



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

"CARACTERIZACIÓN DEL GEN *piragua* (*prg*) EN
Drosophila melanogaster"

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. EN C. NESTOR OCTAVIO NAZARIO YEPIZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR

DRA. MARTHA VERÓNICA VÁZQUEZ LASLOP
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DR. FERNANDO LÓPEZ CASILLAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, FEBRERO DE 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RESUMEN

Una importante herramienta en el estudio y caracterización de genes del desarrollo embrionario en *Drosophila melanogaster* fue la generación de mutantes y el agrupamiento de éstos en base a las características morfológicas del exoesqueleto (cutícula), distintas al del organismo silvestre. Los embriones homocigotos mutantes para los genes involucrados en el proceso del desarrollo embrionario del cerrado dorsal, por ejemplo, tienen un fenotipo letal común: un orificio en la parte dorsal del embrión. *piragua* (*prg*) es un gen pleiotrópico, que fue originalmente descubierto porque los mutantes presentan el fenotipo de apertura dorsal. La proteína predicha Prg codificada por este gen contiene nueve dedos de zinc del tipo C₂H₂ y un dominio asociado a dedos de zinc de tipo ZAD. El cerrado dorsal involucra al cambio de forma celular semejante al que ocurre en la cicatrización de heridas; en este proceso las células epiteliales que recubren al embrión en desarrollo en la parte lateral se estiran en una dirección ventral-dorsal y se fusionan en la línea media dorsal para cubrir al embrión completamente. En un trabajo previo se generaron alelos recesivos letales de *prg* que presentaron el fenotipo de apertura dorsal en los embriones, derivados de escisiones imprecisas del elemento *P{RD401}*. En este trabajo generamos tres nuevos alelos letales con fenotipos más acusados que los alelos anteriores, por medio de escisiones del elemento *P{GT1}fu2^{BG02741}*. Estos nuevos alelos presentan además alteraciones en otros procesos del desarrollo embrionario como la involución de la cabeza. Una parte de los organismos homocigotos mutantes mueren como embriones y la otra parte mueren como larvas de primer o segundo estadio. Debido a que el fenotipo de apertura dorsal es el más fácil de analizar en los embriones mutantes de *prg*, decidimos estudiar este proceso más a detalle por medio del análisis de filmaciones en tiempo real de microscopia confocal de alta resolución con proteínas quimeras del citoesqueleto que contienen GFP y descubrimos que los embriones mutantes tienen una cinética significativamente más lenta en este proceso. Asimismo, rescatamos los fenotipos mutantes embrionarios de uno de estos alelos con una construcción silvestre de *prg* usando el sistema UAS-GAL4.

Además, en trabajos anteriores habíamos determinado la expresión del mRNA y de la proteína Prg en etapas tempranas del desarrollo embrionario del organismo silvestre que sugieren la existencia de contribución materna del gen. En este trabajo analizamos la eliminación de la contribución materna de *prg* en clones de línea germinal y observamos defectos en el desarrollo del huevo.

También, analizamos la expresión del mRNA en los discos imagales, que darán origen a las estructuras adultas durante la metamorfosis, ya que *prg* fue identificado en un tamizaje genético de supercompetencia en discos imagales junto con otros genes como *flower* (*fwe*). Al mismo tiempo, hemos investigado la participación de *prg* en la generación de estructuras del organismo adulto, analizando clonas mutantes en mosaicos genéticos, por medio de la técnica FRT-Flipasa. Estos datos demuestran que *prg* se requiere para la formación del ojo compuesto y para la formación del tórax. Los clones mutantes de *prg* analizados en los discos imagales del ojo presentan apoptosis ectópica temprana.

Hay varias vías de transducción de señales involucradas en el cerrado dorsal. Una de ellas es la vía de la cinasa de Jun (vía de JNK), que culmina con la fosforilación de Jun. La vía de JNK participa de manera importante, regulando la transcripción de varios genes, entre ellos genes que codifican para proteínas componentes del citoesqueleto, y genes de señalización de respuesta inmediata. Realizamos interacciones génicas de *prg* con algunos componentes de esta vía. Además, determinamos los fenotipos mutantes de *fwe* durante la embriogénesis e hicimos interacciones genéticas entre *prg* y este gen.

ABSTRACT

A very important tool to study and characterize the genes involved in embryonic development of *Drosophila melanogaster*, was the generation of embryonic lethal mutants and their classification based on the morphologic exoskeletal differences from wild type. Embryos mutant for genes required for embryonic dorsal closure, for example, share a common lethal phenotype: a hole in the dorsal part of the embryo. *piragua* (*prg*) is a pleiotropic gene, initially discovered because the mutants present a “dorsal open” phenotype. The putative protein Prg encoded by this gene contains nine C2H2-zinc fingers and a ZAD-zinc finger associated domain. Dorsal closure involves cell shape changes similar to wound healing; in this process, the epithelial cells that cover the developing embryo in the lateral part stretch in a ventral-dorsal manner, and fuse in the dorsal midline to completely cover the embryo dorsally. In a previous work were generated recessive mutant alleles of *prg* that presented the “dorsal open” phenotype, derived from imprecise excisions of the P-element *P{RD401}*. In this work, we generated three new lethal alleles with more acute phenotypes, by excisions of the P-element *P{GT1}fu2^{BG02741}*. The new alleles present problems in other processes of embryonic development, such as head involution. *prg* mutants have an extended phenocritical period as only part of the mutant homozygotes die as embryos. Surviving mutant embryos die as first or second instar larvae. We studied dorsal closure by real time recordings using high resolution confocal microscopy with *prg* mutant and control transgenic embryos that express GFP-chimeric cytoskeletal proteins. We discovered that *prg* embryos have sluggish dorsal closure kinetics. We also performed rescue experiments with a wild type *prg* construct using the UAS-GAL4 system.

In previous work, we determined the mRNA and protein expression of *prg* during development in wild type flies, and the results with early embryos suggested maternal contribution. In this work, we eliminated the maternal contribution of *prg* generating germ line clones, and observed defects in oocyte development.

We also analyzed the mRNA expression in imaginal discs that form most adult structures during metamorphosis, as *prg* was identified in a cell super competition screening in wing imaginal discs, together with other genes like *flower* (*fwe*). At the same time, we investigated the participation of *prg* in the formation of adult structures, analyzing mutant clones in genetic mosaics, generated by the FRT-Flipase technique. These data show that *prg* is necessary for compound eye and adult thorax formation. Mutant *prg* clones in eye imaginal discs exhibited ectopic apoptosis.

There are different signal transduction pathways involved in dorsal closure the one of which is the Jun kinase pathway, which regulates several genes, including ones that code for cytoskeletal components and cell signaling. We performed genetic interaction between *prg* and some components of this pathway. Furthermore, we also determined *fwe* mutant phenotypes during embryogenesis and the genetic interaction between *prg* and *fwe*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por CONACYT (donativo #177962) y el presupuesto del Instituto de Neurobiología destinado a la Laboratorio D04, a cargo del Dr. Juan R. Riesgo Escovar; además, por mi beca para la formación académica del doctorado por parte del CONACYT (número de beca #161748). Agradezco al Programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

Agradezco a mi tutor el Dr. Juan R. Riesgo y a mis sinodales, la Dra. Martha Vázquez Laslop y el Dr. Fernando López Casillas, por su ayuda intelectual en el desarrollo de este proyecto y en la revisión crítica del escrito.

Agradezco a los integrantes de mi jurado de examen (Dra. R. Navarro, Dr. F. López Casillas, Dr. G. Martínez de la Escalera, Dr. A. Varela y Dr. J. Chimal) por sus aportaciones al enriquecimiento de este trabajo y a la minuciosa revisión del escrito.

Agradezco a Angélica Tello y Laura Briones por su ayuda en la generación de los alelos mutantes de *prg*. Además, gracias a Aldo A. Téllez y Daniel Krauth por su ayuda en la realización de los experimentos para el estudio de los clones homocigotos mutantes en los discos imagales.

Agradecimientos a Juan Manuel Murillo e Ismael Gimete por su ayuda en los experimentos de rescate y a Miguel A. Mendoza por su ayuda en las inmunotinciones.

Agradezco a Nydia Hernández de la unidad de microscopía del INB-UNAM por su ayuda en los experimentos de microscopía confocal; a Aynur Kaya, Nadia Dube y Yury Belyaev del EMBL por su ayuda en las adquisiciones y el análisis de las filmaciones en tiempo real con la microscopía confocal de alta resolución.

Agradezco al Dr. Damian Brunner por su apoyo en la realización de la estancia académica en su laboratorio, proporcionarnos las cepas transgénicas para las filmaciones en tiempo real y su ayuda intelectual.

Agradezco a Claudia González Flores por su ayuda en el cuidado de las cepas. Gracias también a la Dra. Ma. Teresa Peña por su ayuda en el mantenimiento de las cepas, la generación de las líneas recombinantes para las interacciones génicas y su valioso aporte intelectual en el proyecto.

Agradezco a la Dra. Anaid Antaramian y al Dr. Michael Jeziorski de la Unidad de Proteogenómica del INB-UNAM por las facilidades en el uso de los equipos y su ayuda en la secuenciación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	
ABSTRACT	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
1. El desarrollo embrionario antes del cerrado dorsal.	4
2. El cerrado dorsal y la involución de la cabeza.	5
2.1. La vía de la JNK en el cerrado dorsal.	6
2.2. La vía de <i>dpp</i> en el cerrado dorsal.	9
2.3. El citoesqueleto y su función en el cerrado dorsal.	10
3. El cerrado torácico.	11
3.1. La vía de la JNK y <i>dpp</i> en el cerrado torácico.	12
4. El ojo compuesto.	13
5. El gen <i>piragua</i> (<i>prg</i>).	15
5.1. El locus.	16
5.2. Prg y las proteínas con dedos de zinc.	17
5.3. Los alelos mutantes de <i>prg</i> .	18
5.4. La expresión de <i>prg</i> durante el desarrollo embrionario.	19
5.5. <i>prg</i> en la competencia celular y el desarrollo de estructuras imagales.	21
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
DISEÑO EXPERIMENTAL	24
MÉTODOS	25
1. Generación de nuevos alelos mutantes.	25
2. Las líneas utilizadas.	26

2.1. ARNi de <i>prg</i> .	26
2.2. Las líneas transgénicas del rescate de <i>prg</i> .	27
2.3. Las líneas mutantes para las interacciones génicas.	28
3. El análisis de las cutículas.	28
4. La secuenciación de los alelos mutantes.	29
5. La extracción del ARN y la RT-PCR semi-cuantitativa.	30
6. El análisis de la cinética del cerrado.	32
7. La viabilidad de las larvas.	33
8. El análisis por Southern-blot.	33
9. Las interacciones genéticas.	34
10. La generación de los mosaicos genéticos.	36
10.1. Los mosaicos genéticos con los clones de la línea germinal.	37
10.2. Los mosaicos genéticos con los clones del tórax y el ojo compuesto.	37
11. La inmunohistoquímica de los discos imagales.	38
12. La hibridación <i>in situ</i> de los discos imagales.	38
13. La histología del ojo compuesto.	39
14. El análisis estadístico.	39
RESULTADOS.	41
1. La caracterización de los alelos de <i>prg</i> .	41
1.1. Los alelos <i>prg</i> ¹ , <i>prg</i> ² y <i>prg</i> ³ presentan aperturas dorsales más acusadas.	41
1.2. La caracterización de la lesión molecular en <i>prg</i> ³ .	45
1.3. Los niveles de mRNA en los homocigotos de <i>prg</i> ³ son menores.	50
2. Los embriones con el ARNi de <i>prg</i> tienen alteraciones de cerrado dorsal.	51
3. Los experimentos del rescate de <i>prg</i> .	53
3.1. La construcción silvestre rescata el fenotipo mutante embrionario de <i>prg</i> ³ .	54
3.2. La construcción silvestre restablece el mRNA en los embriones mutantes.	55
4. El análisis <i>in vivo</i> del cerrado dorsal.	57
5. Las interacciones genéticas.	63
5.1. ¿ <i>prg</i> y la vía de la JNK interaccionan?	63
5.2. <i>prg</i> y <i>fwe</i> interaccionan genéticamente durante el desarrollo embrionario.	65

6. <i>prg</i> se requiere para la ovogénesis.	68
7. <i>prg</i> en la formación de las estructuras adultas.	69
7.1. <i>prg</i> se expresa en los discos imagales.	69
7.2. <i>prg</i> es necesario para la formación del tórax y el ala.	70
7.3. <i>prg</i> es necesario para la formación del ojo compuesto.	75
DISCUSIÓN.	81
CONCLUSIONES.	86
BIBLIOGRAFÍA.	87
ANEXO I.	99
ANEXO II.	104
ANEXO III.	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	La vía de la JNK.	8
Figura 2.	El fenotipo de la hendidura torácica de <i>hep</i> y <i>Dfos</i> .	13
Figura 3.	El ojo compuesto del imago de <i>Drosophila</i> .	15
Figura 4.	Esquema de la región genómica de <i>prg</i> y de su proteína predicha.	16
Figura 5.	Hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica de <i>prg</i> .	19
Figura 6.	La construcción que expresa el ARN de doble cadena en las líneas del ARNi de <i>prg</i> .	26
Figura 7.	Mapa de restricción de las enzimas <i>HindIII</i> y <i>EcoRV</i> de la región genómica de <i>prg</i> y de los elementos P utilizados para el análisis de Southern.	34
Figura 8.	Esquema de cruzas para generar cepas dobles heterocigotas mutantes, balanceadas, con <i>prg</i> y genes del cromosoma 2.	35
Figura 9.	Esquema de cruzas para generar cepas dobles heterocigotas mutantes, balanceadas, con <i>prg</i> y genes del cromosoma 3.	36
Figura 10.	Los alelos <i>prg</i> ¹ , <i>prg</i> ² y <i>prg</i> ³ presentan un fenotipo más acusado de apertura dorsal.	41
Figura 11.	Los alelos mutantes de <i>prg</i> presentan otros fenotipos además de la apertura dorsal.	43
Figura 12.	Southern-blot de los alelos de <i>prg</i> .	47
Figura 13.	Los oligonucleótidos diseñados para amplificar el <i>locus</i> completo de <i>prg</i> .	48
Figura 14.	Los amplificadores de PCR con los distintos pares de oligonucleótidos para la secuenciación de <i>prg</i> .	48
Figura 15.	Comparación de las secuencias del dominio ZAD de Prg con las proteínas homólogas de otras especies de <i>Drosophila</i> .	50
Figura 16.	El análisis de la expresión de <i>prg</i> en los distintos alelos mutantes.	51
Figura 17.	El análisis de los fenotipos de las líneas del ARNi de <i>prg</i> .	53
Figura 18.	Los experimentos del rescate de <i>prg</i> durante la embriogénesis.	55
Figura 19.	El análisis de la expresión de <i>prg</i> en los experimentos del rescate durante el cerrado dorsal.	56

Figura 20.	Filmaciones de microscopía confocal <i>in vivo</i> del cerrado dorsal de embriones silvestres y mutantes de <i>prg</i> que expresan Ecad:GFP.	58
Figura 21.	Dinámica del cerrado dorsal en embriones silvestres y mutantes de <i>prg</i> .	60
Figura 22.	Filmaciones de microscopía confocal <i>in vivo</i> del fenotipo extremo de los embriones mutantes de <i>prg</i> y embriones mutantes de <i>bsk</i> .	62
Figura 23.	Filmaciones de microscopía confocal <i>in vivo</i> del cerrado dorsal de embriones silvestres y mutantes de <i>prg</i> que expresan GFP:Moe.	63
Figura 24.	El análisis de las interacciones genéticas del alelo <i>prg</i> ³ con los genes que participan en la vía JNK.	64
Figura 25.	El análisis de las interacciones genéticas de <i>prg</i> con <i>fwe</i> .	67
Figura 26.	Evaluación del fenotipo mutante de los clones de línea germinal de <i>prg</i> .	69
Figura 27.	Hibridación <i>in situ</i> de <i>prg</i> en los discos imagales.	70
Figura 28.	Estudio de los clones homocigotos de <i>prg</i> ¹ en el tórax adulto.	72
Figura 29.	Estudio de los clones homocigotos de <i>prg</i> ³ en el tórax adulto.	74
Figura 30.	Estudio de los clones homocigotos de <i>prg</i> ¹ en el ojo compuesto.	76
Figura 31.	Corte horizontal del ojo compuesto de los mosaicos genéticos de <i>prg</i> ¹ .	77
Figura 32.	Estudio de los clones homocigotos de <i>prg</i> ³ en el ojo compuesto.	79
Figura 33.	Apoptosis en los discos imagales del ojo de los mosaicos genéticos de <i>prg</i> ³ .	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características de los alelos y las líneas de <i>prg</i> utilizadas en este estudio.	44
Tabla S1.	Iniciales y prefijos de los nombres de los genes predichos de algunas especies del género <i>Drosophila</i> .	99

INTRODUCCIÓN

Tratar de entender la función que desempeñan los genes en un organismo es la tarea de todo buen genetista. El experimentador intenta acotar muchas variables y hacerlas homogéneas para poder dilucidar mejor un proceso. Una de las mejores maneras de estudiar la función de un gen es teniendo alelos con pérdida de función de este gen y observar el fenotipo que ocasiona en el organismo. Sin embargo, la redundancia de genes ha sido un problema para los genetistas en este tipo de estudios. Es necesario, por lo tanto, valerse de un modelo de estudio que cuente con las características clave (menor redundancia de los genes, facilidad para generar alelos mutantes y tiempo de generación corto) para hacer análisis más confiables. *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) ha sido un organismo modelo muy importante para estudiar la función de los genes. El estudio del desarrollo embrionario de *Drosophila*, en el que diversas modificaciones celulares conllevan al arreglo de tejidos en un contexto tridimensional para esculpir al embrión, ha sido de gran ayuda en la disección génica. En la biología del desarrollo de los organismos, las modificaciones celulares que dirigen la proliferación, la diferenciación y el arreglo de los tejidos son fenómenos morfogenéticos. Estos fenómenos morfogenéticos ocurren de manera continua y precisa, ya que se encuentran finamente regulados a través del tiempo y el espacio por medio de la comunicación celular.

Desarrollo embrionario de *Drosophila*

Después de la fertilización del huevo, en el cigoto comienzan una serie de divisiones nucleares sin que se efectúe la citocinesis. La mayoría de los núcleos del cigoto migran a la periferia en la etapa del blastodermo sinsicial. Una vez que los núcleos en la periferia se individualizan y se rodean de membranas, el embrión en desarrollo se convierte en un blastodermo celular. Durante la gastrulación, diferentes grupos de células forman las capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. El mesodermo y el ectodermo conforman un tejido llamado la banda germinal en *D. melanogaster*. Esta banda germinal posteriormente se estira y se retrae en dos movimientos morfogenéticos continuos. Una vez que la banda germinal se ha retraído, el epitelio lateral no está presente en la parte

dorsal, y el dorso del embrión queda recubierto por un tejido extra embrionario llamado amnioserosa. Para cubrir esta parte del embrión, el epitelio lateral se extiende y se une en la línea media dorsal en un proceso conocido como el cerrado dorsal. Al final de la embriogénesis, los tejidos que conforman la parte anterior del embrión se reacomodan durante la involución de la cabeza (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

La cutícula se forma al final del desarrollo. La sistematización en el estudio de genes que intervienen en el desarrollo embrionario por medio del análisis fenotípico de la cutícula en estas etapas ha sido una herramienta trascendental para la disección génica en la ontogenia. Este estudio ha sido tan valioso (meritorio a un premio Nobel), gracias a que el exoesqueleto proporciona una representación fiel de muchas alteraciones que sufre el embrión durante su desarrollo (Jürgens et al., 1984; Nüsslein-Volhard et al., 1984; Wieschaus et al., 1984). Por esta razón, el cerrado dorsal ha sido muy estudiado por medio de herramientas genéticas y moleculares. El cerrado dorsal en el embrión es equiparable al cerrado de una herida en lo que se refiere al cambio de forma celular, es decir, tanto el cerrado dorsal como la cicatrización de heridas utilizan el mismo andamiaje molecular y las mismas moléculas de señalización, por lo tanto, tratar de esclarecer lo que ocurre en este proceso resulta particularmente atractivo (Harden, 2002; Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013). Diversos estudios genéticos, moleculares y bioquímicos han demostrado que la vía de la cinasa de Jun (JNK por su nombre en inglés) regula el proceso de cerrado dorsal de manera importante (Harden, 2002; Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013). Esta vía fue descubierta originalmente en levaduras y cultivos de células de mamíferos, como una vía de señalización que se activa en respuesta al estrés, por ello también es conocida como SAPK o "stress-activated protein kinase" (por sus siglas en inglés) (Galcheva-Gargova et al., 1994; Goberdhan y Wilson, 1998). Además de esta vía, se requiere de otros genes de señalización y de genes que codifican para componentes del citoesqueleto (Knust, 1997). Una alteración en este proceso del desarrollo embrionario de *D. melanogaster* resulta en un fenotipo letal muy claro que se puede observar como un orificio en la parte dorsal de la cutícula del embrión y que se conoce como "apertura dorsal" (Harden, 2002; Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013).

En el laboratorio aislamos y caracterizamos alelos mutantes del gen *piragua* (*prg*), un gen no caracterizado involucrado en el cerrado dorsal, que codifica a una proteína con nueve dedos de zinc (ZF del inglés “Zinc Finger”) y un dominio N-terminal asociado a dedos de zinc. Los embriones homocigotos de estos alelos mutantes presentan el fenotipo característico de apertura dorsal. Además, hemos generado sondas de ARN a partir del ADN complementario (cADN) y un antisuero policlonal contra una proteína Prg recombinante. Nuestros resultados (por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica) demuestran que *prg* se expresa en embriones silvestres de forma muy dinámica durante el desarrollo, es decir, no sólo durante el cerrado dorsal sino también en etapas muy tempranas en células precursoras del tejido epitelial. Su mayor nivel de expresión es en las células del epitelio lateral que recubren el embrión durante el cerrado dorsal. Estas células son precisamente las que experimentan el cambio de forma en el cerrado dorsal (Nazario-Yepiz, 2006).

Los nueve ZFs que Prg contiene son del tipo C2H2 (ZF-C2H2) y el dominio amino terminal es del tipo C4DM o ZAD (del inglés “Zinc-Finger Associated Domain”). Los motivos ZF-C2H2 se encuentran típicamente en factores de transcripción y funcionan principalmente para la unión de estas proteínas al ADN (Matthews y Sunde, 2002), aunque podría mediar interacciones proteína-proteína (Gamsjaeger et al., 2007) como se ha demostrado para motivos C2HC (Matthews et al., 2000). Se sabe muy poco de los dominios ZAD, aunque son interesantes desde el punto de vista evolutivo y del desarrollo. Los genes con dominios ZAD se encuentran predominantemente en los insectos (Chung et al., 2007) y se ha demostrado que estos dominios pueden servir para la interacción entre proteínas (Jauch et al., 2003).

En el presente trabajo se realizó la caracterización fenotípica de los alelos mutantes de *prg*, por medio del estudio de cutículas y estudios de filmación *in vivo* de embriones con microscopía confocal en tiempo-real (transgénicos que expresan una proteína quimera E-cadherina:GFP). Además, se realizó la caracterización molecular a través de RT-PCR semicuantitativa y finalmente, se rescató su función con una construcción de *prg* silvestre en embriones homocigotos mutantes de uno de estos alelos. Se documentó también la interacción de *prg* con genes que participan en el cerrado dorsal del embrión, y con *flower*

(*fwe*), un gen necesario para la competencia celular. Al mismo tiempo, se estudió el efecto de eliminar la contribución materna de *prg* y la función de *prg* en el desarrollo de estructuras adultas durante la metamorfosis, por medio de la generación de clones homocigotos mutantes de línea germinal (GLC por sus siglas en inglés), y clones homocigotos mutantes en los discos imagales.

ANTECEDENTES

La pleiotropía es una característica presente en muchos genes del desarrollo. Esta característica se refiere a la participación de un gen en distintos procesos (Griffiths et al., 2008). Los fenotipos mutantes de la falta de función de un gen evidencian los procesos en los que este gen se requiere, dependiendo del grado de hipomorfismo de los alelos mutantes con los que se cuenta. El gen *prg* presenta pleiotropía y por lo tanto participa en el desarrollo de *Drosophila* a varios niveles, así que comenzaremos por describir con mayor detalle los procesos iniciales del desarrollo de *D. melanogaster* en los que este participa (analizados en este trabajo). La caracterización que se necesita para entender un fenómeno del desarrollo no estaría completa si sólo nos referimos a los estudios morfológicos, por esta razón, también haremos una correlación de los genes que participan en cada etapa.

1. El desarrollo embrionario antes del cerrado dorsal

La banda germinal (formada por tejido mesodérmico y ectodérmico) que se ha estirado y se ha doblado sobre sí misma, se retrae. Durante su retracción, la banda germinal comprende desde la parte superior hasta la parte inferior del embrión, dibujando una C invertida. En este momento la amnioserosa está presente entre la banda germinal a manera de “relleno”. Las células de la amnioserosa conforman un epitelio extraembrionario que es alargado y plano (a diferencia del epitelio columnar lateral). Este epitelio extraembrionario que se encuentra entre la parte dorsal y ventral de la banda germinal queda en la parte superior del embrión para recubrir esta zona después de la retracción de la banda germinal.

Las células de la amnioserosa cumplen además un papel importante durante la retracción de la banda germinal. La retracción de la banda germinal no se culmina en embriones mutantes que carecen de amnioserosa. Los genes del grupo de forma de U (USG)

están involucrados en la viabilidad de la amnioserosa, durante la retracción de la banda germinal (Frank y Rushlow, 1996). Las mutaciones en estos genes causan el fenotipo común de cutículas en forma de U, provocado por la falla en la retracción de la banda germinal. Varias proteínas codificadas por los genes de este grupo, como *u-shaped (ush)*, *hindsight (hnt)* y *tail-up (tup)*, presentan motivos de dedos de zinc al igual que Prg.

Hnt codifica para una proteína predicha que contiene 14 dedos de zinc de tipo C2H2, con localización nuclear en las células de la amnioserosa. Los alelos hipomorfos de *hnt* además de presentar el fenotipo característico de cutículas con forma de U (Yip et al., 1997), presentan el fenotipo de apertura dorsal. Este gen es necesario para la retracción de la banda germinal y además regula negativamente a la vía de la JNK de manera independiente a *puckered (puc)* para que se lleve a cabo el cerrado dorsal. El gen *hnt* actúa en la amnioserosa durante el cerrado dorsal, induciendo la re-localización de DJun y DFos hacia el citoplasma, lo cual es importante para que se pueda llevar a cabo este proceso (Reed et al., 2001).

2. El cerrado dorsal y la involución de la cabeza

La elongación y la retracción de la banda germinal conllevan a una discontinuidad de la epidermis en la región dorsal del embrión. Esta región queda cubierta solamente por la amnioserosa (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997) y por lo tanto el epitelio lateral tiene que cubrir esta porción del embrión durante el cerrado dorsal. En este proceso no hay mitosis y las células de la epidermis se alargan en el eje dorso-ventral. Este cambio de forma inicia en la fila de células epidérmicas más dorsales, las cuales forman las así llamadas “células de la hilera guía” (“células de leading-edge” en inglés). La amnioserosa desempeña también un papel importante durante el cerrado dorsal, ya que este epitelio proporciona fuerza mecánica y sirve de sustrato para que las células del epitelio lateral “trepén” y se estiren para fusionarse en la línea media dorsal del embrión. Al mismo tiempo en que las células de la epidermis se estiran y cierran al embrión dorsalmente, una porción de células de la amnioserosa se delaminan hacia el interior del embrión y posteriormente sufren apoptosis, para después ser absorbidas en la parte interna del embrión (Reed et al., 2004).

Al mismo tiempo en que inicia el cerrado dorsal también inicia el proceso de involución de la cabeza. En este proceso, la epidermis migra sobre el tejido que dará origen a la cabeza adulta de la mosca y estos segmentos cefálicos se internalizan dentro de la parte anterior del embrión. Una vez que termina la migración del tejido hacia la parte interna, este tejido secreta una estructura quitinosa y pigmentada que soporta la cabeza de la larva, conocida como el esqueleto cefalofaríngeo (CFS del inglés “cephalopharyngeal skeleton”) (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997). Los individuos mutantes que presentan fallas en la migración de la epidermis presentan problemas para cubrir los segmentos de la cabeza. Este fenotipo mutante se hace evidente por un hoyo en la cutícula de los embriones en la región anterior que es conocido como “apertura anterior”. Algunos individuos con las mutaciones en los genes que participan en el cerrado dorsal también pueden presentar el fenotipo mutante de “apertura anterior”, además del fenotipo de “apertura dorsal” que los caracteriza. Se piensa que el cerrado dorsal y la involución de la cabeza están relacionados mecánica y genéticamente (Vanhook y Letsou, 2008).

Los genes involucrados en el cerrado dorsal se pueden clasificar en tres grandes grupos: los genes que pertenecen a la vía de la cinasa de Jun (JNK), los genes que pertenecen a otras vías de señalización (*dpp*, *Rho* y *Dcdc42*) y los genes que codifican a componentes del citoesqueleto, los cuales se describen a continuación (Young et al., 1993; Riesgo-Escovar et al., 1996; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997a; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b; Zeitlinger et al., 1997; Bloor y Kiehart, 2002; Harden, 2002; Homsy et al., 2006; Jankovics y Brunner, 2006; Laplante y Nilson, 2011; Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013).

2.1. La vía de la JNK en el cerrado dorsal

El cerrado dorsal se ha usado de manera clásica para la disección genética de la vía de la JNK, ya que esta etapa del desarrollo embrionario de *D. melanogaster* se requiere forzosamente de su activación (Riesgo-Escovar et al., 1996). La vía de la JNK aún no está completamente caracterizada. En general, en respuesta a la activación de esta cascada, la JNK fosforila a factores de transcripción de tipo Jun en la parte amino-terminal (de ahí su nombre en inglés: “Jun N-terminal Kinase”). La fosforilación de Jun regula la transcripción de genes (Zeitlinger et al., 1997; Karin y Gallagher, 2005; Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar,

2013). Una señal que emana de las células de la hilera guía controla y coordina el progreso del cerrado dorsal (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b; Zeitlinger et al., 1997). Los estímulos relacionados al estrés, así como ciertas citocinas pueden activar a la vía de la JNK en diferentes organismos. La activación de la vía puede regular diferentes procesos como la muerte celular programada o apoptosis (Igaki, 2009). Aunque se conocen algunos de los genes que conforman la vía de la JNK en *D. melanogaster*, no se ha descrito aun ningún ligando ni receptor de esta vía en el desarrollo embrionario (Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013). Las combinaciones de dobles mutantes de los genes de las tirosinas-quinasas de la familia de Src (*src42A*, *src64B* y *btk29A*), sin embargo, generan alteraciones del cerrado dorsal (Tateno, 2000). Estas proteínas de la familia de Src son los componentes conocidos río arriba de la vía de la JNK, junto con Shark, otra proteína-quinasa no receptora. Shark además interacciona con la proteína adaptadora Ddok (Biswas et al., 2006) y por debajo de éstas están los miembros de las familias de Rac y Cdc42 que son proteínas GTPasas pequeñas no heterotriméricas (Hakeda-Suzuki et al., 2002). *misshapen (msn)* es el gen homólogo al gen que codifica para la JNKKKK o proteína-3-quinasa de la JNK (Fig. 1) (Su et al., 1998). Río abajo de la JNKKKK existen en vertebrados seis familias de proteínas JNKKK (proteína-2-quinasa de la JNK) que son posibles reguladoras de la JNKK. En *D. melanogaster* hay un solo gen homólogo para cada una de ellas. La proteína quinasa de tipo MLK, abreviado del inglés “Mixed Lineage Kinase”, codificada por el gen *slipper (slpr)* (JNKKK=MLK=Slpr, Fig. 1) participa en la vía de la JNK (Stronach y Perrimon, 2002). Debajo de *slpr* se encuentran *hemipterous (hep)* y *basket (bsk)*, los cuales codifican para una proteína quinasa de la JNK de *D. melanogaster* (JNKK=Hep, Fig. 1) y a la proteína-quinasa de Jun (JNK=Bsk, Fig. 1) respectivamente (Glise et al., 1995; Riesgo-Escovar et al., 1996). El gen *connector of kinase to AP-1 (cka ó conector de quinasa a AP1)*, es un gen que codifica para una proteína que forma un complejo con Hep, Bsk, DJun y DFos, actuando como proteína armazón (Chen et al., 2002).

Bsk activado fosforila a DJun y de esta manera lo activa (Riesgo-Escovar et al., 1996; Sluss et al., 1996). DJun activado se une a DFos y forman el complejo AP-1 (AP-1, Fig. 1). Finalmente, este complejo AP-1 activa la transcripción de genes blanco en las células de la

hiler a guía: *decapentaplegic (dpp)*, *chickadee (chic)* y *puckered (puc)*, que le permiten desempeñar un papel central en el cerrado dorsal. *dpp* codifica para la proteína homóloga de la familia del TGF- β (Dpp, Fig. 1), el ligando de una vía de señalización que induce el estiramiento de las células del epitelio lateral más ventrales (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997a; Zeitlinger et al., 1997; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b). *chic* codifica para la proteína homóloga de la Profilina (Chic, Fig. 1), una proteína que interviene directamente en la polimerización del citoesqueleto de actina (Jasper et al., 2001). Por último, *puc* codifica para una fosfatasa involucrada en la regulación de la vía de la JNK (Puc, Fig. 1). Esta fosfatasa actúa por medio de retroalimentación negativa, desfosforilando a la JNK en *Drosophila* (Martin-Blanco et al., 1998; Jasper et al., 2001).

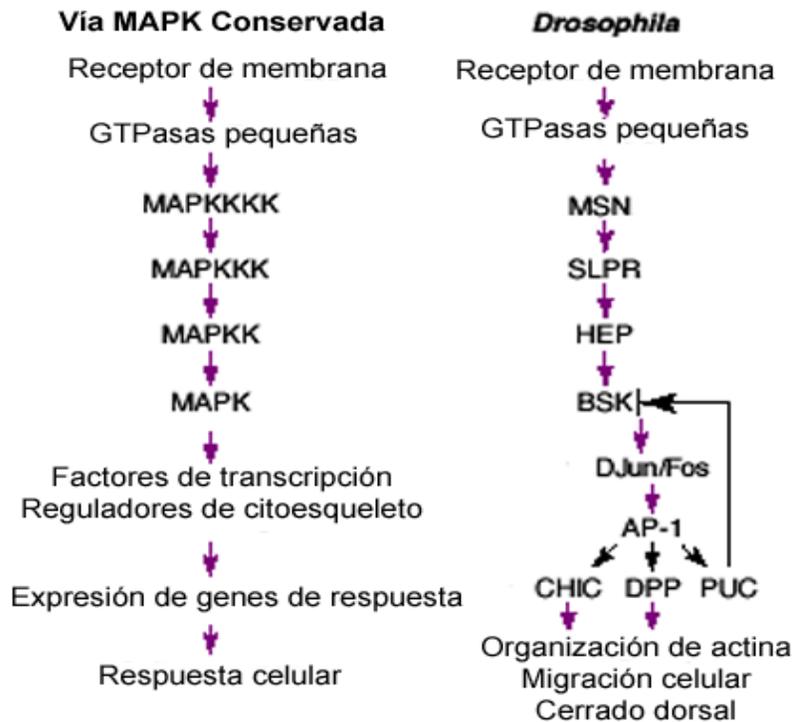


Figura 1. La vía de la JNK. La vía de la JNK en *Drosophila* es una vía de tipo MAPK que dirige señales extracelulares al núcleo a través de una serie de fosforilaciones en cascada, que activan al complejo AP-1 (DJun/DFos), el cual regula la transcripción de genes de respuesta inmediata para llevar a cabo el cerrado dorsal. A la izquierda se presenta la vía de tipo MAPK conservada y a la derecha la vía de JNK de *Drosophila*. MSN=JNKKKK, SLPR=JNKKK, HEP=JNKK, BSK=JNK, CHIC=Profilina, DPP=proteína tipo TGF- β , y PUC=fosfatasa de JNK. Imagen modificada (Xia y Karin, 2004).

DJun y DFos se unen a promotores específicos o a elementos “enhancer”. Para esta interacción proteína-DNA, DJun y DFos forman un heterodímero a través del dominio de cierre de leucina (Rousseau y Goldstein, 2001). DJun y DFos pueden formar también homodímeros. El heterodímero DJun-DFos es más estable que el homodímero DJun y dado que se requieren los dos genes durante el cerrado dorsal, lo más probable es que sea el heterodímero DJun-DFos el factor de transcripción activo (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b).

Las mutaciones que afectan a componentes de la vía de transducción de señales de JNK, como los antes mencionados, son letales embrionarios y causan defectos en el cerrado dorsal, ya que se bloquea el cambio de forma celular (Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013). El fenotipo resultante de todas estas mutaciones (conocido como apertura dorsal) se caracteriza por la ausencia de la elongación de las células en la epidermis lateral, lo que concuerda con la pérdida de expresión del gen *dpp* en las células epiteliales más dorsales del embrión (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b; Zeitlinger et al., 1997).

2.2. La vía de *dpp* en el cerrado dorsal

La vía de transducción de señales activada por Dpp (homólogo de genes TGF- β /BMP de vertebrados) en *D. melanogaster*, también es esencial en el cerrado dorsal (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997a; Affolter et al., 2001). Dpp se une a sus receptores de membrana tipo I y tipo II, codificados por los genes *thickveins* (*tkv*) y *punt* (*put*) respectivamente, induciendo la fosforilación de los productos proteicos de los genes *mothers against dpp* (*mad*) y *medea* (*med*). Mad y Med son miembros de los factores de transcripción de la familia de las SMAD que forman un heterodímero que se transloca al núcleo e induce la expresión de genes blanco (Affolter et al., 2001).

Las mutaciones en *dpp* ocasionan fenotipos letales anteriores al cerrado dorsal debido a la participación de este gen en el establecimiento del eje dorsal-ventral, pero mutaciones en *tkv* y *pnt* resultan con fenotipos letales embrionarios similares a los que presentan los mutantes de *schnurri* (*shn*). Shn es una proteína nuclear con dedos de zinc que parece ser un cofactor tejido-específico importante para el cerrado dorsal (Affolter et al., 2001). Además, se rescata parcialmente el fenotipo de los embriones mutantes de genes de la vía

de la JNK cuando se expresa una versión del receptor de Dpp activado de manera permanente (Tkv^{QD}) (Affolter et al., 1994; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b).

2.3. El citoesqueleto y su función en el cerrado dorsal

Además de los genes que codifican a componentes de las vías de señalización, en el cerrado dorsal también se requieren cambios directos en el citoesqueleto. Estos cambios en el citoesqueleto son indispensables para el cambio de forma celular (Alberts et al., 2015). El citoesqueleto, por lo tanto, es el actor final en el que recae muchas veces la función de esta señalización. Para su estudio, el cerrado dorsal se ha dividido mecánicamente en dos pasos: la convergencia y el sellado (“zipping” en inglés). Durante la convergencia, las dos placas epiteliales que yacen a los lados del embrión se estiran hasta alcanzarse y tocarse en la línea media dorsal. Una vez que las placas se encuentran una frente a otra, se establecen las conexiones necesarias para unir a los epitelios. El “zipping” ocurre al inicio en los extremos (cantos) anterior y posterior de la apertura (Jankovics y Brunner, 2006).

Antes de que el cerrado dorsal se inicie, las células de la amnioserosa se contraen y se expanden de manera pulsada en su superficie apical. Estas pulsaciones se mantienen en la amnioserosa en el inicio y durante el cerrado dorsal (Solon et al., 2009; Blanchard et al., 2010). En este proceso se ensambla primeramente un anillo formado por cables de actina y miosina en la periferia de la apertura, en la parte apical de las células más dorsales. Se piensa que este anillo de actina-miosina genera una parte de la fuerza de tensión necesaria para realizar la convergencia de los epitelios laterales; sin embargo, esta fuerza actúa de manera perpendicular a la dirección de cierre (Kiehart et al., 2000). Un modelo que acopla esta fuerza en la dirección correcta es el que se propone al cable de actina-miosina como el sistema de cierre de una bolsa de jareta, con una participación pasiva de las células de la amnioserosa. Otro modelo propone al cable de actina-miosina como un trinquete. En este modelo las pulsaciones de las células de la amnioserosa al inicio del cerrado dorsal están descoordinadas, después las pulsaciones de estas células se acoplan para jalar y empujar en conjunto a los dos epitelios contralaterales. El cable de actina-miosina perpendicular al cerrado se va engrosando y aumentando su fuerza de contracción, para evitar que el epitelio lateral se regrese una vez que ha avanzado en dirección dorsal (Solon et al., 2009).

Además, un pequeño porcentaje de células de la amnioserosa de la parte central se delamina y muere por apoptosis, lo que reduce la superficie apical total de la amnioserosa, generando fuerzas mecánicas que contribuyen al cerrado (Toyama et al., 2008). La polimerización de los cables de actina está regulada por la vía de la JNK, a través de *chic* (Homsy et al., 2006). Actualmente se sabe que la amnioserosa es crítica para el cerrado dorsal (Pasakarnis et al., 2016).

El citoesqueleto conformado por microtúbulos también desempeña un papel importante. Los microtúbulos se polimerizan inicialmente en las células de la hilera guía y después en las células más ventrales del epitelio lateral. Estos microtúbulos se polimerizan en manojos orientados de forma antiparalela alineados con el eje dorsoventral y son necesarios para que se lleve a cabo el “zipping” (Jankovics y Brunner, 2006). Los embriones mutantes de *tkv* presentan un patrón de expresión alterado de los microtúbulos. En esta mutante los microtúbulos no presentan una orientación dorsal-ventral y algunos se encuentran entre la interfase de las células de la hilera guía con la amnioserosa en posición anterior-posterior, cuando en embriones silvestres esto no ocurre (García-Fernandez et al., 2007). Las uniones adherentes que se encuentran entre la amnioserosa y el epitelio lateral también sufren una remodelación dinámica, que es necesaria para llevar a cabo el “zipping” (Gorfinkiel y Martínez-Arias, 2007).

Mutantes en *Djun*, *bsk* y *slpr* exhiben tres defectos comunes durante el cerrado dorsal: ausencia en la formación y contracción del cable de actina, disminución en el “zipping” y pérdida de las uniones entre la amnioserosa y el epitelio lateral (Homsy et al., 2006).

3. El cerrado torácico

El cerrado torácico es un proceso que ocurre durante la metamorfosis de *Drosophila* y que se ha equiparado con el cerrado dorsal debido a que presentan características similares. Una vez que se ha formado el embrión y eclosiona como larva de primer estadio, se forman conjuntos de células llamados “discos imagales”. Los discos imagales son células epiteliales de las que se derivarán estructuras del organismo adulto como la cabeza, las alas y las extremidades durante la metamorfosis. La larva pasa por tres diferentes estadios antes de

formar la pupa, en donde la mayoría de sus tejidos se histolizan. Durante los estadios larvarios las células que conforman los discos imagales proliferan, teniendo su mayor actividad durante la metamorfosis para formar *de novo* las estructuras del organismo adulto (imago).

El “notum” conforma la parte dorsal del tórax adulto y deriva de los discos imagales de alas. Estos discos están compuestos por tres partes principalmente: el epitelio columnar, la membrana peripodial y la región del tallo peripodial. El epitelio columnar forma la mayor parte del disco y la membrana peripodial es un epitelio escamoso de células planas con un núcleo prominente, que recubre al disco en un lado. La región del tallo peripodial mantiene unido el disco a la epidermis de la larva.

El cerrado torácico es un proceso en el cual los dos discos de alas migran hacia la parte dorsal en el pupario, se aproximan y se unen en la línea media dorsal para formar un tejido continuo. Para su estudio, el cerrado torácico se ha subdividido en cuatro pasos: eversión del epitelio del disco imagal en la región del tallo, migración de los discos hacia la parte dorsal, cambio de forma de las células epiteliales hacia la línea media dorsal, y fusión de los dos “heminota” (Kockel et al., 2001).

3.1. La vía de la JNK y *dpp* en el cerrado torácico

Muchos estudios han demostrado la participación de la vía de la JNK en el cerrado torácico. Mutaciones cigóticas de *hep* (*hep*¹) presentan fenotipos de malformación del tórax, específicamente una división de las dos partes del notum en la línea media dorsal. Este fenotipo mutante es conocido como tórax hendido (Fig. 2). A su vez, organismos homocigotos mutantes para *Dfos* rescatados con la construcción silvestre de *Dfos* expresada con un promotor de ectodermo (*69B*) con el sistema UAS-Gal4, sobreviven al desarrollo embrionario, pero presentan alteraciones en la formación del tórax (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b; Zeitlinger et al., 1997) (Fig. 2B). Un fenotipo más dramático, pero menos frecuente es la delección de una parte del notum, debido a la no migración de uno de los discos de ala hacia la parte dorsal en los mutantes cigóticos de *hep* (Fig.2A).

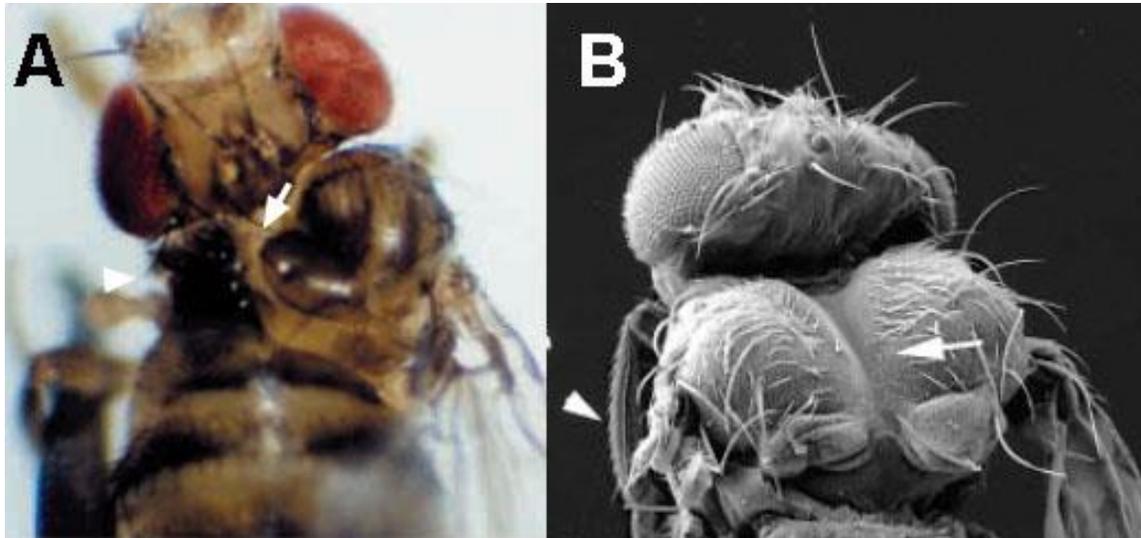


Figura 2. El fenotipo de la hendidura torácica de *hep* y *Dfos*. Los organismos homocigotos mutantes de *hep* (*hep*¹) presentan un surco en el tórax como resultado de un mal cerrado torácico (A), al igual que los organismos con la combinación heteroalélica mutante de *Dfos* (*kay*¹/*kay*²) rescatados de la embriogénesis con una construcción silvestre de *Dfos* (regulada con el sistema UAS-Gal4 en el ectodermo) (B). La flecha señala el surco y la punta de flecha la alteración en la formación del ala. Imágenes tomadas de Agnes et al. (1999) (A); y Riesgo-Escovar y Hafen (1997b) (B).

Otra evidencia de la participación de la vía de la JNK en el cerrado torácico es la expresión de *puc* en las células marginales de la membrana peripodial y el epitelio columnar que conforma el disco de ala. Estas células marcadas por la expresión de *puc* han sido equiparadas con las células de la hilera guía en pupas silvestres. Esta expresión de *puc* se pierde en organismos mutantes de *hep* (Agnes et al., 1999).

4. El ojo compuesto

Al igual que el cerrado torácico, la formación del ojo del imago es un modelo muy importante para el estudio de la participación y la caracterización de diferentes vías de transducción de señales. Particularmente, ha servido para la disección genética de la vía de las MAPK que involucra a receptores con actividad de tirosina cinasa y a proteínas Ras (RTK-Ras) de tipo clásica. Especialmente se han realizado muchos estudios sobre los efectos de proliferación y diferenciación de esta vía (Kockel et al., 2001). La morfología externa y el arreglo citoarquitectónico que presenta el ojo compuesto del organismo adulto hace

asequible la detección de alteraciones en su desarrollo (Fig. 3). En este apartado haremos una descripción de la citoarquitectura del ojo compuesto para poder entenderlo mejor.

Externamente el ojo está compuesto por aproximadamente 750 omatidios (Fig. 3A). Un omatidio es la unidad funcional del ojo compuesto, que cuenta con 8 células fotorreceptoras y células accesorias. Dentro de las células accesorias hay células pigmentarias primarias, células pigmentarias secundarias, células pigmentarias terciarias, células del cono y las células que conforman mecanorreceptores (o quetas). La disposición de todas estas células en el omatidio es en forma de empalizada con las células fotorreceptoras (R1-R8) dentro de un hexágono. Las células fotorreceptoras proyectan sus organelos fotosensibles, prolongaciones de membrana especializada o rabdómeros hacia el centro. Las membranas que conforman los rabdómeros contienen las opsinas necesarias para captar la luz (Fig. 3B y C). Las células pigmentarias secundarias rodean a los fotorreceptores a los lados del polígono; las células pigmentarias terciarias se encuentran en tres de los vértices del hexágono; y las células de las quetas en los tres vértices restantes espaciando a las células pigmentarias terciarias. Dos células pigmentarias primarias se encuentran rodeando a las cuatro células del cono en la parte más distal del omatidio. Las células del cono proyectan sus prolongaciones de membrana desde la parte distal del omatidio hasta la membrana fenestrada en la parte más proximal, por donde cruzan los axones de las células fotorreceptoras (Fig. 3C). Los rabdómeros (ópticamente más densos) se agrupan para la formación de un trapecio irregular con R1, R3, R5 y R6 en los vértices; R7 en el centro del polígono en la parte más distal y R8 en la parte más proximal. Todos los omatidios se agrupan unidos por sus células pigmentarias secundarias para formar un arreglo cristalino que se asemeja a un panal de abejas (Fig. 3B) (Wolff y Ready, 1993).

No se han encontrado datos acerca de la participación de *Djun* ni de *bsk* (Riesgo-Escovar et al. 1996; Riesgo-Escovar y Hafen 1997a) en la formación del ojo; sin embargo, se ha documentado la participación de otros miembros de la vía de la JNK en el ojo (Riesgo-Escovar, datos no publicados). *msh* fue originalmente aislado como un gen que participa en la formación del ojo; de hecho, su nombre deriva del fenotipo de fotorreceptores mal formados en clones de células de ojo homocigotos mutantes para *msn* (Su et al., 1998).

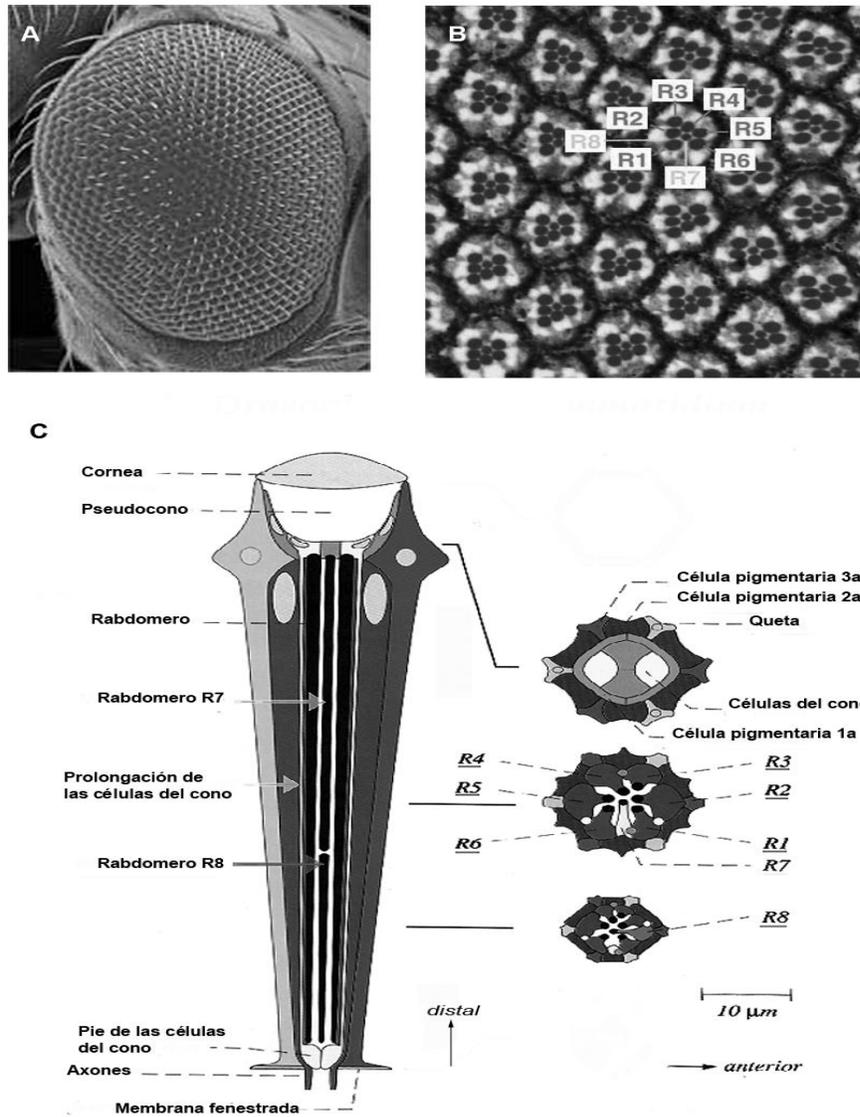


Figura 3. El ojo compuesto del imago de *Drosophila*. A) El ojo está compuesto por aproximadamente 750 omatidios. B) Cada omatidio está formado por ocho células fotorreceptoras (R1-R8) y células accesorias agrupadas conformando un hexágono. Estos omatidios se arreglan formando un conjunto casi cristalino. C) Esquema de un omatidio que evidencia las diferentes células que lo conforman, con los rabdómeros de las células fotorreceptoras proyectando hacia el centro. Imagen modificada de Wolff y Ready (1993).

5. El gen *piragua* (*prg*)

piragua (*prg*) es un locus vital no caracterizado (FBgn0029173, en la base de datos de *Drosophila*). El nombre de "*piragua*" se debe a la apariencia física de las cutículas de los

embriones mutantes, las cuales se asemejan a este tipo de embarcación al igual que otros genes mutantes con fenotipo de apertura dorsal (Nazario-Yepiz, 2006).

5.1. El locus

prg está mapeado en la región 29D1, en el brazo izquierdo del cromosoma 2 (Fig. 4A), en la región genómica: 2L: 8,464,488 - 8,466,694 de la cadena "+", y está reportado en la base de datos de *Drosophila* con el símbolo *Dmel/CG9233*. *prg* también es conocido en esta base de datos con la denominación *fu2* y tiene un tamaño de 2207 pb ("pb" por pares de bases). Este gen codifica teóricamente a dos transcritos de tamaños: 2149 pb y 1984 pb que difieren únicamente en la longitud de su secuencia 3' UTR (UTR es el acrónimo del inglés "untranslated region" que significa 3' no traducible).

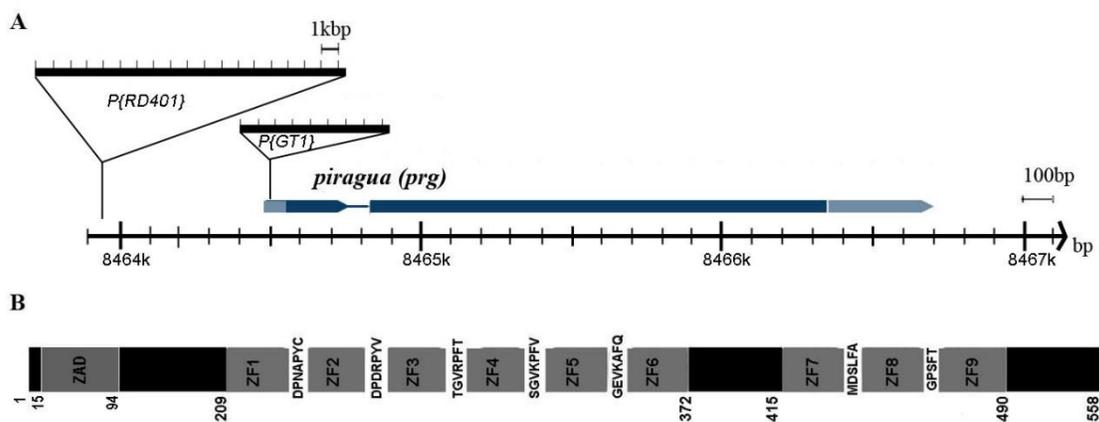


Figura 4.- Esquema de la región genómica de *prg* y de su proteína predicha. A) El gen *prg* tiene un tamaño de 2207pb, contiene dos exones (rectángulos azules) y un intrón (línea azul). El marco de lectura abierto está marcado con azul marino y la secuencia 5'-UTR y 3'-UTR en azul claro. Los elementos P que están insertados en las dos cepas que se usaron para generar los alelos mutantes por escisión están representados como triángulos. El elemento *P{RD401}* (18.5kb) se encuentra en la región intergénica río arriba de *prg*. El elemento *P{GT1}* (8.5kb) se encuentra insertado en la secuencia 5'-UTR. B) La proteína Prg contiene nueve motivos de dedos de Zn de tipo C2H2 (ZF en la figura), localizados en las posiciones: 210-231, 238-260, 268-288, 296-316, 324-344, 352-372, 416-436, 443-464, 470-490 (marcados con rectángulos grises), ubicados en dos "clusters". El primer "cluster" agrupa seis ZFs que están arreglados en tándem y se encuentran separados del segundo "cluster" de tres ZFs por 43 aa. Cada ZF en cada "cluster" se encuentra separado del siguiente ZF por la secuencia "linker" (la secuencia de aminoácidos marcada en código de una letra). Prg contiene además un dominio C4DM o ZAD de la posición 15 a 94.

5.2. Prg y las proteínas con dedos de zinc

Ya que la secuencia predicha de Prg presenta nueve dominios ZF-C2H2 y un dominio ZAD, en este apartado hablaremos más acerca de estas características en las proteínas. Cada dominio ZF-C2H2 contiene 25 a 30 aminoácidos que constituyen dos láminas- β y una α -hélice arregladas de manera antiparalela. En el dominio ZF-C2H2 dos cisteínas y dos histidinas son aminoácidos clave para unir al Zn^{2+} en enlaces coordinados y así proyectar este dominio a manera de un dígito (Razin et al., 2012). Los dominios ZF-C2H2 actúan de manera modular al unirse a una secuencia específica en el ADN. Típicamente, cada dominio puede unirse a tres nucleótidos consecutivos a través de tres aminoácidos presentes en la posición -1, +3 y +6 relativas al inicio de la α -hélice; la punta del dedo interactúa con el surco mayor del ADN (Stubbs et al., 2011).

Los dominios ZF-C2H2 en Prg se encuentran arreglados en tándem en dos aglomerados como se ha visto en este tipo de proteínas con múltiples dedos de zinc (Krystel, 2012). El primer aglomerado contiene seis ZFs y se encuentra separado del segundo aglomerado de tres ZFs por 43 aminoácidos. Usualmente, los dominios ZF-C2H2 se encuentran separados dentro de los aglomerados por una secuencia "linker" canónica TGEKP(Y/F) (Stubbs et al., 2011), pero en Prg los ZFs dentro de los aglomerados se encuentran separados por secuencias no canónicas (Fig. 4B).

Muchas de las proteínas con múltiples dominios ZF-C2H2 en vertebrados tienen además algunos dominios asociados en la región N-terminal que se han conservado evolutivamente. Los dominios que se han reportado incluyen a: KRAB (del inglés "Kruppel Associated Box"), BTB/POZ (por el nombre en inglés del tipo de proteínas que contienen este dominio "Broad-complex, Tram track and Bric-a-brac"/"Poxvirus and Zinc finger"), ZAD y SCAN. La estructura tradicional de los factores de transcripción presenta dos regiones clave: un dominio de unión al ADN (DBD, del inglés "DNA Binding Domain") y un dominio efector. Se cree que los múltiples dedos de zinc, presentes en la región C-terminal pueden ser el dominio DBD y el dominio asociado a la región N-terminal podría ser el dominio efector (Krystel, 2012). El dominio KRAB es uno de los dominios asociados presentes en la mayoría de las proteínas ZF-C2H2 de humanos. Este dominio KRAB en esta familia de

factores de transcripción sirve para unir a la proteína KAP1. KAP1 a su vez puede atraer al complejo NURD (necesario para la remodelación de la cromatina y desacetilación de histonas) o a la metilasa de histonas SETDB1 (Razin et al., 2012). Un dominio homólogo a KRAB en las proteínas que contienen ZF-C2H2 en *Drosophila* es el dominio ZAD, también conocido como dominio C4DM. El dominio ZAD también puede unir Zn^{2+} pero forma una estructura en forma de trébol a través de cuatro cisteínas. Este dominio ZAD está presente en aproximadamente un tercio de todas las proteínas que contienen ZFs en *Drosophila* (Chung et al. 2002) de manera similar a KRAB en vertebrados (Krystel, 2012). Prg contiene un dominio ZAD en la parte N-terminal (Fig. 4B) (Gramates et al., 2016).

5.3. Los alelos mutantes de *prg*

En el laboratorio generamos moscas mutantes de *prg* por medio de la escisión de un elemento P, uno de los transposones más usados en *Drosophila* para hacer mutagénesis (Bellen et al., 2004). El mecanismo de escisión de elementos P involucra un rompimiento de doble cadena de ADN en el cromosoma y la posterior reparación. Se han reportado los dos mecanismos de reparación de ruptura de ADN de doble cadena en la escisión: reparación por “recombinación homologa” (HR del inglés “Homologous Recombination”) y reparación por “unión de extremos no homólogos” del mismo cromosoma (NHEJ del inglés “Non Homologous End Joining”) (Johnson-Schlitz y Engels, 1993; Weinert et al., 2005). Una reparación deficiente genera lo que se considera una escisión imprecisa. Usamos una cepa de *Drosophila* que contenía al elemento *P{RD401}* río arriba del locus *prg*. La escisión imprecisa generó a cuatro cepas mutantes y pensamos que se afectó a un gen aledaño al sitio original de la inserción de este elemento P (Araceli Gómez et al., datos no publicados del laboratorio). Los cuatro alelos mutantes de *prg* obtenidos en este tamizaje (*prg*⁸, *prg*¹⁰, *prg*³¹ y *prg*³²) son recesivos letales embrionarios, pero contienen una mutación de fondo de un gen importante en el desarrollo que nos impide mostrar de manera limpia el fenotipo real de *piragua*. Contamos con otra línea con un elemento P insertado dentro de *prg*, conocida como *P{GT1}fu2^{BG02741}*, la llamaremos de aquí en adelante como *P{GT1}*. Este elemento P está insertado en la región 5' UTR de *prg* (región 5' no traducible). Las

inserciones de estos elementos P en *prg* produjeron alelos que no son letales, sin embargo, los alelos generados a partir de su escisión si producen letalidad.

5.4. La expresión de *prg* durante el desarrollo embrionario

Nosotros contamos con el ADN complementario (cADN) de *prg* (clona RE69756) obtenido de la colección del “Proyecto del Genoma de *Drosophila* de Berkeley” (BDGP por sus siglas en inglés). También se cuenta con un antisuero generado en ratas a partir de una proteína recombinante producida con este mismo cADN, para los primeros 400 aa de la proteína (datos no publicados del laboratorio). Con la ayuda de estas herramientas se pudo estudiar el patrón de expresión de *prg* durante el desarrollo (Fig. 5).

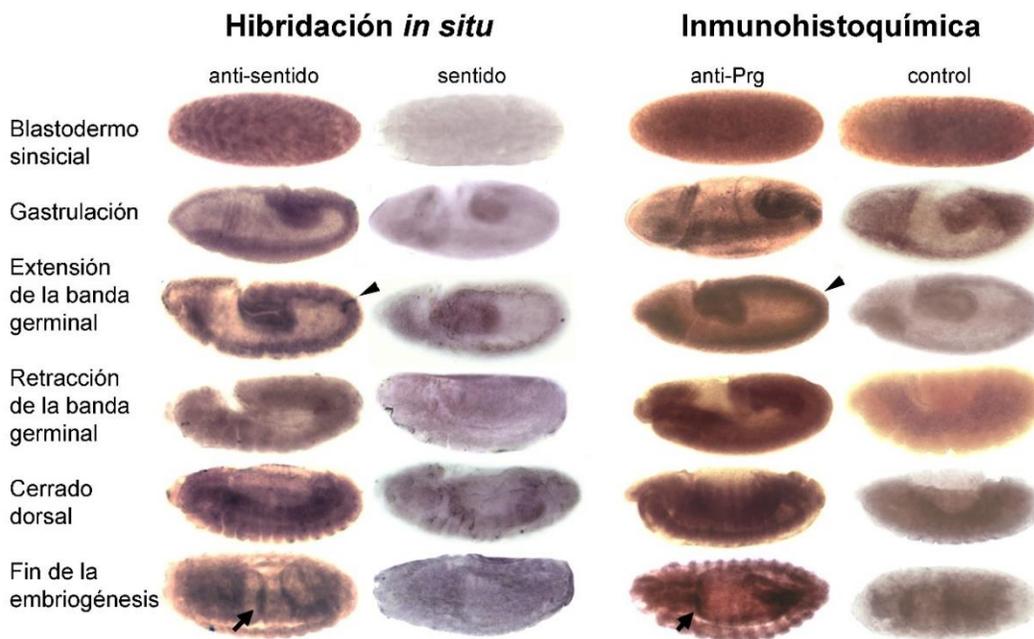


Figura 5.- Hibridación *in situ* e inmunohistoquímica de *prg*. Tanto el transcrito (izquierda) como la proteína (derecha) se correlacionan durante la embriogénesis. *prg* se expresa en etapas tempranas antes de la celularización (blastodermo sinsicial), así como en la banda germinal (puntas de flecha) durante su extensión y durante la gastrulación. Además, *prg* está presente en el epitelio lateral durante la retracción de la banda germinal y el cerrado dorsal. Finalmente, *prg* se expresa en el intestino medio al término de la embriogénesis (flecha). Los embriones están orientados en una vista lateral a excepción del embrión que está al final de la primera columna. Los controles para los experimentos de la hibridación *in situ* son embriones incubados con la sonda sentido y para la inmunohistoquímica son embriones que solo se incubaron con el anticuerpo secundario. La tinción se llevó a cabo por un método enzimático, usando fosfatasa alcalina (conjugada con anti-dig para el transcrito y conjugada con el anticuerpo anti-rata para la proteína) y NBT-BCIP como sustrato.

Tanto el transcrito como la proteína codificados por el gen *prg*, ARN mensajero (mARN) y Prg respectivamente, se expresan en etapas tempranas del desarrollo. Se observa la presencia del mARN y de Prg en etapas del desarrollo anteriores a la celularización del embrión (etapa en donde aún no se da la activación de los primeros genes cigóticos). Esto implica que hay contribución materna del mARN y de la proteína (Fig. 5). Después, se observa expresión en los primordios de dos capas germinales: el ectodermo y el mesodermo, las cuales forman la llamada banda germinal en la gastrulación. Durante la extensión-retracción de la banda germinal, *prg* permanece en este tejido. El epitelio que cubre el embrión y que participa activamente en el cerrado se deriva del ectodermo; *prg* se expresa de manera importante en este tejido (epitelio lateral) y durante este proceso. Además, *prg* se expresa en el endodermo que se invagina en la parte anterior y posterior, y del cual deriva el intestino medio, tejido en el que también se expresa *prg* durante la organogénesis.

Las pruebas de interacciones genéticas de los alelos *prg*¹⁰ y *prg*³² sugieren que *prg* podría participar en la vía de JNK y en una vía alterna durante el cerrado dorsal. Estos datos sugieren que *prg* interacciona con *Djun* y *Dfos* (Nazario-Yepiz, 2006). Pruebas de complementación de los alelos de *prg* con la deficiencia *Df(2L)N22-5*, que contiene la región genómica de *prg* en la parte deletada, demuestran que el fenotipo de apertura dorsal de *prg* se hace más acusado, produciendo un hoyo en la parte media dorsal que se extiende hasta la parte anterior, lo que implica que los alelos mutantes probados son hipomorfos. Estas mismas pruebas muestran que las cutículas de los embriones mutantes revelan problemas en otras etapas del desarrollo embrionario. Estos datos y la contribución materna sugieren que *prg* participa en etapas tempranas en el desarrollo. Aun cuando la vía de la JNK en *Drosophila* ha sido ampliamente estudiada, no se conocen todos los genes que participan en la misma. Por esta razón pensamos que *prg* podría ser un gen que pertenece a esta vía, actuando en el cerrado dorsal además de participar en otra vía paralela en este mismo proceso, como resultado de su posible función en etapas más tempranas en el desarrollo.

5.5. *prg* en la competencia celular y el desarrollo de estructuras imagales

La competencia celular es un proceso de selección entre células con diferentes índices de proliferación y se describió desde muchos años atrás en los discos imagales de *Drosophila* (Morata y Ripoll, 1975; Casas-Tinto et al., 2011). En estos experimentos se analizaron mutantes que presentaron fenotipos relacionados con un problema de crecimiento y proliferación. Los primeros análisis se hicieron de los organismos mosaicos genéticos de los genes que codifican a proteínas ribosomales (conocidos como *Minute*) por medio de la recombinación mitótica inducida (Morata y Ripoll, 1975) (para mayor detalle ver el Anexo I). Además, la generación de mosaicos genéticos de un alelo hipomorfo de *dmyc*, un factor de transcripción necesario para la proliferación y homólogo al proto-oncogen *c-myc*, hizo evidente que estos genes son críticos en este proceso de competencia celular (Moreno y Basler, 2004).

Se piensa que las células mejor adecuadas incorporan grandes cantidades de factores de sobrevivencia y moléculas de señalización, que se traduce en un código de sobrevivencia. Las células “ganadoras” son capaces de medir los niveles de señalización de sus vecinas y envían señales secretadas extracelularmente para matar a las células “perdedoras” o células de crecimiento lento (Rhiner y Moreno, 2009).

En un tamizaje genético diseñado para encontrar genes que participan en la competencia celular se encontró que los niveles de *prg* están incrementados en las “células perdedoras”. En este experimento se midió la expresión de *prg* por medio de microarreglos. Además, la reducción de la expresión de *prg* en estas “células perdedoras” a través del uso del ARN de interferencia (ARNi) demostró que este gen es necesario para la apoptosis de dichas células. Es interesante ver que solamente *prg* codifica a un factor de transcripción entre los seis genes que se detectaron en este estudio y los otros cinco genes codifican a proteínas de membrana (Rhiner et al., 2010).

Asimismo, *prg* fue detectado en un tamizaje genético diseñado para buscar genes que se requieren en la formación del tórax adulto. Estos experimentos mostraron que la expresión del ARNi de *prg* en la región dorso-medial provoca tórax hendido (no reportado en la clasificación), la pérdida de quetas y la deficiencia de pigmentación. Los experimentos

se realizaron con dos cepas transgénicas reguladas bajo secuencias UAS y con una línea *pnr-Gal4* (*pnr^{MD237}*) (para mayor detalle del sistema UAS-Gal4 ver el Anexo I). Además, en estos mismos experimentos se observó la muerte de organismos en la etapa de pupa (Mummery-Widmer et al., 2009).

En este trabajo, con base en los antecedentes presentados, se generaron nuevos alelos mutantes de *prg*, a partir de la escisión del elemento *P{GT1}*, y se caracterizaron estos alelos genética y molecularmente. Se estudiaron las funciones de *prg* en el desarrollo del organismo y la relación de *prg* con genes que pertenecen a la vía de JNK y otros genes que participan en el desarrollo de *Drosophila* y que pertenecen a otras vías de señalización.

HIPÓTESIS

piragua es un gen pleiotrópico que participa en diferentes etapas del desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*, así como en la formación del tórax y el ojo compuesto durante la metamorfosis.

OBJETIVOS

- Generar nuevos alelos mutantes de *prg* por medio de la escisión imprecisa del elemento *P{GT1}*.
- Caracterizar fenotípica y molecularmente los nuevos alelos de *prg*.
- Medir el nivel de expresión del transcrito de los alelos mutantes de *prg* por medio de la RT-PCR semicuantitativa.
- Rescatar la función de *prg* en los alelos mutantes por medio de la transformación con una construcción silvestre del gen *Dmel/CG9233*.
- Estudiar la participación de *prg* en etapas anteriores al cerrado dorsal al eliminar la contribución materna.
- Conocer si *prg* participa en la formación del tórax y el ojo del organismo adulto con el estudio de clones mutantes en mosaicos genéticos de estas estructuras.

DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Generar nuevos alelos mutantes por medio de la escisión del elemento *P{GT1}*.
2. Caracterizar el periodo fenocrítico de *prg* por medio del análisis del fenotipo mutante embrionario de los alelos de *prg* examinando las cutículas.
3. Caracterizar molecularmente los diferentes alelos mutantes de *prg* por medio de la amplificación por PCR y la secuenciación de los amplicones generados.
4. Rescatar la función de *prg* con una construcción silvestre del gen *Dmel/CG9233* en los fondos mutantes.
5. Estudiar la dinámica del cerrado dorsal en embriones silvestres y mutantes para *prg* y *bsk*, analizando videos de lapsos de tiempo con microscopía confocal de alta resolución.
6. Estudiar la participación de *prg* con la vía JNK en el cerrado dorsal, realizando interacciones genéticas con *Djun*, *Dfos* y *bsk*.
7. Estudiar la participación de *prg* con otros genes del desarrollo, por medio de interacciones genéticas.
8. Estudiar el efecto de eliminar la contribución materna, al generar clones mutantes de línea germinal por recombinación mitótica inducida.
9. Estudiar la participación de *prg* en la formación del tórax y el ojo compuesto, al generar clones mutantes en discos imagales por recombinación mitótica inducida.
10. Estudiar el defecto en las estructuras adultas por medio de la microscopía electrónica de barrido y/o cortes histológicos.

MÉTODOS

1. Generación de nuevos alelos mutantes

Los alelos generados a partir de la línea *P{RD401}* (regalo del doctor Ronald Davis de “The Scripps Research Institute” en Florida, USA) presentan el marcador *Sternopleural (Sp)*. *Sp* es un alelo mutante de *wingless (wg)* (Neumann y Cohen, 1996) que genera quetas extras en el área esterno-pleural del adulto y está localizado en el cromosoma 2 (Lindsley y Zimm, 1992) al igual que *prg*. *wg* es un gen muy importante en el desarrollo embrionario y no podríamos descartar la influencia de la mutación de este gen en el fenotipo de los alelos de *prg*. Por lo tanto, tratamos de quitar *Sp* del fondo genético de las líneas con los alelos de *prg* por medio de recombinación, pero está muy cercano al *locus* de *prg* y no lo logramos. Aunque en el análisis de cutículas de las cruzas *Sp/+* con *Sp/+* no se encontraron problemas en el cerrado dorsal, estos alelos no los usaremos más en nuestro análisis.

La línea *P{GT1}fu2^{BG02741}* (con numero de stock de Bloomington #12822) y que nombramos abreviadamente como *P{GT1}*, contiene un elemento P insertado en la región promotora de *prg*. Nosotros generamos tres nuevos alelos mutantes por medio de escisiones de este elemento P, ya que esta línea a pesar de presentar la inserción a 18 pb del sitio de inicio de la transcripción es semi-viable. Cruzamos moscas de la línea *P{GT1}* con moscas que contenían en su genoma la secuencia que codifica para la forma activa de la transposasa del elemento P. Esta enzima cataliza la escisión del elemento P, uniéndose a los extremos 5' y 3' que presentan secuencias IRS (del inglés Inverted Repeat Sequences). Seleccionamos hembras que heredaron la fuente de transposasa y la inserción del elemento P. Al expresarse la transposasa en la línea germinal de hembras que poseen la inserción del elemento P, se pueden generar gametos en los que se haya escindido este elemento. Se cruzaron moscas de la descendencia de manera independiente con moscas balanceadoras (contienen un cromosoma balanceador). Se cruzaron después moscas hermanas para generar líneas independientes (balanceadas) con la posible alteración. El producto de la escisión de este elemento P puede ocasionar que el genoma se reconstituya de manera normal o generar alteraciones en el mismo. Separamos y caracterizamos las líneas que

presentaron el fenotipo de interés mediante un tamizaje genético y así obtuvimos los alelos: *prg*¹, *prg*² y *prg*³.

2. Las líneas utilizadas

2.1 ARNi de *prg*

Contamos con cuatro líneas transgénicas que expresan el ARNi de *prg* regulado bajo el sistema UAS-Gal4. Usamos dos cepas que fueron obtenidas del NIG-FLY (del inglés National Institute of Genomics Fly Stock Center) de Japón y que nombramos en este estudio como: UAS-*prg*^{R1} (#9233R-1) y UAS-*prg*^{R3} (#9233R-3). También, usamos dos cepas del VDRC (del inglés Vienna Drosophila RNAi Center) que nombramos como: UAS-*prg*^{R2} (#19805) y UAS-*prg*^{R4} (#19804) (Dietzl et al., 2007) (Fig. 6).

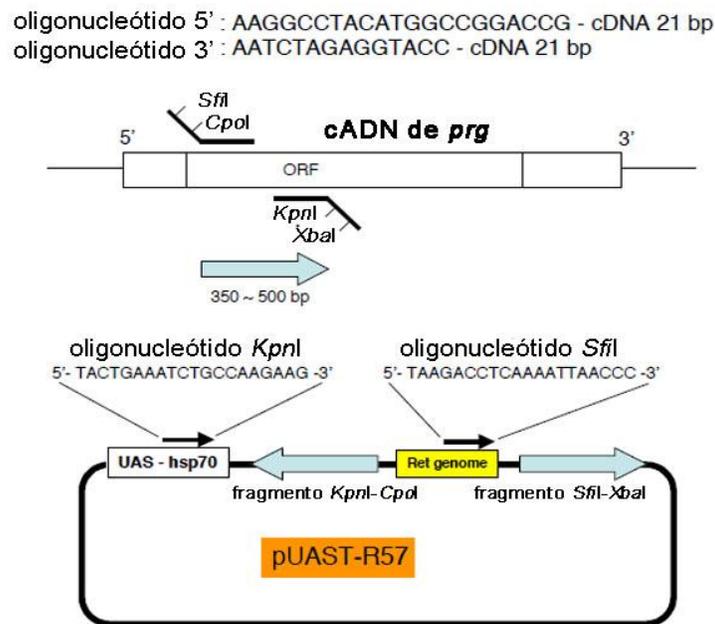


Figura 6.- La construcción que expresa el ARN de doble cadena en las líneas del ARNi de *prg*. Las cuatro líneas transgénicas que expresan el ARNi de *prg* contienen una construcción que expresa ARN de doble cadena de la región 5' de ~500 pb del respectivo cADN regulada por el sistema UAS-Gal4. Un fragmento de la región 5' del cADN se generó con un oligonucleótido al que se le adicionó la secuencia de restricción de la enzima *KpnI* y otro con la secuencia de restricción de la enzima *CpoI*. Otro fragmento de esta misma región, pero con la secuencia invertida se generó con un oligonucleótido que contenía el sitio de restricción para la enzima *SfiI* y un oligonucleótido con la secuencia de restricción para la enzima *XbaI*, para poder ser sub-clonados en el vector pUAST-R57(arriba). Imagen modificada de (National Institute of Genome, 2017).

En estas líneas, un fragmento de la región 5' del cADN de *prg* está insertado dos veces (un fragmento en sentido invertido con respecto al otro) en el vector pUAST-R57, y esto genera ARN de doble cadena de ~500 pb regulado por la secuencia UAS (Fig. 6).

2.2 Las líneas transgénicas del rescate de *prg*

Las líneas transgénicas que utilizamos para el rescate fueron generadas con una construcción silvestre de *prg*, usando el cADN RE69756 del Berkeley *Drosophila* Genome Project (Stapleton et al., 2002), digerido con las enzimas de restricción *Not1-Kpn1*, clonado en un vector pUAST por técnicas de clonación estándar (Sambrook et al., 1989). Se secuenció el plásmido para observar que estuviera el inserto en la orientación correcta. Esta construcción fue inyectada en embriones y moscas transgénicas fueron seleccionadas por Genetic Services, Inc..

Se mapearon las inserciones independientes de 10 líneas transgénicas que contienen la construcción de rescate del gen *prg* (UAS-*prg*^{C1}-UAS-*prg*^{C10}). La construcción de rescate con *prg* silvestre en las líneas UAS-*prg*^{C1} y UAS-*prg*^{C3} se encuentra en el cromosoma 1. La construcción de rescate en las líneas UAS-*prg*^{C4}, UAS-*prg*^{C6}, UAS-*prg*^{C8} y UAS-*prg*^{C9} está en el cromosoma 2. Finalmente, la construcción de rescate en las líneas UAS-*prg*^{C2}, UAS-*prg*^{C5}, UAS-*prg*^{C7} y UAS-*prg*^{C10} se encuentra en el cromosoma 3.

Se empleó la línea *69B-Gal4* para activar las líneas UAS-rescate y UAS-ARNi específicamente en el ectodermo. Las líneas *act-Gal4* y *hs-Gal4* se usaron para activar a las líneas UAS en el embrión completo. La construcción de rescate UAS-*prg*^{C1} y *hs-Gal4* fueron cruzadas en un fondo mutante de *prg*: UAS-*prg*^{C1}; *prg*³/*CyO* y *prg*³/*CyO*; *hs-Gal4* (para mayor detalle de la nomenclatura de *Drosophila* ver el Anexo I). Estas dos líneas se cruzaron entonces y los embriones de la descendencia fueron recolectados por dos horas y se les permitió desarrollarse por 10 horas. Después recibieron un choque térmico en una incubadora a 37°C por 1 hora y 30 minutos.

Se usó también *act-Gal4* recombinado en el mismo cromosoma del alelo *prg*³ (*act-Gal4*, *prg*³/*CyO*) para rescatar el fenotipo con la línea UAS-*prg*^{C1}; *prg*³/*CyO*. Se sabe que el sistema

UAS-Gal4 puede ser dependiente de temperatura y un exceso en la expresión de un gen silvestre también puede ser letal, por eso se probó el rescate con este promotor a tres diferentes temperaturas: 18°C, 21°C y 25°C.

2.3 Las líneas mutantes para las interacciones génicas

Para las pruebas de interacción génica se usaron los siguientes alelos: *kay*¹ (*Dfos*), *jun*^{A109} (*Djun*) y *ush*^{E6} (*ush*). Los tres son alelos nulos (Cubadda et al., 1997; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997a; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b); en cambio se usó *bsk*² que es un alelo hipomorfo (Riesgo-Escovar et al., 1996). *pu*^{E69} es un alelo con falta de función también hipomorfo, que contiene el gen *lacZ* como un gen reportero y que ha sido utilizado para evidenciar la activación de la JNK (Ring y Martínez-Arias, 1993). *hs-jun*^{ACT} codifica para una forma activada de Jun de vertebrados que contiene residuos acídicos en los sitios de fosforilación (Treier et al., 1995). *ppo*³ es un alelo letal, generado a partir de la escisión imprecisa de un elemento P (Peña-Rangel et al., 2002). Todas las moscas fueron crecidas a 25°C bajo condiciones estándar. Los balanceadores (*FM7C*, *CyO*, *SM6B*, *TM3*, *TM6B* y *MKRS*) y marcadores (*Sp*, *Bc*, *br*, *Gla* y *Ki*) usados están descritos en la base de datos de *Drosophila*: <http://flybase.org> (Gramates et al., 2016).

3. El análisis de las cutículas

Se empleó el análisis de cutículas para observar y caracterizar el fenotipo de las líneas mutantes de *prg* y la progenie de las interacciones genéticas de *prg* con otros genes que participan en la retracción de la banda germinal y en el cerrado dorsal. La preparación de cutículas se realizó con embriones que no eclosionaron después de 24 horas a partir de su deposición en placas de agar-jugo de uva por un método que ya ha sido descrito (Stern y Sucena, 2000), en donde se eliminó el corion con hipoclorito de sodio (5% en agua desionizada) y los embriones fueron recolectados con un pincel en un vial de 1.5 ml con 750 µl de heptano. La membrana vitelina fue removida con una mezcla metanol-heptano (1:1) agitando vigorosamente y luego metanol. Los embriones se rehidrataron con PBS (2.7% NaCl, 0.02% KCl, 0.115% Na₂HPO₄ y 0.02% KH₂PO₄ en agua) y se transfirieron a un portaojetos con PBST (1X PBS-0.3% triton). Las cutículas se montaron en medio de Hoyer o

en medio de montaje PVA-LA (BioQuip Products, Inc.) y fueron aclarados, calentando las muestras en la plancha caliente a 65°C durante 24 horas. Para que el análisis de letalidad y el análisis del fenotipo fuera más exacto en los alelos mutantes de todos los genes que se usaron y las interacciones, se contaron las larvas que eclosionaron y los embriones muertos se colocaron con pinzas en una placa excavada con hipoclorito de sodio 5% para decolorar, se enjuagaron con PBS y se montaron con medio de Hoyer o medio de montaje “PVA-LA” sin eliminar la membrana vitelina. En algunos casos se usaron cromosomas balanceadores que expresan GFP en embriones, y se separaron los embriones homocigotos mutantes de los demás para la caracterización y cuantificación.

Cálculo de la letalidad debida al cromosoma balanceador.

En los casos en los que no se usaron cromosomas balanceadores que expresan GFP, los cromosomas balanceadores del cromosoma 2 y 3 que utilizamos se pusieron en heterocigosis en un fondo silvestre (ORR) y se determinó su letalidad embrionaria. Las cutículas de los embriones homocigotos del balanceador presentan un fenotipo silvestre (cuando se analizaron las cutículas).

4. La secuenciación de los alelos mutantes

Para conocer las lesiones moleculares en los *loci* mutantes de *prg*, secuenciamos siete fragmentos de ADN para cubrir cada *locus* de los respectivos alelos como en Riesgo-Escovar y Hafen (1997b). El ADN se extrajo con el protocolo modificado de extracción de ADN para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) de una sola mosca (Gloor et al., 1993). Se seleccionaron cinco embriones homocigotos mutantes de los distintos alelos (se reconocieron porque son de color café oscuro y presentaron un hoyo en la región dorsal cuando se observaron en el microscopio de disección), se retiró el corion con las pinzas de disección y se pusieron los embriones desnudos en cada vial en hielo. Se maceraron con la punta de la pipeta automática con 20 µl de buffer de homogenización (SB de “squishing buffer” en inglés), sin expelerlo ya que el líquido que se escapa de la punta es suficiente. El buffer debió de ser preparado en fresco (10 mM de Tris-HCl a pH 8.2, 1 mM de EDTA, 25 mM de NaCl, y 200 µg/ml de Proteinasa-K). Cuando los embriones estuvieron

machacados se agregó el buffer sobrante y se incubó a 37°C por 20 minutos. La inactivación de la Proteinasa-K se efectuó incubando a 95°C por 2 minutos y para la reacción de PCR se agregaron 2 µl de este homogenado por cada volumen de reacción de 20 µl.

Los pares de oligonucleótidos que se usaron para las reacciones de PCR fueron:

PRGF1= 5'-GCATCATCAAACCTCAACCCC-3' con PRGB1= 5'-CCGTATTATGGTGGCACAGG-3'; PRGF2= 5'-GCCTGTGCCACCATAATACG-3' con PRGB2= 5'-CTCCTCATCATCGTCGTCATAG-3'; PRGF3= 5'-TGAGGAGGAGGAGGAAGACTAC-3' con PRGB3= 5'-GACTTGCTGGTGGGCTATTAG-3'; PRGF4= 5'-ACCAGCAAGTCCATACCAGG-3' con PRGB4= 5'-CTGTAGAAGCCCAGATTCATTG-3'; PRGF5= 5'-CGAACTTTCCAACGGGAGAG-3' con PRGB5= 5'-CGACTAAAACAGCCTTGACCTAC-3'; PRGF6= 5'-GTCAAGGCTGTTTTAGTCGTTT-3' con PRGB6= 5'-AAGGTGGATTCTGATTCCCTC-3'; PRGF7= 5'-TCTTTCTTGAGTTCGCCCC-3' con PRGB7= 5'-CGCCAACACCTAAACACATC-3'.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, las bandas presentes en el gel se cortaron y los fragmentos de ADN se purificaron del gel de agarosa con las columnas de "GenElute Agarose Spin Colum" (Sigma-Aldrich, Inc.). Se concentraron las muestras haciendo una precipitación alcohólica y resuspendiendo en 20 µl de H₂O. Se secuenciaron los fragmentos de ADN por duplicado utilizando los oligonucleótidos sentido y anti-sentido. Los pares de oligonucleótidos PRGF2-PRGB2 no amplificaron en los extractos de ADN de los embriones mutantes, así que se amplificaron bandas más grandes usando PRGF1 con PRGB3 y se clonaron en un vector comercial "pGEM-T Easy Vector" (Promega), para poder transformar cepas de *E. coli*. Se usaron tres clones para amplificar, se purificaron los plásmidos usando el "High Pure Plasmid Isolation Kit" (Roche) y se secuenciaron usando los oligonucleótidos T7 y SP6 para cada una de las tres colonias. Todos los amplicones y los plásmidos se secuenciaron en la Unidad de Proteogenómica del INB de la UNAM.

5. La extracción del ARN y la RT-PCR semi-cuantitativa

Para determinar los niveles de expresión del ARN mensajero de *prg* en los alelos mutantes, realizamos un análisis de "Retrotranscripción con Reacción en Cadena de la Polimerasa" (RT-PCR por sus siglas en inglés) semicuantitativa. Se colectaron embriones por dos horas de la cruce de individuos heterocigotos que están balanceados con *CyO-GFP*, un

balanceador que contiene una proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) y se dejaron desarrollar durante 10 horas, para que alcanzaran la etapa de cerrado dorsal. Los embriones colectados se decorionaron con cloro y se lavaron con abundante agua, se vaciaron en una placa excavada con PBST, se seleccionaron con la micropipeta 100 embriones del genotipo deseado en un microscopio de disección con epifluorescencia y se agregaron en un vial de 1ml. Los balanceadores expresan GFP de manera generalizada permitiendo identificar a los embriones homocigotos mutantes por la ausencia del balanceador (ausencia de la fluorescencia), y a los embriones heterocigotos por tener una dosis de GFP (fluorescencia intermedia comparados con los homocigotos del balanceador). Los embriones heterocigotos se usaron como controles porque son viables hasta la etapa adulta sin ningún defecto visible. Los embriones seleccionados en cada vial se enjuagaron con abundante PBS 1X, se secaron y se guardaron a -70 °C hasta la extracción de ARN. Para la cuantificación en los experimentos de rescate se seleccionaron los embriones con los genotipos correspondientes de la misma manera, cruzando las cepas generadas para el rescate (ver apartado “2.2. Líneas transgénicas del rescate de *prg*” de Materiales y Métodos) balanceadas con *CyO-GFP*.

Para la extracción de ARN se maceraron los embriones colectados con un pistilo de teflón libre de RNAsas en frío y se extrajo el ARN total con “TRIzol® Reagent” según el protocolo del fabricante (Life Technologies). Se dejó secar el ARN y se resuspendió en 15 µl de H₂O-PCR, se midió la concentración en el “NanoDrop” y se guardaron las muestras a -70 °C hasta su uso. Se utilizaron 3µg de ARN total para generar cadenas híbridas de cADN-mARN por retrotranscripción, usando el “oligonucleótido dT₁₅” y la enzima “M-MLV Reverse Transcriptase” (PROMEGA) según el protocolo del fabricante. Se agregó RNAsaH para degradar el mARN molde y generar cADN de cadena sencilla, que se usó como templado para identificar por PCR los ARN mensajeros deseados. Se utilizó el gen ribosomal *rp49* como control como en Homsy et al. (2006). Los oligonucleótidos diseñados para *prg* fueron: Sentido: 5'-GCCTGTGCCACCATAATACG-3' y Antisentido: 5'-CCATCGGAGCCGAGTGCGAA-3'. La fase logarítmica en la reacción de PCR fue calculada para cada gen ensayado, de esta forma se usaron 22 ciclos para el gen *rp49* y 26 ciclos para *prg*; y se preparó una misma

mezcla de reacción para *rp49* y *prg* (solo los oligonucleótidos fueron diferentes) para que las cantidades de los reactivos fueran las mismas. La electroforesis se hizo en un gel de agarosa al 2% y se midió la intensidad en escala de grises cuantificando el área bajo la curva con el programa Kodak ID.

6. El análisis de la cinética del cerrado

Para analizar la cinética del cerrado dorsal, nosotros empleamos las líneas: *UAS-GFP:tub* que expresan β -tubulina marcada con GFP (regalo de Damian Brunner), dirigiendo su expresión con *act-Gal4*, *ubi-Ecad:GFP (DEcad:GFP)* que codifica a E-cadherina expresada de manera ubicua marcada con GFP (Oda y Tsukita, 2001; Fernandez et al., 2007) y *sGMCA:GFP (moe:GFP)* que es un fragmento de la proteína moesina que se une a la actina también marcada con GFP (Kiehart et al., 2000; Dutta et al., 2002; Jankovics y Brunner, 2006), recombinadas en los fondos genéticos mutantes (*prg³* y *bsk²*) y silvestre, estos últimos usados como controles. El estudio comprendió el cerrado dorsal (estadios 13-15) usando un microscopio confocal de disco giratorio (Spining-Disk).

Los embriones para el análisis fueron recolectados por 12 horas, decorionados con hipoclorito de sodio 5%, de igual manera que como se preparan las cutículas, para su observación en el microscopio. Se seleccionaron los embriones en etapas de cerrado dorsal y se montaron en una caja petri con fondo de vidrio (MatTek) adheridos con la superficie dorsal hacia abajo con “fly glue” (un pegamento casero hecho a base de heptano con cinta adhesiva transparente). Se cubrieron completamente los embriones con aceite de halocarbón (Sigma) para evitar la deshidratación. Los embriones homocigotos fueron seleccionados por la ausencia de balanceador *CyO-GFP* y fueron registrados en un microscopio invertido LCI Spinning Disk Confocal Microscope (Nikon) en un cuarto atemperado a 21°C. Las proyecciones y las series de tiempo fueron ensambladas con los complementos específicos para “Stacks” y analizadas con el complemento “Measure” del programa ImageJ.

7. La viabilidad de las larvas

La línea recombinada *prg³, UAS-GFP:tub, act-Gal4/CyO* se cruzó con *prg³,UAS-GFP:tub/CyO* para determinar la viabilidad en larvas, ya que esta combinación produce mayor fluorescencia. Se tomaron los embriones más brillantes (homocigotos de *prg*), se separaron en una placa de agar-jugo de manzana y se observaron hasta su muerte. Las cutículas se montaron con medio PVA-LA para determinar el estadio larvario por medio de la observación de las mandíbulas y los espiráculos respiratorios. También se tomaron los embriones que no brillaban tan intensamente (heterocigotos de *prg*) como controles y se observaron hasta llegar al estadio adulto.

8. El análisis por Southern-blot.

Para tratar de encontrar las lesiones moleculares en los alelos de *prg*, hicimos un análisis tipo Southern de moscas heterocigotas. Se analizaron los diferentes alelos de *prg* con sus respectivos controles: moscas de fondo genético silvestre y moscas de fondo genético de la línea de la cual se originaron. Las líneas ORR y *P{RD401}* se utilizaron como controles para los alelos derivados de *P{RD401}*. Las líneas *y,w* y *P{GT1}* fueron los controles para los alelos derivados de *P{GT1}*. Se extrajo, se purificó y se digirió el ADN genómico de cada una de las líneas, se separó en una electroforesis y se transfirió el ADN digerido a una membrana de nitrocelulosa y se hibridó como ya ha sido descrito. El análisis se realizó digiriendo el ADN de las distintas muestras con dos enzimas de restricción: *EcoRV* y *HindIII* por separado. Los sitios de restricción de estas enzimas en la región genómica de *prg* y en los elementos P se muestra en la Fig. 7. Las sondas utilizadas para estos experimentos fueron dos: un amplificado de 726 bp que flanquea el sitio de inserción de *P{RD401}*, en la zona 5' antes del sitio de inicio de la transcripción de *prg* o el cADN completo de *prg* (Fig.7, ar1-ar3 y *prg* respectivamente).

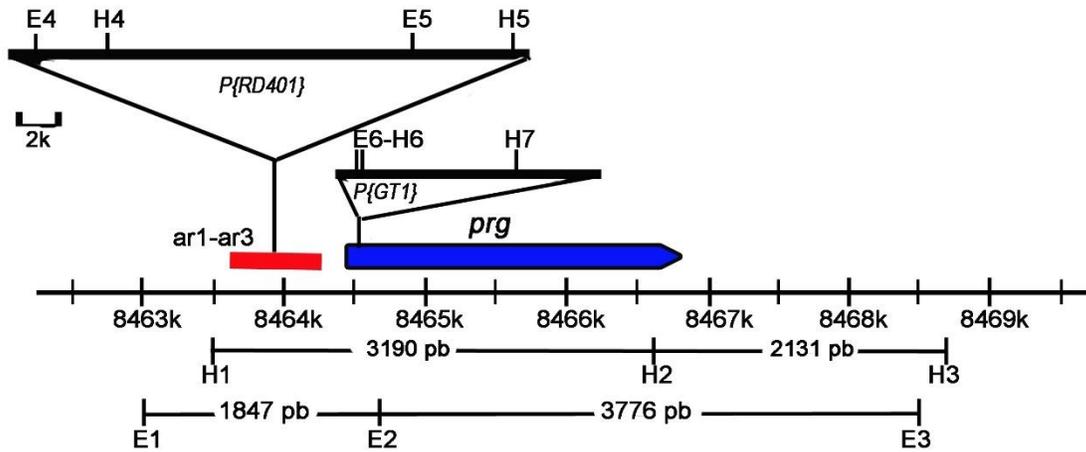


Figura 7. Mapa de restricción de las enzimas *HindIII* y *EcoRV* de la región genómica de *prg* y de los elementos P utilizados para el análisis de Southern. Los elementos P insertados en las líneas *P{RD401}* y *P{GT1}* están representados por los triángulos. La barra de calibración muestra la escala dentro de los transposones. Los sitios de restricción de las enzimas *HindIII* y *EcoRV* están marcadas con H (H1-H7) y E (E1-E6) respectivamente. La región de *prg* está marcada con la flecha azul. La línea roja señala la sonda *ar1-ar3*, que se diseñó con el amplificado que PCR de la zona que flanquea el sitio de inserción de *P{RD401}*.

9. Las interacciones genéticas

Se generaron líneas dobles heterocigotas mutantes balanceadas, con *prg* y algunos genes requeridos para el cerrado dorsal de la vía de la JNK: *Djun*, *Dfos*, *bsk*. Además, se probó la interacción de *prg* con un alelo de la fosfatasa *puc*. Se usó también una forma activada de *jun* (*hs-jun^{ACT}*), en la cual se han sustituido los posibles sitios de fosforilación por residuos ácidos. También, se generaron líneas dobles heterocigotas mutantes balanceadas con *prg* y genes del grupo de forma de U: *ush*, gen que codifica para un factor de transcripción con dedos de Zn y *ppo*. Además, observamos interacciones génicas en el desarrollo embrionario con dos alelos mutantes del gen *flower*: *fwe^{EY08496}* y *fwe^{HP3554}* (Bloomington: #16898 y #21983).

Se estudiaron las interacciones genéticas, observando los fenotipos resultantes en organismos en donde los dos genes están alterados: homocigoto mutante para *prg* y heterocigoto para el segundo gen, homocigoto mutante para el segundo gen y heterocigoto para *prg*, y finalmente los dobles homocigotos. Para estas pruebas de interacciones genéticas se utilizaron los 3 nuevos alelos de *prg*.

Se generaron líneas dobles heterocigotas mutantes balanceadas con genes que están en el cromosoma 2 (*Djun*, *bsk*, *ush* y *ppo*), por ello fue importante recombinar las mutaciones de *prg* con el cromosoma homólogo en el que está contenida la mutación del otro gen (*gen2*)(Fig.8).



Figura 8. Esquema de cruza para generar cepas dobles heterocigotas mutantes, balanceadas, con *prg* y genes del cromosoma 2. *CyO* es un cromosoma balanceador del cromosoma 2. *Bc*, *bw* y *Gla* son marcadores del cromosoma 2.

Para generar cepas dobles heterocigotas mutantes balanceadas con genes que están en el cromosoma 3 (*Dfos*, *puc* y *fwe*), es importante primero cruzar a *prg* y genes de cromosoma 3 (*gen3*) con líneas dobles balanceadas y después mantenerlas con un cromosoma que es balanceador para los cromosomas 2 y 3 al mismo tiempo (Fig.9).

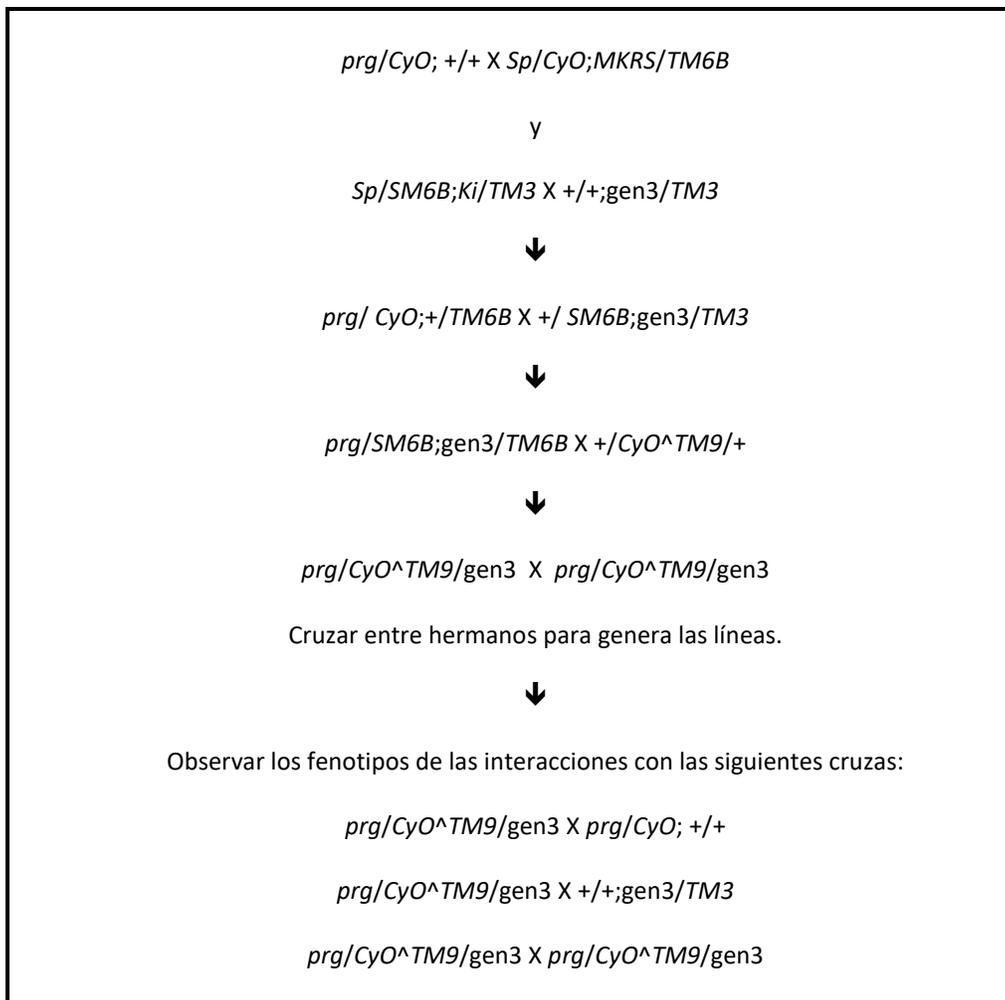


Figura 9. Esquema de cruzas para generar cepas dobles heterocigotas mutantes, balanceadas, con *prg* y genes del cromosoma 3. *CyO* y *SM6B* son cromosomas balanceadores del cromosoma 2. *TM3* y *TM6B* son cromosomas balanceadores del cromosoma 3. *Sp* y *MKRS* son marcadores dominantes del cromosoma 2 y del cromosoma 3 respectivamente. *CyO^TM9* son cromosomas balanceadores de los cromosomas 2 y 3 que se encuentran fusionados y se segregan como uno solo.

10. La generación de los mosaicos genéticos

Para estudiar el efecto de eliminar la contribución materna de *prg* o estudiar su participación en la formación de estructuras del imago durante la metamorfosis, es necesaria la generación de mosaicos genéticos en el organismo adulto. La enzima recombinasa FLP de levaduras puede reconocer secuencias FRT en el genoma de *Drosophila* y recombinar cromosomas homólogos durante la mitosis. Una vez que se recombinan estos cromosomas homólogos durante un periodo proliferativo como en las gónadas (la línea

germinal) o en los discos imagales de larvas de segundo y tercer estadio se pueden generar clones de células con diferentes genotipos en el mismo organismo (mosaico genético) (ver detalles en el Anexo I). Para generar los clones primero se recombinó el sitio FRT en la posición 40 del cromosoma 2 con alelos mutantes de *prg*. La línea FRT que se utilizó para esta recombinación con *prg* fue: *y⁻, w⁻, hsp70-flp; w⁺, arm-lacZ, FRT40A/CyO*. Se obtuvieron dos líneas recombinantes para el alelo *prg¹* y una línea para el alelo *prg³* a las que se les incluyó además el transgen que codifica para la enzima transposasa (*y⁻, w⁻, hsp70-flp; prg¹, FRT40A/CyO* y *y⁻, w⁻, hsp70-flp; prg³, FRT40A/CyO*).

10.1. Los mosaicos genéticos con los clones de la línea germinal

Se utilizó la técnica dominante estéril femenina (Chou y Perrimon, 1996) en donde se generaron estos mosaicos genéticos en todo el organismo usando *hsp70-flp*. La técnica dominante estéril femenina utiliza un cromosoma con una mutación dominante (*ovo^{D1}*) que evita el desarrollo de los huevos en las hembras. Por lo tanto, sólo los clones homocigotos del gen en estudio, en las células germinales de las hembras podrán generar huevos, pero sin la contribución materna de tal gen. Para esta técnica se cruzó la línea *ovo^{D1}, FRT40A/CyO* con *y⁻, w⁻, hsp70-flp; prg³, FRT40A/CyO* ó *y⁻, w⁻, hsp70-flp; prg¹, FRT40A/CyO*. La progenie de esta cruce se sometió a choque térmico en baño maría a 37°C por 1 hora cada día, en larvas de segundo y tercer estadio.

10.2. Los mosaicos genéticos con los clones del tórax y el ojo compuesto

Los mosaicos genéticos fueron generados en discos imagales de ojo y en ojos compuestos usando *ey-flp* (Stowers y Schwarz, 1999), y para ello se cruzaron moscas hembras *y⁻, w⁻, ey-flp; w⁺, arm-lacZ, FRT40A/CyO* con *y⁻, w⁻, hsp70-flp; prg³, FRT40A/CyO* o *y⁻, w⁻, hsp70-flp; prg¹, FRT40A/CyO* y se analizaron los clones de los discos imagales de las larvas de tercer estadio haciendo inmunomarcaje con anticuerpos contra la enzima β-galactosidasa (anti-βGal), o en las moscas adultas por la presencia o ausencia del pigmento rojo en los ojos. Otra manera de hacer el marcaje de los clones mutantes fue por la ausencia de fluorescencia, usando una línea transgénica que expresa la Proteína Roja Fluorescente (RFP, por sus siglas en inglés) bajo el promotor del gen *ubiquitina* (*w¹¹¹⁸; ubi-RFP, FRT40A*).

Para el análisis de los clones en el tórax de los adultos, se generaron mosaicos en organismos completos usando *hsp70-flp* (Xu y Rubin, 1993) y se marcaron las células que no presentan la mutación de *prg* con *forked* (*f*), una mutación que marca a las células con la generación de quetas dobladas. Las cruzas para esta prueba fueron: moscas hembras $y^-, w^-, f, hsp70-flp; f^+, FRT40A/CyO$ con $y^-, w^-, f, hsp70-flp; prg^3, FRT40A/CyO$ o $y^-, w^-, f, hsp70-flp; prg^1, FRT40A/CyO$.

11. La inmunohistoquímica de los discos imagales

Los discos de ojo disecados de las larvas de tercer estadio de las cruzas $y^-, w^-, ey-flp; w^+, arm-lacZ, FRT40A/CyO$ con $y^-, w^-; prg^3, FRT40A/CyO$ o $y^-, w^-; prg^1, FRT40A/CyO$, fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos. Estos discos fueron bloqueados con suero bovino fetal al 25% en PBST (PBS + 0.3% triton-X100). Se hicieron dobles inmunohistoquímicas contra la β -galactosidasa y contra la caspasa 3. El anticuerpo anti- β Gal (generado en ratón) fue incubado en una dilución 1:500 y el anticuerpo anti-caspasa 3 activa (generado en conejo) fue incubado en una dilución 1:50. Los anticuerpos secundarios se incubaron en una dilución 1:1000 (Cy3 anti-ratón y FICT anti-conejo). Todos los lavados fueron hechos con suero bobino fetal al 5% en PBST. Todos los anticuerpos fueron incubados a temperatura ambiente por lo menos 1 hora o toda la noche a 4°C.

12. La hibridación *in situ* de los discos imagales

Se generaron dos ribosondas marcadas con digoxigenina por transcripción *in vitro*, para esto se linearizó el plásmido que contiene el cADN de *prg* (RE69756 de la colección BDGP) digiriendo con las enzimas de restricción *Kpn*-I y *Not*-I (usadas para la sonda sentido y antisentido respectivamente). Los fragmentos lineales se purificaron del gel de agarosa con el "GenElute™ Gel Extraction Kit", siguiendo las especificaciones del fabricante (SIGMA) y se precipitaron de la elución agregando 10 μ l de acetato de sodio (3M, pH5.2) y 400 μ l de isopropanol, después se enjuagaron con etanol a 70%. Se secaron las muestras y se resuspendieron en 6 μ l de agua para PCR. Se utilizaron 3 μ l de cada tubo para hacer la transcripción *in vitro* usando el "DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)" siguiendo el protocolo del fabricante (ROCHE) para un volumen de reacción de 20 μ l. Se precipitaron las sondas ajustando los volúmenes con agua libre de RNAsa y agregando cloruro de litio y etanol, se

lavaron con etanol al 70% y se secaron los tubos para después resuspender las ribosomas en 100 μ l de solución de hibridación, se agregó 1 μ l de inhibidor de RNAsas y se congelaron a -20°C hasta su uso.

13. La histología del ojo compuesto

Las cabezas de moscas adultas fueron disecadas como ya se ha descrito (Wolff, 2000). Se partieron las cabezas en dos y se pusieron en solución de fijación (buffer de cacodilatos 1X, glutaraldehído al 2% y OsO₄ al 1% en agua) por 30 minutos y subsecuentemente en OsO₄ al 2 % por 2 horas. Las cabezas se enjuagaron en acetona/H₂O al 30%, se deshidrataron en un procesador de tejidos (EMTP tissue processor de Leica) con concentraciones crecientes de acetona en agua: 30%, 50%, 70%, 90% y 96% (5 minutos cada una); y dos lavados en acetona al 100% (10 minutos cada uno). Se dejaron reposar en una mezcla de Spurr con acetona 1:1 por 12 horas. Se reemplazó la mezcla por la resina al 100% por lo menos 4 horas, se embebieron las mitades de las cabezas en moldes independientes y se dejaron solidificar por lo menos 32 horas a 60°C. Los bloques fueron cortados en un microtomo (RM2265 Rotary Microtome de Leica) en secciones de 1.5 μ m de grosor. Se recogieron los cortes en un portaobjetos, se tiñeron con azul de toluidina y se sellaron con Entellan (Electron Microscopy Sciences) y el cubreobjetos. Todas las fotografías fueron tomadas con una cámara digital (Cool-SNAP de Photometrics), en un microscopio compuesto de Nikon (Eclipse-E600).

14. El análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se hicieron con el programa Graphpad-Prism (Graphpad Software). Los análisis de RT-PCR semi-cuantitativa se hicieron a través de comparaciones de los grupos mutantes contra sus grupos controles a través de una “t de student” (n=3, p<0.05). También, se aplicó una “t de student” para analizar la diferencia de longitud (anterior-posterior) entre los huevos silvestres (n=8) y los clones mutantes de línea germinal de *prg*³ (n=16) (p<0.05).

Además, el análisis de la dinámica del cerrado entre los embriones controles y mutantes de *prg* se hizo con una “t de student” para correlación lineal (n=4), midiendo la

distancia central entre los bordes de los epitelios laterales en la región dorsal o la reducción del área de las células de la amnioserosa medial contra el tiempo ($p < 0.01$).

El análisis estadístico de los fenotipos embrionarios entre los alelos mutantes de *prg* y sus controles, o los mutantes de *prg* y los mutantes de otros genes, en las interacciones génicas fueron a través de pruebas de χ^2 ($p < 0.05$).

RESULTADOS

1. La caracterización de los alelos de *prg*

1.1. Los alelos *prg*¹, *prg*² y *prg*³ presentan aperturas dorsales más acusadas

Los tres nuevos alelos generados de la escisión del elemento P en la línea *P{GT1}* (Fig. 10B-D) son recesivos letales y presentan principalmente cutículas con fenotipo de apertura dorsal más acusado que los alelos derivados de la línea *P{RD401}* (Fig. 10E-H), cuando se probaron a 18°C y 25°C. De aquí en adelante se emplearon las nuevas cepas mutantes y no volvimos a usar las cepas derivadas de la línea *P{RD401}* porque no pudimos quitar el marcador dominante como se explica en los métodos.

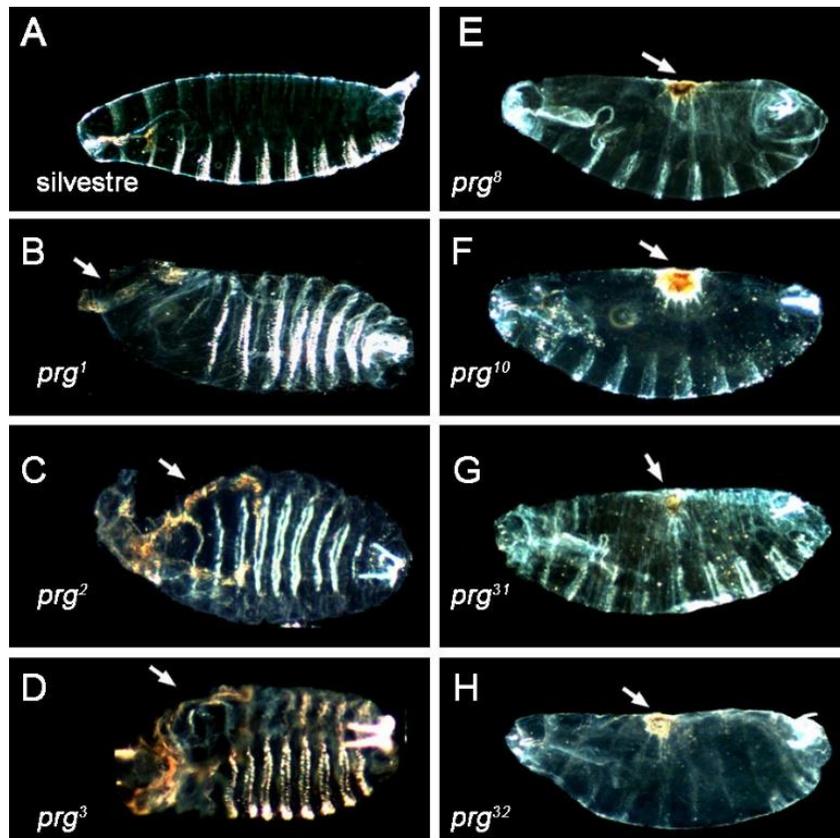


Figura 10. Los alelos *prg*¹, *prg*² y *prg*³ presentan un fenotipo más acusado de apertura dorsal. Preparaciones de cutículas de embriones observadas por microscopía de campo oscuro. Las cutículas pertenecen a embriones homocigotos para cada uno de los alelos y están colocadas en vista lateral con la parte anterior a la izquierda y la parte dorsal arriba, a excepción de *prg*¹ y *prg*² que están en una vista ventral. Las aperturas están marcadas con bordes color marrón, que indican las regiones necróticas en las cutículas (flechas).

Las líneas que se analizaron están balaceadas con el cromosoma *CyO* (cromosoma balanceador que evita la recombinación). Todos los adultos de la generación F1 que derivan de la cruce de padres heterocigotos presentan el marcador dominante de alas curvadas. Esto significa que la mutación de *prg* es 100% letal y los adultos de la F1 son heterocigotos para *prg* y el cromosoma balanceador (*prg/CyO*), ya que no puede haber homocigotos del balanceador como se explica en el Anexo I.

Al cruzar individuos heterocigotos (balanceados) en la generación parental, la letalidad esperada de un alelo recesivo letal embrionario es del 25%, y como la letalidad debida al balanceador también es del 25%, la letalidad total esperada sería del 50%. El valor esperado de letalidad embrionaria de la cruce de individuos heterocigotos balanceados es del 50%, porque es la suma de la letalidad debida a *prg* en homocigosis y la letalidad debida al cromosoma *CyO* en homocigosis. *CyO* contiene la mutación letal recesiva *dpy^{VI}* que produce letalidad en larvas, además el marcador dominante *Cy* presenta letalidad recesiva al final del desarrollo embrionario (Gramates et al. 2016). Analizamos la letalidad embrionaria y el fenotipo mutante que presentan los homocigotos de *CyO* experimentalmente. Generamos individuos heterocigotos del balanceador en un fondo silvestre (+/*CyO*) y los cruzamos entre ellos. En la descendencia de esta cruce observamos una letalidad embrionaria cercana al 25% y las cutículas analizadas tenían fenotipo silvestre. Además, analizamos la descendencia de los heterocigotos con el alelo *Djun^{A109}* que es 100% penetrante en el fenotipo mutante y el balanceador (*Djun^{A109}/CyO*), la cruce de estos individuos tiene una letalidad cercana al 50% y presentan 23.6% de cutículas de fenotipo silvestre debida al balanceador. Los alelos nuevos de *prg* no complementan entre ellos. La descendencia de la cruce de los heterocigotos balanceados de los tres alelos (*prg¹/CyO*, *prg²/CyO* y *prg³/CyO*) presentan una letalidad embrionaria total de alrededor del 33%. Si quitamos la letalidad debida al balanceador, la letalidad debida a la mutación en *prg* sería alrededor de un 1/3 de la letalidad esperada en la población. Esto significa que las mutaciones en *prg* no son 100% penetrantes en el fenotipo embrionario. Para tener un mejor análisis de las alteraciones presentes en los embriones debido a la mutación en *prg*, seleccionamos a los embriones homocigotos mutantes usando un cromosoma balanceador que expresa una

proteína verde fluorescente (*CyO-GFP*). Los embriones homocigotos mutantes de *prg* fueron seleccionados por la ausencia de la GFP y separados en placas de agar por 48h. Los datos de los fenotipos que presentaron los homocigotos mutantes de *prg* fueron normalizados en base a los fenotipos que presentaron los embriones de una cepa control (*yw*) y se muestran en la Figura 11.

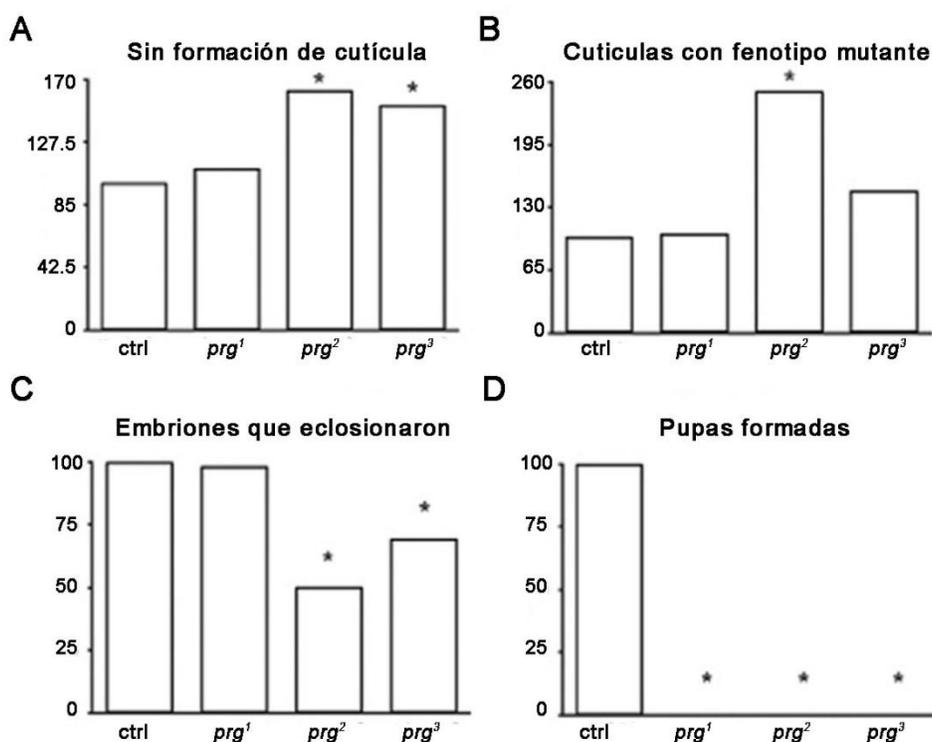


Figura 11. Los alelos mutantes de *prg* presentan otros fenotipos además de la apertura dorsal. A) Frecuencia normalizada de embriones que no forman cutícula (membrana vitelina vacía). B) Frecuencia normalizada de cutículas con fenotipos mutantes (aperturas dorsales y defectos de involución de la cabeza). C) Frecuencia normalizada de larvas que eclosionaron. D) Frecuencia normalizada de pupas formadas (en los mutantes no se observó ninguna pupa). En este experimento se cruzaron cepas balanceadas con *CyO-GFP* y se seleccionaron solamente los genotipos correspondientes en la descendencia. Se contaron las larvas que eclosionaron y las cutículas de los embriones que murieron después de 48 horas de ser ovipositados. Los datos se normalizaron de acuerdo a lo obtenido en los organismos silvestres (ajustando a 100), se usó la cepa *yw* como control (*ctrl*). Para todos los paneles (*) es la diferencia significativa ($p < 0.05$, χ^2) contra la línea control.

Los homocigotos mutantes de los tres alelos presentaron alteraciones del desarrollo que evitan la formación de la cutícula, que se hace evidente por la presencia de membranas vitelinas vacías, sin embargo, los mutantes de *prg*² y *prg*³ presentan este fenotipo

mayoritariamente (Fig. 11A). Los homocigotos de *prg*² presentaron el mayor porcentaje de fenotipos mutantes en las cutículas (Fig. 11B) y la mayor alteración del desarrollo embrionario, ya que presentaron menor número de embriones que eclosionaron (Fig. 11C). Además, los dos tercios restantes de los homocigotos mutantes de los tres alelos, que no mueren como embriones, mueren en la etapa larvaria, ya que ninguno llega a la etapa de pupa (Fig. 11D).

Tabla 1. Características de los alelos y las líneas de *prg* utilizadas en este estudio. Los alelos que se utilizan en este estudio se han ordenado en una tabla con sus características principales para entender mejor los experimentos que se explican más adelante.

Alelos	Características	Fenotipos mutantes
<i>prg</i> ⁸ <i>prg</i> ¹⁰ <i>prg</i> ³¹ <i>prg</i> ³²	Alelos con pérdida de función, derivados de la escisión del elemento P de la línea <i>P{RD401}</i> *.	Hoyos dorsales en la parte central del embrión. No se determinaron otros fenotipos.
<i>prg</i> ¹ <i>prg</i> ² <i>prg</i> ³	Alelos con pérdida de función, derivados de la escisión del elemento P de <i>P{GT1}</i> .	Defectos embrionarios: hoyos dorsales que van desde la parte central hasta la parte anterior del embrión y alteraciones en la involución de la cabeza. Además, múltiples defectos como: defectos en la formación de la cutícula. Los clones de línea germinal presentan defectos en la ovogénesis. Defectos de metamorfosis: los mosaicos genéticos presentan alteración de cerrado torácico y defectos en la formación del ojo.
<i>UAS-prg</i> ^{R1} <i>UAS-prg</i> ^{R3}	Alelos que expresan ARN de doble cadena, provenientes de NYG.	Hoyos dorsales que van desde la parte central hasta la parte anterior del embrión.
<i>UAS-prg</i> ^{R2} <i>UAS-prg</i> ^{R4}	Alelos que expresan ARN de doble cadena, provenientes de VDRC.	No determinado
<i>UAS-prg</i> ^{C1} <i>UAS-prg</i> ^{C3}	Alelos que contienen una construcción silvestre de <i>prg</i> , regulados con UAS.	Rescatan la función durante la embriogénesis cruzando con <i>act-Gal4</i> .
*Los alelos de la línea <i>P{RD401}</i> no se usaron más en estos análisis, pero se pusieron para fines comparativos de las nuevas líneas.		

Los embriones homocigotos para los tres alelos mutantes de *prg* presentan cutículas con alteraciones en la involución de la cabeza, además de los problemas de apertura dorsal. Las características fenotípicas de estos alelos se explican en la Tabla 1. Los organismos que sobreviven a la embriogénesis no llegan hasta la etapa adulta, así que decidimos estudiar los periodos fenocríticos analizando las etapas larvarias y las pupas. Los tres alelos mutantes de *prg* tienen un periodo fenocrítico que se extiende desde el desarrollo embrionario hasta larvas de primero-segundo estadio. Esto se correlaciona perfectamente con los estudios del cerrado dorsal *in vivo*. En estos estudios realizamos filmaciones en tiempo real en el microscopio confocal de alta resolución de los embriones mutantes con marcadores del citoesqueleto. Estos estudios muestran que muchos embriones homocigotos mutantes de *prg*³ comienzan a moverse para eclosionar sin haber terminado el cerrado dorsal y seguramente salen del huevo aun con una apertura que después los lleva a la muerte.

1.2. La caracterización de la lesión molecular en *prg*³

Se realizó un análisis de tipo Southern para tratar de encontrar las alteraciones moleculares de los alelos mutantes de *prg*. En este estudio se usaron dos tipos de sondas para la hibridación (la “sonda *prg*” y la “sonda ar1-ar3”) y las muestras se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HindIII*. La “sonda *prg*” se generó a partir del cADN completo de *prg* y la “sonda ar1-ar3” se generó de un amplificado de la secuencia silvestre de la región que flanquea el sitio de inserción de *P{RD401}*. El esquema de la Fig. 12A muestra la región genómica de *prg* con los sitios de restricción y los transposones insertados en las líneas *P{RD401}* y *P{GT1}*.

El Southern en el que se digirió el ADN con la enzima *EcoRV* y se hibridó con la sonda *prg* (Fig. 12B, izquierda) muestra una banda de 3776 pb que se conserva en todas las líneas a excepción de la línea *P{GT1}*. Esta banda es el resultado del corte dentro de *prg* y el sitio de corte que se encuentra río abajo del gen (Fig. 12A, E2 y E3). El tamaño de la banda presente en la línea *P{GT1}* era de esperarse, ya que tiene insertado un elemento P en esa zona. La banda que se observa es el resultado del corte en el sitio de restricción dentro del elemento *P{GT1}* y el sitio de corte río abajo de *prg* (Fig. 12A, E6 y E3). *P{RD401}* no presenta diferencias con la cepa silvestre porque la zona en donde está insertado el elemento P no

es reconocida por la “sonda *prg*” cuando se digiere con esta enzima. Los alelos derivados de *P{RD401}* (*prg*⁸, *prg*¹⁰, *prg*³¹ y *prg*³²) presentan adicionalmente una banda arriba del marcador de 5000 pb, lo que hace suponer una alteración en el sitio de corte de esta enzima dentro de *prg* (Fig. 12). Estos individuos son heterocigotos, si por un polimorfismo desapareciera el sitio de corte de *EcoRV* que se encuentra dentro de *prg* y la enzima usara el siguiente sitio de corte se generaría esta banda extra de 5623 pb (Fig. 12B, izquierda).

El análisis de Southern para la enzima *EcoRV* y la “sonda ar1-ar3” muestra una banda de 1847 pb que se conserva en todas las líneas a excepción de las líneas *P{RD401}* y *P{GT1}*. Esta banda es el resultado del corte en el sitio de restricción que se encuentra río arriba de *prg* y dentro del gen (Fig. 12A, E1 y E2). En esta membrana aparecen también dos bandas extras: una arriba de 2000 pb y otra arriba de 5000 pb en los alelos derivados de *P{RD401}* y sus respectivos controles, así como en la línea *yw*, y no en los alelos derivados de *P{GT1}*, lo que hace suponer que hay polimorfismos en esta zona (Fig. 12C, izquierda). La banda de 2247 pb que se encuentra en la línea *P{RD401}* (Fig. 12C, izquierda) es el producto del corte en el sitio que se encuentra río arriba de *prg* y el primer sitio de corte dentro del transposón (Fig. 12A, E1 y E4).

El análisis de Southern para la enzima *HindIII* con la “sonda *prg*” y la “sonda ar1-ar3” muestran una banda de 3190 pb que se conserva en todas las líneas a excepción de la línea *P{GT1}* y *P{RD401}* (Fig. 12B-C, derecha). Esta banda es el producto del corte en el sitio de restricción que se encuentra río arriba de *prg* y el sitio de restricción adentro del gen (Fig. 12A, H1 y H2). La línea *P{RD401}* presenta además una banda cercana a 4000 pb cuando el ADN fue digerido con la enzima *HindIII* y se hibridó con la “sonda ar1-ar3” (Fig. 12C, derecha). Esta banda es el producto del corte en el sitio de restricción río arriba de *prg* y el primer sitio de restricción dentro del transposón (Fig. 12A, H1 y H4). Los controles presentan adicionalmente una banda abajo del marcador de 3000 pb en las dos membranas digeridas con *HindIII* (Fig. 12B-C, derecha). Además, hay una banda abajo del marcador de 5000 pb para las muestras digeridas con *HindIII* y marcadas con la “sonda ar1-ar3” en *ORR* y *yw* (Fig. 12C, derecha), lo que hace suponer que también hay polimorfismos en esta zona para la restricción de esta enzima.

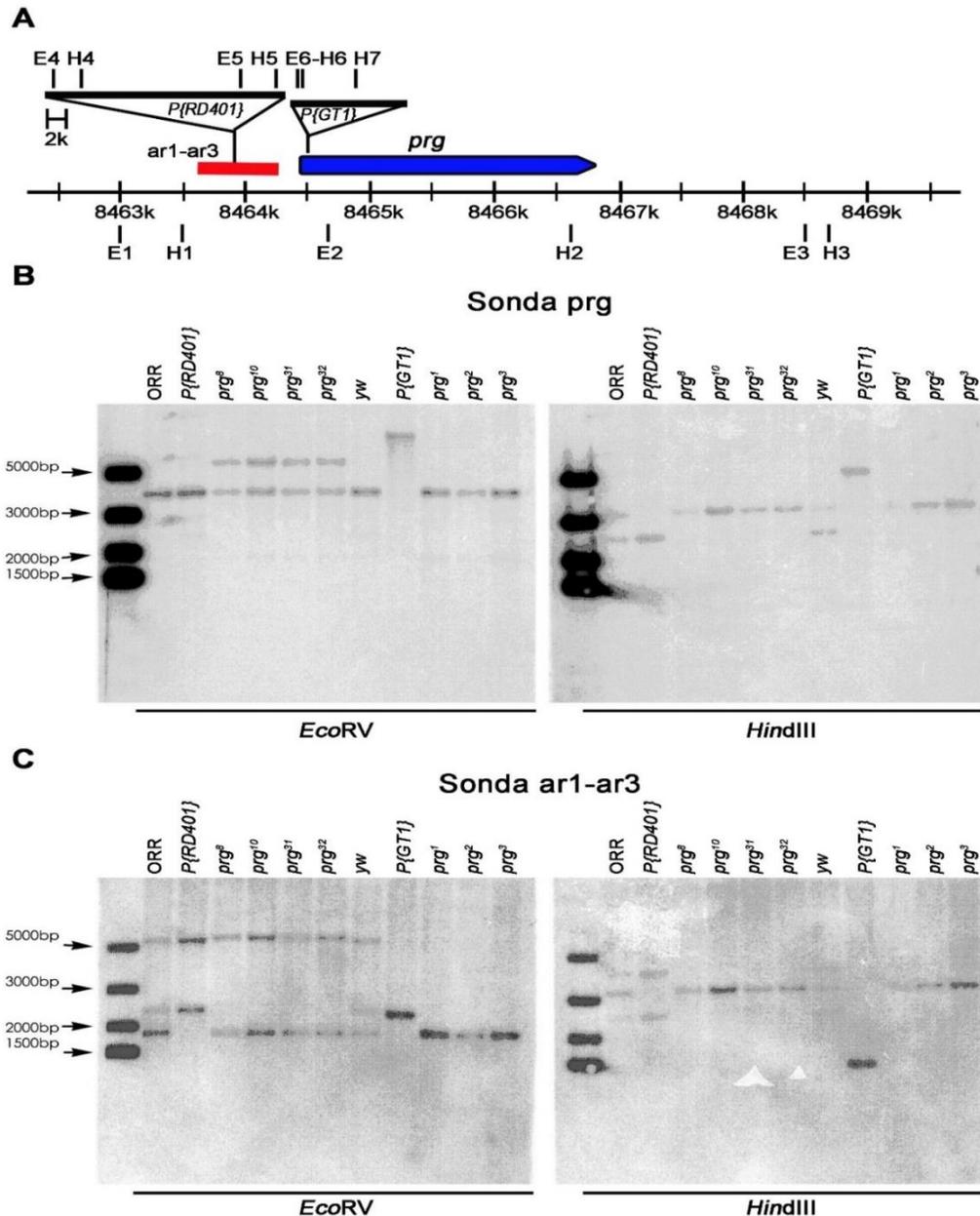


Figura 12. Southern-blot de los alelos de *prg*. A) Esquema de la región genómica de *prg* que muestra los sitios de restricción de las enzimas *EcoRV* (E1-E6) y *HindIII* (H1-H7) que se usaron en el análisis. Se utilizaron dos tipos de sondas para la hibridación: el cADN de *prg* (flecha azul) y el amplificado de PCR de la región que flanquea el sitio de la inserción del elemento *P{RD401}* (sonda *ar1-ar3* marcada por la línea roja). Los triángulos representan a los elementos P insertados en las líneas *P{RD401}* y *P{GT1}* y la barra de calibración marca la escala dentro de los transposones. B) Análisis de Southern usando la sonda del cADN de *prg* con las muestras de ADN digeridas con *EcoRV* (izquierda) o *HindIII* (derecha). C) Análisis de Southern usando la sonda *ar1-ar3* con las muestras de ADN digeridas con *EcoRV* (izquierda) o *HindIII* (derecha). El ADN que se usó en el análisis fue de moscas heterocigotas de los alelos mutantes de *prg* y de moscas homocigotas controles. ORR y *P{RD401}* fueron controles para los alelos *prg⁸*, *prg¹⁰*, *prg³¹* y *prg³²*. *yw* y *P{GT1}* fueron controles para los alelos *prg¹*, *prg²* y *prg³*.

Al parecer las lesiones moleculares en los alelos de *prg* no son detectables por esta técnica, lo que implicaría una alteración discreta. Los distintos eventos de escisiones de elementos P y las alteraciones que generan son complejos; por lo tanto, es importante secuenciar el *locus* completo de *prg* en los alelos mutantes para localizar las lesiones moleculares. Para ello diseñamos pares de oligonucleótidos que generan bandas de aproximadamente 500 pb que cubren el *locus* completo de *prg* (Fig. 13).

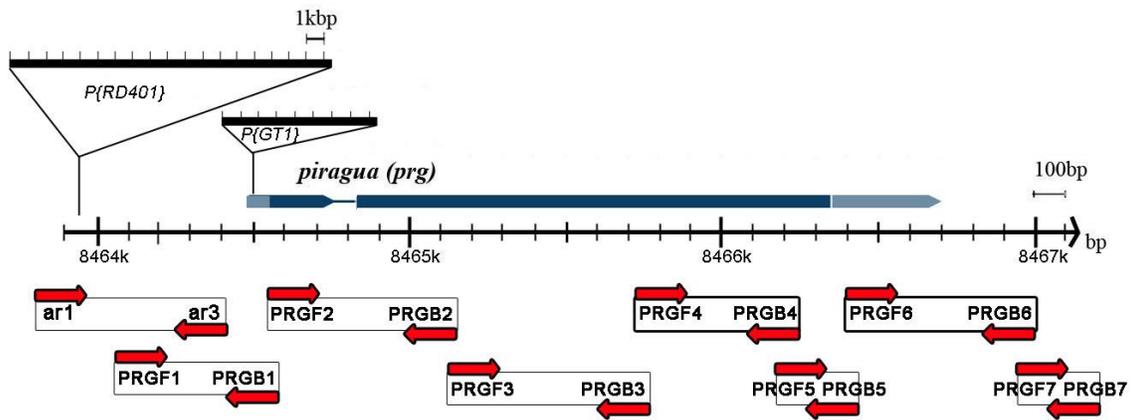


Figura 13. Los oligonucleótidos diseñados para amplificar el *locus* completo de *prg*. Las bandas que se generan con los pares de oligonucleótidos (flechas rojas) son de aproximadamente 500 pb (cuadros blancos) para amplificar el locus de *prg* (cajas y flechas de color azul claro y oscuro, línea azul oscuro=intrón, cajas y flechas azul oscuro= exones) en los alelos derivados de las inserciones $P\{RD401\}$ y $P\{GT1\}$ (triángulos).

Los pares de oligonucleótidos se probaron con ADN genómico silvestre, y todos amplifican una banda del tamaño esperado (Fig. 14). Con estos pares de oligonucleótidos se amplificaron y se secuenciaron todos los fragmentos de ADN de embriones homocigotos mutantes de los distintos alelos.

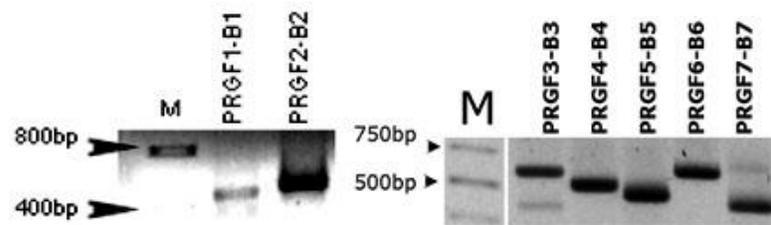


Figura 14. Los amplificados de PCR con los distintos pares de oligonucleótidos para la secuenciación de *prg*. Los amplificados fueron hechos con ADN genómico para probar que todos los pares de oligonucleótidos amplificasen una banda del tamaño esperado.

Secuenciamos todos los fragmentos amplificados por PCR con todos los pares de oligonucleótidos para los tres alelos mutantes y por triplicado. Desafortunadamente no pudimos encontrar la alteración molecular en los alelos *prg*¹ y *prg*². Sólo el alelo *prg*³ muestra distintos cambios en la secuencia de este *locus*, algunas de ellas son mutaciones silenciosas en la región de los dedos de zinc.

Además de las mutaciones silenciosas presentes en los dedos de zinc también existen dos mutaciones puntuales dentro del dominio ZAD, que no están presentes en el alelo silvestre y los otros alelos que contienen el mismo fondo genético (*prg*¹ y *prg*²). Las mutaciones que encontramos son sustituciones que pueden generar un cambio de sentido en el marco de lectura. La primera mutación es una sustitución en la posición 57 de Prg, intercambiando un ácido aspártico (D) que es un aminoácido negativamente cargado, por una alanina (A) que es un aminoácido alifático. La segunda mutación es en la posición 76 de la proteína, cambiando un ácido glutámico (E) por ácido aspártico. Ambos son aminoácidos cargados. Estos aminoácidos están conservados en las diferentes especies de *Drosophila* que se han secuenciado y tienen un grado alto de identidad. La posición 56 tiene D en seis especies y E en otras tres especies (aminoácidos con la misma carga), lo que sugiere que ese cambio por A en esa posición en la mutante *prg*³ es significativo. El cambio de D por E en la posición 76 también se encuentra naturalmente en los genes homólogos de otras especies de *Drosophila* (Fig. 15) y posiblemente no representa una alteración grave en la función de la proteína.

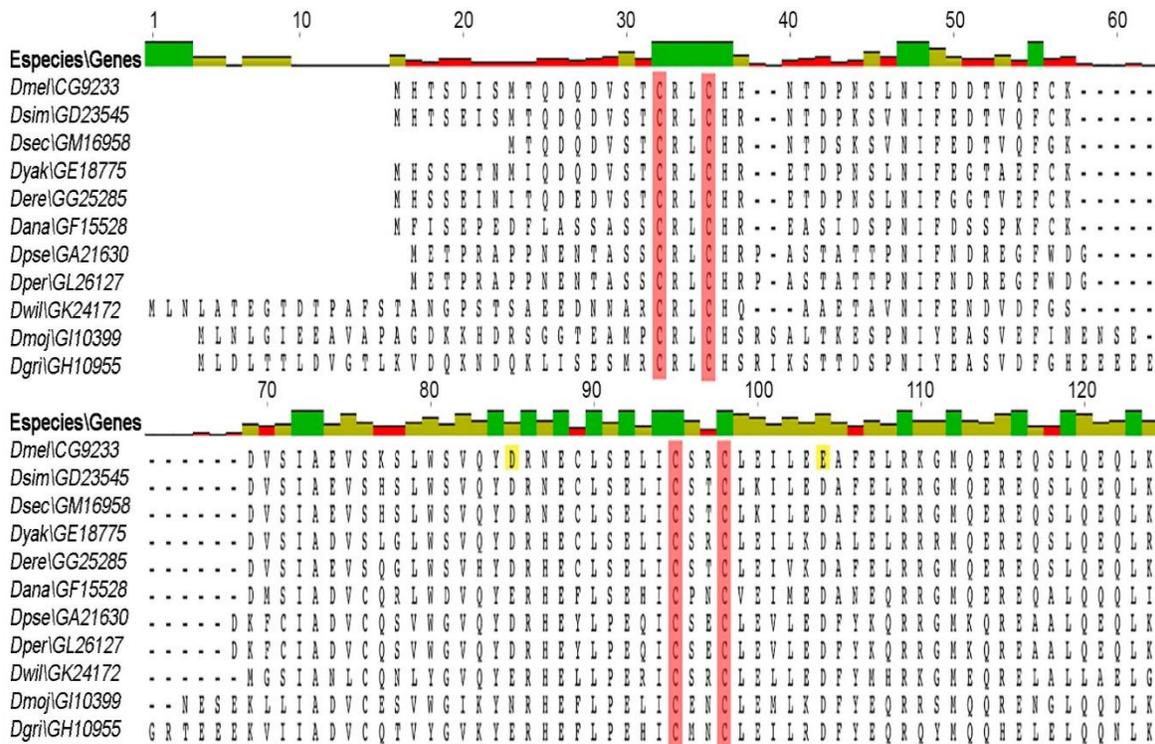


Figura 15. Comparación de las secuencias del dominio ZAD de Prg con las proteínas homólogas de otras especies de *Drosophila*. El alelo *prg*³ contiene una sustitución de D por A en la posición 57 de la proteína Prg y una E por una D en la posición 76 dentro del dominio ZAD (85 y 104 en el esquema del gen *Dmel\CG9233* marcadas con un recuadro amarillo). La altura y el color de las barras arriba de las secuencias representan el grado de identidad entre los aminoácidos de las proteínas predichas (verde = 100%, café = <100%-60% y rojo = >60%). Las cisteínas importantes para la formación del dominio ZAD están resaltadas en rojo dentro de las secuencias. El análisis de identidad de las proteínas se realizó con la herramienta Clustal-W del paquete Genious (Biomatters) (Thompson et al., 1994). Las primeras cuatro letras de los nombres de los genes representan a las especies a las que pertenecen: *Dmel* = *D. melanogaster*, *Dsim* = *D. simulans*, *Dsec* = *D. sechellia*, *Dyak* = *D. yakuba*, *Dere* = *D. erecta*, *Dana* = *D. ananassae*, *Dpse* = *D. pseudoobscura pseudoobscura*, *Dper* = *D. persimilis*, *Dwil* = *D. willistoni*, *Dmoj* = *D. mojavensis* y *Dgri* = *D. grimshawi* (ver Anexo I).

1.3. Los niveles de mRNA en los homocigotos de *prg*³ son menores

Posteriormente se hicieron experimentos de RT-PCR semicuantitativa para medir la expresión del mRNA y saber qué tanto se afecta la expresión de *prg* en los diferentes alelos mutantes. Analizamos organismos homocigotos de los tres alelos mutantes de *prg* y los comparamos con sus hermanos heterocigotos durante la etapa de cerrado dorsal. Los organismos homocigotos de los alelos *prg*¹ y *prg*² no presentan diferencias significativas

comparados con sus controles heterocigotos. Sin embargo, el homocigoto del alelo *prg*³ tiene una expresión reducida del transcrito comparada con su control (Fig. 16).

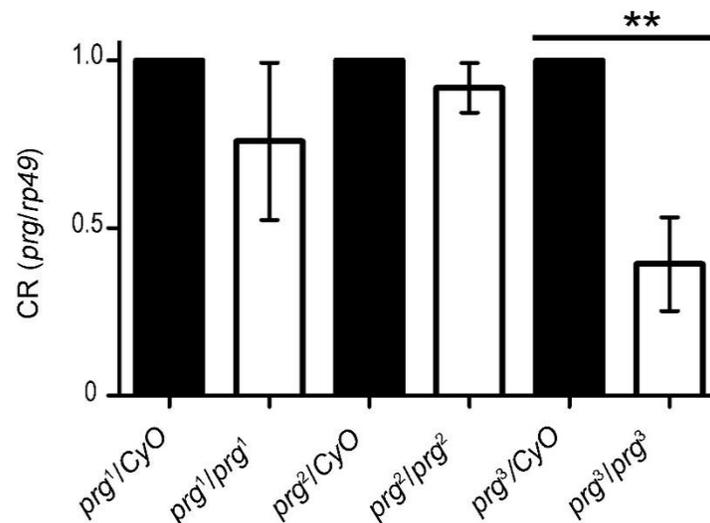


Figura 16. El análisis de la expresión de *prg* en los distintos alelos mutantes. Los homocigotos mutantes de *prg*³ tienen una expresión reducida del transcrito comparada con su control. Los organismos heterocigotos son viables y no presentan ningún fenotipo, y por eso fueron usados como controles. CR= cuantificación relativa usando *rp49* como control interno en la RT-PCR. ** Es con un nivel de $\alpha \leq 0.01$, cuando se utilizó una “t de student” para el análisis estadístico.

2. Los embriones con el ARNi de *prg* tienen alteraciones de cerrado dorsal

La construcción que expresa el ARN de doble cadena en las líneas UAS-*prg*^{R1} y UAS-*prg*^{R3} está insertada en el cromosoma 3. La inserción de la construcción en estas dos líneas genera semi-letalidad embrionaria con fenotipo de apertura dorsal. Esta característica es interesante porque la construcción sola no debería de causar alteraciones. Estos datos sugieren que el promotor de expresión basal (*hsp70*) que se encuentra río abajo de las secuencias UAS en la construcción permite que este ARNi de *prg* se exprese en niveles bajos (expresión “leaky”). Datos preliminares con UAS-*prg*^{R1} nos muestran que la expresión “leaky” parece ser suficiente para anular al mensajero de *prg* en el cerrado dorsal a 25°C, lo que genera estos fenotipos embrionarios (Fig. 17A). Para probar si esta construcción es sensible a la temperatura, sin la activación por Gal4, recolectamos embriones durante 24 horas (Fig. 17B) y 12 horas (Fig. 17C) y les aplicamos el choque térmico incubándolos a 37°C por 1 hora; dejamos desarrollarse a estos embriones por 24 horas a 25°C. Los embriones

homocigotos de UAS-*prg*^{R1}, que fueron sometidos al choque térmico y que no contienen a Gal4 se mueren con el mismo fenotipo que los embriones que no fueron sometidos al choque térmico. Estos resultados preliminares sugieren que la construcción del ARNi en las líneas UAS-*prg*^{R1} no responde a la temperatura, pero tiene expresión basal debida al promotor *hsp70* que genera letalidad embrionaria en el cerrado dorsal. Se ha observado que las construcciones con UAS con el promotor basal *hsp70* tienen una expresión “leaky” (Pfeiffer et al., 2010). Para probar la expresión del ARNi con el sistema UAS-Gal4, recolectamos embriones durante 12 horas con el genotipo *hs-Gal4/UAS-prg*^{R1} y los sometimos a un choque térmico de una hora. Estos embriones que tienen una copia de la construcción del ARNi de *prg* y una copia de Gal4 regulado por choque térmico presentaron cutículas con fenotipos más acusados (Fig. 17D). Las construcciones de UAS-*prg*^{R2} y UAS-*prg*^{R4} no presentaron cutículas con alteraciones aun en presencia de Gal4 y choque térmico (datos no mostrados). Un problema de las cepas que contienen las construcciones UAS-ARNi es que no pueden reducir la expresión de los mARNs a niveles nulos. La reducción en los niveles del mARN depende del sitio en donde se insertó la construcción en el cromosoma. Este problema se ha superado en otros estudios usando nuevas líneas transgénicas que tienen la construcción en un lugar caracterizado que asegura altos niveles de expresión (Ni et al., 2008). Es necesario hacer más experimentos con las construcciones del ARNi de *prg* en un futuro. Podríamos inducir la expresión de Gal4 de manera constitutiva usando *act-Gal4* y aumentar las copias de la construcción UAS-RNAi. Igualmente, podríamos combinar las construcciones de UAS-ARNi con los alelos mutantes de *prg* para reducir más los niveles de mARN de este gen. Además, podríamos disminuir la expresión de *prg* combinando las construcciones UAS-RNAi y *act-Gal4* con el transgen UAS-*dicer* (*Dicer* es la enzima que procesa el ARN de doble cadena para promover la acción de los ARNi). Además, podríamos cuantificar el mARN de *prg* en estas cepas para saber cómo se afectan la expresión de este gen como se hizo con los experimentos de rescate (ver apartado “3.2. Análisis molecular del rescate” en Resultados).

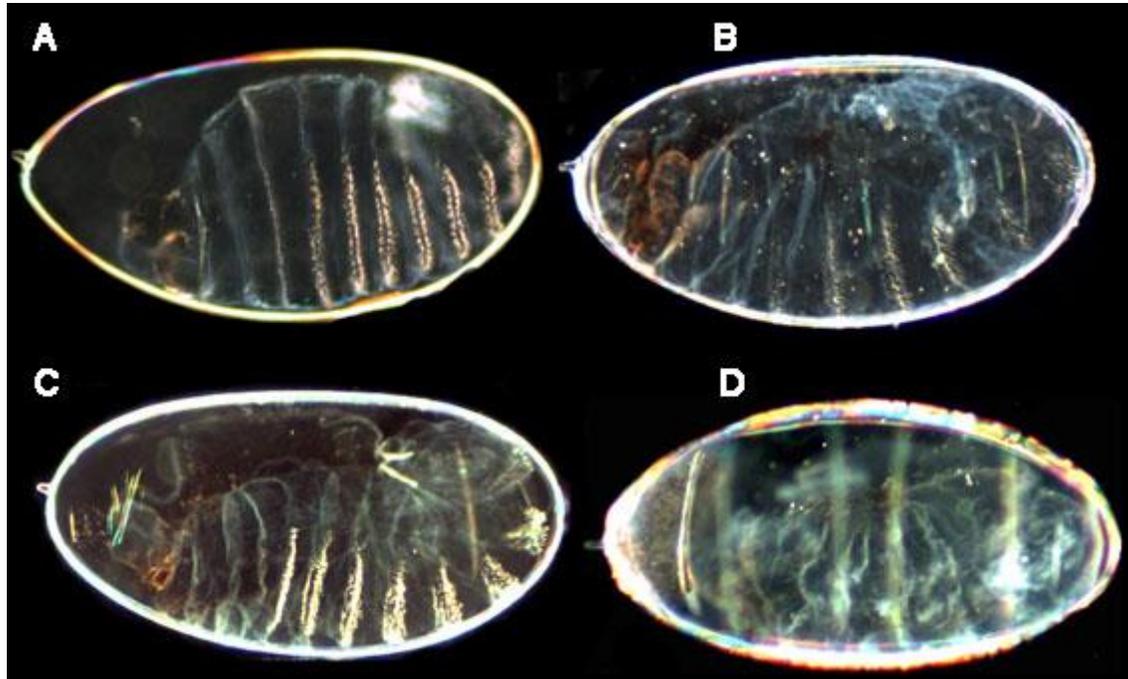


Figura 17. El análisis de los fenotipos de las líneas del ARNi de *prg*. Cutículas de embriones preparadas con la membrana vitelina. A) Embriones con dos copias de la construcción del RNAi de *prg* sin el activador y sin choque térmico. B) Embriones con dos copias de la construcción del ARNi de *prg* sin el activador, recolectados por 24 horas y expuestos a choque térmico. (C) Embriones con dos copias de la construcción del ARNi de *prg* sin el activador, recolectados por 12 horas y expuestos a choque térmico. D) Los embriones con una copia de la construcción del ARNi de *prg* y *hsp70-Gal4* que fueron recolectados por 12 horas y expuestos al choque térmico presentan un fenotipo más acusado (N= 34/376). Los genotipos son: *UAS-prg^{R1}/UAS-prg^{R1}* (A, B y C) y *UAS-prg^{R1}/hsp70-Gal4* (D).

3. Los experimentos del rescate de *prg*

Para demostrar de manera concluyente que el locus afectado en los organismos mutantes es el mismo que codifica a *prg* se hicieron experimentos de rescate. La construcción de rescate que se utilizó se generó a partir del cADN silvestre de *prg* clonado en un vector que introduce los sitios UAS para la expresión con el sistema bipartito UAS-Gal4. Usamos la cepa *UAS-prg^{C1}* que contienen la construcción de rescate en el cromosoma X e hicimos las cruza correspondientes para tener moscas con la construcción de rescate y la mutación de *prg*. Además, generamos moscas con la mutación de *prg* y *Gal4* (ver Materiales y Métodos).

3.1. La construcción silvestre rescata el fenotipo mutante embrionario de *prg*³

En el primer experimento cruzamos hembras *UAS-prg*^{C1}; *prg*³/*CyO* con machos *prg*³/*CyO*; *hsp70-Gal4*. Los embriones de la descendencia fueron recolectados por dos horas y se les permitió desarrollarse durante 10 horas. Después recibieron un choque térmico en una incubadora a 37°C por 1 hora y 30 minutos. Al expresarse *prg* silvestre a partir de esta construcción en todo el organismo durante el cerrado dorsal la letalidad embrionaria está disminuida y se suprime el fenotipo de apertura dorsal. Una copia de la construcción de rescate en el fondo mutante de *prg* con una copia de *hsp70-Gal4* sin inducir un choque térmico rescata el fenotipo de apertura dorsal, lo que sugiere una expresión basal de *prg* en esta construcción. Cuando analizamos el grado de apertura dorsal, encontramos que sin el choque térmico presentan predominantemente el fenotipo habitual de los nuevos alelos de *prg*, mientras que el 100% de las cutículas de los embriones expuestos a choque térmico tienen un fenotipo menos severo, aunque el rescate no fue completo (datos no mostrados).

Los fenotipos mutantes observados en las cutículas demuestran un periodo fenocrítico extendido (ya que las cutículas mutantes presentan diversos fenotipos) y la activación con el promotor de choque térmico dio un rescate incompleto durante el desarrollo embrionario, así que decidimos usar un promotor constitutivo (Fig. 18). Recombinamos *act-Gal4* en el mismo cromosoma del alelo *prg*³ (*act-Gal4*, *prg*³/*CyO*) y cruzamos esta línea con la línea *UAS-prg*^{C1}; *prg*³/*CyO* para rescatar el fenotipo mutante en su descendencia.

En la cruce control de la línea *act-Gal4*, *prg*³/*CyO* con la cepa *prg*³/*CyO* presenta descendencia muy parecida a la cruce de heterocigotos (*prg*³/*CyO* X *prg*³/*CyO*). Sin embargo, al usar la línea con la construcción de *prg* silvestre en el fondo heterocigoto de *prg*³ y cruzarlos con los heterocigotos de *prg*³ (*UAS-prg*^{C1}; *prg*³/*CyO* X *prg*³/*CyO*) se rescata parcialmente la embriogénesis en su descendencia. Finalmente, dirigiendo la expresión de la construcción *UAS-prg*^{C1} con el promotor constitutivo *act-Gal4* en el fondo mutante al hacer la cruce: *UAS-prg*^{C1}; *prg*³/*CyO* X *act-Gal4*, *prg*³/*CyO* se rescata toda la embriogénesis, aunque estos organismos no llegan a emerger como adultos (Fig. 18).

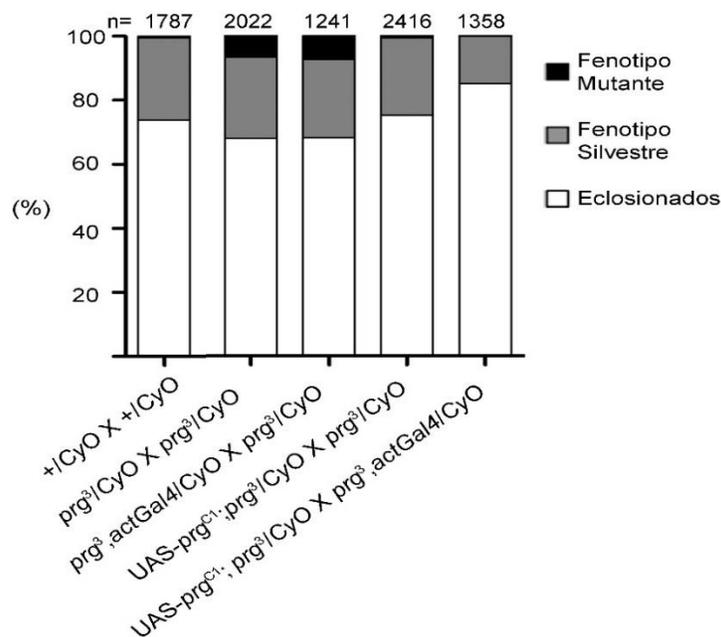


Figura 18. Los experimentos del rescate de *prg* durante la embriogénesis. La expresión de *prg* con la construcción silvestre (*UAS-prg^{C1}*) activada con un promotor constitutivo (*act-Gal4*) rescata completamente la embriogénesis de los homocigotos de *prg³* (barra de la extrema derecha). La presencia de una copia de la construcción silvestre de *prg* en el fondo homocigoto de *prg³* sin *Gal4* rescata parcialmente la embriogénesis (penúltima barra de izquierda a derecha). Una copia de *act-Gal4* en el fondo mutante de *prg* (barra del centro) es muy semejante a la que se observa en este fondo mutante solo (segunda barra de izquierda a derecha). La cruce de los individuos balanceados en un fondo silvestre fue usada como control (barra de extrema izquierda).

3.2. La construcción silvestre restablece el mRNA en los embriones mutantes

También analizamos la expresión del mRNA en los embriones con los diferentes genotipos al hacer las cruces de los experimentos del rescate con *act-Gal4* (Fig. 18). Este análisis fue más específico ya que seleccionamos a los embriones con los genotipos correspondientes por la ausencia de la fluorescencia cuando usamos cepas balanceadas con *CyO-GFP* en las cruces (ver Materiales y Métodos y Anexo I). Se analizó el nivel de expresión de *prg* en los diferentes embriones solamente durante la etapa de cerrado dorsal. Para estos experimentos se colectaron embriones durante dos horas y se les permitió llegar a esa etapa para hacer la extracción de mRNA. La cuantificación del mRNA de *prg* fue relativa en base a la expresión del gen constitutivo *rp49* (Fig. 19A). Además, utilizamos un par de

oligonucleótidos que nos permitiera discernir entre la amplificación de la región genómica y el cADN de cada gen generado por retrotranscripción. Esta estrategia nos permitió eliminar la posibilidad de una mala cuantificación por contaminación genómica solamente utilizando el producto de PCR del cADN de cada gen para la cuantificación (Fig. 19B).

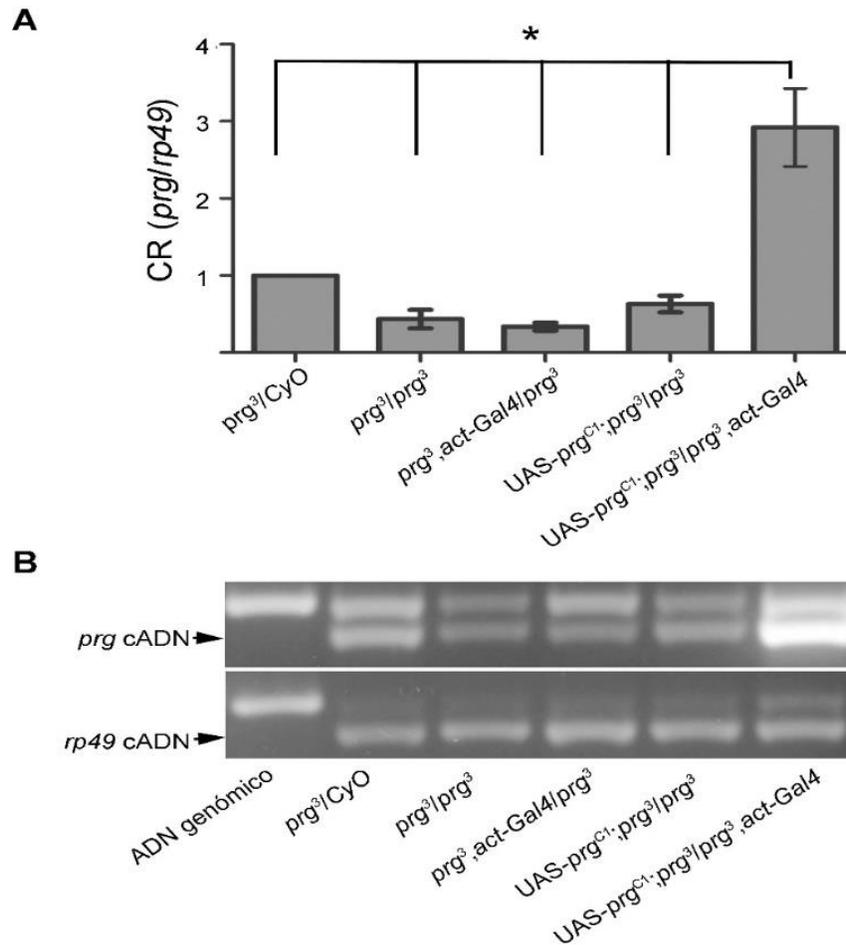


Figura 19. El análisis de la expresión de *prg* en los experimentos del rescate durante el cerrado dorsal. Los embriones que se usaron para la extracción de ARN fueron recolectados durante dos horas y se dejaron desarrollar hasta la etapa de cerrado dorsal. A) Cuantificación relativa (CR) del nivel de transcrito de *prg* usando *rp49* como control interno en la RT-PCR. Se analizó la intensidad de las bandas con el programa Kodak ID y se utilizó una “t de student” para el análisis estadístico con un nivel de $\alpha \leq 0.05$, comparando cada barra con la barra del extremo izquierdo. B) Productos de PCR después de la retrotranscripción de *prg*, se observan dos bandas en el gel pero solamente se usó la banda amplificada por el mRNA (cADN) de los genes para la cuantificación.

La cantidad de transcrito en los embriones homocigotos mutantes de *prg* (*prg³/prg³*) es menor que en los embriones control (*prg³/CyO*). El mRNA de *prg* en los homocigotos de

*prg*³ con una copia de *act-Gal4* (*prg*³, *act-Gal4/prg*³) es muy parecida a la de los embriones homocigotos mutantes (*prg*³/*prg*³). Los embriones homocigotos de *prg*³ con una copia de la construcción de rescate (*UAS-prg*^{C1}; *prg*³/*prg*³) tienen mayor cantidad del transcrito que la que se observa en los homocigotos de *prg*³, lo que sugiere expresión “leaky”. Esta expresión “leaky” podría explicar porque se rescata parcialmente el fenotipo mutante en esta combinación en los experimentos de rescate (Fig. 18). Finalmente, la cantidad de transcrito en los embriones con la construcción *UAS-prg*^{C1} y el promotor constitutivo *act-Gal4* en el fondo homocigoto mutante de *prg* (*UAS-prg*^{C1}; *prg*³/*act-Gal4*, *prg*³) es tres veces mayor que la de los embriones control (Fig. 19A). Esto podría explicar porque la activación del rescate con un promotor constitutivo rescata la embriogénesis, pero no rescata a los organismos hasta la etapa adulta (Fig. 18). Al parecer la expresión alta de *prg* puede ser también un problema para los embriones como la expresión reducida.

4. El análisis *in vivo* del cerrado dorsal

La letalidad embrionaria de los tres alelos mutantes de *prg* es muy baja comparada con la letalidad de otros genes relacionados al cerrado dorsal. El fenotipo mutante en las cutículas de embriones homocigotos para los tres alelos muestra requerimientos de *prg* desde etapas muy tempranas del desarrollo, el cerrado dorsal y hasta la involución de la cabeza. Sin embargo, hay mutantes que no mueren como embriones y alcanzan las etapas larvarias de primero y segundo estadio. Para comprender mejor esta baja penetrancia del fenotipo mutante embrionario, nosotros decidimos estudiar la dinámica del cerrado dorsal. Analizamos a los embriones mutantes de *prg* usando filmaciones *in vivo* con microscopía confocal de alta resolución. Para estos experimentos marcamos el contorno de las células con una proteína quimera DEcad:GFP. Este tipo de proteína quimera nos permitió estudiar la superficie apical de las células y registrar así el comportamiento celular (Fig.20).

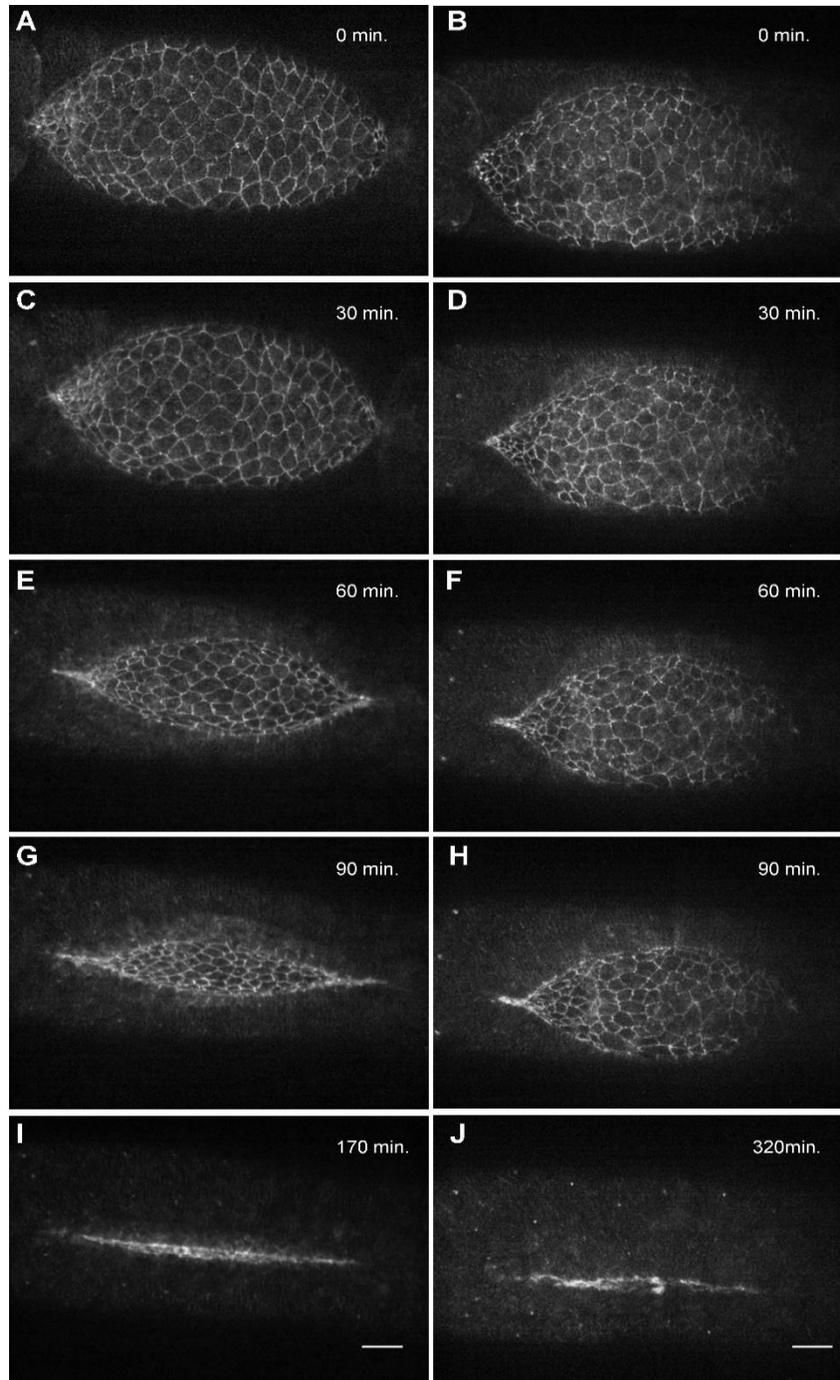


Figura 20. Filmaciones de microscopía confocal *in vivo* del cerrado dorsal de embriones silvestres y mutantes de *prg* que expresan Ecad:GFP. Imágenes tomadas de los videos de filmaciones *in vivo* con microscopía confocal de embriones. Los embriones silvestres (A, C, E, G e I) y homocigotos de *prg*³ (B, D, F, H y J) que expresan una proteína quimera de E-cadherina con GFP (DEcad:GFP) fueron filmados en la región dorsal durante toda la etapa del cerrado (Anexo II, VS1). Estos embriones se muestran con la parte anterior a la derecha. Las células más dorsales y de mayor área son las células de la amnioserosa, y las células con menor brillo en los contornos son las células del epitelio lateral. Los videos fueron obtenidos a 22°C. La barra de la escala es de 30µm.

Generamos embriones homocigotos mutantes de *prg*³ que contienen el alelo transgénico *DEcad:GFP* en el mismo cromosoma y los registramos en el microscopio confocal durante todo el tiempo que dura el proceso de cerrado (Anexo II, VS1). Los embriones mutantes de *prg* se comportan de acuerdo a lo que se observa en las cutículas, ya que algunos organismos mutantes mueren en el cerrado dorsal, mientras que otros terminan el proceso. Sin embargo, se pudo observar que todos los embriones mutantes que cierran lo hacen en un periodo de tiempo más largo comparados contra los embriones silvestres (Fig. 20 y Fig. 21B).

Para entender la etapa del cerrado dorsal en donde se presenta la alteración, comparamos la velocidad del cerrado de los embriones mutantes contra los silvestres, midiendo la distancia desde el frente de los epitelios contra-laterales (Fig. 21A-B). Las cinéticas del cerrado son diferentes significativamente. Aunque al inicio las pendientes de las curvas de la cinética del cerrado de los embriones silvestres y mutantes se ven muy semejantes, al final las pendientes cambian. Al inicio del cerrado dorsal los embriones mutantes de *prg* se comportan de manera similar a los embriones silvestres, y es en el “zipping”, la fase final del cerrado dorsal, la más afectada. Decidimos entonces medir esta última etapa a través de la reducción de la superficie apical de las células de la amnioserosa medial (Fig. 21A y Fig. 21C). Las células de la amnioserosa disminuyen su superficie apical de manera más lenta en los mutantes comparados con los controles durante el “zipping” (Fig. 21C). Una vez que ha avanzado el cerrado dorsal al término de la convergencia, los embriones comienzan a tener problemas en las células del epitelio lateral. En los embriones mutantes de *prg* que presentan el fenotipo más extremo durante el cerrado dorsal, las células se han estirado, pero pierden su organización en la parte más dorsal. Algunas células reducen el lado dorsal de la superficie apical cambiando su forma típica rectangular a una forma triangular. Estas células además se amontonan en un punto generando estructuras en forma de abanico invertido, mientras que otras células adyacentes se estiran de manera excesiva. Cuando estas células del epitelio lateral se han estirado demasiado en el eje anterior-posterior, en la zona en la que se une a la amnioserosa, terminan por desgarrarse.

Este desgarre ocurre predominantemente en la región anterior, lo que concuerda con el fenotipo que se observa en las cutículas mutantes.

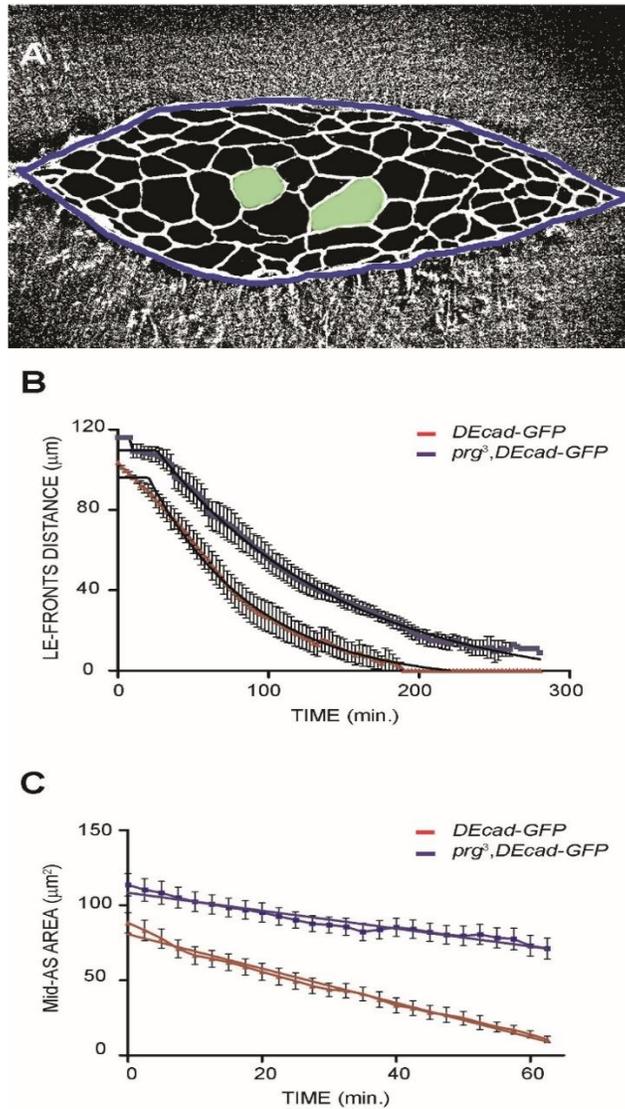


Figura 21. Dinámica del cerrado dorsal en embriones silvestres y mutantes de *prg*. A) Esquema que representa la región dorsal de un embrión que expresan la construcción *DEcad:GFP*, en donde se observan el contorno del epitelio lateral (línea azul) y los contornos de las células de la amnioserosa de la parte media (verde). La dinámica del cerrado dorsal se midió a través de la distancia entre los epitelios laterales (B) y a través de la reducción del área apical de las células mediales de la amnioserosa (C) y se graficaron contra tiempo. Los embriones silvestres (triángulos rojos) terminan el cerrado dorsal en un periodo de tiempo mucho menor que los homocigotos de *prg*³ (cuadrados azules).

Las moléculas principales que podrían estar regulando la interacción de la amnioserosa con el epitelio lateral son las integrinas codificadas por los genes *mys* y *scb* (Homsy et al., 2006). Analizamos la expresión de estos dos genes por RT-PCR semicuantitativa. Los embriones mutantes de *prg*³ muestran una reducción importante del mRNA de *mys* y *scb* comparados con los controles heterocigotos, pero los resultados no fueron concluyentes cuando se analizaron los fondos mutantes en las combinaciones de rescate (datos no mostrados). Analizamos también con esta técnica de filmaciones de microscopía confocal *in vivo* a los embriones mutantes hipomorfos de *bsk* y encontramos que en estos casos una proporción de embriones mutantes de *bsk* cierran, pero también tienen un tiempo de cerrado prolongado. Los embriones mutantes de *bsk* que no cierran presentan las mismas alteraciones en la forma celular del epitelio lateral que los mutantes de *prg* (Fig. 22).

Además, observando más detalladamente el “zipping”, nos dimos cuenta de que los embriones mutantes de *prg* con fenotipos menos severos cierran de manera anormal ya que los epitelios no se unen primero en los cantos como los silvestres (Anexo II, VS4). Datos preliminares del análisis del cerrado en los embriones mutantes de *prg* nos muestran el mismo defecto en el proceso de “zipping”, al hacer las filmaciones de microscopía confocal *in vivo* con una construcción *GFP:Moe* (Anexo II, VS5). La construcción *GFP:Moe* produce a la proteína moesina que se une al citoesqueleto de actina fusionada con GFP. Este tipo de alteración en el cerrado sugiere alguna modificación de los filopodios que participan en el “zipping” causando la anormalidad en la unión de los dos epitelios laterales en la línea media dorsal (Fig. 23). Desafortunadamente, la proteína fusión *Moe:GFP* que utilizamos no fue lo suficientemente brillante como para poder analizar en detalle la alteración del cable de actina-miosina. Este cable se requiere normalmente en las células más dorsales del epitelio lateral (hilera guía) para facilitar el proceso de cerrado, pero los bordes irregulares de los epitelios en los embriones mutantes hicieron difícil el estudio de este elemento en las filmaciones *in vivo* a mayor amplificación.

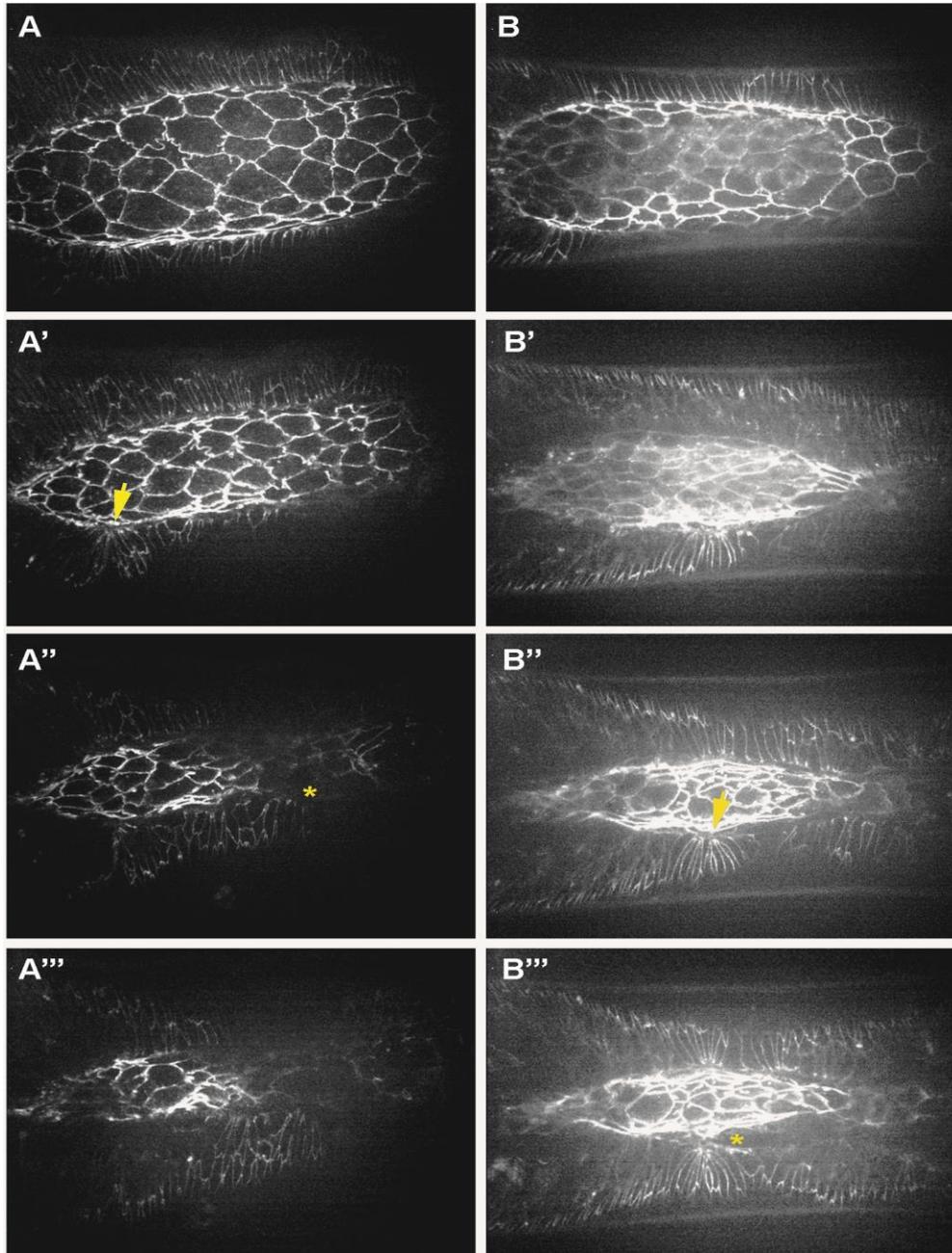


Figura 22. Filmaciones de microscopía confocal *in vivo* del fenotipo extremo de los embriones mutantes de *prg* y embriones mutantes de *bsk*. Imágenes de microscopía confocal tomadas de las filmaciones *in vivo* de embriones en una vista dorsal con la parte anterior a la derecha. El fenotipo embrionario extremo de los mutantes de *prg* (A-A''') (Anexo II, VS2) se asemeja al fenotipo embrionario de los mutantes de *bsk* (B-B''') (Anexo II, VS3). Los videos de los embriones homocigotos de *prg*³ (izquierda) y *bsk*¹ (derecha) que expresan DEcad:GFP fueron obtenidos a temperatura ambiente (22°C). Las células más dorsales del epitelio lateral se unen evidenciando una falla en el cable de actomiosina (flecha amarilla). El epitelio lateral en los mutantes de *prg* y *bsk* pierde su unión con la amnioserosa durante el cerrado dorsal lo que ocasiona una falla del cerrado (asterisco amarillo).

Sin embargo, experimentos preliminares con faloidina fluorescente, una droga que se une a los polímeros de actina, nos muestran que el cable de actina-miosina podría estar comprometido en los mutantes (datos no mostrados), y por lo tanto, es necesario hacer más experimentos para conocer la participación de *prg* en la regulación de estos componentes del citoesqueleto.

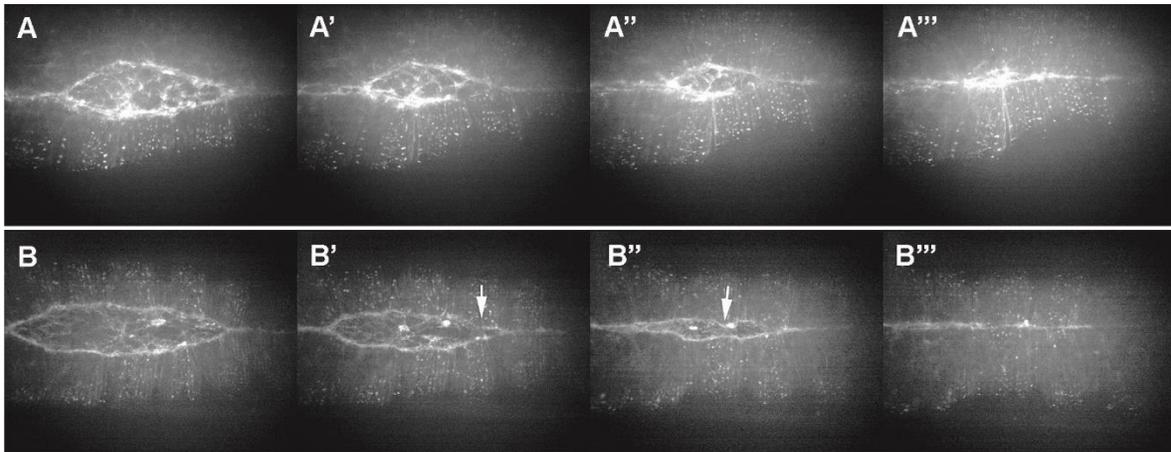


Figura 23. Filmaciones de microscopía confocal *in vivo* del cerrado dorsal de embriones silvestres y mutantes de *prg* que expresan GFP:Moe. Imágenes tomadas de los videos de microscopía confocal *in vivo* de embriones. Los embriones silvestres (A-A''') y homocigotos de *prg*³ (B-B''') que expresan una proteína quimera de moesina con GFP (GFP:Moe) fueron filmados en la región dorsal durante toda la etapa del cerrado (Anexo II, VS5). Los embriones están orientados con la parte anterior a la derecha. Las células más dorsales y de mayor área son las células de la amnioserosa; las células con menor brillo en los contornos son las células del epitelio lateral. Las flechas señalan un mal cerrado durante el “zippering” en los embriones homocigotos de *prg*³. Los videos fueron obtenidos a 22°C.

5. Las interacciones genéticas

5.1. ¿*prg* y la vía de la JNK interaccionan?

Para estudiar las interacciones de *prg* con miembros de la vía de la JNK, decidimos estudiar a los factores de transcripción: *Djun* y *Dfos*; y a la cinasa de Jun, *bsk*. En estos experimentos observamos que la letalidad de los organismos homocigotos mutantes de *prg* se reducen considerablemente cuando tenemos una copia de un alelo letal de *Djun* (*Djun*^{A109}). La letalidad de *Djun* también se reduce cuando hay una copia mutante de *prg* (Fig. 24A-B). Sin

embargo, al hacer el análisis con un alelo letal de *Dfos* (*kay¹*) se observó lo contrario con respecto a la cantidad de cutículas que presentan fenotipos mutantes de las distintas cruzas (Fig. 24E-F).

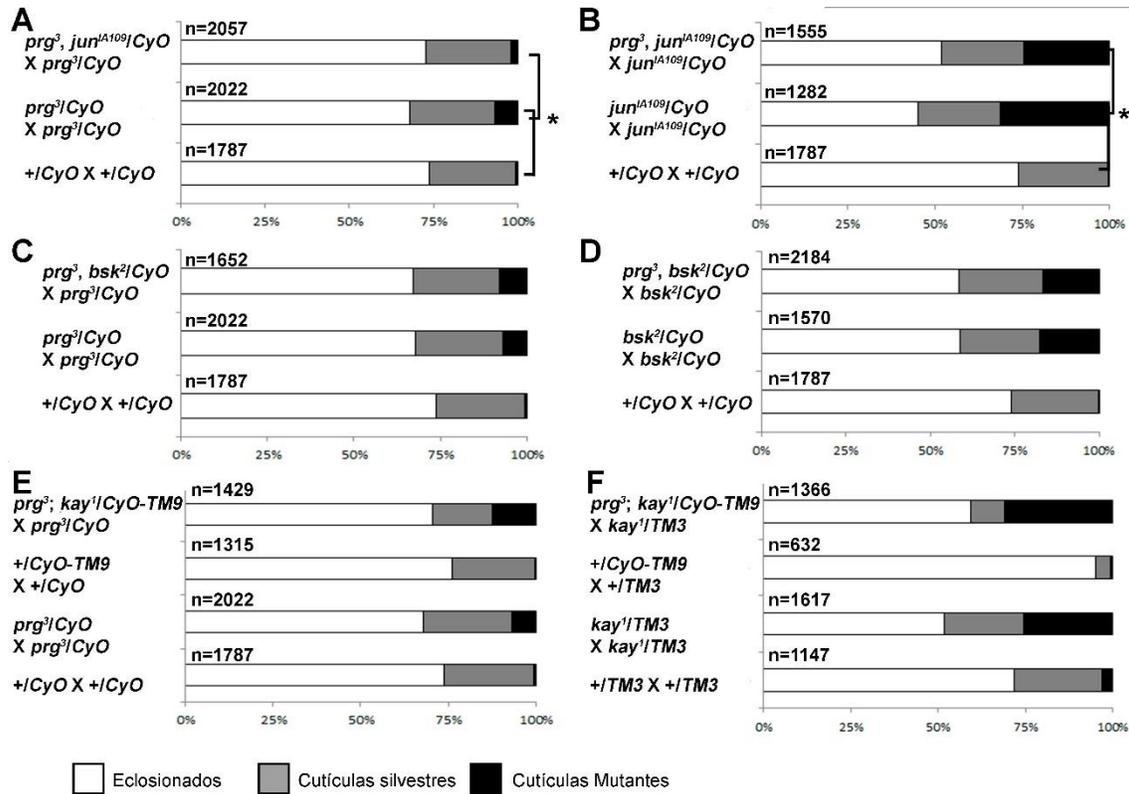


Figura 24. El análisis de las interacciones genéticas del alelo *prg³* con los genes que participan en la vía JNK. El porcentaje de fenotipos embrionarios se determinó con las cutículas divididas entre el total de embriones analizados después de 48 horas de ser ovipositados. La letalidad debida a los balanceadores se determinó cruzando moscas heterocigotas del balanceador en fondo silvestre (ORR): *+/CyO X +/CyO*, *+/TM3 X +/TM3*, *+/CyO-TM9 X +/CyO*, *+/CyO-TM9 X +/TM3*. En cada crusa “n” representa al número de embriones totales analizados.

Los alelos mutantes que analizamos de *Djun* y *Dfos* no nos permitieron encontrar alguna interacción, posiblemente porque son alelos nulos y no fueron tan sensibles para este análisis como esperábamos. Decidimos probar un alelo hipomorfo de *bsk* (*bsk²*). Las interacciones con este alelo no alteran la cantidad de cutículas con fenotipos mutantes en los homocigotos de *prg* y los mutantes de *prg* no se afectan con una copia mutante de *bsk* (Fig. 24C-D). La forma activada de *Djun* no arrojó resultados interesantes ya que la letalidad de *prg* aumenta cuando se da un choque térmico, pero todos ellos presentan fenotipo

silvestre, lo que parece indicar que esta forma activada es deletérea y complica el análisis (datos no mostrados).

A pesar de que estos análisis no mostraron datos concluyentes, en el momento de procesar las cutículas para hacer el análisis, se observó que el grado de afección del fenotipo de apertura dorsal cambiaba en las distintas combinaciones. Si la banda germinal se retrae completamente pero el cerrado dorsal no se inicia, el fenotipo sería con una cutícula completamente extendida. Este tipo de fenotipo está presente en los mutantes de *bsk* a los que se les eliminó la contribución materna. Si el cerrado dorsal se inició y la parte anterior no selló, el embrión quedaría con la cabeza sin formar y con un hoyo dorsal. Este fenotipo está presente en los embriones mutantes de *Djun*. Si la mayor parte del cerrado se llevó a cabo, pero la parte anterior no, tendríamos un embrión con un hoyo dorsal pequeño y sin cabeza como los que se observan en los nuevos alelos de *prg*. Finalmente, si el cerrado dorsal se da en los dos extremos del embrión, pero al final no culmina, el embrión tendría un hoyo muy pequeño, pero en la parte central. Este fenotipo está presente en los alelos iniciales de *prg*, por el cual deriva su nombre de “*piragua*”. Cuando se evaluaron estos grados de apertura en las distintas combinaciones se pudo apreciar mejor el efecto de la interacción. El fenotipo de *Djun* se realza cuando tiene una copia mutante de *prg* y este efecto se ve más drástico cuando se presentan dos copias de *prg*. Lo mismo ocurre con *Dfos*, pero con *bsk* la interacción es más discreta. Por otra parte, el fenotipo de *prg* no se altera cuando se le agrega alguna mutación de genes de la vía de la JNK (datos no mostrados).

5.2. *prg* y *fwe* interaccionan genéticamente durante el desarrollo embrionario

En los estudios de supercompetencia de Rhiner et al. (2010) se identificó a *prg* como un gen de expresión temprana, necesario para la muerte de las células específicas en los discos imagales del ala. En estos estudios también se observó la expresión temprana de *flower* (*fwe*). Estos experimentos demuestran que las células que mueren expresan menos Myc (“perdedoras”) en el mismo disco que contiene células con más Myc (“ganadoras”) que presentan niveles aumentados de *prg* y *fwe*. La inhibición de los genes que se expresaron

temprano en este tamizaje con distintas líneas de ARNi mostraron que sólo tres genes son necesarios para la eliminación de las células perdedoras: *prg*, *fwe* y *lamp1*. No se sabe mucho acerca de *lamp1* y los alelos reportados son viables y fértiles (Hofmann y Munro 2006; Gramates et al. 2016), así que decidimos estudiar la interacción genética con *fwe*.

fwe codifica a un canal de calcio de la membrana plasmática. Este gen sufre corte y empalme alternativo, lo que genera tres diferentes isoformas de la proteína Fwe: la proteína Fwe completa, y dos formas cortas (Fwe^{LoseA} y Fwe^{LoseB}). En el ensayo de supercompetencia las células “perdedoras” que serán eliminadas expresan *fwe*^{LoseA} y *fwe*^{LoseB}, mientras que, en el desarrollo normal del ojo, otro escenario completamente distinto, las células que se eliminan expresan solamente *fwe*^{LoseB}. Nosotros decidimos analizar interacciones de *prg* y *fwe* en el desarrollo embrionario. Para esto, primero analizamos si los alelos mutantes de *fwe* presentaban alteraciones del desarrollo que fueran comparables con los fenotipos mutantes de *prg*. En estos experimentos, para que los datos fueran más limpios, nosotros balanceamos las líneas con balanceadores-GFP y solamente seleccionamos los individuos que no presentaron fluorescencia en la descendencia de las cruza. Además, estandarizamos los porcentajes en base a lo observado a una línea silvestre (*yw*); analizamos cuatro alelos mutantes, pero sólo dos presentan alteraciones embrionarias y sólo con estos alelos trabajamos. Los alelos *fwe*^{HP35545} y *fwe*^{EY08496} presentan un periodo fenocrítico que cubre desde la etapa embrionaria hasta larva de primer estadio. Aproximadamente tres cuartos de los embriones homocigotos mutantes de *fwe*^{HP35545} mueren como larvas de primer estadio (74.5%) y el resto como embriones (24.5%), mientras que cerca de la mitad de los homocigotos mutantes *fwe*^{EY08496} se mueren como larvas de primer estadio (47.7%) y el resto como embriones (52.3%) (Fig. 25). Una proporción de los embriones muertos analizados en *fwe*^{HP35545} no formaron cutículas (Fig. 25A) y un cuarto presentó defectos de involución de la cabeza (Fig. 25B), mientras que del alelo *fwe*^{EY08496} dos tercios de los embriones analizados tienen defectos de involución de la cabeza (Fig. 25B). Estos datos nos demuestran que el alelo *fwe*^{EY08496} es el más fuerte de estos dos.

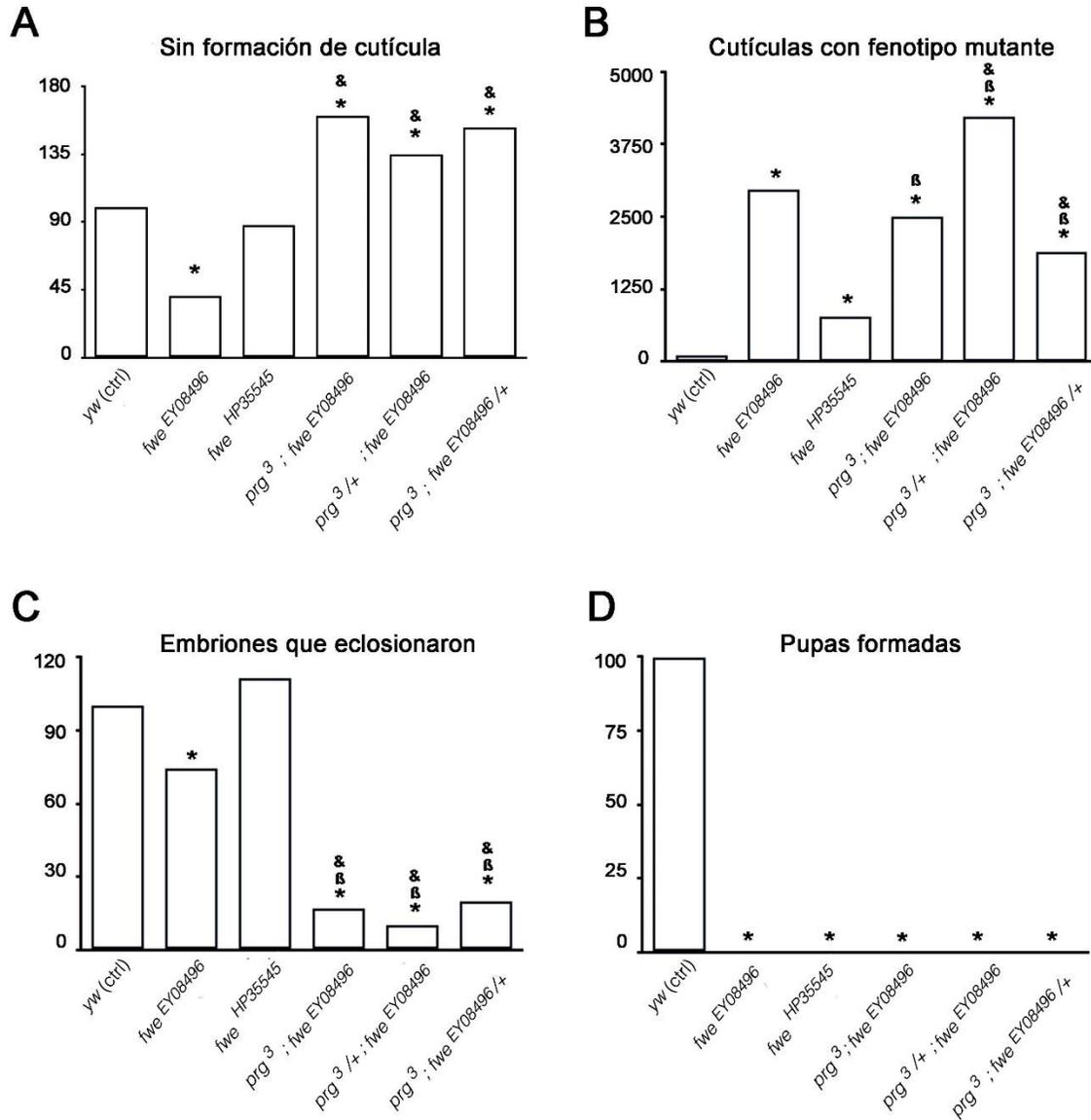


Figura 25. El análisis de las interacciones genéticas de *prg* con *fwe*. A) Frecuencia normalizada de embriones que no forman cutícula (membrana vitelina vacía). B) Frecuencia normalizada de cutículas con fenotipos mutantes (aperturas dorsales y defectos de involución de la cabeza). C) Frecuencia normalizada de larvas que eclosionaron. D) Frecuencia normalizada de pupas formadas (en los mutantes no se observó ninguna pupa). En este experimento se cruzaron cepas balanceadas con *CyO-GFP* y se seleccionaron solamente los genotipos correspondientes en la descendencia. Se contaron las larvas que eclosionaron y las cutículas de los embriones que murieron después de 48 horas de ser ovipositados. Los datos se normalizaron de acuerdo a lo obtenido en los organismos silvestres, usando la cepa *yw* como control (ajustando a 100). Para todos los paneles (*) es la diferencia significativa ($p < 0.05$, χ^2) contra la línea control, (β) contra el alelo *prg*³ y (&) contra el alelo *fwe*^{EY08496}. n = 583 para *yw*, 1237 para *fwe*^{EY08496}, 677 para *fwe*^{HP35545}, 541 para *prg*³; *fwe*^{EY08496}, 166 para *prg*³/+; *fwe*^{EY08496} y 79 para *prg*³; *fwe*^{EY08496}/+.

Además, los defectos de involución de la cabeza son el fenotipo mutante embrionario predominante en los alelos de *fwe*, aunque también presentan apertura dorsal. *prg* y *fwe* presentan fenotipos mutantes similares, ambos tienen embriones que no forman cutícula, defectos en el cerrado dorsal e involución de la cabeza y embriones que eclosionan (Fig. 25C) pero que no llegan a formar pupas (Fig. 25D) y mueren como larvas de primero-segundo estadio. Una vez analizados los fenotipos de *fwe* se evaluaron diferentes combinaciones para valorar las interacciones genéticas con *prg*. En el fondo homocigoto mutante de *fwe*^{EY08496}, con una o dos copias mutantes de *prg*³, la cantidad de embriones que eclosiona disminuye significativamente (Fig. 25C) y la cantidad de los que no producen cutícula aumenta (Fig. 25A). En el fondo homocigoto mutante de *prg*³, con una o dos copias mutantes de *fwe*^{EY08496}, la cantidad de embriones que eclosiona disminuye significativamente (Fig. 25C) y la cantidad de los embriones que producen cutícula con defectos aumenta (Fig. 25B). Estos datos demuestran que *prg* y *fwe* interactúan genéticamente.

6. *prg* se requiere para la ovogénesis

La presencia del mRNA y la proteína Prg en embriones tempranos (Fig. 5) demuestra que hay contribución materna de este gen. Para saber si *prg* se requiere más temprano en el desarrollo, debimos estudiar el efecto de eliminar la contribución materna. Generamos líneas recombinantes de *prg*¹ y *prg*³ con la secuencia FRT en la posición 40A y así inducimos la formación de mosaicos genéticos. Estudiamos ovocitos y huevos a partir de células homocigotas mutantes de *prg*, generando clones de la línea germinal usando el sistema FLP-DFS según Chou y Perrimon (1996).

Los huevos que no contienen contribución materna de *prg*, que derivan de células germinales homocigotas para este gen, presentan alteraciones morfológicas. Éstos son de menor longitud y este defecto puede deberse a la falta de volumen del vitelo. Además, estos huevos presentan alteraciones del desarrollo de los apéndices anteriores (Fig. 26).

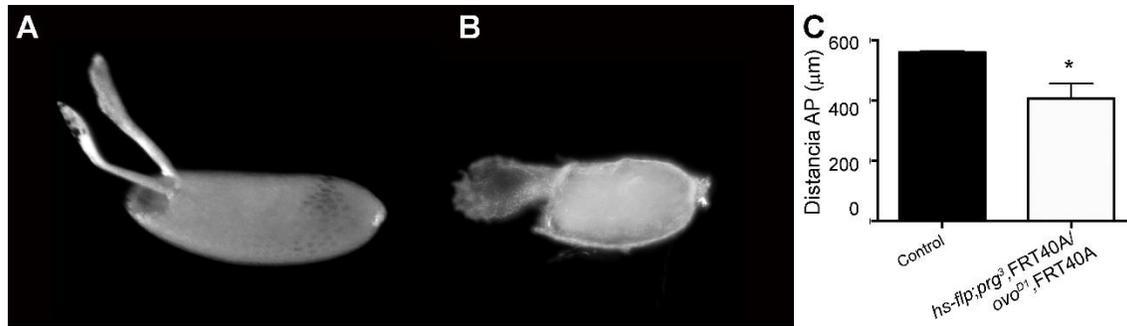


Figura 26. Evaluación del fenotipo mutante de los clones de línea germinal de *prg*. A) Huevo control generado a partir de una hembra heterocigota de *prg*, B) Huevo sin contribución materna de *prg* generado a partir de una hembra mosaico genético. Los genotipos son: *hs-flp; prg³, FRT40A/CyO* (A) y *hs-flp; Ovo^{D1}, FRT40A/prg³, FRT40A* (B). C) Los clones de línea germinal de *prg* (n=16) muestran diferencias significativas en el tamaño comparados a los controles (n=8). Prueba “t de student” (p<0.05).

7. *prg* en la formación de las estructuras adultas

Estudiamos también posibles funciones de *prg* durante la formación del imago, ya que los datos del tamizaje genético en el desarrollo del tórax, realizados por Mummery-Widmer et al. (2009) con el ARNi de *prg* y los experimentos de supercompetencia de Rhiner et al. (2010) apoyan a la idea de que *prg* se requiere durante esta etapa. Realizamos primero una hibridación *in situ* para conocer la expresión del transcrito de *prg* en los discos imagales y después la formación de mosaicos genéticos con el sistema FRT-FLP.

7.1. *prg* se expresa en los discos imagales

Los datos de expresión por hibridación *in situ* de los discos imagales nos mostraron que *prg* se expresa en los discos que analizamos: los discos de ala (Fig. 27A-B), los discos de ojo-antena (Fig. 27C-D), y los discos de patas (Fig. 27E-F). La expresión de *prg* en los discos imagales es generalizada. *prg* se expresa en el disco de ojo-antena en mayor proporción en la zona que formará el ojo compuesto, particularmente en la región de células indiferenciadas por delante del surco morfogenético. Estos resultados son consistentes con funciones de *prg* en estas estructuras.

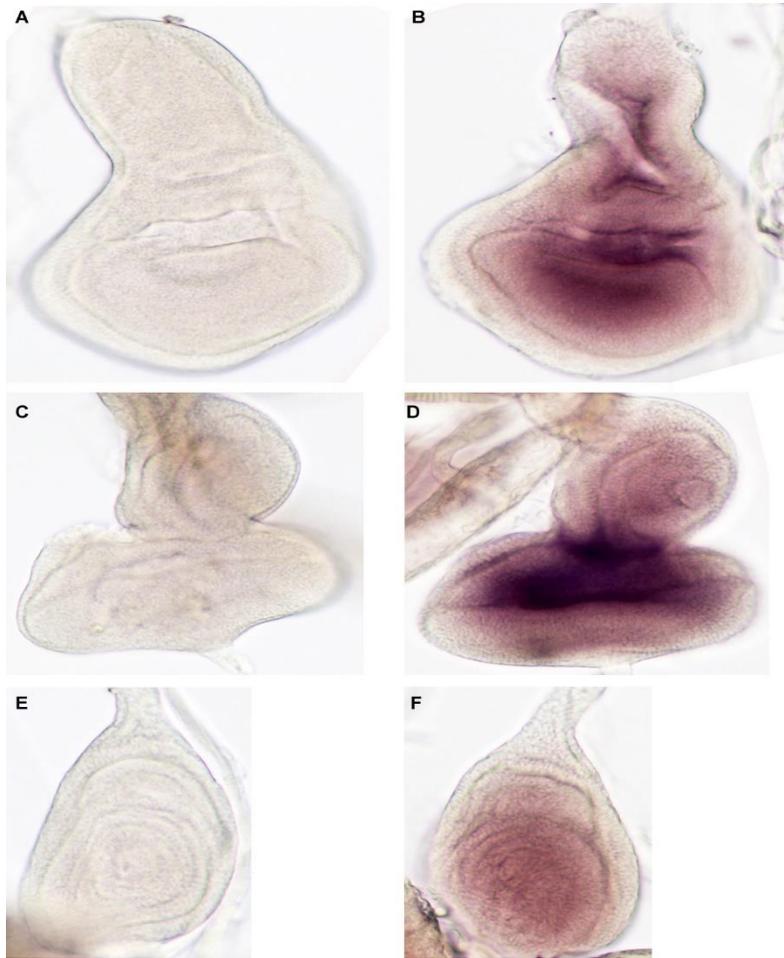


Figura 27. Hibridación *in situ* de *prg* en los discos imagales. Discos silvestres expuestos a la sonda antisentido (B, D y F) o sentido como control (A, C y D). A-B) discos imagales de alas, C-D) discos imagales de ojos y E-F) discos imagales de patas. La tinción fue hecha por precipitación del sustrato NBT-BCIP por AP-conjugada al anticuerpo anti-dig.

7.2. *prg* es necesario para la formación del tórax y el ala

Para conocer la función de *prg* durante la formación del imago también se indujo la formación de mosaicos genéticos (ver Anexo I). Analizamos grupos de células mutantes de *prg* en el tórax y el ala. Se generaron clones homocigotos de este gen en todo el organismo adulto usando el sistema FRT-FLP (Xu y Rubin, 1993), dirigiendo la expresión de la enzima recombinasa FLP por medio de un promotor de choque térmico (*hsp70-flp*) y usando como marcador un fondo genético que contiene el alelo *yellow* (*y*). Las moscas contienen un fondo genético mutante para el gen *y* que presenta un fenotipo recesivo de pigmentación

amarilla en la cutícula. Las células heterocigotas y las células que no contienen la mutación de *prg* tienen un transgen de *y* silvestre (y^+) que rescata al fenotipo de color de cutícula. Los clones de células homocigotas mutantes de *prg* no tienen el rescate y^+ , por lo tanto, tendrán el fenotipo de células amarillas. Larvas de 1^{er}, 2^o y 3^{er} estadio, fueron sometidas a un choque térmico de 1 hora y los clones formados en el tórax y las alas fueron reconocidos usando el marcador. Los clones homocigotos mutantes de *prg* en el tórax fueron difíciles de identificar, pero fue más fácil en la parte marginal del ala. A veces las células mutantes producen quetas muy pequeñas que se reconocen por la ausencia de pigmento (datos no mostrados).

Como el análisis de los clones mutantes de *prg* por medio del marcador y^- fue difícil de realizar, decidimos hacer los experimentos marcando a los clones con *forked* (*f*) (Fig. 28). Se observó prácticamente el mismo fenotipo anterior usando este marcador. Las moscas contienen un fondo genético mutante para *forked* (*f*) que presenta un fenotipo recesivo de quetas dobladas. Las células heterocigotas y las células que no contienen la mutación de *prg* tienen un transgen de *f* silvestre (f^+) que rescata al fenotipo mutante, dejando las quetas normales. Los clones de células homocigotas de *prg*¹ no tienen el rescate de f^+ , por lo tanto, tendrán el fenotipo de quetas dobladas. Comparados con las moscas control que fueron sometidos al mismo tratamiento (Fig. 28A-F), se encontró que las moscas adultas con clones mutantes presentan ausencia de microquetas y macroquetas en la región dorsal del tórax (Fig. 28G-I).

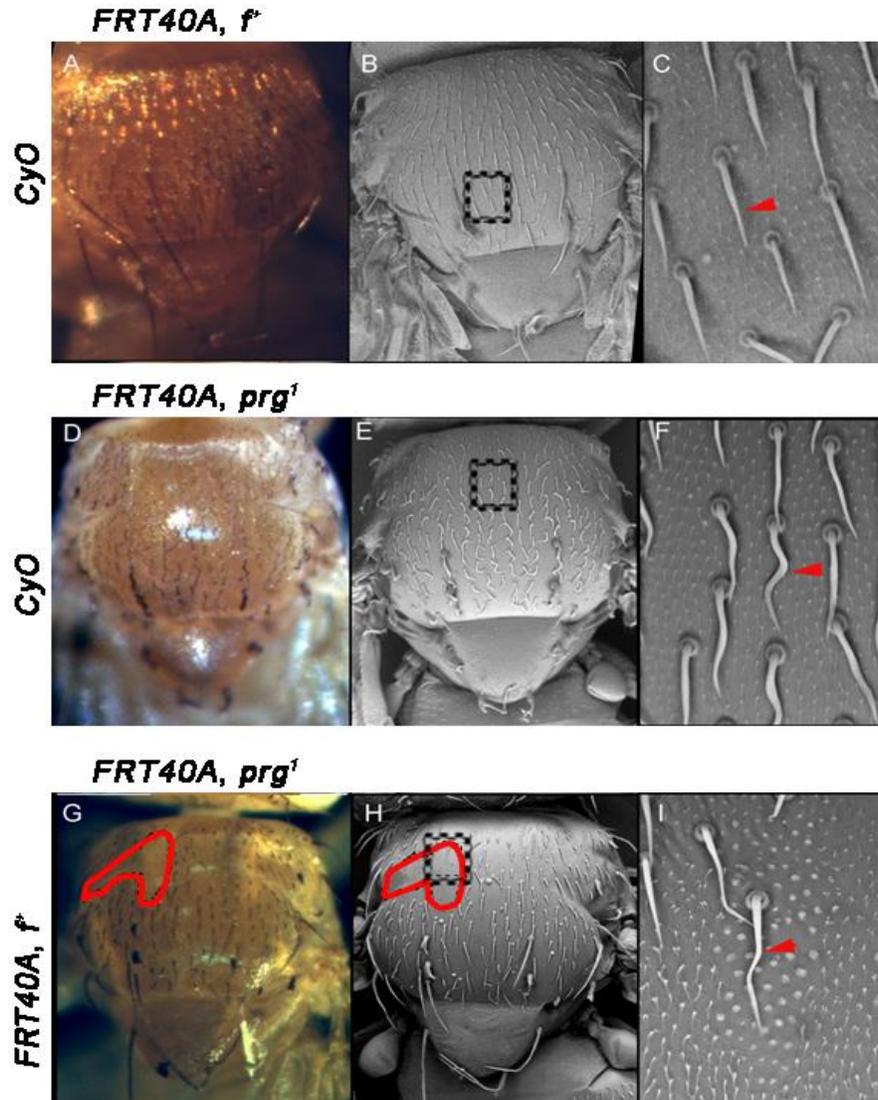


Figura 28. Estudio de clones los homocigotos de *prg*¹ en el tórax adulto. Imágenes de tórax de moscas adultas tomadas por microscopía óptica (A, D y G) y tomadas por microscopía electrónica de barrido (B, C, E, F, H e I). Los clones fueron generados por la técnica FRT-FLP usando moscas con fondo genético *f*^t (marcador de quetas torcidas) y dirigiendo la expresión de la recombinasa FLP con un promotor de choque térmico (*hsp70-flp*, ver Anexo I). Las moscas control que contienen un cromosoma balanceador (*CyO*) y un cromosoma con la secuencia FRT no sufren recombinación (A-F), aunque fueron sometidas a las mismas condiciones que las moscas que generan clones (G-I). A-C) Las moscas control que tienen además de *CyO* el cromosoma con *f*^t presentan todas las quetas normales. D-F) Las moscas control que tienen además de *CyO* el cromosoma con *prg*¹ presentan todas las quetas torcidas. G-I) Las moscas que tienen los dos cromosomas homólogos con la secuencia FRT son heterocigotas de *prg*¹ pero formaron clones homocigotos mutantes (*prg*¹/*prg*¹). Las áreas encerradas en rojo en G y H muestran la zona aproximada de los clones mutantes de *prg* que se han marcado con las quetas dobladas. Los clones de células silvestres que rodean a los clones mutantes están marcados con *mwh*⁻ (quetas extras). C, F e I) Ampliaciones correspondientes a los rectángulos con líneas punteadas en B, E y H. Las puntas de flecha señalan la forma de las quetas. Los genotipos completos de las moscas son: *f*, *hsp70-flp*; *f*^t, *FRT40A/CyO* (A-C); *f*, *hsp70-flp*; *prg*¹, *FRT40A/CyO* (D-F) y *f*, *hsp70-flp*; *prg*¹, *FRT40A/f*^t, *FRT40A* (G-I).

Los clones homocigotos mutantes de *prg*³ generados con esta técnica (Fig. 29), también presentaron los mismos fenotipos que el alelo *prg*¹. Estos fenotipos incluyen la ausencia de microquetas y macroquetas en la región dorsal en donde se encuentran los clones (Fig. 29F), estas moscas incluso presentaron un ligero fenotipo de hendidura torácica (Fig. 29E) en la región mutante, a diferencia de las moscas controles que no presentaron ninguna alteración en el tórax cuando se trataron de la misma manera (Fig. 29A-D).

Este fenotipo de hendidura torácica presente en los mosaicos genéticos de *prg*³ concuerda con lo que se observó en los experimentos de Mummery-Widmer et al. (2009), en donde se expresó un ARNi de *prg* en la línea media dorsal bajo el control de UAS usando *pnr-Gal4* (*pnr*^{MD237}). Estos experimentos de mosaicos genéticos con clones homocigotos mutantes de *prg* en el tórax del adulto demuestra claramente la importancia de este gen en el desarrollo de esta estructura.

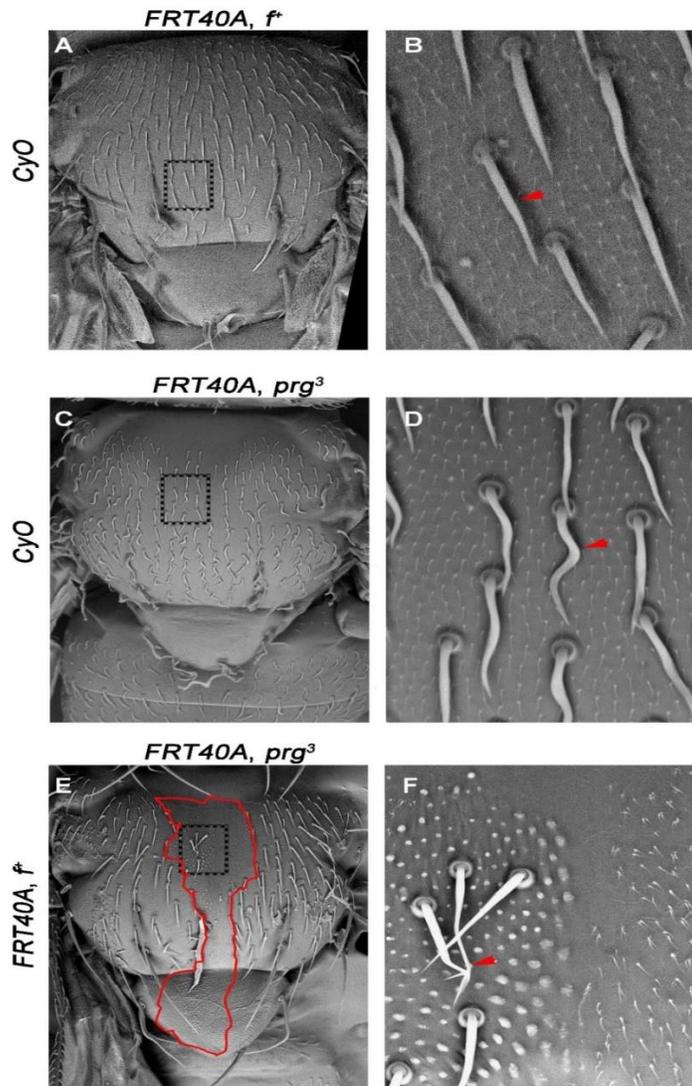


Figura 29. Estudio de los clones homocigotos de *prg³* en el tórax adulto. Imágenes de tórax de moscas adultas tomadas por microscopía electrónica de barrido. Los clones fueron generados por la técnica FRT-FLP usando moscas con fondo genético *f⁺* (marcador de quetas torcidas) y dirigiendo la expresión de la recombinasa FLP con un promotor de choque térmico (*hsp70-flp*, ver Anexo I). Las moscas control que contienen un cromosoma balanceador (*CyO*) y un cromosoma con la secuencia FRT no sufren recombinación (A-D), aunque fueron sometidas a las mismas condiciones que las moscas que generan clones (E-F). A-B) Las moscas control que tienen además de *CyO* el cromosoma con *f⁺* presentan las quetas normales. C-D) Las moscas control que tienen además de *CyO* el cromosoma con *prg³* presentan las quetas torcidas. E-F) Las moscas que tienen los dos cromosomas con la secuencia FRT son heterocigotas de *prg³* pero formaron clones homocigotos mutantes (*prg³/prg³*). El área encerrada en rojo en E muestra la zona aproximada de los clones mutantes de *prg* que se han marcado con las quetas dobladas. Los clones de las células homocigotas silvestres que rodean a los clones mutantes están marcadas con *mwh* (quetas extras). B, D y F) Ampliaciones correspondientes a los rectángulos con líneas punteadas en A, C y E. Las puntas de flecha muestran la forma de las macroquetas. Los genotipos completos de las moscas son: *f⁺, hsp70-flp; f⁺, FRT40A/CyO* (A-B); *f⁺, hsp70-flp; prg³, FRT40A/CyO* (C-D) y *f⁺, hsp70-flp; prg³, FRT40A/f⁺, FRT40A* (E-F).

7.3. *prg* es necesario para la formación del ojo compuesto

Los clones mutantes de *prg* se generaron en el ojo de manera tejido-específica usando nuevamente el sistema FRT-FLP. En este caso, inducimos la expresión de la recombinasa FLP en el disco imagal de ojo utilizando la región promotora del gen *eyeless* (*ey*). *ey* se expresa durante el estadio larvario en este tejido. Los clones homocigotos mutantes de *prg* fueron identificados por la ausencia de pigmento en zonas del ojo. Para ello usamos un marcador del color de ojos que es una mutación en *white* (*w*) y que presenta un fenotipo recesivo de ojos blancos.

Todas las moscas con genotipo *w*, *ey-flp*; *prg*¹, FRT40/*w*⁺, *arm-lacZ*, FRT40A que fueron sometidas a choque térmico presentaron clones mutantes en el ojo (n=100). Ninguna de las moscas control con genotipos: *w*, *ey-flp*; *w*⁺, FRT40A/*CyO* (n=100) o *w*, *ey-flp*; *prg*¹, FRT40A/*CyO* (n=100) presentaron clones. La zona en donde se encuentran los clones homocigotos mutantes de *prg* (Fig. 30C y D) generan omatidios con orificios en el cono, produciendo un fenotipo de ojo rugoso en esta región. Cuando se generaron los ojos compuestos con la mayoría de los omatidios con células homocigotas mutantes de *prg* por medio de la técnica "Minute" se observan ojos completamente rugosos (Fig. 30G y H). Todas las moscas con el genotipo *w*, *ey-flp*; *prg*¹, FRT40A/*w*⁺, *P{GMR-hid}*, FRT40A (n=100) formaron ojos rugosos. En esta técnica se utilizó una construcción de *hid* que se expresa en el disco del ojo durante el desarrollo (*P{GMR-hid}*). Esta construcción es letal celular y se encuentra en el cromosoma homólogo que no contiene la mutación de *prg*. Los clones de células homocigotas de la construcción *P{GMR-hid}*, que se generan por la recombinación, se mueren. Además, las células que contienen una copia de la construcción *P{GMR-hid}* son débiles y son superadas durante el desarrollo por la proliferación de los clones homocigotos mutantes de *prg*. Al final, la gran mayoría de las células que logran poblar el ojo durante el desarrollo son homocigotas mutantes de *prg*.

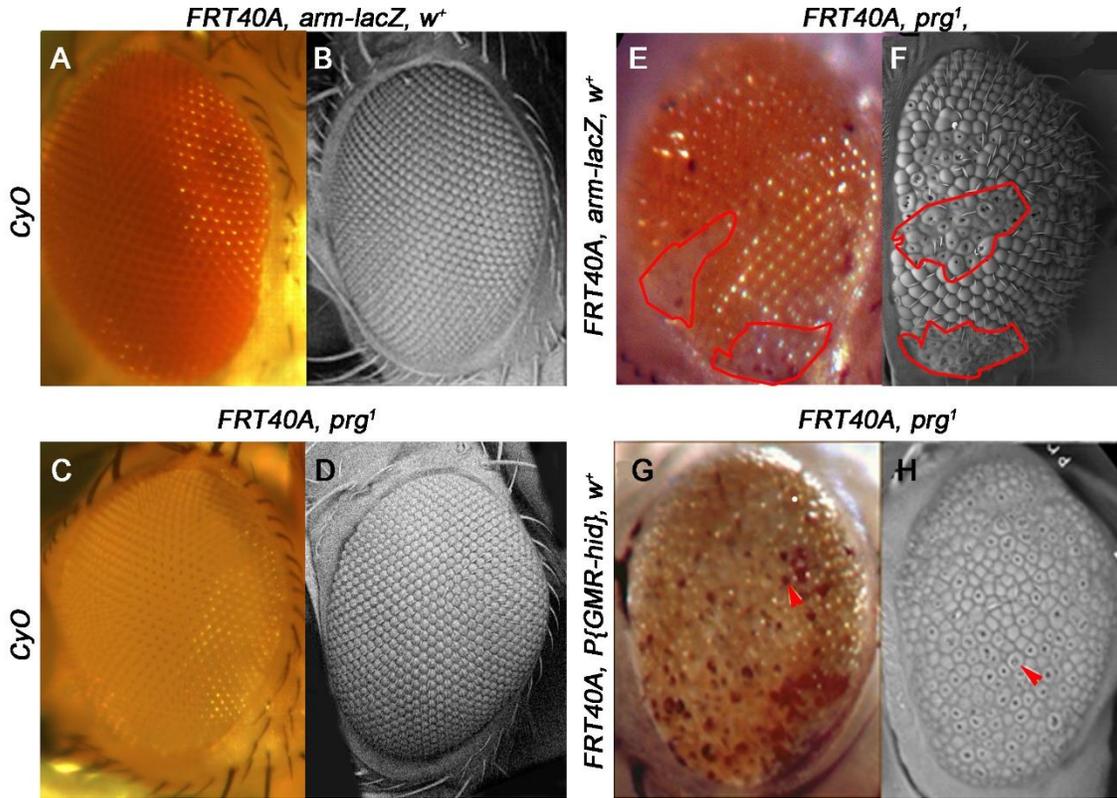


Figura 30.- Estudio de los clones homocigotos de prg^1 en el ojo compuesto. Imágenes de ojos adultos tomadas por microscopía óptica (A, C, E y G) y tomadas por microscopía electrónica de barrido (B, D, F, H). Los clones fueron generados por la técnica FRT-FLP usando moscas con fondo genético w^- (marcador de ojos blancos) y dirigiendo la expresión de la recombinasa FLP solamente en el ojo ($ey-flp$, ver Anexo I). Las moscas control que contienen un cromosoma balanceador (CyO) y un cromosoma con la secuencia FRT no sufren recombinación (A, B, E y F), aunque fueron sometidas a las mismas condiciones que las moscas que generan clones (C, D, G y H). A y B) Las moscas control que tienen además de CyO al cromosoma con w^+ presentan los ojos de color rojo. C y D) Las moscas control que tienen además de CyO al cromosoma con prg^1 presentan el ojo de color blanco. E y F) Las moscas que tienen los dos cromosomas homólogos con la secuencia FRT son heterocigotas de prg^1 pero formaron clones homocigotos mutantes (prg^1/prg^1). Las áreas encerradas en rojo muestran la zona aproximada de los clones mutantes de prg que se han marcado con la ausencia de pigmento. Las puntas de flecha señalan los hoyos en los omatidios dentro del área de los clones homocigotos de prg^1 . G y H) Ojo completamente homocigoto de prg^1 generado con la técnica "Minute" (ver Anexo I); los clones homocigotos de $P\{GMR-hid\}$ se mueren y los heterocigotos de prg^1 que contienen una copia de $P\{GMR-hid\}$ son débiles y proliferan más lento ($prg^1, FRT40A/w^+, P\{GMR-hid\}, FRT40A$). Los genotipos completos de las moscas son: $w^-, ey-flp; w^+, arm-lacZ, FRT40A/CyO$ (A y B); $w^-, ey-flp; prg^1, FRT40A/CyO$ (E y F); $w^-, ey-flp; prg^1, FRT40A/w^+, arm-lacZ, FRT40A$ (C y D); $w^-, ey-flp; prg^1, FRT40A/w^+, P\{GMR-hid\}, FRT40A$ (G y H).

Para analizar en detalle la citoarquitectura del ojo, se generaron cortes semifinos de 1.5 μm del ojo compuesto. Observamos un desarreglo interno de los omatidios por la pérdida de células fotorreceptoras y de células accesorias, y también, se encontraron estructuras de células picnóticas que parecían cuerpos apoptóticos en la retina. Cuando analizamos los mosaicos genéticos con clones de ojo completo por medio de la técnica “Minute” observamos el mismo fenotipo, pero más acusado (Fig. 31).

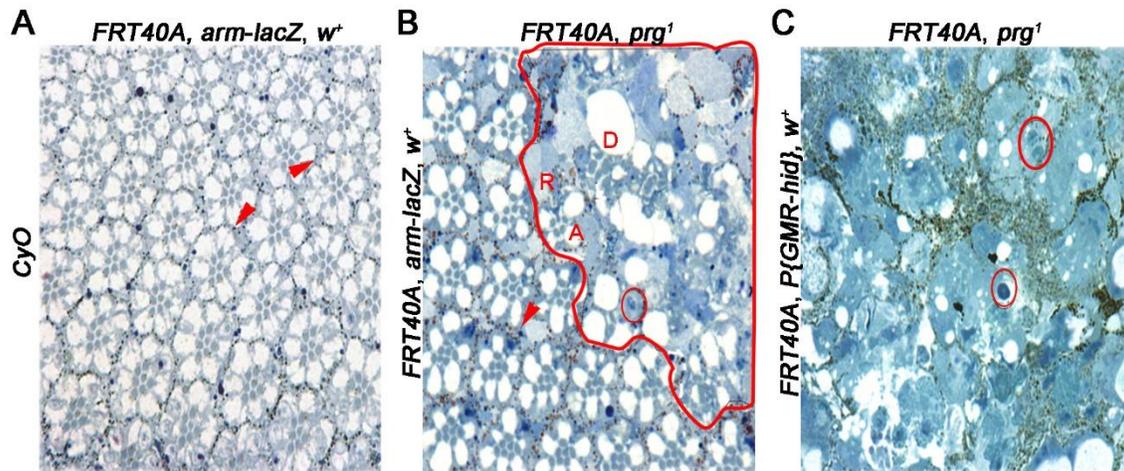


Figura 31.- Corte horizontal del ojo compuesto de los mosaicos genéticos de *prg¹*. Los clones fueron generados por la técnica FRT-FLP usando moscas con fondo genético *w* (marcador de ojos blancos) y dirigiendo la expresión de la recombinasa FLP solamente en el ojo (*ey-flp*, ver Anexo I). A) Corte de un ojo control que contiene *CyO* y un cromosoma con la secuencia FRT (las moscas no presentan la recombinación). Las puntas de flecha rojas marcan los gránulos de pigmento en los omatidios silvestres. B) Corte de un ojo con clones homocigotos de *prg¹* (producto de la recombinación); el área aproximada de los clones mutantes de *prg* está encerrada con rojo (ausencia de pigmento en los omatidios). Una letra R señala los omatidios rotados de manera incorrecta, una letra D los omatidios que se encuentran duplicados y una letra A señala la ausencia de algún fotorreceptor en un omatidio. C) Corte de un ojo completamente mutante para *prg¹* generado con la técnica “Minute” (ver Anexo I); los clones homocigotos de *P{GMR-hid}* se mueren y los heterocigotos de *prg¹* que contienen una copia de *P{GMR-hid}* son débiles y proliferan más lento (*prg¹, FRT40A/w⁺, P{GMR-hid}, FRT40A*). Las elipses señalan la presencia de cuerpos apoptóticos. Los genotipos completos de las moscas son: *w, ey-flp; w⁺, arm-lacZ, FRT40A/CyO* (A); *w, ey-flp; prg¹, FRT40A/w⁺, arm-lacZ, FRT40A* (B); *w, ey-flp; prg¹, FRT40A/w⁺, P{GMR-hid}, FRT40A* (C).

Los fenotipos observados en los clones mutantes de *prg*¹ en los ojos compuestos de los mosaicos genéticos se observan también en los clones de *prg*³ (Fig. 32). Los ojos control no presentan alteración (Fig. 32A-C) pero la región del ojo compuesto en donde se encuentran los clones homocigotos de *prg*³ presenta conos con hoyos (Fig. 32D-F). Además, esta zona del ojo compuesto en donde se encuentran los clones mutantes de *prg* no tiene quetas (Fig. 32E). La histología muestra el desarreglo interno de los tejidos en la zona de los clones homocigotos de *prg*³. Algunas trazas de células picnóticas se asemejan a cuerpos apoptóticos (Fig. 32F). Asimismo, los ojos completamente homocigotos de *prg*³ en los mosaicos genéticos generados por la técnica “Minute” (Fig. 32G-I) son rugosos (Fig. 32G-H). El fenotipo mutante que se observa en la región de los clones homocigotos mutantes de *prg*³ es más acusado cuando las células silvestres y heterocigotas son eliminadas por la expresión ectópica de *hid* (técnica “Minute”, ver Anexo I). Todos estos datos demuestran que *prg* se requiere durante la metamorfosis en la formación del ojo compuesto de *Drosophila*.

Para tratar de entender por qué las células del ojo se encuentran desarregladas o ausentes, hicimos tinciones por medio de inmunohistoquímica con un anticuerpo de mamífero contra la caspasa 3 activada en los discos imagales de ojos de larvas de tercer estadio. Este anticuerpo cruza con la caspasa 3 activa de *Drosophila* (Denton et al., 2008), por lo que una reacción positiva es un buen indicador de que las células están sufriendo apoptosis. Encontramos actividad de caspasa 3 en los clones mutantes de *prg* de los discos imagales de larvas de tercer estadio (datos preliminares) (Fig. 33).

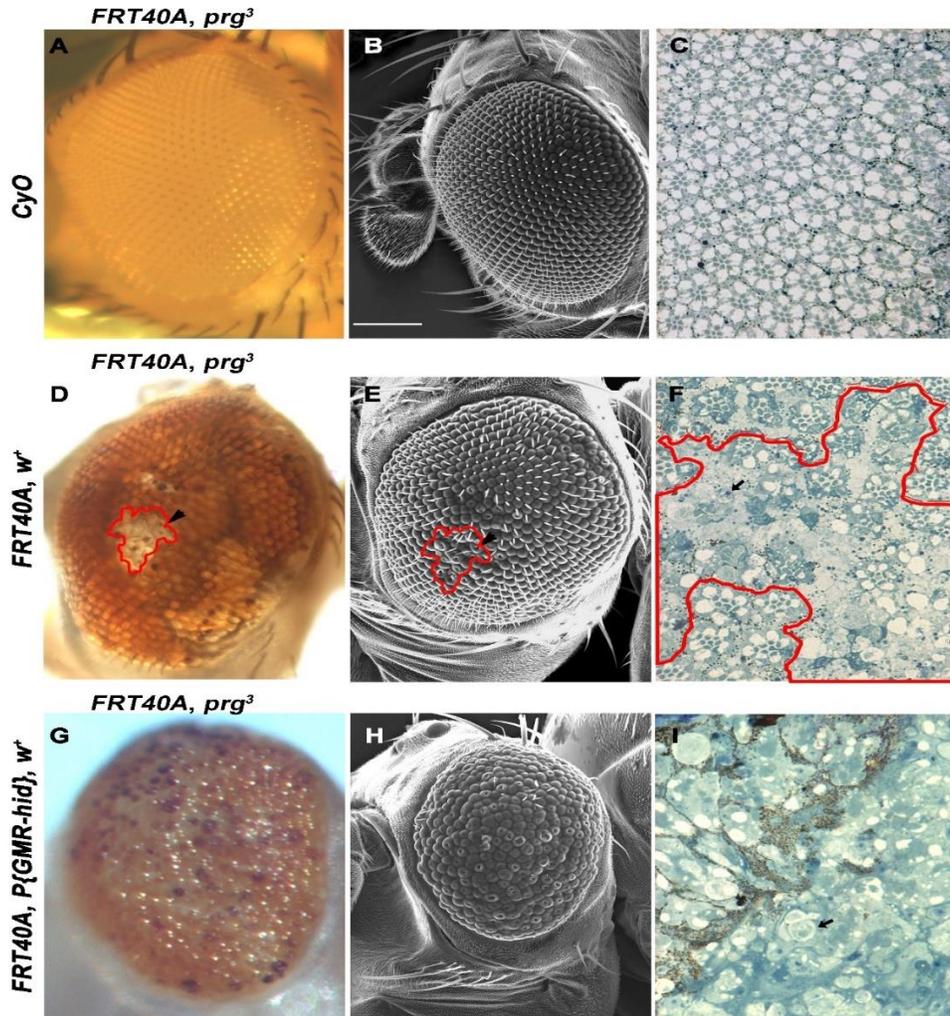


Figura 32.- Estudio de los clones homocigotos de *prg³* en el ojo compuesto. Imágenes de ojos compuestos tomadas por microscopía óptica de luz transmitida (A, D y G) o microscopía electrónica de barrido (B, E y H), además, imágenes de cortes horizontales de ojo (C, F e I). Los clones fueron generados por la técnica FRT-FLP usando moscas con fondo genético *w* (marcador recesivo de ojos blancos) y dirigiendo la expresión de la recombinasa FLP solamente en el ojo (*ey-flp*, ver Anexo I). Las moscas control que contienen un cromosoma balanceador (*CyO*) y un cromosoma con la secuencia FRT no sufren recombinación (A-C), aunque fueron sometidas a las mismas condiciones que las moscas que generan clones (D-I). A-C) Las moscas control que tienen además de *CyO* al cromosoma con *prg³* presentan el ojo de color blanco. D-F) Las moscas que tienen los dos cromosomas homólogos con la secuencia FRT son heterocigotas de *prg³* pero formaron clones homocigotos mutantes (*prg³/prg³*). Las áreas encerradas en rojo muestran la zona aproximada de los clones mutantes de *prg* que se han marcado con la ausencia de pigmento. Las puntas de flecha señalan los hoyos en los omatidios dentro del área de los clones homocigotos de *prg³*. Las flechas negras señalan a los cuerpos apoptóticos. G-I) Ojo completamente homocigoto de *prg³* generado con la técnica "Minute" (ver Anexo I); los clones homocigotos de *P{GMR-hid}* se mueren y los heterocigotos de *prg³* que contienen una copia de *P{GMR-hid}* son débiles y proliferan más lento (*prg¹, FRT40A/w⁺, P{GMR-hid}, FRT40A*). Los genotipos completos de las moscas son: *w, ey-flp; prg³, FRT40A/CyO* (A-C); *w, ey-flp; prg³, FRT40A/w⁺, arm-lacZ, FRT40A* (D-F); *w, ey-flp; prg³, FRT40A/w⁺, P{GMR-hid}, FRT40A* (G-I).

En la región de los clones, marcados por la ausencia de β -galactosidasa, se observa una expresión temprana de la caspasa 3 lo que sugiere que las células mutantes para *prg* sufren apoptosis ectópica (Fig.33). Esto puede explicar la ausencia de las células en la retina, pero aún no sabemos el mecanismo por el cual la ausencia de *prg* resulta en apoptosis ectópica. Este trabajo abre una nueva vertiente para estudiar los mecanismos del desarrollo necesarios en la formación del ojo compuesto en los que *prg* podría estar involucrado. Podríamos analizar las uniones intercelulares de las células que conforman el ojo, entre otras posibilidades para un trabajo posterior, ya que se ha visto que la pérdida de las uniones celulares puede generar apoptosis.

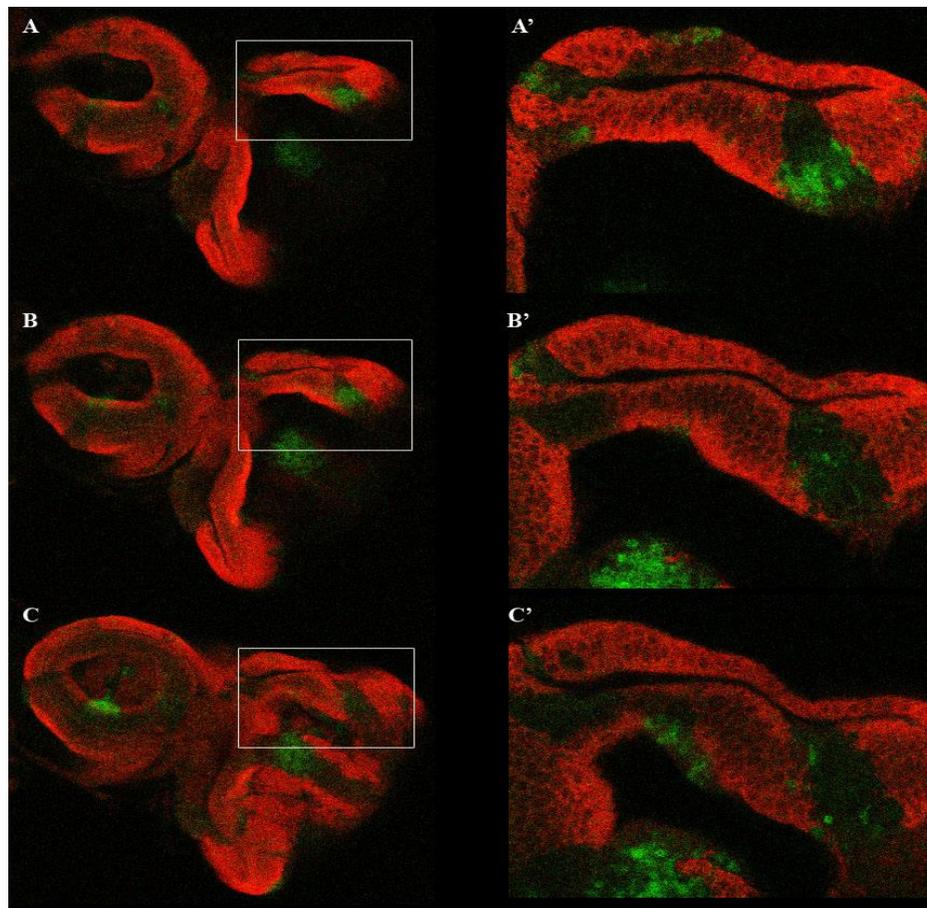


Figura 33.- Apoptosis en los discos imagales del ojo de los mosaicos genéticos de *prg*³. Imágenes de distintos planos focales del disco imagal del ojo de un mosaico genético tomada por microscopía confocal. El disco de ojo está orientado con la porción que forma la antena del lado izquierdo. Los clones homocigotos mutantes de *prg* están marcados por la ausencia de β -galactosidasa (ausencia del color rojo). El anticuerpo anti-caspasa 3 (verde) fue usado para mostrar la activación de la apoptosis. (A', B' y C') son ampliificaciones de los rectángulos en A, B y C respectivamente. El genotipo del disco es: *w*, *ey-flp*; *prg*³, *FRT40A/w*⁺, *arm-lacZ*, *FRT40A*.

DISCUSIÓN

Los dedos de zinc y la posible función de *prg*.

La secuencia genómica de *prg* nos muestra que este gen codifica a una proteína que contiene nueve motivos ZF-C2H2. Los genes que codifican proteínas que contienen este tipo de dedos de zinc son los más abundantes y versátiles en el genoma de los organismos eucariontes (Laity et al., 2001). Muchos estudios han mostrado que estos motivos C2H2 forman estructuras en forma de dígito. Los motivos C2H2 puede interaccionar directamente con el surco mayor del ADN, aunque también se han relacionado en la interacción proteína-proteína y otros tipos de dedos de Zn se han relacionado a la unión con el ARN (Matthews et al., 2000; Matthews y Sunde, 2002; Gamsjaeger et al., 2007; Razin et al., 2012). Además, *prg* contienen un dominio C4DM asociado a dedos de zinc o ZAD. Este dominio es muy específico de insectos y se ha asociado con las proteínas con múltiples dedos de Zn del tipo C2H2 (C2H2-ZFPs). Este dominio ZAD está presente en el producto de ~100 genes del tipo C2H2-ZFPs de *Drosophila* y solamente se ha encontrado un gen ortólogo en los genomas de vertebrados (Chung et al., 2007), lo que sugiere una expansión específica de linaje. Este dominio usualmente se encuentra en el extremo N-terminal del producto de estos genes (Chung et al., 2002; Chung et al., 2007). El dominio ZAD a pesar de ser muy interesante ha sido poco estudiado. Solamente algunos genes de ZAD-ZFPs se han caracterizado funcionalmente en *Drosophila*. La expresión generalizada de algunos de estos genes en el embrión ha sugerido que podrían realizar funciones redundantes (Knight y Shimeld, 2001). Sin embargo, los genes que contienen estos dominios realizan diversas funciones. *grauzone* (*grau*) y *serendipity* δ (*sry*- δ) codifican a factores de transcripción. *sry*- δ es necesario en el desarrollo embrionario y la pupa (Crozatier et al., 1992). *zeste-white-5/scs binding protein* (*Zw5/SBP*) es una proteína que se une a un “insulator” y promueve el bloqueo de la interacción enhancer-promotor (Gaszner et al., 1999), *poils au dos* (*pad*) actúa como posible represor transcripcional de *achaete* y *scute* (Gibert et al., 2005), *zif*, *dorsal interacting protein 1* (*dip1*) a un factor de transcripción asociado a Dorsal (Bhaskar et al., 2000; Chung et al., 2002) y *trade embargo* (*trem*) se requiere para la ruptura de doble cadena de ADN en la recombinación cromosómica (Lake et al., 2011). La caracterización que hicimos de *prg* en

este estudio nos comprueba la visión que tenemos acerca de la función versátil de este tipo de genes que codifican ZAD-ZFPs. *prg* demostró ser necesario en varias etapas del desarrollo de *Drosophila* y nos aporta información relevante para entender a este tipo de genes. El dominio ZAD en Prg incluso podría servir para dimerizarse con diferentes ZAD-ZFPs, como se sugiere que funciona para la proteína Grau (Jauch et al., 2003) y ayudar a reconocer distintas secuencias de manera específica para modular distintos procesos del desarrollo. Sería interesante hacer experimentos de electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturizantes y co-inmunoprecipitación para buscar la interacción con otras ZAD-ZFPs. Además, se ha hecho un esfuerzo importante de experimentos *in vitro* para buscar a los genes que regulan las ZAD-ZFPs, usando quimeras-GST, ensayos de cambio de movilidad electroforética y herramientas bioinformáticas. Las secuencias consenso obtenidas encontraron genes blanco de 21 ZAD-ZFPs, que muestran a estos genes de ZAD-ZFPs como reguladores importantes del desarrollo embrionario temprano (Krystel y Ayyanathan, 2013), aunque *prg* no fue estudiado en esos experimentos.

La mutación en el alelo *prg*³ y los experimentos de rescate.

En este estudio no pudimos encontrar las mutaciones en los alelos *prg*¹ y *prg*², lo que significa que las alteraciones moleculares de estos alelos no se encuentran en la región secuenciada; los experimentos de expresión por RT-PCR semicuantitativa no revelan una reducción significativa del mRNA de *prg* en estos mismos alelos. Sin embargo, logramos caracterizar la alteración molecular del alelo *prg*³ y el análisis de expresión reveló una reducción significativa del mRNA de *prg*. Las mutaciones *D57A* y *D76E* en el alelo *prg*³ afectan la posición 57 y 76 de la proteína, justo en donde se encuentra el dominio ZAD. La mutación *D76E* podría no alterar la función de Prg, ya que este cambio se encuentra conservado naturalmente en otras especies de *Drosophila*. Sin embargo, la mutación *D57A* sustituye a un aminoácido cargado (D) por uno no cargado (A) en la posición 57 de Prg que se encuentra dentro del dominio ZAD y se ha visto en otros genes que las mutaciones en el dominio ZAD producen alelos de pérdida de función (Crozier et al., 1992; Gaszner et al., 1999; Chung et al., 2002). Conjuntamente, logramos rescatar el fenotipo mutante de los embriones homocigotos de *prg*³ con dos construcciones UAS-*prg* usando *act-Gal4* pero las

larvas que sobrevivieron no lograron eclosionar como adultos. Estos datos son consistentes con que *prg* se requiere en otras etapas post-embrionarias y apoyan fuertemente que el locus *Dmel/CG9233* es el gen *prg*.

***prg* es un gen pleiotrópico.**

prg es un gen que se requiere en diversas etapas del desarrollo. Lo vemos expresado durante todo el desarrollo embrionario en el tejido precursor del epitelio y su necesidad se hace evidente en los fenotipos mutantes presentes en las cutículas embrionarias. La contribución materna hace difícil saber si *prg* se requiere más temprano en el desarrollo embrionario porque cuando la eliminamos se generaron problemas en la formación del huevo. Asimismo, se expresa en los diferentes discos imagales que analizamos: discos de ala, patas y ojo-antena. La expresión de *prg* en el disco de ojo-antena es generalizada, aunque está en mayor cantidad en la región que dará origen al ojo.

La expresión de *prg* en los discos imagales se correlacionó fuertemente con los fenotipos mutantes mostrados en los mosaicos genéticos. La expresión en el disco de ala correlaciona con la pérdida de quetas en la región media dorsal del tórax y una ligera hendidura torácica. La expresión en el disco de ojo-antena correlaciona con las alteraciones en la citoarquitectura del ojo compuesto: ausencia de quetas y perforaciones de los conos, lo que da una apariencia rugosa, junto con el desarreglo interno de la retina y hasta cuerpos picnóticos que sugieren cuerpos apoptóticos (datos preliminares de activación de Caspasa 3).

Es difícil juntar todos los datos para entender la función de *prg* en todos los tejidos y procesos del desarrollo en los que participa. No sabemos si su función sea instructiva, preparando a los tejidos para estos procesos. Sabemos que el desarrollo ocurre a través de procesos celulares como proliferación, diferenciación, cambio de forma celular, adhesión-migración, competencia celular y sobrevivencia-apoptosis (Gilbert et al., 2006); todo esto está regulado por cambios en la señalización celular y la expresión génica. *prg* afecta a varios de estos procesos del desarrollo lo que le atribuye un papel desde donde se pueden regular todos estos fenómenos. Es claro que los experimentos que siguen estarán

enfocados a buscar los genes que *prg* regula, para entender mejor la participación de *prg* a lo largo del desarrollo.

***prg* en la vía de la JNK.**

El fenotipo mutante de *bsk* en el análisis *in vivo* se asemeja al fenotipo mutante de *prg* a nivel molecular. Diversos segmentos embrionarios se alinean y se encuentran de manera aberrante durante la etapa del “zipping”. Estos defectos moleculares involucran posibles alteraciones en el cable de actina-miosina. Experimentos preliminares muestran un desalineamiento de los microtúbulos en las células del epitelio lateral de los embriones homocigotos mutantes de *prg*. Estos experimentos de filmaciones en *in vivo* con microscopía confocal no son concluyentes por una baja expresión de la proteína fusión de tubulina con GFP que usamos (*UAS-GFP:Tub* usando *act-Gal4*) (datos no mostrados). Sin embargo, abren la posibilidad de enfocar hacia allá nuestros estudios. Este defecto de desalineamiento de los microtúbulos es compartido por otros genes necesarios para el cerrado dorsal (García-Fernandez et al., 2007). El alineamiento anormal de los microtúbulos se debe a que el tejido presenta desgarros y por lo tanto los microtúbulos no se mantienen alineados, aunque se encuentran en la parte apical de las células epiteliales y forman manojos. Los embriones mutantes de *Djun* y *Dfos* también tienen alteraciones parecidas a los mutantes de *bsk* y *prg* pero más graves y más tempranos en el desarrollo, como se ha observado en los mutantes de *tkv* (García-Fernandez et al., 2007).

Los experimentos de interacción génica no son concluyentes, aunque sugieren que *prg* es epistático sobre los genes de la JNK y por lo tanto actúa arriba de la vía. Esto es debido a que la mayoría de los fenotipos mutantes de *prg* no se ven afectados por una copia mutante de *Djun* o *Dfos*. La presencia de una o dos copias mutantes de *prg* en los embriones homocigotos de *Djun* o *Dfos* tienen tendencia a ser más extremos. Otra coincidencia interesante es que los mutantes de genes de la vía de la JNK presentan fenotipos de hendidura torácica como *prg*, pero más acusados (Ríos-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013). Los fenotipos presentes en las cutículas de embriones homocigotos de los balanceadores no nos permitieron hacer el análisis de manera adecuada. Sería conveniente repetir esta serie

de experimentos usando balanceadores fluorescentes como se hizo para los estudios de interacciones genéticas con *fwe*.

El papel de *prg* y *fwe* en el desarrollo.

prg y *fwe* tienen fenotipos mutantes embrionarios similares, como la apertura dorsal y la apertura anterior en las cutículas embrionarias y además interactúan genéticamente. Asimismo, ambos presentan fenotipos similares en los ensayos de supercompetencia celular de los discos imagales del ala. Sin embargo, los fenotipos mutantes de *prg* son más extremos en el desarrollo del ojo, ya que *fwe* se necesita sólo para reconocer y eliminar las células sobrantes del contorno del ojo compuesto (Merino et al., 2013) y *prg* se necesita para la viabilidad y organización de todo el tejido. Aunque los dos genes se requieren para la eliminación de las células “perdedoras” en un contexto anormal de supercompetencia, esto puede reflejar un papel más extenso y vital de *prg* en las estructuras imagales, mientras que *fwe* puede tener un papel más circunscrito a la competencia celular de células similares. Además, aunque *prg* no tiene homólogos en humanos, sí existe un gen que codifica a un ZAD-ZFP en mamíferos que podría ser estudiado en los ensayos de competencia celular, ya que estos estudios se han sugerido como importantes para entender procesos relacionados al cáncer (Rhiner y Moreno, 2009).

CONCLUSIONES

En este estudio logramos aportar información valiosa acerca de la función de *prg*, un gen no caracterizado del desarrollo de la mosca que codifica a una proteína con nueve motivos ZF-C2H2 y un dominio ZAD. *prg* es un gen pleiotrópico que participa en diferentes etapas del desarrollo de *D. melanogaster*. En este trabajo caracterizamos a *prg* y las etapas del desarrollo en las que se requiere. *prg* es probablemente necesario para la formación de los gametos en la hembra, ya que la formación de clones homocigotos mutantes de *prg* durante la ovogénesis genera huevos anormales. Además, *prg* participa en diferentes procesos durante el desarrollo embrionario: principalmente en el cerrado dorsal y la involución de la cabeza. *prg* interacciona con diferentes genes a través del desarrollo; como ejemplo, con *fwe*. *prg* también participa en la formación de estructuras del organismo adulto, como la formación del tórax y la formación del ojo compuesto. La ausencia de *prg* durante la metamorfosis probablemente ocasiona un aumento en la apoptosis en el disco imagal de ojo, lo que genera un desarreglo de la arquitectura interna de la retina por la ausencia de células fotorreceptoras y de células accesorias. Se observaron también hoyos en la parte externa de los conos y ausencia de quetas en el ojo compuesto. En el tórax genera pérdida de macroquetas y microquetas, así como fenotipos de hendidura torácica.

La información que aportamos de *prg* es muy valiosa, ya que nos ayuda a entender el tipo de funciones que podrían desempeñar los genes de ZAD-ZFPs. Estos genes se han caracterizado muy poco y se han expandido de manera específica en el linaje de insectos, aunque provienen de un ancestro común con los vertebrados. Entender las funciones de estos genes que codifican a ZAD-ZFPs nos ayudará a entender por qué estos genes se extendieron en este linaje, y eso podría aportar información para entender por qué otros genes como los que codifican a proteínas con otros dominios asociados a dedos de zinc lo hicieron en otros grupos animales.

BIBLIOGRAFÍA

Affolter M, Marty T, Vigano MA y Jazwinska A. 2001. Nuclear interpretation of Dpp signaling in *Drosophila*. *EMBO J*; 20(13): 3298–3305.

Affolter M, Nellen D, Nussbaumer U y Basler K. 1994. Multiple requirements for the receptor serine/threonine kinase thick veins reveal novel functions of TGF beta homologs during *Drosophila* embryogenesis. *Development*; 120(11): 3105–3117.

Agnes F, Suzanne M y Noselli S. 1999. The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development*; 126(23): 5453–5462.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K y Walter P. 2015. The cytoskeleton. En: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, editores. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, Taylor and Francis group. 6ª Edición. USA: 889–962.

Bellen HJ, Levis RW, Liao G, He Y, Carlson JW, Tsang G, Evans-Holm M, Hiesinger PR, Schulze KL, Rubin GM, et al. 2004. The BDGP gene disruption project: Single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics*; 167: 761–781.

Bhaskar V, Valentine SA y Courey AJ. 2000. A functional interaction between dorsal and components of the Smt3 conjugation machinery. *J Biol Chem*; 275(6): 4033–4040.

Biswas R, Stein D y Stanley ER. 2006. *Drosophila* Dok is required for embryonic dorsal closure. *Development*; 133(2): 217–227.

Brand AH y Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*; 118:401–15.

Blanchard GB, Murugesu S, Adams RJ, Martinez-Arias A y Gorfinkiel N. 2010. Cytoskeletal dynamics and supracellular organisation of cell shape fluctuations during dorsal closure. *Development*; 137(16): 2743–2752.

Bloor JW y Kiehart DP. 2002. *Drosophila* RhoA regulates the cytoskeleton and cell-cell adhesion in the developing epidermis. *Development*; 129(13): 3173–3183.

Campos-Ortega JA y Hartenstein V. 1997. A summary of *Drosophila* embryogenesis. En: Campos-Ortega JA, Hartenstein V, editores. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag. 2ª Edición. Berlin: 1–8.

Casas-Tinto S, Torres M y Moreno E. 2011. The flower code and cancer development. *Clin Transl Oncol*; 13(1): 5–9.

Chen HW, Marinissen MJ, Oh SW, Chen X, Melnick M, Perrimon N, Gutkind JS y Hou SX. 2002. CKA, a novel multidomain protein, regulates the JUN N-terminal kinase signal transduction pathway in *Drosophila*. *Mol Cell Biol*; 22(6): 1792–1803.

Chou TB y Perrimon N. 1996. The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*; 144(4): 1673–1679.

Chung HR, Lohr U y Jackle H. 2007. Lineage-specific expansion of the zinc finger associated domain ZAD. *Mol Biol Evol*; 24(9): 1934–1943.

Chung HR, Schafer U, Jackle H y Bohm S. 2002. Genomic expansion and clustering of ZAD-containing C2H2 zinc-finger genes in *Drosophila*. *EMBO Rep*; 3(12): 1158–1162.

Crozatier M, Kongsuwan K, Ferrer P, Merriam JR, Lengyel JA y Vincent A. 1992. Single amino acid exchanges in separate domains of the *Drosophila serendipity delta* zinc finger protein cause embryonic and sex biased lethality. *Genetics*; 131(4): 905–916.

Cubadda Y, Heitzler P, Ray RP, Bourouis M, Romain P, Gelbart W, Simpson P y Haenlin M. 1997. *u-shaped* encodes a zinc finger protein that regulates the proneural genes *achaete* and *scute* during the formation of bristles in *Drosophila*. *Genes Dev*; 11(2): 3083–3095.

Denton D, Mills K, Kumar S. 2008. Methods and Protocols for Studying Cell Death in *Drosophila*. *Methods Enzymol*; 446:17–37.

Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblauer S, et al. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*; 448(7150): 151–156.

Duffy JB. 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*; 34:1–15.

Dutta D, Bloor JW, Ruiz-Gomez M, VijayRaghavan K y Kiehart DP. 2002. Real-time imaging of morphogenetic movements in *Drosophila* using Gal4-UAS-driven expression of GFP fused to the actin-binding domain of moesin. *Genesis*; 34(1-2): 146–151.

García-Fernandez B, Martínez-Arias A y Jacinto A. 2007. Dpp signalling orchestrates dorsal closure by regulating cell shape changes both in the amnioserosa and in the epidermis. *Mech Dev*; 124(11-12): 884–897.

Frank LH y Rushlow C. 1996. A group of genes required for maintenance of the amnioserosa tissue in *Drosophila*. *Development*; 122(5): 1343–1352.

Galcheva-Gargova Z, Derijard B, Wu IH y Davist RJ. 1994. An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science*; 265(5173): 806–808.

Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M y Mackay JP. 2007. Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci*; 32(2): 63–70.

Gaszner M, Vazquez J y Schedl P. 1999. The Zw5 protein, a component of the scs chromatin domain boundary, is able to block enhancer-promoter interaction. *Genes Dev*; 13(16): 2098–2107.

Gibert JM, Marcellini S, David JR, Schlotterer C y Simpson P. 2005. A major bristle QTL from a selected population of *Drosophila* uncovers the zinc-finger transcription factor *poils-au-dos*, a repressor of *achaete-scute*. *Dev Biol*; 288(1): 194–205.

Gilbert SF, Singer SR, Tyler MS y Kozlowski RN. 2006. *Developmental biology*. Sinauer Associates-Inc Publishers. 8ª Edición. Sunderland, Mass.

Glise B, Bourbon H y Noselli S. 1995. *hemipterous* encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell*; 83(3): 451–461.

Gloor GB, Preston CR, Johnson-Schlitz DM, Nassif NA, Phillis RW, Benz WK, Robertson HM y Engels WR. 1993. Type I repressors of P element mobility. *Genetics*; 135(1): 81–95.

Goberdhan DCI y Wilson C. 1998. JNK, cytoskeletal regulator and stress response kinase? A *Drosophila* perspective. *Bioessays*; 20(12): 1009–1019.

Gorfinkiel N y Martinez-Arias A. 2007. Requirements for adherens junction components in the interaction between epithelial tissues during dorsal closure in *Drosophila*. *J Cell Sci*; 120: 3289–3298.

Gramates LS, Marygold SJ, Santos G dos, Urbano J-M, Antonazzo G, Matthews BB, Rey AJ, Tabone CJ, Crosby MA, Emmert DB, et al. 2016. FlyBase at 25: looking to the future. *Nucleic Acids Res*; 45(D1): D663–D671.

Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC y Carrol SB. 2008. *Introduction to genetic analysis*. W.H. Freeman and Co. 9ª Edición. New York.

Hakeda-Suzuki S, Ng J, Tzu J, Dietzl G, Sun Y, Harms M, Nardine T, Luo L y Dickson BJ. 2002. Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature*; 416(6879): 438–442.

Hales KG, Korey CA, Larracuenta AM y Roberts DM. 2015. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics*; 201(3): 815–842.

Harden N. 2002. Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation*; 70(4-5): 181–203.

Hofmann I y Munro S. 2006. An N-terminally acetylated Arf-like GTPase is localised to lysosomes and affects their motility. *J Cell Sci*; 119: 1494–1503.

Homsy JG, Jasper H, Peralta XG, Wu H, Kiehart DP y Bohmann D. 2006. JNK signaling coordinates integrin and actin functions during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Dyn*; 235(2): 427–434.

Igaki T. 2009. Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis*; 14(8): 1021–1028.

Jankovics F y Brunner D. 2006. Transiently reorganized microtubules are essential for zippering during dorsal closure in *Drosophila melanogaster*. *Dev Cell*; 11(3): 375–385.

Jasper H, Benes V, Schwager C, Sauer S, Clauder-Munster S, Ansorge W y Bohmann D. 2001. The genomic response of the *Drosophila* embryo to JNK signaling. *Dev Cell*; 1(4): 579–586.

Jauch R, Bourenkov GP, Chung HR, Urlaub H, Reidt U, Jackle H y Wahl MC. 2003. The zinc finger-associated domain of the *Drosophila* transcription factor *grauzone* is a novel zinc-coordinating protein-protein interaction module. *Structure*; 11(11): 1393–1402.

Johnson-Schlitz DM, Engels WR. 1993. P-element-induced interallelic gene conversion of insertions and deletions in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*; 13(11):7006–7018.

Jürgens G, Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C y Kluding H. 1984. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*: II. Zygotic loci on the third chromosome. *Wilehm Roux Arch Dev Biol*; 193(5): 283–295.

Karin M y Gallagher E. 2005. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*; 57(4-5): 283–295.

Kiehart DP, Galbraith CG, Edwards KA, Rickoll WL y Montague RA. 2000. Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*. *J Cell Biol*; 149(2): 471–490.

Knight RD y Shimeld SM. 2001. Identification of conserved C2H2 zinc-finger gene families in the Bilateria. *Genome Biol*; 2(5): 1–8.

Knust E. 1997. *Drosophila* morphogenesis: Movements behind the edge. *Current Biology*; 7(9): 558-561.

Kockel L, Homsy JG y Bohmann D. 2001. *Drosophila* AP-1: lessons from an invertebrate. *Oncogene*; 20(19): 2347–2364.

Krystal J y Ayyanathan K. 2013. Global analysis of target genes of 21 members of the ZAD transcription factor family in *Drosophila melanogaster*. *Gene*; 512(2): 373–382.

Krystal J. 2012. Comprehensive study of the ZAD family of zinc finger transcription factors in *Drosophila melanogaster*. Doctor of Philosophy. Florida Atlantic University. Boca Ratón, FL.

Laity JH, Lee BM y Wright PE. 2001. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*; 11(1): 39–46.

Lake CM, Nielsen RJ y Hawley RS. 2011. The *Drosophila* zinc finger protein trade embargo is required for double strand break formation in meiosis. *PLoS Genet*; 7(2): 1–15.

Laplante C y Nilson LA. 2011. Asymmetric distribution of Echinoid defines the epidermal leading edge during *Drosophila* dorsal closure. *J Cell Biol*; 192(2): 335–348.

Lindsley DL y Zimm GG. 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.

Martin-Blanco E, Gampel A, Ring J, Virdee K, Kirov N, Tolkovsky AM y Martinez-Arias A. 1998. *puckered* encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev*; 12(4): 557–570.

Matthews JM, Kowalski K, Liew CK, Sharpe BK, Fox AH, Crossley M y MacKay JP. 2000. A class of zinc fingers involved in protein-protein interactions biophysical characterization of CCHC fingers from Fog and U-shaped. *Eur J Biochem*; 267(4): 1030–1038.

Matthews JM y Sunde M. 2002. Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life*; 54(6): 351–355.

Merino MM, Rhiner C, Portela M y Moreno E. 2013. “Fitness fingerprints” mediate physiological culling of unwanted neurons in *Drosophila*. *Curr Biol*; 23(14): 1300–1309.

Morata G y Ripoll P. 1975. Minutes: mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol*; 42(2): 211–221.

Moreno E y Basler K. 2004. dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell*; 117(1): 117–129.

Mummery-Widmer JL, Yamazaki M, Stoeger T, Novatchkova M, Bhalerao S, Chen D, Dietzl G, Dickson BJ y Knoblich JA. 2009. Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature*; 458(7241): 987–992.

National Institute of Genetics. 2017. NIG-FLY: Fly stocks of national institute of genetics. https://shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/about/pdf/IR_construct_v4.pdf

Nazario Yepiz NO. 2006. Caracterización de un nuevo gen *piragua (prg)* en *Drosophila melanogaster*. Maestría en ciencias (Neurobiología). Universidad Nacional Autónoma de México. Querétaro, MX.

Neumann CJ y Cohen SM. 1996. *Sternopleural* is a regulatory mutation of *wingless* with both dominant and recessive effects on larval development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*; 142: 1147–1155.

Ni J-Q, Markstein M, Binari R, Pfeiffer B, Liu L-P, Villalta C, Booker M, Perkins L y Perrimon N. 2008. Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Methods*; 5:49–51.

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E y Kluding H. 1984. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*: I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilehm Roux Arch Dev Biol*; 193(5): 267–282.

Oda H y Tsukita S. 2001. Real-time imaging of cell-cell adherens junctions reveals that *Drosophila* mesoderm invagination begins with two phases of apical constriction of cells. *J Cell Sci*; 114: 493–501.

Pasakarnis L, Frei E, Caussin E, Affolter M y Brunner D. 2016. Amnioserosa cell constriction but not epidermal actin cable tension autonomously drives dorsal closure. *Nat Cell Biol*; 18(11): 1161–1172.

Peña-Rangel MT, Rodriguez I y Riesgo-Escovar JR. 2002. A misexpression study examining dorsal thorax formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*; 160(3): 1035–1050.

Pfeiffer BD, Ngo TT, Hibbard KL, Murphy C, Jenett A, Truman JW, Rubin GM. 2010. Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*. *Genetics*; 186: 735–755.

Pierce, BA. 2014. *Genetics: A Conceptual Approach*. McMillan Education. 5ª Edición. USA.

Razin S V, Borunova V V, Maksimenko OG y Kantidze OL. 2012. Cys2His2 zinc finger protein family: classification, functions, and major members. *Biochemistry*; 77(3): 217–226.

Reed BH, Wilk R y Lipshitz HD. 2001. Downregulation of Jun kinase signaling in the amnioserosa is essential for dorsal closure of the *Drosophila* embryo. *Curr Biol*; 11(14): 1098–1108.

Reed BH, Wilk R, Schock F, Lipshitz HD. 2004. Integrin-dependent apposition of *Drosophila* extraembryonic membranes promotes morphogenesis and prevents anoikis. *Curr Biol*; 14(5): 372–380.

Rhiner C, López-Gay JM, Soldini D, Casas-Tinto S, Martín FA, Lombardía L y Moreno E. 2010. Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in *Drosophila*. *Dev Cell*; 18(6): 985–998.

Rhiner C y Moreno E. 2009. Super competition as a possible mechanism to pioneer precancerous fields. *Carcinogenesis*; 30(5): 723–728.

Riesgo-Escovar JR y 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 Dev*; 11(13): 1717–1727.

Riesgo-Escovar JR y Hafen E. 1997b. Common and distinct roles of DFos and DJun during *Drosophila* development. *Science*; 278(5338): 669–672.

Riesgo-Escovar JR, Jenni M, Fritz A y 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 Dev*; 10(21): 2759–2768.

Ring JM y Martinez-Arias A. 1993. *puckered*, a gene involved in position-specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the *Drosophila* larva. *Dev Suppl*; 251–259.

Ríos-Barrera LD y Riesgo-Escovar JR. 2013. Regulating cell morphogenesis: the *Drosophila* jun N-terminal kinase pathway. *Genesis*; 51(3): 147–162.

Rousseau E y Goldstein ES. 2001. The gene structure of the *Drosophila melanogaster* homolog of the human proto-oncogene *fos*. *Gene*; 272(1-2): 315–322.

Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989. Plasmid vectors. En: Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, editores. *Molecular cloning a laboratory manual-Vol. 1*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2ª Edición. USA: 1.2–1.110.

Sluss HK, Han Z, Barrett T, Davis RJ y Ip YT. 1996. A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev*; 10(21): 2745–2758.

Solon J, Kaya-Copur A, Colombelli J y Brunner D. 2009. Pulsed forces timed by a ratchet-like mechanism drive directed tissue movement during dorsal closure. *Cell*; 137(7): 1331–1342.

Stapleton M, Carlson J, Brokstein P, Yu C, Champe M, George R, Guarin H, Kronmiller B, Pacleb J, Park S, Wan K, Rubin GM y Celniker SE. 2002. A *Drosophila* full-length cDNA resource. *Genome Biol*; 3(12): RESEARCH0086.1– RESEARCH0086.2

Stern DL y Sucena E. 2000. Preparation of larval and adult cuticles for light microscopy. En: Sullivan W, Ashburner M, Hawley RS, editores. *Drosophila protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: 601–615.

Stowers RS y Schwarz TL. 1999. A genetic method for generating *Drosophila* eyes composed exclusively of mitotic clones of a single genotype. *Genetics*; 152(4): 1631–1639.

Stronach B y Perrimon N. 2002. Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, *slipper*. *Genes Dev*; 16(3): 377–387.

Stubbs L, Sun Y y Caetano-Anolles D. 2011. Function and Evolution of C2H2 Zinc Finger Arrays. En: Hughes TR, editor. A Handbook of Transcription Factors. Springer Netherlands. Dordrecht: 75–94.

Su YC, Treisman JE y Skolnik EY. 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 Dev*; 12(15): 2371–2380.

Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*; 22: 4673-4680.

Tateno M. 2000. Regulation of JNK by Src During *Drosophila* Development. *Science*; 287(5451): 324–327.

Toyama Y, Peralta XG, Wells AR, Kiehart DP y Edwards GS. 2008. Apoptotic force and tissue dynamics during *Drosophila* embryogenesis. *Science*; 321(5896): 1683–1686.

Treier M, Bohmann D y Mlodzik M. 1995. JUN cooperates with the ETS domain protein pointed to induce photoreceptor R7 fate in the *Drosophila* eye. *Cell*; 83(5): 753–760.

Vanhook A y Letsou A. 2008. Head involution in *Drosophila*: genetic and morphogenetic connections to dorsal closure. *Dev Dyn*; 237(1): 28–38.

Weinert BT, Min B y Rio DC. 2005. P element excision and repair by non-homologous end joining occurs in both G1 and G2 of the cell cycle. *DNA Repair (Amst)*; 4: 171–181.

Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C y Jürgens G. 1984. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*: III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. *Wilehm Roux Arch Dev Biol*; 193(5): 296–307.

Wolff T. 2000. Histological Techniques for the *Drosophila* Eye. Part II: Adult. En: Sullivan W, Ashburner M, Hawley RS, editores. *Drosophila* protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: 229–243.

Wolff T y Ready DF. 1993. Pattern formation in the *Drosophila* retina. En: The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA: 1277–1325.

Xia Y y Karin M. 2004. The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases. *Trends Cell Biol*; 14(2): 94–101.

Xu T y Rubin GM. 2012. The effort to make mosaic analysis a household tool. *Development*; 139: 4501–4503.

Xu T y Rubin GM. 1993. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development*; 117(4): 1223–1237.

Yip ML, Lamka ML y Lipshitz HD. 1997. Control of germ-band retraction in *Drosophila* by the zinc-finger protein HINDSIGHT. *Development*; 124(11): 2129–2141.

Young PE, Richman AM, Ketchum AS y Kiehart DP. 1993. Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function. *Genes Dev*; 7(1): 29–41.

Zeitlinger J, Kockel L, Peverali FA, Jackson DB, Mlodzik M y Bohmann D. 1997. Defective dorsal closure and loss of epidermal *decapentaplegic* expression in *Drosophila fos* mutants. *EMBO J*; 16(24): 7393–7401.

ANEXO I

Este apartado contiene los conceptos básicos de la genética de *Drosophila*.

La nomenclatura de los genes y sus símbolos

Los nombres de los genes de *Drosophila* y sus símbolos se escriben en cursivas como en otros organismos. La mayoría de los nombres de los genes de *Drosophila* hacen referencia al fenotipo que se observa en los individuos con el alelo mutante que primero se reportó. Los genes o sus símbolos comienzan con una letra mayúscula sí su nombre hace referencia a un fenotipo mutante dominante, ejemplo: *Glazed (Gla)* y comienzan con una letra minúscula sí su nombre hace referencia a un fenotipo mutante recesivo, ejemplo: *white (w)*. Además, los nombres de los genes pueden hacer alusión a su función.

Tabla S1. Iniciales y prefijos de los nombres de los genes predichos de algunas especies del género *Drosophila*.

Iniciales de la especie	Prefijo	Especie*
Dmel	CG o CR	<i>Drosophila melanogaster</i>
Dpse	GA	<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>
Dsim	GD	<i>Drosophila simulans</i>
Dyak	GE	<i>Drosophila yakuba</i>
Dana	GF	<i>Drosophila ananassae</i>
Dere	GG	<i>Drosophila erecta</i>
Dgri	GH	<i>Drosophila grimshawi</i>
Dmoj	GI	<i>Drosophila mojavensis</i>
Dvir	GJ	<i>Drosophila virilis</i>
Dwil	GK	<i>Drosophila willistoni</i>
Dper	GL	<i>Drosophila persimilis</i>
Dsec	GM	<i>Drosophila sechellia</i>
*En esta tabla se presentan solamente las especies cuyos genomas han sido secuenciados y se encuentran almacenados en el FlyBase.		

Los nombres que se asignaron a los genes de *D. melanogaster* anotados por predicción en computadora, después del proyecto de secuenciación, contienen el prefijo “CG” o “GR” y son anteceditos por las iniciales de la especie, ejemplo: *prg* es el gen anotado con el nombre *Dmel/CG9233*. Los nombres de los genes anotados de otras especies también contienen un prefijo antecedido por las iniciales de la especie (Tabla S1).

Los cromosomas balanceadores

Los cromosomas balanceadores son muy importantes en *Drosophila*, ya que facilitan el análisis genético. Estos cromosomas contienen tres componentes importantes: tienen múltiples inversiones que evitan la recombinación; una mutación de un gen que genera un fenotipo visible y dominante (“marcador”); una mutación letal recesiva que ayuda a preservar cepas con mutaciones deletéreas (Hales et al., 2015). La manera de preservar una cepa mutante de *Drosophila* es cruzándola de forma endogámica en cada generación. Una opción para preservar una mutación letal recesiva en los adultos viables es en heterocigosis, pero el alelo silvestre tendería a seleccionarse en cada generación. Las cepas balanceadas evitan que estemos seleccionando de manera manual a los organismos heterocigotos en cada generación. Las cepas mutantes de *prg* deben de estar balanceadas porque las mutaciones en este gen son letales embrionarias. *prg* se encuentra en el cromosoma 2, así que usamos *CyO* (“*Curly* de Oster”) como balanceador, este cromosoma contiene la versión silvestre de *prg*. *CyO* evita la recombinación (para evitar la reparación de la mutación de estudio), contiene el marcador *Curly* (*Cy*) que genera alas curvadas en las moscas adultas de manera dominante y la mutación letal recesiva. La cepa mutante siempre se mantiene con adultos solamente heterocigotos porque los homocigotos de *prg* se mueren y los homocigotos del balanceador también se mueren en etapas tempranas. Las cepas balanceadas son cepas de cruza endogámicas estables que mantienen las mutaciones de interés a lo largo de las generaciones.

Los genotipos de las cruzas

La información de dos *loci* que están presentes en un mismo cromosoma se escribe separada por una “coma” y seguida por un “espacio”, ejemplo: *prg³, fwe^{EY08496}*. Además, en el genotipo los nombres de los genes se escriben en orden a la posición citogenética que ocupan. El símbolo “/” sirve para separar el genotipo de dos cromosomas homólogos, ejemplo: *prg¹/CyO*. El nombre de un gen para su genotipo homocigoto se puede escribir una sola vez, ejemplo: *prg¹/prg¹* se escribe solamente como *prg¹*. La información de dos loci que están presentes en diferentes cromosomas se escribe separada por un “punto y coma” y seguida por un “espacio”, ejemplo: *prg³; kay¹*.

El sistema UAS-Gal4

El sistema UAS-Gal4 es una herramienta muy útil en *Drosophila* y fue adoptado de las levaduras. Gal4 es un factor de transcripción que se une a su secuencia reguladora UAS (del inglés Upstream Activating Sequences) para inducir la transcripción de genes que se encuentran río-abajo (Duffy, 2002; Hales et al., 2015). Este sistema es bipartito y se utilizan cepas que expresan a *Gal4* y cepas que contienen un transgen de interés con una secuencia reguladora UAS río-arriba. Se han diseñado muchas cepas de *Drosophila* que expresan *Gal4* de manera sitio-específica a través de “trampas de enhancer” (Brand y Perrimon, 1993; Pfeiffer et al., 2010). Estas cepas contienen una construcción con *Gal4* dentro de un elemento P que utiliza las secuencias reguladoras de los genes cercanos a la inserción. La construcción al usar las secuencias reguladoras de los genes cercanos puede expresar *Gal4* en el patrón de expresión de dichos genes endógenos (cepas RE-*Gal4*, RE del inglés “Responsive Element”). Las cepas RE-*Gal4* están disponibles en el centro de cepas BDSC (del inglés “Bloomington Drosophila Stock Center”) de la universidad de Indiana y se tienen acceso a una lista de estas cepas en la dirección electrónica: <http://flystocks.bio.indiana.edu/gal4.htm>. Además, se cuenta con vectores para poder clonar genes de interés bajo el control de secuencias UAS y hacer animales transgénicos (Brand y Perrimon, 1993; Pfeiffer et al., 2010). Al cruzar las dos cepas seleccionadas (ER-*Gal4* y UAS-transgen) se obtienen moscas que se expresan *Gal4* en un tejido o en un tiempo

del desarrollo específico y el transgen de interés regulado bajo la secuencia UAS, así al unirse Gal4 a su secuencia regulatoria puede encender el gen de interés en el lugar o en el momento deseado.

Los estudios de los mosaicos genéticos

Muchos de los genes necesarios para el desarrollo embrionario son también necesarios para procesos del desarrollo del adulto durante la metamorfosis. El estudio de los efectos de estos genes en etapas posteriores a la embriogénesis es difícil porque sus alelos mutantes son recesivos letales. Una manera de sortear este inconveniente es a partir del estudio de mosaicos genéticos. En este estudio analizamos a parches de células homocigotas mutantes del gen de interés en los adultos heterocigotos. El sistema FRT-FLP nos permite recombinar dos cromosomas homólogos durante la mitosis. En esta técnica las moscas heterocigotas para el gen de interés contienen las secuencias FRT (del inglés “FLP Recombination Target”) en la base de los brazos de sus cromosomas homólogos (los cromosomas a recombinar). La secuencia FRT se encuentra en la porción más proximal al centrómero (en este estudio las secuencias FRT se encuentran en la banda 40A del brazo izquierdo de los cromosomas dos). Estas secuencias FRT en los cromosomas homólogos son reconocidas por la recombinasa FLP que genera la recombinación en estos sitios. Las células hijas resultantes de la mitosis con la recombinación serán células homocigotas mutantes del gen de interés y células homocigotas silvestres. Las células que no sufrieron la recombinación serán heterocigotas (Xu y Rubin, 1993; Xu y Rubin, 2012; Hales, 2015). Estos organismos que tienen células con diferente constitución cromosómica (genotipos) coexistiendo son conocidos como “mosaicos genéticos” (Pierce, 2014). Además, podemos dirigir la expresión de la recombinasa FLP en un solo tejido con un promotor de un gen específico y generar parches de clones homocigotos mutantes solamente en dicho tejido (en este estudio se utilizó *ey-flp* para expresar la recombinasa en el ojo). Asimismo, podemos identificar los parches de clones homocigotos mutantes si usamos un marcador en el extremo distal del brazo del cromosoma que no tiene la mutación de interés. Las células homocigotas mutantes del gen de interés no tendrán el marcador y las células homocigotas silvestres del gen de interés

tienen dos copias del marcador. En este estudio usamos w^+ en las moscas con un fondo mutante w^- . Las moscas heterocigotas ($prg^3, FRT40A/w^+, FRT40A$) generan células hijas homocigotas de prg ($prg^3, FRT40A/prg^3, FRT40A$) y células hijas homocigotas silvestres de prg ($w^+, FRT40A/w^+, FRT40A$). La ausencia de pigmento rojo marca a las células homocigotas mutantes de prg en el ojo del imago porque no tienen ninguna copia de w^+ .

ANEXO II

Se incluyen los videos suplementarios de las filmaciones de microscopía confocal *in vivo* en un disco compacto. Todos los videos de las filmaciones *in vivo* fueron tomados con microscopía confocal a temperatura ambiente (22°C). Los embriones están en una vista dorsal con la parte anterior a la derecha.

Video Suplementario 1 (VS1). Filmaciones de microscopía confocal *in vivo* del cerrado dorsal de embriones controles y mutantes de *prg* que expresan *DEcad:GFP*. Los embriones silvestres (arriba) y homocigotos de *prg*³ (abajo) con la construcción *DEcad:GFP* que expresan una proteína quimera de E-cadherina con GFP, fueron filmados durante toda la etapa del cerrado dorsal. Las células más dorsales y de mayor área son las células de la amnioserosa, y las células con menor brillo en los contornos son las células del epitelio lateral.

Video Suplementario 2 (VS2). Filmación de microscopía confocal *in vivo* del fenotipo extremo de los embriones mutantes de *prg*. Embrión homocigoto de *prg*³ que expresa *DEcad:GFP*. Las células más dorsales del epitelio lateral tienen forma de abanico, evidenciando una falla en el cable de actomiosina y pierden su unión con la amnioserosa, ocasionando la falla del cerrado.

Video Suplementario 3 (VS3). Filmación de microscopía confocal *in vivo* del fenotipo extremo de los embriones mutantes de *bsk*. Embrión homocigoto de *bsk*¹ que expresa *DEcad:GFP*. Las células más dorsales del epitelio lateral tienen forma de abanico, evidenciando una falla en el cable de actomiosina y pierden su unión con la amnioserosa, ocasionando la falla del cerrado.

Video Suplementario 4 (VS4). Filmaciones de microscopía confocal *in vivo* del “zipping” de embriones controles y mutantes de *prg* que expresan *Ecad:GFP*. Los embriones silvestres (arriba) y homocigotos de *prg*³ (abajo) con la construcción *DEcad:GFP*, fueron filmados durante la etapa final del cerrado dorsal (“zipping”). Las células del epitelio lateral más dorsales de los embriones mutantes no sellan en los cantos (flecha) como en los embriones silvestres.

Video Suplementario 5 (VS5). Filmaciones de microscopía confocal *in vivo* del “zipping” de embriones controles y mutantes de *prg* que expresan *GFP:moe*. Los embriones silvestres (arriba) y homocigotos de *prg*³ (abajo) con la construcción *GFP:moe* que expresan una proteína quimera de moesina con GFP, fueron filmados durante la etapa final del cerrado dorsal (“zipping”). Las células del epitelio lateral más dorsales de los embriones mutantes no sellan en los cantos como en los embriones silvestres.

ANEXO III

Se incluye el manuscrito aceptado del artículo de investigación derivado de este trabajo de tesis, para la obtención del grado.



piragua encodes a zinc finger protein required for development in *Drosophila*



Nestor O. Nazario-Yepiz, Juan R. Riesgo-Escovar *

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus UNAM Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, Querétaro c.p. 76230, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 February 2016

Received in revised form 7 November 2016

Accepted 19 December 2016

Available online 21 December 2016

Keywords:

Zinc finger

Dorsal closure

Embryonic development

Imaginal development

Heterochrony

ABSTRACT

We isolated and characterized embryonic lethal mutations in *piragua* (*prg*). The *prg* locus encodes a protein with an amino terminus Zinc Finger-Associated-Domain (ZAD) and nine C₂H₂ zinc fingers (ZF). *prg* mRNA and protein expression during embryogenesis is dynamic with widespread maternal contribution, and subsequent expression in epithelial precursors. About a quarter of *prg* mutant embryos do not develop cuticle, and from those that do a small fraction have cuticular defects. Roughly half of *prg* mutants die during embryogenesis. *prg* mutants have an extended phenocritical period encompassing embryogenesis and first instar larval stage, since the other half of *prg* mutants die as first or second instar larvae. During dorsal closure, time-lapse high-resolution imaging shows defects arising out of sluggishness in closure, resolving at times in failures of closure. *prg* is expressed in imaginal discs, and is required for imaginal development. *prg* was identified in imaginal tissue in a cell super competition screen, together with other genes, like *flower*. We find that *flower* mutations are also embryonic lethal with a similar phenocritical period and strong embryonic mutant phenotypes (head involution defects, primarily). The two loci interact genetically in the embryo, as they increase embryonic mortality to close to 90% with the same embryonic phenotypes (dorsal closure and head involution defects, plus lack of cuticle). Mutant *prg* clones generated in developing dorsal thorax and eye imaginal tissue have strong developmental defects (lack of bristles and ommatidial malformations). *prg* is required in several developmental morphogenetic processes.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Zinc-finger domains (ZF) are among the most prevalent and diverse domains in eukaryotic genomes (Laity et al., 2001). The diversity of proteins that harbor such domains, plus the different modifications suffered throughout evolution, creates opportunities and a conundrum: They are clearly very important and versatile, yet this very commonality and prevalence has somewhat obscured specific zinc-finger containing genes and their functions. In *Drosophila*, close to one hundred genes coding for ZF and Zinc finger-associated-domain (ZAD) are known, but few have been extensively studied.

Here we characterize one such gene: *piragua*, that illustrates their versatility: It is required multiple times, during gamete formation and embryogenesis (oogenesis, and late embryogenesis: Dorsal closure and head involution) and imaginal development (dorsal thorax and compound eye development). It also interacts with other genes, like the membrane receptor protein Flower.

1.1. Zinc finger proteins

The *Drosophila piragua* gene codes for a protein with nine instances of the abundant Cys₂His₂ zinc finger (C₂H₂-ZF) protein motif (Lander et al., 2001; Andreini et al., 2006). The C₂H₂-ZF motif bound by coordination to a zinc ion forms a digit-like shape in space that can interact with DNA, RNA, and proteins (Gamsjaeger et al., 2007; Matthews et al., 2000; Matthews and Sunde, 2002; Razin et al., 2012). C₂H₂-ZF encoding genes may harbor another zinc ion-bound-by-coordination motif, the ZAD or C₄DM (Chung et al., 2002). The ZAD domain forms a cloverleaf structure in space coordinated by a zinc ion and four cysteine residues.

Identified mutations in their ZAD or ZF domains gives rise to loss of function alleles (Chen et al., 2000). The Grauzone ZAD motif is involved in protein-protein interactions (Chang et al., 2010; Crozatier et al., 1992; Gaszner et al., 1999; Gibert et al., 2005). By extension, ZAD motifs in other proteins are thought to be protein-protein interaction modules. Recently, consensus binding DNA sequences for target genes were obtained for 21 ZAD-ZF-containing genes, using GST-chimeras, electrophoretic mobility shift assays, and bioinformatics, showing that these 21 genes are in general early embryonic regulators (Krystel and Ayyanathan, 2013).

Despite commonality of ZAD-ZF genes and efforts to characterize their function (Jauch et al., 2003; Krystel and Ayyanathan, 2013),

* Corresponding author.

E-mail address: juanriesgo@prodigy.net.mx (J.R. Riesgo-Escovar).

relatively little is known about them. Some might have redundant functions (Chung et al., 2007). ZAD-ZF genes expression patterns in *Drosophila* embryos tend to be widespread. This might suggest, likewise, widespread functions in developmental processes (Knight and Shimeld, 2001)

1.2. *piragua* in embryonic tissues: dorsal closure and head involution

At mid-embryogenesis, the *Drosophila* embryo undergoes dorsal closure, a process where its dorsal aspect is covered by the future tegument. Lateral epithelia (LaE) stretch dorsally over the amnioserosa (AS); both LaE and AS are ectodermally derived tissues. (Rios-Barrera and Riesgo-Escovar, 2013). The AS cells relax and contract in an oscillatory pattern before and during DC. (Fernandez et al., 2007; Muliylil et al., 2011; Reed et al., 2004; Solon et al., 2009). During DC contralateral post-mitotic LaE cell sheets extend in a dorsalward fashion and close the embryo dorsally (Kiehart et al., 2000; Layton et al., 2009; Peralta et al., 2007; Peralta et al., 2008).

Three basic categories of genes are required for DC: Jun-N-terminal kinase (JNK) pathway genes, other signaling genes like *dpp*, *Rho*, and *Dcdc42* and thirdly, cytoskeletal proteins like tubulin, integrins, and a non-muscle myosin. (Bloor and Kiehart, 2002; Dutta et al., 2002; Harden, 2002; Homsy et al., 2006; Jankovics and Brunner, 2006; Riesgo-Escovar and Hafen, 1997a; Riesgo-Escovar and Hafen, 1997b; Riesgo-Escovar et al., 1996; Rios-Barrera and Riesgo-Escovar, 2013; Young et al., 1993; Zeitlinger et al., 1997). Besides these, another ZF protein has been implicated in DC: *cabut*, with three C₂H₂-ZF (Belacortu et al., 2011; Munoz-Descalzo et al., 2007; Munoz-Descalzo et al., 2005).

Head involution starts at about the same time as dorsal closure, and is the rearrangement of tissues at the anterior end of the embryo. This basically involves internalization of the six head segments. There are close parallels between dorsal closure and head involution, including shared genetic components (VanHook and Letsou, 2008). Here we show *piragua* is required for both dorsal closure and head involution.

1.3. *piragua* in cell-cell competition

Cell-cell competition was discovered many years ago in imaginal disc tissue (Morata and Ripoll, 1975). Since then, several genes have been found to be critical: Minute mutations (mutations in genes encoding ribosome proteins), and *dmyc*, that triggers ribosome biosynthesis (Moreno and Basler, 2004). It is thought that 'fitter' cells incorporate higher amounts of survival factors and signaling molecules, translated in a 'survival code' that is secreted extracellularly, read by competing cells, leading to the culling of 'loser' or slower growing cells (Rhiner and Moreno, 2009). In a screen designed to isolate genes expressed early in 'loser' cells, *prg* levels were found to increase, and, via RNAi experiments, to be required for apoptosis of imaginal 'loser' cells. Among six such genes, *prg* was the sole transcription factor (all remaining five genes were membrane proteins) (Rhiner et al., 2010; Rhiner and Moreno, 2009).

In the same cell-competition screen where *prg* was isolated, another gene, *flower* (*fwe*), was isolated that had been cloned before (Yao et al., 2009a). *fwe* is considered the best-characterized cell-competition gene (Casas-Tinto et al., 2011; Merino et al., 2013; Moreno and Rhiner, 2014; Rhiner and Moreno, 2009). *fwe* loss of function homozygous mutant cells in clones in developing imaginal tissue fail to suffer apoptosis. Here we show that *prg* and *fwe* interact genetically.

1.4. *piragua* in imaginal tissues: dorsal thoracic closure and eye development

Published RNAi experiments driving two *prg* RNAi constructs in the dorsomedial portion of embryos, larvae, and adults using the *pnr-Gal4* (*pnr^{MD237}*) line lead to adult flies that showed lack of thoracic bristles and pigmentation defects in the thorax and pupal death (Mummery-

Widmer et al., 2009). Observation of the published mutant phenotypes also shows thoracic clefts. Here we observe lack of bristles and thoracic clefts in *piragua* mutant clones. Compound eye development is a classic and very well described structure (Bate and Martinez Arias, 1993). Here we report a surprising mutant phenotype: Lack of bristles, gross external cone malformations, and extensive tissue disarray in *prg* mutant clones.

2. Results

2.1. *prg* locus and mutants

We have isolated mutations by imprecise P-element excision in a locus we named *piragua* (*prg*). *piragua* means small boat in Spanish. A small fraction of mutant embryos sport a hole in the dorsal aspect of the cuticle, resembling such a vessel. *prg* is located (locus CG9233 in FlyBase (2003)) on the left arm of the second chromosome at 29D1 (2L: 8,464,488 to 8,466,694) (Fig. 1A). The *prg* locus theoretically codes for two transcripts of 2149 and 1984 bp long, respectively, differing only in the length of the 3' trailer sequences (these transcripts are also known as *fu2*). There are two reported fully sequenced cDNAs for *prg* (BT025217 and RE69756), of 1997 bp each. *prg* encodes a hypothetical protein of 558 aminoacids (aa) encoding an amino terminus ZAD domain and nine classical C₂H₂ zinc fingers, with no close homologs in non-dipteran species (Fig. 1B).

Prg is evolutionarily conserved in Drosophilids and Dipterans (Fig. S1). The first six *Prg* ZF are contiguous and separated from the other three ZFs by 40 aa. The *Prg* ZAD domain is in the first 90 aa of the putative protein, containing a very conserved arginine between the first two cysteines (Figs. 1B and S2).

We generated three mutant *prg* alleles (*prg¹*, *prg²*, and *prg³*) by excision of the P-element transposon in the *P{GT1}fu2^{BG02741}* strain whose insertion point is in the *prg* transcription unit (Fig. 1A, *prg* schematic). This P-element is inserted in the 5' leader sequence of the transcript (at 2L: 8,464,503, 15 nucleotides downstream from the proposed transcription start site) (Fig. 1A). This stock is viable and fertile and has no mutant phenotypes. All three mutant alleles derived from *P{GT1}fu2-BG02741* are homozygous lethal. The three alleles fail to complement each other.

Sequencing of the locus failed to reveal molecular abnormalities in *prg¹* and *prg²*, arguing that the defects were not present in the coding region. Semi-quantitative RT-PCR failed to reveal significant reductions of *prg* mRNA in *prg¹* and *prg²* mutants. In contrast, *prg³* mutants have a significant reduction of *prg* mRNA, strongly arguing that locus CG9233 codes for *prg* (Fig. 1C).

In addition, *prg³* has point mutations not present in flies with the same genetic background (*prg¹* and *prg²*) and the wild type control. These point mutations in *prg³* are present in the promoter region upstream of the start point of transcription, plus two missense point mutations in the ORF, that change an aspartic acid (D) to an alanine (A), and a glutamic acid (E) to an aspartic acid (D) at positions 57 and 76 respectively, both within the ZAD domain. The E to D change at position 76 most likely does not affect *Prg* function, as a D is found (instead of an E as in *D. melanogaster*) in all *Drosophila* species surveyed with a recognizable *Prg* homologue (Fig. S2). In contrast, the 57 D position is conserved in six *Drosophila* species with an identifiable *Prg* homologue. Three others have a conservative change to E. A polar aminoacid is, thus, very conserved in position 57 in 10 orthologs of *Drosophila* (the *Drosophila virilis* ortholog does not have a ZAD domain). Other *D. melanogaster* ZAD containing genes also have an E/D residue in the equivalent position. This residue is found in the context of an evolutionarily conserved VQYER motif, probably important for ZAD function. Despite having a tyrosine residue in the middle, this motif is not predicted for phosphorylation. A non-conservative change at 57 D to alanine would likely alter function, and may account for the *prg³* phenotype, together with the significant reduction in expression of the mRNA (Figs.

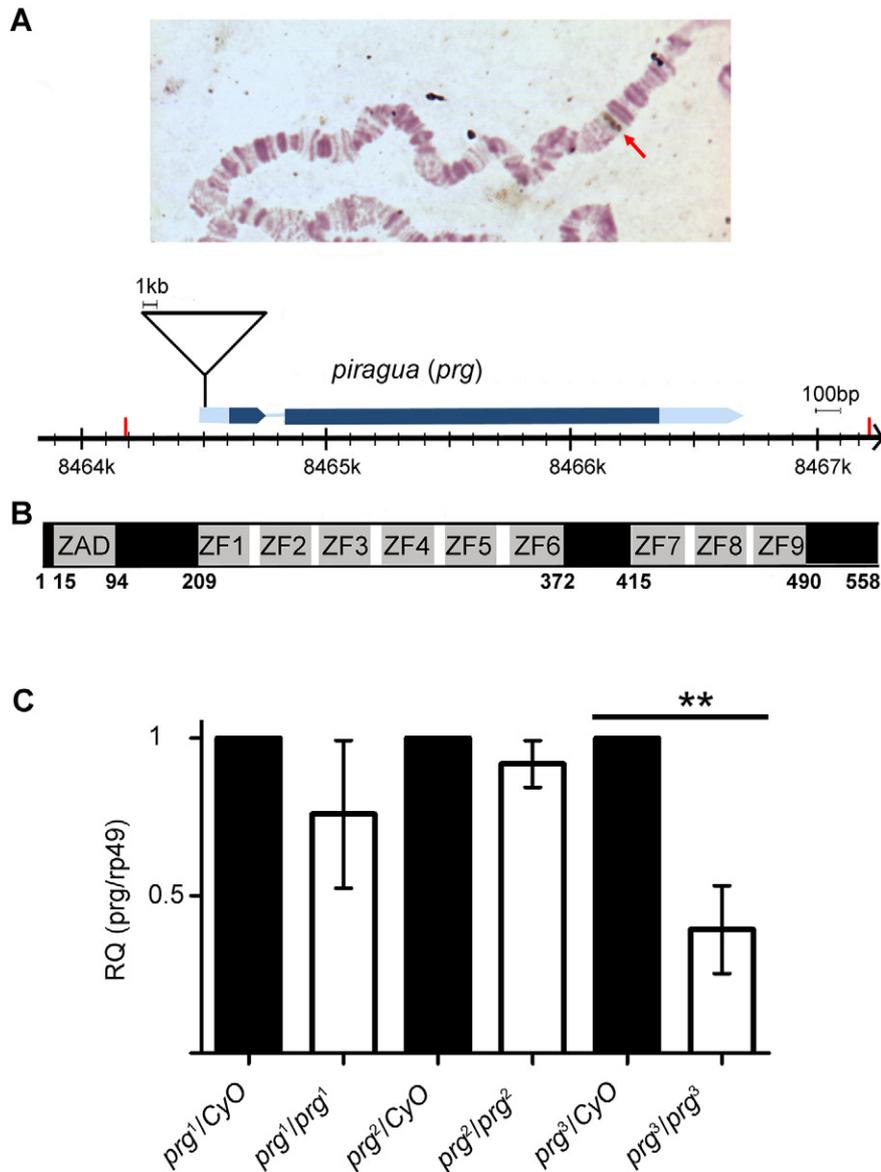


Fig. 1. *prg* codes for a predicted ZAD-ZF protein. (A) A *ry* probe localizes the cytological locus of *prg* to 29D1 in the polytene chromosomes (red arrow). The P element (line 401 from (Han et al., 1996)) carries a *ry* transgene used for identification. In the map below, a second P transposon lying approximately 400 bp from 401, in the 5' end of *prg*, *P{GT1}fju2^{BC02741}* is depicted as an inverted triangle. *prg* has one intron (thin blue line) and two exons (colored rectangles). The open reading frame is the dark blue, whereas the 5' leader and 3' trailer sequences are light blue. (B) The *prg* transcript codes for a 558 aa predicted protein with an amino terminus ZAD domain, and 9 ZFs, divided in two blocks, with 6 and 3 ZFs, respectively. (C) Semi-quantitative PCR shows that *prg³* has a significant reduction in the *prg* transcripts; ** is significantly different at $p < 0.05$ (*t*-test).

1C and S2). Single amino acid changes in very conserved positions in ZAD domains are sufficient to explain loss of function alleles in *sry-δ* and *Zw5/SBP* (Crozatier et al., 1992; Gaszner et al., 1999). Overall, this collectively argues very strongly for CG9233 as the locus for *prg*.

2.2. *prg* embryonic expression and phenotypes

prg is expressed very dynamically during embryogenesis (Fig. 2A). From early mRNA expression in the non-cellularized embryo, both the mRNA and the protein product are expressed primarily in the ectoderm, in the germband, during germband extension and retraction, and, later, in the mesoderm as well as during dorsal closure. At the end of embryogenesis expression is also seen in the endoderm. We generated a rat polyclonal antibody against the first 400 aa of the predicted Prg protein. The antibody recognizes a single band of approximately 60 kD, consistent with the size of the protein (Fig. S3). The Prg embryonic protein expression is very comparable to the mRNA (Figs. 2A, S3). This expression

pattern is compatible with several requirements for Prg during embryogenesis.

We studied *prg* expression in imaginal tissue (Fig. 2B). *prg* is expressed in wing, eye-antenna, and leg discs. The expression seen is fairly generalized, yet in the eye-antennal disc expression is highest in the eye portion of the disc, particularly in undifferentiated cells ahead of the morphogenetic furrow. This is consistent with a function for *prg* in imaginal development.

prg mutants are all lethal, with an extended phenocritical period that encompasses embryogenesis and first-second instar larvae. We collected and counted *prg* mutant alleles and control homozygous wild type embryos from 24 h egg lays. We cultured them for at least another 24 h, and examined them. *prg* has several embryonic mutant phenotypes. Roughly a quarter of embryos treated this way do not develop cuticles in *prg²* and *prg³*, significantly different from control and *prg¹* (Fig. 3A). This implies an early embryonic requirement for Prg function, consistent with the early maternally derived expression of *prg* mRNA and

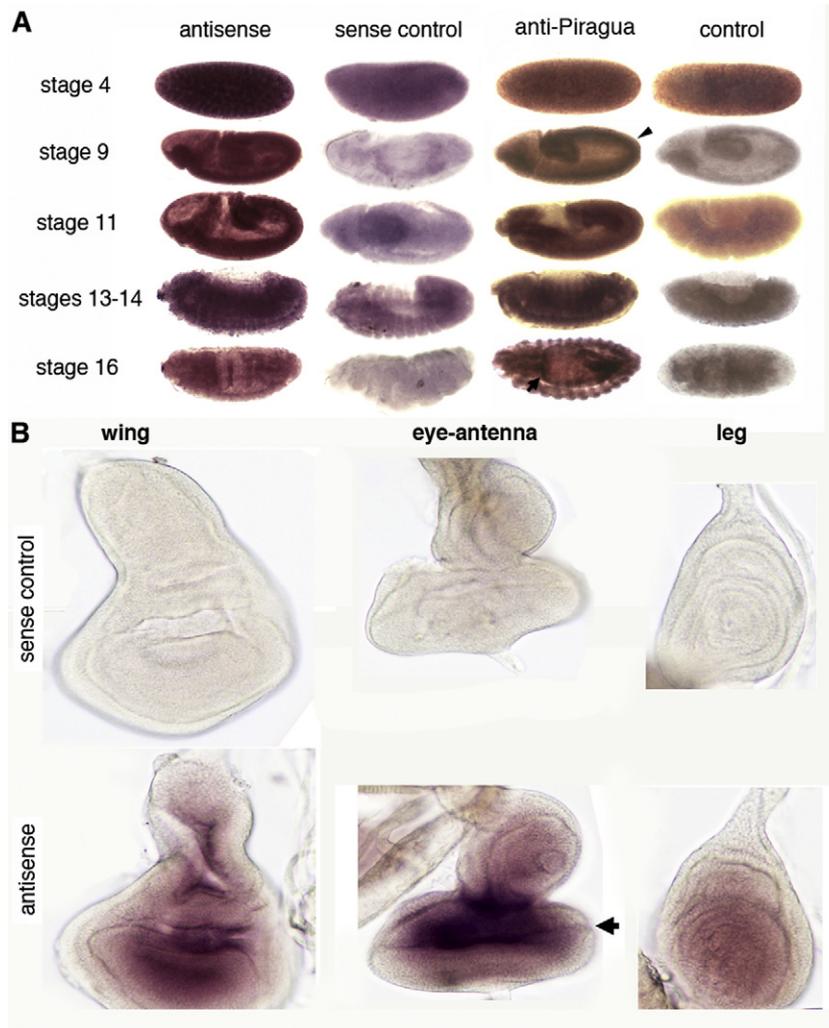


Fig. 2. (A) *prg* transcript and Prg protein are expressed in a dynamic pattern, highly correlated, during embryogenesis. From an early generalized *prg* expression, both the transcript and the protein are expressed in the germband (arrowhead), the lateral epithelium, the mesoderm, and finally, the endoderm (arrow) at the end of embryogenesis. In situ controls were a sense probe, and immunostaining controls had no primary antibody in the incubation. Embryos are arranged in a lateral view with dorsal side up, and anterior left. (B) *piragua* is expressed in imaginal discs. Third instar wing, eye-antenna, and leg disc show significant expression of the *piragua* transcripts (bottom row; top row are corresponding sense probe controls). Arrow in eye-antenna disc marks the morphogenetic furrow. Expression of *piragua* is higher in front of the morphogenetic furrow.

protein. Next, we analyzed dead embryos that form cuticles: some cuticles have dorsal open phenotypes, and a few head involution defects (Fig. 3B). This difference is significantly different for *prg*², and is consistent with a later requirement for Prg during embryogenesis. Notice the extensive *prg* mRNA and protein in the lateral epithelium during dorsal closure stages (Fig. 2A). Next, we analyzed the mutant embryos that hatched: they all died as first and second instar larvae (Table 1), with *prg*² and *prg*³ having a significantly lower hatching rate, due to earlier mortality (Fig. 3C). *prg* mutant larvae are sluggish, eventually stopping movement and dying. No *prg* homozygote reaches pupation (Fig. 3D). Dead mutant larvae have wild type cuticles. From these data, we generated an allelic series: *prg*² > = *prg*³ > *prg*¹, since *prg*³ mutants have a significant reduction in mRNA expression not present in *prg*², but similar hatching rates, and *prg*² mutants have a significant difference in cuticular phenotypes. *prg*¹ is the weaker mutant allele, with no significantly different embryonic phenotypes. The mutant phenotypes are also consistent with the *prg* expression pattern.

We generated *prg*³ germline clones. These eggs are significantly smaller than control eggs, do not develop, and have abnormal dorsal appendages (Fig. 3E–G). This is consistent with a Prg requirement during oogenesis, and shows an early requirement for Prg function during oogenesis.

Finally, we attempted a rescue experiment in *prg*³ homozygotes, using an actin-Gal4 driver and two copies of a UAS-*prg* construct. We rescued embryonic phenotypes (cuticular defects and excess of dead embryos with no cuticle synthesized), but surviving larvae did not eclose as adults (Fig. S4). This is consistent with other *prg* requirements during larval life, which we were not able to rescue. Semi-quantitative PCR in these embryos showed that the rescue-expressing embryos had a significantly higher level of *prg* transcript expression (Fig. S4C). Taken together, all the foregoing point to CG9233 as coding for *prg*.

2.3. *prg* and *fve* interact during embryogenesis

Recent work identified the *piragua* locus (referred to as CG9233) in a supercompetition screen that identified loci expressed early and required in losing cells for cell death in wing imaginal discs. Populations of imaginal cells with different amounts of Myc were confronted: Regular cells versus Myc ectopically expressing cells. *prg* expression augments in loser, regular cells. In this confrontation, besides *prg*, 'loser cells' express higher levels of a few other genes (Rhiner et al., 2010).

The work identified a total of six genes expressed early in 'loser cells'. RNAi against these genes in 'loser cells' found that in three cases this prevented 'losing cells' from being culled. The three genes are *prg*, *flower*

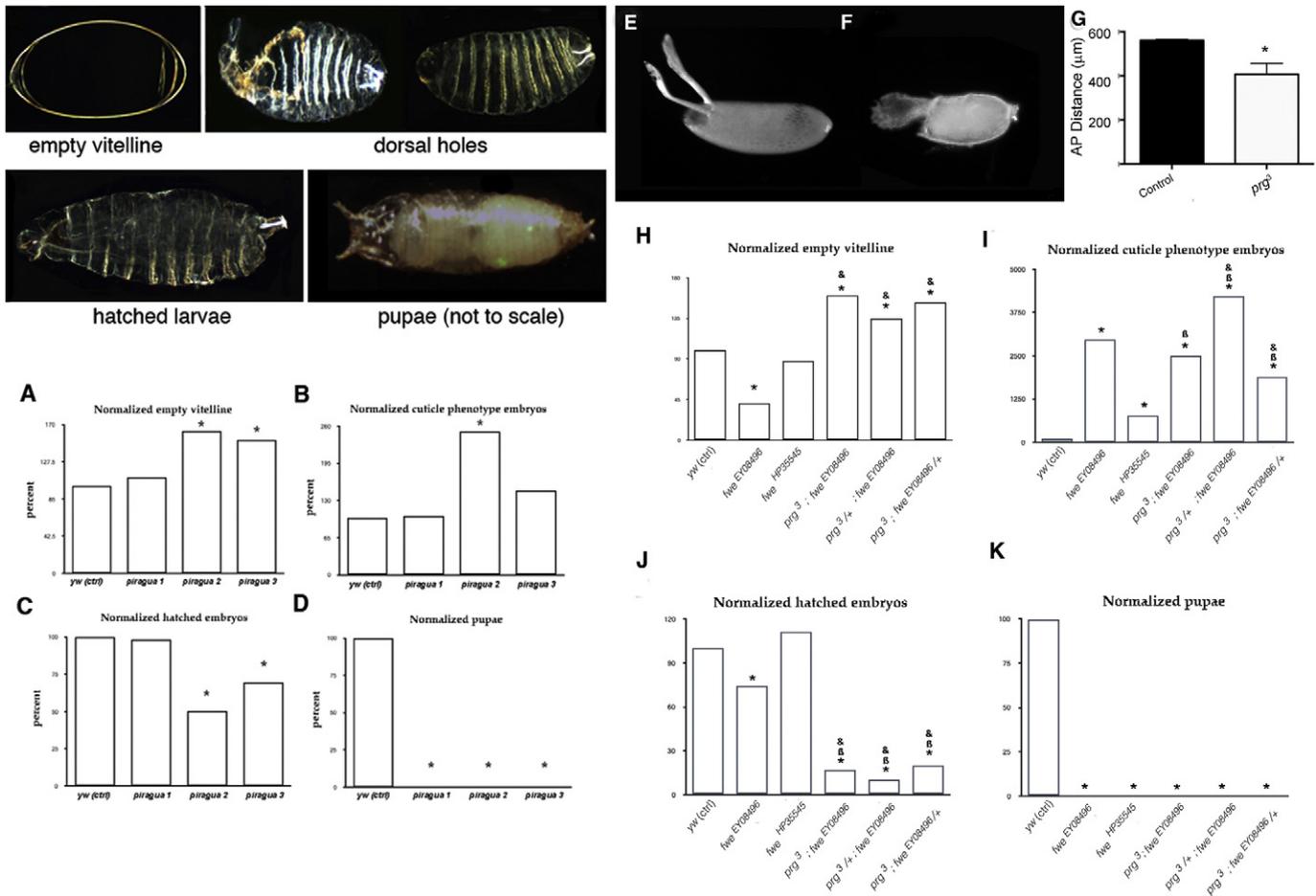


Fig. 3. *prg* mutant phenotypes and interaction with *fwe*. The top panels depict *prg* mutant embryonic phenotypes: The left panel shows a vitelline membrane without any cuticle inside (*prg²* mutant embryo; empty vitelline), whereas the right panel shows a dorsal open (*prg³* mutant embryo; middle) and a head involution defective (*prg²* mutant embryo; right) cuticles. The lower row shows a first instar larval cuticle (*prg²*; left), and a pupa (wild type; right). These four panels correspond to the phenotypes quantitated in (A–D) in the lower half of the figure, respectively. For all panels except the pupa, views are lateral with anterior left, and dorsal up. The pupa is a dorsal view. (A) Normalized frequency of empty vitelline membrane phenotype, referred to a *y,w* strain control. (B) Normalized frequency of dorsal closure plus head involution (cuticle phenotypes) in *prg* mutant alleles compared to a *y,w* control. (C) Normalized hatching frequency of mutant embryos, compared to control. (D) Normalized frequency of occurrence of pupae of *prg* mutants (none were ever observed) versus *y,w* control strain. In (A–D) significant differences are marked by an asterisk (chi-square). *n* = 583 for *y,w*; 511 for *prg¹*; 510 for *prg²* and 545 for *prg³*. *prg³* germline clones are defective. (E) shows a *y,w* control newly oviposited embryo. (F) shows a *prg³* newly oviposited germline clone. Note reduction in size and malformation of dorsal appendages in (F), compared to (E). (G) shows the significant difference in length measurement (anterior–posterior; AP) between wild type (control) embryos and *prg³* germline clones. *n* = 8 for wild type, and 16 for *prg³*; *p* < 0.05 (*t*-test). In (F) and (G) anterior is left, and dorsal is up. A fraction of *fwe* mutant embryos die during embryogenesis; the rest as larvae, and *fwe* and *prg* genetically interact. (H) Normalized frequency of empty vitelline phenotype for *fwe* mutant embryos and *fwe-prg* genetic interactions. (I) Normalized frequency of cuticle phenotypes (dorsal closure plus head involution defects) for *fwe* mutant embryos and *fwe-prg* genetic interactions. (J) Normalized frequency of hatching for *fwe* mutant embryos and *fwe-prg* genetic interactions. (K) Normalized frequency of occurrence of pupae for *fwe* mutant embryos and *fwe-prg* genetic interactions (in the mutant strains, no pupae were ever observed). For (H)–(K) an asterisk (*) denotes a significant difference from the *y,w* control strain; β denotes a significant difference from the *prg³* mutant strain, and & denotes a significant difference from the *fwe^{EY08496}* mutant strain. *p* < 0.05; chi-square. *n* = 583 for a; 1237 for b; 677 for c; 541 for d; 166 for e; and 79 for f.

(*fwe*), and *lamp1*. We wondered whether any of these two other genes interact with *prg* in a loss of function scenario – specifically in embryos, where *prg* mutants harbor phenotypes. Would lack of function of any of these other genes have on their own phenotypic consequences akin to *prg* embryos?

lamp1 codes for a membrane protein present in the lysosome and plasma membranes. Not much is known about *lamp1* (Hofmann and Munro, 2006). All alleles known are described as viable and fertile (FlyBase, 2003).

Table 1

piragua mutant larvae survival. The table shows the actual number of early first instar homozygous mutant larvae identified, cultured separately from sibling heterozygous larvae, and the numbers of larvae that died as first instar and as second instar for *prg¹* and *prg³*.

Genotype	Total larvae	First instar dead	Second instar dead	Third instar dead
<i>prg¹</i>	25	17	6	–
<i>prg³</i>	80	42	38	–

fwe codes also for a membrane protein, thought to oligomerize to form a calcium channel (Yao et al., 2009b), and to act also as part of a code, via expression of some Fwe ‘lose’ isoforms, signaling from expressing cells that are to be culled from the tissue (Rhiner et al., 2010). In the ectopic Myc-driven supercompetition assay loser cells in wing imaginal tissue express two specific isoforms of Fwe (Fwe loser A and loser B forms, the longest isoforms), whereas in another scenario, during normal final eye morphogenesis, only one ‘loser’ Fwe isoform (Fwe loser B isoform) is expressed (Merino et al., 2013). We wondered whether *fwe* has an embryonic phenotype, and if so, whether *prg* and *fwe* might interact.

We first studied whether *fwe* loss-of-function homozygotes have bona fide embryonic phenotypes, in particular if they are comparable to *prg*. We examined two *fwe* alleles, *fwe^{HP35545}* and *fwe^{EY08496}*. Both are P-element transposon insertions in the *fwe* 5’ UTR region, at 44 and 56 bp 3’ from the start of transcription, respectively (FlyBase, 2003). In our hands, both alleles are lethal, with embryonic and first instar larval phenocritical periods (Fig. 3H–K). About three quarters of

fwe^{HP35545} die as first instar larvae (74.5%), and the remaining 24.5% die as embryos, whereas close to half (47.7%) of *fwe*^{EY08496} die as first instar larvae, and the rest (52.3%) as embryos (Fig. 3H–K).

Of the dead embryos, in *fwe*^{HP3554} mutant embryos, a fraction has no cuticle, and a quarter has head involution defects (Figs. 3H and S5B). In *fwe*^{EY08496} dead embryos, strikingly about two thirds have head involution defects (Figs. 3H and S5A). Of these two, *fwe*^{EY08496} is the strongest allele. This head involution phenotype constitutes the main phenotype of *fwe* mutant embryos, a phenotype also seen in *prg* mutant embryos, although much less frequent. A small fraction of *fwe* mutants also has dorsal closure defects. In summary, the phenocritical period of mutant alleles of both loci is equivalent: embryonic development and first/second instar larvae, and the cuticular defects of those embryos that synthesize cuticle are similar,

with head involution defects being the norm in *fwe*, whereas lack of cuticle is the most common phenotype in *prg*.

Since *fwe* and *prg* have roughly similar phenocritical periods, share types of embryonic phenotypes, we wondered whether they also genetically interact (Fig. 3H–K). Regardless of the genetic combination (a double mutant homozygote, or heterozygous mutant for one gene and homozygous mutant for the other), results are similar: the resulting embryos have an abundance of dead embryos without synthesizing cuticle, like *prg*, and also an abundance of head involution defects, like *fwe*. As a consequence, up to 89% of mutant embryos die, with the few remaining larvae dying as first instar larvae. This increase in embryonic lethality is highly significant in all cases, and points to a genetic interaction between the two loci.

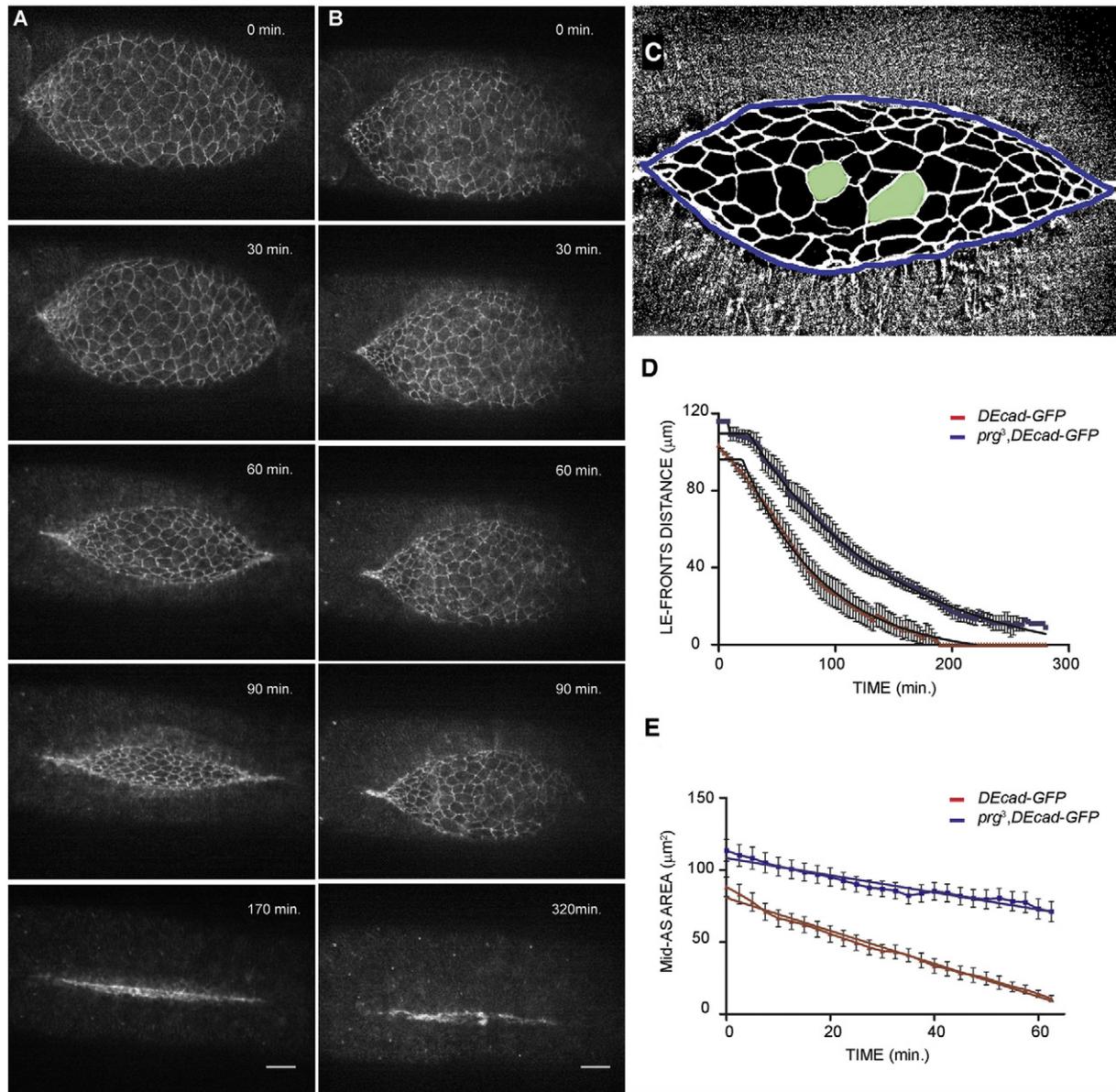


Fig. 4. Dorsal closure dynamics in *prg* and wild type embryos. (A) a *y,w* control strain, and (B) a *prg*³ mutant embryo. Depicted are stills taken from live imaging of the dorsal aspects of embryos undergoing dorsal closure showing the AS and LaE cells, marked by expression of *DEcad-GFP* to mark cell borders, from movies in SM1. Notice lag in the *prg*³ embryo in closing. Experiments were done at 22 °C. Scale is 30 μm. Quantification of dorsal closure dynamics of a *y,w* control strain and *prg*³ embryos. In (C), a frame from a video is shown with a blue line marking the border between pulsating AS cells and advancing LaE cell sheets. In green, two AS cells in the middle of the field are highlighted. (D) shows a significant difference in the speed of closing of LaE over the AS, by measuring central distance between dorsalward LaE cell sheets versus time. In (D) and (E) the red line depicts the *y,w* control strain, and the blue line the *prg*³ mutant strain. Standard error of the mean is depicted by vertical bars in both cases. $p < 0.01$ (t -test for linear correlation). $n =$ at least 4.

2.4. *prg* displays sluggish kinetics during dorsal closure

Since embryonic cuticular phenotypes found in *prg* mutants are dorsal closure and ensuing head involution defects, we next examined whether there are dorsal closure defects in living *prg*³ embryos that may explain the mutant phenotypes. In particular, whether these defects, if present, may also explain why the defects are seen only in a fraction of embryos. We examined the kinetics of dorsal closure in living mutant and control embryos (Fig. 4A–B). We found that *prg* mutants display significantly delayed kinetics compared to wild type controls (Fig. 4D–E), quantitated by either the remaining AS area left in the dorsal aspect of the developing embryo, or the distance separating advancing LE. In some cases, this sluggishness does not prevent final closure (Movie SM1), while in other cases, this led to failures and abnormal alignment of LaE sheets (Movie SM2), exemplified by detachment of LE from the underlying AS, similar to other dorsal closure mutants, like *basket* (Movie SM3). This kinetic phenotype is consistent and may explain the cuticular embryonic phenotypes seen in *prg*, as well as its occurrence in some, but not all, embryos (those that finalize embryonic development then die as larvae).

2.5. Mutant *prg* clones have extensive defects in adults

Since *prg* mutants all die as larvae at the latest, we wondered whether *prg* might have other functions later in development, especially since loss-of-function can impair cell death in super-competition assays in wing imaginal tissue, and there is *prg* expression in imaginal discs (Fig. 2B). We generated *prg* mutant clones in cells giving rise to dorsal thorax (wing imaginal disc) and compound eye (eye-antenna discs) (Fig. 5). We found that thoracic mutant clones lacked chaetae, and in cases, showed a slight indentation of the mid-dorsal thorax, suggestive of problems with thoracic closure, problems that may be consistent with altered thoracic closure kinetics, compared to controls (Fig. 5A–H).

Mutant eye tissue had very striking defects, compared to controls (Fig. 5I–Q), with lack of eye bristles, extensive malformation of ommatidial cones, leading in some cases to holes within them, extreme roughness of the compound eye, and extensive disarray of ommatidial cells and reticular cytoarchitecture, with common picnotic figures in tissue sections. These defects stand in stark contrast to those encountered with *five* mutants, where only extra photoreceptor cells are culled (and thus, believed to be barred from forming incomplete ommatidia at the rim of the compound eyes), via physiological expression of the *five* gene 'loserB' protein isoform (Merino et al., 2013). These defects arose both in cases where mutant cells were next to wild type control cells (Fig. 5L–N), or when twin-spot and heterozygous cells mainly died from expression of a *hid* transgene (Fig. 5O–Q).

Overall, we see extensive imaginal defect in several tissues. The occurrence of picnotic figures in mutant clones (Fig. 5N and Q) suggests that cell death can happen in *prg* mutant cells, at least in conditions where there is no super-competition. The damage to the eye cytoarchitecture is so extensive as to lead to eye collapse and warrant further studies.

3. Discussion

3.1. *piragua* is a ZAD-ZF protein

In *Drosophila* there are 81 loci encoding proteins with ZAD and ZF domains (Chung et al., 2007). The ZAD motif is always amino terminal in these proteins, and in different insect groups particular classes have suffered specific lineage expansions. Studied vertebrate genomes have only one ZAD motif-containing gene (Chung et al., 2007; Chung et al., 2002). Known examples include gene expression regulators. *prg* codes for a ZAD-ZF transcription factor, part of this extensive class in many invertebrates, thought to be partially redundant, and to have had lineage specific recent expansions.

Drosophila ZAD-ZF genes are diverse. Studied examples are: The insulator promoter *zeste-white-5/scs binding protein* (*zw5/SBP*) (Gaszner et al., 1999), the transcription factors *grauzone* (Harms et al., 2000), *poils au dos* (Gibert et al., 2005), and *zif* (Chang et al., 2010), the transcription factor-associated *dorsal interacting protein1* (*Dip1*) (Chung et al., 2002), *trade embargo*, required for chromosome recombination (Lake et al., 2011), *hangover* for stress and ethanol tolerance (Scholz et al., 2005), and *ranshi* for female fertility (Lewandowski et al., 2010). *piragua* appears to be the more pleiotropic of the lot: Here we show requirements in many different developmental contexts.

Developmental processes occur via cellular phenomena: Cellular proliferation, cellular shape changes, changes in cellular motility and adhesivity, cell competition and survival, and changes in cellular signaling and gene expression (Gilbert et al., 2006). *piragua* affects several developmental processes. Altering these varied phenomena suggests that a common denominator is at work, similarly altering different cellular contexts.

3.2. *prg* is a vital and pleiotropic gene

prg also has an extended phenocritical period, and the defects evidenced in different cellular contexts in the mutants are varied: abnormal morphology, no cuticle formation, cuticular defects, sluggish development, and extensive imaginal tissue defects, including picnotic figures and overall disarray of tissue architecture. What could be influencing all these phenotypes? As a transcription factor, *prg* could be inscribed into the hazy category of somewhat "general" developmental regulators.

In this sense, the fact that development timing, like in dorsal closure stages, is different in the *prg* mutant conditions, leading at the end to failure, could be instructive. This timing alteration is perhaps also reflected in the sluggishness that accompanies mutant larvae. A way to tie all these dissimilar phenotypes might lie precisely in timing. Keeping the right timing is essential: too long developmental times lead, in some cases, to early failure, and in others, to distraught development, whereas fast timing can also be just as disruptive, ending, in extreme cases, in death.

Prg was identified in a gain-of-function screen as member of a class of genes expressed early in 'loser' cells required for death. This associates *Prg* with 'loser', 'sluggish' cells that lose in cell-cell competition during development. As an extension of this interpretation *Prg* might be required in cells with different "vigor and fitness" as compared to neighbors, as being part and parcel of cells that might need a different tempo during development.

For example, it is well known that during dorsal closure, the speed at which cells change shape is critical. Too much activation, like in the *puc* phosphatase mutants, generates lethal dorsal open phenotypes (Martin-Blanco et al., 1998), similar to the mutant phenotype resulting from reduction of activation, like in *bsk* mutants (Riesgo-Escovar et al., 1996). *Prg* function, and the expression program that goes with it, might lead to the appropriate "competitiveness" and the right "speed" of cells undergoing several developmental processes, like shape changes. It might then result in dorsal closure having proper dorsal closure kinetics.

Prg could function to dictate the tempo of several other developmental processes, a function hinted at from the *Myc* gain-of-function screen, an instance where *Prg* could function to 'prepare' cells to die, driving them to a different tempo (Rhiner et al., 2010). Violation of these time parameters could lead to tissue disarray, and end in disparate phenotypes, like morphological abnormalities exemplified in abnormal mutant eggs, dorsal and anterior open mutant phenotypes, thorax malformations, or strong eye phenotypes. In this way, *prg* might exemplify a different class of heterochronic mutations, where timing becomes critical in particular developmental contexts, and where different developmental velocities might turn out to be advantageous. A change in these normal but different rhythmicities would lead, either

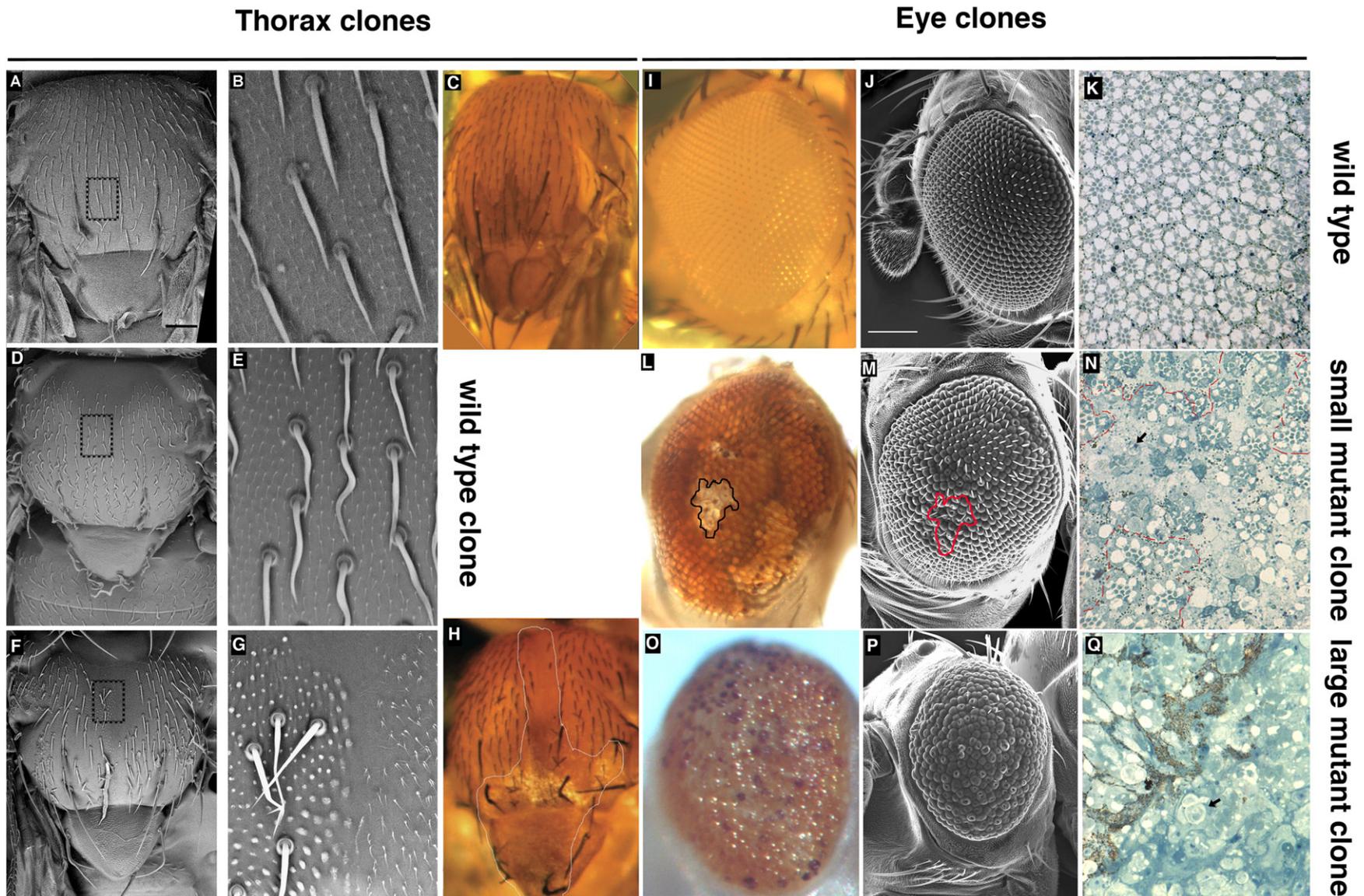


Fig. 5. *prg* mutant clones in imaginal tissue in the dorsal thorax and the compound eye. Left side, thorax; right side, compound eye. The *prg* mutant dorsal thorax has fewer bristles and has indentations. (A) and (B) show scanning electron micrographs of a control thorax. (C) shows a wild type thorax as in (A), but photographed with transmitted light stereomicroscopy. (D) and (E) show a big clone of cells (marked by wavy bristles) of wild type cells, showing clone formation does not disrupt chaetae or thorax closure. (F) and (G) show a *prg*³ mutant clone (marked by *forked*⁻ bristles), showing death of chaetae and an indentation of the dorsal thorax. In (G), twin spot wild type clone is marked by *mwh*⁻ bristles. (H) shows a *prg*³ mutant clone (delimited by the white line) in a dorsal thorax, photographed with transmitted light stereomicroscopy. Black rectangles in (A), (D) and (F) mark corresponding areas enlarged in (B), (E) and (G). (C) and (H) are pictures from living, anesthetized flies, whereas A–B, D–E and F–G are scanning electron microscope pictures. *prg* clones in the eye have dramatic mutant phenotypes. (I) shows a wild type compound eye of the control *y,w* strain, whereas (L) shows a compound eye from a fly where *prg*³ homozygous mutant clones, marked by lack of pigment (one is outlined in black), and twin spots (marked by dark red) are interspersed with heterozygous eye tissue (marked by lighter red color). Twin spot and heterozygous cells have no mutant phenotypes. *prg*³ homozygous mutant cells form irregularly spaced and sized ommatidia, lack eye bristles, and often, ommatidial cones sport a central hole. (O) shows a compound eye from a fly with *prg*³ mutant clones, and where most of the corresponding twin spot and heterozygous tissue has been eliminated by use of a *hid* transgene. Mutant phenotypes are the same as in (B). Images in (J), (M) and (P) are the corresponding scanning electron micrographs from the same eyes in (I), (L) and (O). (K), (N) and (Q) are pictures of tangential sections of compound eyes of the same phenotypes as in (I), (L) and (O). A mutant *prg*³ clone is outlined in red in (M). Mutant tissue has frequent picnotic cells (arrows in (N) and (Q)), shows extreme disruption of cytoarchitecture, cell debris, and empty spaces.

by accumulated partial defects, or by stronger defects at any one point, to failure and death.

This in no way precludes particular defects arising out of specific deficits in any one developmental context. In this regard, *prg* being a transcription factor might translate into regulation of some genes in some environmental milieus, and not in others. It would be of interest to see whether *prg* has such functions, perhaps besides the proposed “vigor” and “developmental speed” function, which might tie well with the described and here more amply documented interaction with *fwe*.

Finally, *Prg* timing defects might also be due to the fact that cells and tissues are developing in a ‘rarefied’ mutant ambience, and as the developmental context is not normal, it might just take longer to proceed. In essence, in this view, the different timing in *Prg* mutants is just a consequence of an abnormal developmental context. To substantiate any of the above interpretations, knowledge of the genes regulated by *Prg* should be illuminating.

3.3. *prg* and *fwe* have both common and distinct phenotypes

Despite the fact that *fwe* and *prg* have common defects: Embryonic mutant phenotypes, similar phenotypes in super competition assays in wing imaginal cells, and embryonic genetic interactions, not all defects are similar. Specifically, imaginal tissue phenotypes differ. Whereas *fwe* has a function in the culling of supernumerary cells in the rim of compound eyes, *prg* has a more widespread and critical function in the compound eye: mutant cells have striking defects, leading ultimately to death and gross tissue deformity and disorganization. This might ultimately reflect a more general and vital role for *prg* in imaginal development, as outlined above, and shed light on the array of functions and genes that *prg* regulates. In contrast, *Fwe* might be tuned more narrowly to cell-cell competition between similar cells, and not more general, broad tuning of developmental timing. *Prg* would intersect with *Fwe* just in this one aspect.

It is clear future studies addressing the extent and variety of *prg*-regulated genes are in order, to clarify the manner(s) and extent of *prg* function. It is perhaps surprising that particular embryonic and larval phenotypes are reasonably mild compared to eye phenotypes. So, imaginal tissue development and differentiation might be more illuminating, perhaps due to higher temporal astringency. Overall, *prg* represents a class of genes timing manifold developmental processes and milieus, and thus, acting as a critical, non-redundant component of development.

4. Experimental procedures

4.1. Fly stocks and genetics

*prg*¹, *prg*², and *prg*³ were isolated as imprecise excisions from the *P{GT1}fu2^{BC02741}* P transposon line (Bloomington stock #12822) by standard procedures. *fwe* mutant alleles were obtained from Bloomington: *fwe*^{EY08496} (stock #16898), and *fwe*^{HP35545} (stock #21983). *bsk*² was obtained from the Tübingen stock center. All stocks were balanced with GFP-expressing balancer chromosomes. For the genetic interactions, *prg*³ and *fwe*^{EY08496} were doubly balanced with a GFP-expressing attached second and third chromosome balancer. A *y,w* stock was the general background control stock. Rescue experiments were performed with *UAS-prgC1* and *UAS-prgC3* transgenic flies, which were independent insertions of a *UAS-prg* construct. The *UAS-prg* construct was obtained from ligating onto the pUAST vector the full length *Not1-Kpn1* digested RE69756 cDNA obtained from the Berkeley *Drosophila* Genome Project (Stapleton et al., 2002) and injected in a *y,w* background. The FRT-FLP technique was used for clonal analysis in imaginal tissue (Xu and Rubin, 1993), using a *prg*³ allele recombined onto an FRT40 chromosome. *prg* germ line clones were generated by the FLP-DFS technique (Chou and Perrimon, 1996), using the *y*−, *w*−, *hsFlp*; *w*+, *ovoD1*, *FRT40A/CyO* (Bloomington stock #2121) and the *prg*³ FRT40A chromosome. For live imaging, a *UAS-DECad-GFP* (Solon et al., 2009) construct

was introduced into the *y,w* and *prg*³ stocks, and driven with the 69B *Gal4* construct (Brand and Perrimon, 1993).

4.2. Cuticle preparation

Cuticles were prepared as described (Riesgo-Escovar et al., 1996). Eggs were collected on yeasted agar-grape juice plates for 24 h and aged at least another 24 h at 25 °C to allow for embryonic development. We mounted embryos in Hoyer’s or PVA-Lactic Acid (BioQuip Products, Inc.) mounting mediums. Embryos were viewed and digitized on an Eclipse microscope (Nikon) equipped with a Photonics camera.

4.3. Sequencing

Sequencing analysis was carried out from PCR-amplified 7 DNA fragments covering the genomic *prg* locus, from fly DNA purified according to (Riesgo-Escovar and Hafen, 1997a). We used 5 dead mutant embryos for DNA purification. Primers used were:

PRGF1 = GCATCATCAAACCTCAACCCC
 PRGB1 = CCGTATTATGGTGGCACAGG
 PRGF2 = GCCTGTGCCACCATAATACG
 PRGB2 = CTCCTCATCATCGTCGCATAG
 PRGF3 = TGAGGAGGAGGAGGAAGACTAC
 PRGB3 = GACTTGCTGGTGGGCTATTAG
 PRGF4 = ACCAGCAAGTCCATACCAGG
 PRGB4 = CTGTAGAAGCCCAGATTCATTG
 PRGF5 = CGAACTTTCCAACGGGAGAG
 PRGB5 = CGACTAAAACAGCCTTGACCT
 PRGF6 = GTCAAGGCTGTTTGTAGTCGTT
 PRGB6 = AAGGTGGATTGTTATCCCTC
 PRGF7 = TCTTTCTTGAGTTCGCCCC
 PRGB7 = CGCCAACACCTAAACACATC

4.4. Semi-quantitative RT-PCR

Selected homozygous mutant embryos were washed three times with PBS after dechoriation. Almost 300 embryos were used per RNA extraction by the Trizol method. 3 µg of RNA were used to generate single strand cDNA using the M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA). For semi-quantitative PCR, common *rp49* and several of the *prg* primers shown in 4.3 were used. Logarithmic phase was calculated for the genes assayed: 22 cycles for PCR *rp49* and 26 cycles for *prg*. Resulting PCR products were separated electrophoretically in a 2% agarose gel.

4.5. Live imaging

We recombined and employed a GFP-tagged DE-cadherin construct to follow DC in *prg*³ and *prg*² mutants and wild type embryos. The study encompassed stages 13–15 of embryogenesis (DC) using either a spinning disc confocal microscope (Nikon) or a LSM 7 Live confocal microscope (Zeiss). Embryos were dechorionated, washed and mounted in Halocarbon oil in glass-bottomed culture dishes and imaged. Projections and time-lapse series were assembled and analyzed using ImageJ (Schneider et al., 2012). Measurements of distance from LE borders were done with a 20× objective. *n* = 5 for wild type and 4 for *prg*. Plateau with decay function were adjusted for differences between

slopes and were different at *p* < 0.001. Apical surface measurement of areas of mid-AS cells in wild type (*n* = 10) and *prg* mutants (*n* = 20) were done at 60× measured and stage standardized by using images of embryos with the same distance between lateral sheets of LaE. Linear correlation was adjusted and T was significant at *p* < 0.001.

4.6. In situ hybridization

Embryos and imaginal discs were collected and processed as in (Riesgo-Escovar et al., 1996) using the slow formaldehyde fix method.

We used as probes digoxigenin-marked RNA (both sense and antisense probes) transcribed from RE69756 cDNA, according to the manufacturer's instructions (Roche).

4.7. Immunostaining

Embryos were collected and fixed using the fast formaldehyde fix method as in (Young et al., 1993). Embryos were blocked with 25% bovine serum in PBST. All washes and incubations were performed in 5% bovine serum in PBS. We generated a Prg polyclonal antibody by injecting a peptide with the first 400 aa of Prg in rats. Anti-Prg antibody was incubated in a 1:100 dilution and anti-rat in a 1:1000 dilution. We obtained micrographs using a Nikon Eclipse microscope equipped with a 10× objective, 0.3 NA using bright field optics. For the anti-Prg fluorescence stainings in Fig. S4, we fixed and stained embryos according to (Riesgo-Escovar et al., 1996). We used a 1:250 dilution of the anti-Prg antibody, and a 1:500 GFP-anti rat secondary antibody. We counterstained with DAPI. We obtained micrographs using a Zeiss 510 Meta confocal microscope using the 40×, 1.2NA water corrected objective at various electronic zoom settings (4.1 and 8.2 for panels A–C and D–F, respectively, in Fig. S3, single optical sections).

4.8. Western blot

Embryos were collected, processed, and Western blots performed according to (Riesgo-Escovar et al., 1996). We used a 1:1000 dilution of the anti-beta-tubulin antibody (E7 from the Developmental Studies Hybridoma Bank) and 1:300 dilution of the affinity purified anti-Prg polyclonal antibody. Blots were developed using NBT-NCIP (nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate) and a secondary anti-mouse or anti-rat antibody, respectively, coupled to alkaline phosphatase (1:1000). Experiments with *prg* mutant homogenates yielded similar results.

4.9. Scanning electron microscopy

We processed adult flies for scanning electron microscopy as in (Riesgo-Escovar and Hafen, 1997a).

4.10. Bioinformatics

Sequence comparisons, dendrogram analysis, and sequence alignments were done using BLAST (Altschul et al., 1990).

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2016.12.003>.

Acknowledgements

Funding: This work was supported by CONACYT grant #177962 to JRRE, and Instituto de Neurobiología, UNAM, D-04 laboratory budget to JRRE. Nestor Octavio Nazario-Yépiz was a graduate student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, and was a recipient of CONACYT graduate fellowship # 161748.

We acknowledge Laura Briones and Angélica Tello for help generating the *prg* alleles, Denise Nellen for help with the polytene chromosome in situ, Aynur Kaya, Nadia Dube, Yury Belyaev, and Nydia Hernandez for help with microscopy, Damian Brunner for stocks and help, and Teresa Peña for stock-keeping.

References

Lander, E.S., et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A., 2006. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome Res.* 5, 196–201.
Bate, M., Martinez Arias, A., 1993. The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
Belacortu, Y., Weiss, R., Kadener, S., Paricio, N., 2011. Expression of *Drosophila* Cabut during early embryogenesis, dorsal closure and nervous system development. *Gene Expr. Patterns* 11, 190–201.
Bloor, J.W., Kiehart, D.P., 2002. *Drosophila* RhoA regulates the cytoskeleton and cell–cell adhesion in the developing epidermis. *Development* 129, 3173–3183.
Brand, A.H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
Casas-Tinto, S., Torres, M., Moreno, E., 2011. The flower code and cancer development. *Clin. Transl. Oncol.* 13, 5–9.
Chang, K.C., Garcia-Alvarez, G., Somers, G., Sousa-Nunes, R., Rossi, F., Lee, Y.Y., Soon, S.B., Gonzalez, C., Chia, W., Wang, H., 2010. Interplay between the transcription factor Zif and aPKC regulates neuroblast polarity and self-renewal. *Dev. Cell* 19, 778–785.
Chen, B., Harms, E., Chu, T., Henrion, G., Strickland, S., 2000. Completion of meiosis in *Drosophila* oocytes requires transcriptional control by Grauzone, a new zinc finger protein. *Development* 127, 1243–1251.
Chou, T.B., Perrimon, N., 1996. The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144, 1673–1679.
Chung, H.R., Lohr, U., Jackle, H., 2007. Lineage-specific expansion of the zinc finger associated domain ZAD. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1934–1943.
Chung, H.R., Schafer, U., Jackle, H., Bohm, S., 2002. Genomic expansion and clustering of ZAD-containing C2H2 zinc-finger genes in *Drosophila*. *EMBO Rep.* 3, 1158–1162.
Croizatier, M., Kongsuwan, K., Ferrer, P., Merriam, J.R., Lengyel, J.A., Vincent, A., 1992. Single amino acid exchanges in separate domains of the *Drosophila* serendipity delta zinc finger protein cause embryonic and sex biased lethality. *Genetics* 131, 905–916.
Dutta, D., Bloor, J.W., Ruiz-Gomez, M., VijayRaghavan, K., Kiehart, D.P., 2002. Real-time imaging of morphogenetic movements in *Drosophila* using Gal4-UAS-driven expression of GFP fused to the actin-binding domain of moesin. *Genesis* 34, 146–151.
Fernandez, B.G., Arias, A.M., Jacinto, A., 2007. Dpp signalling orchestrates dorsal closure by regulating cell shape changes both in the amnioserosa and in the epidermis. *Mech. Dev.* 124, 884–897.
FlyBase, C., 2003. The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res.* 31, 172–175.
Gamsjaeger, R., Liew, C.K., Loughlin, F.E., Crossley, M., Mackay, J.P., 2007. Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem. Sci.* 32, 63–70.
Gaszner, M., Vazquez, J., Schedl, P., 1999. The Zw5 protein, a component of the scs chromatin domain boundary, is able to block enhancer-promoter interaction. *Genes Dev.* 13, 2098–2107.
Gibert, J.M., Marcellini, S., David, J.R., Schlotterer, C., Simpson, P., 2005. A major bristle QTL from a selected population of *Drosophila* uncovers the zinc-finger transcription factor poils-au-dos, a repressor of achaete-scute. *Dev. Biol.* 288, 194–205.
Gilbert, S.F., Singer, S.R., Tyler, M.S., Kozlowski, R.N., 2006. *Developmental Biology*. eighth ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA.
Han, P.L., Meller, V., Davis, R.L., 1996. The *Drosophila* brain revisited by enhancer detection. *J. Neurobiol.* 31, 88–102.
Harden, N., 2002. Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*. *Differ. Res. Biol. Divers.* 70, 181–203.
Harms, E., Chu, T., Henrion, G., Strickland, S., 2000. The only function of Grauzone required for *Drosophila* oocyte meiosis is transcriptional activation of the cortex gene. *Genetics* 155, 1831–1839.
Hofmann, I., Munro, S., 2006. An N-terminally acetylated Arf-like GTPase is localised to lysosomes and affects their motility. *J. Cell Sci.* 119, 1494–1503.
Homsy, J.G., Jasper, H., Peralta, X.G., Wu, H., Kiehart, D.P., Bohmann, D., 2006. JNK signaling coordinates integrin and actin functions during *Drosophila* embryogenesis. *Dev. Dyn.* 235, 427–434.
Jankovics, F., Brunner, D., 2006. Transiently reorganized microtubules are essential for zippering during dorsal closure in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Cell* 11, 375–385.
Jauch, R., Bourenkov, G.P., Chung, H.R., Urlaub, H., Reidt, U., Jackle, H., Wahl, M.C., 2003. The zinc finger-associated domain of the *Drosophila* transcription factor grauzone is a novel zinc-coordinating protein-protein interaction module. *Structure* 11, 1393–1402.
Kiehart, D.P., Galbraith, C.G., Edwards, K.A., Rickoll, W.L., Montague, R.A., 2000. Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 149, 471–490.
Knight, R.D., Shimeld, S.M., 2001. Identification of conserved C₂H₂ zinc-finger gene families in the Bilateria. *Genome Biol.* 2 (RESEARCH0016).
Krystel, J., Ayyanathan, K., 2013. Global analysis of target genes of 21 members of the ZAD transcription factor family in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 512, 373–382.
Laity, J.H., Lee, B.M., Wright, P.E., 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 39–46.
Lake, C.M., Nielsen, R.J., Hawley, R.S., 2011. The *Drosophila* zinc finger protein trade embargo is required for double strand break formation in meiosis. *PLoS Genet.* 7, e1002005.
Layton, A.T., Toyama, Y., Yang, G.Q., Edwards, G.S., Kiehart, D.P., Venakides, S., 2009. *Drosophila* morphogenesis: tissue force laws and the modeling of dorsal closure. *HFSP J.* 3, 441–460.
Lewandowski, J.P., Sheehan, K.B., Bennett Jr., P.E., Boswell, R.E., 2010. Mago nashi, tsunagi/Y14, and ranshi form a complex that influences oocyte differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 339, 307–319.
Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A.M., Martinez-Arias, A., 1998. Puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12, 557–570.
Matthews, J.M., Kowalski, K., Liew, C.K., Sharpe, B.K., Fox, A.H., Crossley, M., MacKay, J.P., 2000. A class of zinc fingers involved in protein-protein interactions: biophysical characterization of CCHC fingers from fog and U-shaped. *Eur. J. Biochem.* 267, 1030–1038.

- Matthews, J.M., Sunde, M., 2002. Zinc fingers—folds for many occasions. *IUBMB Life* 54, 351–355.
- Merino, M.M., Rhiner, C., Portela, M., Moreno, E., 2013. “Fitness fingerprints” mediate physiological culling of unwanted neurons in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 23, 1300–1309.
- Morata, G., Ripoll, P., 1975. Minutes: mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* 42, 211–221.
- Moreno, E., Basler, K., 2004. dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* 117, 117–129.
- Moreno, E., Rhiner, C., 2014. Darwin’s multicellularity: from neurotrophic theories and cell competition to fitness fingerprints. *Curr. Opin. Cell Biol.* 31, 16–22.
- Muliyil, S., Krishnakumar, P., Narasimha, M., 2011. Spatial, temporal and molecular hierarchies in the link between death, delamination and dorsal closure. *Development* 138, 3043–3054.
- Mummery-Widmer, J.L., Yamazaki, M., Stoeger, T., Novatchkova, M., Bhalerao, S., Chen, D., Dietzl, G., Dickson, B.J., Knoblich, J.A., 2009. Genome-wide analysis of notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature* 458, 987–992.
- Munoz-Descalzo, S., Belacortu, Y., Paricio, N., 2007. Identification and analysis of cabut orthologs in invertebrates and vertebrates. *Dev. Genes Evol.* 217, 289–298.
- Munoz-Descalzo, S., Terol, J., Paricio, N., 2005. Cabut, a C2H2 zinc finger transcription factor, is required during *Drosophila* dorsal closure downstream of JNK signaling. *Dev. Biol.* 287, 168–179.
- Peralta, X.G., Toyama, Y., Hutson, M.S., Montague, R., Venakides, S., Kiehart, D.P., Edwards, G.S., 2007. Upregulation of forces and morphogenic asymmetries in dorsal closure during *Drosophila* development. *Biophys. J.* 92, 2583–2596.
- Peralta, X.G., Toyama, Y., Kiehart, D.P., Edwards, G.S., 2008. Emergent properties during dorsal closure in *Drosophila* morphogenesis. *Phys. Biol.* 5, 015004.
- Razin, S.V., Borunova, V.V., Maksimenko, O.G., Kantidze, O.L., 2012. Cys2His2 zinc finger protein family: classification, functions, and major members. *Biochemistry (Mosc)* 77, 217–226.
- Reed, B.H., Wilk, R., Schock, F., Lipshitz, H.D., 2004. Integrin-dependent apposition of *Drosophila* extraembryonic membranes promotes morphogenesis and prevents anoikis. *Curr. Biol.* 14, 372–380.
- Rhiner, C., Lopez-Gay, J.M., Soldini, D., Casas-Tinto, S., Martin, F.A., Lombardia, L., Moreno, E., 2010. Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in *Drosophila*. *Dev. Cell* 18, 985–998.
- Rhiner, C., Moreno, E., 2009. Super competition as a possible mechanism to pioneer pre-cancerous fields. *Carcinogenesis* 30, 723–728.
- Riesgo-Escovar, J.R., Hafen, E., 1997a. Common and distinct roles of Dfos and DJun during *Drosophila* development. *Science* 278, 669–672.
- Riesgo-Escovar, J.R., Hafen, E., 1997b. *Drosophila* Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor DJun during dorsal closure. *Genes Dev.* 11, 1717–1727.
- Riesgo-Escovar, J.R., Jenni, M., Fritz, A., 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 Dev.* 10, 2759–2768.
- Rios-Barrera, L.D., Riesgo-Escovar, J.R., 2013. Regulating cell morphogenesis: the *Drosophila* Jun N-terminal kinase pathway. *Genesis* 51, 147–162.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Scholz, H., Franz, M., Heberlein, U., 2005. The hangover gene defines a stress pathway required for ethanol tolerance development. *Nature* 436, 845–847.
- Solon, J., Kaya-Copur, A., Colombelli, J., Brunner, D., 2009. Pulsed forces timed by a ratchet-like mechanism drive directed tissue movement during dorsal closure. *Cell* 137, 1331–1342.
- Stapleton, M., Liao, G., Brokstein, P., Hong, L., Carninci, P., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Champe, M., Pacleb, J., Wan, K., Yu, C., Carlson, J., George, R., Celniker, S., Rubin, G.M., 2002. The *Drosophila* gene collection: identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes. *Genome Res.* 12, 1294–1300.
- VanHook, A., Letsou, A., 2008. Head involution in *Drosophila*: genetic and morphogenetic connections to dorsal closure. *Dev. Dyn. Off. Am. Assoc. Anat.* 237, 28–38.
- Xu, T., Rubin, G.M., 1993. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117, 1223–1237.
- Yao, C.-K., Lin, Y.Q., Ly, C.V., Ohyama, T., Haueter, C.M., Moiseenkova-Bell, V.Y., Wensel, T.G., Bellen, H.J., 2009a. A synaptic vesicle-associated Ca²⁺ channel promotes endocytosis and couples exocytosis to endocytosis. *Cell* 138, 947–960.
- Yao, C.K., Lin, Y.Q., Ly, C.V., Ohyama, T., Haueter, C.M., Moiseenkova-Bell, V.Y., Wensel, T.G., Bellen, H.J., 2009b. A synaptic vesicle-associated Ca²⁺ channel promotes endocytosis and couples exocytosis to endocytosis. *Cell* 138, 947–960.
- Young, P.E., Richman, A.M., Ketchum, A.S., Kiehart, D.P., 1993. Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function. *Genes Dev.* 7, 29–41.
- Zeitlinger, J., Kockel, L., Peverali, F.A., Jackson, D.B., Mlodzik, M., Bohmann, D., 1997. Defective dorsal closure and loss of epidermal decapentaplegic expression in *Drosophila* fos mutants. *EMBO J.* 16, 7393–7401.