 2003; Page-McCaw, 2008). In the fly, Timp

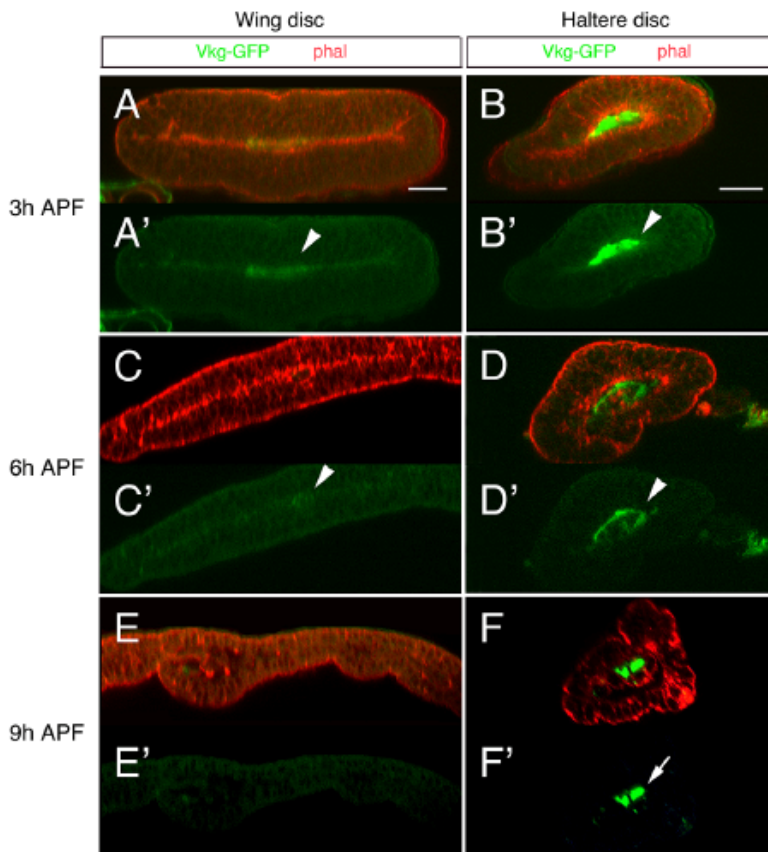


Fig. 3. Vkg-GFP decays more rapidly in prepupal wing discs than in haltere discs. Optical frontal sections of Vkg-GFP distal wing (A,A',C,C',E,E') and haltere (B,B',D,D',F,F') discs of 3 h (A-B') ($n=11$), 6 h (C-D') ($n=6$) and 9 h (E-F') ($n=6$) APF, showing GFP signal and stained with phalloidin. In the wing disc, Vkg-GFP signal is observed in the basal membrane at 3 h APF (A, arrowhead in A'), decays at 6 h APF (C, arrowhead in C') and no traces are detected at 9 h APF (E,E'). By contrast, in the haltere pouch, Vkg-GFP remains at high levels at 3 h (B, arrowhead in B') and 6 h APF (D, arrowhead in D'), and decays later on, showing signal in only hemocytes (F, arrow in F'). Scale bars: 25 μ m.

abrogates *Mmp1* and *Mmp2* activity completely (Page-McCaw et al., 2003). Metalloproteinases remodel tissue by degrading the Collagen IV-containing basement membrane (Srivastava et al., 2007) and, interestingly, *Mmp1*, *Mmp2* and *Timp* have been identified as targets of *Ubx* (Pavlopoulos and Akam, 2011): *Mmp1* is downregulated by *Ubx* in pupal stage whereas *Mmp2* and *Timp* are upregulated by *Ubx* in late larval and pupal stages, respectively. All these data prompted us to analyze whether or not the delay in the elimination of Collagen IV in the prepupal haltere disc, with respect to the wing disc, might result from *Ubx*-mediated regulation of metalloproteinase activity.

To test this, we first analyzed *Mmp1* and *Mmp2* expression in wing and haltere prepupal discs. *Mmp2* expression can be detected with an *Mmp2*-GFP line (Deady et al., 2015). The GFP signal is non-uniformly distributed in both wing and haltere prepupal discs, and there appears to be higher expression levels in groups of cells of the wing pouch than in the corresponding region of the haltere pouch; however, these cells are mainly in the peripheral region of the disc (Fig. S6A,B). To carefully compare the relative levels of *Mmp2*-GFP levels in the two discs, we looked at the GFP signal in *Mmp2*-GFP *pbx* mutants, in which the posterior compartment of the haltere disc is transformed into the corresponding region of the wing disc. As shown in Fig. S6C,C', in *pbx* haltere discs there appears to be only a somewhat higher *Mmp2*-GFP expression in the dorsal, but not the ventral, cells contacting the lumen, in the mutant (wing-like) compartment.

A significant difference is readily observed, by contrast, when studying *Mmp1* expression with an anti-*Mmp1* antibody: the wing pouch lumen shows notably higher levels of *Mmp1* protein than the haltere pouch at the same stage (Fig. 4A,B). When comparing simultaneously Vkg-GFP and *Mmp1* expression in both discs at 3 h

APF we noticed that, in the wing pouch, the higher levels of *Mmp1* were correlated with lower Vkg-GFP signal, and the reverse was true for the distal haltere disc (Fig. 4A,B). Quantification of such levels in eight wing and haltere disc pairs showed that the wing disc lumen accumulated about twice as much *Mmp1* as did the haltere disc lumen, and that the level of Vkg-GFP in the former is $\sim 40\%$ lower than in the latter, after normalization (Fig. 4C). We have also observed consistent results with high-throughput techniques identifying genes that are regulated by *Ubx* and differentially expressed between wing and haltere discs of third instar larvae. Although ChIP-seq suggests that both *Mmp1* and *Mmp2* are direct targets of *Ubx*, RNA-seq data suggest that only transcripts of *Mmp1* (one isoform), and not of *Mmp2*, are differentially expressed (S. Khan and L.S.S., unpublished observations).

We have also analyzed *Timp* expression in prepupal wing and haltere discs by *in situ* hybridization (ISH) because no antibody against *Timp* or *Timp* protein trap is available. *Timp* RNA is distributed in small, discrete patches in the 3 h APF wild-type wing disc; none of these is close to the lumen (Fig. 4D). In the haltere disc, by contrast, there appear to be two patches of *Timp*-expressing cells abutting the lumen (Fig. 4E). However, as we could not detect protein expression, the possible difference in distribution of *Timp* protein between the two discs in the lumen, and therefore possible *Mmp1* inactivation, could not be properly assessed.

The differences in *Mmp1* and Vkg-GFP expression between wing and haltere discs suggest *Ubx*-mediated control. If so, 'gain' or 'loss' of *Ubx* activity ought to result in reciprocal changes in the expression of these genes in both wing and haltere discs. To test this in the mutant conditions, in this and the following experiments we selected 3 h and 6 h APF as the best time-points to show the different *Mmp1* and Vkg-GFP signals between wing and haltere

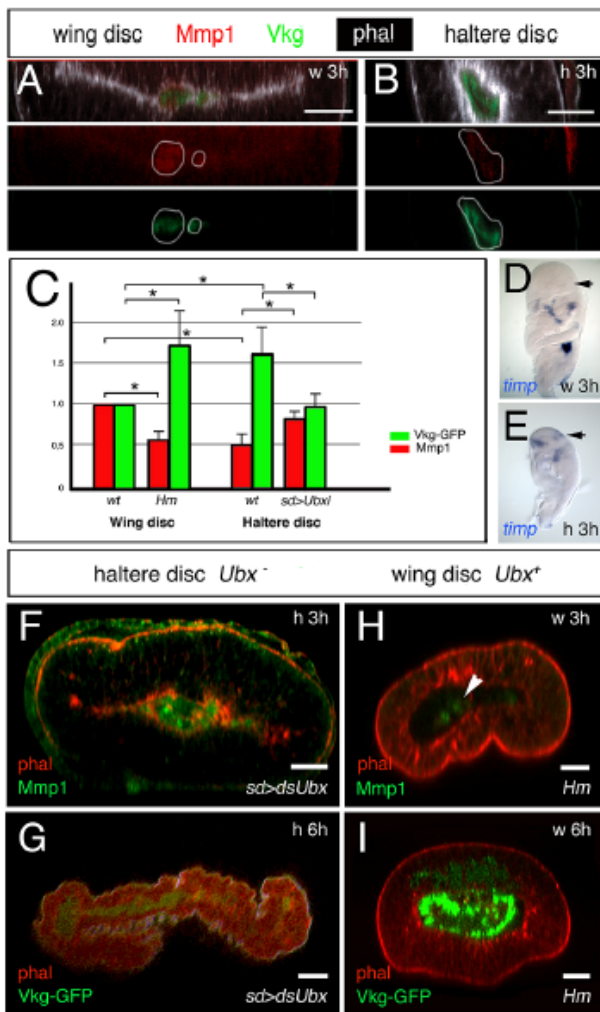


Fig. 4. *Ubx* regulates *Mmp1* and *Vkg* levels in the haltere pouch. (A,B) Optical frontal sections showing that at 3 h APF, the amount of *Mmp1* (red) is higher, but that of *Vkg*-GFP (green) is lower, in the wing disc (A) ($n=8$) compared with in the haltere disc (B) ($n=8$). Phalloidin is shown in white. (C) Quantification of *Mmp1* and *Vkg*-GFP levels in the 3 h APF wing (wild type and *Hm*) and haltere (wild type and *sd-Gal4 UAS-dsUbx DfUbx¹⁰⁹*) discs. The expression in the wing disc has been normalized to 1 (arbitrary units). Data are mean \pm s.d. * $P < 0.01$. (D,E) ISH with a *Timp* probe in 3 h APF wing (D) ($n=30$) and haltere (E) ($n=27$) imaginal discs, showing RNA expression close to the haltere pouch but not the wing pouch (arrows). (F,G) Optical frontal sections of a 3 h (F) and 6 h (G) APF *sd-Gal4 UAS-dsUbx DfUbx¹⁰⁹* haltere disc, showing increased *Mmp1* expression (F) ($n=7$) and lower *Vkg*-GFP signal (G) ($n=6$) with respect to the wild type. Note also the apposition of dorsal and ventral surfaces. (H) In 3 h APF *Hm* wing discs, the expression of *Mmp1* is drastically reduced (some remaining signal is indicated by an arrowhead) ($n=7$). (I) Optical frontal section of the distal part of an *Hm/Vkg*-GFP prepupal wing disc at 6 h APF, showing that the ectopic expression of *Ubx* prevents *Vkg* degradation (compare with the wild type in 3C) ($n=6$). Scale bars: 21 μ m.

discs. When *Ubx* levels were compromised by employing an *Ubx*RNAi construct driven by the *scalloped* (*sd*)-*Gal4* line, which directs expression in the appendage region of both wing and haltere discs (Klein et al., 1997), we observed a significant increase in *Mmp1* accumulation (Fig. 4F, compare with 4B), and reduction of *Vkg*-GFP (compare Fig. 4G with Fig. 3D), in the distal haltere disc. Conversely, if *Ubx* is expressed ectopically in the wing disc (*Hm* mutants), *Mmp1* expression is reduced by $\sim 50\%$ (Fig. 4H, compare with 4A) and *Vkg*-GFP signal is significantly increased (compare

Fig. 4I with Fig. 3C). These results, for the 3 h APF discs, are quantified and compared with the wild-type levels in Fig. 4C.

***Mmp1* and *Timp* regulate *Vkg*-GFP expression and organ shape**

We have shown that *Mmp1* expression and *Vkg*-GFP abundance appear inversely correlated in wing and haltere discs, and also that decreasing levels of *Vkg*-GFP coincide with significant morphological changes in the wing disc. We resolved to analyze whether changes in *Mmp1* activity were responsible for the differences in *Vkg*-GFP presence and morphology between the two discs, with a further analysis of the possible impact on adult morphology. At 6 h APF, overexpression of *Timp* in the wing pouch prevents the elimination of *Vkg*-GFP in the basal side of the cells; in addition, there is neither apposition of tissue layers nor expansion of the tissue (Fig. 5A,A'). The cells exhibit an elongated shape, resembling the wild-type 6 h APF haltere cells and not the wild-type wing disc cells of the same stage (compare Fig. 5B with Fig. 2C,D). In this mutant condition, therefore, the distal wing disc adopts several characteristics of the haltere disc. In the haltere pouch, *Timp* overexpression does not elicit significant changes at 3 h or 6 h APF, although the morphology in frontal sections appears rounder than in the wild type (Fig. 5C).

Next, we studied the possible effect in adult appendage development of expressing *Timp* with *sd*-*Gal4*. As this driver is inserted on the X chromosome, and therefore dosage compensated, there is high male lethality in this and other mutant combinations. We therefore focused our study on females heterozygous for the *Gal4* insertion. Increasing *Timp* expression in the wing pouch led to animals with abnormal wings, shorter than in the wild type, and in which dorsal and ventral surfaces were not apposed (Fig. 5E, compare with the wild type in 5D). The halteres in most of these animals (in 28/39 females) presented a more globular capitellum than in the wild type, with a square-like shape (compare Fig. 5I with 5H, the wild type). A very similar phenotype in wings and halteres is observed if *Timp* expression is induced only in middle-late third instar larvae (in *sd-Gal4 tub-Gal80^{ts} UAS-Timp* flies shifted from 17°C to 29°C; Fig. 5F,J). By contrast, if these flies are shifted to 29°C at 12 h APF, the flies are wild type, suggesting that regulation of *Mmp* activity is important only prior to this time-point (Fig. 5G,K).

We performed the reciprocal set of experiments by increasing *Mmp1* expression. The induction of high *Mmp1* levels with the *sd-Gal4* line resulted in high larval lethality, so we used the *Gal4/Gal80^{ts}* system and temperature-shift experiments with 24 h resolution to reduce the lethality rate. When we expressed *Mmp1* in the haltere pouch in middle-late third instar larvae, we observed elimination of most *Vkg*-GFP expression at 6 h APF, but no dorso-ventral apposition (Fig. 6A). The epithelium is no longer pseudostratified, resembling more the epithelium of the 6 h APF wild-type wing disc than that of the 6 h APF wild-type haltere disc (Fig. 6B, compare with 6C, the wild-type haltere disc). The wing disc of the prepupa overexpressing *Mmp1* does not differ much from the wild type (not shown). Adult flies emerging after this treatment presented reduced or crumpled (but flat) wings, whereas others showed a *dumpy* phenotype (Fig. 6D). Halteres in nearly 50% of the flies (8/18) have an elongated and flattened capitellum (compare Fig. 6G with the wild type in Fig. 5H). Interestingly, if *Mmp1* expression is induced earlier, at the early-middle third larval instar stage, the capitellum of the halteres was, in most cases (7/11), significantly flatter and more elongated than in the wild type (Fig. 6H). The wings also presented the crumpled phenotype observed when the temperature shift was made at middle-late third

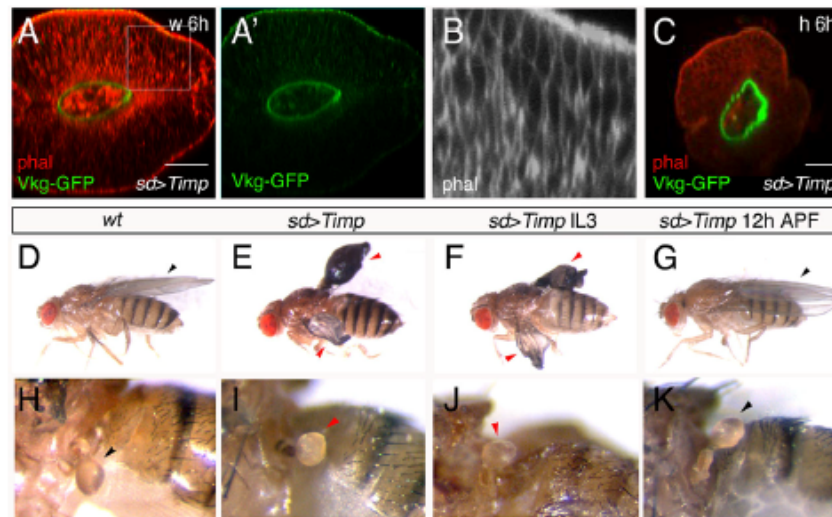


Fig. 5. Reducing Mmp activity modifies prepupal wing and haltere disc shape, and adult appendage morphology. (A,A') Optical frontal section of a 6 h APF distal wing disc overexpressing *Timp* (*sd-Gal4 Vkg-GFP UAS-Timp*): Vkg-GFP is not degraded, the disc shows a globular shape, and there is no elongation or apposition of dorsal and ventral surfaces ($n=7$). (B) Boxed area in A. The cells present an elongated shape, similar to wild-type haltere (but not wing) cells at this stage. (C) Optical frontal section of a 6 h APF *sd-Gal4 UAS-Timp* distal haltere disc, showing a round shape ($n=4$). (D) Wild-type fly, showing flat wings. (E) In *sd-Gal4 UAS-Timp* animals, grown at 29°C, the wings are shorter and do not appose their dorsal and ventral surfaces (36/39). (F) A similar phenotype is observed in *sd-Gal4 tub-Gal80^{ts} UAS-Timp* flies, shifted from 17°C to 29°C at late third larval instar (IL3) (34/36). (G) If the shift is made at 12 h APF, the flies have normal wings ($n=8$). (H) Detail of a wild-type haltere. (I) In *sd-Gal4 UAS-Timp* flies grown at 29°C most of the halteres are globe shaped (28/39). (J) A *sd-Gal4 UAS-Timp tub-Gal80^{ts}* fly shifted from 17°C to 29°C at about the middle-late third larval instar: the capitellum is more globular than in the wild type (30/36). (K) When pupae from this genotype are shifted from 17°C to 29°C at 12 h APF, the capitellum is wild type ($n=8$). Black arrowheads indicate normal development; red arrowheads indicate abnormal development. Scale bars: 21 μ m.

instar larvae (Fig. 6E). As seen when overexpressing *Timp*, forcing *Mmp1* expression at 12 h APF onwards is immaterial to wing development and most halteres also develop normally (Fig. 6F,I).

Finally, we analyzed whether the changes in Vkg-GFP expression observed when *Ubx* expression is modified were mediated by the regulation of Mmps. In pupae in which we simultaneously reduce *Ubx* expression and Mmp activity (*sd-Gal4 UAS-dsUbx UAS-Timp*) the haltere discs show, at 6 h APF, the ring of Vkg-GFP expression and the lack of expansion and dorso-ventral apposition that are characteristic of the wild-type haltere, and not of the *Ubx*-mutant haltere (Fig. 6J, compare with *sd-Gal4 UAS-dsUbx* haltere disc in Fig. 4G). This strongly suggests that *Ubx* regulates Vkg-GFP expression and morphology through the control of Mmps.

We also analyzed whether changes in *Ubx* expression during the third larval instar stage cause phenotypes related to those observed when modifying *Mmp1*. If *Ubx* is downregulated in the early-middle third larval stage, the halteres are transformed into small wings, most of which are flat (17/27) (compare Fig. 7B with the control haltere in 7A). Some of these winglets have, for unknown reasons, dark patches. By contrast, if *Ubx* expression is reduced at the late third larval stage, the halteres are enlarged but globular (Fig. 7C). These data suggest that the size of the transformation to wing correlate to a certain extent with appendage shape: bigger transformations make flatter organs whereas small transformations produce a globular shape.

Taken together, our results indicate that: (1) the levels of Mmp1 in the wing pouch lumen are significantly higher than in the corresponding haltere lumen at the first 3 h of prepupal development; (2) this higher expression negatively correlates with Vkg-GFP levels in the basal membrane of the wing disc, and Vkg-GFP persists longer in the distal haltere disc than in the distal wing disc; (3) *Ubx*, which is expressed only in the haltere disc, maintains Vkg-GFP levels in the haltere pouch for longer, most likely by directly downregulating *Mmp1* expression; and (4) changes in Mmp

activity impact pupal disc shape and adult appendage morphology – halteres elongate and get flatter if *Mmp1* expression is increased, and wings shorten and get inflated if Mmp activity is reduced.

DISCUSSION

The homeotic gene *Ubx* has served as a paradigm of cell fate determination mediated via transcriptional regulation. *Ubx* is one of the few well-characterized master control genes, as its activity is necessary and sufficient for haltere fate specification. Although a number of transcriptional targets of *Ubx* have been identified using different molecular strategies, how individual targets contribute to the molecular and biochemical composition of the haltere structure remains unclear. Equally elusive are the components of the morphogenetic pathways that influence the development of the specific structural and morphological characteristics of the halteres. As *Ubx* activity is necessary to suppress wing fate, comparative analysis employing molecular and biochemical criteria between the two structures has proven to be highly instructive. Here, we have addressed how *Ubx* controls organ shape to prevent the flat shape of the wings and develop the globular form of the halteres. Our results show that the presence of *Ubx* in the haltere disc directs its shape by controlling the ECM dynamics in the prepupal haltere pouch. Importantly, our data reveal that the molecular target *Mmp1* assists *Ubx* in achieving this task. This regulation prevents the expansion and apposition observed in the wing pouch and consequently, instead of a flat wing-like structure, a globular-shaped haltere emerges. A summary of our results is shown in Fig. 8.

Ubx and regulation of ECM component expression

Previous studies have reported Collagen IV expression (and other components of the ECM) in the pupal wing disc (Fristrom et al., 1993; Murray et al., 1995). By using GFP protein trap lines, and in fixed tissue, we have shown that Perlecan and Collagen IV are eliminated from the wing pouch at 6 h APF because of high levels of

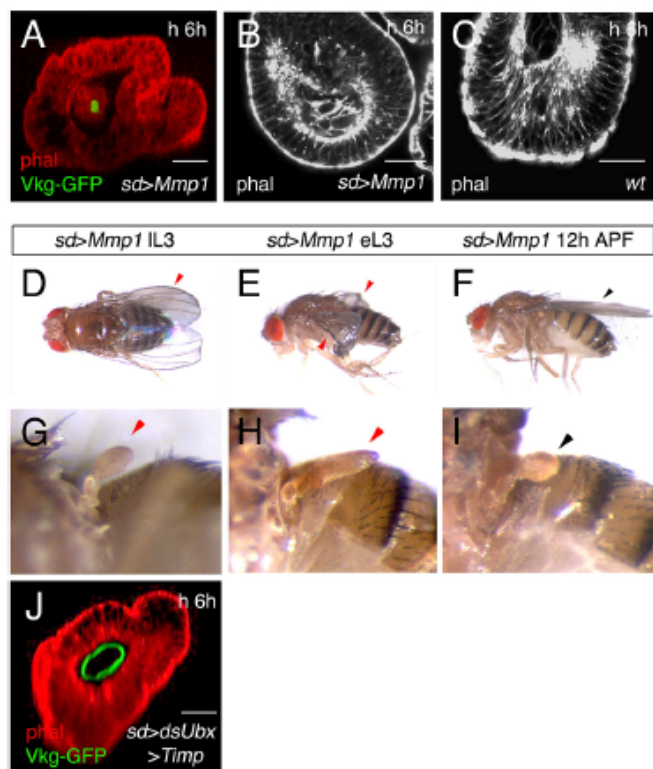


Fig. 6. Increasing *Mmp1* expression changes prepupal wing and haltere disc shape, and adult wing and haltere morphology. (A) In a *sd-Gal4 UAS-Mmp1 Vkg-GFP tub-Gal80^{ts}* haltere pouch at 6 h APF, after induction of *Mmp1* at the middle third instar, *Vkg-GFP* expression is not detected in the basement membrane (compare with the wild type in Fig. 3D) ($n=7$). (B,C) In optical transverse sections of these discs (distal part at the bottom) an increase in lumen size is observed, and the epithelium is cuboidal (B), rather than columnar pseudostratified, as in the wild type (C; see also Fig. 2D) ($n=4$). (D) In *sd-Gal4 UAS-Mmp1 tub-Gal80^{ts}* flies shifted from 17°C to 29°C at about middle-late third instar larvae (*sd>Mmp1* IL3) ($n=18$), several of the flies show a *dumpy* phenotype. About half of these flies (8/18) have halteres that show elongation and flattening of the capitellum (G; the wild type in Fig. 5H). (E) If the temperature shift is made at early-middle of the third larval instar (*sd>Mmp1* eL3), the adults show crumpled wings ($n=11$). (H) The halteres of most of these flies (7/11) are elongated and flattened, very noticeably in some specimens. (F,I) If the temperature shift is made at 12 h APF, the adults show wild-type wings and halteres ($n=15$). (J) Frontal section of a 6 h APF *sd-Gal4 UAS-dsUbx UAS-Timp tub-Gal80^{ts}* prepupa after a change from 17°C to 29°C at early third larval stage. There is a ring of *Vkg-GFP* expression at the basal side of cells abutting the lumen, and the disc has a haltere-like morphology (no dorso-ventral apposition or expansion), much more similar to *sd-Gal4 UAS-Timp* wing discs than to *sd-Gal4 UAS-dsUbx Df109* haltere discs (compare with Fig. 5A and Fig. 4G) ($n=10$). Black arrowheads indicate normal development; red arrowheads indicate abnormal development. Scale bars: 21 μ m.

Mmp1 activity, but persist at this stage in the haltere pouch. A microarray analysis of genes regulated by *Ubx* in the pupal haltere disc also identified *Mmp1* as a *Ubx* target, although the precise spatial and temporal expression of this gene was not described (Pavlopoulos and Akam, 2011). Our analysis shows that *Ubx* downregulates *Mmp1* expression in the haltere pouch at 3 h and 6 h APF, and that *Mmp1* degrades Collagen IV. By contrast, contribution of *Mmp2* to this regulation, based on its distribution, is probably negligible. We have also expressed an *Mmp2RNAi* line in wing and haltere discs with the *sd-Gal4* driver but found no phenotype (not shown). Our data thus argue that the ability of *Ubx* to attenuate *Mmp1* activity is crucial for haltere disc morphogenesis.

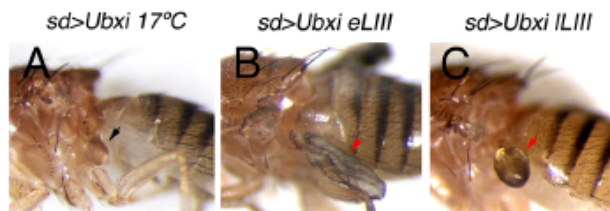


Fig. 7. Effect of downregulation of *Ubx* on size and shape. (A) Control haltere of an *sd-Gal4 UAS-dsUbx Df109 tub-Gal80^{ts}* fly grown at 17°C. The capitellum is slightly enlarged because of the haploinsufficiency for *Ubx* (*Df109*). (B) If larvae of the same genotype are shifted from 17°C to 29°C at about early third instar (*sd>Ubx* i eLIII), the halteres are transformed into small wings, most of them flat (17/27). (C) By contrast, if larvae of the same genotype undergo this shift at about late third instar (*sd>Ubx* i LIII), the halteres are enlarged, but are much smaller than the wings of the early shift and globular in shape (40/42). Black arrow indicates normal development; red arrows indicate abnormal development.

There is a correlation between elimination of *vkg* in wing discs at 6 h APF and pouch cells acquiring a more isodiametric shape. Our results are consistent with previous studies showing that the basement membrane constricts cells to give the columnar shape to the disc cells, and that upon degradation of ECM there is transition from a columnar pseudostratified epithelium to a cuboidal epithelium and a flattening of the tissue (Dominguez-Jiménez et al., 2007; Pastor-Pareja and Xu, 2011). This is what we observed in the wild-type pupal wing disc. Therefore, the rapid clearance of the ECM in the wing disc would lead to two events: first, the tissue expands as the shape of the cells changes from columnar to cuboidal; and second, the dorsal and ventral epithelia appose. If we inactivate *Mmp1* and prevent *Vkg* degradation by expressing *Ubx* or *Timp*, there is no dorso-ventral apposition and no expansion, thus resembling haltere disc development. Supporting our conclusions, previous experiments have reported that dorso-ventral adhesion is sensitive to ectopic *Ubx* only during the larval and prepupal stages (Pavlopoulos and Akam, 2011). This latter result also suggests that the second separation and adhesion of wing surfaces, which take place after prepupa (Fristrom et al., 1993), may not be as relevant for *Ubx* control of dorso-ventral adhesion as the gene regulation we have described at 3–6 h APF. Our data, therefore, strongly suggest that elimination of the ECM in the basal side of the wing pouch cells is indispensable for the flattening and expansion of the tissue and development of the wing. By preventing *Mmp* activity, and so preserving ECM integrity, ectopic *Ubx* makes the prepupal wing pouch acquire a haltere pouch-like shape. In the wild-type haltere disc, by reducing *Mmp1* expression *Ubx* delays basal ECM degradation, the transition from columnar to cuboidal epithelium, the early disc expansion, and the apposition of dorsal and ventral layers.

Even though the presence of ECM in the basal membrane, which is regulated by *Ubx*, is enough to prevent a wing shape, the absence of this regulation in the prepupa may not be sufficient to give a wing-like form to the haltere disc. If we force *Mmp1* expression in the haltere pouch, *Vkg-GFP* signal is not observed at 6 h APF and the epithelium is no longer pseudostratified, as in the wild-type wing pouch. However, ventral and dorsal layers do not make contact and there is no expansion of the tissue. We also noted that in the 9 h APF wild-type haltere pouch there is no Collagen IV in the basement membrane (and we do not know the mechanism that degrades it), but the shape of the cells and the absence of dorso-ventral apposition is different from the 9 h APF wing pouch. Apart from *Mmp1*, other genes are likely to have an impact in distinguishing wing and haltere morphology.

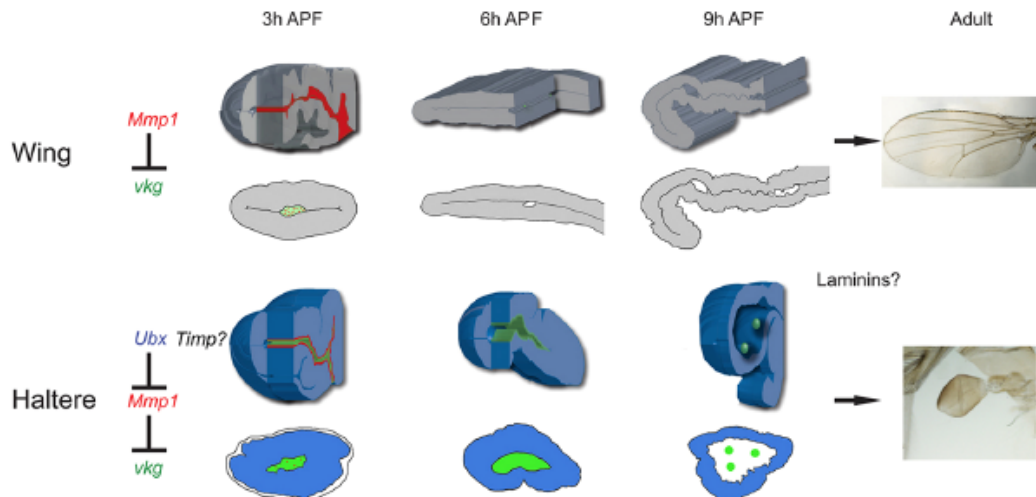


Fig. 8. Model of *Ubx* activity and the control of appendage shape. Simplified scheme of the early development of wing and haltere pupal discs, and the role of *Ubx* in the haltere disc. In the wing pouch, *Mmp1* expression at 3 h APF degrades *Vkg* and allows wing development. In the haltere pouch, *Ubx* downregulates *Mmp1* expression and therefore *Vkg* is not degraded. As a result, the expansion of the disc and apposition of dorsal and ventral surfaces, which are observed in the wing pouch, are prevented. There is probably also *Timp* protein expression in the haltere disc, and a role for laminins and other ECM components in determining shape.

For example, *blistered* (Fristrom et al., 1994) and laminin genes (Henchcliffe et al., 1993; Martin et al., 1999) are required to maintain a flat wing blade, and mutations in genes such as *dumpy*, *piopio* or *miniature*, which encode apical matrix proteins, also cause abnormal wing development (Carlson, 1959; Prout et al., 1997; Wilkin et al., 2000; Jaźwińska et al., 2003; Roch et al., 2003; Bökel et al., 2005; Ray et al., 2015). All these genes have been shown to be regulated by *Ubx* at different developmental stages (Roch et al., 1998; Slatery et al., 2011; Pavlopoulos and Akam, 2011). However, we have analyzed Laminin A expression (Sarav et al., 2016) and found no major difference between wing and haltere prepupal discs at 3–9 h APF (not shown). The apposition of dorsal and ventral surfaces probably needs the cooperation of mechanisms regulating apical and basal ECM proteins, and the way *Ubx* might control them to distinguish haltere from wing shape remains unexplored.

Timp and Mmp activity, and organ shape

The differences in ECM dynamics affect adult organ shape: changes in *Mmp1* activity impact pupal disc shape and adult dorsal appendage morphology. The interpretation of the results is somehow complicated because of the high lethality observed when expressing *Mmp1* at certain developmental stages. However, we find a broad correlation between *Mmp1* activity and organ shape: if *Mmp1* expression is increased, halteres are longer and flatter, and wings are shorter and crumpled; if *Mmp1* activity is reduced, the halteres are more round, and wings are shorter and more globular. Timing of major gene requirement for *Mmp1* expression does not seem to be the same for wing and haltere discs. Elevated *Timp* expression in the wing disc at late larval stages, or throughout development, prevents apposition of dorsal and ventral layers and expansion of the pouch, and the adults have inflated and abnormal wings. Although *Mmp1* expression in the haltere disc is low, high levels of *Timp* result in halteres with a slightly more globular form, suggesting that further reduction of *Mmp1* and *Mmp2* activity impacts haltere shape. Interestingly, the effects observed in both appendages occur when *Timp* is expressed in middle-late third instar larvae onwards, but not after 12 h APF. Therefore, the time when *Timp* expression affects appendage morphology includes the prepupal stage, when *Mmp* activity regulates the presence of *Vkg*-GFP.

In contrast, when *Mmp1* expression is forced in the haltere disc we see elongation and flattening of the haltere, but this diminishes if the expression is induced in late third instar larvae, suggesting *Mmp1* might affect haltere shape mainly, but not exclusively, at the early-middle third larval stage. It seems, therefore, that *Ubx* might control other pathways to maintain the globular haltere shape, even if *Vkg* is absent in prepupal stages. Supporting this, it has been demonstrated that simultaneous activation of the Akt pathway and downregulation of *expanded* (or activation of *Yorkie*) in the haltere disc also results in flattened halteres (Singh et al., 2015). These mechanisms might contribute to maintain the globular shape of the haltere pouch throughout the rest of the pupal development to form the adult appendage.

The control of size and shape by *Ubx*

The formation of an organ requires the coordination of mechanisms that regulate size, shape and differentiation. *Ubx* regulates haltere disc size by controlling the Decapentaplegic and Hippo pathways (Crickmore and Mann, 2006; de Navas et al., 2006; Makhijani et al., 2007; Singh et al., 2015). Most of these observations are based on *Ubx*-mediated regulation of patterning events in the third instar larval stage. Our results reported here suggest that *Ubx* may, to some extent, regulate haltere shape early in third instar larvae and that elimination of the *Hox* protein immediately before pupariation may change cell fate but not organ shape. A delayed effect of *Ubx* activity was also reported in the control of haltere cell differentiation (Roch and Akam, 2000). We also noticed that timing of *Ubx* expression, shape and size, might correlate in appendage development. The early downregulation of *Ubx* makes large appendages that are flat (small wings), but late downregulation produces smaller appendages that are globular. Although early overexpression of *Mmp1* makes halteres slightly bigger and flatter than those of the wild type, the conversion to a completely flat appendage might require its reaching a critical size. Cell differentiation, by contrast, might be changed by *Ubx* expression in pupal stages (Roch and Akam, 2000), suggesting differentiation might be uncoupled from size and shape. Further studies are required to understand how *Ubx* regulates gene expression to coordinate size, shape and differentiation in haltere development.

MATERIALS AND METHODS

Genetics

The following mutations were used: *pbx¹* (Lewis, 1963), *DfUbx¹⁰⁹* (Lewis, 1978) and *Hm* (Lewis, 1982). The Gal4/UAS system (Brand and Perrimon, 1993) was used to drive or inactivate gene expression with the following Gal4 and UAS lines: *sd-Gal4* (Calleja et al., 1996), *UAS-dsUbx* (Monier et al., 2005), and *UAS-Mmp1* and *UAS-Timp* (Page-McCaw et al., 2003). Other lines used were *Mmp2-GFP* (Deady et al., 2015), *vkg-GFP* (*vkg^{G454}*) and *troI-GFP* (*troI-GFP^{ZCL1700}*) (Morin et al., 2001), and DE-cad-Tomato (Huang et al., 2009). To activate or inactivate genes at precise times, we used the Gal4/Gal80^{ts} system (McGuire et al., 2003). The white pupa stage was taken as 0 h APF.

Immunocytochemistry

Staining of imaginal discs was performed as described previously (Roch and Akam, 2000), with slight modifications. The experiments comparing wing and haltere discs were carried out with the same experimental conditions of fixation, staining and acquisition using a confocal microscope. We used a mouse anti-Mmp1 monoclonal antibody cocktail (Page-McCaw et al., 2003; Developmental Studies Hybridoma Bank, 3A6B4, 3B8D12 and 5H7B11, 1:50), and TRITC-phalloidin (Sigma Aldrich, 1:200), Phalloidin-Atto 488 and Phalloidin-Atto 647N (Life Technologies, 1:200) to detect F-actin. Secondary antibodies were anti-mouse Alexa Fluor 448 and 555 (ThermoFisher Scientific, A-21202 and A-31570, respectively, 1:100). Images were taken with LSM710 vertical and LSM710 inverted multiphoton microscopes (Zeiss).

In situ hybridization

ISH was carried out as described in Wolff (2000). The probes were generated using the cDNA GH26186 from the collection of expression sequence tags (ESTs) of the Berkeley *Drosophila* Genome Project, with RNA polymerase T7 and SP6 promoter sequences in its ends. The transcription was carried out using the RNA polymerases T7 or SP6 (Roche) for 2 h.

Time-lapse movies

Time-lapse movies were captured of *ex vivo* imaginal discs as described in Aldaz et al. (2010) and Guamer et al. (2014), with small modifications. The time of development observed in the movies does not exactly agree with the time of development in pupae. We have taken the retraction of the peripodial membrane, which occurs at around 4 h APF, and the disc eversion as reference time points to analyze the presence of Vkg-GFP and TroI-GFP.

Measurements and statistical analysis

To quantify Mmp1 and Vkg-GFP levels in wing and haltere discs, we took pairs of discs from the same pupa and measured the intensity in 3 h APF wing and haltere segmented lumens using a user-made macro for phalloidin channel in Fiji. An RStudio macro was generated to normalize and generate a wing/haltere ratio, which was later implemented in Excel (Microsoft) to generate the average graphs. Analysis for both Mmp1 and Vkg-GFP was performed on six to eight discs. Images were taken using LSM710 vertical and LSM710 inverted multiphoton microscopes. A two-tailed Mann-Whitney-Wilcoxon test was used to compare wild-type wing and haltere samples, wild-type and *Hm* wings, and wild-type and *sd-Gal4* UAS-UbxRNAi halteres.

Acknowledgements

We thank Antonio Tarruell for collaborating in the study of the adult phenotypes; M. Akam, María Dolores Martín-Bermudo, the *Drosophila* Bloomington Stock Center, the Vienna *Drosophila* RNAi Centre, and the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) at the University of Iowa for providing stocks and antibodies; and the confocal microscopy service at the CBMSO for excellent service. We thank members of E.S.-H.'s and L.S.S.'s labs for help and comments, and Y. Bellaïche, J. Casanova and G. Deshpande for comments on the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: J.M.D.H., E.S.-H.; Formal analysis: J.M.D.H., C.G.-C., D.F., J.C.P.-P., L.S.S., E.S.-H.; Investigation: J.M.D.H., C.G.-C., D.F.; Writing - original

draft: E.S.-H.; Writing - review & editing: J.M.D.H., C.G.-C., D.F., J.C.P.-P., L.S.S., E.S.-H.; Funding acquisition: L.S.S., E.S.-H.

Funding

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2011-26075 to E.S.-H.); the Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España (BFU2014-51989-P to E.S.-H.); by a Spanish-Indian Program, the Department of Scientific and Industrial Research, Ministry of Science and Technology (DST/INT/Spain/P-12/2009 to L.S.S.) and the Ministerio de Ciencia e Innovación (ACI2009-0857 to E.S.-H.); and by the Fundación Ramón Areces (institutional grant) to E.S.-H.

Data availability

Macros for the quantification of Mmp1 and Vkg in wing and haltere discs have been deposited in Figshare under accession number 10.6084/m9.figshare.6615218.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.161844.supplemental>

References

- Aldaz, S., Escudero, L. M. and Freeman, M. (2010). Live imaging of *Drosophila* imaginal disc development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 14217-14222.
- Baena-López, L. A., Baonza, A. and García-Bellido, A. (2005). The orientation of cell divisions determines the shape of *Drosophila* organs. *Curr. Biol.* **15**, 1640-1644.
- Blair, S. S. (2007). Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 293-319.
- Bökel, C., Prokop, A. and Brown, N. H. (2005). Papillote and Piopio: *Drosophila* ZP-domain proteins required for cell adhesion to the apical extracellular matrix and microtubule organization. *J. Cell Sci.* **118**, 633-642.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Cabrera, C. V., Botas, J. and García-Bellido, A. (1985). Distribution of Ultrabithorax proteins in mutants of *Drosophila* bithorax complex. *Nature* **318**, 569-571.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-255.
- Carlson, E. A. (1959). Allelism, complementation, and pseudoallelism at the dumpy locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **44**, 347-373.
- Cohen, S. M. (1993). Imaginal disc development. In *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. M. Bate and A. Martínez-Arias), pp. 747-841. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Crest, J., Diz-Muñoz, A., Chen, D. Y., Fletcher, D. A. and Bilder, D. (2017). Organ sculpting by patterned extracellular matrix stiffness. *Elife* **6**, e24958.
- Crickmore, M. A. and Mann, R. S. (2006). Hox control of organ size by regulation of morphogen production and mobility. *Science* **313**, 63-68.
- Deady, L. D., Shen, W., Mosure, S. A., Spradling, A. C. and Sun, J. (2015). Matrix metalloproteinase 2 is required for ovulation and corpus luteum formation in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **11**, e1004989.
- de Navas, L. F., Garaulet, D. L., and Sanchez-Herrero, E. (2006). The Ultrabithorax Hox gene of *Drosophila* controls haltere size by regulating the Dpp pathway. *Development* **133**, 4495-4506.
- Diaz de la Loza, M. C. and Thompson, B. J. (2017). Forces shaping the *Drosophila* wing. *Mech. Dev.* **144**, 23-32.
- Dickinson, M. H. (1999). Haltere-mediated equilibrium reflexes of the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **354**, 903-916.
- Domínguez-Jiménez, P., Brown, N. H. and Martín-Bermudo, M. D. (2007). Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the *Drosophila* wing epithelium. *J. Cell Sci.* **120**, 1061-1071.
- Etournay, R., Popović, M., Merkel, M., Nandi, A., Blasse, C., Aigouy, B., Brandl, H., Myers, G., Salbreux, G., Jülicher, F. et al. (2015). Interplay of cell dynamics and epithelial tension during morphogenesis of the *Drosophila* pupal wing. *Elife* **4**, e07090.
- Fristrom, D. (1976). The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. III. Evidence for cell rearrangement. *Dev. Biol.* **54**, 163-171.
- Fristrom, D. and Fristrom, J. W. (1975). The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. 1. General considerations. *Dev. Biol.* **43**, 1-23.
- Fristrom, D. and Fristrom, J. W. (1993). The metamorphic development of the adult epidermis. In *The Development of Drosophila melanogaster* (ed. M. Bate and A. Martínez-Arias), pp. 843-897. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fristrom, D., Wilcox, M. and Fristrom, J. (1993). The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in *Drosophila* wing development. *Development* **117**, 509-523.
- Fristrom, D., Gotwals, P., Eaton, S., Kornberg, T. B., Sturtevant, M., Bier, E. and Fristrom, J. W. (1994). blistered: a gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*. *Development* **120**, 2661-2671.
- Gilmour, D., Rembold, M. and Leptin, M. (2017). From morphogens to morphogenesis and back. *Nature* **541**, 311-320.

- Godenschwege, T. A., Pohar, N., Buchner, S. and Buchner, E. (2000). Inflated wings, tissue autolysis and early death in tissue inhibitor of metalloproteinases mutants of *Drosophila*. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 495-501.
- Guamer, A., Manjón, C., Edwards, K., Steller, H., Suzanne, M. and Sánchez-Herrero, E. (2014). The zinc finger homeodomain-2 gene of *Drosophila* controls Notch targets and regulates apoptosis in the tarsal segments. *Dev. Biol.* **385**, 350-365.
- Guirao, B., Rigaud, S. U., Bosveld, F., Bailles, A., López-Gay, J., Ishihara, S., Sugimura, K., Graner, F. and Bellaïche, Y. (2015). Unified quantitative characterization of epithelial tissue development. *Elife* **4**, e08519.
- Haigo, S. L. and Bilder, D. (2011). Global tissue revolutions in a morphogenetic movement controlling elongation. *Science* **331**, 1071-1074.
- Henchcliffe, C., Garcia-Alonso, L., Tang, J. and Goodman, C. S. (1993). Genetic analysis of laminin A reveals diverse functions during morphogenesis in *Drosophila*. *Development* **118**, 325-337.
- Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A. M. and Hong, Y. (2009). Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 8284-8289.
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216-1219.
- Jaźwińska, A., Ribeiro, C. and Affolter, M. (2003). Epithelial tube morphogenesis during *Drosophila* tracheal development requires Piopio, a luminal ZP protein. *Nat. Cell Biol.* **5**, 895-901.
- Klein, T., Brennan, K. and Martínez-Arias, A. (1997). An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **189**, 123-134.
- LaFever, K. S., Wang, X., Page-McCaw, P., Bhawe, G. and Page-McCaw, A. (2017). Both *Drosophila* matrix metalloproteinases have released and membrane-tethered forms but have different substrates. *Sci. Rep.* **7**, 44560.
- LeBleu, V. S., Macdonald, B. and Kalluri, R. (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp. Biol. Med.* **232**, 1121-1129.
- Lewis, E. B. (1963). Genes and developmental pathways. *Am. Zool.* **3**, 33-56.
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-570.
- Lewis, E. B. (1982). Control of body segment differentiation in *Drosophila* by the bithorax gene complex. In *Embryonic Development, Part A: Genetic Aspects* (ed. M.M. Burger and R. Weber), pp. 269-288. New York, USA: Alan R. Liss.
- Llano, E., Pendás, A. M., Aza-Blanc, P., Kornberg, T. B. and López-Otín, C. (2000). Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. *J. Biol. Chem.* **275**, 35978-35985.
- Llano, E., Adam, G., Pendás, A. M., Quesada, V., Sánchez, L. M., Santamaria, I., Noselli, S. and López-Otín, C. (2002). Structural and enzymatic characterization of *Drosophila* Dm2-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase with tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 23321-23329.
- Makhijani, K., Kalyani, C., Srividya, T. and Shashidhara, L. S. (2007). Modulation of Decapentaplegic gradient during haltere specification in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **302**, 243-255.
- Martin, D., Zusman, S., Li, X., Williams, E. L., Khare, N., DaRocha, S., Chiquet-Ehrismann, R. and Baumgartner, S. (1999). *wing blister*, a new *drosophila* Laminin A chain required for cell adhesion and migration during embryonic and imaginal development. *J. Cell Biol.* **145**, 191-201.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. and Davis, R. L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-1768.
- Monier, B., Astier, M., Sémériva, M. and Perrin, L. (2005). Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart. *Development* **132**, 5283-5293.
- Morata, G. and Garcia-Bellido, A. (1976). Developmental analysis of some mutants of the bithorax system of *Drosophila*. *Wilehm Roux Arch. Dev. Biol.* **179**, 125-143.
- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M. and Chia, W. A. (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 15050-15055.
- Murray, M. A., Fessler, L. I. and Palka, J. (1995). Changing distributions of extracellular matrix components during early wing morphogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **168**, 150-165.
- Page-McCaw, A. (2008). Remodeling the model organism: matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 14-23.
- Page-McCaw, A., Serano, J., Santé, J. M. and Rubin, G. M. (2003). *Drosophila* matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Dev. Cell* **4**, 221-233.
- Park, Y., Rangel, C., Reynolds, M. M., Caldwell, M. C., Johns, M., Nayak, M., Welsh, C. J., McDermott, S. and Datta, S. (2003). *Drosophila* perlecan modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cell division. *Dev. Biol.* **253**, 247-257.
- Pastor-Pareja, J. C. and Xu, T. (2011). Shaping cells and organs in *Drosophila* through the opposing effects of fat body-secreted Collagen IV and Perlecan. *Dev. Cell* **21**, 245-256.
- Pavlopoulos, A. and Akam, M. (2011). Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of *Drosophila* haltere morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 2855-2860.
- Prout, M., Damania, Z., Soong, J., Fristrom, D. and Fristrom, J. W. (1997). Autosomal mutations affecting adhesion between wing surfaces in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **146**, 275-285.
- Ray, R. P., Matamoros-Vidal, A., Ribeiro, P. S., Tapon, N., Houle, D., Salazar-Ciudad, I. and Thompson, B. J. (2015). Patterned anchorage to the apical extracellular matrix defines tissue shape in the developing appendages of *drosophila*. *Dev. Cell* **34**, 310-322.
- Roch, F. and Akam, M. (2000). Ultrabithorax and the control of cell morphology in *Drosophila* halteres. *Development* **127**, 97-107.
- Roch, F., Baonza, A., Martín-Blanco, E. and García-Bellido, A. (1998). Genetic interactions and cell behaviour in blistered mutants during proliferation and differentiation of the *Drosophila* wing. *Development* **125**, 1823-1832.
- Roch, F., Alonso, C. R. and Akam, M. (2003). *Drosophila* miniature and dusky encode ZP proteins required for cytoskeletal reorganisation during wing morphogenesis. *J. Cell Sci.* **116**, 1199-1207.
- Sarov, M., Barz, C., Jambor, H., Hein, M. Y., Schmied, C., Suchold, D., Stender, B., Janosch, S., Vinay Vikas, K. J., Krishnan, R. T. et al. (2016). A genome-wide resource for the analysis of prote in localisation in *Drosophila*. *Elife* **25**, e12068.
- Singh, S., Sánchez-Herrero, E. and Shashidhara, L. S. (2015). Critical role for Fat/Hippo and IIS/Akt pathways downstream of Ultrabithorax during haltere specification in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **138**, 198-209.
- Slattery, M., Ma, L., Négre, N., White, K. P. and Mann, R. S. (2011). Genome-wide tissue-specific occupancy of the Hox protein Ultrabithorax and Hox cofactor Homothorax in *Drosophila*. *PLoS ONE* **6**, e14686.
- Srivastava, A., Pastor-Pareja, J. C., Igaki, T., Pagliarini, R. and Xu, T. (2007). Basement membrane remodeling is essential for *Drosophila* disc eversion and tumor invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 2721-2726.
- Voigt, A., Pflanz, R., Schäfer, U. and Jäckle, H. (2002). Perlecan participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Dev. Dyn.* **224**, 403-412.
- Wei, S., Xie, Z., Filenova, E. and Brew, K. (2003). *Drosophila* TIMP is a potent inhibitor of MMPs and TACE: similarities in structure and function to TIMP-3. *Biochemistry* **42**, 12200-12207.
- White, R. A. H. and Akam, M. (1985). *Contrabithorax* mutations cause inappropriate expression of *Ultrabithorax* products in *Drosophila*. *Nature* **318**, 567-569.
- Wilkin, M. B., Becker, M. N., Mulvey, D., Phan, I., Chao, A., Cooper, K., Chung, H.-J., Campbell, I. D., Baron, M. and MacIntyre, R. (2000). *Drosophila* dumpy is a gigantic extracellular protein required to maintain tension at epidermal-cuticle attachment sites. *Curr. Biol.* **18**, 559-567.
- Wolff, T. (2000). Histological techniques for the *Drosophila* eye. Part I: Larva and Pupa. In *Drosophila Protocols* (ed. W. Sullivan, M. Aahbumer and R. S. Hawley), pp. 210-227. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Yasothornsrikul, S., Davis, W. J., Cramer, G., Kimbrell, D. A. and Dearolf, C. R. (1997). viking: identification and characterization of a second type IV collagen in *Drosophila*. *Gene* **198**, 17-25.

