



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**Competencia entre Vestigial y Yorkie por el factor de  
transcripción Scalloped en la regulación de la proliferación y  
diferenciación del disco alar de *Drosophila***

Tesis que presenta

**Erik Alejandro Ruiz Pérez**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en la especialidad de Fisiología Celular y Molecular**

Director de tesis:

Dr. Marcos Nahmad Bensusan

Comité Tutorial:

Dra. Lorenza González Mariscal

Dra. Elisa Domínguez Hüttinger

Ciudad de México

agosto de 2022

## Índice

<b>Agradecimientos</b>	4
<b>Resumen</b>	5
<b>Abstract</b>	6
<b>Introducción</b>	7
<i>Drosophila melanogaster como modelo de estudio</i>	7
<i>Ciclo de vida de Drosophila melanogaster</i>	7
<i>El disco imagal alar como modelo de estudio</i>	8
<i>Vestigial es el gen selector de la diferenciación celular de tipo ala</i>	9
<i>Yorkie, Tgi y la regulación de la proliferación celular en el disco alar</i>	11
<i>Sd como proteína integradora de los procesos de diferenciación y crecimiento</i>	13
<i>La función de las proteínas en los procesos de proliferación y diferenciación se describieron alterando sus concentraciones</i>	13
<b>Planteamiento del Problema</b>	16
<b>Objetivo General</b>	17
<b>Objetivos Particulares</b>	18
<i>Objetivo Particular 1</i>	18
<i>Objetivo Particular 2</i>	18
<i>Objetivo Particular 3</i>	18
<b>Metodología</b>	19
<i>Soluciones</i>	19
<i>Modelo experimental</i>	19
<i>Disección de larvas</i>	20
<i>Fijación e inmunofluorescencia</i>	20
<i>Montaje de discos alares</i>	21
<i>Montaje de alas adultas</i>	21

<i>Visualización de los discos imagales y las alas</i>	22
<i>Procesamiento de imágenes de los discos y alas</i>	24
<i>Cruzas</i>	24
<b>Resultados</b>	29
<i>Animales que sobre-expresan Sd en el compartimento posterior no son viables</i>	29
<i>Disminución del tamaño de los discos imagales y las alas cuando Sd se subexpresa</i>	29
<i>El patrón de expresión de Vg es complementario al de Yki</i>	32
<i>Sub-expresión de Sd reduce el patrón nuclear de Vg mientras que el de Yki no cambia</i>	33
<b>Discusión</b>	35
<b>Perspectivas</b>	38
<b>Bibliografía</b>	40

## **Agradecimientos**

Un agradecimiento especial a CONACyT que me apoyó con una beca de maestría, permitiéndome desarrollar este trabajo.

Al Dr. Marcos Nahmad Bensusan por aceptarme en su laboratorio y por enseñarme todo lo necesario para desarrollarme en mi práctica profesional.

A la doctora Lorenza González-Mariscal y Muriel y a la doctora Elisa Domínguez Hüttinger por sus aportes al desarrollo y presentación de este proyecto.

A mis padres y hermanos que siempre han estado apoyándome en las buenas y en las malas, además de ayudarme a lo largo de mi formación académica.

A mi pareja Daniela Romero, por permanecer a mi lado a pesar de todo, por brindarme su apoyo siempre y por creer en mí siempre.

Y a mi perrita Mielina por enseñarme que la distracción es necesaria para despejar la mente.

## Resumen

Durante el desarrollo de un órgano, los procesos de proliferación, crecimiento y diferenciación celular deben coordinarse de forma precisa para generar un organismo funcional con forma y tamaño adecuados. En *Drosophila melanogaster*, el proceso de diferenciación celular en el ala requiere de la expresión del gen selector vestigial (*vg*), que codifica a una proteína con el mismo nombre. Por otro lado, la proliferación y crecimiento celular en el disco alar se regulan por la proteína Yorkie (*Yki*), efectora final de la vía Hippo, cuya localización nuclear promueve estos procesos.

Para controlar el tamaño final del ala, estos procesos deben estar estrechamente regulados. Sin embargo, *Vg* y *Yki* no poseen dominios de unión al DNA, por lo que, para llevar a cabo su función, deben unirse un factor de transcripción. En el disco imagal alar, *Vg* y *Yki* se unen a un mismo factor de transcripción llamado Scalloped (*Sd*). En su porción C-terminal, *Sd* cuenta con sitios de unión en común para ambas proteínas, lo cual sugiere una competencia entre estas.

En esta tesis, evalué si se altera la expresión nuclear de *Vg* y *Yki* en condiciones genéticas donde se disminuye la expresión de *Sd* y, por lo tanto, se espera haya mayor competencia entre *Vg* y *Yki* por la unión a *Sd* respecto a los niveles control de *Sd*. Dado que *Vg* y *Yki* regulan el balance entre diferenciación y proliferación celular en este sistema, también evalué el efecto de la subexpresión de *Sd* en el tamaño final de los discos alares y de las alas. Mis resultados indican que cuando se disminuye la cantidad de *Sd*, la expresión nuclear de *Vg* también disminuye, pero la de *Yki* no se afecta. Esto sugiere que la cantidad de *Vg* nuclear es determinada por la disponibilidad de *Sd*, mientras que los niveles nucleares de *Yki* no parecen depender de su unión a *Sd*. Se concluye que ante la limitación de *Sd*, el sistema favorece la diferenciación sobre la proliferación, sugiriendo que *Vg* es más eficiente que *Yki* en su competencia por *Sd*.

## **Abstract**

During organ development, the processes of cell proliferation, growth, and differentiation must be precisely coordinated to generate a functional organism with an appropriate size and shape. In *Drosophila melanogaster*, cell differentiation into the wing cell-type requires the expression of the vestigial (*vg*) selector gene, which encodes for a protein with the same name. On the other hand, cell proliferation and growth in the wing disc are promoted by the nuclear localization of the Yorkie (*Yki*) protein, the final effector of the Hippo pathway.

To control the final size of the wing, these processes must be tightly regulated. However, *Vg* and *Yki* do not have DNA-binding domains, so they must bind a transcription factor in order to carry out their function. In the wing imaginal disc, *Vg* and *Yki* bind to the same transcription factor called Scalloped (*Sd*). In its C-terminal portion, *Sd* has common binding sites for both proteins, suggesting that there is competition between them.

In this thesis, I evaluate whether there are alterations in the nuclear expression of *Vg* and *Yki* in genetic conditions where the expression of *Sd* is decreased and, therefore, greater competition between *Vg* and *Yki* for binding to *Sd* is expected. Since *Vg* and *Yki* regulate the balance between cell differentiation and proliferation in this system, I also evaluated the effect of *Sd* underexpression on the final size of wing discs and adult wings. My results indicate that, when the amount of *Sd* decreases considerably, the nuclear expression of *Vg* also decreases but the expression of *Yki* is not affected. This suggests that nuclear *Vg* levels are determined by the availability of *Sd* while the nuclear levels of *Yki* appear to be independent of *Sd* binding. Taken together, we conclude that under limiting levels of *Sd*, differentiation is favoured over proliferation, suggesting that *Vg* outcompetes *Yki* in binding to *Sd*.

## Introducción

### *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio

La coordinación de los procesos de diferenciación y proliferación celular ha sido estudiada en una gran variedad de modelos experimentales. Sin embargo, el modelo de *Drosophila melanogaster*, ha sido muy útil debido a la diversidad de métodos accesibles para su manipulación genética. Además, posee otras ventajas como modelo de estudio como: proveer resultados de forma rápida por su corto ciclo de vida (10 días a 25°C); ser un modelo accesible tanto por su costo como por su facilidad de almacenamiento y reproducción; y poseer únicamente 4 cromosomas (Fig. 1). (Johnston, 2002).

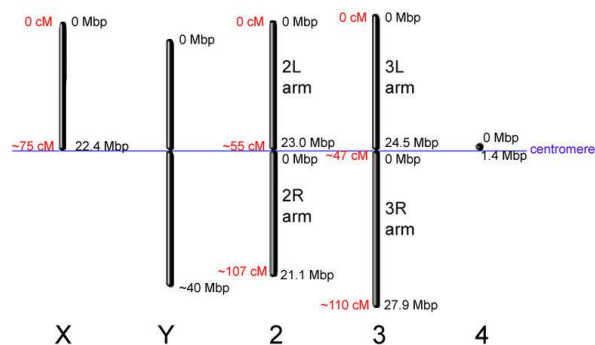


Figura 1: Representación gráfica de los cromosomas en *Drosophila melanogaster*.

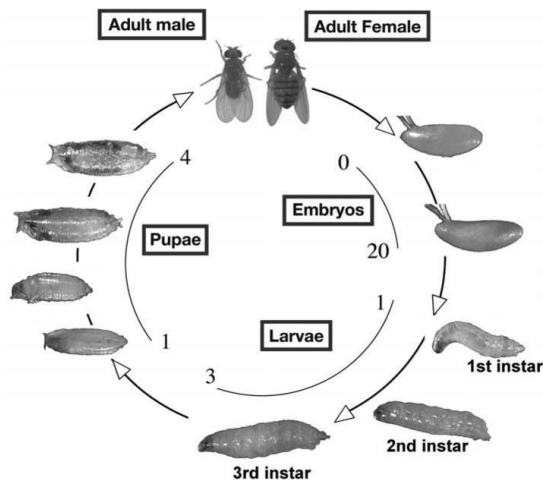
Tomada de Johnston, 2002

### Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El desarrollo de *Drosophila melanogaster* ha sido estudiado extensivamente. Durante la etapa embrionaria se llevan a cabo el desarrollo temprano y diversos procesos como la formación del blastodermo y la gastrulación, donde se forma el mesodermo y endodermo. La duración de esta etapa es de 1 día a 25°C. (Campos-Ortega, 1985)

Una vez que el huevo eclosiona, el animal se encuentra en la fase larvaria, que consta de tres estadios en los cuales el animal pasa por 2

mudas. Los estadios larvarios se destacan por el crecimiento del organismo. Por último, en el tercer estadio larvario la larva deja de alimentarse y busca un lugar para formar la pupa. En el que ocurrirá la metamorfosis a las estructuras de la mosca adulta. En este proceso la mayoría de los tejidos larvales se degradan y los órganos adultos surgen a partir de los discos imagales (Fig. 2). (Fernández-Moreno et al., 2007)



**Figura 2:** El ciclo de vida de *Drosophila* se divide en cuatro etapas: embrión, larva, pupa y adulto. El tiempo de duración de las etapas se muestra en horas para embriones y días para larvas y pupas a 25°C. (Adaptado de Fernández-Moreno et al., 2007)

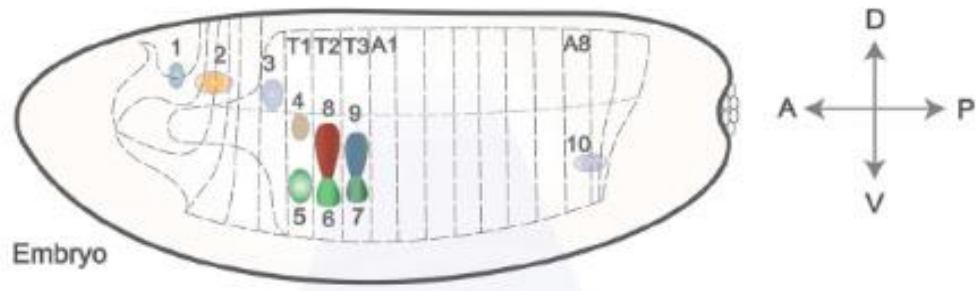
### *El disco imagal alar como modelo de estudio*

Durante la etapa embrionaria de *Drosophila*, se definen cúmulos de células tejido-específicos que darán lugar a los órganos y extremidades principales de la mosca como los ojos, las patas, las alas y las antenas. Estos tejidos se denominan discos imagales. (Fig. 3) (Beira y Paro 2016). Más tarde durante los estadios larvarios, estos discos crecen de forma exponencial y se establecen patrones de expresión genética específicos que determinan su tamaño y forma.

Uno de los discos imagales más usados como modelo de estudio es el disco imagal alar, dado que es el de mayor tamaño. El disco alar y el de la segunda pata (Fig. 3; discos marcados por los números 8 y 6, respectivamente) provienen de un precursor común que se establece en el



límite anteroposterior (A/P) dentro del segmento del mesotórax (Beira et al., 2016). Posteriormente se separan, formando dos conjuntos de primordios que se distinguen por la expresión diferencial de genes selectores que dan la identidad al ala y la pata, respectivamente (Klein, 2001).



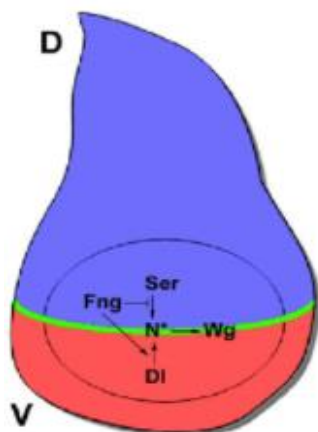
**Figura 3:** Embrión de *D. melanogaster* donde se muestran los cúmulos celulares que darán lugar a los discos imagales en la larva. El número 8 es el disco imagal alar y el número 6 es el disco de la pata (Adaptado de Beira et al., 2016).

*Vestigial* es el gen selector de la diferenciación celular de tipo ala

Las células precursoras de ala están determinadas por la expresión del gen selector *vestigial* (*vg*), cuya función se encuentra ampliamente conservada en los insectos alados (Courtney, 2013). El proceso de diferenciación a células del ala está controlado por la proteína Vg de 453 aminoácidos (Williams et al., 1991), miembro de la familia de proteínas *Vestigial-like* (VGLL) (Williams y Bell, 1988). Su nombre se debe a que las moscas que pierden la función de *vg* solo muestran vestigios de alas (Tabla 1). Su rol de gen selector de ala se debe a que además de ser necesario para la formación de las alas, cuando se expresa de forma ectópica en otros discos imagales causa la transformación a tejido tipo alar (Baéna-López y García Bellido, 2003). Sin embargo, la expresión y función de *vg* no son exclusivas de los discos alares, ya que también es importante en la diferenciación tardía

del tejido muscular derivado del mesodermo (Deng et al., 2009), así como en la formación de los músculos indirectos de vuelo (Bernard et al., 2009).

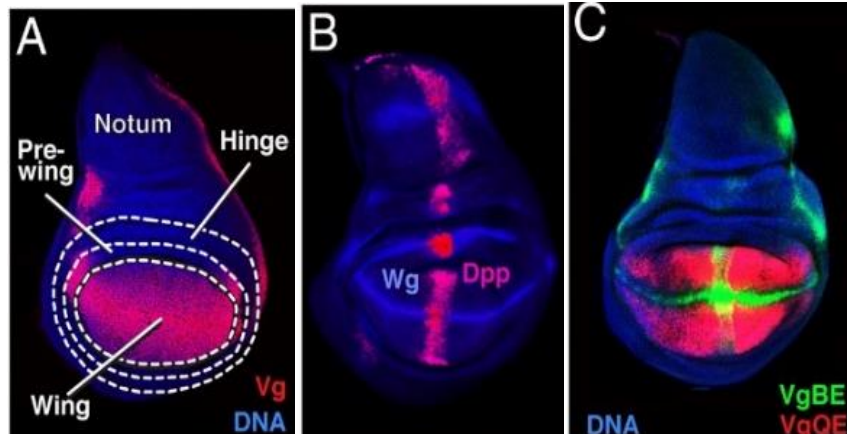
La formación del patrón de Vg en el disco alar está directamente asociada a la formación de los ejes A/P y dorsal-ventral (D/V). Cuando se forma la frontera D/V, la señal de *Notch* induce la expresión del morfógeno *Wingless* (Wg) para que ambos activen transcripcionalmente a *vg* a través de un potenciador conocido como el *Boundary Enhancer* (BE) (Djiane et al., 2014; Tossell et al., 2011; Klein et al., 2001) (Fig. 4; Fig. 5 C).



**Figura 4:** Esquema de un disco imagal alar de *D. melanogaster*. La porción azul representa la parte dorsal del disco y la roja la parte ventral. En la frontera D/V, representada con una línea verde, se produce *Notch* que favorece la producción de *Wingless*.

(Tomada de Tossell et al, 2011)

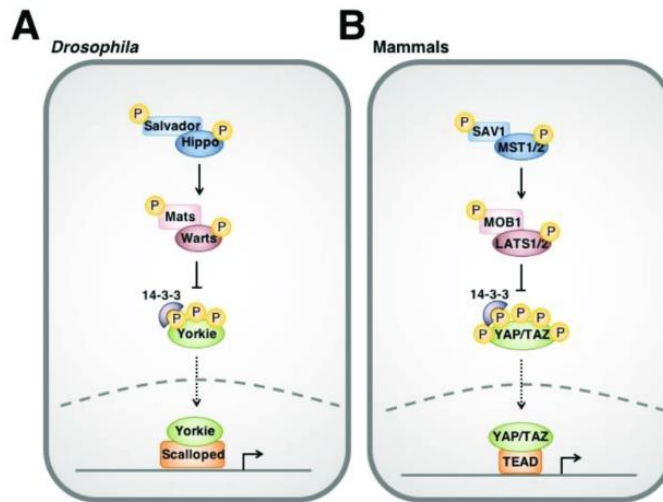
Entre el segundo y el tercer estadio larvario, el disco aumenta en, aproximadamente 100 veces, el número de células por la acción de dos factores de crecimiento, *Decapentaplegic* (Dpp) en la frontera A/P (Kim et al., 1996) y *Wg* en la frontera D/V (Zecca et al., 1996) (Fig. 5B). Dpp y *Wg* favorecen el crecimiento celular y la expresión de *vg* a través de un segundo potenciador, el *Quadrant enhancer* (QE), dentro de una región del disco conocida como la bolsa del ala. La acción combinada del BE y del QE hace que *Vg* se exprese en toda la bolsa del disco alar (Zecca et al., 2010) (Fig. 5 A y C). La expresión de *Vg* determina el número de células que se diferenciarán a tipo alar y por lo tanto el tamaño del ala adulta.



**Figura 5:** A) El territorio de Vg en el disco alar marcado por un anticuerpo de Vg (rojo). B) La frontera A/P se define por el marcador de Dpp (rojo) y la frontera D/V se marca con el anticuerpo de Wg (azul). C) Territorio de los dos *enhancers* de Vg: *BE* (verde) y *QE* (rojo). (Adaptado de Parker y Struhl, 2020).

### *Yorkie, Tgi y la regulación de la proliferación celular en el disco alar*

En una gran variedad de órganos y tejidos, desde *Drosophila* hasta mamíferos, los procesos de proliferación, crecimiento celular y apoptosis están mediados por la proteína YAP/*Yorkie* (Yki), el efector final de la vía de señalización *Salvador-Warts-Hippo* (SWH) (Fig.6). A través de su acción transcripcional en el núcleo, Yki determina el crecimiento y la proliferación celular, así como el tamaño final de los órganos (Harvey y Tapon, 2007). Yki posee este nombre en referencia al tamaño de los perros, *Yorkshire Terriers*, pues el fenotipo derivado de la pérdida de función de la proteína genera células de menor tamaño (Tabla 1). Yki es una proteína de 395 aminoácidos (Wu, 2008), con dos dominios WW, que se unen al motivo PPXY de la cinasa Warts (*LATS1/2* en mamíferos), encargada de fosforilar e inhibir a Yki (Huang, 2005). A su vez, Yki posee un dominio NH, con el que se une a factores de transcripción para promover la activación de genes como *ciclina E* (*cycE*), *diap1* y *bantam* (Zhang, 2008).



**Figura 6:** Esquema representativo de la vía Hippo en *Drosophila* y mamíferos. Cuando se encuentra activada la vía Hippo, se fosforila la proteína efectora YAP/Yki para evitar que ingrese al núcleo.

(Tomada de Harvey y Tapon, 2007).

En la condición silvestre, estos procesos se reprimen para evitar un exceso en el crecimiento y el tamaño final del ala. Una de las proteínas encargadas de dicha represión es la *Tondu-domain-containing growth inhibitor* (Tgi), también denominada *Sd-Binding Protein* (SdBP) (Guo et al., 2013). Recibe el nombre de Tgi por ser un inhibidor del crecimiento celular (Koontz et al., 2013) (Tabla 1). Esta proteína, que se expresa de forma ubicua, consta de 382 aminoácidos (Guo et al., 2013) y posee 2 dominios TDU, los cuales le confieren interacción directa con Sd, además de 3 dominios PPXY que interactúan con los dominios WW de Yki (Macias et al., 1996; Koontz et al., 2013; Guo et al., 2013).

## *Sd como proteína integradora de los procesos de diferenciación y crecimiento*

Vg, Yki y Tgi no poseen dominios de unión al DNA, por lo que, para llevar a cabo su función, deben unirse al factor de transcripción *Scalloped* (Sd) (Simmonds et al., 1998; MacKay et al., 2003; Guo et al., 2013; Wu, 2008).

Sd pertenece a la familia *TEF-1 AbaA* (TEA) (Campbell, 1992). Obtuvo su nombre porque el ala en las moscas en las cuales se perdió la función de esta proteína se asemeja a la forma de una vieira (Gruneberg, 1929) (Tabla 1). Sd consta de 440 aminoácidos (Campbell, 1992) y posee un dominio TEA, con el cual se une al DNA. En su porción C-terminal se encuentran los sitios de unión para Vg, Yki y Tgi (Simmonds et al., 1998; Wu et al., 2008; Koontz et al., 2013), esto implica que, si una de estas proteínas se encuentra unida a Sd, las otras dos no pueden unirse. Las constantes de disociación ( $k_d$ ) de los dímeros Yki-Sd, Vg-Sd y Tgi-Sd; revelan que el dímero Vg-Sd posee una menor  $k_d$  seguido del dímero Tgi-Sd y por Yki-Sd (Mesrouze et al., 2022). Esto indica que Vg posee una mayor afinidad por Sd en comparación con Tgi y Yki.

Además de su actividad como factor de transcripción, Sd es necesario para el ingreso al núcleo de Vg y Tgi, dado que estas no poseen una señal de localización nuclear (Fig. 7) (Simmonds et al., 1998; Koontz et al., 2013). (Mesrouze et al., 2022).

## *La función de las proteínas en los procesos de proliferación y diferenciación se describieron alterando sus concentraciones*
















Una estrategia empleada para estudiar la coordinación entre los procesos de diferenciación y proliferación es modificar *in vivo* las concentraciones y

analizar el efecto generado en el ala adulta. En *Drosophila*, esto puede hacerse con facilidad gracias al sistema Gal4-UAS (Brand y Perrimon, 1993) que permite disminuir o aumentar la expresión de genes controlada de forma espacial y temporal.

Usando este sistema, se encontró que la sobreexpresión de Vg en el disco alar, resulta en una ligera disminución en el tamaño del ala adulta (Tabla 1). Por otro lado, la subexpresión de Vg, al igual que en los mutantes de pérdida de función del gen, genera un vestigio de ala (Tabla 1). En el caso de la Yki, un aumento en su expresión en el disco imagal alar, resulta en un aumento en el crecimiento y proliferación celular (Tabla 1) (Huang, 2005), mientras que, si su expresión se reduce, las células crecen en menor medida (Tabla 1) (Koontz et al., 2013). Por otra parte, la sobreexpresión de Tgi en los discos imagales produce una disminución del tamaño final del órgano (Tabla 1) (Guo et al., 2013), mientras que las moscas con un alelo nulo de Tgi, mueren entre el segundo y el tercer estadio larvario. Sin embargo, los mosaicos mutantes de Tgi no presentan alteraciones en el ala adulta (Tabla 1) (Koontz et al., 2013). Finalmente, si se aumenta la expresión de Sd en los discos imagales, disminuye el tamaño final del órgano afectado (Tabla 1) (Simmonds, 1998), y si se quita o se genera un alelo hipofuncional de Sd, el ala es de menor tamaño y exhibe bordes festonados. (Wu et al., 2008; Koontz et al., 2013).

A pesar de estos estudios previos, aún se desconoce si las proteínas Vg, Yki y Tgi compiten por la unión a Sd (Fig. 7) y cuál es el efecto de esta competencia en el tamaño y forma del ala adulta. Por lo que, en este proyecto propongo limitar las concentraciones de Sd en los discos imagales alares con la finalidad de analizar cuantitativamente su alteración tanto en los discos como en el ala resultante. Como una perspectiva a mediano plazo, este trabajo experimental, se complementará con un modelo matemático que nos permitiría explorar bajo qué valores de las constantes de afinidad de los

complejos proteicos formados, podríamos explicar los fenotipos en el ala adulta.

Genes	Expresión	Efecto en ala	Bibliografía
Yki	Sobreexpresión	  H	Steinmetz et al, 2021
	Subexpresión	  B -14% nub>yki-i GFP	Hevia et al, 2017.
Vg	Sobreexpresión	  J UAS-vg vg-Gal4 29°C	Simmonds et al, 1998
	Subexpresión	  C	Williams et al. 1991.
Tgi	Sobreexpresión	  vg>Tgi	Koontz et al, 2013.
	Subexpresión		Koontz. 2013.
Sd	Sobreexpresión	  vg-Gal4 UAS-Sd	Wu et al, 2008
	Subexpresión	  Sd	Wu et al. 2008.

**Tabla 1:** Sobre- y sub-expresión de las proteínas Yki, Vg, Tgi y Sd en el disco imagal alar de *Drosophila melanogaster*. Flechas: indican si hubo un aumento o disminución en el tamaño final del ala. Cruz: no se produjo el ala. Línea horizontal: las moscas no se desarrollaron.

## Planteamiento del Problema

Una pregunta clave en la biología del desarrollo es entender los procesos que regulan el equilibrio entre la diferenciación y el crecimiento celular. Dado que Vg, el factor clave de la diferenciación y los elementos fundamentales de la proliferación celular, Yki y Tgi, comparten al factor de transcripción Sd para realizar sus funciones en el disco imagal alar, es posible que el equilibrio entre la diferenciación y proliferación en este sistema dependa de la dinámica de la competencia molecular entre Vg, Yki y Tgi por el sitio de unión a Sd (Fig. 7).

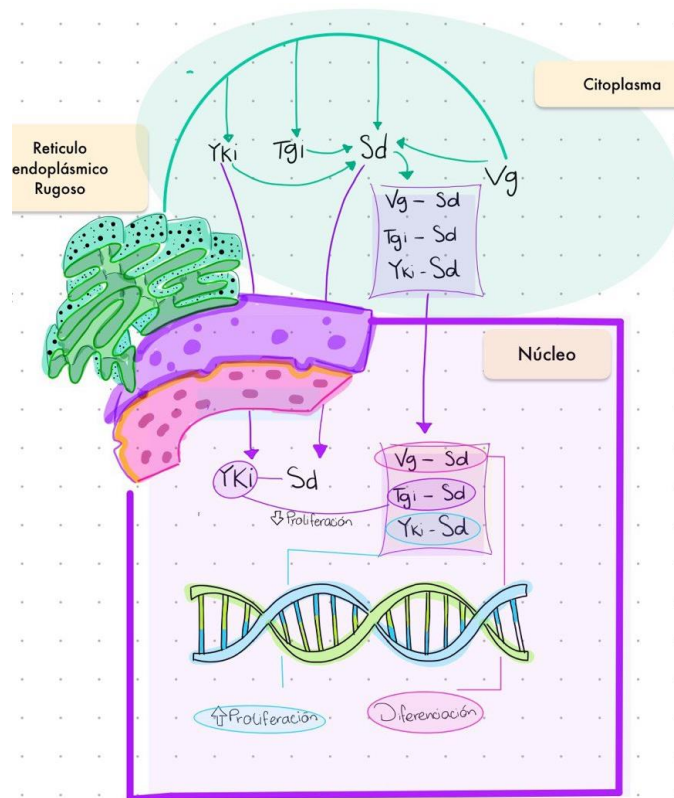


Figura 7: Esquema representativo de las interacciones entre Vg, Yki y Tgi con Sd.



## **Objetivo General**

Investigar la competencia entre las proteínas Vg y Yki para unirse a la proteína Sd y su efecto en la diferenciación y crecimiento celular del disco imagal alar en *Drosophila melanogaster*.

## **Objetivos Particulares**

### *Objetivo Particular 1*

Evaluar cuantitativamente el efecto de sobre y sub-expresión de Sd en el tamaño y forma a nivel del disco alar, así como en las alas adultas.

### *Objetivo Particular 2*

Evaluar cuantitativamente la expresión nuclear de Vg y de Yki en los discos imagales alares.

### *Objetivo Particular 3*

Comparar la expresión nuclear de Vg y Yki en el disco imagal alar en las condiciones de sobre y sub-expresión de Sd.

## Metodología

### *Soluciones*

- PEM (500 ml) = 80 mM Na-Pipes (Sigma) (13 g) + 5 mM EGTA + 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (0.1 gr.) + Agua Mili-Q aforada hasta 500 ml, se ajusta el pH a 7.4.
- PEM-T (100 ml) = PEM (99 ml) + 0.1 ml de Tritón al 100%.
- Solución de Fijación (5 ml) = PEM-T (2.5) + 2.5 ml de PFA al 8%.
- Solución de bloqueo (20 ml) = PEM-T (20 ml) + 0.1g de Suero Fetal Bovino al 0.5%.
- Solución de tinción (10 ml) = Solución de bloqueo (9.9 ml) + 0.1 ml de NGS al 1%.
- Medio de montaje: Mowiol.
- Alcohol etílico al 70% y al 50%.

### *Modelo experimental*

Se utilizaron discos imagales alares de *Drosophila melanogaster* obtenidos de larvas de sexo indistinto en el tercer estadio de desarrollo. Todas las cepas utilizadas se mantuvieron a temperatura ambiente y las cruzas o stocks utilizados se mantuvieron a temperatura constante de 25° o a 22°. Se alimentaron con alimento estándar de *Drosophila* a base de levadura.

Se utilizaron las siguientes cepas de moscas:

<b>Cepas de moscas</b>	<b>Proveedor</b>
W; UAS-Sd	Bloomington Drosophila Stock Center, BDSC #9374
y, sc, v; +; UAS-Sd RNAi	Bloomington Drosophila Stock Center, BDSC #55404
y, w	Fanis Missirlis (Cinvestav, Mexico)
enGal4, UAS-GFP; MKRS, <i>hs</i> -FLP	Bloomington Drosophila Stock Center, BDSC
S-T	#25752

### *Diseción de larvas*

Se seleccionan larvas del tercer estadio y se colocan en un portaobjetos con solución PEM. Se utiliza una pinza de disección al igual que una jeringa de insulina con aguja y se observa a través de un microscopio estereoscópico. Se toma con la pinza la parte posterior de la larva y con la aguja de la jeringa se retira y desecha su parte posterior, debido a que en su parte anterior se encuentran los discos imagales alares. Posteriormente se invierte la parte anterior para exponer los discos a las soluciones. Finalmente, se retiran tanto el tejido graso como las demás estructuras no deseadas para que únicamente queden los discos imagales alares anclados a la larva (carcasas).

### *Fijación e inmunofluorescencia*

Después de completar el protocolo de disección de las larvas, se lleva a cabo el protocolo de fijación, el cual consiste en dejar las carcasas en una solución con PFA y PEM-T por 40 minutos. Una vez concluido el protocolo de fijación, se continúa con el de inmunofluorescencia donde primero se realizan 3 lavados con solución PEM-T y posteriormente se administra la solución de bloqueo por una hora. Después, se colocan las carcasas con los anticuerpos primarios de la proteína a evaluar diluidos en solución de tinción durante toda

la noche. Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario, se realizan 3 lavados con solución PEM-T por 10 minutos y se agrega el anticuerpo secundario diluido en solución de tinción por 2 horas, cubierto en papel aluminio para proteger de la luz ambiental. Una vez concluido el tiempo, se realizan 2 lavados con solución PEM-T y se agrega DAPI (para la teñir los núcleos) por 30 minutos. Finalmente se realiza un lavado con solución PEM-T y otro con solución PEM.

Los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis fueron: de conejo anti Yki (1:500 obtenido de Duoqia Pan); de cobayo anti Vg (1:200 un regalo de Sean Carroll y Kirsten Guss); y de cobayo anti Sd (1:1000 proporcionado por Kirsten Guss). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Alexa 594 (1:1000) y Alexa 647 (1:1000).

#### *Montaje de discos alares*

Al finalizar el protocolo de inmunofluorescencia, en un portaobjetos se coloca Mowiol (medio de montaje para tejidos con señal de fluorescencia) y en él, se colocan las carcasas procurando tengan la menor cantidad de líquido posible. Posteriormente se disectan los discos alares de las carcasas con la ayuda de un microscopio estereoscópico y se colocan entre dos tiras de cinta adhesiva. Se repite el procedimiento con todas las larvas hasta obtener todos los discos. Finalmente, se coloca un cubreobjetos sostenido por las tiras de cinta (que actúan como puentes).

#### *Montaje de alas adultas*

Las moscas adultas que se desean evaluar se deshidratan durante un día entero en etanol al 70%. Posteriormente, se prosigue a la disección de las alas con un par de fórceps en una solución de etanol al 50% sobre un

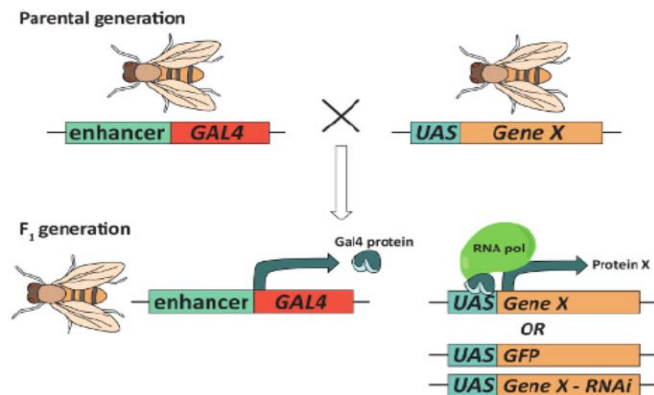
portaobjetos. Una vez separadas, se retira el resto del cuerpo de la mosca y el ala se coloca un cubreobjetos con una gota de etanol al 50%.

#### *Visualización de los discos imagales y las alas*

Una vez montados, los discos imagales se observan en un microscopio confocal Leica TCS SP8 utilizando un objetivo de inmersión de 40X ó 63X. Por su parte, las alas adultas se observaron en un microscopio de luz Nikon eclipse Ci-L/Ci-S utilizando un objetivo de 4X.

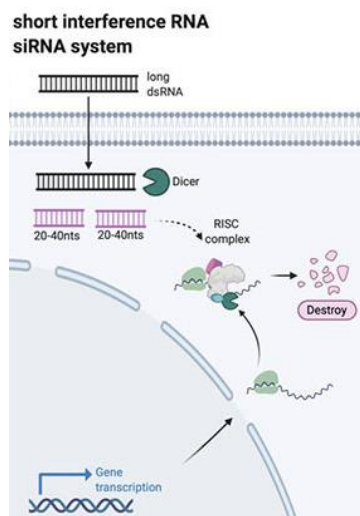
#### *Sistema Gal4-UAS*

Para expresar o reprimir un gen se utiliza el sistema Gal4/UAS (Brand y Perrimon 1993). Para ello, primero se inserta un transgen con el activador de transcripción de levadura “Gal4” río abajo de algún promotor endógeno, el cual debe ser específico de la región donde se expresará el gen de interés. (Johnston, 1987). En otra mosca se inserta un transgen con la *Upstream Activator Sequence* (UAS) río arriba del gen que se busca alterar (Fig. 8) (Johnston, 1987).



**Figura 8:** Esquema representativo del sistema Gal4/UAS. En la generación parental ( $G_0$ ), una mosca tiene un transgen con Gal4 río abajo de un *enhancer* y la otra tiene un transgen con la UAS río arriba de la secuencia que se desea expresar. La generación resultante ( $F_1$ ) posee ambos transgenes, con lo que Gal4 podrá unirse a la UAS y producir la proteína correspondiente. (Tomado de Kelly et al., 2017)

El sistema Gal4/UAS se puede emplear tanto para sobre expresar como para reprimir ectópicamente la expresión de genes o proteínas. Una forma de utilizar el sistema para inhibir la cantidad de una proteína es utilizando, río debajo de la secuencia UAS, un RNA de interferencia (RNAi), el cual es una molécula de RNA que suprime la expresión de genes específicos al unirse con una secuencia de un RNA de interés. Así se forma un RNA de doble cadena que se degrada (Fig. 9).



**Figura 9:** Formación y mecanismo de acción de un RNAi (Adaptado de: Hernández-Soto et al., 2021)

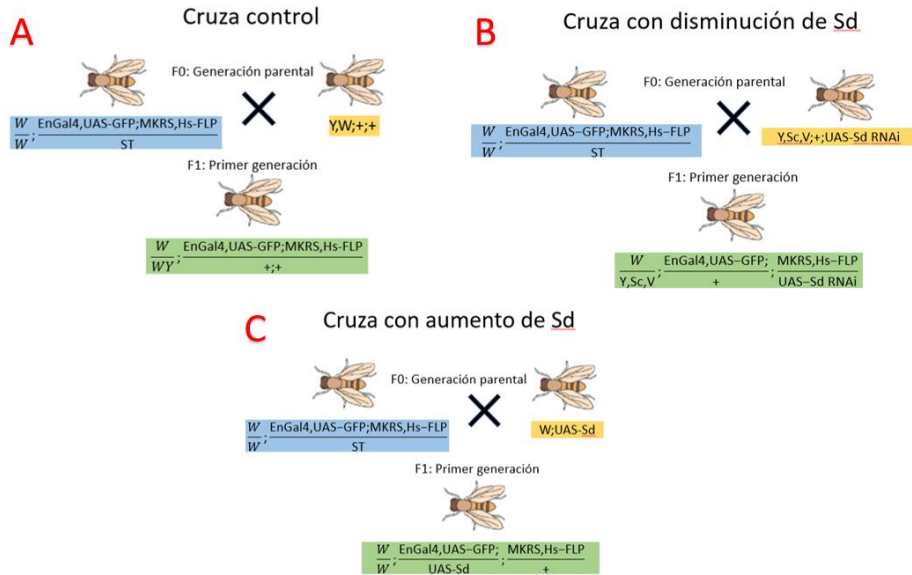
### *Procesamiento de imágenes de los discos y alas*

Para procesar y visualizar las imágenes obtenidas por el microscopio confocal, se utilizó el software ImageJ/Fiji (<https://imagej.nih.gov/ij/>), con el cual se realizan las mediciones tanto de los discos imagales como de las alas (ver secciones subsecuentes para detalles).

### *Cruzas*

Para los experimentos que se llevan a cabo en esta tesis, utilizamos un sistema que nos permite comparar diferencias dentro de un mismo tejido utilizando las propiedades de los compartimentos que son regiones del disco que no se mezclan entre sí. Particularmente, si afectamos el compartimento posterior del disco utilizando el sistema Gal4/UAS podemos mantener el otro como control interno. Para afectar la expresión exclusivamente en el compartimento posterior del disco imagal alar, utilizamos la proteína *Engrailed* (En) (Hidalgo A., 1998). Como control de la técnica Gal4/UAS y visualizar esta región utilicé UAS-GFP que expresa la proteína verde fluorescente con una señal de localización nuclear. Además de GFP se sobre o sub-expresó Sd bajo el mismo sistema (UAS-Sd RNAi o UAS-Sd) (Fig. 10).

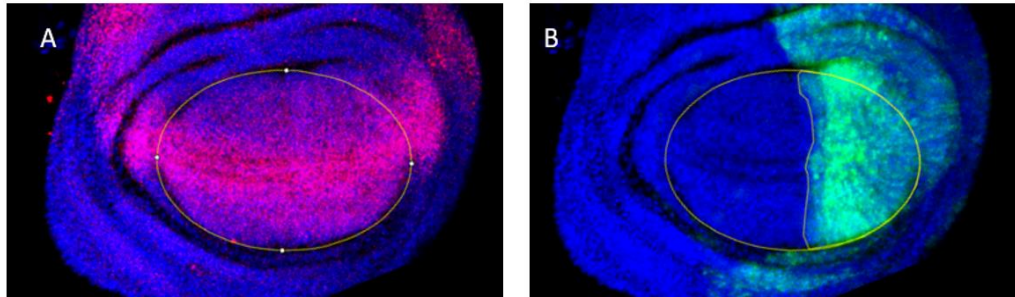




**Figura 10:** Cruzas realizadas para los experimentos de este trabajo. A) Cruza control. B) Cruza con reducción de los niveles de la proteína Sd, utilizando UAS-SdRNAi. C) Cruza con aumento de los niveles de la proteína Sd, utilizando UAS-Sd.

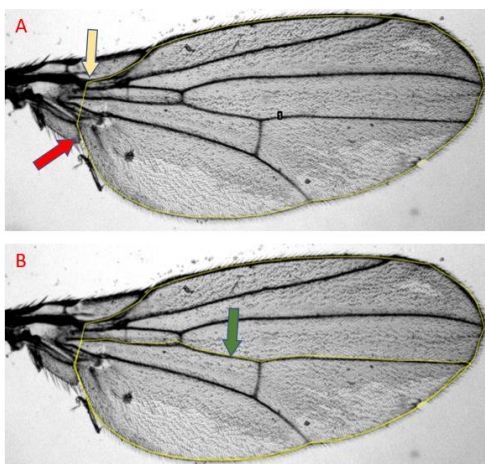
### *Metodología para el objetivo particular 1*

Para evaluar el tamaño de los discos alares, se utilizó el programa ImageJ/FIJI de la siguiente manera. Primero, se ubicó la bolsa del ala al igual que en el objetivo anterior. (Fig 11A). A continuación, se cuantificó el área total tomando los bordes que se forman alrededor de la bolsa del ala usando el canal de DAPI y luego el área posterior de la bolsa con la ayuda de la proteína GFP en el patrón dictado por EnGal4 (Fig. 11B). Posteriormente, se resta el área posterior de la total para obtener la anterior. Una vez obtenidas estas áreas, se obtiene el cociente del área posterior entre el anterior y se comparan los cocientes entre los grupos de discos alares.



**Figura 11:** Mediciones de los discos alares. (A) Se selecciona la bolsa del ala a partir del patrón de Vg (Rojo). (B) Se ubica la porción posterior marcada con En (Verde). La marca azul corresponde a DAPI.

Para realizar las mediciones de alas adultas, primero se midió el área total tomando como referencia la bifurcación de la primera y segunda vena (Fig. 12A; flecha amarilla) y definiendo un perímetro manualmente alrededor de la vena hasta la escotadura posterior formada por la unión de la hoja del ala con la axila (Fig. 12A; flecha roja). Para medir la porción posterior, se define como frontera anteroposterior la cuarta vena del ala (Fig. 12B; flecha verde) y se construye un polígono sobre esta vena que circunde toda el área posterior. Una vez obtenida esta área se resta del área total para conseguir el área anterior y luego se calcula el cociente entre las áreas posterior y anterior

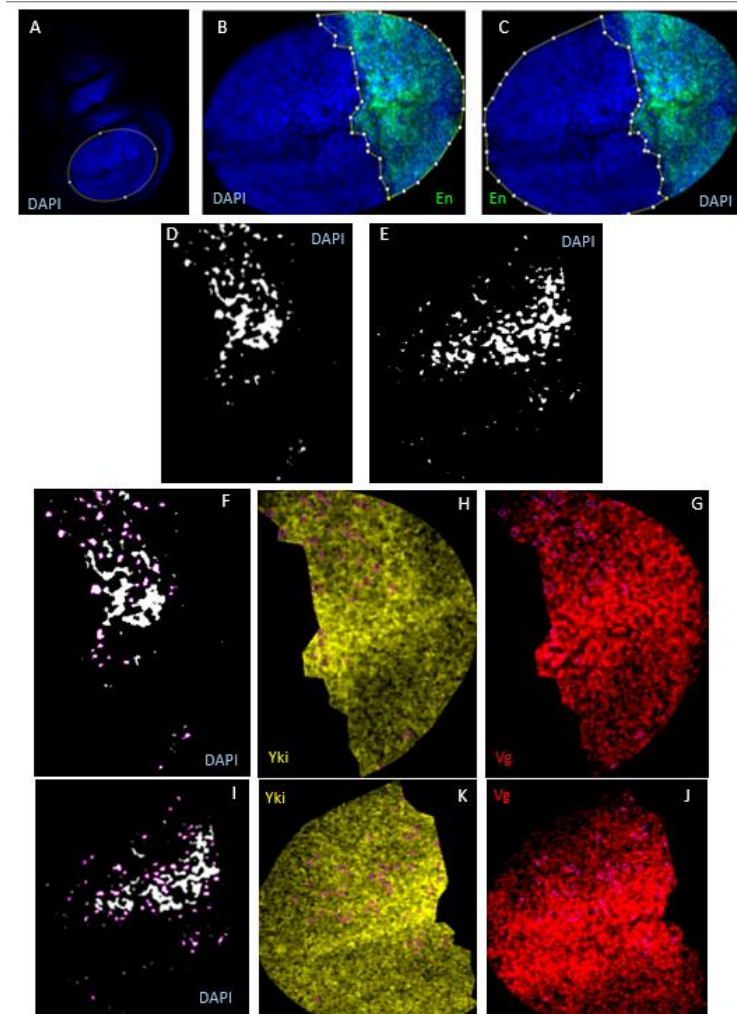


**Figura 12:** Referencias para mediciones de las alas. Anterior es hacia arriba. A) Para obtener el área total se utilizan como parámetros la bifurcación de la primera y segunda venas (Flecha amarilla) y la unión entre la axila y la hoja del ala (Flecha roja). B) Para obtener el área posterior se utiliza la cuarta vena como referencia (Flecha verde)

### *Metodología para los objetivos particulares 2 y 3*

Para evaluar los patrones nucleares de Vg y Yki, se cuantificó la intensidad de estas proteínas en la bolsa alar en el microscopio confocal. Utilizando ImageJ/FIJI, primero se limitó la imagen a la bolsa alar en un corte en Z (Fig. 13A), para restringir el análisis a las células dentro de la bolsa. Posteriormente, con ayuda de la proteína GFP que marca la zona posterior (EnGal4) (Fig. 13B), se identifican las regiones anteriores (sin GFP) y posteriores (con GFP) (Fig. 13C). A continuación, se hace binaria la imagen usando un umbral de 4% en el canal de DAPI (Fig. 13D y 13E), el cual tiene un patrón nuclear. Una vez hecha binaria la imagen, se analizó con la función “*Analyze particles*” en ImageJ/FIJI, usando como parámetros el tamaño de las partículas de un tamaño de 1-infinito (para disminuir la cantidad de partículas a analizar) y una circularidad 0.5-1 (para que únicamente cuente las partículas ovoides o circulares) (Fig. 13F y 13I). Una vez obtenidas las partículas a analizar, se sobreponen en los canales de las proteínas Vg (Fig. 13G y 13J) y Yki (Fig. 13H y 13K) para medir la intensidad media de los píxeles dentro de las partículas.

Una vez obtenidas las intensidades medias de los píxeles, se realiza un promedio de estos. Los promedios obtenidos de diferentes cortes de la porción posterior se dividen entre los de la anterior para obtener el cociente experimental/control. Para determinar si hay significancia estadística entre los cocientes, se realizó una prueba t de *Student* en el programa GraphPad-Prism.



**Figura 13:** Metodología para el análisis de la expresión nuclear de las proteínas Vg y Yki. (A) Se selecciona la bolsa del disco imagal alar. (B y C) Se Separa la porción posterior (B, F, G, H) de la anterior (C, I, J, K). D y E) Se determina el umbral. (F e I) Se seleccionan las partículas a analizar en el umbral. (H y K) Se sobreponen en el canal de Yki. (G y J) Se sobreponen en el canal de Vg. (D, F, G y H) Compartimento posterior del disco alar. (E, I, J, y K) Compartimento anterior del disco alar.

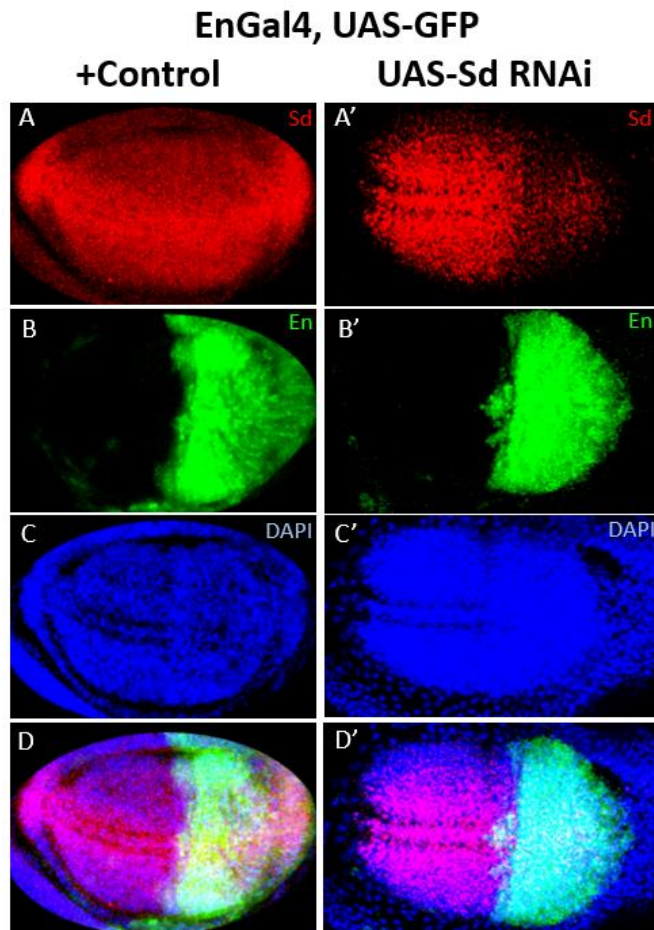
## Resultados

*Animales que sobre-expresan Sd en el compartimento posterior no son viables*

Al realizar las cruces de sobre-expresión de Sd (Fig. 10C), no se encontraron larvas que sobrevivieran hasta el tercer estadio, aún a temperaturas más bajas (22°C) donde disminuye el efecto del sistema Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993). Por ello no fue posible evaluar el efecto de la sobre-expresión de Sd en el tamaño del disco alar y el ala adulta (Objetivo particular 1), ni en la expresión nuclear de Vg y Yki (Objetivos particulares 2 y 3).

*Disminución del tamaño de los discos imagales y las alas cuando Sd se subexpresa*

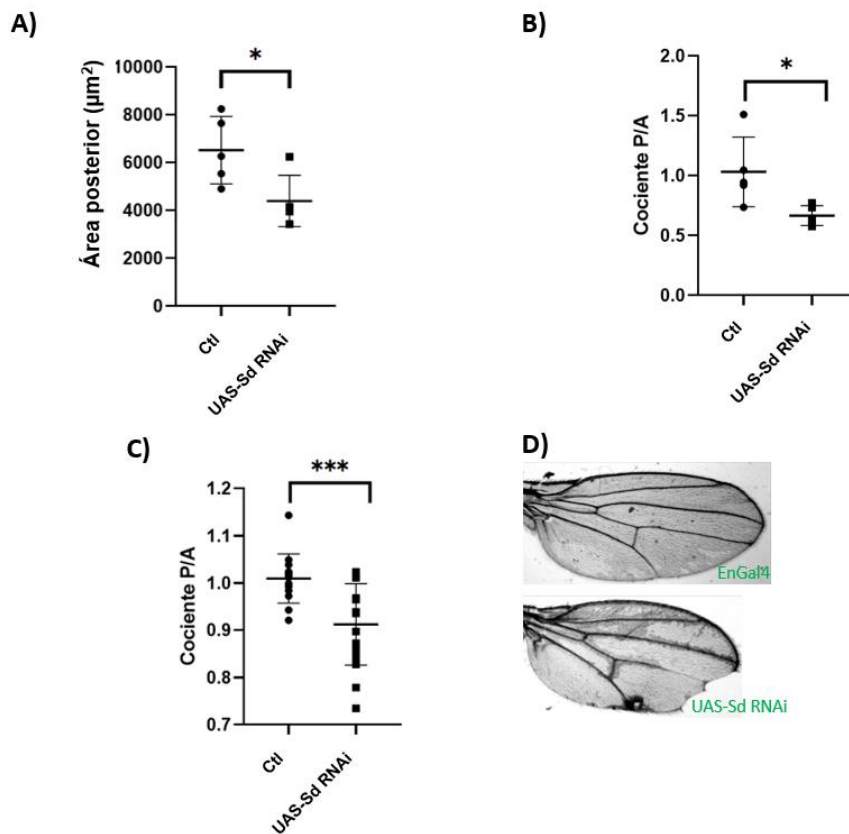
Como control de la técnica Gal4/UAS, primero se verificó que efectivamente la expresión de Sd disminuyera en el compartimento posterior de las larvas que expresan el RNAi para Sd (UAS-Sd RNAi) bajo el control de EnGal4 (Fig. 10B). Para esto, se hicieron inmunotinciones para comparar la expresión de Sd con respecto a los discos controles (Fig. 10A). En los discos control se observa que la expresión de Sd es homogénea a lo largo de la bolsa alar (Fig. 14A); sin embargo, cuando se expresa el Sd RNAi, se observa una clarísima disminución en la expresión de Sd en el compartimento posterior de estos discos (Fig. 14A, A').



**Figura 14:** La expresión de Sd en el compartimento posterior disminuye con la expresión del Sd RNAi. Discos representativos de la cruce control (Fig. 10A; primera columna). y de sub-expresión de Sd (Fig. 10B, segunda columna). Se muestran inmunotinciones para la proteína Sd (A, A'), así como marcajes con GFP (B, B') y DAPI. (C, C'). Los paneles D y D' muestran la superposición de las tinciones anteriores.

A continuación, se evaluó si en los discos con disminución de Sd existe una reducción del compartimento posterior, comparando las áreas anterior y posterior de la bolsa alar utilizando el marcaje de GFP. Efectivamente, los que sub-expresan Sd son más pequeños (Fig. 15B) y esta reducción en tamaño es causada por la disminución del área posterior (Fig. 15A).

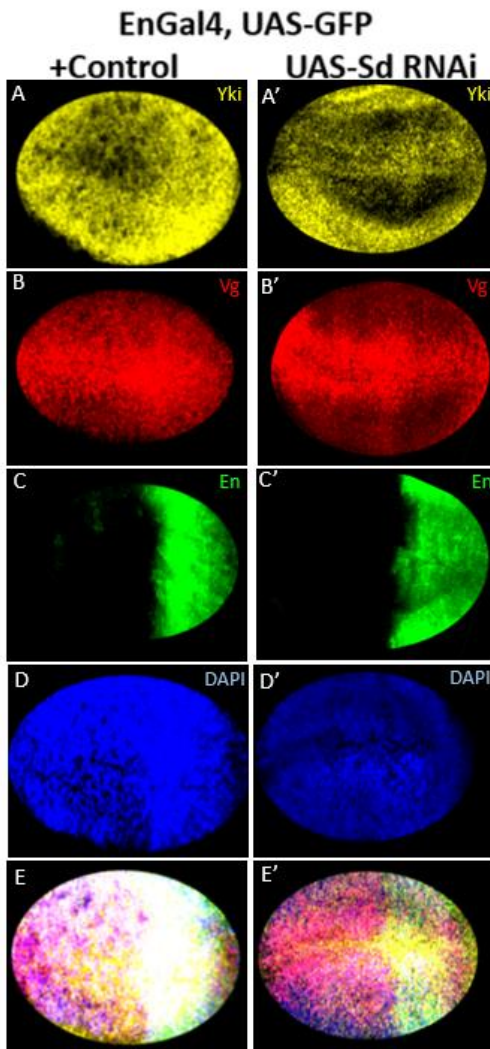
Para verificar que el efecto de esta disminución de la bolsa alar también se refleja en el ala adulta, se hizo una comparación entre los tamaños en las alas resultantes de estos dos grupos. Como se esperaba, la reducción en los niveles de Sd también reduce el tamaño final del ala (Fig. 15C). En apoyo a este resultado, también la forma del margen posterior del ala, así como la formación de la vena longitudinal 4 (que está localizada en la parte posterior) se encuentran afectadas en animales con sub-expresión de Sd (Fig. 15D).



**Figura 15:** Análisis del tamaño de los discos imagales alares y las alas. (A) Comparación de las áreas posteriores de los discos imagales control (Fig. 10A; n=5) y con sub-expresión de Sd (Fig. 10B; n=5). (B) Comparación del tamaño total de la bolsa de los discos imagales alares del inciso A. (C) Análisis de los cocientes de alas adultas con (n=16) y sin reducción de Sd (n=14). (D) Foto de alas representativas de los genotipos descritos en el inciso A.

### *El patrón de expresión de Vg es complementario al de Yki*

A continuación, se analizó el patrón normal de expresión nuclear de Vg y Yki cuando Sd se sub-expresa en el compartimento posterior. En los discos control, como podría predecirse de las interacciones genéticas conocidas entre Vg y Yki, (Zecca y Struhl 2010) el patrón de Vg es complementario al de Yki (Fig. 16A y 16B). Particularmente, la expresión de Yki se localiza en la periferia de la bolsa alar (Fig. 16A), mientras que del patrón de Vg se expresa principalmente en el centro de la bolsa (Fig. 16B).

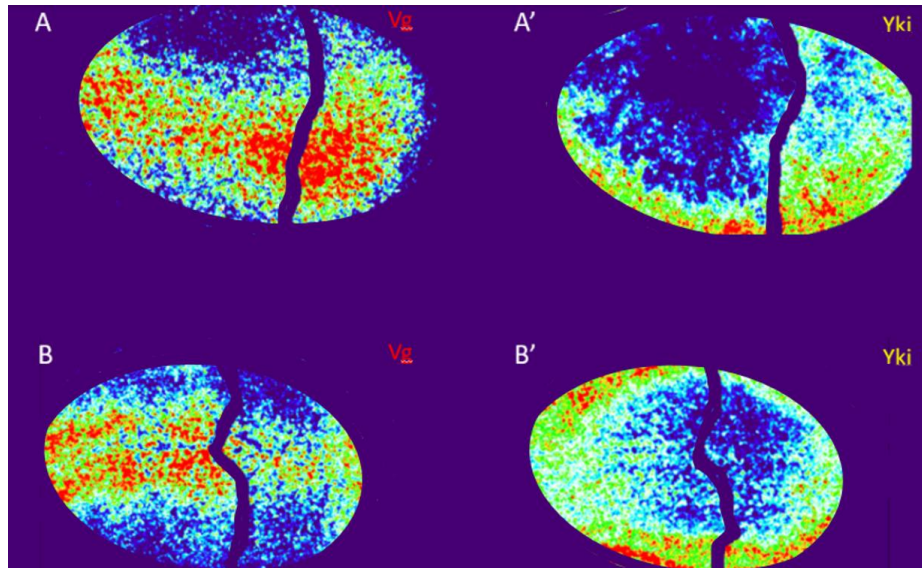


**Figura 16:** Expresión nuclear de Yki y Vg es complementaria. Discos representativos de la cruce control (Fig. 10A; primera columna) y de sub-expresión de Sd (Fig. 10B, segunda columna). Se muestran inmunotinciones para las proteínas Yki (A, A'), Vg (B, B'), así como marcaje de GFP (C, C') y DAPI. (D, D'). Los paneles E y E' muestran la superposición de las tinciones anteriores.



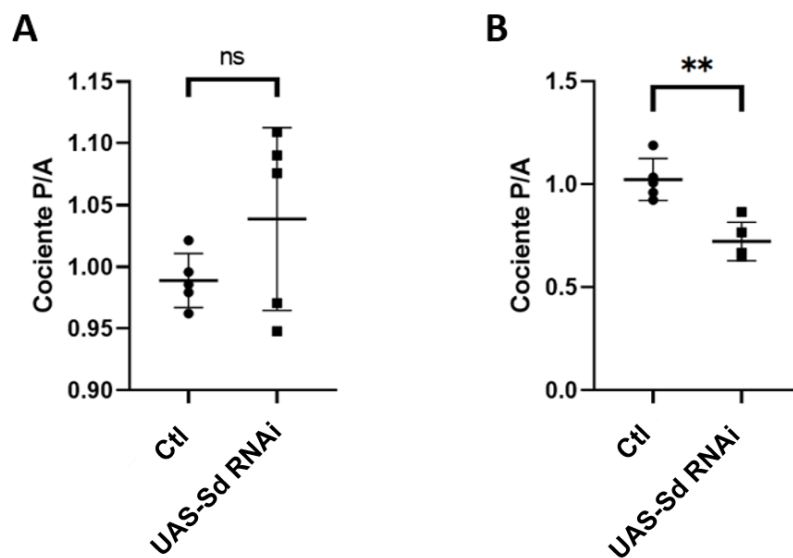
*Sub-expresión de Sd reduce el patrón nuclear de Vg mientras que el de Yki no cambia*

Para analizar si existen cambios en la expresión nuclear de las proteínas Vg y Yki en condiciones de limitación de Sd, se analizó la expresión nuclear de estas proteínas en los discos con RNAi contra Sd respecto a discos control. A simple vista, se aprecia una disminución en la expresión en el compartimento afectado (Fig. 16B, B'), pero no es posible concluir esto con seguridad sin hacer un análisis semicuantitativo. Para analizar la distribución nuclear de Vg y Yki en estos discos, se realizó un mapa de calor para analizar diferencias de intensidad entre los grupos (Fig. 17). En un primer acercamiento con esta herramienta semicuantitativa, se observa que el patrón de Vg se reduce en la parte posterior del disco que sub-expresa Sd en el compartimento posterior (Fig. 17B) respecto al disco control (Fig. 17A). Sin embargo, la expresión nuclear de Yki no es tan sencilla de determinar.



**Figura 17:** Mapa de calor de la expresión de Yki y Vg. (A, A') Discos control (cruzas de la Fig. 10A). (B y B') Discos que sub-expresan Vg (Fig.10B). La porción de la derecha en las imágenes es la posterior y la línea negra es la frontera anteroposterior. La expresión de Vg es mayor en el centro de la bolsa alar y la de Yki es mayor en la periferia de la bolsa alar.

Para confirmar si esta reducción en la intensidad de Vg se debe a una reducción en su expresión nuclear, se realizaron mediciones de los cocientes de intensidades nucleares de Vg y Yki entre los compartimentos posterior y anterior, tanto en los discos control como en los discos con sub-expresión de Sd (Fig. 18). Se encontró una gran variabilidad en la expresión nuclear de Yki y no se detectaron cambios significativos (Fig. 18A). No obstante, se observa una reducción en la expresión nuclear de Vg en el grupo de sub-expresión de Sd en comparación con el grupo control (Fig. 18B).



**Figura 18:** Comparación de la expresión nuclear de Yki (A) y Vg (B) en discos control vs. discos que sub-expresan Sd.

## Discusión

Durante el desarrollo de un órgano, los procesos de diferenciación y proliferación celular determinan el tamaño final que requiere un órgano para cumplir adecuadamente sus funciones. Por ejemplo, si las células se diferencian prematuramente y dejan de proliferar, se obtendría un órgano más pequeño y lo contrario sucedería si la proliferación celular se extiende por más tiempo de lo normal. Aunque en la literatura se han diseñado varios modelos que proponen cómo deben ser las características de retroalimentación entre la diferenciación y proliferación (véase por ejemplo la revisión de Lander 2011), aún desconocemos cómo ocurre la coordinación de estos procesos a nivel molecular.

En esta tesis, utilizamos el disco alar de *Drosophila Melanogaster* porque las señales que determinan el crecimiento y la diferenciación de las células alares son conocidas y se pueden realizar experimentos para investigar cómo estos procesos podrían coordinarse mutuamente. En particular, evaluamos el papel que tiene la competencia por el factor de transcripción Sd entre el factor de diferenciación tipo alar Vg y el factor de proliferación celular Yki, en la coordinación de estos procesos del disco alar de *Drosophila*. Para esto, analizamos la expresión nuclear de Vg y Yki en condiciones de sub-expresión de Sd (La condición de sobreexpresión no pudo ser evaluada y queda como perspectiva de este trabajo).

Observamos que, cuando la cantidad de Sd es limitada en el compartimento posterior del disco alar, el Sd remanente se une a Vg y se traslada al núcleo celular, mientras que los niveles de Yki se mantienen sin cambios aparentes (Fig. 18). Este último resultado aparentemente sugiere que Sd tendría una preferencia por Yki para mantener sus niveles constantes en el núcleo, mientras que explicaría que Vg al no encontrar suficiente Sd reduciría sus niveles nucleares. Sin embargo, si así fuera, esperaríamos que el compartimento posterior (respecto al anterior) creciera de forma similar a

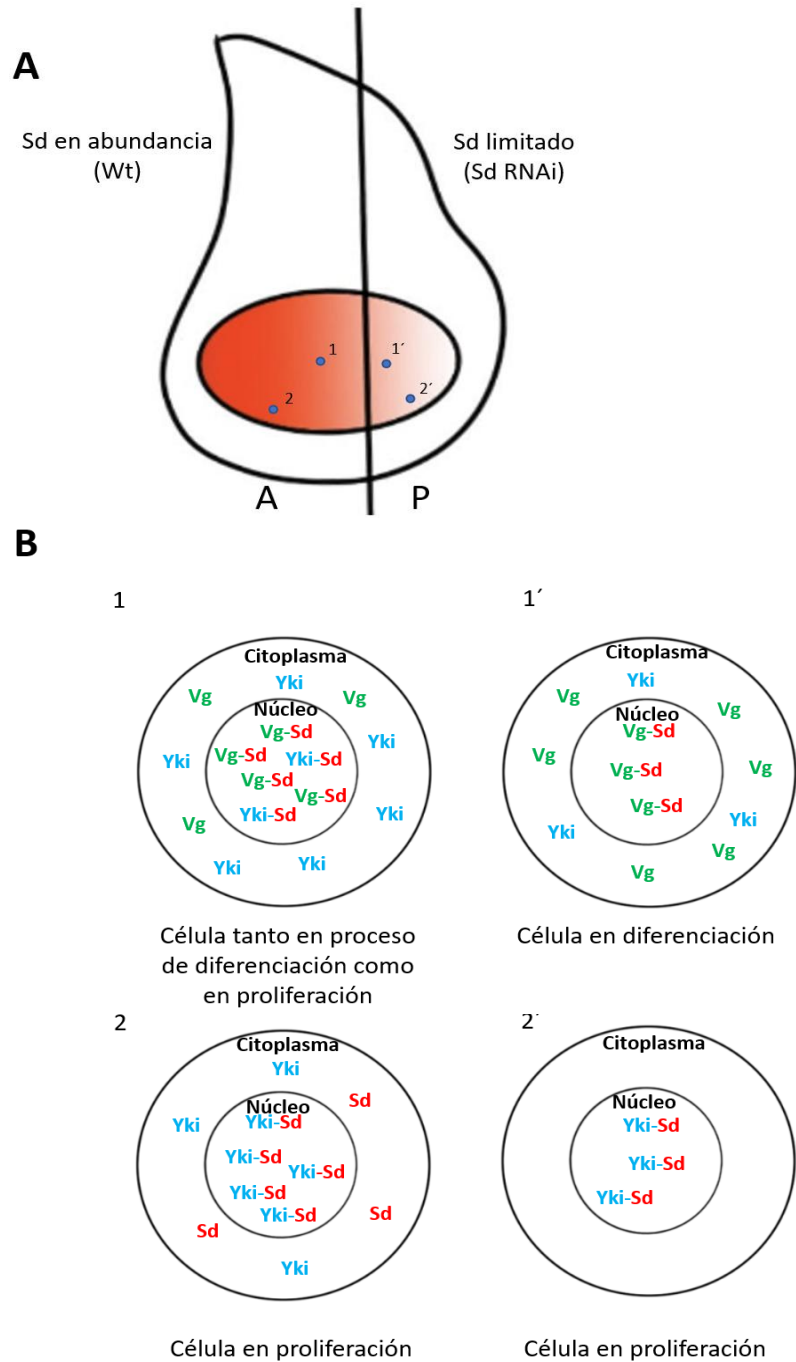
los discos controles y, sin embargo, el compartimento posterior crece menos de lo esperado (Fig. 15).

La reducción de tamaño del compartimento posterior sugiere que los niveles limitados de Sd favorecen la diferenciación sobre la proliferación, y que la invariancia de los niveles nucleares de Yki se debe a que Yki entra al núcleo de forma independiente a Sd, como se ha sugerido en estudios previos (Cho et al, 2021). De esta forma, aunque Yki aparentemente se encuentra en el núcleo, no está unida a Sd y no puede estimular la proliferación de forma normal. De forma contraria, Vg no puede entrar al núcleo sin Sd, por esta razón se aprecia una reducción en los niveles nucleares de Vg cuando la producción de Sd se encuentra reducida (Fig. 19B). Estos resultados confirman que el proceso de diferenciación se favorece sobre el proceso de proliferación y que estos procesos son mutuamente excluyentes en la condición silvestre. De igual forma, el que no se expresen Vg y Yki en las mismas células en el estado silvestre implica que existe una regulación excluyente que, probablemente se deba a la competencia por el factor de transcripción Sd.

Previamente se evidenció que la reducción de la proteína Sd reduce el tamaño del ala resultante, ya que el tamaño final de los discos imagales alares también se reduce (Simmonds et al, 1993) (Fig. 19A). Sin embargo, esta es la primera ocasión en la que se correlacionan los cambios en tamaño y forma de los tejidos con la expresión nuclear de estos factores. Además de que los resultados obtenidos coinciden con los publicados por Simmonds et al., observamos que la forma del ala se aprecia mellada en su borde únicamente en el compartimento donde realizamos la mutación (Fig. 15). Así, al reducir el nivel de Sd, la proliferación mediada por el dímero Yki-Sd disminuye, ocasionando una reducción tanto en el tamaño celular como en el número final de células. Algo a destacar es que, a pesar de la reducción de la proteína Sd, el patrón de expresión de Yki en la periferia no se alteró. Esto puede deberse a que, el remanente de Sd en la periferia, se une a Yki debido

a que no hay un proceso de competencia contra Vg, el cual todavía no se expresa en esta zona, ocasionando que su expresión nuclear no se vea afectada.

No obstante, estos resultados son aún preliminares y se requieren más experimentos y estudiar el sistema con otras perturbaciones de Sd, Vg y Yki para tener conclusiones más certeras. Esta tesis revela la viabilidad de estos estudios con los que se puede realizar un modelo a nivel multiescala, correlacionando cuantitativamente aspectos moleculares locales con respuestas tisulares a nivel global.



**Figura 19:** A) Figura representativa de un disco imagal alar con Sd RNAi, la porción posterior reduce su tamaño con Sd limitado. B) Células de la bolsa del disco. El número indica de dónde fueron tomadas del disco del inciso previo.

## Perspectivas

El presente trabajo muestra solo los primeros indicios de lo que puede ser este proyecto a mediano plazo. Para complementar este trabajo, lo primero a realizar es aumentar el número de discos evaluados, con esto podremos confirmar nuestros resultados de forma certera.

También es necesario generar un experimento viable donde aumente en la expresión de Sd. Esto podría generarse con la proteína GAL80 sensible a la temperatura. Así se podría controlar temporalmente, mediante cambios de temperatura, la sobreexpresión de Sd. Con esta herramienta se podrá analizar la expresión nuclear de las proteínas Vg y Yki y generar un modelo donde no exista competencia por Sd.

Para evaluar el efecto que tiene la reducción de Sd sobre la proteína Yki, se podrían tomar discos más jóvenes, por ejemplo, del segundo estadio larvario. Así se podría observar el efecto de la expresión nuclear de Yki en un momento donde no hay presencia de Vg. O bien, combinando el RNAi de Sd con uno para Vg.

Por último, se planea formular un modelo matemático que represente las interacciones moleculares de las proteínas y complejos de interés (Vg, Yki, Sd, Tgi, Vg-Sd, Yki-Sd, Yki-Tgi, Tgi-Sd) (Transcripción/Traducción, formación de complejos y degradación). Este modelo matemático se iniciará este mismo verano en colaboración con grupos especialistas en biología teórica (grupo del Dr. Osvaldo Chara en Argentina). También se planea a mediano plazo expandir este modelo matemático a nivel molecular para generar un modelo multiescala, es decir, que el modelo matemático tome en cuenta también las alteraciones a nivel celular, como la proliferación y diferenciación, y a nivel de sistema, tomando en cuenta el tamaño y forma finales del disco alar.

## Bibliografía

A.H. Brand, N. Perrimon. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 1 June 1993; 118 (2): 401-415.

Baena-López LA, García-Bellido A. Genetic requirements of vestigial in the regulation of *Drosophila* wing development. *Development*. 2003; 130(1):197-208.

Beira, J.V. and Paro, R. The legacy of *Drosophila* imaginal discs. (2016) *Chromosoma* 125, 573-592.

Bernard, P. Kasherov, S. Grenetier, A. Dutriaux, A. Zider, J. Silber, A. Lalouette, Integration of differentiation signals during indirect flight muscle formation by a novel enhancer of *Drosophila* vestigial gene. *Dev. Biol.*, 332, 2009; pp. 258-272

Brower D. L. Engrailed gene expression in *Drosophila* imaginal discs. (1986). *The EMBO journal*, 5(10), 2649-2656.

Campbell S, Inamdar M, Rodrigues V, Raghavan V, Palazzolo M, Chovnick A. The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev*. 1992 Mar; 6(3):367-79.

Campos-Ortega J., Hartenstein V. *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Springer Berlin, Heidelberg. 1985. XI, 227.

Cho YS, Jiang J. Hippo-Independent Regulation of Yki/Yap/Taz: A Non-canonical View. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Apr 1;9:658481.

Courtney M. Clark-Hachtel, David M. Linz, and Yoshinori Tomoyasu. Insights into insect wing origin provided by functional analysis of vestigial in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *PNAS* October 15, 2013 110 (42) 16951-16956.



Couso, J. P., Knust, E. and Martinez Arias, A. Serrate and wingless cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in *Drosophila*. (1995). *Curr. Biol.* 5,1437-1448.

Deng H., Hughes S. C., Bell J. B., Simmonds A. J. Alternative requirements for Vestigial, Scalloped, and Dmef2 during muscle differentiation in *Drosophila melanogaster*. 2009. *Mol. Biol. Cell* 20, 256-269.

Department of biology from Indiana University (2021). An Introduction to Balancers. Indiana University Bloomington: Bloomington *Drosophila* Stock Center. [https://bdsc.indiana.edu/stocks/balancers/balancer\\_intro.html](https://bdsc.indiana.edu/stocks/balancers/balancer_intro.html)

Dijane, A., Zaessinger, S., Babao?lan, A. B., & Bray, S. J. Notch inhibits Yorkie activity in *Drosophila* wing discs. (2014). *PloS one*, 9(8), e106211.

Fernández-Moreno, M. A., Farr, C. L., Kaguni, L. S., & Garesse, R. (2007). *Drosophila melanogaster* as a model system to study mitochondrial biology. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 372, 33–49.

Gruneberg, H. Ein Beitrag zur Kenntnis der Rontgenmutationen des X-Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. 1929. *Biol. Zentbl.* 49: 680-694.

Guo, T., Lu, Y., Li, P., Yin, M. X., Lv, D., Zhang, W., Wang, H., Zhou, Z., Ji, H., Zhao, Y., & Zhang, L. A novel partner of Scalloped regulates Hippo signaling via antagonizing Scalloped-Yorkie activity. 2013. *Cell research*, 23(10), 1201-1214.

Harvey, K., Tapon, N. The Salvador-Warts-Hippo pathway, an emerging tumour-suppressor network. 2007; *Nat Rev Cancer* 7, 182-191.

Hernández-Soto, A., Echeverría-Beirute, F., & Guzmán-Hernández, T. (2021). The RNAi as a tool to control tropical pathogens. *Agronomy Mesoamerican*, 32(1), 326-337.

Hevia, C.F., A. López-Varea, N. Esteban, and J.F. de Celis. ¿A Search for Genes Mediating the Growth-Promoting Function of TGF? in the *Drosophila melanogaster* Wing Disc. 2017. *Genetics*. 206:231-249.

Hidalgo A. Growth and patterning from the engrailed interface. *Int J Dev Biol*. 1998;42(3):317-24.

Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell*. 2005 Aug 12;122(3):421-34.

Johnston M. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. 1987. *Microbiological reviews*, 51(4), 458-476.

Joseph Parker, Gary Struhl Control of *Drosophila* wing size by morphogen range and hormonal gating. 2020. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (50) 31935-31944;

Kelly SM, Elchert A, Kahl M. J. Dissection and immunofluorescent staining of mushroom body and photoreceptor neurons in adult *Drosophila melanogaster* brains. *Vis Exp*. 2017 nov; 129:56174.

Kim J, Sebring A, Esch JJ, Kraus ME, Vorwerk K, Magee J, Carroll SB. Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. 1996. *Nature*. 382(6587):133-8.

Klein, T. Wing disc development in the fly: the early stages. (2001). *Current opinion in genetics & development*, 11(4), 470-475.

Koontz, L. M., Liu-Chittenden, Y., Yin, F., Zheng, Y., Yu, J., Huang, B., Chen, Q., Wu, S., & Pan, D. The Hippo effector Yorkie controls normal tissue growth by antagonizing scalloped-mediated default repression. 2013. *Developmental cell*, 25(4), 388-401.

Macias MJ, Hyvönen M, Baraldi E, Schultz J, Sudol M, Saraste M, Oschkinat H. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature*. 1996 Aug 15;382(6592):646-9.

MacKay J. O., Soanes K. H., Srivastava A., Simmonds A., Brook W. J., Bell J. B. An in vivo analysis of the vestigial gene in *Drosophila melanogaster* defines the domains required for Vg function. 2003. *Genetics* 163, 1365-1373.

Mesrouze, Y., Aguilar, G., Meyerhofer, M., Bokhovchuk, F., Zimmermann, C., Fontana, P., Vissières, A., Voshol, H., Erdmann, D., Affolter, M., & Chène, P. (2022). The role of lysine palmitoylation/myristoylation in the function of the TEAD transcription factors. *Scientific reports*, 12(1), 4984.

Simmonds A. J., Liu X., Soanes K. H., Krause H. M., Irvine K. D., Bell J. B. Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. 1998. *Genes Dev.* 12: 3815-3820.

St Johnston, D. The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 3, 176–188 (2002).

Tossell, K., Kiecker, C., Wizenmann, A., Lang, E., and Irving, C. Notch signalling stabilises boundary formation at the midbrain-hindbrain organiser. (2011). *Development* 138, 3745-3757.

Williams J. A., Bell J. B., Carroll S. B. Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. (1991). *Genes Dev* 5, 2481-2495.

Williams JA, Bell JB. Molecular organization of the vestigial region in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 1988 May;7(5):1355-63.

Wu S, Liu Y, Zheng Y, Dong J, Pan D. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell.* 2008

Zecca M, Basler K, Struhl G. Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell*. 1996 nov 29;87(5):833-44.

Zecca, M., & Struhl, G. A feed-forward circuit linking wingless, fat-dachsous signaling, and the warts-hippo pathway to *Drosophila* wing growth. (2010). *PLoS biology*, 8(6), e1000386.

Zhang, L., Ren, F., Zhang, Q., Chen, Y., Wang, B., & Jiang, J. The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. (2008). *Developmental cell*, 14(3), 377-387.