

03040

12



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Centro de Neurobiología

CARACTERIZACION DE GENES QUE
PARTICIPAN EN EL CERRADO DORSAL EN
Drosophila melanogaster.

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

Presenta

María Teresa Peña Rangel

Querétaro, Qro.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Genética de Transducción de Señales, del Departamento de Neurobiología del Desarrollo, del Centro de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla, bajo la dirección del Dr. Juan R. Riesgo Escovar.

INDICE

	Pág
RESUMEN.....	5
SUMMARY.....	7
INTRODUCCION	
I. Desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	
1) Generalidades.....	9
2) Desarrollo embrionario.....	9
a) Alargamiento/retracción de la banda germinal y cerrado dorsal..	12
3) Etapas larvarias y metamorfosis.....	14
a) Discos imaginales.....	16
b) Cerrado torácico	14
c) Formación de las quetas en el tórax.....	17
4) Participación de genes en diferentes etapas del desarrollo	
a) Genes requeridos en la elongación/retracción de la banda germinal.....	18
b) Genes requeridos en el cerrado dorsal y en el cerrado torácico	
Genes de la vía DJNK.....	20
Genes de la vía Dpp.....	22
<i>pannier (pnr)</i> , otro gen requerido en el cerrado dorsal y en la for- mación del tórax.....	23
c) Genes requeridos en la formación de las quetas.....	24
II. Tamizaje o "screen" genético.....	27
III. Obtención de alelos por escisión imprecisa del elemento P.....	30
IV. Mosaicos genéticos.....	31
OBJETIVO.....	33
HIPOTESIS.....	33
MATERIAL Y METODOS	
I. Mantenimiento de las cepas.....	34
II. Tamizaje o "screen" genético.....	34
III. Colecta de embriones.....	34

IV. Preparación de las cutículas embrionarias.....	35
V. Obtención de alelos por escisión imprecisa del elemento P.....	35
VI. Mosaicos genéticos	
1) Generación de líneas recombinantes	37
2) Inducción de clonas mutantes.....	38
3) Clonas de línea germinal.....	39
VII. Disección de discos imaginales e inmunotinción.....	39
VIII. Fijación de ojos y cortes para observación de clonas mutantes de <i>poco pelo</i>	40
IX. Fijación de adultos para microscopía electrónica de barrido.....	41
X. Hibridación <i>in situ</i> en embriones mutantes de <i>poco pelo</i>	41
RESULTADOS Y DISCUSION	
<i>poco pelo</i>	
1. Expresión alterada de <i>poco pelo</i> con diferentes líneas Gal4.....	45
2. Obtención de alelos por escisión imprecisa del elemento P.....	46
3. Pruebas de complementación.....	46
4. Fenotipo embrionario de diferentes escisiones de <i>poco pelo</i>	47
5. Interacciones genéticas	
a) <i>poco pelo</i> y <i>pannier</i>	48
b) <i>poco pelo</i> y <i>u-shaped</i>	50
6. Efectos de la falta de función de <i>poco pelo</i> sobre la expresión de <i>dpp</i> durante el cerrado dorsal.....	54
7. Efectos de la falta de función de <i>poco pelo</i> en el adulto	
a) Clonas mutantes de <i>poco pelo</i> en el tórax y el ala.....	55
b) Clonas mutantes de <i>poco pelo</i> en el ojo.....	56
c) Clonas de línea germinal.....	57
8. Efectos de la falta de función de <i>poco pelo</i> sobre la expresión de <i>scute</i>	57
CONCLUSIONES	60
REFERENCIAS	62

RESUMEN

Nuestro interés está centrado en entender los mecanismos involucrados en dos procesos del desarrollo de *Drosophila*: el cerrado dorsal y la formación del tórax. El cerrado dorsal es un proceso que ocurre durante la embriogénesis y consiste básicamente en el cambio de forma de células epiteliales ectodérmicas, el epitelio lateral. Estas células se estiran y cierran por la parte dorsal al embrión en desarrollo. Este proceso requiere de genes estructurales como miosinas no musculares e integrinas y otras proteínas del citoesqueleto y de proteínas de vías de señalización como, la vía de la cinasa de Jun y la vía Dpp, este último un homólogo de TGF- β de vertebrados. Se requiere también de otros genes como *pannier* (*pnr*), un gen de prepatrón.

Durante la formación del tórax ocurre otro evento morfogénico conocido como cerrado torácico en donde las células del borde del compartimento dorsal de los discos imaginales del ala, experimentan cambios de forma hasta su fusión, en la región media del futuro tórax. Algunos de los genes involucrados en el cerrado torácico también son miembros de la vía de la cinasa de Jun y de la vía Dpp y también participan elementos del citoesqueleto y *pnr*. Por lo tanto, el cerrado dorsal y el cerrado torácico son procesos con mecanismos moleculares muy similares.

El objetivo del trabajo fue identificar nuevos genes implicados en el cerrado dorsal y en la formación del tórax. Esto se hizo usando como estrategia el tamizaje genético de expresión modificada de genes endógenos. Para llevar a cabo la expresión modificada de genes endógenos se usaron líneas transgénicas de *Drosophila* cada una de las cuales tiene un elemento P insertado en un gen endógeno. Los elementos P tienen secuencias de unión para el activador transcripcional Gal4 de levadura y su presencia altera la expresión del gen adyacente al elemento P cuando hay Gal4 presente. En el tamizaje se usó un fondo sensibilizado que es un fenotipo adulto dominante producto de una mutación en *pnr*. Esta consiste en una ligera hendidura en la parte media del tórax como resultado de defectos en el cerrado torácico y falta de algunas quetas. Esta mutación se debe a la inserción de un elemento P en *pnr* que activa la expresión del activador Gal4 en el patrón de expresión de *pnr*.

Se partió de la hipótesis siguiente: aquellos genes en los que una alteración en su expresión produjera modificaciones al fenotipo mutante de *pnr*, estarían involucrados en la formación del tórax y muy probablemente en el cerrado dorsal. Se hicieron cruza entre aproximadamente 2,100 líneas transgénicas y esta mutante de *pnr*. Aproximadamente un 9% de las líneas transgénicas utilizadas mostraron modificaciones del fenotipo de *pnrGal4*. Algunas de las modificaciones fueron de acentuación, con alteraciones en el número y/o localización de las quetas y malformaciones en el notum. Otras modificaciones fueron de supresión del fenotipo de *pnrGal4* y en algunos casos también se produjo letalidad en diferentes etapas del desarrollo. Varios de los genes identificados están ya caracterizados y está descrito que se requieren para la formación del tórax. Además, identificamos resultados novedosos en otro grupo de genes que aunque ya están caracterizados, no se habían relacionado con el desarrollo de esta estructura: por ejemplo, los genes de los complejos remodeladores de la cromatina como *kismet*. Estos resultados son novedosos. Finalmente se identificó a un último grupo de genes que se localizan en 142 *loci* aún no caracterizados (correspondiendo al 85% de las líneas transgénicas analizadas). Una línea de este tercer grupo de genes se ha estudiado más a fondo: *poco pelo* (*ppo*). Hemos demostrado que *ppo* es un gen requerido en diferentes etapas del desarrollo en *Drosophila*. Algunos de los alelos mutantes de *ppo* obtenidos son letales embrionarias con defectos en la elongación-retracción de la banda germinal y defectos en el cerrado dorsal. *ppo* también se requiere en el desarrollo del ala, del ojo y del tórax. En particular, la falta de función de *ppo* en el tórax produce falta de órganos sensoriales, de ahí su nombre. *poco pelo* se localiza en el brazo izquierdo del segundo cromosoma y mapea en la región 32D. Resultados de experimentos genéticos nos permiten proponer que *ppo* interactúa con un componente de la vía JNK y con *pannier* y *u-shaped*, dos genes de prepatrón. En conclusión, el tamizaje genético de expresión alterada es una herramienta muy útil para identificar genes potenciales que participan en diferentes etapas y procesos durante el desarrollo.

SUMMARY

We are interested in understanding the mechanisms involved in two processes during *Drosophila* development: dorsal closure and thorax formation. Dorsal closure is a process that occurs during embryogenesis, and consists of changes in cell shape in the lateral epithelium. These cells spread and cover the embryo in the dorsal region during midembryogenesis. In general, two kinds of genes are required for this process: a) genes coding for structural proteins like nonmuscle myosin, integrins, and proteins of the cytoskeleton, and b) genes coding for proteins of signaling pathways like the JNK and Dpp cascades (Dpp is a homolog of TGF- β in *Drosophila*). Other genes like *pannier* (*pnr*), a prepatter gene, are also required.

Thoracic closure occurs during thorax formation. In thoracic closure, the cells of the dorsal imaginal epithelial sheets of the wing discs spread and assemble the continuous epidermal structure of the future thorax. Several genes required for embryonic dorsal closure including JNK pathways genes, genes coding for cytoskeletal proteins, and others like *pnr* are also required for thoracic closure. Thus, dorsal and thoracic closures are processes that share molecular mechanisms.

We sought to identify new genes required for dorsal closure and thorax formation. In order to do so, we performed a misexpression screen using *Drosophila* transgenic lines harbouring EP elements containing UAS sites where the yeast transcription factor Gal4 can bind. We misexpressed genes 3' of these insertions by means of a Gal4-expressing line, a dominant mutant allele of *pnr*. This allowed us to perform the screen in a sensitized genetic background. *pnrGal4/+* flies have a slight dorsal thoracic cleft, sometimes missing a few bristles. This allele is an insertion in the *pnr* promoter. Our hypothesis was that genes 3' of the insertions misexpressed in the thorax could result in a modification of the *pnrGal4* phenotype. These genes were good candidates for genes required for thorax formation. The molecular similarities between dorsal and thoracic closures could mean that genes recovered in the screen could also be required for dorsal closure.

We screened 2100 EP lines from which 9% produced modifications of the *pnrGal4/+* phenotype. Some of them showing alterations of thoracic bristles (number and/or location), and notum malformations. Others produced

suppression of the *pnrGal4/+* phenotype, or were lethal at different stages of development.

From these, a few lines identified genes previously characterized in thoracic formation. In contrast, most lines identified genes that had not been implicated in thorax formation. An example is the *kismet* gene of the BRM complex, a *Drosophila* chromatin-remodeling complex. In total, we identified 142 hitherto uncharacterized candidate genes required for thoracic closure (85% of the lines screened).

We focused on the analysis of one of them: a gene we call *poco pelo* (*ppo*). We demonstrate that *ppo* is a gene required at different stages during *Drosophila* development. *ppo* mutant alleles are embryonic lethal with defects at the extended germ band and dorsal closure stages. Besides, *ppo* is involved in wing and eye development, and loss-of-function clones of *ppo* in the dorsal thorax show loss of bristles. The *ppo* insertion maps at 32D1 of the polytene chromosome map. In addition, *ppo* interacts genetically with *pnr* and *ush*, two prepatter genes, and with a member of the JNK signaling pathway.

INTRODUCCION

I. Desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

1) Generalidades.

El modelo de *Drosophila* ha sido muy útil para estudiar varios aspectos del desarrollo. La gran cantidad de información que se ha obtenido en este sistema nos permite entender como los genes controlan el desarrollo del esquema corporal, definiendo los patrones espaciales y temporales de los diferentes tipos celulares y en consecuencia cada una de las partes del cuerpo. También es importante porque nos permite conocer aspectos genéticos fundamentales del desarrollo animal, ya que una gran cantidad de genes de *Drosophila* tienen homólogos en otros phyla incluidos los mamíferos. Además, actualmente se ha completado la secuenciación del genoma de *Drosophila*, lo que brinda grandes ventajas para una amplia diversidad de estudios funcionales (Adams et al., 2000).

El desarrollo embrionario en *Drosophila melanogaster* dura aproximadamente 24 horas a partir de la fecundación. Después, el embrión pasa por tres fases larvarias con una duración total de 4 a 5 días. Posteriormente, las larvas del tercer estadio se transforman en pupas. Esta fase dura alrededor de 4 a 5 días y de la pupa emerge el adulto o imago. A continuación se describen los principales cambios morfológicos que ocurren a lo largo de la embriogénesis con especial énfasis en el momento en que se lleva a cabo el alargamiento/retracción de la banda germinal y el cerrado dorsal. Este último es uno de los fenómenos a estudiar en este proyecto junto con la formación del tórax al final de las fases larvarias y durante la metamorfosis.

2) Desarrollo embrionario.

La fecundación del huevo ocurre en el útero. Durante las dos primeras horas, el huevo es un sincitio, es decir, se llevan a cabo varias divisiones nucleares y los núcleos comparten un mismo citoplasma, lo que facilita la libre difusión de los productos de los genes maternos. A partir de la tercera división se inicia la etapa 2, durante la cual los núcleos se dividen cada 10 minutos en promedio y de manera

sincronizada. Después de 9 divisiones, la mayoría de los núcleos migran hacia la superficie del embrión y se da inicio a la etapa 3. En esta etapa varios de los núcleos localizados aún en el centro del embrión forman ahí los vitelófagos mientras que otro grupo de núcleos se dirigen al polo posterior dando origen a las células polares que son las precursoras de la línea germinal. La diferenciación de las células germinales es el primer ejemplo de diferenciación celular en el embrión de *Drosophila*. Estas células polares se individualizan (celularizan) del blastodermo y continúan dividiéndose bajo su propio esquema.

Durante la etapa 4, los núcleos del blastodermo todavía como sincitio experimentan las últimas 4 divisiones nucleares. Estas se llevan a cabo cada 20 minutos. El embrión aumenta considerablemente de tamaño y la etapa termina con el inicio de la celularización. En la etapa 5, la celularización ocurre gracias a la fusión de vesículas citoplásmicas derivadas del retículo endoplásmico, produciéndose así la formación de las membranas plasmáticas. Durante este proceso el tamaño de los núcleos aumenta de 3-4 μm a 10-15 μm . Es al final de esta fase cuando se inicia la gastrulación que permitirá la formación de la mayor parte de los órganos internos, un evento común en el desarrollo animal. En la etapa 6, un grupo de células blastodérmicas en la parte media ventral se invagina y forma el mesodermo que dará origen a órganos internos y músculos. La capa de células externas formarán el ectodermo que dará origen a la epidermis y a los sistemas nervioso central y periférico. Un grupo de células del mesodermo y del ectodermo a lo largo de la línea media ventral en dirección antero-dorsal formará la **banda germinal** y parte del futuro sistema nervioso central.

En la etapa 7 continúa la gastrulación y se hacen visibles dos pliegues, el anterior transversal y el posterior transversal. Gran parte de las células que forman los surcos constituyen el primordio de la **amnioserosa**, una membrana extraembrionaria que juega un papel fundamental durante el cerrado dorsal, como se describirá mas adelante. A su vez, un grupo de células ectodérmicas localizadas en la parte anterior del surco cefálico, en la parte dorsolateral, dará origen a los neuroblastos del lóbulo procefálico (parte del cerebro). Al final de esta etapa y al principio de la etapa 8, ocurre otro evento morfogénético que se describirá con detalle más adelante, la elongación de la **banda germinal**. La **banda germinal** se extiende hacia la parte posterior del embrión y se curva hacia arriba. En la etapa

9, las células mesodérmicas experimentan una reorganización que se traduce en la iniciación de la segmentación. Otro de los principales eventos es la segregación de dos poblaciones de neuroblastos, pues el ectodermo neurogénico tiene una región laterodorsal que dará lugar a los ganglios supraesofágicos y una ventromedial que dará origen a los ganglios subesofágicos. Durante la etapa 10, las células polares migran a ambos lados del primordio del intestino. En esta etapa se hace muy evidente la segmentación de la banda germinal. En la etapa 11 se hacen muy notables los surcos intersegmentales. Para este momento hay una gran cantidad de células ganglionares en el lóbulo procefálico y empieza a evidenciarse el primordio del lóbulo óptico y tres primordios del sistema nervioso estomagástrico. En la etapa 12 el principal acontecimiento es la retracción de la **banda germinal** lo que hace que la **amnioserosa** quede cubriendo la parte dorsal del embrión. También en esta etapa migran las células polares hacia la posición en donde se formarán las gónadas y el cordón nervioso ventral se separa completamente de la epidermis y aparecen las primeras fibras y procesos neurales. Durante la etapa 13 se completa el acortamiento de la **banda germinal**. En esta etapa las células de los primordios de la mayor parte de los órganos empiezan su diferenciación. Ocurren también dos eventos morfogénéticos muy importantes: la invaginación de la cabeza y el **cerrado dorsal**, (este último, uno de los objetos de estudio del proyecto de investigación). Durante esta etapa las células dorsolaterales del epitelio lateral empiezan a alargarse sobre la amnioserosa hacia la línea media del embrión. Este es el inicio del **cerrado dorsal** que se describirá con detalle más adelante. En esta fase, en el sistema nervioso central se diferencian los ganglios supraesofágico y subesofágico. En la etapa 14, continúa el cerrado dorsal y la invaginación de la cabeza en donde varias regiones no segmentadas de la parte más anterior del embrión involucionan. En la etapa 15 se completa el **cerrado dorsal** y la **amnioserosa** se invagina experimentando apoptosis posteriormente. El intestino forma un tubo cerrado. Puesto que las estructuras de la cabeza se desplazaron hacia el interior, los segmentos del tronco experimentan una expansión. Durante las dos últimas etapas del desarrollo, etapas 16 y 17, la epidermis inicia la secreción de la cutícula. Aparece el proventrículo o válvula cardíaca. Se hacen visibles las especializaciones de la cutícula como los dentículos ventrales, las quetas dorsales, etc. Al finalizar la etapa 17, los precursores de la epidermis del adulto que será completamente

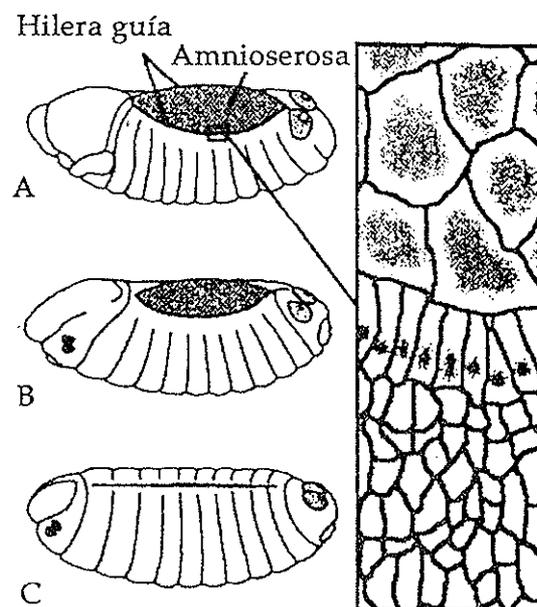
independiente de la epidermis larval, ya se han invaginado como discos imaginales conectados a la epidermis larval. En esta etapa termina el desarrollo embrionario (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

a) Alargamiento/retracción de la banda germinal y cerrado dorsal.

Entre las etapas 7 y 12 ocurre un evento morfogénico que se conoce como alargamiento/retracción de la banda germinal y que precede al cerrado dorsal. La banda germinal comprende los primordios de los segmentos mandibular, maxilar y del labial, los de los 3 segmentos torácicos y los 8 abdominales. Cada primordio de la banda germinal tiene la misma organización con componentes epidérmicos, neurales y mesodérmicos (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997). En la extensión de la banda germinal hay mayor cantidad de rearrreglos celulares que de cambios de forma celular, intercalándose muchas células a lo largo del eje anteroposterior con la resultante disminución en el eje dorsoventral (Irvine y Wieschaus, 1994). En esta etapa la banda germinal tiene la característica forma de "U", con la parte caudal plegada sobre la región dorsal. Durante la retracción de la banda hay una combinación de cambios de forma celular en la epidermis y rearrreglos, siendo más importantes los primeros. Esto da como consecuencia el desplazamiento de la parte caudal a la región posterior del embrión. Se han descrito mutaciones en varios genes del grupo "*U-shaped*" que alteran no tan solo el proceso de alargamiento/acortamiento de la banda germinal sino también el cerrado dorsal.

El cerrado dorsal se lleva a cabo de las etapas 13 a 15. Se conocen algunos aspectos sobre la biología celular de los elementos que participan en el cerrado dorsal gracias al estudio y caracterización de mutantes. El cerrado dorsal consiste en una fase de diferenciación de las células de la hilera guía (leading edge), la hilera de células más dorsales del epitelio lateral. Durante el acortamiento de la banda germinal las células de la hilera guía forman un epitelio columnar con una polaridad bien definida. En estas células el núcleo se ubica ventralmente, es decir hacia el lado opuesto a la amnioserosa y acumulan actina y miosina no muscular de tipo II, en la parte apical. Otro aspecto notable es la ausencia de moléculas de adhesión del tipo de la fasciclina III y la neurotactina entre estas células y la amnioserosa. Hasta hace algún tiempo se consideró a la amnioserosa como un

sustrato pasivo durante el cerrado dorsal; sin embargo estudios más recientes muestran un papel muy activo de esta capa celular en el cerrado dorsal. Los análisis de filmaciones sobre el comportamiento de las células de la amnioserosa durante el cerrado revelan una contracción masiva en su superficie apical. Imágenes de microscopia electrónica de transmisión también han demostrado una fuerte constricción en su membrana apical. Por lo tanto, el cerrado dorsal es el producto de los movimientos coordinados de dos tejidos como respuesta a eventos de señalización entre la amnioserosa y el ectodermo dorsal (Stronach y Perrimon, 2001), en donde los movimientos son el alargamiento y desplazamiento de las células del epitelio lateral y la contracción de la superficie apical de las células de la amnioserosa que favorece el acercamiento entre los frentes del epitelio lateral (Jacinto y Martín, 2001). Conforme se acercan los dos frentes epiteliales se forman filopodios y lamelipodios de las células de la hilera guía, que son extensiones a base de actina (Jacinto et al., 2000). Una vez que las células de la amnioserosa pierden contacto con las células epidérmicas, se acercan al corazón en desarrollo y posteriormente experimentan apoptosis. Cuando se completa el cerrado dorsal las células en la línea media dorsal permanecen alineadas un tiempo y después se interdigitan (Figura 1).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Cerrado dorsal. En el lado izquierdo (A, B y C) se muestra un esquema de un embrión durante el cerrado dorsal y en el lado derecho los cambios de forma de las células del epitelio lateral (Tomado de Noselli, 1998)

3) Etapas larvarias y metamorfosis

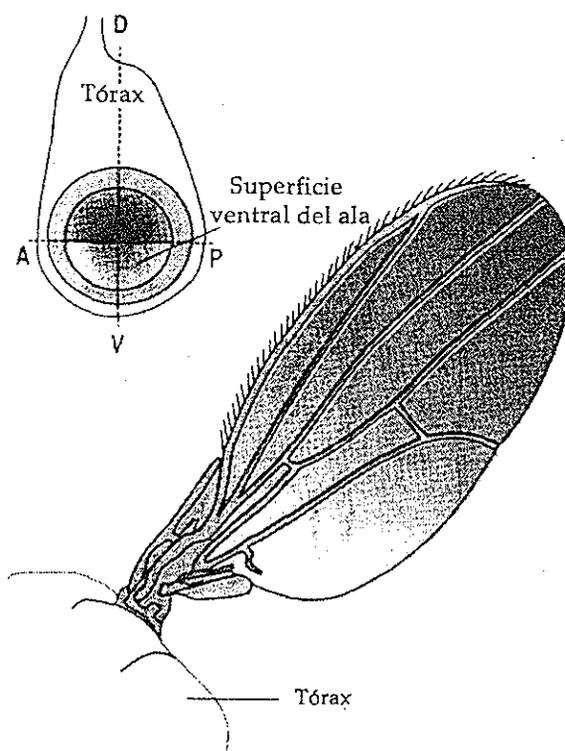
La gran mayoría de los órganos larvarios son reemplazados por otros órganos en el adulto, prácticamente solo persiste el sistema nervioso central. Varias evidencias sugieren que la mayoría de las neuronas motoras y las interneuronas del adulto son de origen embrionario, pero también hay un gran número de neuronas que se añaden durante las etapas larvarias y la etapa pupal temprana (Truman, 1990).

Como se mencionó anteriormente, las estructuras del adulto surgen de epitelios especializados llamados discos imaginales que se desarrollan a partir de precursores definidos desde la etapa embrionaria. Hay discos imaginales para cada estructura: de alas y tórax, de patas, de ojos y antenas, de halterios, de genitales y de estructuras labiales. Durante las fases larvarias los discos crecen en número de células y en tamaño. Al finalizar la tercera fase larvaria ocurren cambios en los niveles de la hormona ecdisona que inducen a la larva a un estado prepupal. Después de la formación del pupario hay solo una o dos rondas más de división. Es en este momento cuando los discos imaginales experimentan los cambios morfogenéticos más importantes como eversión o evaginación, alargamiento, expansión y fusión (Fristrom y Fristrom, 1993). Estos sacos epiteliales en unas cuantas horas darán origen a estructuras perfectamente reconocibles como las alas, el tórax, las patas, los ojos, etc.

a) Discos imaginales.

Los discos imaginales son modelos ideales para estudiar la formación de patrones. Además los mecanismos moleculares involucrados en la formación de patrones tienen similitudes con los que regulan el desarrollo de las extremidades de los vertebrados. En el desarrollo de este proyecto, nos interesaron los genes que participan en la formación del tórax. Esta estructura surge a partir del disco imaginal de ala y tórax. Este disco se divide en 8 secciones, 4 en la lámina del ala y cuatro en la región torácica. Hay un límite de compartimento que separa el disco en regiones anterior y posterior. El límite de compartimento en el ala adulta se localiza entre las venas 3 y 4. En el ala del adulto hay 5 venas numeradas del borde anterior al posterior. Las vías de señalización de *hedgehog* (*hh*) y *decapentaplegic*

(*dpp*), un miembro de la familia TGF- β , establecen estas regiones (Morata y Lawrence, 1975; Basler y Struhl, 1994; Ingham y Fietz, 1995). El disco también se subdivide en compartimentos dorsal y ventral más tardíamente durante la segunda etapa larvaria. En esta subdivisión intervienen genes como *apterous* (*ap*), *fringe* (*fng*) y la vía de Notch definiendo el compartimento dorsal (Díaz-Benjumea y Cohen, 1993; Blair et al., 1994). El papel de estos genes se ha estudiado generando clonas de falta de función: por ejemplo cuando se generan clonas homocigotas mutantes para *apterous* en la superficie dorsal, las células adquieren una identidad ventral formándose un margen ectópico del ala con el patrón característico de quetas. La vía de Wingless interviene de manera importante en el establecimiento del límite de compartimento dorso-ventral (Neumann y Cohen, 1997). Así, el disco imaginal queda dividido en regiones anterior y posterior, dorsal y ventral. A partir de estas divisiones se irán determinando y diferenciando las estructuras del disco (Figura 2).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Compartimentos del disco del ala y del tórax. En el recuadro superior se muestran los compartimentos anterior (A), posterior (P), dorsal (D) y ventral (V) del disco imaginal. En la parte inferior se muestran las estructuras que se originan a partir del disco imaginal (Tomado de Wolpert et al., 1998).

b) Cerrado torácico.

El tórax dorsal o notum se desarrolla de las partes dorsales del disco imaginal del ala y del tórax. Estos discos (uno por cada lado del organismo) se aproximan el uno al otro y se fusionan en la parte media entre las 6 y 8 horas después de la formación de la pupa, proceso que se denomina cerrado torácico y del que más adelante se describirán algunas de las moléculas involucradas (Figura 3). Este proceso tiene una gran similitud con el cerrado dorsal en términos de morfogénesis y los mecanismos moleculares involucrados (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997a; Agnès et al., 1999; Zeitlinger y Bohmann, 1999).

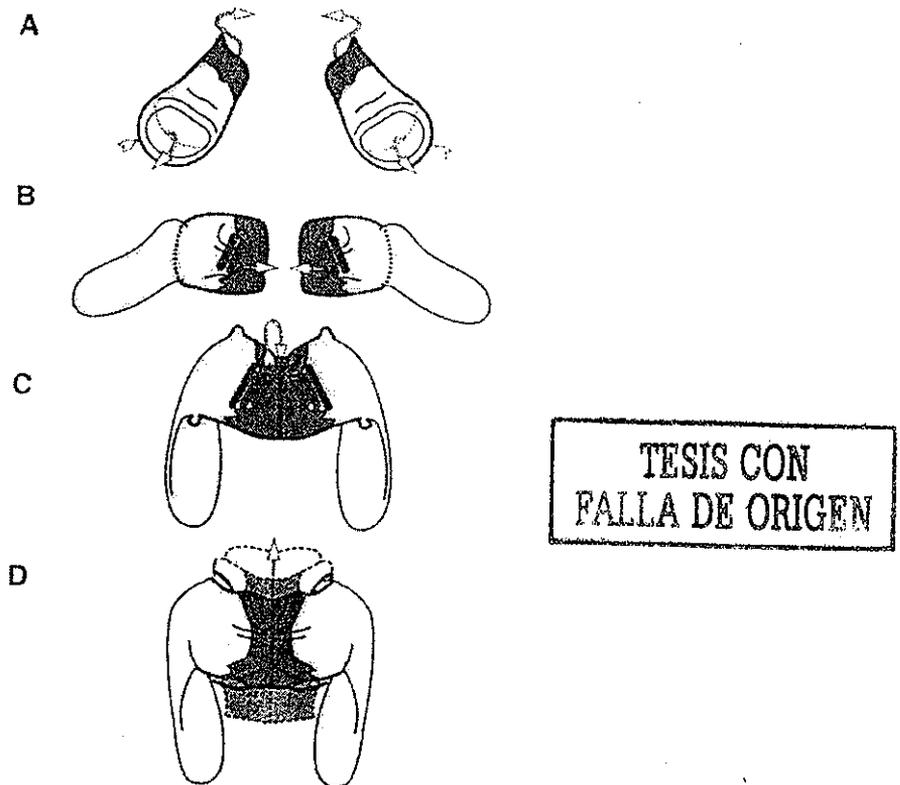


Figura 3. Formación del tórax. En el esquema se muestra el par de discos imaginales del ala y del tórax de la tercera etapa larvaria (A), los cambios morfogenéticos después de 6 horas de la formación de la pupa (B), a las 8 horas (C) y a las 9 horas (D) después de la misma. Las zonas más oscuras muestran la expresión de *pnr* (Tomado de Zeitlinger y Bohmann, 1999).

Tanto en el cerrado dorsal como en el cerrado torácico se requieren de cambios de forma celular, pero no hay eventos de división celular ya que el uso de

compuestos que inhiben la síntesis de DNA durante el cerrado torácico no interfieren con el desarrollo del tórax mientras que el uso de citocalasina B, que despolimeriza filamentos de actina, bloquea la morfogénesis de los discos y el cerrado torácico (Fristrom y Fristrom, 1993).

c) Formación de las quetas en el tórax.

También durante la tercera etapa larvaria y el inicio de la etapa pupal ocurren en el disco eventos que permiten el establecimiento de un campo morfogenético, que es un grupo de células competentes entre las que están las que originarán a las quetas. En estos campos morfogenéticos es necesaria información posicional y esta información está dada por gradientes de respuestas a vías de señalización evolutivamente conservadas. Ejemplos de estas vías son: la del EGFR (Factor de crecimiento epidérmico), la vía Dpp, la vía de Wingless, la vía de Hedgehog y la vía de Notch. Estas vías se usarán en repetidas ocasiones durante el desarrollo, para proveer información posicional en la formación de la mayoría de las estructuras. Además de estas vías, otros grupos de genes, los genes selectores juegan un papel muy importante en estos procesos porque son los que controlan el surgimiento de campos morfogenéticos.

Las células que forman estos campos deberán interpretar la información posicional dada por los efectores de las vías de señalización (Affolter y Mann, 2001). La interpretación de esta información da como resultado el establecimiento de un prepatrón (Stern, 1954) o combinaciones específicas locales de factores de transcripción que a su vez prefiguran la formación y localización de estructuras como las quetas. Durante la tercera etapa larvaria, en el disco del ala y tórax, surgen pequeños grupos de 20 a 30 células llamados grupos proneurales, los cuales son los responsables de prefigurar la formación de las quetas torácicas más grandes llamadas macroquetas. Estas quetas adoptan posiciones perfectamente definidas no sólo en *Drosophila melanogaster* sino en todos los miembros de este género. Las posiciones y el número de estos mecanorreceptores es perfectamente constante y a cada uno se ha asignado un nombre, lo que permite utilizar el desarrollo de estos órganos como un modelo en el estudio del sistema nervioso central y periférico. A partir de cada grupo proneural surge un campo proneural

del cual se selecciona a una sola célula, como célula precursora del órgano sensorial (SMC). Esta célula experimentará cuando menos dos divisiones asimétricas dando origen a cuatro células, las cuales después de completar su diferenciación darán lugar a los cuatro componentes básicos de un órgano sensorial: el pelo o queta y el "socket" que son los componentes externos y una neurona y una célula glial (Hartenstein y Posakony, 1989). Tanto los grupos proneurales como sus correspondientes SMC adquieren posiciones definidas dentro del disco imaginal (Figura 4).

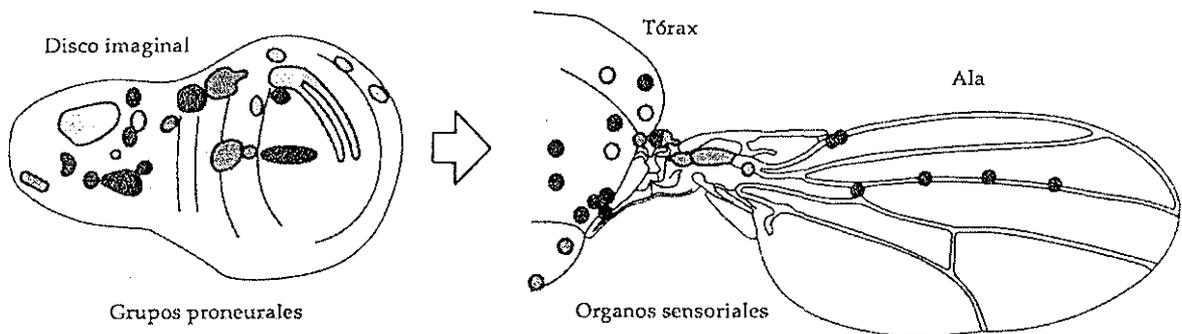


Figura 4. Disco imaginal del ala y del tórax y las estructuras a las que da origen. Del lado izquierdo están representados los diferentes grupos proneurales con diferentes tonos de gris. Del lado derecho se muestra la posición de las macroquetas y las sensilas que surgen a partir de cada grupo proneural con los mismos tonos de gris (Tomado de Wolpert et al., 1998).

4) Participación de genes en diferentes etapas del desarrollo.

a) Genes requeridos en la elongación/retracción de la banda germinal.

Se han descrito mutaciones en varios genes cigóticos que afectan la retracción de la banda germinal. La mayoría pertenecen al grupo conocido como U-shaped y son: *hindsight (hnt)* (Wieschaus et al., 1984), *tailup (tup)* (Nüsslein-Volhard et al., 1984), *serpent (srp)* (Jürgens et al., 1984) *u-shaped (ush)* (Nüsslein-Volhard et al., 1984), y *pnr*. Además, también afectan este fenómeno *Egfr*, el homólogo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Clifford y Schüpbach, 1989) e *inr*, el homólogo del receptor de insulina en mamíferos (Fernández et al., 1995). Los cinco primeros son genes cuyos productos son factores de transcripción del tipo de dedos de zinc.

Desde el inicio del alargamiento hasta el final de la retracción, *hnt* se expresa en la amnioserosa y en el endodermo pero no en las células del ectodermo que son

las que experimentan los cambios de forma durante la retracción de la banda germinal. Como se mencionó anteriormente, la amnioserosa juega un papel muy importante en la retracción de la banda germinal y el cerrado dorsal. Las mutaciones en los genes del grupo U-shaped producen pérdida prematura de la amnioserosa y esto trae como consecuencia defectos en la retracción de la banda y en el cerrado dorsal (Frank y Rushlow, 1996). Se han propuesto dos hipótesis sobre la función de *hnt*: a) su participación en el mantenimiento de las células de la amnioserosa con quienes establecen contactos las células del ectodermo durante la retracción de la banda germinal, o b) su participación en la regulación de alguna vía de señalización de la amnioserosa hacia el epitelio lateral (Yip et al., 1997). En embriones mutantes para *hnt* que además tienen una deficiencia que elimina tres genes requeridos para la muerte celular, no hay pérdida prematura de la amnioserosa. En estos embriones, sin embargo, no hay retracción de la banda germinal (Lamka y Lipshitz, 1999). Se sugiere entonces que *hnt* participa como factor de transcripción en la expresión de genes que finalmente controlan la retracción de la banda germinal. Un posible miembro de esta vía de señalización es INR (la vía del receptor de la insulina) que se expresa en todo el embrión a excepción de la amnioserosa (Fernández et al., 1995). Cuando se sobreexpresa este receptor en mutantes de *hnt* hay rescate de la retracción de la banda germinal (Lamka y Lipshitz, 1999). Recientemente se ha propuesto que *hnt* es un regulador negativo de la vía de la cinasa de Jun (JNK) en la amnioserosa. Antes de la retracción de la banda germinal hay expresión de *puc* y *dpp* en la amnioserosa, lo que puede reflejar un estado de activación de la vía JNK. Conforme ocurre la retracción de la banda germinal, la expresión de *puc* y *dpp* disminuye en la amnioserosa y para cuando se inicia el cerrado dorsal, no hay expresión detectable en esta capa celular pero hay una expresión elevada en las células de la hilera guía. En mutantes de *hnt*, persiste la expresión de *puc* y *dpp* en la amnioserosa durante el cerrado dorsal y este no se completa (Reed et al., 2001). Por lo tanto, es posible que la inactivación de la vía JNK en la amnioserosa sea un requisito para que se lleve a cabo el cerrado dorsal de manera adecuada. Hay evidencias de que *hnt* junto con *ush* juegan un papel importante en la diferenciación de las células de la hilera guía, y que se requiere de interacciones inductivas entre la amnioserosa y el epitelio lateral para tal fin (Stronach y Perrimon, 2001).

ush tiene un patrón muy dinámico de expresión durante la embriogénesis, se expresa primeramente en el primordio de la amnioserosa en etapas muy tempranas. Durante la extensión de la banda germinal, se expresa en el tracto intestinal en desarrollo y en los precursores de los hemocitos; durante la retracción de la banda germinal en el epitelio lateral y en los precursores de los hemocitos, y al inicio y durante el cerrado dorsal en la amnioserosa y el epitelio lateral (Fossett et al., 2000): Se ha estudiado su participación en el desarrollo cardíaco durante la embriogénesis y en el desarrollo de los órganos sensoriales durante la metamorfosis, pero no está clara su función en la retracción de la banda germinal ni durante el cerrado dorsal. Sólo se sabe que se requiere para la especificación de la hilera guía (Stronach y Perrimon, 2001).

La expresión de *srp* es muy similar a la de *ush* durante la embriogénesis y aunque tampoco está clara su función durante la elongación/retracción de la banda germinal, se ha demostrado que es esencial para la expresión de *ush* (Fossett et al., 2001) y esta interacción genética juega un papel importante en estos eventos morfogénéticos.

La expresión de *tup* se ha observado en las células de la amnioserosa en desarrollo y en regiones de la futura epidermis dorsal al inicio de la gastrulación. Para esta etapa su expresión es muy similar a la de *ush*, excepto que en el caso de *tup* se extiende a regiones más anteriores. Existe también otra diferencia con respecto a los demás genes del grupo U-shaped, ya que mutaciones en *tup* no producen apoptosis prematura en las células de la amnioserosa (Frank y Rushlow, 1996) y no hay alguna explicación en cuanto a los defectos en la retracción de la banda germinal.

b) Genes requeridos en el cerrado dorsal y en el cerrado torácico.

Genes de la vía DJNK

La vía de la JNK es un miembro del grupo de las vías de cinasas activadas por mitógenos (MAPK). La vía JNK está evolutivamente conservada y participa principalmente en la regulación de cambios de forma celular y en la respuesta a condiciones de estrés celular (Noselli, 1998). Varios de los genes que conforman esta vía son oncogenes.

Aún no se ha identificado el ligando ni el receptor de la vía pero se tienen algunas evidencias de que Dcdc42 y DRac1 podrían participar (Harden et al., 1999). Una vez que la señal se recibe en la membrana, se activa una cascada de cinasas y una de las primeras en participar es una proteína codificada por *misshapen* (*msn*) una cinasa de tipo Ste20 (Su et al., 1998), la MAPKKKK, la MAP cinasa cinasa cinasa cinasa. Misshapen a su vez activa a Slipper codificada por *slipper* (*slpr*), una MAPKKK (Stronach y Perrimon, 2002). Las siguientes cinasas de la vía en activarse son Hemipterous (Hep), una MAPKK (Glise et al., 1995) y Basket (Bsk) la cinasa de Jun, una MAPK (Riesgo-Escovar et al., 1996). La cinasa de Jun fosforila factores de transcripción como Jun que forma heterodímeros con otro factor de transcripción, DFos (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b). Se desconoce si existen otros factores de transcripción que sean regulados por la vía de la cinasa de Jun. Se conocen al menos dos genes blanco del complejo Jun-Fos: *puckered* (*puc*), que codifica para una fosfatasa que modula la actividad de la cinasa de Jun, y *decapentaplegic* (*dpp*) (Noselli y Agnes, 1999).

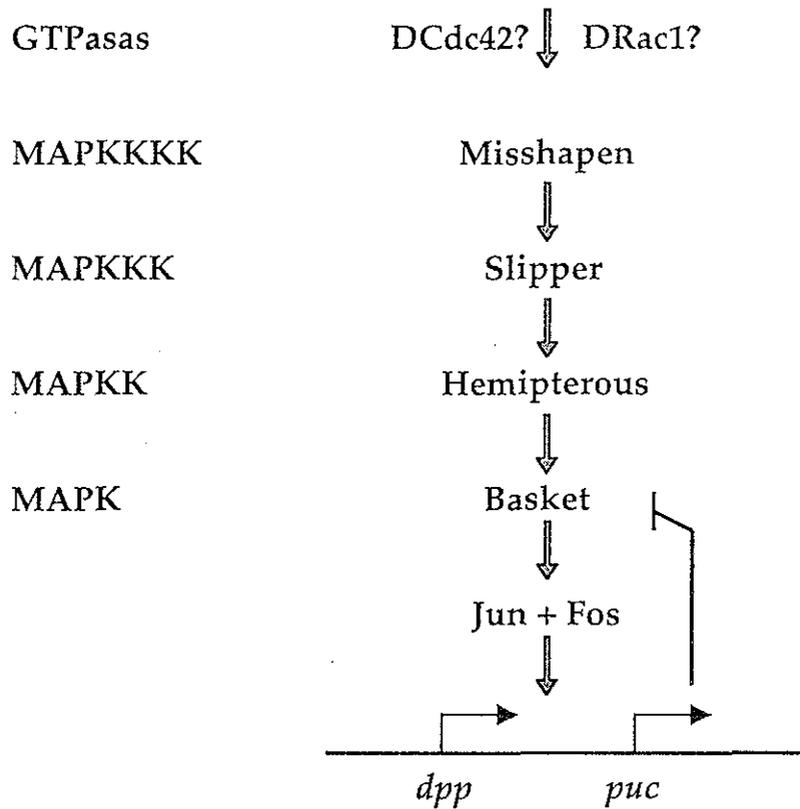


Figura 5. Esquema de la vía de la cinasa de Jun en *Drosophila*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mutaciones en miembros de la vía como *hep*, *bsk* y *DJun* producen fallas en el cambio de forma celular de la hilera guía en el epitelio lateral dando como resultado un fenotipo de apertura dorsal. Se ha observado que en mutantes de *hep* no se forman adecuadamente los filopodios y lamelipodios necesarios para la fusión de los frentes del epitelio lateral, y el cerrado es defectuoso con un mal alineamiento entre los segmentos correspondientes (Jacinto et al., 2000). La pérdida de función de DFos produce un fenotipo similar al de los mutantes DJun (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b). Estas evidencias muestran que heterodímeros DJun/DFos controlan el cerrado dorsal y la expresión génica derivada de la activación de la vía, como la expresión de *dpp*. DFos también interviene en las células ventrales a la hilera guía durante el cerrado dorsal pero la expresión de DFos en estas células depende de *dpp*.

Varios alelos hipomorfos de *hep* y DFos permiten que se complete el desarrollo hasta la etapa adulta, pero producen un defecto de cerrado torácico por falta de fusión de los discos imaginales, y se observa una hendidura en la parte media dorsal. Estas fueron las primeras evidencias del requerimiento de la vía JNK en la formación del tórax (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b) y de la similitud en los mecanismos moleculares del cerrado torácico con el proceso del cerrado dorsal.

Genes de la vía Dpp.

La activación de DJNK por una señal aún desconocida, lleva a la expresión de genes como *dpp* (Riesgo-Escovar et al., 1996). Dpp tiene su blanco en las células del ectodermo lateral en donde la señal se recibe por medio de sus receptores, *tkv* (*thick veins*) y *punt* (*put*) (Affolter et al., 1994; Letsou et al., 1995). En las mutantes *tkv*, las células del ectodermo lateral no experimentan cambios de forma ni migración mientras que los cambios morfológicos en las células de la hilera guía no se ven afectados. Además, la expresión de *dpp* o de formas activadas de *tkv* en el ectodermo, suprimen los fenotipos de apertura dorsal de alelos mutantes de *bsk* y de *DJun* (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997) lo que demuestra que las células del epitelio lateral responden a la señal Dpp.

En cuanto al cerrado torácico alteraciones del nivel de expresión de *dpp* (Martín-Blanco et al., 2000) o efectos de sobreexpresión (ver artículo anexo) producen alteraciones durante este evento morfogenético. Los adultos tienen una hendidura en el tórax producto de la falta de formación de filopodios que permiten la fusión de las células de la hilera guía en los discos imaginales. En el disco imaginal de ala y tórax, *dpp* se expresa en las células del pedúnculo que darán origen a la hilera guía. La expresión de una forma dominante negativa del receptor *tkv* (Martín-Blanco et al., 2000) o la expresión ectópica de una forma activada del mismo (ver artículo anexo), producen defectos similares de cerrado torácico. Todos estos datos demuestran la participación de esta vía de señalización en el cerrado dorsal y torácico y la importancia de la regulación fina de su actividad en los cambios de forma celular.

pannier (pnr), otro gen requerido en el cerrado dorsal y en la formación del tórax.

En vertebrados existe una familia de factores de transcripción que se unen al DNA en secuencias "GATA" llamada factores de transcripción tipo GATA que regulan la transcripción de varios genes como los de la globina en células eritroides. La estructura terciaria de estos factores de transcripción se caracteriza por poseer dedos de zinc, fundamentales para el reconocimiento de secuencias en el DNA. Mutaciones en genes GATA impiden que se lleve a cabo la diferenciación de las células eritroides. En vertebrados hay varios miembros: GATA1, GATA2, GATA3 y GATA4 y cada uno tiene patrones de expresión específicos.

En *Drosophila* se identificaron a dos genes miembros de esta familia con gran homología con los de vertebrados, *srp* y *pannier (pnr)* (Winick et al, 1993).

El locus *pnr* fue descrito por Jürgens y colaboradores en 1984 a partir de alelos mutantes encontrados en un tamizaje genético de mutaciones que afectaban la morfología de la cutícula larvaria. El gen se localiza en el intervalo 89B4-9. Se han identificado un gran número de alelos dominantes y recesivos de *pnr*. El alelo que se usó en el presente trabajo fue *pnrGal4*, un alelo dominante viable que en condición heterocigota muestra una ligera hendidura en el tórax y pérdida de algunas macroquetas torácicas.

pnr se empieza a transcribir dos horas después de la fecundación del huevo de *Drosophila* y los RNAm se localizan en la región del blastodermo celular que dará lugar a la amnioserosa y a la epidermis dorsal. Conforme transcurre el desarrollo, la expresión de *pannier* queda restringida a la epidermis dorsal y continúa hasta el final de la etapa de cerrado dorsal. En los embriones mutantes de *pnr*, hay una degeneración prematura de las células de la amnioserosa lo que da como consecuencia un fenotipo de apertura dorsal (Romain et al., 1993). Sin embargo, hay otro reporte en donde no observan este efecto (Herranz y Morata, 2001). Heitzler et al., en 1996 han demostrado que *pnr* también se expresa en la región dorsal de los discos imaginales del ala y del tórax, en donde surgirá el notum. *pannier* participa en el cerrado dorsal y en el cerrado torácico, y está involucrado en la formación de los órganos sensoriales. En el adulto, *pnr* se expresa a lo largo de la línea media dorsal incluyendo la parte posterior de la cabeza y el abdomen. En algunas combinaciones alélicas viables de este gen, se observa una hendidura torácica en la línea media dorsal porque no hay fusión de los dos hemitoraces, muy semejante a algunos fenotipos mutantes de *hep* y de *DFos*. Incluso en algunos mutantes con hendiduras muy marcadas también la cabeza y el abdomen se ven afectados. Aunque existen varias evidencias de la participación de *pnr* durante el cerrado dorsal y el cerrado torácico, no está clara su función. Recientemente se ha reportado que a diferencia de lo que ocurre al inicio de la embriogénesis en donde *pnr* es un gen blanco de *dpp*, durante el cerrado dorsal la expresión de *dpp* en la hilera guía está regulada por *pnr*. En mutantes nulos de *pnr*, no hay expresión de *dpp* en la hilera guía, pero no se afecta la expresión de *dpp* en otros tejidos. Esto en principio parecería sugerir que se requiere de *pnr* para la activación de la vía JNK, sin embargo cuando se observa en mutantes de *pnr* la expresión de *puc*, un gen que se activa en respuesta a JNK, esta no se afecta (Herranz y Morata, 2001). Esto sugiere que la expresión de *dpp* en la hilera guía depende por un lado de *pnr* y de manera independiente de la vía JNK.

c) Genes requeridos en la formación de las quetas.

Previo a la formación de las quetas, se requiere de gradientes de varios morfógenos como Wingless, Hedgehog y Dpp, que como ya se mencionó anteriormente, generan información posicional dentro de los discos imaginales durante la

formación de los compartimentos. Estos mismos morfógenos participan en el establecimiento del prepatrón para la formación de las quetas en el notum. Se requiere de Dpp en cooperación con Wg para la formación de algunos grupos proneurales (Tomoyasu et al., 1998). También la expresión ectópica de Hh en el disco del ala produce SMC ectópicas y por tanto quetas extra (Mullor et al., 1997).

Entre los genes del prepatrón están *pannier* (Cubbada et al, 1997; Haenlin et al., 1997) y el complejo *iroquois* (Gómez-Skarmeta et al., 1996). La expresión de *pnr* e *iroquois* en los discos imaginales del ala y el tórax se restringe a la región que contiene a las células precursoras de las regiones mediales y laterales del notum, respectivamente. A su vez estos genes son responsables de la activación de los genes proneurales, fundamentales en la determinación de las células SMC.

Dos de los genes proneurales más importantes son *achaete* (*ac*) y *scute* (*sc*), los cuales codifican para reguladores transcripcionales con dominios hélice-vuelta-hélice (bHLH). Estos genes le confieren a todas las células del grupo proneural el potencial para llegar a ser una SMC (Garrell y Campuzano, 1991).

Debe mencionarse que estos genes proneurales también le dan el potencial de diferenciarse en neuronas a las células ectodérmicas de la zona neurogénica o neuroectodermo durante la formación del sistema nervioso central. En este último caso se hace evidente la expresión de Ac y Sc en la diferenciación de los neuroblastos, después de la gastrulación, en los límites de los futuros segmentos y en regiones un poco anteriores a estos.

Las células que acumulan el mayor nivel de proteínas Ac y Sc en el sistema nervioso periférico se definen como SMC y siempre ocupan la misma posición dentro del grupo proneural (Campuzano y Modolell, 1992). La pérdida de función de *pnr* produce una disminución en la expresión de *ac* y *sc* y por lo tanto un menor número de quetas. Una ganancia de función de *pnr* produce sobreexpresión de los genes proneurales lo que resulta en un mayor número de quetas. Se sabe que *pnr* se une específicamente a una región de complejo *ac-sc* con actividad de "enhancer" (Gómez-Skarmeta et al., 1995) a través de secuencias GATA. Más adelante se describirán otras funciones de *pnr* a lo largo del desarrollo en *Drosophila*.

Por otro lado, hay productos de genes que regulan negativamente la expresión de *ac* y *sc* como Hairy (H) que reprime directamente su expresión, y *extramacrochaetae* (*emc*) que evita que Daughterless (Da) forme heterodímeros con

Ac y Sc. Otra proteína que también regula negativamente la expresión de los genes proneurales y es considerado otro gen de prepatrón junto con *pnr* e *iroquois*, es *u-shaped* (*ush*), un factor de transcripción con dedos de zinc que forma dímeros con *pnr*. La expresión de *ush* en el disco del ala sobrelapa en gran parte con la de *pnr*. Algunos alelos mutantes de *ush* inducen un aumento en la expresión de *ac* y *sc* induciendo un mayor número de SMC y la formación de quetas extra (Cubbada et al., 1997; Haenlin et al., 1997).

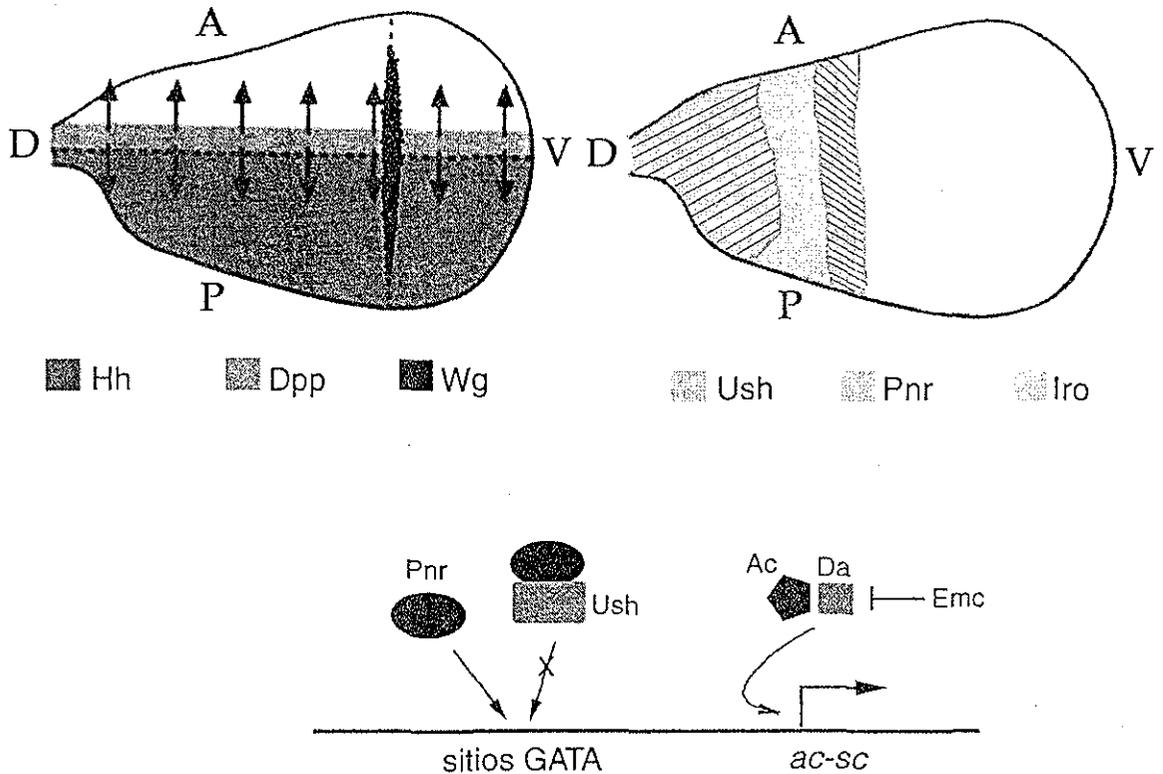


Figura 6

Cuando se ha definido la SMC, esta célula evita que las células vecinas adquieran el mismo destino mediante el fenómeno conocido como inhibición lateral, por la vía de Notch. Notch es un receptor de membrana y Delta es uno de sus ligandos. La activación de Notch por Delta inhibe la expresión de los genes proneurales en las células vecinas a la SMC impidiendo así que adopten el destino neural, diferenciándose entonces como células epidérmicas. En mutantes de falta de función de Notch, se forman varias células SMC en cada grupo proneural y se producen muchas quetas a partir del mismo grupo (Artavanis-Tsakonas et al.,

1995). De manera antagónica al efecto inhibitorio de la vía de Notch sobre el desarrollo de los órganos sensoriales, la vía Egfr parece promover el destino neural (Díaz-Benjumea y García-Bellido, 1990) por interacciones de cooperación lateral (Culí et al., 2001).

Por lo tanto la acción de los genes de prepatrón y la regulación positiva y negativa sobre la expresión de los genes proneurales, son esenciales en la formación de los órganos sensoriales.

II. Tamizaje o "screen" genético.

Una forma de hacer un análisis genético para identificar genes requeridos en un proceso biológico, es a base de mutaciones. La radiación ionizante (rayos X) ha sido un popular mutágeno. Una de las principales desventajas en el uso de este mutágeno es la inducción de translocaciones, duplicaciones o inversiones que complican el análisis genético; sin embargo sigue utilizándose cuando el objetivo es inducir rearrreglos cromosómicos. Otro mutágeno que resulta muy efectivo y de baja toxicidad en moscas es el etilmetanosulfonato (EMS), que produce una gran cantidad de mutaciones puntuales o deleciones pequeñas y aberraciones cromosómicas (Greenspan, 1997). De hecho, la identificación de gran parte de los genes que participan en la formación de patrones durante el desarrollo embrionario temprano provino de un análisis genético en *Drosophila* a partir de una mutagénesis de saturación con EMS (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980).

Dos de las principales desventajas de las mutagénesis mencionadas anteriormente son: la dificultad para la identificación o clonación de los genes afectados, y en el caso de mutaciones letales que ocurren en etapas muy tempranas del desarrollo, no permitir estudiar directamente la participación de estos genes en etapas más tardías (Miklos y Rubin, 1996).

Por lo anterior se ha usado como alternativa la mutagénesis por inserción de elementos P o transposones, un tipo de elementos móviles que se encuentran en *Drosophila*. Hay construcciones de elementos P que llevan un gen reportero como el de la β -galactosidasa. Este se expresa bajo el control de promotores endógenos y permite identificar la expresión de genes endógenos en el sitio de inserción (Bellen et al., 1989). Una variante en este sistema consiste en la combinación de la

mutagénesis por inserción de elementos P, con la expresión controlada de un activador transcripcional (Brand y Perrimon, 1993), dando como resultado expresión ectópica de RNAm sentido o antisentido de genes endógenos cercanos a la inserción. Esto puede ayudar a revelar funciones del gen en cuestión que no se habían detectado antes. Se han generado varias colecciones de líneas transgénicas de *Drosophila* con inserciones al azar de elementos P con secuencias UAS (Upstream Activation Sequence) capaces de expresar de manera ectópica secuencias cercanas (Figura 5). Una de estas colecciones es la que se utilizó en el presente trabajo, generada por Rørth (1996). Las secuencias UAS son sitios de unión del activador transcripcional Gal4 de levadura (Ptashne, 1988). Gal4 no tiene secuencias blanco endógenas en *Drosophila*, y por lo tanto cuando Gal4 se expresa como transgen en un patrón específico en *Drosophila* puede provocar expresión del gen adyacente a estos elementos P-UAS.

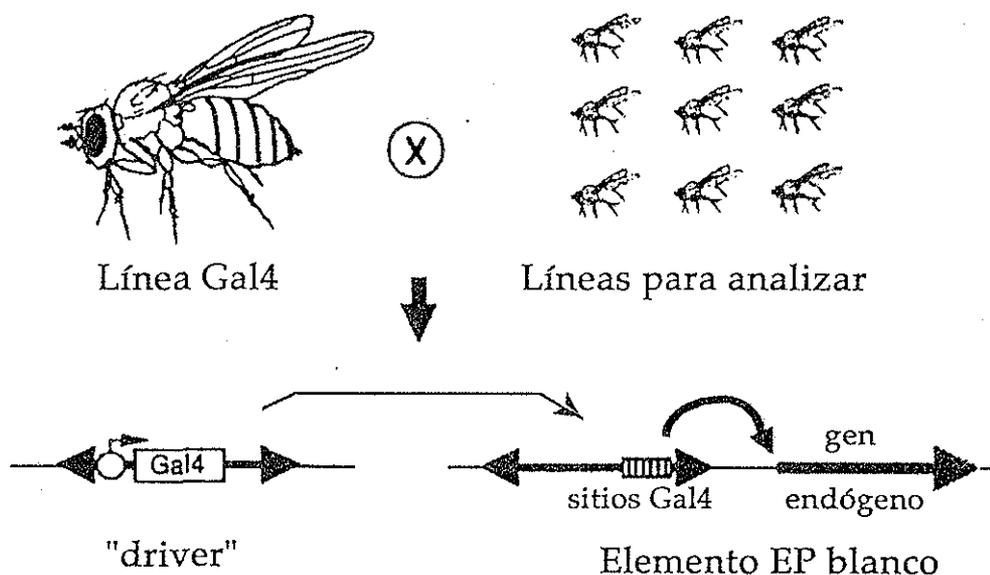


Figura 7. Estrategia para inducir modificaciones en la expresión de un gen endógeno. La línea que se utiliza como "driver" induce la expresión del activador GAL4 con el mismo patrón de expresión que el gen adyacente. La línea EP blanco tiene a su vez sitios de unión a GAL4. Por lo tanto en la descendencia producto de esta cruce, GAL4 está presente y se producen modificaciones en la expresión del gen endógeno de manera tejido específica (Tomado de Rørth, 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A la fecha, la gran mayoría de los elementos P de la colección obtenida por Rørth se han mapeado citológicamente por hibridación *in situ* en cromosomas politénicos. Estas líneas también se han mapeado molecularmente por medio de PCR inversa, lo que permite localizar molecularmente las inserciones recuperando y secuenciando DNA genómico adyacente a la inserción. Se ha observado que la mayoría de los transposones se insertan en las regiones reguladoras de un gen o muy cercanos al sitio de iniciación de la región codificante, es decir hacia el extremo 5' del transcrito (Spradling et al., 1995), de manera que estas inserciones P-UAS pueden dirigir la expresión de transcritos completos.

Por otra parte se han generado líneas transgénicas con construcciones del elemento P que inducen la expresión del activador Gal4 y cuya expresión se encuentra bajo el control de diferentes promotores. De esta manera, y dependiendo del sitio de integración del elemento P en el genoma, se dirige la expresión tejido-específica de Gal4 en una gran cantidad de patrones en embriones, larvas y/o adultos (Calleja et al., 1996). La línea Gal4 que se usó en este proyecto fue *pannier* Gal4 (*pnrGal4*), una línea en la que el activador se expresa exclusivamente en los tejidos en donde se expresa *pnr*.

El uso de este tipo de tamizaje genético permite identificar genes cuyos productos se requieren para una función y también permite identificar interacciones genéticas si el tamizaje se realiza en un fondo sensibilizado (Simon et al., 1991). En este caso el fondo genético no es el del tipo silvestre, sino el de una mutación en un gen lo cual "facilita" visualizar efectos causados por alteraciones en otro gene, sobre todo si hay una interacción entre ambos. Nuestro proyecto utilizó un fondo sensibilizado, una mutación en *pannier*.

Entre las ventajas de este sistema están a) la facilidad relativa con la que se pueden subclonar las secuencias adyacentes al elemento P, b) el control de transcripción ectópica del gen adyacente al elemento P sólo en las células que expresan el activador transcripcional Gal4, c) la obtención de fenotipos por la expresión alterada, del gen vecino a la inserción, d) la determinación de interacciones genéticas, y e) la obtención de alelos por removilización imprecisa del elemento P, a partir de las líneas P-UAS al adicionar una fuente de transposasa.

En el tamizaje, se usó como fondo sensibilizado *pnrGal4*, ya que esta línea es a la vez un alelo hipomorfo dominante de *pnr* producto de la inserción de un

elemento P Gal4, que expresa Gal4 en el patrón de *pnr*. El fenotipo de *pnrGal4* es fácil de visualizar; además, el gen *pnr* es un factor de transcripción que participa en la formación del tórax y en el cerrado dorsal (Heitzler et al., 1996), precisamente los procesos de interés en este trabajo. Líneas P-UAS en donde la expresión alterada por *pnrGal4*, de un gen (o genes) adyacente (s) al elemento P, que modificaron el fenotipo mutante de *pnrGal4/+* fueron seleccionadas en el tamizaje.

En ocasiones es recomendable comparar los resultados obtenidos en un fondo sensibilizado con los efectos obtenidos en otro fondo también sensibilizado pero diferente, con la finalidad de separar los efectos debidos a la expresión alterada del gen en estudio, de los efectos de interacción entre diferentes genes. (En este trabajo se repitió parte del tamizaje utilizando como fuente del activador la línea *apGal4*. *apGal4* también se expresa en el tórax dorsal en formación.)

III. Obtención de alelos por removilización de elementos P.

Como se mencionó anteriormente, una de las ventajas de trabajar con líneas transgénicas con elementos P, es la facilidad para obtener alelos mutantes del gen adyacente. El elemento P insertado no contiene al gen que codifica para la transposasa, la enzima requerida para la movilización del transposón. Sin embargo, si se cruza esta línea con otra que expresa a la enzima transposasa, se induce la movilización del elemento P. Hay líneas transgénicas de *Drosophila* usadas como fuente de transposasa que contienen un elemento P incompleto que codifica para la enzima, pero sin los extremos del transposón, lo que impide su movilidad (Robertson et al., 1988). Se hace una cruce entre hembras de esta línea y machos de la línea P-UAS del que se desean obtener alelos, para que se lleve a cabo la removilización del elemento P-UAS y después usar balanceadores para que no se pierdan las mutaciones por recombinación. Un balanceador es un cromosoma que contiene inversiones múltiples y marcadores genéticos. Las inversiones múltiples evitan la recombinación entre los homólogos. Los marcadores genéticos facilitan analizar los esquemas de cruces y la selección de individuos.

Las mutaciones obtenidas por removilización de elementos P suelen ser deleciones ya que con frecuencia el elemento P se escinde de manera imprecisa. Si

la inserción original es mutagénica, se obtendrán también alelos por escisiones parciales del elemento P, y cuando estas sean precisas, se obtendrán revertientes.

IV. Mosaicos genéticos

Una vez que se han generado alelos de un gen, es importante conocer los efectos de la falta de función del mismo en diferentes etapas del desarrollo y en el adulto. Sin embargo, cuando la mutación es letal en etapas tempranas, es muy difícil saber si en etapas más tardías participa dicho gen. Una forma de solucionar este problema es generar mosaicos genéticos por recombinación mitótica utilizando el sistema de recombinación Flipasa/FRT. Con este sistema se obtienen animales mosaico a una alta frecuencia, en los que la mayor parte de los tejidos están formados de células heterocigotas para la mutación en estudio. Una minoría incluye clonas de células homocigotas mutantes y clonas "twin spot" que contienen células homocigotas de tipo silvestre.

Anteriormente se inducían mosaicos genéticos por recombinación mitótica por radiación con rayos X. Este método tiene algunas desventajas: a) muy baja frecuencia de mosaicismo, b) alto índice de muerte celular, y c) rompimientos cromosómicos inespecíficos.

El sistema de recombinación Flipasa/FRT en *Drosophila* se implementó a partir del descubrimiento en levaduras, de la recombinasa FLP sitio específica y sus secuencias blanco FRT (Golic and Lindquist, 1989). Lo que se hizo fue introducir elementos P con secuencias FRT marcadas con alelos dominantes cerca del centrómero de cada brazo de cada cromosoma (a excepción del cromosoma 4 que es muy pequeño). La selección de la línea FRT a usar dependerá de la localización del gen en estudio. Además, se construyeron cromosomas que llevan marcadores celulares para tejidos internos o marcadores de cutícula en el adulto, de tal forma que se pueden distinguir territorios celulares con los diferentes genotipos (Xu y Rubin, 1993).

Para generar animales mosaicos se necesita hacer una cruce entre la línea FRT adecuada (en nuestro caso ya que *ppo* está en la región 32D1-D2, correspondiente al brazo izquierdo del cromosoma 2, se utilizó la línea FRT40), con

un marcador para distinguir el territorio mutante del "twin spot" y el fondo genético heterocigoto.

El evento de recombinación mitótica es al azar y por lo tanto puede ocurrir en cualquier célula en división. Si la mutación tiene un efecto fenotípico sobre esa célula y su descendencia se observará el fenotipo mutante en ellas, pero si la recombinación ocurre en una célula precursora de un tejido en el que normalmente este gen no se expresa, no se verá ningún efecto. También es importante el momento en que se lleva a cabo la inducción de la recombinación puesto que se pueden evidenciar distintos requerimientos temporales de los genes en estudio.

Una modificación a esta técnica permite conocer si un gen se requiere cigóticamente o es de efecto materno. Los genes cigóticos son aquellos cuyos productos contribuyen al desarrollo temprano pero que se expresan exclusivamente a partir del genoma del cigoto. Las mutaciones recesivas en este tipo de genes solo producen fenotipos en individuos homocigotos mutantes. Los genes de efecto materno afectan el desarrollo temprano también, pero al menos parte de la expresión se da a partir del genoma materno durante la ovogénesis. Así, el fenotipo del cigoto dependerá del genotipo de la madre y no del genotipo del cigoto. Una mutación recesiva en estos genes solo producirá individuos mutantes cuando la madre sea homocigota mutante.

La forma para determinar si un gen presenta contribución materna es analizar el fenotipo de huevos derivados de madres que son mosaicos genéticos en el ovario. Para esta técnica se hace uso de mutaciones con efectos de esterilidad dominante, como *ovo^{D1}*. Una hembra heterocigota para esa mutación es estéril y solo si un evento de recombinación mitótica ocurre en sus ovarios durante la ovogénesis, podrá surgir un ovocito homocigoto de tipo silvestre que completará su programa de desarrollo (Chou et al., 1993). Cuando en el cromosoma homólogo al que lleva *ovo^D* y que se va a recombinar está presente una segunda mutación, el embrión resultante de la recombinación no tendrá *ovo^{D1}* pero se desarrollará en homocigosis mutante para el producto de este otro gen. En nuestro caso nos interesaba saber si había un efecto en la falta de función de *poco pelo* durante la formación del ovocito.

OBJETIVO

Identificar nuevos genes que participan en el cerrado dorsal y torácico en *Drosophila melanogaster*.

HIPÓTESIS

Es posible identificar y caracterizar nuevos genes que participan en el cerrado torácico, el cerrado dorsal y en la formación de quetas torácicas, por medio de un tamizaje genético de expresión modificada en un fondo genético sensibilizado.

OBJETIVO

Identificar nuevos genes que participan en el cerrado dorsal y torácico en *Drosophila melanogaster*.

HIPÓTESIS

Es posible identificar y caracterizar nuevos genes que participan en el cerrado torácico, el cerrado dorsal y en la formación de quetas torácicas, por medio de un tamizaje genético de expresión modificada en un fondo genético sensibilizado.

MATERIAL Y METODOS

I. Mantenimiento de las cepas.

Las moscas se mantuvieron a una temperatura constante de 25°C. El medio de cultivo se prepara de la siguiente manera: 50 gr de levadura activa, 50 gr de azúcar o piloncillo y 15 gr de agar. Se afora a 500 ml con agua desionizada y se esteriliza en el autoclave. Se deja enfriar a 55°C aproximadamente y se añaden 5 ml de ácido propiónico y 7 gr de grenetina. Se vierte el medio en viales de 10 X 3 cm, previamente esterilizados. Los viales se mantienen tapados con algodón y en refrigeración hasta su uso.

II. Tamizaje o "screen" genético.

Para hacer el análisis genético, se hicieron cruzas entre hembras vírgenes de *pnrGal4* con machos de las 2100 líneas P-UAS obtenidas por Rørth (1996). En la descendencia en donde estaban presentes los dos elementos P, se indujo la modificación a la expresión del gen adyacente 3' al elemento P. De estas cruzas se seleccionaron todas las líneas que produjeron modificaciones viables del fenotipo adulto de *pnrGal4*, además de aquellas que causaron letalidad en alguna de las etapas de desarrollo. Las moscas con modificaciones se fijaron en una mezcla de alcohol etílico y glicerol (75:25) y se guardaron en la oscuridad. Los organismos fijados se fotografiaron con una cámara Optronics bajo el microscopio óptico o se prepararon para microscopía electrónica de barrido.

III. Colecta de embriones.

De las cruzas en las que se produjo letalidad en etapa embrionaria así como de los alelos obtenidos a partir de la EP(2)2478, se hicieron preparaciones de cutículas embrionarias para saber si había efecto en el cerrado dorsal. Para coleccionar embriones se ponen moscas adultas en vasos de precipitado de 100 ml de plástico invertidos y tapados con cajas de Petri de 5 cm que contienen el medio de puesta descrito a continuación, y levadura seca activada. El medio de puesta se prepara

con 5 gr de agar y 4.2 gr de piloncillo en 250 ml de agua bidestilada. Se esteriliza esta mezcla en el autoclave y se deja enfriar a 55°C. Se añaden 5 ml de ácido propiónico y 250 ml de jugo de manzana. Se vierte este medio en las cajas de Petri y se mantienen en refrigeración hasta su uso.

Se colectan huevos por 24 h a 25°C aproximadamente. Las cajas de Petri se cambian entonces y se mantienen a 25°C por otras 24 h para que todos los huevos completen su desarrollo embrionario y se mueran aquellos con efectos letales. Durante este proceso se revisan las cajas dos o tres veces para eliminar con pinzas de punta fina las larvas que eclosionan.

IV. Preparación de cutículas embrionarias.

Para la preparación de cutículas, se añade agua desionizada a las cajas de Petri y se remueven los embriones con un pincel. Se transfieren a una malla de nylon y se colocan durante 4 min en hipoclorito de sodio al 100% para decorionarlos. Se enjuagan entonces con agua desionizada sobre la misma malla y se lavan con tritón al 0.1 % en PBS. Se transfieren con el pincel a un tubo eppendorf a una mezcla de 500 µl de heptano, 500 µl de metanol y 50 µl de EGTA 0.5 M. Se agitan durante 30 segundos y se elimina la capa superior (heptano) con cuidado, para no perder embriones. Se añaden 500 µl de metanol y se agitan durante unos segundos. La mayoría de los embriones se depositan en el fondo del tubo. Se hacen otros dos lavados con metanol y finalmente dos lavados con tritón 0.1 % en PBS. Los embriones se transfieren entonces a un portaobjetos con la punta recortada de una pipeta automática para no dañarlos. Se elimina el exceso de medio con papel absorbente y se montan en medio de Hoyer. Las laminillas se colocan en un plato caliente a 60°C para que se digieran todos los tejidos y solamente perduren las cutículas. Las cutículas se observaron en un microscopio óptico de campo oscuro.

V. Obtención de alelos por escisión imprecisa del elemento P.

Se cruzaron machos de la línea EP(2)2478 con hembras vírgenes de la línea a usar como fuente de transposasa:

$w; 2478/2478 \quad \times \quad w^+/w^+; Sp/CyO; Sb\Delta 2-3/TM6$

De esta primer cruce, se seleccionaron machos que tenían ojos rojos, alas curvas y quetas cortas, lo que indicaba que llevaban el elemento P de la línea EP(2)2478 y la fuente de transposasa.

$w; 2478/CyO; Sb\Delta 2-3/+$

En una segunda cruce, estos machos se cruzaron con hembras vírgenes de una línea que tiene un balanceador del segundo cromosoma ya que el elemento EP de la EP(2)2478 está insertado en el segundo cromosoma. Estos balanceadores llevan marcadores que permiten seleccionar el genotipo deseado, la cepa que se utilizó fue $y^+w; BcGla/CyO$.

$y^+w; 2478/CyO; Sb\Delta 2-3/+ \quad \times \quad y^+w/y^+w; BcGla/CyO; +/+$

En la siguiente generación se seleccionaron machos de ojos blancos. Estos individuos portan escisiones del transposón porque ya no tienen el gen reportero de ojos (rojo) presente en el elemento P. También debían tener quetas de tipo silvestre pues es este el marcador del cromosoma que contiene la fuente de transposasa.

$y^+w; \{2478\}/CyO; +/+$

Cada uno de estos machos fue producto de un evento independiente de escisión y por ello se cruzaron de manera individual con hembras vírgenes con el balanceador descrito anteriormente para establecer líneas de escisiones aquí representadas entre corchetes:

$y^+w; \{2478\}/CyO; +/+ \quad \times \quad y^+w/y^+w; BcGla/CyO; +/+$

De cada tubo se seleccionan machos y hembras vírgenes de ojos blancos, de alas curvas y cutícula amarilla. Se obtuvieron 26 escisiones.

Para determinar si en algunas de las líneas se produjeron escisiones letales, se observó la descendencia. Aquellas líneas en donde no surgieron individuos homocigotos mutantes, eran escisiones letales. Estas se analizaron y se descubrió

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

que eran letales embrionarias; por lo tanto se hicieron preparaciones de cutículas para conocer el fenotipo.

VI. Mosaicos genéticos

Generación de líneas recombinantes.

Se seleccionaron las mutaciones letales ppo^4 , ppo^5 y ppo^7 para generar mosaicos genéticos. Se cruzaron machos de cada alelo con hembras homocigas $yw; FRT40 y^+$

$$y^-w^-; ppo^x / CyO \times y^-w^-/y^-w^-; FRT40 y^+/FRT40 y^+$$

De esta cruce se seleccionaron hembras $ppo^x/FRT40 y^+$ y se cruzaron con machos de un balanceador del segundo cromosoma:

$$y^-w^- ppo^x/FRT40 y^+ \times y^-w^-; BcGla/CyO$$

El elemento P de la línea FRT es una construcción que lleva un gen de resistencia a gentamicina. Este gen se usó como marcador dominante para seleccionar individuos con la secuencia FRT. Por lo tanto la cruce se hizo añadiendo al alimento 100 μ l de una solución de 10 mg/ml de gentamicina.

Para distinguir los recombinantes deseados del resto de las moscas con secuencias FRT, se seleccionó contra la parte distal del brazo izquierdo del cromosoma 2. La parte distal estaba marcada con la inserción P[y^+]. Por lo tanto la selección de recombinantes FRT40 ppo^x , se hizo seleccionando moscas y^- , resistentes a gentamicina y con el balanceador CyO.

El fenotipo y^- indica que la inserción P[y^+] que estaba asociada con la parte distal del cromosoma parental que lleva la FRT, se recombinó de la inserción FRT. Así el cromosoma recombinante resultante debió haber recibido una región equivalente del cromosoma parental que lleva la mutación ppo^x , por lo que muy probablemente esta se recombinó en el brazo que lleva la FRT.

Ya que cada individuo fue el producto de un evento de recombinación independiente, cada uno se cruzó de manera individual con machos o hembras del balanceador del cromosoma 2:

$$y^{-w}; FRT40 (ppo^x)/CyO \times y^{-w}; BcGla/CyO$$

De cada cruce se seleccionaron machos y hembras vírgenes de alas curvas y con ojos no Glazed que es un marcador dominante del cromosoma *BcGla*, es decir que las moscas seleccionadas llevaban una copia del cromosoma recombinante y una del balanceador *CyO*. Una vez expandidas estas líneas, 20 de cada escisión, se hicieron cruces de prueba con la escisión misma, por ejemplo:

$$y^{-w}; FRT40 ppo^4/CyO \times y^{-w}; ppo^4 / CyO$$

Se eliminaron todas aquellas líneas FRT de las que nacieron individuos de alas rectas porque significaba que el cromosoma recombinante no tenía la mutación de *ppo*. De esta forma solo se mantuvieron dos líneas $y^{-w}; FRT40 ppo^4/CyO$, 3 líneas $y^{-w}; FRT40 ppo^5/CyO$ y 2 líneas $y^{-w}; FRT40 ppo^7/CyO$

Inducción de clonas mutantes.

Después de generar los cromosomas recombinantes que llevan la secuencia FRT y una mutación en *ppo* en el mismo brazo, se indujeron clonas de células homocigotas para la mutación. Para ello se cruzaron machos de cada recombinante con hembras que llevan la misma secuencia FRT pero también llevan una construcción en otro cromosoma para inducir la expresión de la flipasa (*Flp*) mediante un choque térmico. La flipasa es una recombinasa sitio específica que reconoce los sitios FRT y promueve la recombinación mitótica entre secuencias FRT. Para marcar el territorio mutante, la parte distal del brazo que lleva la FRT en la línea que lleva la fuente de flipasa, también lleva una construcción con un marcador de cutícula. Ya que nos interesaba ver efectos en las quetas, el marcador que se usó fue *ckf*⁺. Por lo tanto la cruce fue:

$$y^{-w}; FRT40 ppo^x/CyO \times fFlp; FRT40 ckf^+ / CyO$$

Las larvas de 48 ± 12 hrs, 60 ± 12 hrs y 72 ± 12 hrs después de las puestas de los huevos, se sometieron a choque térmico de 37° C durante una hora. Se

mantuvieron a 25° C para que completaran su desarrollo hasta adultos y se analizó la descendencia. Las clonas de células homocigotas para la mutación en *ppo*, generadas con este procedimiento, se identificaron como cutícula con quetas f^- ($f^-; ppo^+$), mientras que las homocigotas de tipo silvestre, también denominado "twin spot" ($f^+; ppo^+$), produjeron quetas ck^- . El resto de las células son heterocigotas ($f^+; ppo^+ / f^- ppo^-$).

La misma estrategia se usó para generar clonas de células homocigotas mutantes en los ojos con marcadores apropiados ya que en los experimentos anteriores se observó que una alteración en la expresión de *poco pelo* producía efectos en los ojos. Se usó la línea *yw; FRT40 w^+* para marcar clonas en los ojos.

Clonas de línea germinal.

Se generaron clonas de línea germinal de una línea FRT a partir de escisiones de cada grupo de complementación (ver resultados), haciendo la siguiente cruce:

$$FRT40\ ppo^+ / CyO \times ovo^D\ FRT40\ w^+$$

Las larvas de tercer estadio producto de esta cruce se sometieron a un choque térmico a 37° C durante una hora y se mantuvieron a 25° C hasta completar su desarrollo. Se seleccionaron hembras vírgenes (con clones somáticos marcados por w^-) y se hizo una segunda cruce con machos de las escisiones correspondientes, por ejemplo:

$$FRT40\ ppo^+ / ovo^D \times ppo^+ / CyO$$

Estas cruces no se mantuvieron en frascos sino en cajas para puestas de embriones para hacer preparaciones de cutículas y observar los fenotipos embrionarios, con el método que se mencionó anteriormente.

VII. Disección de discos imaginales e inmunotinción

Se cultivaron moscas *yw* como control en frascos de 250 ml con medio de cultivo para obtener una gran cantidad de larvas. Se disectaron los discos imaginales de

las larvas de 3er estadio. También se disectaron discos imaginales de larvas de la cruce *pnrGal4* con la EP(2)2478. La disección se hizo de la siguiente manera. Se colocó a la larva sobre un portaobjetos con unas gotas de buffer de fosfatos (PBS) para evitar la deshidratación y con una pinza de punta fina se le sujetó por la parte central del cuerpo mientras que con otra pinza se cortó el tercio posterior del mismo. Este se desechó. La parte anterior se sujetó con una pinza a la altura de las mandíbulas, con la parte dorsal hacia arriba. Con la otra pinza se rasgó la cutícula lo más anterior posible para exponer el conjunto de discos imaginales. Se eliminó el tejido graso y digestivo y se colocaron los discos en PBS en un tubo Eppendorf de 1.5 ml en hielo. Se colectan discos imaginales. Los discos se fijaron entonces en paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos durante 20 minutos. Se lavaron después 3 veces con buffer de fosfatos-Tritón 0.3% (PBT), durante 10 minutos en agitación cada vez. Se bloquearon los discos durante una hora con PBT-BSA. Se incubaron los discos durante toda la noche a 4° C con el anticuerpo anti-Scute preabsorbido y en una dilución 1:200. Se lavaron después los discos 3 veces durante 15 minutos cada vez con PBT. Se incubaron los discos con un segundo anticuerpo anticonejo en dilución 1:100 durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron 4 veces con PBT durante 10 minutos cada vez y se revelaron con diaminobenzidina (1.25 mg/ml). Se montaron los discos y se fotografiaron.

VIII. Fijación de ojos y cortes para observación de clonas mutantes de *poco pelo*.

Se anestesiaron las moscas con clonas mutantes en los ojos, y se separaron las cabezas del cuerpo con pinzas de punta fina. Se seccionaron las cabezas por la mitad para separar los dos ojos y se colocaron en solución de Ringer para *Drosophila* en hielo. La solución de Ringer se preparó con 1.36 g de KCl, 0.27 g de NaCl, 0.033 g de CaCl₂·H₂O y 0.121 g de Tris-base disueltos en 80 ml de H₂O. Esta solución se ajustó a un pH de 7.2 y el volumen a 100 ml con H₂O y se esterilizó en el autoclave. Una vez colectados los ojos, se sustituyó la solución de Ringer por 1 ml de la solución de fijación. La solución de fijación se preparó con 500 µl de tetraóxido de Osmio al 2%, 120 µl de glutaraldehído al 25%, 250 µl de buffer de cacodilatos 2X y 210 µl de agua desionizada. La fijación se hizo durante 30 minutos

en hielo. Se hizo una segunda fijación en tetraóxido de Osmio al 2% durante 2 horas, en hielo. Se deshidrataron durante 5 minutos en cada una de las siguientes soluciones: acetona al 30, 60, 90 y 96% y durante 10 minutos en acetona al 100%. Se dejaron durante toda la noche en Spurr-acetona (1:1) a temperatura ambiente. Por la mañana se sustituyó la mezcla por Spurr y se incubó durante 4 hr a temperatura ambiente. Se rellenaron hasta la mitad los moldes con media cabeza en cada uno de ellos, orientando el ojo hacia abajo. Se rellenó el molde y se dejó solidificar de 18 a 70 hrs a 60-65°C. Se hicieron cortes en el microtomo de 12 µm de grosor y se tiñeron con azul de metileno. Se observaron al microscopio óptico y se fotografiaron con una cámara Optronics.

IX. Fijación de adultos para microscopía electrónica de barrido.

La fijación de las moscas completas se hizo en glutaraldehído al 4% en PBS durante 2 horas habiendo hecho algunas perforaciones con pinzas de punta fina en la parte ventral del abdomen y del tórax. Se sustituyó el glutaraldehído con acetona al 50% en PBS y se guardaron en acetona al 70% hasta el momento de procesarlas para microscopía electrónica de barrido. Se hizo una deshidratación de punto crítico. Por tratarse de tejidos suaves, se hizo la técnica de "sputter coating" que consiste en depositar una capa de metal sobre la superficie del espécimen y así evitar deformaciones del mismo al someterlo al haz de electrones. Se observaron al microscopio electrónico y se tomaron fotografías.

X. Hibridación *in situ* en embriones mutantes de *poco pelo*.

Se colectaron embriones *ppo⁵*, *ppo5/CyO* y *CyO/CyO* de puestas de 24 horas y se lavaron con agua desionizada. Se decorionaron con hipoclorito de sodio al 100 % durante 4 minutos. Se lavaron nuevamente los embriones con agua desionizada y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml que contenía 800 µl de heptano, 600 µl de PBS y 200 µl de formaldehído al 36.5 %. Se incubaron durante 25 minutos con agitación lenta a temperatura ambiente. Se removió la fase inferior y se añadió 1 ml de metanol. Todos los siguientes pasos se hicieron en condiciones libres de RNAasa. Se agitó fuertemente el tubo durante 1 minuto. Se eliminó la mayoría del

líquido con cuidado (la mayoría de los embriones se sedimentan), se añadió nuevamente 1 ml de metanol y se agitó el tubo suavemente por unos segundos. Se hizo un tercer cambio con metanol. Se eliminó el metanol y se hicieron tres cambios con etanol. Se hizo un cambio por una mezcla de etanol:xileno (1:1). Se cambió a xileno y se incubaron después de 1-4 horas con agitación suave. Después del tiempo de incubación se hizo un cambio a etanol:xileno (1:1) y posteriormente tres cambios en etanol. Se incubaron los embriones durante 5 minutos en una mezcla de etanol y solución de fijación (1:1). La solución de fijación es PBT y 5% de formaldehído al 36.5% (el PBT es PBS y Tween al 0.3%). Posteriormente se incubaron los embriones durante 25 minutos en solución de fijación en agitación y después se hicieron tres cambios con PBT. Se incubaron durante 2 minutos en una solución de proteinasa K de 4 µg/ml en PBT. La actividad de la enzima se detuvo haciendo tres cambios en PBT. Se incubaron nuevamente los embriones por 25 minutos en solución de fijación, en agitación. Se hicieron tres cambios de PBT con incubaciones de 2 minutos cada uno. Se mantuvieron en agitación por 10 minutos en una mezcla de solución de hibridación y PBT (1:1). La solución de hibridación se preparó con formamida al 50%, SSC 5X, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón y Tween 20 al 0.1%. Los embriones se incubaron durante 1 hora a 55°C en una solución de hibridación. Se eliminó la mayor parte de la solución de hibridación y se añadió la sonda desnaturalizada. La sonda que se utilizó fue una sonda de *dpp* (1 µl de la sonda en 100 µl de la solución de hibridación) y se desnaturalizó incubándola durante 10 minutos a 80°C e inmediatamente después colocándola en hielo. La incubación de los embriones con la sonda desnaturalizada fue durante toda la noche a 55°C. Al siguiente día se recuperó la mayor cantidad de sonda posible, ya que se reutiliza varias veces, y se hicieron los siguientes cambios de 15 minutos cada uno a 60°C: a) 2 veces con solución de hibridación, b) 800 µl de solución de hibridación y 200 µl de PBT, c) 600 µl de la solución de hibridación y 400 µl de PBT, d) 400 µl de la solución de hibridación y 600 µl de PBT, e) 200 µl de la solución de hibridación y 800 µl de PBT, y f) 2 veces con PBT. Durante estos cambios se incubaron algunos embriones de tipo silvestre fijados con el anticuerpo anti-Digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:200 en PBT, manteniéndose en agitación a temperatura ambiente para preabsorber al

anticuerpo. Al término de los cambios se incubaron los embriones hibridados durante 1 hora y 45 minutos con el anticuerpo anti-Digoxigenina diluído 1:2000 en PBT. Después de la incubación se hicieron tres cambios de 15 minutos cada uno en PBT. Se hicieron dos cambios más de 5 minutos cada uno en la siguiente solución salina: NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM y Tris-HCl 100 mM, pH 9.5. Al final se añadió 1 ml de la solución salina conteniendo 20 µl del sustrato. El sustrato consiste en una mezcla de NBT (nitroblue tetrazolium) y BCIP (bromo-cloro-indolil-fosfato). La reacción se detuvo lavando con PBS, aproximadamente a las 2 horas. Los embriones se colocaron en un portaobjetos, se eliminó la mayor parte de PBS con papel absorbente y se montaron en Polymount.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se cruzaron 2100 líneas transgénicas con inserciones de tipo UAS, obtenidas por Rørth con el alelo de *pnrGal4*. De todas esas cruza, en el 9% (191 líneas) se encontraron modificaciones del fenotipo adulto de *pnrGal4/+*. La mayoría muestra fenotipos más acentuados (falta de más quetas, hendidura torácica más pronunciada, etc.) y menor cantidad de supresión del fenotipo. Esto se debió probablemente a que el fenotipo de *pnrGal4/+* es muy débil y es más difícil de distinguir. Encontramos también efectos de letalidad en diferentes etapas de desarrollo. Los resultados de este análisis se muestran con detalle en el artículo (ver Tabla 1).

Se consultó la base de datos del Proyecto del Genoma de *Drosophila* (<http://flybase.bio.indiana.edu/>), para obtener información sobre los sitios de inserción de los transposones de todas las líneas que produjeron algún tipo de modificación. En varias de las líneas, el elemento P está insertado en un gen ya conocido y que se sabe participa en la formación del tórax. En estos casos nuestros resultados corroboran reportes previos y sirvieron como nuestros controles positivos.

Un ejemplo de lo anterior son las líneas EP(3)0415, EP(3)3087, EP(3)3614, y EP(3)3620, que son inserciones en el gen *emc*. Las inserciones dan fenotipos extremos de acentuación, con moscas sin quetas en el área de expresión de *pnr*.

En otras líneas, el elemento P está insertado en un gen ya conocido pero no relacionado con la formación del tórax por lo que los resultados son novedosos. Algunos ejemplos son las líneas EP(2)0563 (*kismet*) y la EP(X)0355 (*Dsp1*). Estos genes se han relacionado con eventos de organización de la cromatina y control transcripcional en otros procesos del desarrollo pero no en el cerrado torácico.

Por último, encontramos varias líneas en las que el transposón está insertado en un gen no caracterizado. Estas líneas son muy buenas candidatas para identificar genes nuevos que participan en la formación del tórax y que se deben estudiar a fondo. Debido a la imposibilidad de estudiar todas estas últimas líneas, analizamos la información contenida en las bases de datos para seleccionar una de ellas y estudiarla a profundidad. Los criterios utilizados para la selección fueron: a) que el fenotipo de expresión ectópica fuera muy evidente, b) que no estuviera

caracterizado el locus, c) que existieran una o varias clonas con DNAC para facilitar su caracterización molecular y d) que existiera material genético, como otras líneas EP o P o deficiencias en la región o letales. Seleccionamos la línea EP(2)2478 porque cumplía con estas características. Además, cuando analizamos en el laboratorio el fenotipo de una letal embrionaria insertada muy cerca de EP(2)2478, la letal l(2)k15817, encontramos un fenotipo de apertura dorsal. Esto último resulta muy interesante ya que como objetivo queremos describir nuevos genes que participan en la formación del tórax y el cerrado dorsal.

Por todo lo anterior, caracterizamos el locus representado por EP(2)2478, al que llamamos *poco pelo* (*ppo*). El nombre deriva del fenotipo resultante al alterar sus niveles de expresión en el tórax. Este fenotipo se caracteriza por pérdida de varias macroquetas y microquetas (ver artículo, Figura 3C).

poco pelo.

1. Expresión alterada de *poco pelo* con diferentes líneas Gal4

Con el objeto de comparar el efecto producido por la expresión modificada de *poco pelo* en el fondo genético *pnrGal4* con otros fondos genéticos, se usaron otras líneas Gal4, *apGal4* y C765. Estas líneas expresan el transactivador en áreas más extensas del disco imaginal del tórax y el ala, y permitieron evidenciar la participación de *poco pelo* en el ala.

apterous (*ap*) es un factor de transcripción con dominios LIM y homeodominios que participa en la formación del sistema nervioso, de los halterios y de las alas (O'Keefe et al., 1998). En la etapa larvaria, *ap* se expresa en grupos de células del compartimento dorsal del disco del ala, que dará origen al tórax, donde también se expresa *pnr*, y en la región que dará origen a la superficie dorsal del ala. Los adultos heterocigotos *apGal4* tienen alas y tórax de tipo silvestre. La cruce de la EP original de *poco pelo* con *ap Gal4* dio moscas con falta de microquetas en la región media dorsal del tórax, aunque no tan evidente como el fenotipo de la EP de *ppo* con *pnr Gal4* (ver artículo, Figura 3D). En ocasiones también faltan algunas de las macroquetas dorsocentrales. Como el transactivador también se expresa en el ala, vimos que la alteración en la expresión de *poco pelo*

produce modificaciones en el número y distribución de las quetas del borde del ala (ver artículo, Figura 5D) y venas ectópicas en esta estructura.

La modificación de la expresión de *ppo* con la línea Gal4 en C765 también produce falta de macroquetas escutelares, de algunas dorsocentrales y de pocas microquetas. El transactivador Gal4 también se expresa en el ala y en conjunción con la EP de *ppo* produce venas ectópicas, falta de sensilas en la vena LII y alteración en la distribución y número de las quetas del margen anterior del ala tanto en la superficie dorsal como en la ventral.

De lo anterior deducimos que independientemente del fondo genético en el que se induzca la alteración en la expresión de *poco pelo*, hay defectos en la formación de quetas en el tórax y el ala. El efecto más acentuado con *pnrGal4* sugiere una interacción genética entre *pnr* y *poco pelo*.

apGal4 también se usó con otras 19 líneas EP que dieron modificaciones del fenotipo de *pnrGal4*. En la mayoría de ellas se producen efectos similares, aunque en algunas hay efectos diferentes y en 4 líneas no se observa ningún efecto. Esto confirma la confiabilidad del "screening" y da evidencias a favor de que los genes cuya expresión fue explicada posiblemente participan en los procesos de formación del tórax (ver artículo, Tabla 1).

2. Obtención de alelos por escisión imprecisa del elemento P

La caracterización genética de *poco pelo* se inició con la obtención de alelos por escisiones imprecisas del elemento EP. Se obtuvieron 24 líneas. En cinco de estas líneas, la escisión produjo letalidad embrionaria en homocigosis. Las 19 líneas restantes son homocigotas viables. Se hicieron pruebas de complementación para determinar si las letales eran alélicas y se hicieron preparaciones de cutículas para ver los fenotipos embrionarios.

3. Pruebas de complementación.

Se hicieron pruebas de complementación para determinar alelismo. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Los resultados indican que existen dos grupos de complementación, uno que incluye a *ppo*², *ppo*⁵ y *ppo*⁷ (Grupo I) y otro grupo que incluye a *ppo*³ y *ppo*⁴ (Grupo II). La complementación entre los alelos del grupo I con los del grupo II, sugiere la posibilidad de que los grupos de complementación sean alelos de dos genes diferentes de tal manera que su combinación produce un fenotipo de tipo silvestre. Esto es posible si se trata de dos genes que están muy próximos o sobrelapados. De esta manera al llevarse a cabo la escisión se puede afectar a los dos loci. Los fenotipos embrionarios de los dos grupos son muy similares. Esto también puede implicar que se trata de un solo locus con complementación intragénica. Para poder discernir entre estas posibilidades es indispensable clonar a *poco pelo* y mapear molecularmente las escisiones. Sin embargo, la forma más rápida y fácil de determinar sobre estas posibilidades es repetir las cruzas en un fondo genético que inhiba la transvección, lo cual permitiría corroborar o eliminar alguna de las opciones.

Tabla 1. Resultados de las pruebas de complementación entre los diferentes grupos letales obtenidos por escisiones imprecisas del elemento EP(2)2478.

Grupos	Resultado	Fenotipo
<i>ppo</i> ² X <i>ppo</i> ³	Complementan	Tipo silvestre
<i>ppo</i> ² X <i>ppo</i> ⁴	Complementan	Tipo silvestre
<i>ppo</i> ² X <i>ppo</i> ⁵	No complementan	Letal embrionario
<i>ppo</i> ² X <i>ppo</i> ⁷	No complementan	Letal embrionario
<i>ppo</i> ³ X <i>ppo</i> ⁴	No complementan	Letal embrionario
<i>ppo</i> ³ X <i>ppo</i> ⁵	Complementan	Tipo silvestre
<i>ppo</i> ³ X <i>ppo</i> ⁷	Complementan	Tipo silvestre
<i>ppo</i> ⁴ X <i>ppo</i> ⁵	Complementan	Tipo silvestre
<i>ppo</i> ⁴ X <i>ppo</i> ⁷	Complementan	Tipo silvestre
<i>ppo</i> ⁵ X <i>ppo</i> ⁷	No complementan	Letal embrionario

4. Fenotipo embrionario de las diferentes escisiones de *poco pelo*.

El análisis de las cutículas embrionarias de las líneas de los dos grupos de complementación dieron resultados muy parecidos. Se observó un defecto muy

evidente de cerrado dorsal. Esto valida claramente la hipótesis planteada en la tesis, ya que se demostró que un gen que participa en la formación del tórax, también participa en el cerrado dorsal. Las cutículas además muestran defectos en el proceso de elongación/retracción de la banda germinal y defectos en la cabeza. Los problemas durante la elongación/retracción de la banda germinal dan como producto un fenotipo que recuerda a los mutantes del grupo "U-shaped", ya que varios de los segmentos posteriores permanecen plegados sobre la parte dorsal del embrión (ver artículo Figura 4B). Lo anterior puede interpretarse como defectos en el alargamiento de la banda germinal que impide que se complete este evento morfogénico, o defectos en la retracción de la misma. La primera interpretación es la más probable debido a los resultados que se describen más adelante en pruebas de interacción con *u-shaped* (*ush*). Es posible que *poco pelo* participe en la elongación de la banda germinal. *hindsight* (Lamka y Lipshitz, 1999), *pnr* y *ush*, del grupo "U-shaped" presentan fenotipos similares.

5. Interacciones genéticas.

a) *poco pelo* y *pannier*.

Los heterocigotos de las escisiones letales de *poco pelo* tienen un fenotipo de tipo silvestre. Para estudiar si existen interacciones con *pnr*, se hicieron cruza entre *pnr* y estos alelos letales y se examinaron los dobles heterocigotos obtenidos (ver Tabla 2).

Los datos muestran que hay interacciones genéticas entre los grupos de *poco pelo* y *pannier*. El grupo I muestra una supresión del fenotipo de *pnrGal4/+*, al igual que algunas de las líneas que se obtuvieron en el "screening" de expresión modificada, y sugeriría que este grupo de *poco pelo* y *pnr* interactúan.

El fenotipo del grupo II es muy similar al obtenido con la EP de *poco pelo* (ver artículo Fig 3C). Esto puede tener diferentes explicaciones. Por un lado, se puede pensar que el elemento EP de la línea 2478 esta orientado para producir un transcrito antisentido. Existen varias líneas EP en donde se sabe que la inserción es antisentido (Rørth et al., 1998; Abdelilah-Seyfried et al., 2000). De esta forma, en presencia del transactivador Gal4, lo que se genera es un transcrito antisentido de

poco pelo y el resultado final es una falta de función, en lugar de una sobreexpresión.

Tabla 2. Resultados de las interacciones genéticas entre los grupos letales de *poco pelo* y *pnrGal4*.

	Genotipo	Fenotipo
Control	<i>pnrGal4/+</i>	Falta de alguna macroqueta postvertical y algunas microquetas en la región media central torácica. Hendidura torácica muy ligera.
<i>poco pelo</i>	EP(2)2478/+; <i>pnrGal4/+</i>	Faltan macroquetas dorsocentrales y escutelares y microquetas en la región de <i>pnr</i> . El escutelo está deformado.
Grupo I	<i>ppo</i> ² /+; <i>pnrGal4/+</i>	Tórax de tipo silvestre.
	<i>ppo</i> ⁵ /+; <i>pnrGal4/+</i>	Tórax de tipo silvestre.
	<i>ppo</i> ⁷ /+; <i>pnrGal4/+</i>	Tórax de tipo silvestre
Grupo II	<i>ppo</i> ³ /+; <i>pnrGal4/+</i>	Falta la mayoría de las microquetas en la región de expresión de <i>pnr</i> , faltan las macroquetas dorsocentrales y las escutelares.
	<i>ppo</i> ⁴ /+; <i>pnrGal4/+</i>	

También existe la posibilidad de que tanto la ganancia como la pérdida de función de *poco pelo* tengan el mismo efecto. Situaciones similares han sido reportadas para otro genes como el mismo *pnr* (Heitzler et al., 1996). Nosotros lo hemos demostramos para *dpp* (ver artículo). En este segundo caso la inserción podría también ser de sentido es decir, producir un transcrito normal y generar entonces expresión ectópica de *ppo*. Sin embargo, de una u otra manera, la falta y/o ganancia de función de *poco pelo* en combinación con una condición hipomorfa de *pannier*, tienen efecto y demuestran una interacción genética.

Para estudiar más a fondo estas interacciones genéticas entre *pannier* y grupos de *poco pelo* se hicieron cruza entre la línea UAS-*pnr*/Cyo ; *pnr Gal4* /TM2ry y la línea EP(2)2478 o bien con un representante de cada grupo letal de *poco pelo*. Esto nos permitió ver simultáneamente en los adultos los efectos de cambios en la

expresión de *pnr* y *poco pelo* en heterocigosis. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Vemos que la expresión modificada de *poco pelo* y *pannier* simultáneamente, tiene un efecto muy marcado cuando se usa la línea original EP(2)2478. El fenotipo producido es muy similar al que se observa cuando se sobreexpresa *emc* (ver artículo, Figura 1C), un antagonista de los genes proneurales (Posakony, 1994). Este resultado indica que un balance entre los niveles de *poco pelo* y *pnr* en la formación de estos órganos sensoriales es importante y sugiere una posible interacción directa entre los productos de estos genes. Los efectos observados cuando se usa *ppo*³ o *ppo*⁵ son muy similares a los que se presentan en la tabla 2, lo que apoya las ideas ya propuestas.

Tabla 3. Efectos de la expresión alterada de *poco pelo* y *pannier*.

Genotipo	Fenotipo
UAS- <i>pnr</i> ; <i>pnrGal4</i> /+	Tipo silvestre
UAS- <i>pnr</i> /2478; <i>pnrGal4</i>	Ausencia casi total de macroquetas y microquetas en la región dorsocentral torácica e incluso abdominal.
UAS- <i>pnr</i> / <i>ppo</i> ³ ; <i>pnrGal4</i>	Faltan varias microquetas y en ocasiones macroquetas dorsocentrales o escutelares.
UAS- <i>pnr</i> / <i>ppo</i> ⁵ ; <i>pnrGal4</i>	Tipo silvestre.

b) poco pelo y u-shaped.

Ush y Pnr interactúan directamente. En vista de la interacción entre *poco pelo* y *pnr* y de la similitud en el fenotipo que tienen las cutículas de los mutantes de *poco pelo* y las de mutantes nulos de *ush*, se hicieron experimentos de interacción genética entre ambos loci.

ush se requiere para a) el mantenimiento de la amnioserosa (Frank y Rushlow, 1996), b) la retracción de la banda germinal (Frank y Rushlow, 1996), c) la diferenciación de las células cardíacas (Fossett, et al., 2000), y d) antagoniza la

función de Pnr en el establecimiento del patrón de las quetas torácicas en el adulto regulando la expresión de los genes proneurales (Haenlin, et al., 1997; García-García, et al., 1999; de Celis, et al., 1999 y Sato and Saigo, 2000). Los alelos nulos de *ush* son letales, con defectos de retracción de la banda germinal y en el cerrado dorsal. Las cutículas embrionarias del mutante nulo *ush*^{E6} tienen forma de "U" ya que la banda germinal no se retrae y la mitad posterior del embrión está plegada sobre la mitad anterior. En el laboratorio se generó una recombinante con el alelo nulo *ush*^{E6} y la letal *ppo*³. Las cutículas embrionarias del doble mutante muestran el fenotipo embrionario de *ppo*³. En estos embriones la mitad posterior del embrión está menos plegada sobre la mitad anterior, en comparación a las cutículas embrionarias de *ush*^{E6} (Figura 8). Los resultados en condiciones de homocigosis y heterocigosis se muestran en la tabla 4.

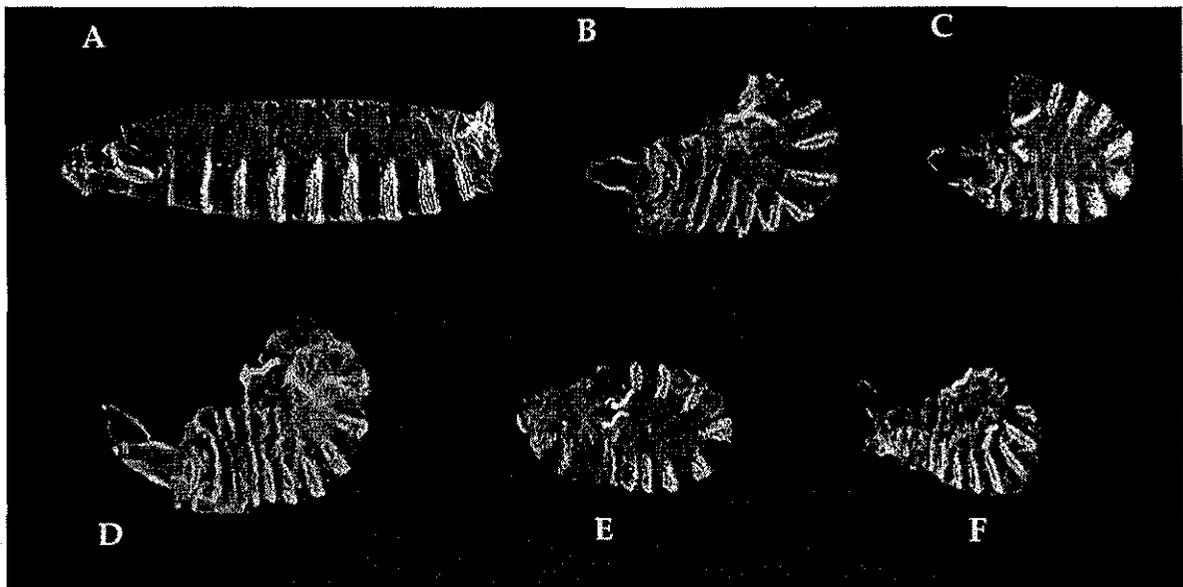


Figura 8. Fenotipos embrionarios resultantes de las pruebas de interacción genética entre *poco pelo* y *ush*. Se muestran las cutículas embrionarias de tipo silvestre (A), *ppo*³/*ppo*³ (B), *ush*^{E6}/*ush*^{E6} (C), *ppo*³*ush*^{E6}/*ppo*³ (D), *ppo*³*ush*^{E6}/*ush*^{E6} (E) y *ppo*³*ush*^{E6}/*ppo*³*ush*^{E6} (F).

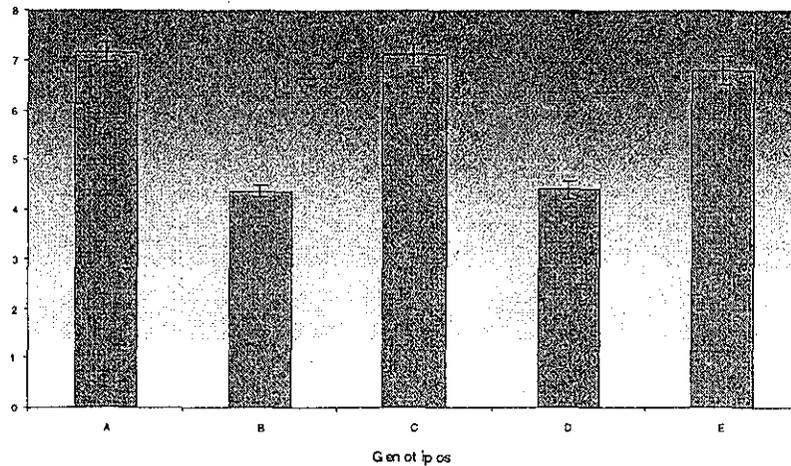
Para hacer una estimación más precisa de los defectos en el alargamiento/acortamiento de la banda germinal en el doble mutante se hizo lo siguiente: se contó el número de bandas de dentículas abdominales en posición ventral en las cutículas embrionarias, lo que evidencia la posición de los segmentos abdominales, en una línea recta imaginaria. En el caso de los mutantes *ush*^{E6}/*ush*^{E6},

la mitad posterior del embrión está totalmente plegada sobre la mitad anterior y en promedio hay alrededor de 4.3 bandas de dentículas en la línea recta imaginaria ventral. En el caso de los mutantes $ppo^3ush^{E6}/ppo^3ush^{E6}$ hay en promedio 6.8 bandas de dentículos en la recta imaginaria. Esto no es estadísticamente distinto a los mutantes ppo^3 (ver Gráfica 1). Sin embargo existen diferencias significativas entre los fenotipos tipo “*ush*” y “*ppo*”.

Tabla 4. Resultados de los fenotipos embrionarios en cutículas de la línea recombinante $ppo^3ush^{E6}/+$ en diferentes combinaciones de homocigosis y/o heterocigosis para ambos loci.

Genotipo	Fenotipo
ppo^3/ppo^3	Defectos en el alargamiento de la banda germinal y defectos en el cerrado dorsal. [Fenotipo “ <i>ppo</i> ”].
ush^{E6}/ush^{E6}	Defectos en la retracción de la banda germinal, defectos en la cabeza y defectos de cerrado dorsal. [Fenotipo “ <i>ush</i> ”].
ppo^3ush^{E6}/ppo^3	Fenotipo <i>ppo</i> .
ppo^3ush^{E6}/ush^{E6}	Fenotipo <i>ush</i> .
$ppo^3ush^{E6}/ppo^3ush^{E6}$	Fenotipo <i>ppo</i> .

El fenotipo embrionario de la doble mutante es como el de ppo^3 , y sugiere que *poco pelo* tiene una participación en la embriogénesis anterior a la participación de *ush*, siempre y cuando el alelo sea de falta de función. Además, no sabemos si el efecto es durante el alargamiento o la retracción de la banda germinal pero independientemente de cual sea el efecto, las consecuencias son defectos en el cerrado dorsal. Para determinar exactamente si hay problemas durante el alargamiento o durante la retracción de la banda, será necesario otro tipo de estudios como por ejemplo, filmaciones *in vivo* de embriones mutantes. También será necesario estudiar estas interacciones con el otro grupo de *poco pelo*.



TEST CON FALLA DE ORIGEN

Gráfica 1. Defectos en el alargamiento/retracción de la banda germinal en cutículas embrionarias. Los genotipos de los embriones son: *ppo³/ppo³* (A), *ush^{E6}/ush^{E6}* (B), *ppo³ush^{E6}/ppo³* (C), *ppo³ush^{E6}/ush^{E6}* (D) y *ppo³ush^{E6}/ppo³ush^{E6}* (E). Los datos graficados son los promedios ± el error estándar del número de bandas de dentículos, en posición ventral en 100 embriones.

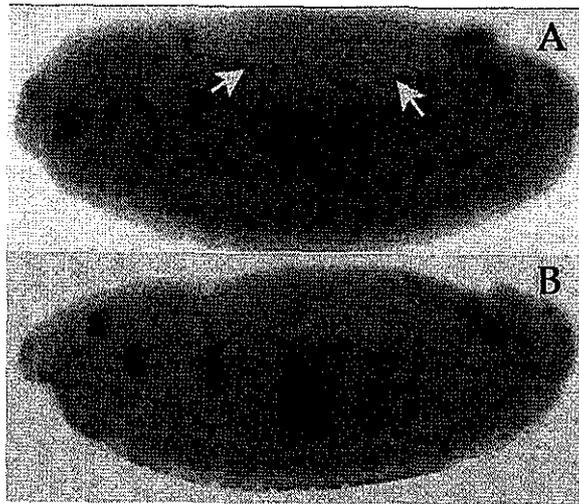
Se generó también una línea recombinante *UAS-ush EP(2)2478/+*. Esta recombinante se cruzó con la línea *pnrGal4* para inducir simultáneamente la sobreexpresión de *ush* y modificación en las expresiones de *poco pelo* y *pnr*. Esta cruce produjo adultos de tipo silvestre. Este resultado apoyaría la interpretación de que la *EP(2)2478* produce transcritos antisentido y que *ush* es hipostático sobre *poco pelo*, compensando la falta de función de *poco pelo* con la sobreexpresión de *ush*. También sugeriría que *ppo* y *pnr* actúan en el mismo sentido.

Existen varios reportes en la literatura en donde se demuestra que *pannier* y *ush* interactúan directamente formando dímeros (Haenlin et al., 1997; Cubbada et al., 1997) en la formación de las quetas torácicas. Ambos son considerados genes de prepatrón. Los genes de prepatrón prefiguran la formación de patrones con cierto grado de refinamiento (Stern, 1954), delimitando áreas o territorios embrionarios por medio de combinaciones específicas de factores de transcripción. Nosotros hemos demostrado interacciones genéticas entre *poco pelo* y *pannier* en la formación de los órganos sensoriales y epistásis entre *ush* y *poco pelo* en la embriogénesis durante el alargamiento/retracción de la banda germinal y durante la metamorfosis, en la formación de las quetas. De esta forma tanto nuestros resultados como los antecedentes nos permiten sugerir que *poco pelo* es

probablemente otro gen de prepatrón como *pannier* y *ush*. Sin embargo, se requieren estudios moleculares de estos tres loci, además del análisis clonal de falta de función de *poco pelo* (ver más adelante), para probar esta hipótesis. También será necesario obtener recombinantes entre *ush*^{E6} y alguna línea del grupo I para comparar con los resultados presentados.

6. Efectos de la falta de función de *poco pelo* sobre la expresión de *dpp* durante el cerrado dorsal.

Recientemente, se ha demostrado que *hindsight* (*hnt*), otro gen del grupo "U-shaped", regula la actividad de la cinasa de Jun (JNK) (Reed et al., 2001). Cuando se sobreexpresa *hnt* en el epitelio lateral embrionario se observa una disminución en la actividad de la vía JNK en las células de la hilera guía. Esto produce defectos de cerrado dorsal. Además, existen evidencias de que la interacción entre *hindsight* y *ush* se requiere para la diferenciación de la hilera guía (Stronach and Perrimon, 2001) y que *pannier* se requiere para la activación de la vía Dpp de manera independiente a su activación por la vía JNK en la hilera guía (Herranz and Morata, 2001). Como hemos demostrado interacción entre *pnr* y *poco pelo* a lo largo de la elongación/retracción de la banda germinal y el cerrado dorsal, decidimos investigar si la vía de la cinasa de Jun está afectada en ausencia de *poco pelo*. Para ello hicimos hibridaciones *in situ* en embriones mutantes de *poco pelo*, utilizando la sonda de *dpp* como marcador de la diferenciación de las células de la hilera guía. Observamos falta de expresión de *dpp* en los embriones homocigotos mutantes de *poco pelo* en las células de la hilera guía (Figura 9). Estos datos son argumentos a favor de que *poco pelo* puede estar regulando la actividad de la vía JNK, y tal vez interactuando directa o indirectamente con *hindsight*, *ush* y *pnr*, durante el cerrado dorsal. Esto y el fenotipo de las cutículas de *ppo*, sugieren además que *ppo*, como *hnt*, *ush* y *pnr* es un gen del grupo "U-shaped".



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Expresión de *dpp* al inicio del cerrado dorsal. Se muestra la expresión de *dpp* por hibridaciones *in situ* en embriones de tipo silvestre (A) y en embriones mutantes de *poco pelo* (B). Note la expresión de *dpp* en las células de la hilera guía (flechas) en los embriones de tipo silvestre y la falta de expresión en el embrión mutante *ppo*.

7. Efectos de la falta de función de *poco pelo* en el adulto.

a) Clonas mutantes de *poco pelo* en el tórax y el ala.

Se generaron clonas de células homocigotas mutantes de *ppo* para estudiar los efectos de falta de función. Se estudiaron clonas homocigotas mutantes en cuando menos una línea de cada grupo de complementación. Se generaron líneas FRT40 con los alelos *ppo*⁴, *ppo*⁵ y *ppo*⁷ como está descrito en los métodos. Para las tres líneas estudiadas se obtuvieron clonas en el tórax, en las alas y en los ojos.

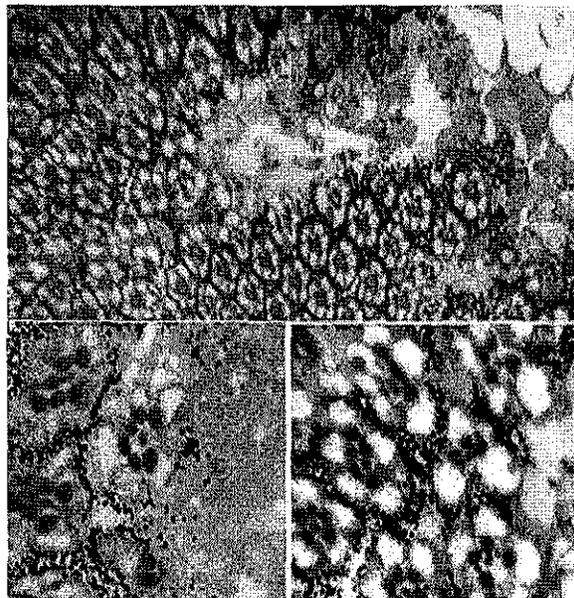
En el tórax, los territorios mutantes tienen menor densidad de microquetas y faltan macroquetas dorsocentrales o escutelares cuando la clona incluye las zonas en donde surgen estos órganos sensoriales (ver artículo, Figura 3G). En algunos casos, estas macroquetas están presentes pero son mesoquetas, más pequeñas. En el ala se altera la distribución y/o el número de quetas en el borde anterior en la superficie dorsal o ventral del ala, cuando el territorio mutante incluye esa región, lo que recapitula el efecto obtenido al inducir alteraciones en la expresión de *ppo* con la línea *apGal4* (ver artículo, Figura 5C y 5D). Cuando la clona mutante incluye alguna vena, aunque el efecto se observa principalmente en

la vena LII, surgen venas ectópicas, un efecto similar al que se produjo cuando se usó la línea C765 para modificar los niveles de *ppo* en el ala.

Todos estos datos apoyan la participación de *poco pelo* en la formación de órganos sensoriales en el tórax y en el ala. En el tórax esta función se lleva a cabo en interacción con *pannier* y *ush*, pero en el ala no, ya que ni *pannier* ni *ush* se expresan ahí. En estos individuos mosaico se observaron ciertos efectos en los ojos y por ello se decidió generar clonas mutantes de *poco pelo* usando un marcador genético específico de ojos, *white*⁺ (*w*⁺).

b) Clonas mutantes de *poco pelo* en el ojo.

Las clonas mutantes de la línea *ppo*⁵ en los ojos producen zonas necróticas o apoptóticas. Para determinar con mayor detalle el efecto de falta de función de *poco pelo* en los ojos, se fijaron las cabezas de individuos con clonas en los ojos y se hicieron cortes histológicos (ver métodos). Lo que se observó fue degeneración del tejido (Figura 10). Será necesario utilizar alguna técnica para determinar si hay procesos apoptóticos o no.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 10. Clona mutante de *poco pelo* en el ojo. Se muestran cortes tangenciales de ojo de individuos mosaico. En el territorio mutante *ppo* (marcado por la falta de pigmento) se observa degeneración de la retina, tanto a menor aumento (40X, la imagen superior) como a mayor aumento (100X, las imágenes inferiores).

Se indujo también la alteración en la expresión de *poco pelo* cruzando la línea original EP(2)2478, con *eyGAL4* y con *GMRGAL4*, líneas que expresan el transactivador GAL4 en el ojo. En ambos casos se produjeron defectos en el ojo. Con *eyGAL4* los ojos son de menor tamaño y rugosos (Figura 11) y con *GMR* los ojos son rugosos y los omatidios están muy desorganizados. En ambos casos será necesario hacer cortes histológicos para determinar con precisión los efectos. Falta aún generar clones en los ojos con las líneas letales de *poco pelo* del grupo II.

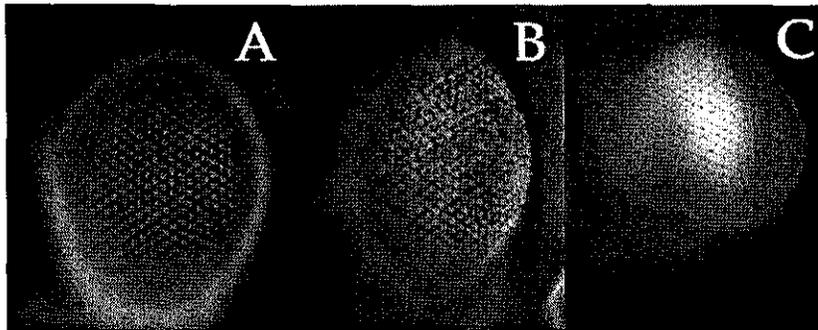


Figura 11. Modificaciones en la expresión de *poco pelo* en el ojo. En (A) se observa el ojo de un individuo de tipo silvestre (note el arreglo regular de los omatidios); en (B) el ojo de un individuo producto de la cruce EP(2)2478 X *GMRGAL4* (note el arreglo irregular de los omatidios), y en (C) el ojo producto de la cruce EP(2)2478 X *eyGAL4* (note la disminución en el tamaño). En todos los casos la parte superior equivale a la región dorsal, la parte inferior a ventral, el lado izquierdo a anterior y el lado derecho a posterior. Todos los ojos fueron fotografiados a 10X.

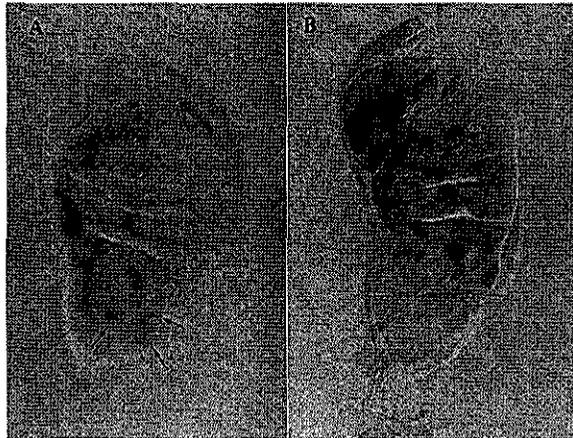
c) Clonas de línea germinal

Se generaron clonas de línea germinal con las líneas letales de *poco pelo* (ver métodos). Se observó que sus fenotipos son muy semejantes a los de los embriones homocigotos mutantes, lo que indica que *poco pelo* es un gen de efecto cigótico y no de efecto materno (ver artículo, Figuras 4B y 4C). Un gen de efecto cigótico es aquel cuyo producto participa en el desarrollo temprano y se expresa exclusivamente en el cigoto.

8. Efectos de la falta de función de *poco pelo* sobre la expresión de *scute*.

Puesto que se requiere de la expresión de genes proneurales para la formación de las quetas, se decidió analizar la expresión de uno de ellos, *scute* (*sc*), en el disco

imaginal de tórax y ala cuando hay modificación de la función de *poco pelo* usando larvas EP(2)2478/+; *pnr Gal4*/+. Se observó una reducción en la expresión de *sc* en la región del grupo proneural dorsocentral y en el escutelar (Figura 12), lo que sugiere que *poco pelo* podría estar involucrado en la regulación de la expresión de los genes proneurales. Este es otro argumento para sugerir que *poco pelo* al igual que *pannier* y *ush*, es un nuevo gen de prepatrón.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12. Expresión de *scute* en disco imaginal del ala y del tórax. Se muestra la expresión de *scute* en un disco de ala de la tercera etapa larvaria de tipo silvestre (A) y en un disco de un individuo EP(2)2478/+; *pnr Gal4*/+. Las flechas en (A) indican la posición de los grupos proneurales dorsocentrales y escutelares: grupos que en (B) presentan disminución o ausencia de expresión de *scute*.

Está descrito que *pannier* se une específicamente a un “enhancer” del complejo proneural *ac-sc* y de esta forma activa su expresión (Gómez-Skarmeta et al., 1995). A su vez, la actividad de *pannier* depende de la de *ush*, un regulador negativo de los genes proneurales. Es muy posible que *poco pelo* interactúe con los productos de estos dos genes formando un complejo que regule la expresión de los genes proneurales. De acuerdo a las pruebas de complementación entre las diferentes líneas obtenidas de *poco pelo*, se predice que el locus es complejo. Como se mencionó anteriormente, puede ser que se trate de un locus con subelementos y que estos sean capaces de experimentar complementación intragénica. Un ejemplo de un locus en el que hay complementación intragénica es *kayak* (Riesgo-Escovar and Hafen, 1997b). Para demostrar si este es nuestro caso, será necesario repetir las pruebas de complementación en un fondo que impida que se lleve a cabo el

fenómeno de transvección. Si en este caso no hay complementación entre los dos grupos de *poco pelo*, estaremos hablando de 5 alelos. Pero si en esa misma condición seguimos observando complementación entre los dos grupos de *poco pelo*, nos inclinaremos a pensar que la región incluye dos loci es decir, que probablemente sean dos genes contiguos y que participan en la misma función. Esto no es difícil de imaginar ya que en *Drosophila* existen varios grupos de genes con sus zonas de regulación organizadas en complejos que participan en la misma función como los miembros de complejo *ac-sc* (Campuzano and Modolell, 1992), los del complejo *iroquois* (Gómez-Skarmeta et al., 1996), los del complejo *Bar* (Sato et al., 1999) y los del complejo *spalt/spalt-related* (De Celis et al., 1999). Los miembros de cada complejo participan en la misma función, la formación de órganos sensoriales en el tórax de *Drosophila*. En el caso de *poco pelo*, si podemos demostrar que se trata de dos loci, los dos estarían participando durante la embriogénesis en los procesos de elongación/retracción de la banda germinal y en el cerrado dorsal. En etapas posteriores su participación es en la formación de las quetas y otros órganos sensoriales.

poco pelo es un gen del grupo "U-shaped" junto con *hnt*, *ser*, *tup*, *ush* y *pnr*, dada la similitud en el fenotipo embrionario de la falta de función de *poco pelo*, con el fenotipo de mutantes nulos de estos otros genes ya caracterizados. Sin embargo, su participación es, al parecer durante la formación de la banda germinal mientras que al menos algunos de los otros genes "*ush*" presentan problemas de retracción de la misma.

Además, *poco pelo* al igual que *pnr* y *ush*, funciona como un gen de prepatrón. Demostramos que hay interacciones genéticas entre *poco pelo* y *pnr* y entre *poco pelo* y *ush*. Se ha propuesto que el tórax en desarrollo está dividido en varios subdominios en los que gobiernan diferentes combinaciones de genes de prepatrón y así prefiguran el desarrollo de los órganos sensoriales. Será muy importante determinar el patrón de expresión de *poco pelo* en diferentes etapas de desarrollo y ver si efectivamente se coexpresa al menos parcialmente con estos u otros genes de prepatrón.

CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra que los tamizajes genéticos basados en la modificación de los niveles de expresión de genes, son una estrategia muy útil para identificar genes que participan en alguna etapa del desarrollo y que no pueden ser detectados a partir de otro tipo de tamizajes como los más tradicionales de falta de función. Los resultados del tamizaje genético nos permitieron evidenciar que se requiere de una gran cantidad de genes durante la formación del tórax, de los cuales varios no se habían relacionado con el desarrollo de esta estructura. Dentro del grupo de genes que ya están descritos, se sabe que participan en diversos procesos celulares como vías de señalización, regulación de la expresión génica, y regulación del ciclo celular. Estos procesos forman parte de los programas de crecimiento, diferenciación celular, mantenimiento del estado diferenciado y muerte celular programada, fenómenos comunes en cualquier etapa del desarrollo de un organismo.

Demostramos que es posible identificar genes aún no caracterizados que se requieren en el cerrado dorsal a partir de un tamizaje genético en el que se buscan genes que participan en la formación del tórax, como *poco pelo*. Este resultado es otro argumento a favor de que el cerrado dorsal y algunas etapas en el desarrollo torácico, tienen mecanismos moleculares similares, junto con los datos sobre la participación de miembros de la vía de la cinasa de Jun en el cerrado dorsal y el cerrado torácico.

Hemos identificado un nuevo gen que llamamos *poco pelo* que se requiere en varias etapas del desarrollo. En la embriogénesis, participa en la etapa de elongación/retracción de la banda germinal y del cerrado dorsal. En la metamorfosis se requiere en la formación de órganos sensoriales en el tórax y en el ala. *poco pelo* también participa en la formación del ojo.

Proponemos que *poco pelo* funciona como gen de prepatrón y demostramos que interactúa genéticamente con *pnr* y *ush*, otros dos genes de prepatrón que se

requieren también en el cerrado dorsal y en la formación de órganos sensoriales en el tórax .

A partir de datos preliminares, se puede sugerir que *poco pelo* es un regulador de la vía de la cinasa de Jun durante el cerrado dorsal y regulador de la expresión de genes proneurales en el tórax.

El *locus* de *poco pelo* parece ser un locus complejo y será necesario clonarlo, así como mapear molecularmente cada una de las líneas letales generadas, para entender mejor su función en los diversos procesos de desarrollo en los que participa.

Este trabajo aporta bastante material de estudio ya que con el tamizaje se detectaron 142 *loci* que representan genes no caracterizados que participan en el desarrollo torácico. Será muy útil generar y analizar mutaciones nulas de algunos de ellos en estudios posteriores y conocer un poco más sobre sus funciones.

REFERENCIAS

- Abdelilah-Seyfried, S., Chan, Y., Zeng, Ch., Justice, N., Younger-Shepherd, S., Sharp, E., Barbel, S., Meadows, S., Jan, L, Y., and Jan, Y. N. (2000). A gain-of-function screen for genes that affect the development of the *Drosophila* adult external sensory organ. *Genetics* 155: 733-752.
- Adams, M. *et al.*, (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Affolter, M., Nelle, D., Nussbaumer, U., and Basler, K. (1994). Multiple requirements for the receptor serine/threonine kinase *thick vein* reveal novel functions of TGF β homologs during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 120: 3105-3117.
- Affolter, M., and Mann, R. (2001). Legs, eyes, or wings-selectors and signals make the difference. *Science* 292: 1080-1081.
- Agnès, F., Suzanne, M., and Noselli, S. (1999). The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development* 126: 5453-5462.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortín, M. E. (1995). Notch signalling. *Science* 268: 225-232.
- Basler, K., and Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by Hedgehog protein. *Nature* 368: 208-214.
- Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R. K., and Gehring, W. J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: A versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes and Development* 3: 1288-1300.
- Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B., and Zavortink, M. (1994). The role of *apterous* in the control of dorsoventral compartmentalization and *PS integrin* gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development* 120: 1805-1815.
- Brand, A., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.

- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S., and Morata, G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 274: 252-255.
- Campos-Ortega J and Hartenstein V. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. 2nd ed. Springer-Verlag Berlin. 405 p.
- Campuzano, S. and Modolell, J. (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex. *Trends in Genetics* 8: 202-208.
- Chou, T., Noll, E., and Perrimon, N. (1993). Autosomal P[*ovo*^{D1}] dominant female-sterile insertions in *Drosophila* and their use in generating germ-line chimeras. *Development* 119: 1359-1369.
- Clifford, R., and Schüpbach, T. (1989). Coordinately and differentially mutable activities of *torpedo*, the *Drosophila melanogaster* homolog of vertebrate EGF receptor gene. *Genetics* 123: 771-787.
- Cubbada, Y., Heitzler, P., Ray, R. P., Bourouis, M., Romain, P., Gelbart, W., Simpson, P., and Haenlin, M. (1997). *u-shaped* encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes *achaete* and *scute* during formation of bristles in *Drosophila*. *Genes and Development* 11: 3083-3095.
- Culi, J., Martín-Blanco, E., and Modolell, J. (2001). The EGF receptor and N signalling pathways act antagonistically in *Drosophila* mesothorax bristle patterning. *Development* 128: 299-308.
- de Celis, J. F., Barrio, R., Kafatos, F. C. (1999). Regulation of the *spalt/spalt-related* gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. *Development* 126: 2653-2662.
- Díaz-Benjumea, F., and Cohen, S. M. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* 75: 741-752.
- Díaz-Benjumea, F. J., and García-Bellido, A. (1990). Behaviour of cell mutant for an EGF receptor homologue of *Drosophila* in genetics mosaics. *Proceedings of the Royal Society of London* 242: 36-42.
- Fernández, R., Tabarini, D., Azpiazu, N., Frasch, M., and Schlessinger, J. (1995). The *Drosophila insulin receptor* homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential. *European Molecular Biology Organization Journal* 14: 3373-3384.

- Fossett, N., Zhang, Q., Gajewski, K., Choi, Ch., Kim, Y., and Schulz, R. A. (2000). The multitype zinc-finger protein U-shaped functions in heart cell specification in the *Drosophila* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 7348-7353.
- Fossett, N., Tevosian, S., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S., Schulz, R. (2001). The friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 7342-7347.
- Frank, L. H., and Rushlow, C. (1996). A group of genes required for maintenance of the amnioserosa tissue in *Drosophila*. *Development* 122: 1343-1352.
- Fristrom, D., and Fristrom, J. W. (1993). The metamorphic development of the adult epidermis. In *The development of Drosophila melanogaster*, vol 2 (ed. M. Bate and A. Martínez-Arias), pp. 843-897. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- García-García, M., Romain, P., Simpson, P., and Modolell, J. (1999). Different contributions of *pannier* and *wingless* to the patterning of the dorsal mesothorax of *Drosophila*. *Development* 126: 3523-3532.
- Garrel, J., and Campuzano, S. (1991). *BioEssays* 13: 493-498.
- Glise, B., Bourbon, H., and Noselli, S (1995). *hemipterous* encodes a novel *Drosophila* Map kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* 83: 451-461.
- Golic, K. G., and Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59: 499-509.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Rodríguez, I., Martínez, C., Culi, J., Ferrés-Marcó, M. D., Beamonte, D. And Modolell, J. (1995). Cis-regulation of *achaete* and *scute*: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *Genes and Development* 9: 1869-1882.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferrés-Marcó, D., and Modolell, J. (1996). *araucan* and *caupolican*, two members of the novel Iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein forming genes. *Cell* 85: 95-105.

- Greenspan, R. (1997). Fly Pushing. The theory and practice of *Drosophila* genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Haenlin M., Cubbada, Y., Blondeau, F., Heitzler, P., Lutz, Y., Simpson, P., and Romain, P. (1997). Transcriptional activity of Pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the *u-shaped* gene of *Drosophila*. *Genes and Development* 11:3096-3108.
- Harden, N., Ricos, M., Ong, Y. M., Chia, W., and Lim, L. (1999). Participation of small GTPases in dorsal closure of the *Drosophila* embryo: distinct roles for Rho subfamily proteins in epithelial morphogenesis. *Journal of Cell Science* 112: 273-284.
- Hartenstein, V., and Posakony, J. W. (1989). *Development* 107: 389-405.
- Heitzler P., Haenlin M., Romain Ph., Calleja M., and Simpson P. (1996). A Genetic Analysis of pannier, a Gene Necessary for Viability of Dorsal Tissues and Bristle Positioning in *Drosophila*. *Genetics* 143: 1271-1286.
- Herranz, H., and Morata, G. (2001). The functions of *pannier* during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 128: 4837-4846.
- Ingham, P. W., and Fietz, M. J. (1995). Quantitative effects of *hedgehog* and *decapentaplegic* activity on the patterning of the *Drosophila* wing. *Current Biology* 5: 432-440.
- Irvine, K. D., and Wieschaus, E. (1994). Cell intercalation during *Drosophila* germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. *Development* 120; 827-841.
- Jacinto, A., Wood, W., Balayo, T., Turmaine, M., Martínez-Arias, A., and Martin, P. (2000). Dynamic actin-based epithelial adhesion and cell matching during *Drosophila* dorsal closure. *Current Biology* 10: 1420-1426.
- Jacinto, A., and Martin, P. (2001). Morphogenesis: Unravelling the cell biology of hole closure. *Current Biology* 11: R705-R707.
- Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II Zygotic loci on the third chromosome. *Roux's Archives Development Biology* 193: 283-295.

- Lamka, M., and Lipshitz, H. D. (1999). Role of the amnioserosa in germ band retraction of the *Drosophila melanogaster* embryo. *Developmental Biology* 214: 102-112.
- Letsou, A., Arora, K., Wrana, J. L., Simin, K., Twombly, V., Jamal, J., Staeheling-Hampton, K., Hofmann, F. M., Gelbart, W. M., Masagué, J. et al., (1995). *Drosophila* Dpp signaling is mediated by the *punt* gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF- β receptor family. *Cell* 80: 899-908.
- Martín-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C., and García-Bellido, A. (2000). JNK and *decapentaplegic* signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 7888-7893.
- Miklos, G., and Rubin, G. (1996). The role of the genome project in determining gene function; insights from model organism. *Cell* 86: 521-529.
- Morata, G., and Lawrence, P. A. (1975). Control of compartment development by the *engrailed* gene in *Drosophila*. *Nature* 255:614-617.
- Mullor, J. L., Calleja, M., Capdevila, J., and Guerrero, I. (1997). Hedgehog activity, independent of decapentaplegic, participates in wing disc patterning. *Development* 124: 1227-1237.
- Neumann, C. J., and Cohen, S. M. (1997). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* 124: 871-880.
- Noselli S. (1998). JNK signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Trends in Genetics* 14(1): 33-38.
- Noselli, S., and Agnès, F. (1999). Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Current Opinion of Genetic and Development* 9: 466-472.
- Nüsslein-Volhard, C., and E. Wieschaus, 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., and Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Archives of Development Biology* 193: 267-282.

- O'Keefe, D., Thor, S., and Thomas, J. (1998). Functions and specificity of LIM domains in *Drosophila* nervous system and wing development. *Development* 125: 3915-3923.
- Posakony, J. W. (1994). Nature versus nurture: asymmetric cell divisions in *Drosophila* bristle development. *Cell* 76:415-418.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335, 683-689.
- Romain P., Heitzler P., Haenlin M., and Simpson P. (1993). Pannier, a negative regulator of achaete and scute in *Drosophila*, encodes a zinc finger protein with homology to the vertebrate transcription factor GATA-1. *Development* 119:1277-1291.
- Reed, B. H., Wilk, R., and Lipshitz, H. D. (2001). Downregulation of Jun kinase signaling in the amnioserosa is essential for dorsal closure of the *Drosophila* embryo. *Current Biology* 11: 1098-1108.
- Riesgo-Escovar J., Jenni M., Fritz A., and Hafen E. (1996). The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for Djun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes & Development* 10: 2759-2768.
- Riesgo-Escovar, J. R., and Hafen, E. (1997a). *Drosophila* Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor Djun during dorsal closure. *Genes and Development* 11: 1717-1727.
- Riesgo-Escovar J. and Hafen E. (1997b). Common and Distinct Roles of DFos and DJun During *Drosophila* Development. *Science* 278: 669-672.
- Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillips, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K., and Engels, W. R. (1988). A stable genomic source of P-element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118: 461-470.
- Rørth P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:12418-12422.
- Rørth P., Szabo, K., Bailey, A., Lavery, T., Rehm, J., Rubin, G., Weigmann, K., Milán, M., Benes, V., Ansorge, W., and Cohen, S. (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* 125: 1049-1057.

- Sato, M., and Saigo, K. (2000). Involvement of *pannier* and *u-shaped* in regulation of Decapentaplegic-dependent *wingless* expression in developing *Drosophila notum*. *Mechanism of Development* 93: 127-138.
- Sato, M., Kojima, T., Michiue, T., and Saigo, K. (1999). *Bar* homeobox genes are latitudinal prepattern genes in the developing *Drosophila notum* whose expression is regulated by the concerted functions of *decapentaplegic* and *wingless*. *Development* 126: 1457-1466.
- Simon, M., Bowtell, D., Dodson, G., Laverly, T., and Rubin, G. (1991). Ras 1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67: 701-716.
- Spradling, A., Stern, D., Kiss, I., Roote, J., Laverly, T., and Rubin, G. (1995). Gene disruptions using P transposable elements: An integral component of the *Drosophila* genome project. *Proceedings National Academy of Sciences* 92: 10824-10830.
- Stern, C. (1954). Two or three bristles. *American Scientist* 42: 213-247.
- Stronach, B. E., and Perrimon, N. (2001). Investigation of leading edge formation at the amnioserosa and dorsal ectoderm in the *Drosophila* embryo. *Development* 128: 2905-2913.
- Stronach, B. E., and Perrimon, N. (2002). Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, *slipper*. *Genes and Development* 16: 377-387.
- Su, Y. C., Treisman, J. E., and Skolnik, E. Y. (1998). The *Drosophila* Ste20-related kinase *misshapen* is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes and Development* 12: 2371-2380.
- Tomoyasu, Y., Nakamura, M., and Ueno, N. (1998). Role of Dpp signaling in pattern formation of the dorsocentral mechanosensory organ in *Drosophila melanogaster*. *Development* 125: 4215-4224.
- Truman, J. W. (1990). Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. *Journal of Neurobiology* 21: 1072, 1084.
- Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., and Jürgens, G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* III. Zygotic

loci on the X chromosome and the fourth chromosome. Roux's Archives of Development Biology. 193: 296-307.

- Winick, J., Abel T., Leonard M., Michelson A., Chardon-Loriaux I., Holmgren R., Maniatis T., and Douglas Engel J. (1993). A GATA family transcription factor is expressed along the embryonic dorsoventral axis in *Drosophila melanogaster*. Development 119:1055-1065.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Thomas, J., Lawrence, P., Meyerowitz, E. 1998. Principles of Development. Oxford University Press, Inc. New York.
- Xu, T., and Rubin, G. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. Development 117: 1223-1237.
- Yip, R., Lamka, M., and Lipshitz, H. (1997). Control of germ-band retraction in *Drosophila* by the zinc-finger protein HINDSIGHT. Development 124: 2129-2141.
- Zeitlinger, J., and Bohmann, D. (1999). Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and JNK pathway. Development 126: 3947-3956.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

A Misexpression Study Examining Dorsal Thorax Formation in *Drosophila melanogaster*

María Teresa Peña-Rangel,^{*†} Isabel Rodríguez[‡] and Juan Rafael Riesgo-Escovar^{*1}

^{*}Department of Developmental Neurobiology and Neurophysiology, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, 76230, México, [†]Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, 76010, México and [‡]Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa," Universidad Autónoma de Madrid-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28049 Madrid, España

Manuscript received October 11, 2001

Accepted for publication December 10, 2001

ABSTRACT

We studied thorax formation in *Drosophila melanogaster* using a misexpression screen with EP lines and thoracic Gal4 drivers that provide a genetically sensitized background. We identified 191 interacting lines showing alterations of thoracic bristles (number and/or location), thorax and scutellum malformations, lethality, or suppression of the thoracic phenotype used in the screen. We analyzed these lines and showed that known genes with different functional roles (selector, prepatterning, proneural, cell cycle regulation, lineage restriction, signaling pathways, transcriptional control, and chromatin organization) are among the modifier lines. A few lines have previously been identified in thorax formation, but others, such as chromatin-remodeling complex genes, are novel. However, most of the interacting loci are uncharacterized, providing a wealth of new genetic data. We also describe one such novel line, *poco pelo* (*ppo*), where both misexpression and loss-of-function phenotypes are similar: loss of bristles and scutellum malformation.

GENETIC screens for loss-of-function mutations have been conventional tools for the identification of genes in model organisms like *Drosophila* (NÜSSLEIN-VOLHARD and WIESCHAUS 1980). Unfortunately, early lethality hinders studies of later functions of these genes. Also, redundancy or pleiotropy may prevent identification of many genes. In this regard, MIKLOS and RUBIN (1996) have estimated that two-thirds to three-quarters of all *Drosophila* genes have no obvious loss-of-function mutant phenotypes. In all these cases, controlled temporal and spatial misexpression is an alternative for identification of these genes and facilitates description of their genetic interactions. RØRTH (1996) devised a successful system in *Drosophila* that allows controlled misexpression of genes randomly tagged by insertion of a transposable element (EP element) containing UAS sites that can bind the yeast transcription factor Gal4 and a promoter directed outward 3' of the insertion site. Crosses to lines bearing *gal4*-expressing insertions in defined patterns allow misexpression of genes 3' of the EP elements in the progeny bearing both constructs.

Very successful genetic screens have also been conducted in sensitized genetic backgrounds (SIMON *et al.* 1991; OLIVIER *et al.* 1993). In these cases, the genetic background of the screen is not wild type, but contains a mutation in a gene that "enhances" effects caused by

mutations in other genes, especially those with which this gene interacts. To take advantage of a genetically sensitized background while at the same time providing a Gal4 driver line, we have employed mutant alleles of *pannier* (*pnr*) and *apterous* (*ap*), caused by insertional mutagenesis as thoracic Gal4 driver lines (CALLEJA *et al.* 1996).

pnr is a pleiotropic gene that encodes a zinc-finger protein with homology to vertebrate GATA transcription factors (RAMAIN *et al.* 1993; WINICK *et al.* 1993). In embryos and larvae, *pnr* is expressed in dorsal tissues (amnioserosa, lateral epidermis, and dorsal-most aspects of wing and eye imaginal discs). In adults, *pnr* expression runs in a medial region from the head capsule to the posterior end of the abdomen (CALLEJA *et al.* 1996). *pnr* functions as a prepatterning gene required for specification of the dorsocentral aspect of the thorax together with *u-shaped* (*ush*; HAENLIN *et al.* 1997; CALLEJA *et al.* 2000). Lateral aspects of the thorax are specified by another set of prepatterning genes, the *iroquois* gene complex (GÓMEZ-SKARMETA *et al.* 1996). Null *pnr* mutants are embryonic lethal with premature loss of the amnioserosa and defects in dorsal closure (HEITZLER *et al.* 1996). Mutant clones in the notum anlagen of the wing imaginal disc produce alterations in the pattern of medial thoracic bristles and a strong dorsal thoracic cleft. The allele used in this study, *pnrGal4*, has an insertion in the *pnr* promoter region that results in a hypomorphic allele (CALLEJA *et al.* 1996). Expression of Gal4 in *pnrGal4* closely mimics normal *pnr* expression. In heterozygous condition, adult *pnrGal4* flies show a very slight dorsal thoracic cleft and disorganization of bris-

¹Corresponding author: Department of Developmental Neurobiology, Instituto de Neurobiología, UNAM, Fútbol #149, Col. Country Club Churubusco, México, D. F., 04220, México.
E-mail: riesgo@mail.cnb.unam.mx juan@zool.unizh.ch

cles, sometimes missing a few inner and postvertical bristles (Figure 1B).

These multiple functions of *pnr* allow several different phenotypes (and genes required for those phenotypes) to be screened for at the same time. We have exploited this in our screen in order to identify genes required for bristle formation, thoracic closure, thorax and scutellum shape, and viability.

We also used *apGal4* as a Gal4 driver counterscreen for some lines to allow us to separate effects due to the combination of particular sensitized backgrounds plus misexpression *vs.* effects of misexpression alone. *apterous* is a transcription factor harboring a LIM domain and a homeodomain that plays a key role in wing, haltere, and nervous system formation (COHEN *et al.* 1992; LUNDGREN *et al.* 1995). In larvae, *ap* is expressed in groups of cells of the dorsal compartment of the wing disc, which also express *pnr*, and in the region giving rise to the wing hinge and dorsal surface of the wing blade. We used a Gal4 allele of *ap* that drives Gal4 expression in an *ap* expression pattern (CALLEJA *et al.* 1996). Heterozygous adult *apGal4* flies have wild-type wings and thorax.

The formation of complex structures like the *Drosophila* thorax putatively requires a large number of genes, including some involved in growth, differentiation, cellular death, and maintenance of the differentiated state. Many genes that control these general processes are known. For example, growth of the wing disc—the imaginal disc that gives rise to the thorax—is controlled by Wingless (Wg), Hedgehog (Hh), mitogen-activated protein kinase (MAPK), and Decapentaplegic (Dpp) signaling pathways (CLIFFORD and SCHÜPBACH 1989; BLAIR 1995). Structures within the thorax, such as bristles, may require different types of genes: selector, prepatter, and proneural genes for regional differentiation, formation, and correct spacing, besides signaling pathways. Dpp and Wg are also important for the formation of bristles in the mesothorax (TOMOYASU *et al.* 1998; PHILLIPS *et al.* 1999; SATO *et al.* 1999). Mutations in the Jun N-terminal kinase (JNK) pathway produce thoracic clefts, indicating a failure in the coordination of imaginal epithelial sheet spreading, a phenomenon similar to dorsal closure during midembryogenesis (RIESGO-ESCOVAR and HAFEN 1997; AGNÈS *et al.* 1999; ZEITLINGER and BOHMANN 1999). Limited amounts of apoptosis also occur during thorax formation (MILAN *et al.* 1997). In spite of this, very little is known about the actual overall genetic architecture that governs the formation of this structure.

We screened 2100 EP lines from which 191 (9%), corresponding to 167 loci, produced modifications of the weak *pnrGal4* phenotype. These modifier lines identified genes previously known to be important for notum development, but also many novel and hitherto known genes that were previously not characterized as required for thoracic development.

MATERIALS AND METHODS

***Drosophila* maintenance:** Fly stocks and crosses were maintained in cotton-stoppered glass vials in a molasses-yeast-gelatin standard medium.

***Drosophila* stocks:** The collection of EP transgenic lines generated and described by RØRTH (1996) was obtained from J. Szabad at the European *Drosophila* stock center in Szeged, Hungary, and from E. Hafen, University of Zürich (Zürich, Switzerland). *pnr*^{MD257}, the *pnrGal4* line (CALLEJA *et al.* 1996), was obtained from G. Morata, Autonomous University of Madrid (Madrid, Spain). *apGal4* and UAS-*pnr* were obtained from J. Modolell, Autonomous University of Madrid. FRT-containing chromosomes and transgenic *hs-flp* flies were obtained from E. Hafen, University of Zürich. All other stocks used are described in LINDSLEY and ZIMM (1992) or Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>).

EP screen: *pnrGal4* virgin female flies were mated to males from the EP collection. F₁ progeny were scored under a dissecting microscope for modification of the weak *pnrGal4/+* phenotype. As most EP lines represent insertions in the promoter region of genes, we expected most of the effects observed to be due to overexpression. A fraction of EP lines are inserted at the 3' end of genes, and so loss-of-function effects due to production of antisense transcripts could also be expected. All lines were tested with *pnrGal4* as driver, and some interacting lines were then tested with *apGal4*. All crosses were carried out at 25°. Lines that modified the original phenotype were retested at least once. In some cases, parents from initial crosses with a strong enhancement of the *pnrGal4* phenotype were retested at 25° and progeny were allowed to develop at 18°, 25°, and 29° to allow us to look for effects of different levels of expression of Gal4.

Adult F₁ flies with modification of the *pnrGal4/+* phenotype were fixed and stored in the dark in a 3:1 mixture of ethanol:glycerol. Thoraxes of adult flies were viewed in stereo and optical microscopes (Nikon and Olympus) and digitally photographed (Optronics, Pixera). For scanning electron microscopy, adult flies were fixed in 4% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 2 hr at room temperature, after ventral incisions in the thorax, abdomen, and head were made. They were then washed in PBS and dehydrated in a graded series of acetone-PBS (50, 70, and 100%) at room temperature. Afterward the specimens were critical point dried, mounted in stubs dorsal thorax side up, sputter coated with gold, viewed, and photographed in a Zeiss scanning electron microscope.

Clonal analysis: Mutant lethal alleles of *ppo* obtained by imprecise *P*-element excisions were recombined onto FRT chromosomes. These *ppo* FRT chromosomes were crossed to appropriately marked FRT chromosomes with *hs-flp*, and heat shocks were applied to progeny larvae for 1 hr at 37° to generate mutant clones in the thorax and wing. The larvae were allowed to develop and examined as adults. We used *forked* and *yellow* to mark clones. For the generation of germline clones, we followed the dominant female sterile technique of CHOU and PERRIMON (1996).

RESULTS AND DISCUSSION

For our screen, we hypothesized that lines where thoracic misexpression leads to alterations of the *pnrGal4* phenotype were candidate genes for thoracic development. We found lines that modified the thorax/scutellum structure or that altered significantly the number, size, and/or arrangement of chaetes in the notum. Over-

all modifications were produced in 9% of the 2100 lines screened. This compares favorably to other misexpression screens (RØRTH *et al.* 1998; ABDELILAH-SEYFRIED *et al.* 2000; HUANG and RUBIN 2000; KRAUT *et al.* 2001), indicating that our screen was very sensitive. We classified observed modifications in three broad categories: (1) enhancement of the *pnrGal4* phenotype in 5.9% (125 of the total lines), (2) lethality (embryonic, larval, or pupal) in <1% (20 lines), and (3) suppression of the *pnrGal4* phenotype in 2.1% (45 lines). The lines where the *pnrGal4* phenotype was enhanced showed: (a) modifications in the number and distribution of thoracic macrochaetes and/or microchaetes, (b) defects of the scutellum, and (c) formation of a cleft of variable width and depth at the dorsal midline of the thorax, with some lines showing more than one phenotype. Very few lines modified the dorsal aspects of the head and abdomen (0.2%). Table 1 shows a summary of these results. Some modifier lines were retested and progeny allowed to develop both at 18° and 29°. Progeny, except for lines EP(2)0639, EP(2)2148, EP(2)2402, and EP(2)2437, showed similar phenotypes to those observed at 25° (data not shown). These four lines have insertions in the same locus and showed stronger effects at 29°, including pupal lethality.

EP elements inserted in genes with previously known effects in the thorax acted as positive controls of the screen. In the following descriptions, we group genes found in the screen by known function and use the positive controls to validate results.

Enhancement of the *pnrGal4/+* phenotype: effects on chaetae: *Selector genes:* The *scalloped (sd)* gene is a selector gene that encodes a transcription factor expressed in several imaginal discs, including the wing imaginal disc and the peripheral and central nervous systems. Sd/Vestigial (Vg) heterodimers bind to cis-regulatory sequences controlling patterns of gene expression for wing development (HALDER *et al.* 1998). In addition, some mutant *sd* alleles have defects in the peripheral sense organs of the embryo (CAMPBELL *et al.* 1992) and loss of sensory organs in the wing margin (CAMPBELL *et al.* 1991). In our case, misexpression of *sd* via EP(X)1435, with both *pnrGal4* and *apGal4*, produced loss of several microchaetae and macrochaetae (Table 1, Ia; Figure 1D). In another gain-of-function screen aimed at identifying genes required in external sensory organ development, misexpression of *sd* using *scdGal4* also produced effects on bristles (ABDELILAH-SEYFRIED *et al.* 2000). These findings confirm that misexpression of *sd*, irrespective of Gal4 driver or of sensitized background, alters numbers of microchaetae. *sd* mutants have chemosensory defects (ANAND *et al.* 1990). Taken together, these data argue for a function of *sd* in bristle formation, perhaps in conjunction with other transcription factors like Vg.

Prepattern and proneural genes: Precise positional information is required during development to generate spe-

cific two-dimensional patterns. This information is provided by the prepattern (STERN 1954), a combination of transcriptional activators and repressors distributed asymmetrically that prefigure the pattern of each region (CAMPÜZANO and MODOLELL 1992). One such transcriptional repressor in the thoracic prepattern is Hairy. Proneural genes are activated in groups of cells within these competent regions from which sensory organ precursor cells or neuroblasts will form. Extramacrochaetae (*Emc*) act as antagonists to proneural gene function (MOSCOSO DEL PRADO and GARCIA-BELLIDO 1984; ELLIS *et al.* 1990; GARRELL and MODOLELL 1990; RAMAIN *et al.* 1993). Prepatterns for bristle formation on the thorax involve the establishment of a zone of competent cells, called proneural territory, where neural precursors arise as sensory organ precursors (SOP). *emc* overexpression gives rise to loss of SOPs (POSAKONY 1994). In EP(3)0415, EP(3)3087, EP(3)3614, and EP(3)3620, the *P* element is inserted in the *emc* locus. Misexpression of these lines via *pnrGal4* resulted in complete loss of bristles in the *pnr* region (Table 1, Ic; Figure 1C), a result consistent with *emc* overexpression experiments. As in the previous case of *sd*, loss-of-function and misexpression data support evidence of a gene's requirement for a function. This argues that relevant loci can be identified through misexpression screens, notwithstanding the caveat that misexpression can also yield artifactual phenotypes.

Cell cycle regulation genes: Loss of bristles could also arise by alterations during the last stages of their formation, for example, by transformation of the support or external cells (the shaft or trichogen cell or the socket or tormogen cell) into neurons (POSAKONY 1994) or loss of sensory mother cells (KIMURA *et al.* 1997), caused by changes in the cell cycle or cell lethality. The EP elements in EP(3)3261 and EP(3)3426 are inserted in *string (stg)*, a gene that encodes a protein tyrosine phosphatase involved in mitotic G2/M transition (EDGAR *et al.* 1994). We observed missing microchaetae in the *pnr*-expressing region with these lines (Table 1, Ia; Figure 1F). Conversely, a suppression of *pnrGal4/+* phenotype was observed with the EP(3)3432 line (Figure 1G). This line also contains an insertion in *string*, but in an anti-sense orientation, thus generating a loss-of-function phenotype. Reduction of *stg* expression is seen in groups of cells where sensory mother cells are emerging (MILAN *et al.* 1996), and *stg* hypomorphic combinations affect formation of macrochaetae (VERHEYEN *et al.* 1996). A gain-of-function study found that *stg* overexpression generated transformations of shaft to socket cells (ABDELILAH-SEYFRIED *et al.* 2000).

Misexpression of several other lines such as EP(2)1221, EP(2)2356, EP(3)3072, EP(3)3073, EP(3)3306, and EP(3)3621 also results in loss of bristles. These insertions are in four different novel genes (see Table 1, Ia).

Effects on the scutellum: Lineage restriction genes: The epidermis of imaginal discs is divided into anterior and



all modifications were produced in 9% of the 2100 lines screened. This compares favorably to other misexpression screens (RØRTH *et al.* 1998; ABDELILAH-SEYFRIED *et al.* 2000; HUANG and RUBIN 2000; KRAUT *et al.* 2001), indicating that our screen was very sensitive. We classified observed modifications in three broad categories: (1) enhancement of the *pnrGal4* phenotype in 5.9% (125 of the total lines), (2) lethality (embryonic, larval, or pupal) in <1% (20 lines), and (3) suppression of the *pnrGal4* phenotype in 2.1% (45 lines). The lines where the *pnrGal4* phenotype was enhanced showed: (a) modifications in the number and distribution of thoracic macrochaetes and/or microchaetes, (b) defects of the scutellum, and (c) formation of a cleft of variable width and depth at the dorsal midline of the thorax, with some lines showing more than one phenotype. Very few lines modified the dorsal aspects of the head and abdomen (0.2%). Table 1 shows a summary of these results. Some modifier lines were retested and progeny allowed to develop both at 18° and 29°. Progeny, except for lines EP(2)0639, EP(2)2148, EP(2)2402, and EP(2)2437, showed similar phenotypes to those observed at 25° (data not shown). These four lines have insertions in the same locus and showed stronger effects at 29°, including pupal lethality.

EP elements inserted in genes with previously known effects in the thorax acted as positive controls of the screen. In the following descriptions, we group genes found in the screen by known function and use the positive controls to validate results.

Enhancement of the *pnrGal4/+* phenotype: effects on chaetae: Selector genes: The *scalloped* (*sd*) gene is a selector gene that encodes a transcription factor expressed in several imaginal discs, including the wing imaginal disc and the peripheral and central nervous systems. Sd/Vestigial (*Vg*) heterodimers bind to *cis*-regulatory sequences controlling patterns of gene expression for wing development (HALDER *et al.* 1998). In addition, some mutant *sd* alleles have defects in the peripheral sense organs of the embryo (CAMPBELL *et al.* 1992) and loss of sensory organs in the wing margin (CAMPBELL *et al.* 1991). In our case, misexpression of *sd* via EP(X)1435, with both *pnrGal4* and *apGal4*, produced loss of several microchaetae and macrochaetae (Table 1, Ia; Figure 1D). In another gain-of-function screen aimed at identifying genes required in external sensory organ development, misexpression of *sd* using *scaGal4* also produced effects on bristles (ABDELILAH-SEYFRIED *et al.* 2000). These findings confirm that misexpression of *sd*, irrespective of Gal4 driver or of sensitized background, alters numbers of microchaetae. *sd* mutants have chemosensory defects (ANAND *et al.* 1990). Taken together, these data argue for a function of *sd* in bristle formation, perhaps in conjunction with other transcription factors like *Vg*.

Prepattern and proneural genes: Precise positional information is required during development to generate spe-

cific two-dimensional patterns. This information is provided by the prepattern (STERN 1954), a combination of transcriptional activators and repressors distributed asymmetrically that prefigure the pattern of each region (CAMPÜZANO and MODOLELL 1992). One such transcriptional repressor in the thoracic prepattern is Hairy. Proneural genes are activated in groups of cells within these competent regions from which sensory organ precursor cells or neuroblasts will form. Extramacrochaetae (*Emc*) act as antagonists to proneural gene function (MOSCOSO DEL PRADO and GARCIA-BELLIDO 1984; ELLIS *et al.* 1990; GARRELL and MODOLELL 1990; RAMAIN *et al.* 1993). Prepatterning for bristle formation on the thorax involve the establishment of a zone of competent cells, called proneural territory, where neural precursors arise as sensory organ precursors (SOP). *emc* overexpression gives rise to loss of SOPs (POSAKONY 1994). In EP(3)0415, EP(3)3087, EP(3)3614, and EP(3)3620, the *P* element is inserted in the *emc* locus. Misexpression of these lines via *pnrGal4* resulted in complete loss of bristles in the *pnr* region (Table 1, Ic; Figure 1C), a result consistent with *emc* overexpression experiments. As in the previous case of *sd*, loss-of-function and misexpression data support evidence of a gene's requirement for a function. This argues that relevant loci can be identified through misexpression screens, notwithstanding the caveat that misexpression can also yield artifactual phenotypes.

Cell cycle regulation genes: Loss of bristles could also arise by alterations during the last stages of their formation, for example, by transformation of the support or external cells (the shaft or trichogen cell or the socket or tormogen cell) into neurons (POSAKONY 1994) or loss of sensory mother cells (KIMURA *et al.* 1997), caused by changes in the cell cycle or cell lethality. The EP elements in EP(3)3261 and EP(3)3426 are inserted in *string* (*stg*), a gene that encodes a protein tyrosine phosphatase involved in mitotic G2/M transition (EDGAR *et al.* 1994). We observed missing microchaetae in the *pnr*-expressing region with these lines (Table 1, Ia; Figure 1F). Conversely, a suppression of *pnrGal4/+* phenotype was observed with the EP(3)3432 line (Figure 1G). This line also contains an insertion in *string*, but in an antisense orientation, thus generating a loss-of-function phenotype. Reduction of *stg* expression is seen in groups of cells where sensory mother cells are emerging (MILAN *et al.* 1996), and *stg* hypomorphic combinations affect formation of macrochaetae (VERHEYEN *et al.* 1996). A gain-of-function study found that *stg* overexpression generated transformations of shaft to socket cells (ABDELILAH-SEYFRIED *et al.* 2000).

Misexpression of several other lines such as EP(2)1221, EP(2)2356, EP(3)3072, EP(3)3073, EP(3)3306, and EP(3)3621 also results in loss of bristles. These insertions are in four different novel genes (see Table 1, Ia).

Effects on the scutellum: Lineage restriction genes: The epidermis of imaginal discs is divided into anterior and

TABLE 1
Modifications of the *pmrGal4/+* phenotype by EP lines

EP line	Map position	Gene	Misexpression phenotype with <i>pmrGal4/+</i>	Misexpression phenotype with <i>afGal4/+</i>	Misexpression phenotype in ABDELLAH-SEYFRIED <i>et al.</i> (2000)
Category I (enhancement of <i>pmrGal4/+</i> phenotype)					
(a) Effects on chaetae					
EP (3)0344	68C10		Short macrochaetae		
EP (3)1051	97D1		Deformed scutellar macrochaetae		
EP (2)1221	27F4-F6	<i>l(2)k10113</i>	Loss of dorsocentral macrochaetae and microchaetae without polarity [see EP(2)0816, section 1c].		Supernumerary external sensory organs or support cells
EP (X)1232	2B16-B18		Loss of some macrochaetae and microchaetae	No effect	Loss of external cells
EP (X)1353	12A8-A10	<i>NFAT</i>	Loss of microchaetae and deformed scutellar macrochaetae [see EP(X)1508, section 1d].		
EP (X)1435	13F1-F2	<i>scalloped</i>	Loss of several microchaetae and dorsocentral macrochaetae	Loss of several microchaetae	Supernumerary external sensory organs or support cells
EP (2)2002	46C5-C8	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>	Loss of row of microchaetae in the dorsal midline		Loss of external cells
EP (2)2356, 2586	57A5-A6	<i>l(2)k009920</i>	Loss of macrochaetae and microchaetae in dorsal midline		Loss of external cells
EP (2)2535	45C4	LD20892	Deformed macrochaetae		
EP (2)2619	47C1-C2	LD08717	Microchaetae without polarity		
EP (3)3072	65A6		Loss of row of microchaetae in the dorsal midline		
EP (3)3073	92E-F	LD05530	Loss of several dorsocentral microchaetae		Loss of external cells
EP (3)3087, 3620, 3614, 0415, 3166	61D	<i>extramacrochaetae</i>	Complete loss of dorsocentral and scutellar macrochaetae and microchaetae in dorsal midline including the abdomen		
EP (3)3261, 3426	99A6	<i>string</i>	Loss of dorsocentral macrochaetae and several microchaetae. Some short macrochaetae		Potential cell fate transformations
EP (3)3306			Loss of dorsocentral macrochaetae and several microchaetae		
EP (3)3449	93F4-F5	<i>Gliolactin</i>	Loss of scutellar macrochaetae and frequent loss of dorsocentral macrochaetae		Loss of external cells
EP (3)3621	70B3-B4		Loss of dorsocentral and scutellar macrochaetae and loss of microchaetae		
EP (3)0632	85D10	<i>l(3)l4092</i>	Extra scutellar macrochaetae [see EP(3)3690, section 1d]		
EP (2)0845	53F11	<i>l(2)k08805</i>	Extra scutellar macrochaetae		
EP (3)0906	65F4		Extra scutellar macrochaetae		
EP (3)0915			Extra scutellar macrochaetae		
EP (3)0924	73E4		Extra scutellar macrochaetae		
EP (2)1020	23C1-C2	GM06070 and others	Extra scutellar macrochaetae		
EP (3)1037	91A2		Extra scutellar macrochaetae		
EP (2)1062	50B6-B7		Extra scutellar macrochaetae		
EP (2)1065	60E1-E2	<i>Reg-5</i>	Extra scutellar macrochaetae		
EP (3)1082	85D25	CG16788	Extra scutellar macrochaetae		

(continued)

TABLE 1
(Continued)

EP line	Map position	Gene	Misexpression phenotype with <i>pmrGal4/+</i>	Misexpression phenotype with <i>atfGal4/+</i>	Misexpression phenotype in ABDELILAH-SEYFRIED <i>et al.</i> (2000)
EP(X)1093	9E1-E2	LD06825 and LD02673	Extra scutellar macrochaetae		
EP(3)1113	76D7		Extra scutellar macrochaetae		
EP(X)1125	2F4-F5		Extra scutellar macrochaetae		
EP(2)1139	49B10		Extra scutellar macrochaetae		
EP(3)1154	83C2		Extra scutellar macrochaetae		
EP(X)1306	17C1-C4	<i>beadex</i>	Extra scutellar macrochaetae [See EP(X)1383,1394, section 1d]		Loss of external cells
EP(X)1644	18A1-A2	LD15404	Extra scutellar macrochaetae		
EP(2)2086	38E6		Extra scutellar macrochaetae		
EP(2)2523	53D13	<i>l(2)k09907</i> and others	Extra scutellar macrochaetae		
EP(2)2595	24C1-C2		Extra scutellar macrochaetae		
EP(3)3186	91F7		Extra scutellar macrochaetae		
EP(3)3246	85B2	GH04517 and others	Extra scutellar macrochaetae		
EP(3)3390	98F10		Extra dorsocentral or scutellar macrochaetae		Potential cell fate transformations
EP(X)0385	12B1-B2	RE37186	No scutellum formed	(b) Effects on the scutellum	
EP(X)0443	17C1-C2	<i>beadex</i>	Reduced scutellum [see EP(X)1306, section 1a]		
EP(3)0666	88D1-D2	RE26350 and others	Reduced scutellum		Slightly deformed scutellum
EP(3)0707	85D15		Deformed scutellum		
EP(2)0853	23C4-C5	RE60986	Reduced scutellum		
EP(2)0941	44D5-D6	<i>patched</i>	No scutellum formed		
EP(2)1220	21B5	<i>smoothened</i>	Deformed scutellum		
EP(2)1236	53F11		Reduced scutellum		
EP(3)1246	69E1		Deformed scutellum		
EP(X)1340	7A1-A2		Deformed scutellum		
EP(X)1350	16A1-A2	Homology with Bar H2	Deformed scutellum		
EP(2)2419	28B1-B2		Deformed scutellum		
EP(2)2433	30C2		Reduced scutellum		
EP(3)3060	84C6	RE52293 and others	Reduced scutellum		
EP(3)3145	88F4	GH27029 and others	Deformed scutellum		
EP(3)3196	89E10-E11		Deformed scutellum		
EP(3)3662	93F4	RE56061 and others	Deformed scutellum		

(continued)

TABLE I
(Continued)

EP line	Map position	Gene	Misexpression phenotype with <i>pprrGal4/+</i>	Misexpression phenotype with <i>afGal4/+</i>	Misexpression phenotype in ABDELILAH-SEYFRIED <i>et al.</i> (2000)
EP(2) 0563, 2240	21B4	<i>hismel</i>	(c) Effects on the thorax Slight thoracic cleft		
EP(2) 0816	27F4-F5	Homology with histone acetyltransferase	Strong thoracic cleft [see EP(2) 1221, section 1a]	No effect	
EP(X) 1501	12C1-C2		Slight thoracic cleft	No effect	Loss of external cells
EP(2) 2146	29A1-C1		Slight thoracic cleft		
EP(3) 3135	95C1		Slight thoracic cleft		
EP(2) 3139	63C1		Deformed thorax		
EP(3) 3140	99A5		Overpigmentation of dorsal midline		
EP(3) 3463	89B-C	<i>taranis</i>	Strong thoracic cleft		Loss of external cells
EP(X) 0355	14B15-B16	<i>Dsp1</i>	(d) Effects on multiple structures Strong thoracic and scutellar cleft	Strong thoracic cleft, deformed scutellum and wings	
EP(3) 0374	67F3		Strong thoracic cleft and lacks scutellum	Strong thoracic cleft, deformed wings, no scutellum	
EP(3) 0381	100E1-E2	<i>fat facets</i>	Slight cleft in abdominal dorsal midline and reduced scutellum	Ectopic bristles on dorsal surface of the wing blade	Loss of external cells
EP(3) 0416	63C5	SD01859	Microchaetae without polarity and deformed scutellum		
EP(3) 0473	85D1-D2	RE69409 and others	Extra macrochaetae and reduced scutellum		
EP(3) 0562	89E10-E11	LD27979 and others	Deformed scutellum and macrochaetae		
EP(2) 0622	48B1-B2		Strong thoracic and scutellar clefts	Extra dorsocentral and scutellar macrochaetae	Supernumerary external sensory organs or support cells
EP(3) 0635	96E1-E2	Helicase domain type RAD54, SNF2 domain	Strong thoracic and slight scutellar clefts	Deformed scutellum and loss of row of microchaetae in dorsal midline	
EP(2) 0639, 2148, 2402, 2437	53D11	SD02913	Strong thoracic cleft, deformed scutellum, head defects, and loss of several macrochaetae and microchaetae	Slight thoracic cleft, misaligned bristles, deformed wings	Supernumerary external sensory organs or support cells
EP(2) 0683	35D1-D2	<i>escargot</i>	Strong thoracic cleft and defects in the abdominal dorsal midline	Slight thoracic cleft, loss of chaetae in dorsal midline	
EP(2) 0747	88D2		Slight thoracic cleft and reduced scutellum	No effect	
EP(3) 0883	85D2		Reduced scutellum and loss of dorsocentral macrochaetae		

(continued)

TABLE I
(Continued)

EP line	Map position	Gene	Misexpression phenotype with <i>fnr</i> Gal4/+	Misexpression phenotype with <i>ap</i> Gal4/+	Misexpression phenotype in ABDELLAH-SEYFRIED <i>et al.</i> (2000)
EP(X)0950	8F8-F10	<i>nej</i>	Extra dorsocentral and scutellar macrochaetae and missing microchaetae in the dorsal midline.		
EP(2)0965	35B1-B2	<i>dlB</i>	Strong thoracic and scutellar cleft	Slight thoracic cleft and loss or gain of dorso-central and scutellar macrochaetae	Supernumerary external sensory organs or support cells
EP(2)0988	54C3-C6	<i>l(2)kl5815-3</i>	Slight thoracic cleft, reduced scutellum and loss of several macrochaetae	Semilethal, deformed wings	Potential cell fate transformations
EP(2)1050	43D3-D4	<i>l(2)k08815-3</i>	Light suppression, extra scutellar macrochaetae, and missing microchaetae in the dorsal midline		
EP(2)1081	55C8		Slight thoracic cleft and extra scutellar macrochaetae		
EP(X)1088	13F1-F2		Strong thoracic cleft	Slight thoracic cleft, deformed wings and scutellum, misaligned bristles	
EP(2)1095	26B1		Suppression and extra scutellar macrochaetae		
EP(2)1229, 2316	52B2		Slightly deformed head and scutellum and loss of scutellar macrochaetae		Supernumerary external sensory organs or support cells
EP(X)1313	11B1-B2	RE18684 and others	Extra scutellar macrochaetae and missing dorsocentral macrochaetae and microchaetae in dorsal midline		
EP(X)1383, 1394	17C1-C4	<i>beadex</i>	Deformed scutellum and loss or gain of dorsocentral and scutellar macrochaetae [see EP(X)1306, section 1a]		Loss of external cells
EP(X)1408	3E6-E7	GH17330	Deformed scutellum and microchaetae without polarity		Supernumerary external sensory organs or support cells
EP(X)1421	1A5-A6		Extra and deformed scutellar macrochaetae		
EP(X)1508	12A8-A10	<i>NFAT</i>	Slight thoracic cleft, deformed macrochaetae, and loss of microchaetae [see EP(X)1353, section 1a]	Extra veins, dorsocentral and scutellar macrochaetae	
EP(X)1581	13F1-F2	RE35685 and others	Reduced scutellum and microchaetae without polarity		Loss of few scutellar macrochaetae
EP(2)2054	50C20-C23		Loss of scutellar macrochaetae, defects in the abdominal midline		
EP(2)2087	33A2	LD32687 and others	Light suppression, deformed scutellar macrochaetae and microchaetae without polarity		
EP(2)2232	22F1-F2	<i>decoherent/plegic</i>	<i>Strong thoracic cleft and reduced scutellum</i>		
EP(2)2237	21C4-C6	Zn finger protein Sp-1 like, DS00764	Deformed scutellum, extra scutellar macrochaetae, microchaetae missing in dorsal midline		Supernumerary external sensory organs or support cells

(continued)

TABLE 1
(Continued)

EP line	Map position	Gene	Misexpression phenotype with <i>fnrGal4/+</i>	Misexpression phenotype with <i>apGal4/+</i>	Misexpression phenotype in ABDELLAH-SEYFRIED <i>et al.</i> (2000)
EP(2)2359	47D5-D6	SD06302 and others	Deformed scutellum, extra microchaetae around ocelli		Loss of external cells
EP(2)2475	43B2-C2	LD35207 and others	Deformed scutellum, altered number of macrochaetae and microchaetae		
EP(2)2478	32D1-D2	<i>poca poho</i>	Loss of macrochaetae and microchaetae on dorsal midline and deformed scutellum	Loss of macrochaetae and microchaetae on dorsal midline, deformed scutellum, alterations on chaetae in anterior border of the wings	Potential cell fate transformations
EP(2)2490	39B3-B4		Thoracic cleft, extra scutellar macrochaetae, and missing microchaetae		
EP(2)2630	30A3-A6	<i>l(2)h05809</i>	Slight thoracic cleft and deformed scutellum		
EP(3)3035	64C1		Suppression and deformed macrochaetae		
EP(3)3083, 3523	67E1-E2	<i>l(3)L0539</i>	Loss of scutellar macrochaetae and reduced scutellum		
EP(3)3263	64C1		Deformed thorax and scutellum	Extra wing veins, alterations on chaetae in anterior wing margin	
EP(3)3283	95C12		Slight thoracic cleft, reduced scutellum		
EP(3)3406	85D15-D17	<i>l(3)l0615</i>	Deformed scutellum and loss of scutellar macrochaetae		
EP(3)3517	85F12-F13	AT24755 and others	Deformed scutellum and several deformed macrochaetae		
EP(3)3528	87D9	RE01030 and REG1183	Strong thoracic cleft and deformed scutellum	Strong thoracic cleft, deformed scutellum, and deformed wings	
EP(3)3541	88B5	<i>l(3)j14A6</i>	Deformed scutellum and ectopic scutellar macrochaetae		
EP(3)3673	62A4	Homology with <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>zfg-11</i> , LD02105, and others	Loss of several macrochaetae and microchaetae and slight thoracic cleft		Loss of external cells
EP(3)3690	85D9-D10	<i>l(3)L4092</i>	Deformed thorax and scutellum [see EP(3)0632, section 1a]		
EP(3)3714	70E1-E2		Extra microchaetae without polarity		
EP(3)3716	95F11-F12	RE28534	Short microchaetae without polarity, deformed scutellum, overpigmentation in thoracic dorsal midline		

(continued)

TABLE I
(Continued)

EP line	Map position	Gene	Misexpression phenotype with <i>fmrGal4/+</i>	Misexpression phenotype with <i>afGal4/+</i>	Misexpression phenotype in ABDELILAH-SEYFRIED <i>et al.</i> (2000)
Category II (lethal)					
EP(3)0747	8SD2		Lethal in pupal stage		
EP(2)0873	49F7		Lethal in larval stage		
EP(3)1191	89C4	LD10376 and others	Lethal in larval stage		
EP(X)1595	12D1-D2		Lethal in larval stage		
EP(2)2009, 0684	35D1-D2	<i>escargot</i>	Embryonic lethal		Loss of external cells
EP(2)2010	57B7	<i>inscuteable</i>	Lethal in larval stage		Loss of external cells
EP(2)2016	26D5	LD44264 and others	Lethal in pupal stage		
EP(2)2088	38E4	<i>hctel</i>	Lethal in pupal stage		
EP(2)2289	26B7-B9	<i>Krüppel-homolog 1</i>	Lethal in pupal stage		Loss of external cells
EP(2)2317	34A5-A6	<i>Elongation factor 4A</i>	Lethal in pupal stage		Loss of external cells
EP(2)2416, 2306	35D6	<i>gliotactin</i>	Lethal in pupal stage		
EP(2)2612	51F6	LD12493, homology with ARF51F	Embryonic lethal		
EP(3)3085	68C1		Lethal in pupal stage		
EP(3)3118	65F10-F11	Rac-2	Lethal in pupal stage		
EP(3)3223	61B3	LP11648 and others	Embryonic lethal		
EP(3)3334	100F4	<i>l(3)LI022</i> , LD11808 and others	Lethal in pupal stage		
EP(3)3384	85D10	<i>l(3)LA092</i> , RE31825 and others	Lethal in pupal stage [see EP(3)3690, section 1d]		
EP(3)3481	94B9	<i>buttonless</i>	Embryonic lethal		

Table I is organized into two categories: category I for lines that showed enhancements of the *fmrGal4/+* phenotype and category II for lines that showed lethality. Within category I we have listed four subsections: (a) effects on chaetae, (b) effects on the scutellum, (c) effects on the thorax, and (d) effects on multiple structures. Within each subsection we have listed EP lines by similar phenotype and in numerical order. Lines also tested with *afGal4* or also found as modifier lines by ABDELILAH-SEYFRIED *et al.* (2000) are marked where appropriate. Category III is shown below and is a listing of the EP lines showing suppression.

Category III: Lines that showed suppression of the *fmrGal4/+* phenotype: EP(3)0339, EP(X)0356, EP(X)0382, EP(2)0393, EP(3)0417, EP(2)0418, EP(2)0488, EP(2)0531, EP(2)0646, EP(3)0714, EP(2)0787, EP(X)0805, EP(2)0812, EP(2)0835, EP(3)0935, EP(3)0995, EP(3)1022, EP(3)1035, EP(3)1072, EP(X)1101, EP(3)1230, EP(X)1329, EP(X)1371, EP(X)1388, EP(X)1413, EP(X)1442, EP(X)1452, EP(X)1459, EP(X)1550, EP(X)1555, EP(X)1570, EP(2)2254, EP(2)2278, EP(2)2368, EP(2)2378, EP(2)2448, EP(2)2618, EP(3)3040, EP(3)3068, EP(3)3238, EP(3)3247, EP(3)3387, EP(3)3432.

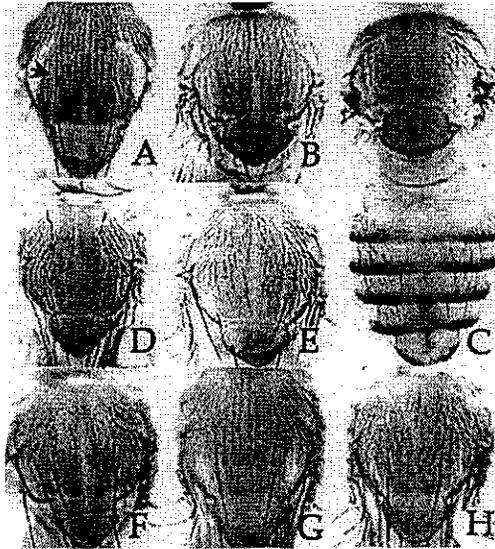


FIGURE 1.—Enhancement of the *pnrGal4/+* phenotype. Modifications in the number and distribution of macrochaetae and/or microchaetae. All figures are dorsal views of adult thoraxes, except C where the dorsal abdomen is also shown. Anterior is up. (C–H) Misexpression phenotypes of the genes listed using *pnrGal4*. In the case of G, this leads to antisense expression; all others are overexpression phenotypes. Dashed lines in D show the approximate area where the phenotype is located in A–H, except C, and the arrow in A shows the location of the dorsocentral macrochaetae. Wild type (A), *pnrGal4/+* (B), *emc* (C), *sd* (D), *glec* (E), *stg* (F), antisense *stg* (G), and EP(X)1353 (H). Note loss of dorsocentral macrochaetae in C–E.

posterior compartments. The principal signaling cascades involved in the determination of these regions are the *hh* and *dpp* signaling pathways. *hh* is expressed in posterior compartment cells and signals to adjacent cells in the anterior compartment. Patched (Ptc) is a transmembrane receptor for *hh*. Genetic analysis indicates that Ptc is a negative regulator limiting Hh diffusion, thus repressing expression of Hh target genes (CHEN and STRUHL 1998). In the EP(2)0941 line, the EP element is inserted in *ptc*. Misexpression in the thorax via *pnrGal4* produced flies lacking the scutellum (Table 1, Ib; Figure 2A), thus suggesting that limiting *hh* signaling disrupts scutellum formation. EP(X)0385 also produced a very similar effect (Table 1, Ib; Figure 2B), but the insertion is in an uncharacterized gene. Misexpression of EP(3)0666, EP(3)0707, EP(2)0853, and other lines (see Table 1) produced other defects on the scutellum, and insertions are in uncharacterized genes as well.

Effects on the thorax and on multiple structures: *Signaling pathway genes:* During thorax formation the two hemithoraxes come together and fuse at the dorsal midline in a process known as thoracic closure. Spreading and fusion of the lateral wing discs in the midline are

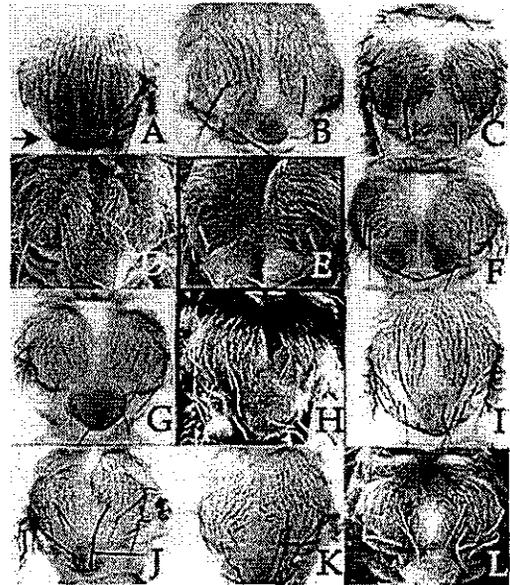


FIGURE 2.—Enhancement of the *pnrGal4/+* phenotype. Modifications in thorax, scutellum, and other structures. Conventions as in Figure 1, except K, where overexpression using *apGal4* is shown. D, E, H, and L are scanning electron microscope micrographs. Arrow in A points to the nearly total absence of scutellum. *ptc* (A), EP(X)0385 (B), *dpp* (C), activated version of *Thv* (*Thv^{OP}* construct of NELLEN *et al.* 1996) (D), homozygous weak allele of *DFos* (E), *Dsp1* (F), *tara* (G), *his* (H), *faf* (I), EP(2)0639 (J), EP(2)0639 with *apGal4* (K), and antisense *esg* (L).

controlled by the JNK and Dpp signaling pathways. Hypomorphic mutants of *dpp* show lack of filopodia from imaginal leading edge cells (MARTIN-BLANCO *et al.* 2000). *dpp* also participates in sensory organ patterning in the thorax in conjunction with the Wg signaling pathway (PHILLIPS *et al.* 1999; SATO *et al.* 1999). Misexpression of the EP(2)2232 line, in which the *P* element is inserted in the *dpp* gene, produced a cleft in the dorsal midline in the thorax and abnormally placed chaetae, as expected (Table 1, Id; Figure 2C). We also misexpressed an activated version of the Dpp receptor *thick veins* (*thv*) and obtained similar results (Figure 2D). A strong thoracic and scutellar cleft is produced in a weak mutant allele of *kayak* (*kay*; *kay* is the *Drosophila* *DFos* homolog, a JNK and Dpp downstream gene; Figure 2E). Thus, both loss- and gain-of-function phenotypes give comparable results, implying that *dpp* signaling levels are critical for function during thorax formation.

Chromatin organization and transcriptional control genes: In eukaryotes, nucleosome assembly and higher-order packaging produce a general repression of gene expression. Remodeling of chromatin structure is necessary for gene activation. ATP-dependent protein complexes with chromatin-remodeling activity can change nucleosomal patterns and DNA packaging (KINGSTON and

NARLIKAR 1999). The best-studied *Drosophila* chromatin-remodeling complexes are the NURF complex (TSUKIYAMA and WU 1995), the CHRAC complex (VARGA-WEISZ *et al.* 1997), the ACF complex (ITO *et al.* 1997), and the BRM complex (PAPOULAS *et al.* 1998). The BRM complex includes several genes of the trithorax group. We unexpectedly found in our screen that misexpression of three genes involved in changes in chromatin structure produced strong defects during thoracic closure. One of them is *Dsp1*, line EP(X)0355, a gene that encodes a member of the high mobility group 1/2 (HMG) family of gene repression proteins (LEHMING *et al.* 1998). We also found two members of the trithorax group: *kismet* (*kis*; DAUBRESSE *et al.* 1999), lines EP(2)2240 and EP(2)0563, and *taranis* (*tara*; H. N. BOURBON, personal communication to FlyBase), line EP(3)3463.

Dsp1 was first identified as a corepressor of Dorsal (LEHMING *et al.* 1998), but recent evidence has showed that *Dsp1* is a regulatory factor involved in several stages during development and is expressed in many tissues (MOSRIN-HUAMAN *et al.* 1998). For example, a gain-of-function screen aimed at identifying genes involved in eye and wing development (RØRTH *et al.* 1998) showed that misexpression of *Dsp1* produced defects in both the wing and the eye. In our screen, misexpression of *Dsp1* produced a strong thoracic and scutellar cleft (Table 1, Id; Figure 2F). It is possible that *Dsp1* interacts with other transcription factors during thorax development.

taranis has been reported as an enhancer in a screen aimed at identifying genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration (FERNANDEZ-FUNEZ *et al.* 2000) and as affecting macrochaetae (ABDELILAH-SEYFRIED *et al.* 2000). Our results showed that *tara* misexpression also alters thoracic closure (Table 1, Id; Figure 2G). Further studies are required to clarify *tara*'s multiple roles during development.

kismet was found in a genetic screen for dominant modifiers of Polycomb mutations (KENNISON and TAMKUN 1988). *kis* has ATPase domains homologous to a subunit of SWI/SNF remodeling complexes (DAUBRESSE *et al.* 1999). We observed a thoracic cleft by misexpression of *kis* (Table 1, Id; Figure 2H). We found several independent insertions in *kis*, such as EP(2)2240 and EP(2)0563, which had similar phenotypes. Molecular analysis indicated that these insertions mapped to the start of the *kis* short transcript, thus implying only the short form of *kis* in the aforementioned effects. *kis* is an example of a gene whose misexpression phenotype may be informative: loss-of-function *kis* alleles are lethal with no obvious phenotype, and clonal analysis has revealed few alterations in mutant cells, perhaps implying redundancy in *kis* function.

To study this, we crossed several *kis* lethal alleles to *pnrGal4* and found that reducing *kis* function suppressed the dominant *pnrGal4* phenotype (Figure 3A and data not shown), indicating that *kis* and *pnr* interact

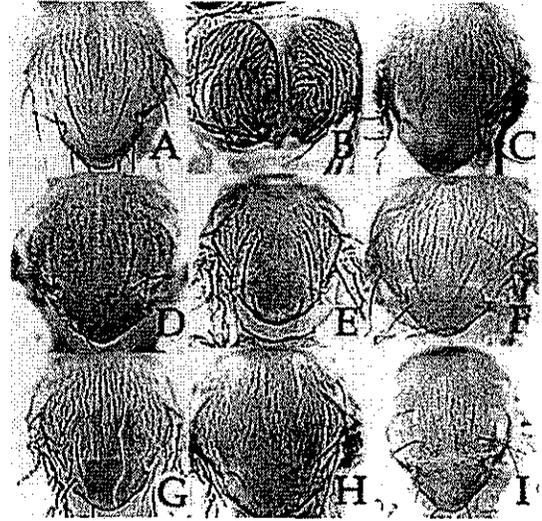


FIGURE 3.—*kis*, *Pc*, and *ppo* thoracic phenotypes. Dorsal thoracic views; conventions as in Figure 2. (A) *kis* suppresses the *pnrGal4* phenotype. Genotype shown is *kis*⁰⁷⁶¹⁶/+; *pnrGal4*/+. We also did the same cross with *kis*¹³⁴¹⁶ and obtained identical results. (B) *Pc* acts as an enhancer of *pnrGal4*. The genotype shown is *Pc*/*pnrGal4*. (C and D) Misexpression of *ppo* alters the scutellum and reduces the number of bristles in the *pnr* thoracic domain. Genotype in C is EP(2)2478/+; *pnrGal4*/+; in D it is EP(2)2478/*apGal4*. (E) *ppo* misexpression reduces thoracic bristles and alters scutellum form even in a wild-type background. Genotype shown is UAS-*pnr*/EP(2)2478; *pnrGal4*. A control rescue of *pnrGal4* is shown in F: UAS-*pnr*/+; *pnrGal4*/+. (G) Loss-of-function clones of *ppo* in the thorax reduce the numbers of bristles. Clone shown is *ppo*³/*ppo*³ and is marked with *forked*. *ppo*³ is a lethal allele of *ppo* obtained by imprecise excision of the EP element in EP(2)2478. The clonal region shows reduced numbers of thoracic bristles. The approximate limits of the clones are marked by the white line. (H and I) *ppo* interacts genetically with *pnr* but not with *ap*. The genotype of H is *ppo*³/+; *pnrGal4*/+; note loss of bristles and deformed scutellum, whereas the genotype of I, *ppo*³/*apGal4*, is wild type.

genetically. The effect is the opposite of what was obtained when *kis* was overexpressed and suggests that dosage of *kis* is important in modulating *pnr* function in the dorsal thorax. Moreover, crossing a mutation in *Polycomb* (*Pc*) to *pnrGal4* enhances dramatically the *pnrGal4* phenotype (Figure 3B). Since *Pc* antagonizes trithorax function, this result is expected. Taken together, the data presented argue for a function of chromatin-remodeling complexes in the formation of the thorax, specifically by regulating *pnr* activity. *pnr* is a prepattern gene, and this would point to chromatin-remodeling complexes as regulators of prepattern gene activity. As such, the data imply a novel function for trithorax and Polycomb group genes.

EP(2)0816 also showed a strong thoracic cleft, but the insertion is in an uncharacterized gene with homology to a histone acetyltransferase. It is thus possible that

this gene is also involved in chromatin organization and state during thorax formation.

Genes acting in post-translational regulation: Misexpression of *fat facets* (*faf*) in EP(3)0381 produced a slight cleft in the thorax and abdomen and a reduced scutellum (Table 1, Id; Figure 2I). *faf* encodes a Ubp enzyme (ubiquitin-processing protease) required for cellularization of the embryo and for patterning the developing eye (FISHER-VIZE *et al.* 1992; CHEN and FISHER 2000). It is now well established that ubiquitin-mediated proteolysis plays an essential role in several key biological processes involving signal transduction (MANIATIS 1999). Several lines—(EP(3)0416, EP(3)0562, EP(2)0622, EP(2)0639 (and the other lines in the same locus), EP(X)1501, EP(3)3135, and EP(3)3528—also have multiple effects and lie in genes that are not yet characterized.

We rescreened 20 of the *pnrGal4* interacting lines with *apGal4*. Of these, one-half gave similar effects with both drivers. Examples include line EP(2)0639, where misexpression with both *pnrGal4* and *apGal4* gave similar results (Table 1, Id; Figure 2, F and K), and the previously mentioned *sd* gene. Six more lines gave different effects, and 4 lines gave no effects with *apGal4*. This underscores the fact that a large fraction (80%) of the rescreened interacting lines produced effects on the thorax irrespective of genetic background. Lines that did not show effects with *apGal4* may represent lines that have specific interactions with *pnr*.

Effects on viability: We found effects on viability in 20 lines where EP misexpression via *pnrGal4* caused lethality. The EP elements were inserted in known genes such as *escargot* (*esg*), *inscuteable* (*insc*), and *Krüppel-homolog 1* (*Kr-h1*) in 7 of the lines. *esg* is expressed in the central nervous system during late embryogenesis and larval stages and in imaginal discs. Loss-of-function mutations of *esg* produce embryonic or early larval lethality (ASHBURNER *et al.* 1990). *esg* overexpression causes defects in eye and wing development (RØRTH *et al.* 1998). In our screen, overexpression of *esg* using EP(2)2009 and EP(2)0684 produced lethality during embryonic development. However, one antisense insert in the *esg* gene in EP(2)0683 produced a strong thoracic cleft and defects in the abdominal dorsal midline but not lethality (Table 1, Id; Figure 2E). This loss-of-function effect could nevertheless be caused also by cell death in these tissues, since *esg* codes for a zinc-finger protein involved in maintaining diploidy of imaginal cells and probably also in suppressing the endoduplication that occurs in larval cells (HAYASHI *et al.* 1993). Dosage of *esg* is important and may be required for cell survival.

The *Kr-h1* gene [EP(2)2289; Table 1, Id] encodes a transcription factor involved in ecdysone response. This gene has at least two different promoters and produces multiple transcripts during development. Mutants complete normal embryonic and larval development but die during metamorphosis with defects of head eversion (PECASSE *et al.* 2000). We also observed pupal lethality

in *Kr-h1* overexpression. *Kr-h1* transcript levels during metamorphosis may be critical. Besides these lines, we also found that EP(2)0797, EP(2)873, EP(3)1191, EP(X)1595, EP(2)2016, EP(2)2612, EP(3)3085, EP(3)3223, EP(3)3334, and EP(3)3384, all with insertions in unknown genes, produce lethality.

Suppression of the *pnrGal4/+* phenotype: From our screen, only 4 out of 45 EP lines whose misexpression suppresses *pnrGal4/+* correspond to characterized genes: EP(X)0382, *corkscrew* (*csw*); EP(2)2278, *big brain* (*big*); EP(X)1442, *amnesiac* (*amn*); and the already mentioned EP(3)3432, *stg* (Figure 1G). *csw* encodes a protein phosphatase identified in an embryonic genetic screen and functions in MAPK signaling pathways. This is consistent with evidence that MAPK pathways are required for normal spacing and number of thoracic bristles (CLIFFORD and SCHÜPBACH 1989). Due to the weak *pnrGal4/+* phenotype, experiments to test suppression in stronger *pnr* mutant backgrounds should be performed to assess the extent of the rescue. The collection of uncharacterized suppressors could provide a starting point for identification of novel *pnr* interacting genes, as suppressions are generally thought to evidence more specific genetic interactions.

Novel gene identified in the screen with thoracic defects: In the foregoing analysis we have concentrated on genes whose functions, in several cases, were already known and whose involvement in thorax formation was sometimes also known (they thus acted as positive controls), but one of the aims of the screen was to identify novel genes required for dorsal thorax formation. A large collection of the lines screened that produced effects fall into uncharacterized loci (142 loci; 85% of the lines screened). From these, we have focused on the analysis of one of them, line EP(2)2478. This line has several effects in the thorax when misexpressed via *pnrGal4*: it has a reduced number of thoracic bristles and a defective scutellum (Figure 3C), whereas the insertion by itself has no phenotype (data not shown). Misexpression via *apGal4* also produced flies with missing bristles (Figure 3D), showing that the effect was not specific to *pnrGal4* misexpression. Further confirmation of this, and of the fact that misexpression of EP(2)2478 generates loss of bristles, among other phenotypes, was obtained when we misexpressed both EP(2)2478 and *pnr* at the same time: the loss of bristles was even more evident (Figure 3E).

We then generated excision alleles of this insertion and identified several lethal lines. We mapped the lethality at the embryonic stage: both zygotic and germline clones show defects at the extended germband stage with a characteristic U-shaped mutant embryo (Figure 4, B and C). Since the excisions are lethal, we generated loss-of-function clones in larvae to study their effects in the thorax (Figure 3G). Adult thoracic clones also lack bristles and have a deformed scutellum, implying that both misexpression and loss-of-function phenotypes are

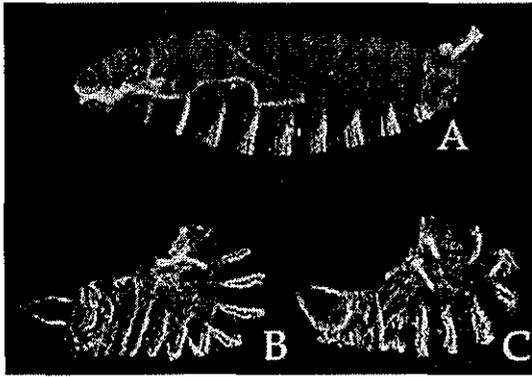


FIGURE 4.—Lethal alleles of *ppo* have embryonic phenotypes. Embryonic cuticles are shown; dorsal is up and anterior is to the left. Lateral views. (A) The cuticle of a wild-type embryo; note filzkörper at the dorsal posterior end and ventral denticle belts. (B) A *ppo'* / *ppo'* zygotic mutant embryo. The embryo has a characteristic U-shape, with part of the ventral cuticle at the posterior end curved upward; note position of the filzkörper and abdominal denticle belts. (C) A germline clone of *ppo'* shows the same embryonic lethal phenotype as a zygotic mutant, suggesting that there is no significant maternal contribution.

similar. For this reason we have named this locus *poco pelo* (*ppo*), which means few hairs in Spanish. In view of the fact that both *pnr* and *ppo* produce loss of bristles and defects in the thorax, we decided to test whether these two loci genetically interact. We crossed a lethal allele of *ppo* to *pnrGal4*. As shown in Figure 3H, *ppo* genetically interacts with *pnrGal4*, because it enhances the weak dominant effect of *pnrGal4* with respect to bristle loss but also with respect to formation of the thorax. This genetic interaction is specific and not due to expression of Gal4 in the thorax in conjunction with a reduction of *ppo* function, because crosses of the same lethal allele of *ppo* to *apGal4* produced wild-type progeny (Figure 3I).

ppo also alters bristles in the wing: while examining the effects of *ppo* misexpression using *apGal4* we observed loss of bristles and bristle duplications at the dorsal wing margin (Figure 5B). This was then corroborated using clonal analysis: loss-of-function clones of *ppo* at the wing margin also produced loss of bristles and bristle duplications (Figure 5, C and D).

ppo maps to the left arm of the second chromosome at 32D. Since both the loss-of-function and misexpression phenotypes of *ppo* are similar, it is possible that the insertion in EP(2)2478 directs expression of an antisense transcript, but we have been unable to clone the gene and are thus unable to verify this assumption. It is also possible that both loss- and gain-of-function phenotypes yield similar results.

ppo mutant phenotypes at the embryonic and adult stages show that this locus is involved in the formation of dorsal structures, such as *pnr*, with which it interacts,

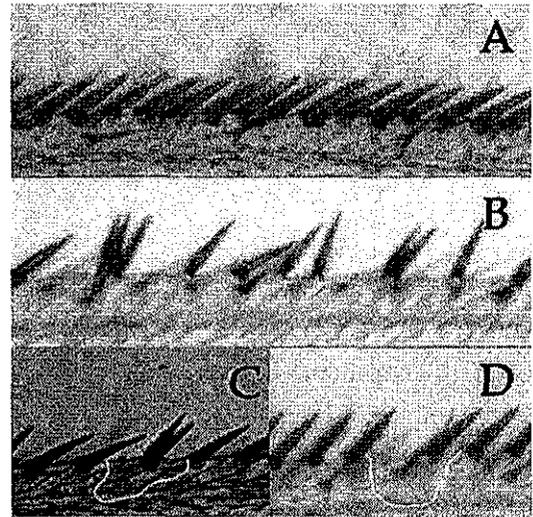


FIGURE 5.—*ppo* function is required for bristle formation at the wing margin. (A) Dorsal view of a wild-type wing margin. Note close spacing of bristles. (B) The effects of misexpression of *ppo* in the wing margin with *apGal4*. Note extensive loss of bristles and bristle duplications. (C) A *ppo'* mutant clone marked with *forked* (approximate limits are marked by the white line) showing a bristle duplication. D is a similar clone, marked as in C, showing bristle loss.

but also that it is required for the formation of other structures where *pnr* is not required, such as the bristles of the dorsal wing margin. It thus represents a member of a class of genes that, like *pnr*, is required for the formation of the thorax both with respect to the number and spacing of bristles but also with respect to the shape and formation of the thorax: *pnr* mutants also display dorsal thoracic clefts, as do mutant conditions of *dpp* signaling in the thorax (both loss- and gain-of-function conditions), a class of genes that this screen was aimed at identifying. This also implies that *ppo* interacts with *pnr* in some structures, such as the thorax, but that, possibly, it interacts with other genes in some others, such as the wing. It is conceivable that these effects are due to the actions of more than one gene, since we have not cloned *ppo*, but in any case these genes would have to be in very close proximity and would also correspond to genes that this study was aimed at identifying. Further studies involving cloning are required to clarify the roles of *ppo* in bristle and thorax formation.

Misexpression screens have been shown to be a powerful tool in identifying genes involved in development. In this screen 11 genes already known to be required for bristle development, *emc*, *dpp*, *glec*, *stg*, *tara*, *esg*, *Bx*, *Mef2*, *faf*, *sd*, and *bib*, were identified. Nevertheless, some of these genes, such as *tara*, *esg*, and *faf*, were not known to also affect thoracic closure. We also identified 4 other genes previously characterized that had not yet been implicated in thorax formation: *Dsp1*, *kis*, *ptc*, and *amn*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

83

Despite this, most of the *pnrGal4* or *apGal4* interacting lines likely represent genes that were not known to be linked to thorax formation. In 20 of these interesting EP lines, the insertions fall close to uncharacterized loci for which cDNAs or lethal lines exist (Table 1). Most of the interacting lines identified represent novel genes, and from these we studied and characterized a new locus, *ppo*, whose misexpression and loss-of-function phenotypes show effects on the thorax and wing.

This result could stem from the fact that few, if any, concerted efforts have been made to catalog the genome's involvement in the formation of the thorax. This screen thus represents an entry point to a wealth of new genetic interactions. Most of what we found represents novel or hitherto unrecognized putative relationships, the interpretation of which has been greatly aided by the completion of the fly's genome sequence (ADAMS *et al.* 2000). It is now necessary to characterize loss-of-function phenotypes for many of these genes to delve into their functions and specific roles. Misexpression of genes may produce abnormalities from completely nonspecific effects in some cases, but our results demonstrate that the opposite is also true. The effects of *emc*, *gtec*, *stg*, and *tara* overexpression, for example, show specific defects in structures also known to require the gene's function, and thus similar phenotypes produced by misexpression from other EP lines may include genes required for thorax development. We also screened lines like *esg*, which gave antisense misexpression and which yielded loss-of-function phenotypes (RØRTH *et al.* 1998), akin to traditional loss-of-function alleles.

Several other misexpression screens show partial overlap with ours. We found that 33 loci identified in our screen also showed effects on external sensory organs using *scaGal4* (ABDELILAH-SEYFRIED *et al.* 2000), an overlap of only 20%. This was expected, since the ABDELILAH-SEYFRIED *et al.* (2000) screen focused on SOP formation, a structure also present in the developing thorax. Another misexpression screen for genes required in axon guidance and synaptogenesis showed eight EP lines in common with our screen, an overlap of 5% (KRAUT *et al.* 2001). This is important if we consider that this screen studied effects on synapse formation at the neuromuscular junction in larvae. Genes detected in both screens may represent genes required for nervous system formation with effects on peripheral sensory organs. Overall, our screen, when compared to other misexpression screens using the same collection of EP lines (RØRTH *et al.* 1998; ABDELILAH-SEYFRIED *et al.* 2000; KRAUT *et al.* 2001), identified a higher number of interacting lines. This result possibly reflects the fact that our attention was centered on the formation of the dorsal thorax, a complex process that involves more aspects than those covered by these other, more narrowly focused screens.

The application of genomic science and DNA microarray technology to characterize expression patterns

is likely to be very useful in studying developmental processes. In striving to define the set of genes important for completion of a developmental program, this technology may be an alternative method to study formation of complex structures, such as the thorax. However, functional data are missing. Misexpression screens like the one we present here, combined with loss-of-function data, try to achieve the same goal by examining functional consequences of alterations in gene expression levels and/or domains and offer a complementary approach. Comprehensive functional screens can then be thought of as providing a phenotypical translation of genomic science studies, since we can assess phenotype aided by genome sequence data.

We gratefully acknowledge the help of Janos Szabad and Ernst Hafen in sending us the 2100 EP lines collection, and C. Carso, M. Jezierski, and G. Martinez for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grant no. J27954-N to J.R.R.-E. and a Programa de Cooperación Científica con Iberoamérica. M.T.P.-R. is a recipient of a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Ph.D. training grant.

LITERATURE CITED

- ABDELILAH-SEYFRIED, S., Y. M. CHAN, C. ZENG, N. JUSTICE, S. YOUNGER-SHEPHERD *et al.*, 2000 A gain-of-function screen for genes that affect the development of the *Drosophila* adult external sensory organ. *Genetics* 155: 733-752.
- ADAMS, M. D., S. E. CELNIKER, R. A. HOLT, C. A. EVANS, J. D. GOCAYNE *et al.*, 2000 The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- AGNÈS, F., M. SUZANNE and S. NOSELLI, 1999 The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development* 126: 5453-5462.
- ANAND, A., J. FERNÁNDEZ, M. C. ARUNAN, S. BHOSSEKAR, A. CHOPRA *et al.*, 1990 *Drosophila* enhancer-trap transposants. Gene expression in chemosensory and motor pathways and identification of mutants affected in smell and taste ability. *J. Genet.* 69(3): 151-168.
- ASHBURNER, M., P. THOMPSON, J. ROOTE, P. F. LASKO, Y. GRAU *et al.*, 1990 The genetics of a small autosomal region of *Drosophila melanogaster* containing the structural gene for alcohol dehydrogenase. VII. Characterization of the region around the *snail* and the *cactus* loci. *Genetics* 126: 679-694.
- BLAIR, S., 1995 Compartments and appendage development in *Drosophila*. *Bioessays* 4: 299-309.
- CALLEJA, M., E. MORENO, S. PELAZ and G. MORATA, 1996 Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 274: 252-255.
- CALLEJA, M., H. HERRANZ, C. ESTELLA, J. CASAL, P. LAWRENCE *et al.*, 2000 Generation of medial and lateral dorsal body domains by the *pannier* gene of *Drosophila*. *Development* 127: 3971-3980.
- CAMPBELL, S., A. DUTTAROV, A. KATZEN and A. CHOVIK, 1991 Cloning and characterization of the *scalloped* gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 127: 367-380.
- CAMPBELL, S., M. INAMDAR, V. RODRIGUEZ, V. RAGHAVAN, M. PALAZZOLO *et al.*, 1992 The *scalloped* gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 6: 367-379.
- CAMPUZANO, S., and J. MODOLELLI, 1992 Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex. *Trends Genet.* 8: 202-208.
- CHEN, X., and J. FISHER, 2000 *In vivo* structure/function analysis of the *Drosophila fat facets* deubiquitinating enzyme gene. *Genetics* 156: 1829-1836.
- CHEN, Y., and G. STRUHL, 1998 *In vivo* evidence that Patched and Smoothed constitute distinct binding and transducing compo-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

84

- agents of a Hedgehog receptor complex. *Development* 125: 4943-4948.
- CHOU, T. B., and N. PERRIMON, 1996 The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144: 1673-1679.
- CLIFFORD, R. J., and T. SCHÜPBACH, 1989 Coordinately and differentially mutable activities of torpedo, the *Drosophila melanogaster* homolog of the vertebrate EGF receptor gene. *Genetics* 123: 771-787.
- COHEN, B., M. MCCUFFIN, C. PFEIFLE, D. SEGAL and S. COHEN, 1992 *apterous*, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila*, encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev.* 6: 715-729.
- DAUBRESSE, G., R. DEURING, L. MOORE, O. PAPOULAS, I. ZAKRAJSEK *et al.*, 1999 The *Drosophila hismel* gene is related to chromatin-remodeling factors and is required for both segmentation and segment identity. *Development* 126: 1175-1187.
- EDGAR, B., D. LEHMAN and P. O'FARRELL, 1994 Transcriptional regulation of *string* (*cdc25*): a link between developmental programming and the cell cycle. *Development* 120: 3131-3143.
- ELLIS, H., D. SPANN and J. POSAKONY, 1990 *extramacrochaetae*, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* 61: 27-38.
- FERNANDEZ-FUNEZ, P., M. L. NINO-ROSALES, B. DE GOUYON, W. SHE, J. M. LUCHAK *et al.*, 2000 Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* 408: 101-106.
- FISHER-VIZE, J., G. RUBIN and R. LEHMAN, 1992 The *fat facets* gene is required for *Drosophila* eye and embryo development. *Development* 116: 985-1000.
- GARRELL, J., and J. MODOLELL, 1990 The *Drosophila extramacrochaetae* locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell* 61: 39-48.
- GÓMEZ-SKARMETA, J. L., R. DIEZ DEL CORRAL, E. DE LA CALLE, D. FERRÉS-MARCÓ and J. MODOLELL, 1996 *arauca* and *cauphican*, two members of the novel Iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* 85: 95-105.
- HAENLIN, M., Y. CUBADA, F. BLONDEAU, P. HEITZLER, Y. LUTZ *et al.*, 1997 Transcriptional activity of Pannier is regulated negatively by heterodimerization of the GATA DNA-binding domain with a cofactor encoded by the *u-shaped* gene of *Drosophila*. *Genes Dev.* 11: 3096-3108.
- HALDER, C., P. POLACZYK, M. E. KRAUS, A. HUDSON, J. KIM *et al.*, 1998 The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Gene Dev.* 12: 3900-3909.
- HAYASHI, S., S. HIROSE, T. METCALFE and A. SHIRRAS, 1993 Control of imaginal cell development by the *escargot* gene of *Drosophila*. *Development* 118: 105-115.
- HEITZLER, P., M. HAENLIN, P. RAMAIN, M. CALLEJA and P. SIMPSON, 1996 A genetic analysis of a *pannier*, a gene necessary for viability of dorsal tissues and bristle positioning in *Drosophila*. *Genetics* 143: 1271-1286.
- HUANG, A., and G. RUBIN, 2000 A misexpression screen identifies genes that can modulate RAS1 pathway signaling in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 156: 1219-1230.
- ITO, T., M. BULGER, M. J. PAZIN, R. KOBAYASHI and J. T. KADONAGA, 1997 ACF and ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* 90: 145-155.
- KENNISON, J. A., and J. W. TAMKUN, 1988 Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8136-8140.
- KIMURA, K., A. USUI-ISHIHARA and K. USUI, 1997 G2 arrest of cell cycle ensures a determination process of sensory mother cell formation in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* 207: 199-202.
- KINGSTON, R. E., and G. J. NARLIKAR, 1999 ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13: 2339-2352.
- KRAUT, R., K. MENON and K. ZINN, 2001 A gain-of-function screen for genes controlling motor axon guidance and synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 11: 417-430.
- LEHMAN, N., A. LE SAUX, J. SCHÜLLER and M. PTASHNE, 1998 Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7322-7326.
- LINDSLEY, D. L., and G. G. ZIMM, 1992 *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- LUNDGREN, S., C. CALLAHAN, S. THOR and J. THOMAS, 1995 Control of neuronal pathway selection by the *Drosophila* LIM homeodomain gene *apterous*. *Development* 121: 1769-1773.
- MANIATIS, T., 1999 A ubiquitin ligase complex essential for the NF- κ B, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev.* 13: 505-510.
- MARTIN-BLANCO, E., J. PASTOR-PAREJA and A. GARCIA-BELLIDO, 2000 JNK and *decapentaplegic* signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7888-7893.
- MIKLOS, G., and G. RUBIN, 1996 The role of the genome project in determining gene function: insights from model organism. *Cell* 86: 521-529.
- MILAN, M., S. CAMPUZANO and A. GARCIA-BELLIDO, 1996 Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 640-645.
- MILAN, M., S. CAMPUZANO and A. GARCIA-BELLIDO, 1997 Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5691-5696.
- MOSCOSO DEL PRADO, J., and A. GARCIA-BELLIDO, 1984 Genetic regulation of the *achaete-scute* complex in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193: 242-245.
- MOSRIN-HUAMAN, C., L. CANAPLE, D. LOCKER and M. DECOVILLE, 1998 *DSP1* gene of *Drosophila melanogaster* encodes an HMG-domain protein that plays multiple roles in development. *Dev. Genet.* 23: 324-334.
- NELLEN, D., R. BURKE, C. STRUHL and K. BASLER, 1996 Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* 85: 357-368.
- NÜSSEIN-VOLHARD, C., and E. WIESCHHAUS, 1980 Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801.
- OLIVIER, J., T. RAABE, M. HENKEMEYER, B. DICKSON, C. MBAMALI *et al.*, 1993 A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the Sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange. *Soc. Cell* 73: 179-191.
- PAPOULAS, O., S. J. MOSELEY, C. M. MCCALLUM, M. SARTE, A. SHEARN *et al.*, 1998 The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* 125: 3955-3966.
- PECASSE, F., Y. BECK, C. RUÍZ and G. RICHARDS, 2000 Krüppel-homolog, a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.* 221: 53-67.
- PHILLIPS, R., N. WARNER and R. WHITTLE, 1999 Wingless signaling leads to asymmetric response to Decapentaplegic-dependent signaling during sense organ patterning on the notum of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 207: 150-162.
- POSAKONY, J. W., 1994 Nature versus nurture: asymmetric cell divisions in *Drosophila* bristle development. *Cell* 76: 415-418.
- RAMAIN, P., P. HEITZLER, M. HAENLIN and P. SIMPSON, 1993 *pannier*, a transcription regulatory gene of *achaete* and *scute* in *Drosophila*, encodes a zinc finger protein with homology to the vertebrate transcription factor GATA-1. *Development* 119: 1277-1291.
- RIESGO-ESCOVAR, J., and E. HAFFEN, 1997 Common and distinct roles of Dfos and Djun during *Drosophila* development. *Science* 278: 669-672.
- RÖRTH, P., 1996 A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12418-12422.
- RÖRTH, P., K. SZABO, A. BAILEY, T. LAVERTY, J. REHM *et al.*, 1998 Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* 125: 1049-1057.
- SATO, M., T. KOJIMA, T. MICHINE and K. SAIGO, 1999 *Bar* homeobox genes are latitudinal prepattern genes in the developing *Drosophila* notum whose expression is regulated by the concerted functions of *decapentaplegic* and *wingless*. *Development* 126: 1457-1466.
- SIMON, M., D. BOWTELL, C. DODSON, T. LAVERTY and G. RUBIN, 1991 Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67: 701-716.
- STERN, C., 1954 Two or three bristles. *Am. Scientist* 42: 213-247.
- TOMOYASU, Y., M. NAKAMURA and N. UENO, 1998 Role of Dpp signaling in prepattern formation of the dorsocentral mechanosensory organ in *Drosophila melanogaster*. *Development* 125: 4215-4224.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

85

- TSUKIYAMA, T., and C. WU, 1995 Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodelling factor. *Cell* 83: 1011-1020.
- VARGA-WEISZ, P. D., M. WILM, E. BONTE, K. DUMAS, M. MANN *et al.*, 1997 Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* 388: 598-602.
- VERHEYEN, E. M., K. J. PURCELL, M. E. FORTINI and S. ARTAVANIS-TSAKONAS, 1996 Analysis of dominant enhancers and suppressors of activated *Notch* in *Drosophila*. *Genetics* 144: 1127-1141.
- WINICK, J., T. ABEL, M. LEONARD, M. MICHELSON and I. CHARDON-LORIAUX, 1993 A GATA family transcription factor is expressed along the embryonic dorsoventral axis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 119: 1055-1065.
- ZEITLINGER, J., and D. BOHMANN, 1999 Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and JNK pathway. *Development* 126: 3947-3956.

Communicating editor: T. SCHÜPBACH