



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Neurobiología

**CARACTERIZACIÓN DE LA PLC-GAMMA EN PROCESOS
DE DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN EN
*Drosophila melanogaster***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

JUAN MANUEL MURILLO MALDONADO

TUTOR DE TESIS: DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR

COMITÉ TUTOR: DRA. MARINA MACÍAS SILVA
DR. MARIO ENRIQUE ZURITA ORTEGA

QUERÉTARO, QRO

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

ÍNDICE	1
LISTA DE FIGURAS	III
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Crecimiento, proliferación y diferenciación celular	3
3.2 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio	5
3.3 Desarrollo del ala en <i>Drosophila</i>	7
3.4 Desarrollo del ojo en <i>Drosophila</i>	10
3.5 Fosfolipasas C	13
3.6 PLC- γ	15
3.6.1 Expresión y función	15
3.6.2 Estructura multidominio	16
3.6.3 Regulación y función celular	17
3.7 PLC- γ en <i>Drosophila</i>	19
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	22
6. METODOLOGÍA	23
6.1 Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	23
6.2 Pruebas Genéticas	23
6.3 Hibridación <i>in situ</i>	24
6.3.1 Síntesis de la sonda	24
6.3.2 Hibridación <i>in situ</i> en embriones	24
6.3.3 Hibridación <i>in situ</i> en discos imagales	25
6.4 Determinación del peso corporal	25
6.5 Análisis de alas	25
6.6 Análisis de ojos	26
6.6.1 Microscopia electrónica de barrido	26
6.6.2 Histología	26
6.7 Construcciones de rescate <i>sl</i>	27
6.8 Análisis estadístico	27

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1 Expresión de <i>sl</i> durante la embriogénesis	28
7.2 Expresión de <i>sl</i> en discos imagales	29
7.3 Artículo	31
8. CONCLUSIONES	48
9. PERSPECTIVAS	49
10. BIBLIOGRAFÍA	50

LISTA DE FIGURAS

1. <i>Drosophila melanogaster</i> _____	5
2. Estructura y mapa de destino del disco imagal de ala _____	8
3. Estructura y diferenciación del ojo compuesto de <i>Drosophila</i> _____	11
4. Clasificación de las fosfolipasas y reacción enzimática catalizada por las PLCs _____	14
5. Esquema representativo de los dominios de la PLC- γ _____	16
6. Mecanismo de translocación a la membrana de la PLC- γ seguido de la activación de RTKs _____	18
7. Fenotipos mutantes de <i>sl</i> en <i>Drosophila</i> _____	19
8. Distribución espacio-temporal del mRNA de la PLC- γ durante la embriogénesis en <i>Drosophila</i> _____	28
9. Distribución espacial del mRNA de la PLC- γ en discos imagales de ala y de ojo-antena de tercer estadio larvario _____	30

1. RESUMEN

La coordinación entre el crecimiento y la diferenciación celular es crítica para obtener un tamaño y una forma adecuados para cada organismo. Estos procesos involucran a un gran número de cascadas de señalización que determinan las instrucciones celulares en espacio y en tiempo. Entender cómo estos procesos son regulados es una cuestión fundamental y aún sin resolver. A través de un análisis genético en *Drosophila melanogaster*, en este trabajo mostramos que la fosfolipasa C de tipo γ (PLC- γ), codificada por *small wing (sl)*, actúa como una conexión entre el crecimiento y la diferenciación celular. A pesar de que *sl* tiene una fuerte expresión durante la embriogénesis, las moscas homocigotas mutantes nulas para *sl* son viables y fértiles. Estas mutantes muestran, sin embargo, una combinación de defectos en el crecimiento y en la diferenciación: alas pequeñas, fragmentos de venas ectópicas y células fotorreceptoras R7 extras. Además, también presentan un peso menor y ojos más pequeños. Encontramos que *sl* se expresa en los tejidos precursores del ala y el ojo en las etapas en que ocurre el crecimiento y la diferenciación celular. Además, mostramos que la PLC- γ , después de ser activada por la vía de la insulina, modula la actividad de la vía del EGF/MAPKs con lo que estimula el crecimiento celular e inhibe la diferenciación. Estas funciones requieren tanto de la vía de señalización clásica de la PLC- γ como de la regulación del procesamiento de ligandos homólogos a EGF. Los dominios SH2 de la PLC- γ se requieren de forma diferencial para estas funciones. Finalmente, proponemos un modelo en el cual la PLC- γ promueve el crecimiento y suprime la diferenciación ectópica, permitiendo que las células alcancen un tamaño normal y una diferenciación apropiada.

2. ABSTRACT

Coordination between growth and patterning/differentiation is critical if appropriate final organ structure and size is to be achieved. These processes involve signal transduction cascades that determine the spatial and temporal pattern of cellular instructions. Understanding how these two processes are regulated is therefore a fundamental and as yet incompletely answered question. Here we show, through a genetic analysis in *Drosophila melanogaster* that the phospholipase C- γ (PLC- γ), encoded by *small wing (sl)*, acts as such a link between growth and patterning/differentiation. Surprisingly, despite high expression during embryogenesis, homozygous *sl* null mutants are viable and fertile. *sl* mutants have previously been shown to have a combination of both growth and patterning/differentiation phenotypes: small wings, ectopic wing veins, and extra R7 photoreceptor cells. We also found that body weight is reduced, as is eye size. Consistently, *sl* is expressed in eye and wing imaginal discs at stages where growth and cell differentiation are taking place. Also, we show here that PLC- γ , activated by the insulin pathway, participates positively during cell growth by modulating the EGF/MAPKs pathway activity; and also that, activated by the insulin receptor, negatively regulates the EGF/MAPKs pathway during differentiation. These roles require both the classic PLC- γ signaling pathway and regulation of EGF ligands processing downstream of PLC- γ . The two PLC- γ SH2 domains are required in a differential way. Finally, we propose a model in which PLC- γ promotes growth and suppresses ectopic differentiation allowing cells to attain a normal size and proper differentiation.

3. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo, las células de un organismo multicelular deben coordinar los procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular para obtener un tamaño y una forma adecuados. Estos procesos celulares requieren de una apropiada comunicación entre las células así como de redes de señalización dentro de las mismas.

3.1 Crecimiento, proliferación y diferenciación celular

Mientras que la talla de cualquier organismo está determinada por el número y el tamaño de las células, la forma se adquiere mediante procesos de diferenciación celular (Conlon y Raff, 1999; Zhu y Skoultchi, 2001).

El tamaño de una célula depende de factores intrínsecos y extrínsecos. El tipo celular es un claro determinante intrínseco, así por ejemplo, una célula neuronal es mucho más grande que una epitelial. Otro factor intrínseco es la cantidad de material genético que contiene la célula. Una célula haploide suele tener la mitad del tamaño de una célula diploide mientras que una célula poliploide (como una de las células de las glándulas salivales en *D. melanogaster*, por ejemplo) es mucho más grande que una diploide. Entre los factores extrínsecos encontramos la disponibilidad de nutrientes y la temperatura. Cuando algunas células en crecimiento se encuentran en condiciones limitadas de nutrientes, éstas detienen el crecimiento celular y en consecuencia adquieren un tamaño celular reducido. También, las larvas de *Drosophila* crecidas en medio con pocos nutrientes se desarrollan más lentamente y generan moscas pequeñas como consecuencia de contener un menor número de células, éstas de una menor talla celular en sus tejidos (Day y Lawrence, 2000; Hafen y Stocker, 2003). Un ejemplo de la influencia de la temperatura sobre el crecimiento celular se observa también en *Drosophila*,

en donde diversos procesos durante el desarrollo (incluido el crecimiento celular) varían considerablemente con la temperatura (de Moed et al., 1997).

El número celular depende de la cantidad de divisiones celulares y de la muerte celular. La división celular se define como la separación de una célula en dos células hijas. En células eucarióticas, este proceso implica la división del núcleo (mitosis) seguido por la división del citoplasma (citoquinesis). La proliferación celular, referida como el aumento en el número de células mediante división celular, está regulada principalmente por señales extracelulares como hormonas y la disponibilidad de nutrientes (Alberts et al., 2007).

Las moléculas extracelulares que regulan el crecimiento y la proliferación celular generalmente son proteínas solubles secretadas, proteínas unidas a la membrana celular o componentes de la matriz extracelular. Estas moléculas pueden ser divididas en tres principales clases: mitógenos, que estimulan la proliferación celular principalmente regulando la progresión a través del ciclo celular; factores de crecimiento, que estimulan el crecimiento celular promoviendo la síntesis de proteínas y otras macromoléculas, además de inhibir la degradación; y los factores de sobrevivencia, que promueven la sobrevivencia celular suprimiendo la apoptosis (muerte celular programada) (Alberts et al., 2007).

Por otra parte, la diferenciación celular es el proceso por medio del cual una célula cambia para poder realizar una o varias funciones específicas. Este proceso involucra cambios en la expresión génica que generalmente provocan modificaciones en la forma celular permitiéndole realizar nuevas funciones y, consecuentemente, ser morfológicamente diferente a otras células. La diferenciación en organismos multicelulares es la responsable de generar una gran variedad de células especializadas organizadas en tejidos y órganos. De forma similar al crecimiento y a la proliferación celular, la diferenciación es regulada por factores externos como moléculas secretadas (morfógenos,

citocinas, moléculas de señalización, etc.), temperatura y oxígeno (Ralston y Shaw, 2008).

Independientemente del proceso del que se trate, las células requieren de mecanismos intracelulares que le permitan acoplar las señales externas a una respuesta celular. Cascadas de transducción de señales intracelulares, activadas por dichos estímulos, son las portadoras de estas instrucciones y son las encargadas de iniciar la respuesta celular. Muchas de estas cascadas de señalización han sido conservadas durante la evolución, es por eso que es posible utilizar diversos organismos modelo para estudiar la transducción de señales involucradas en estos procesos celulares.

3.2 *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio

D. melanogaster, comúnmente conocida como la mosca de la fruta, es uno de los invertebrados más utilizados como modelo de estudio en investigaciones biológicas, principalmente en el área de la genética y la biología del desarrollo (Fig. 1). Fue inicialmente utilizada como modelo genético por Morgan a inicios del siglo pasado. En 1995, su popularidad aumentó exponencialmente con el otorgamiento del premio Nobel a Ed Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard y Eric Wieschaus. En el trabajo de estos investigadores, además del invaluable descubrimiento de genes requeridos durante el desarrollo embrionario, quedaron patentes también las grandes ventajas y potencialidades de este insecto en la investigación científica.



Figura 1. *D. melanogaster*

D. melanogaster es considerado el modelo genético por excelencia. Entre sus ventajas encontramos que: su genoma está secuenciado, su ciclo de vida es corto, genera un número elevado de descendencia, se dispone de una gran cantidad de moscas con mutaciones en diferentes genes, existen muchos procedimientos de genética y biología molecular estandarizados para este modelo. Además, el mantenimiento y manejo en el laboratorio es fácil y económico. A pesar de que *Drosophila* contiene un número considerablemente menor de genes que el humano (*Drosophila* contiene cerca de 14,000 genes mientras que el humano contiene 30,000) se ha determinado que cerca del 75% de los genes humanos que han sido relacionados a enfermedades genéticas se encuentran conservados en la mosca (Reiter et al., 2001). El grado de conservación se extiende a numerosas vías de señalización conservadas tanto en la estructura de sus componentes como en las funciones que éstas ejercen. Ejemplos de esto son las vías de las MAPKs y la de la insulina que serán mencionadas más adelante.

Debido a lo anterior, este insecto ha sido utilizado ampliamente en el estudio del desarrollo. En particular, el desarrollo embrionario ha tenido una atención especial, y es en esta etapa del desarrollo en donde numerosos genes han sido descubiertos y caracterizados. Además del desarrollo embrionario, el desarrollo de los discos imagales es un sistema atractivo para estudiar el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular. Los discos imagales son órganos epiteliales presentes en la larva que se reorganizan durante la metamorfosis para formar estructuras epidérmicas del adulto como son el ala, el ojo, la pata y la antena. Este sistema presenta varias ventajas como modelo de desarrollo: primero, los discos imagales incrementan en masa dramáticamente en unos pocos días antes de la metamorfosis. Durante esta etapa los discos llevan a cabo procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular de forma coordinada; segundo, el desarrollo de los discos, como en los órganos de mamíferos, está regulado por señales externas y factores intrínsecos. Y tercero, existen varias técnicas que permiten modificar la actividad de un gen durante el desarrollo de los discos y monitorear las consecuencias. Los discos imagales de

ala y de ojo son los más utilizados debido a que son los sistemas mejor caracterizados y en donde se han desarrollado un mayor número de herramientas genéticas y moleculares (Weinkove y Leever, 2000). Para poder estudiar aspectos específicos durante el desarrollo es importante entender los procesos generales que ocurren durante la formación del ala y del ojo.

3.3 Desarrollo del ala en *Drosophila*

La formación de las estructuras externas de la mosca adulta se inicia durante la embriogénesis. El ala se desarrolla a partir de un grupo pequeño de 20 a 30 células epiteliales, las cuales se invaginan del ectodermo lateral del segmento mesotorácico en el embrión. Este grupo de células inicia un programa de desarrollo diferente al de las células del ectodermo, el cual se puede distinguir por la expresión del gen *vestigial* a partir de la etapa 12 del desarrollo embrionario (Blair, 2007).

La formación de los compartimentos anterior-posterior y dorsal-ventral es esencial para el desarrollo del disco imagal ya que las interacciones celulares entre los compartimentos generan diferentes señales que regulan procesos de crecimiento y diferenciación. Dichas señales están compuestas principalmente de morfógenos, moléculas cuyos niveles de señalización especifican destinos celulares distintos. Los compartimentos anterior y posterior son una consecuencia de la segmentación embrionaria que ocurre antes de que algunas células del ectodermo se hayan comprometido como células del disco imagal. Estos compartimentos se diferencian por la expresión de los factores de transcripción Engrailed (En) en células posteriores y Cubitus interruptus (Ci) en células anteriores. En el caso particular del disco imagal de ala, las células posteriores secretan el morfógeno Hedgehog (Hh) que difunde a las células anteriores en donde induce la expresión de Decapentaplegic (Dpp). La proteína Dpp se difunde en las direcciones anterior y posterior formando un gradiente de concentración que controla el crecimiento y

la diferenciación en esta estructura (Crozatier et al., 2004). Por otro lado, en este disco imagal, la formación de los compartimentos dorsal y ventral inicia en el segundo estadio larvario, en donde la señalización del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) induce la expresión selectiva del gen *apterous* (*ap*). Este último se expresa sólo en las células dorsales. Esta expresión diferencial genera la activación de la vía de Notch en la región ventral y posteriormente la expresión del morfógeno Wingless (*Wg*) en las células de la frontera dorsal-ventral. Este morfógeno, al igual que *Dpp*, controla el crecimiento y la diferenciación celular en el disco de ala (Diaz-Benjumea y Cohen, 1995; Gonzalez et al., 2006).

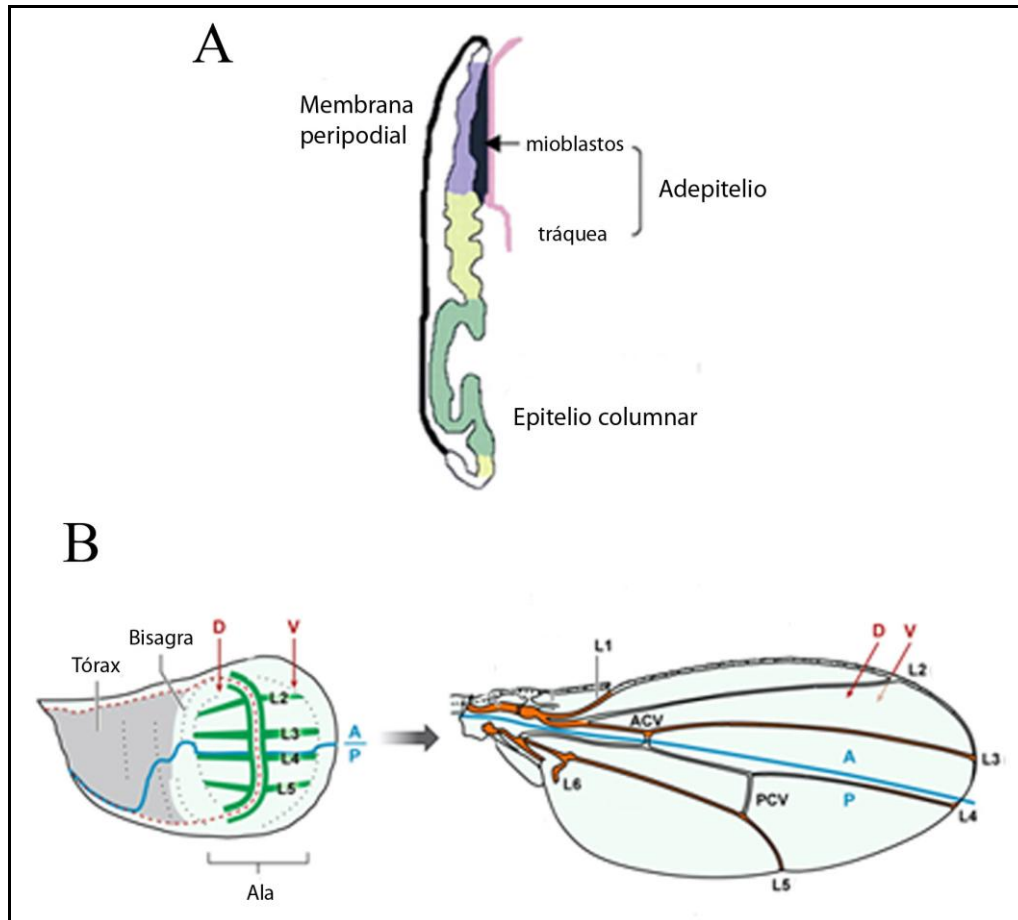


Figura 2. Estructura y mapa de destino del disco imagal de ala. (A) Capas celulares del disco imagal de ala de tercer estado larvario (modificado de Butler et al., 2003). (B) Mapa

de destino del disco imagal de ala indicando los compartimentos anterior-posterior y dorsal-ventral, así como el patrón de las venas (modificado de Blair, 2007).

Posterior a la embriogénesis, y en parte coincidente con el tiempo de los procesos de formación de patrón descritos arriba, los discos de ala proliferan durante toda la etapa larvaria hasta formar un disco imagal de cerca de 50,000 células. El disco maduro está formado por tres capas celulares: el epitelio escamoso o membrana peripodial, que contribuye de forma minoritaria a las estructuras del adulto; el epitelio columnar, que dará origen a la epidermis adulta y que incluye el ala, la bisagra y una parte del tórax; y el adepitelio, formado por mioblastos y tráqueas, que darán lugar a músculos del tórax y a vías respiratorias en el adulto, respectivamente (Fig. 2A) (Butler et al., 2003).

Las células del epitelio columnar se diferencian, desde el tercer estadio larvario hasta la metamorfosis, para finalmente formar un ala adulta con una estructura definida, caracterizada por un patrón específico de venas (Fig. 2B). Las venas son estructuras cuticulares lineales que dan rigidez al ala y en algunos casos sirven como conductores de axones sensoriales. El ala tiene 6 venas longitudinales (L1-L6), cuatro de las cuales atraviesan toda la superficie del ala (L2-L5); y 2 venas transversales (ACV y PCV), las cuales conectan a las venas L3-L4 y L4-L5, respectivamente (Fig. 2B derecha). El proceso de diferenciación de las venas está regulado principalmente por las vías de señalización de Hh, Notch, Wg, EGFR y Dpp, las cuales son activadas durante la formación de los compartimentos anterior-posterior y dorsal-ventral. El resultado inicial de esta señalización es la subdivisión del disco de ala en regiones de provena (líneas verdes en la Fig. 2B izquierda) e intervena (regiones entre líneas verdes). Posteriormente, las regiones provena son finamente delimitadas por la señalización de EGFR y Notch, las cuales se activan en el centro y el borde de cada provena, respectivamente. Finalmente, durante el desarrollo pupal, la vía de señalización del EGFR activa a la señalización de Dpp en la futura vena. La activación simultánea de estas vías

promueve la diferenciación celular para formar las venas del ala adulta (De Celis, 2003; Yan et al., 2009).

3.4 Desarrollo del ojo en *Drosophila*

El ojo de *Drosophila* está compuesto de aproximadamente 800 subestructuras llamadas omatidios. Cada omatidio es una unidad sensorial visual con un arreglo hexagonal que contiene ocho células fotorreceptoras (R1-8), cuatro células del cono y dos células pigmentarias primarias, todas ellas rodeadas por doce células interommatidio (las cuales incluyen quetas, células pigmentarias secundarias y terciarias) (Fig. 3A y 3B). Con base en sus características morfológicas y funcionales, las células fotorreceptoras se dividen en dos clases: los fotorreceptores externos (R1-6) y los internos (R7 y R8). Los externos son los homólogos funcionales de los bastones en los vertebrados, mientras que los internos lo son de los conos. Los R externos expresan un solo tipo de rodopsina (Rh1) y están involucrados en la detección del movimiento y la visión en la luz clara. Los R internos expresan varias rodopsinas (Rh3, Rh4, Rh5 y Rh6) y están involucrados en la discriminación del color y la luz polarizada. Cada fotorreceptor externo tiene un organelo fotosensible llamado rabdómero (extensiones de membrana celular donde se concentran las rodopsinas) que se extiende a lo largo de la retina rodeando a los rabdómeros de los fotorreceptores internos. Los R internos tienen rabdómeros más pequeños, los cuales ocupan solo una mitad del largo de la retina y están localizados uno encima de otro (R7 encima de R8). Los R internos envían sus terminaciones axónicas a la medula mientras que los externos lo hacen a la lámina del lóbulo óptico en el cerebro (Fig. 3B) (Mollereau y Domingos, 2005).

La formación del ojo de la mosca adulta inicia durante la embriogénesis, en donde un grupo de alrededor de 20 células del ectodermo dorso-lateral es especificado para formar el disco imagal de ojo-antena. Durante los estadios larvarios, el disco imagal experimenta varias divisiones celulares hasta llegar a unas 10,000 células.

Iniciado el segundo estadio larvario, las células del disco se especifican en aquellas que formarán el ojo o la antena a través de un proceso que requiere de la señalización de Notch y EGFR. La activación de la vía de Notch promueve la especificación de células del ojo mientras que la del EGFR la antagoniza.

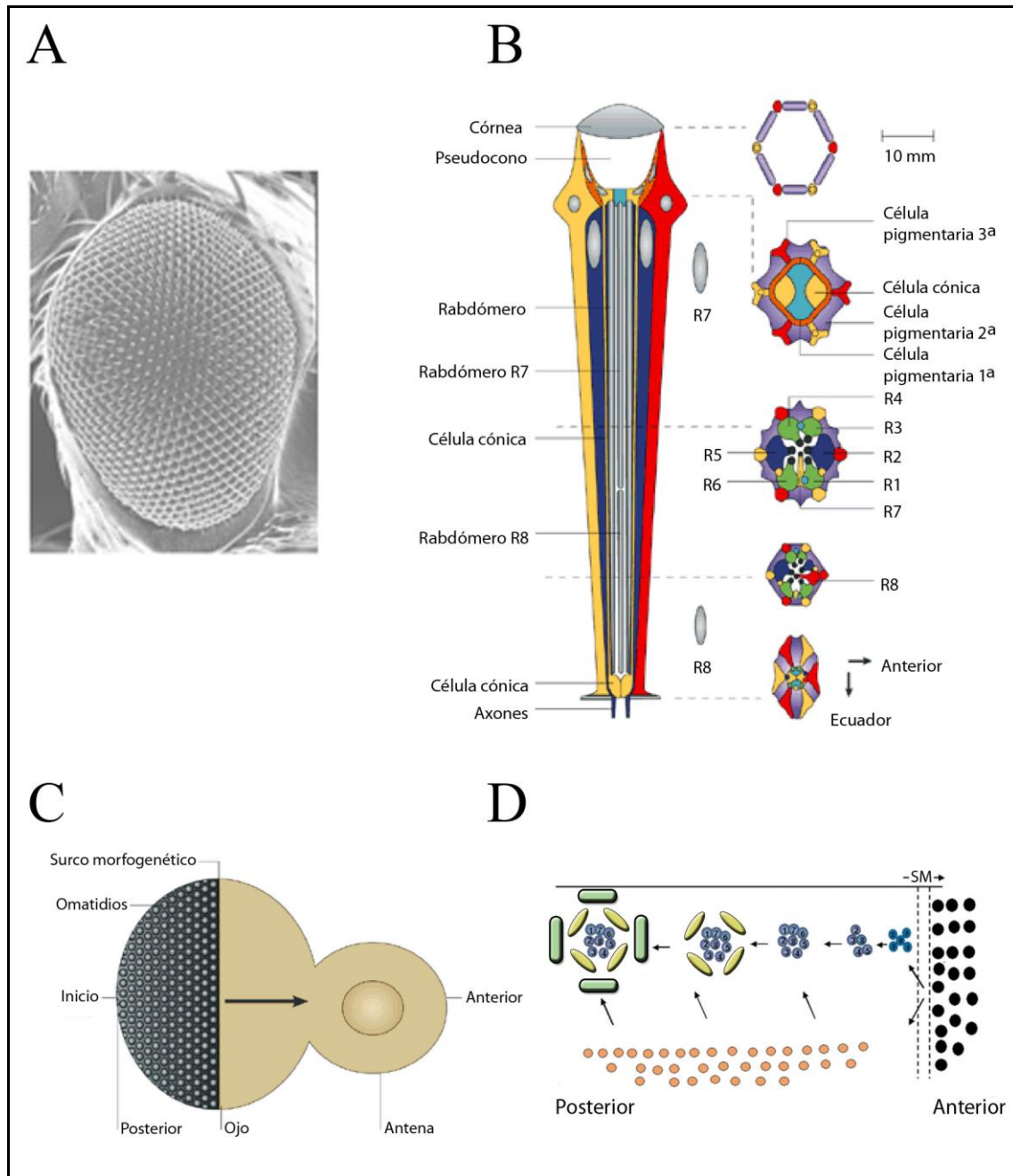


Figura 3. Estructura y diferenciación del ojo compuesto de *Drosophila*. (A) Microscopia electrónica de barrido del ojo compuesto. (B) Estructura de un omatidio (modificado de Kumar, 2001). (C) Proceso de diferenciación en el disco imagal de ojo-antena. (D) Secuencia de la diferenciación celular después del surco morfogenético (SM): fotorreceptores (azul), células del cono (amarillo) y células pigmentarias (verde) (modificado de Nagaraj y Banerjee, 2004).

A principios del tercer estadio larvario las células precursoras del ojo empiezan a diferenciarse. El proceso de diferenciación ocurre en el surco morfogenético, una hendidura dorso-ventral en la región apical del epitelio del disco imagal. El surco, originalmente posicionado en la región más posterior del disco, se mueve hacia la región anterior en un proceso que requiere de dos días. Durante este recorrido, las células que entran al surco dejan de proliferar y empiezan a diferenciarse en una forma ordenada y altamente regulada (Fig. 3C) (Carthew, 2007).

En el surco morfogenético, las vías de señalización de Hedgehog y de Dpp inician la expresión del factor de transcripción proneural Atonal. Atonal estimula la diferenciación de las células fotorreceptoras R8. En ese momento, cada célula R8 diferenciada inhibe la diferenciación de las células que la rodean mediante inhibición lateral por la vía de Notch. Las células R8 se vuelven los primeros fotorreceptores diferenciados. Una vez fuera del surco, las células R8 estimulan la diferenciación de las demás células mediante la secreción de Spitz (homólogo al factor de crecimiento epidermal de mamíferos, EGF). En las células que reciben esta señal, Spitz se une a su receptor membranaral EGFR activando la vía de las MAPKs. La activación de esta vía induce la diferenciación de las células fotorreceptoras R1-R7 en forma secuencial. Primero, se diferencian los fotorreceptores R2 y R5, y posteriormente R3 y R4. Entonces se forman grupos de cinco células llamados “pre-clusters”. Las células indiferenciadas que rodean a los pre-clusters entran en mitosis en un proceso conocido como “segunda ola mitótica”. Posteriormente, los fotorreceptores R1 y R6 se diferencian. Las células fotorreceptoras R7 son las últimas en diferenciarse y requieren de una activación adicional de la vía de las MAPKs. Esta activación es generada por la unión del

ligando Boss, presente en la membrana de las células R8, al receptor Sevenless en las futuras R7s. Finalmente, las células del cono y pigmentarias se diferenciarán y se unen a cada omatidio (Fig. 3D) (Freeman, 1996; Voas y Rebay, 2004).

En resumen, los discos imagales de ala y de ojo son sistemas bien caracterizados que nos permiten estudiar algunos de los procesos celulares involucrados en el desarrollo. Como se deduce de lo mencionado anteriormente, los procesos celulares de crecimiento, proliferación y diferenciación durante el desarrollo, tanto en los discos imagales como en el embrión, involucran una gran cantidad de cascadas de señalización que determinan las instrucciones celulares definidas en espacio y en tiempo. Muchas de estas vías de señalización son activadas por la unión de moléculas extracelulares, como el EGF o la insulina, a receptores con actividad de tirosina-cinasa (RTKs). En vertebrados, se sabe que la fosfolipasa C de tipo γ (PLC- γ) se requiere en la señalización de algunas RTKs para regular estos procesos celulares.

3.5 Fosfolipasas C

Las fosfolipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana celular. Las fosfolipasas han sido clasificadas en cuatro grupos de acuerdo al sitio de rompimiento del lípido: las fosfolipasas A_1 y A_2 hidrolizan el enlace éster del fosfolípido en el carbono 1 y 2, respectivamente; mientras que las fosfolipasas C y D rompen el enlace fosfodiéster que une al grupo polar antes o después del átomo de fósforo, respectivamente (Fig. 4A).

Las fosfolipasas de tipo C (PLCs) hidrolizan de forma específica al fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PIP_2). La reacción produce inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). Estas moléculas funcionan como segundos mensajeros intracelulares. El IP_3 generado se difunde a través del citosol hasta unirse a un

receptor localizado en el retículo endoplásmico. El receptor de IP_3 (IP_3R) es un canal de iones de calcio cuya apertura depende de la unión de IP_3 y de iones de calcio a sitios alostéricos del receptor. Esta apertura provoca la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares hacia el citosol. La elevación en la concentración del calcio citoplasmático regula diversos procesos como la movilidad, la proliferación, y el crecimiento celular. Por otra parte, el DAG anclado en la membrana celular activa, junto con el calcio, a la proteína cinasa C clásica (PKC). PKC entonces fosforila, en residuos de serina/treonina, a una gran variedad de sustratos regulando con ello numerosos procesos que incluyen la proliferación, la diferenciación y el crecimiento celular (Fig. 4B).

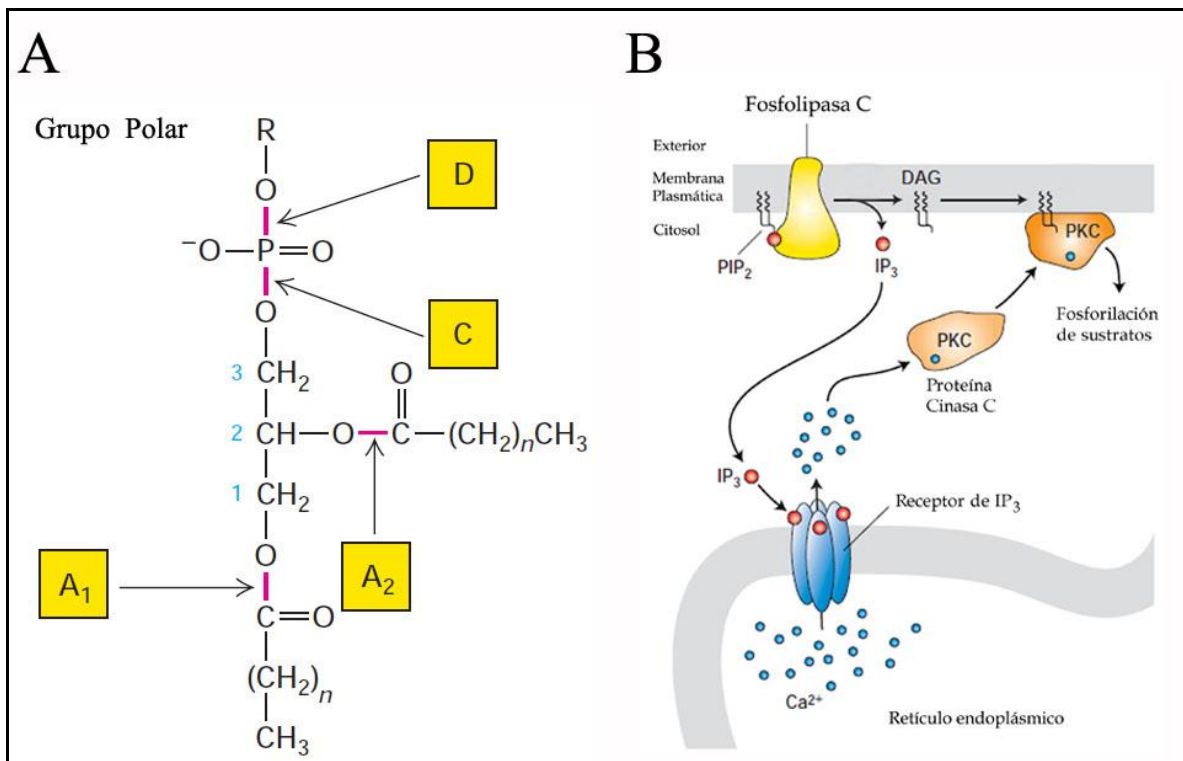


Figura 4. Clasificación de las fosfolipasas (A) y reacción enzimática catalizada por las PLCs (B) (Modificado de Lodish et al., 2004).

En mamíferos se han encontrado 13 isoenzimas que tienen actividad enzimática de fosfolipasa C. Estas isoenzimas contienen un dominio catalítico altamente

conservado, pero difieren en el resto de la estructura así como en la distribución a través de los tejidos. Las diferencias estructurales han permitido subdividir a las isoenzimas de PLC en seis diferentes grupos: PLC- β (con cuatro enzimas), PLC- γ (con dos), PLC- δ (con tres), PLC- ε (con una), PLC- ζ (con una) y PLC- η (con dos) (Patterson et al., 2005; Rhee, 2001; Suh et al., 2008).

3.6 PLC- γ

3.6.1 Expresión y función

Los dos subtipos de la PLC- γ de mamíferos se expresan de forma diferencial en el organismo. La PLC- γ 1 se expresa en una gran variedad de tejidos, aunque es más abundante en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos del cerebro así como en la embriogénesis, en esta última principalmente en estructuras corticales. La expresión de la PLC- γ 2 está limitada principalmente a las células del sistema hematopoyético, en donde los sitios principales de expresión son los nódulos linfáticos. En las células en donde se presentan las dos isoenzimas, la distribución subcelular de éstas difiere. En mastocitos, por ejemplo, las PLC- γ s son fosforiladas después de la activación del receptor Fc ϵ R1. En estas condiciones PLC- γ 1 se transloca a la membrana plasmática mientras que la PLC- γ 2 se mantiene en regiones perinucleares de las células (Barker et al., 1998). Los distintos patrones de expresión de las PLC- γ s correlacionan con las funciones también distintas de estas fosfolipasas. La PLC- γ 1 participa en el desarrollo embrionario mientras que la PLC- γ 2 lo hace en la regulación de la respuesta inmune. Esto quedó demostrado con la obtención de animales nulos para cada una de estas enzimas. Ratones nulos para la PLC- γ 1, obtenidos mediante recombinación homóloga, mueren como embriones a los nueve días después de la gestación. Antes de los nueve días, los embriones homocigotos mutantes son considerablemente más pequeños que los silvestres. Fuera del tamaño reducido, estos embriones no presentan ninguna otra anomalía aparente. Aunque las funciones específicas

de la PLC- γ 1 durante el desarrollo embrionario no se conocen, la enzima tiene un papel esencial (Ji et al., 1997). Se ha sugerido que debe regular procesos celulares como la proliferación y diferenciación celular en tejidos importantes para el desarrollo embrionario. Por el contrario, los ratones nulos para la PLC- γ 2 son viables. Estos ratones muestran defectos en la maduración y funcionamiento de las células B, plaquetas y mastocitos (Wang et al., 2000).

3.6.2 Estructura multidominio

Las PLC- γ s tienen diferencias estructurales con respecto a las otras PLCs. Por ejemplo, el dominio catalítico, compuesto por las regiones X y Y, se encuentra separado por la región Z. En las demás PLCs estas regiones se encuentran unidas. Se ha demostrado que las regiones X y Y se unen en una estructura terciaria, ensamblando así un dominio catalíticamente activo (Horstman et al., 1996). La región Z está formada por dominios involucrados en interacciones entre proteínas: dos dominios SH2, los cuales son capaces de unirse a residuos de fosfotirosina; un dominio SH3, el cual es capaz de unirse a proteínas con secuencias ricas en prolina, y un dominio PH dividido en dos fragmentos. Las PLC- γ s contienen otros dominios que también se encuentran en las demás fosfolipasas C: un dominio completo PH, el cual es capaz de unirse a fosfolípidos de inositol fosforilados en la posición 3, una región EF que contiene cuatro dominios EF que pueden unir calcio, aunque su función es hasta ahora desconocida y un dominio C-2, en el extremo carboxilo-terminal, capaz de unirse a fosfolípidos de una forma dependiente de calcio (Fig. 5) (Rhee, 2001).

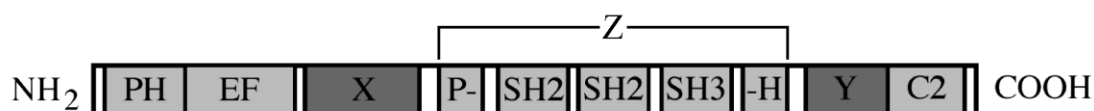


Figura 5. Esquema representativo de los dominios de la PLC- γ .

3.6.3 Regulación y función celular

Originalmente se encontró que la actividad catalítica de las PLC- γ s se incrementaba después de que las células eran estimuladas con moléculas tales como el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Noh et al., 1995). La unión de estos factores de crecimiento a sus receptores con actividad de tirosina-cinasa resulta en la dimerización del receptor, la activación de los dominios catalíticos y finalmente la fosforilación cruzada del fragmento intracelular de los receptores en residuos de tirosina. La PLC- γ 1, a través del dominio SH2 amino terminal, se une a residuos de fosfotirosina del receptor activado (Fig. 6) (Poulin et al., 2000). Esta asociación permite que la PLC- γ 1 sea translocada a la membrana y ello le da acceso a su sustrato, el PIP₂. La PLC- γ 1 es fosforilada en tres residuos de tirosina por el receptor, aunque solo una de estas fosforilaciones es requerida para la activación catalítica de la fosfolipasa (Sekiya et al., 2004). Las PLC- γ s también pueden ser activadas por algunos receptores que no tienen actividad de tirosina-cinasa. La PLC- γ 1 puede ser activada por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), como el receptor de la angiotensina II y el de bradiquinina, por receptores de citocinas o por inmunorreceptores tales como el receptor de células T. La PLC- γ 2 es activada río abajo de receptores de inmunoglobulinas en células del sistema inmune como las células B, plaquetas y mastocitos. En todos estos casos, las PLC- γ s requieren ser fosforiladas por enzimas con actividad de tirosina-cinasa intracelulares como las de la familia de las Src, Syk y Tec (Rhee, 2001).

Además del dominio SH2 amino terminal, las PLC- γ s contienen otros dominios importantes para la translocación de la enzima a la membrana, que por lo tanto participan en la regulación de la actividad catalítica. Los dominios PH y C-SH2 se pueden unir al PIP₃ generado en la membrana después de la estimulación con factores de crecimiento favoreciendo la translocación de la PLC- γ a la membrana celular (Fig. 6) (Falasca et al., 1998). Por otra parte, se ha propuesto que el dominio SH3 está involucrado en la unión de la PLC- γ al citoesqueleto de actina y

que esta unión es importante para colocar a la PLC- γ en las proximidades de la membrana celular, aunque se desconocen las implicaciones que este hecho pueda tener sobre la regulación del dominio catalítico (Bar-Sagi et al., 1993).

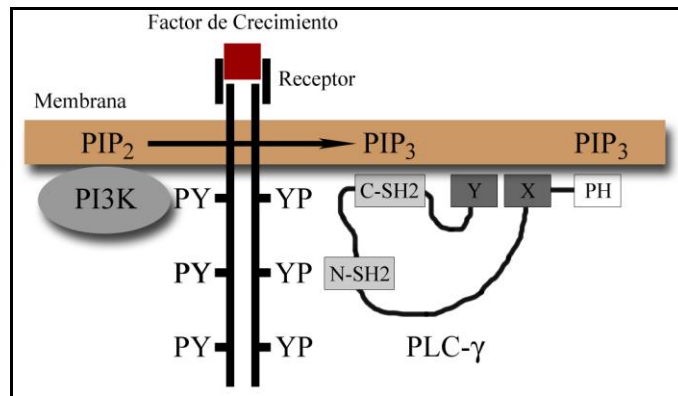


Figura 6. Mecanismo de translocación a la membrana de la PLC- γ después de la activación de RTKs (Modificado de Rhee, 2001).

Debido a que los RTKs que activan a las PLC- γ s están asociados con el crecimiento y la proliferación celular, se ha sugerido que las PLC- γ s son requeridas para estos procesos. Sin embargo, la función de las PLC- γ s en la señalización de los RTKs ha sido controversial. Algunos investigadores han demostrado que la PKC, activada por la PLC- γ , regula positivamente a la vía de las MAPKs, estimulando con ello la mitosis (Burgering et al., 1993). Por otra parte, otros investigadores han colocado a la PLC- γ como un regulador negativo, siendo capaz de inactivar y estimular la degradación de este tipo de receptores, por medio de la activación de PKC (Seedorf et al., 1995). Es importante notar que estos datos fueron obtenidos a partir de cultivos celulares utilizando células diferentes, lo que podría indicar que el modo de acción de la PLC- γ depende del tipo celular, además de que son datos obtenidos en experimentos de ganancia de función, que bien pueden no tener significancia fisiológica. Por lo tanto, es importante conocer las funciones e implicaciones de la relación de la PLC- γ con los RTKs en un contexto fisiológico, como el que ocurre durante el desarrollo de un organismo multicelular donde se sabe que la PLC- γ se requiere. Algunos

animales modelo como *Drosophila melanogaster*, ya antes mencionado, pueden ser sistemas apropiados para este tipo de estudio.

3.7 La PLC- γ en *Drosophila*

D. melanogaster contiene una PLC- γ codificada por el gen *small wing* (*sl*). Se ha observado que moscas homocigas mutantes para este gen son viables y fértiles. Estas moscas muestran alteraciones sutiles y bien definidas. Tienen alas 20% más pequeñas que las de moscas silvestres y muestran fragmentos de venas ectópicas. Sus ojos presentan omatidios con un número extra de células fotorreceptoras R7, lo que genera defectos en la rotación y la estructura de los omatidios afectados (Fig. 7) (Thackeray et al., 1998). Estos fenotipos mutantes indican que la PLC- γ está involucrada en el crecimiento del ala así como en la diferenciación de las venas y los fotorreceptores R7.

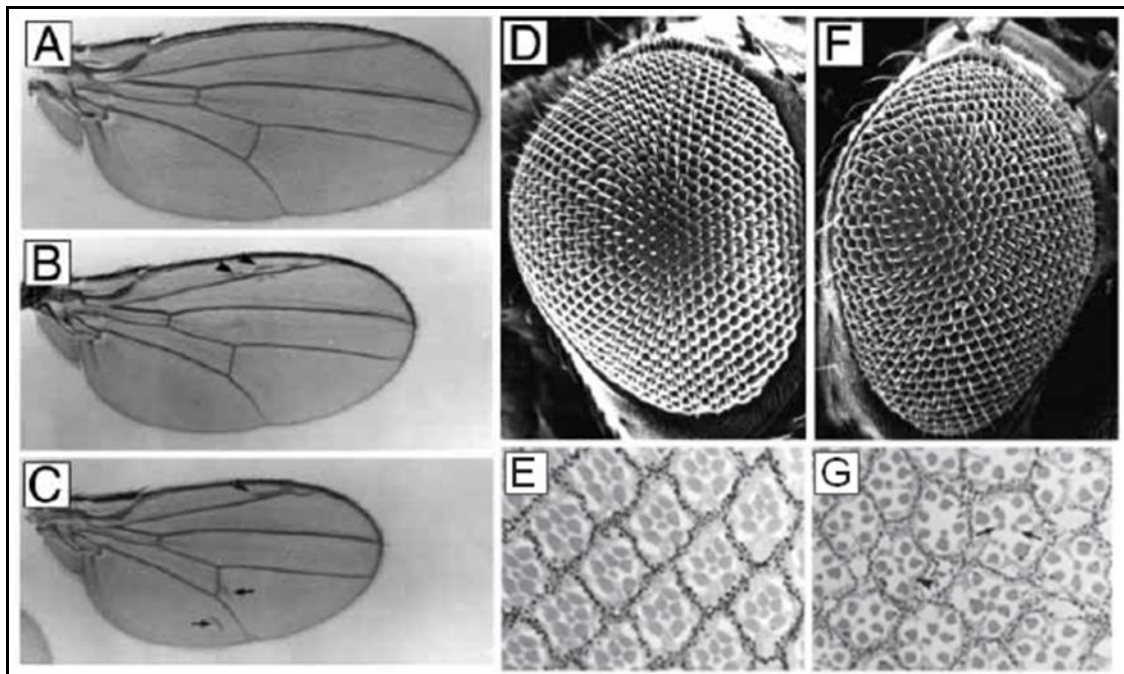


Figura 7. Fenotipos mutantes de *sl* en *Drosophila*. Alas de mosca hembra silvestre (A), hembra mutante *sl*¹ (B) y macho mutante *sl*². Las flechas en B y C indican fragmentos de venas ectópicas. Microscopía electrónica de barrido de ojos silvestres (D) y mutantes *sl*¹

(F). Secciones tangenciales de ojos silvestres (E) y mutantes *sl'* (G). Las flechas en G indican fotorreceptores R7 extra (Thackeray et al., 1998).

La presencia de alas pequeñas en las mutantes sugiere que la PLC- γ es un componente positivo de vías que estimulan el crecimiento y la proliferación celular. Sin embargo, hasta ahora no se conocen los mecanismos moleculares a través de los cuales la PLC- γ regula el tamaño del ala. Las vías de señalización que estimulan el crecimiento y que son activadas por RTKs, como la vía de la insulina, son candidatas factibles para mediar la función de la PLC- γ en el crecimiento del ala.

Los defectos en la diferenciación son similares a los observados en moscas con mutaciones que sobre-activan la vía de las MAPKs tanto en el ojo como en el ala. Como se ha mencionado, las MAPKs estimulan la diferenciación de las venas y de los fotorreceptores R1-R7. Esta activación esta mediada por el receptor del EGF. Adicionalmente, las células R7 requieren de una segunda activación de las MAPKs mediada por el receptor Sevenless. Tanto el EGFR como Sevenless son RTKs. A pesar de lo anterior, se conoce muy poco en *Drosophila* acerca de la regulación de la PLC- γ , así como de la relación que guarda con las MAPKs durante el desarrollo del ala y del ojo.

En los últimos años se ha sugerido, con base en pruebas de interacción génica, que el fenotipo de R7 extras en el ojo se debe, en efecto, a una sobre-activación de las MAPKs, lo que coloca a la PLC- γ como un regulador negativo de esta vía en la diferenciación de este fotorreceptor (Thackeray et al., 1998). Más recientemente se encontró que la PLC- γ estimula la acumulación de Spitz (Spi), un ligando del receptor del EGF, en el retículo endoplásmico de células en cultivo S2R+ de *Drosophila*. En ese mismo estudio, realizando experimentos de rescate genético en el ojo de *Drosophila*, se demostró que la función de la PLC- γ se requiere sólo en las células fotorreceptoras R8 (células que secretan Spitz para inducir la diferenciación de R1-R7). Esto fue deducido de la observación de que la expresión

de una versión silvestre del gen *sl* en células R8 eliminó casi completamente los R7 extras presentes en el ojo de las moscas mutantes (Schlesinger et al., 2004). En su conjunto, los datos anteriores argumentan que la PLC- γ inhibe la señalización de las MAPKs bloqueando el procesamiento y/o la secreción de Spitz al espacio extracelular, regulando con ello la diferenciación celular en el ojo. Evidentemente, varios aspectos de este proceso se desconocen; entre ellos, la forma de activación de la PLC- γ así como los componentes necesarios para unir a la PLC- γ activada en la membrana celular con la maquinaria del procesamiento de Spitz en el retículo endoplásmico. Por otra parte, la función de la PLC- γ en la diferenciación de las venas del ala no ha sido estudiada. Se desconoce si se requiere de un mecanismo similar al del ojo para regular la diferenciación de las venas.

4. HIPÓTESIS

La PLC- γ regula procesos de crecimiento y diferenciación celular a través de su activación por el receptor de insulina y la modulación negativa de la vía de las MAPKs durante el desarrollo del ala y el ojo de *D. melanogaster*.

5. OBJETIVOS

- Determinar el patrón de expresión de *sl* (PLC- γ) durante la embriogénesis y en los discos imagales del ojo y el ala.
- Determinar si la disminución en el tamaño del ala de las mutantes para *sl* se debe a alteraciones en la proliferación y/o crecimiento celular.
- Evaluar las interacciones génicas entre *sl* y componentes de la vía de señalización de la insulina y la vía de las MAPKs.
- Evaluar las interacciones génicas entre *sl* y genes de la vía de señalización clásica de la PLC- γ .
- Evaluar la función de los dominios SH2 de la PLC- γ en la regulación de la diferenciación y el crecimiento.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cepas de *D. melanogaster* empleadas en este trabajo

Las moscas se cultivaron a una temperatura de 25°C y a una humedad relativa de 50%. Las cepas utilizadas son: *sl*¹/*FM7c*, *sl*²/*FM7c* (de J. Carlson, Yale University, USA), *sl*^ρ/*FM7c* (de J. Thackeray, Clark University, USA), *InR*^{E19}/*TM3*, *InR*^{GC25}/*TM3*, *InR*^{3T5}/*TM3*, *chico*¹/*CyO*, *Dp110*^{5W3}/*TM6*, *PKB*¹/*TM3*, *PKB*³/*TM3* (de E. Hafen, ETH, Switzerland), *aos*^{d7}/*TM3*, *Egfr*^{f2}/*CyO*, *Dos*^{R31}/*TM3*, *drk*^{e0A}/*CyO*, *rl*¹/*CyO*, *Ras85D*^{e2f}/*CyO*, *Sos*³⁴/*CyO*, *Sos*^{dm7}/*CyO*, *Rack1*^{EE}/*CyO*, *rho*^{ve-1}/*TM3*, *S²/In(2LR)bw*^{V1 ds}^{33K}, *spi*¹/*CyO*, *lp3R*^{B4}/*TM3*, *PKC53E*^{EY14093}/*CyO*, *vn*^{C221}/*TM3* y *P(ey-FLP.N)6*, *ry*⁵⁰⁶ (del Bloomington *Drosophila* Stock Center, Indiana University, USA).

6.2 Pruebas Genéticas

Las pruebas de interacciones génicas se realizaron cruzando moscas hembras vírgenes homocigotas mutantes para *sl*¹, *sl*² o *sl*^ρ con machos de los siguientes genotipos: *InR*^{E19}/*TM3*, *InR*^{GC25}/*TM3*, *chico*¹/*CyO*, *Dp110*^{5W3}/*TM6*, *PKB*¹/*TM3*, *aos*^{d7}/*TM3*, *Egfr*^{f2}/*CyO*, *Dos*^{R31}/*TM3*, *drk*^{e0A}/*CyO*, *rl*¹/*CyO*, *Ras85D*^{e2f}/*CyO*, *Sos*³⁴/*CyO*, *Sos*^{dm7}/*CyO*, *Rack1*^{EE}/*CyO*, *rho*^{ve-1}/*TM3*, *S²/In(2LR)bw*^{V1 ds}^{33K}, *spi*¹/*CyO*, *lp3R*^{B4}/*TM3*, *vn*^{C221}/*TM3* y *PKC53E*^{EY14093}/*CyO*. En la descendencia, con la ayuda de cromosomas balanceadores marcados, se seleccionaron machos hemocigotos mutantes *sl*¹, *sl*² o *sl*^ρ (el gen *sl* está localizado en el cromosoma X, por lo que los machos se comportarán como homocigotos mutantes) y que además eran heterocigotos para cada una de las mutaciones estudiadas. Para los experimentos de rescate, el procedimiento fue el mismo, solo que los machos cruzados contenían las diferentes construcciones de *sl*.

6.3 Hibridación *in situ*

6.3.1 Síntesis de la sonda

Previo a la reacción de transcripción, se linearizó el plásmido con el cDNA de *s/* para generar las sondas sentido y antisentido, mediante la digestión con *NotI* o con *XhoI*, respectivamente. Para cada sonda, el producto de la digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se realizó una extracción con fenol de la banda obtenida del gel. Para la reacción de transcripción, se utilizó 1 µg del DNA purificado y se le agregaron 2 µl de una mezcla de NTPs con UTP marcado con DIG (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6.5 mM UTP y 3.5 mM DIG-UTP pH 7.5), 2 µl de buffer de transcripción (10x), 1 µl de inhibidor de RNasa (20 u/µl) y 2 µl de RNA polimerasa (20 u/µl). La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas. Posteriormente, la reacción se detuvo agregando 2 µl de EDTA 0.2 M. Finalmente, cada sonda se precipitó con etanol y se diluyó en buffer de hibridación. Como control de calidad de la síntesis, se realizó un ensayo de Dot Blot para cada sonda sintetizada.

6.3.2 Hibridación *in situ* en embriones

Los embriones se trataron de acuerdo a Tautz y Pfeifle (1989). Brevemente, éstos se colectaron de placas de puestas con agarosa y jugo de uva o manzana, se lavaron con agua destilada y se decorionaron con cloro. Posteriormente se les eliminó el vitelo con metanol y agitación, y se trataron con xileno. Se fijaron con formaldehído y se incubaron en una solución de proteinasa K. Se fijaron nuevamente y se hibridaron por separado con la sonda sentido o la sonda antisentido durante toda la noche a 55°C. Después se incubaron con anti-DIG y se revelaron con NBT/BCIP.

6.3.3 Hibridación *in situ* en discos imagales

Se siguió el protocolo de Tautz y Pfeifle (1989). En breve, los discos imagales de ala y de ojo se extrajeron de larvas de tercer estadio. Se fijaron en paraformaldehído y se deshidrataron con una serie de soluciones de etanol. Posteriormente se trataron con xileno, se fijaron nuevamente y se digirieron con una solución de proteinasa K. Se fijaron una tercera vez y posteriormente se hibridaron por separado con la sonda sentido o la antisentido durante toda la noche a 55°C. Finalmente se lavaron e incubaron con anti-DIG y se revelaron con NBT/BCIP.

6.4 Determinación del peso corporal

Para las mediciones del peso corporal se utilizaron hembras homocigotas o heterocigotas (tomadas como control) para el alelo mutante s^{ρ} . Las moscas, de dos días de edad, se congelaron y posteriormente se pesaron utilizando una microbalanza (Cahn C-31, USA) con una sensibilidad de 0.1 μg y un rango de 0.1 μg –25 mg. Para las mediciones de las pupas, las larvas hembras de tercer estadio larvario se separaron y continuaron su desarrollo hasta formar pupas entre los estadios P12 y P15. Las pupas se pesaron como se mencionó antes para las moscas adultas.

6.5 Análisis de alas

Las alas se separaron de moscas anestesiadas con CO₂, se colectaron en etanol absoluto y se montaron en un portaobjetos con una solución de ácido láctico:etanol (6:4). Una vez montadas, se examinaron en un microscopio compuesto. Las mediciones de la superficie del ala y el área de los fragmentos de venas ectópicas se realizaron manualmente con la ayuda del software IPLab. Para

la determinación de la densidad celular, se contaron el número de células (representadas por tricomas o pelos) presentes en una región entre las venas L3 y L4. La densidad se calculó dividiendo el número de células entre el área de la región seleccionada (0.0298 mm²). Para determinar el número total de células por ala, se contaron manualmente las células en toda la superficie del ala usando el software ImageJ.

6.6 Análisis de ojos

6.6.1 Microscopía electrónica de barrido

Las moscas se anestesiaron en frío, se montaron y orientaron en una base de aluminio con adhesivo y pintura de carbón. Para obtener las imágenes de los ojos se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL 1010 en condiciones de alto vacío y con un voltaje de aceleración de 20 KeV. Los ojos, colocados de forma perpendicular al haz de electrones, se digitalizaron a 230X. Las imágenes digitalizadas se utilizaron para medir el área del ojo y el conteo del número de omatidios se realizó con el software ImageJ.

6.6.2 Histología

Las moscas se anestesiaron con CO₂ y se decapitaron. Las cabezas se seccionaron en dos por un corte sagital y se fijaron en 2% glutaraldehído, 1% OsO₄ en buffer de cacodilato 1X (50 mM, pH 7.4) durante 30 minutos sobre hielo. Se fijaron nuevamente en una solución de 2% de OsO₄ en buffer de cacodilato 1X durante 2 horas en hielo. Posteriormente se eliminó el OsO₄ y las cabezas se deshidrataron en una serie de soluciones de acetona. La acetona absoluta se reemplazó por una solución de Spurr:acetona (1:1) toda la noche a temperatura ambiente. Después, la mezcla se sustituyó por Spurr puro por al menos 4 horas a temperatura ambiente para permitir el infiltrado de la resina en el tejido. Las cabezas se orientaron en moldes de plástico con Spurr fresco. Los moldes se incubaron a 60-65°C por 70 horas para permitir la solidificación de la resina. Los

ojos incluidos en la resina se seccionaron tangencialmente con cuchillas de vidrio en un microtomo (Leica RM2265). Se realizaron cortes de 1 μm de ancho, que se recuperaron en portaobjetos y se tiñeron con una solución de azul de toluidina al 0.15% por cerca de 30 segundos. Finalmente, las preparaciones se montaron en Entellan (Electron Microscopy Sciences) y se observaron en un microscopio compuesto. Se controló que las secciones utilizadas para el análisis de los fotorreceptores tuvieran menos de 150 omatidios; debido a que en cortes tangenciales de ojo con este número de omatidios los cortes presentan el rabdómero del R7, ya que éste se localiza por arriba del R8. Cortes con más omatidios, es decir, más profundos, incluyen rabdómeros del R8 (Thackeray, J. comunicación personal).

6.7 Construcciones de rescate *s/*

Las cepas transgénicas que contienen una serie de construcciones de *s/* se obtuvieron de un colaborador (J. Thackeray, Clark University, USA). Las construcciones con *s/* silvestre se generaron a partir de un fragmento de 10 kb de DNA genómico que incluye la unidad transcripcional completa de *s/* y que llamamos X10. El fragmento X10 se modificó para generar una sustitución del aminoácido R619 por A (R619 es un aminoácido crítico para la función del dominio N-SH2) o para generar una sustitución del R726 por A (R726 es un aminoácido crítico para la función del dominio C-SH2) (Marengere y Pawson, 1992). Estas versiones modificadas de X10 fueron producidas por mutagénesis dirigida utilizando el Quikchange kit (Stratagene). Se evaluó la capacidad de las construcciones *s/* para rescatar los fenotipos de las mutantes *s^l*.

6.8 Análisis estadístico

Los datos se presentan como un promedio del número n de experimentos realizados junto con su respectivo error estándar. La n está indicada en cada caso. Se utilizó la prueba de *t de student* para determinar la presencia de diferencias significativas entre parejas de grupos de datos (experimentales *versus* controles). La p obtenida está indicada para cada caso.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Expresión de *s/* durante la embriogénesis

El transcrito del gen *s/* que codifica para la PLC- γ , está presente durante todas las etapas del desarrollo embrionario. En las etapas más tempranas se observa poca expresión posiblemente originada del gen materno (Fig. 8A). Durante la celularización la expresión de *s/* es intensa; es aquí donde la expresión cigótica se vuelve mayoritaria (Fig. 8B). Después de la gastrulación, cuando ocurre la invaginación del endodermo, se observa una clara expresión en la banda germinal, la cual está constituida por mesodermo y ectodermo (Fig. 8C). Este patrón continúa hasta la retracción de la banda germinal (Fig. 8D). En las etapas finales se observa un nivel alto de expresión en el intestino medio (Fig. 8E y 8F).

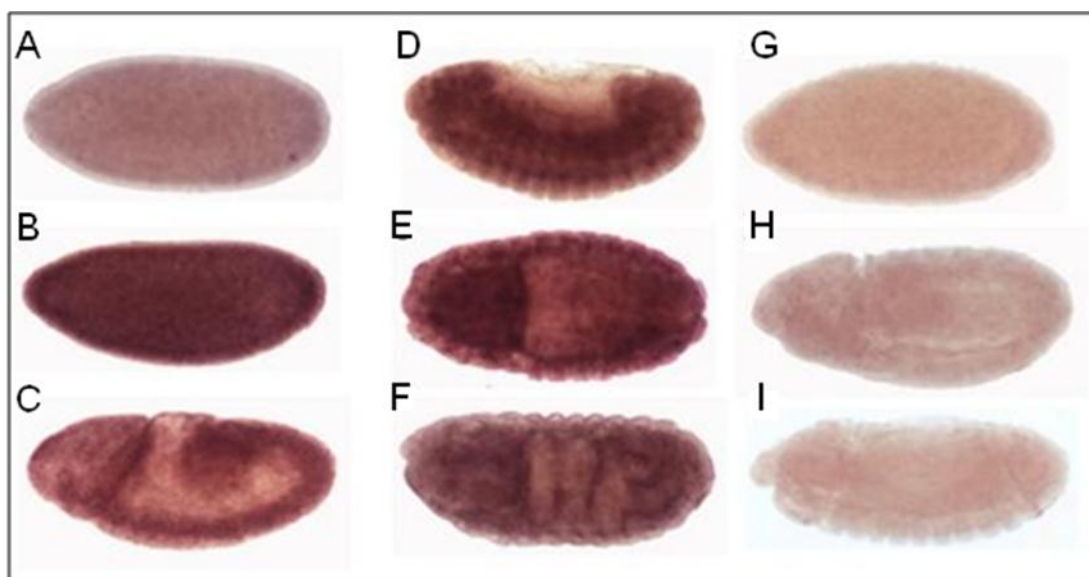


Figura 8. Distribución espacio-temporal del mRNA de la PLC- γ durante la embriogénesis en *Drosophila*. Embriones en etapas tempranas del desarrollo (A,B); en etapa de extensión de la banda germinal (C); en etapa de retracción de la banda germinal (D); en etapa posterior al cerrado dorsal (E); en la etapa final del desarrollo (F). Controles negativos: embriones incubados con la sonda sentido en etapa temprana del desarrollo (G); de extensión (H) y de retracción de la banda germinal (I).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Emori et al. (1994) y, dado que los mutantes nulos del *locus* son viables (Thackeray et al., 1998), se sugiere que la PLC- γ tiene una función no esencial durante la embriogénesis.

7.2 Expresión de *sl* en discos imagales

Debido a que mutaciones en *sl* comprometen el desarrollo del ojo y del ala, determinamos la presencia del transcrito en los discos imagales respectivos. Estos discos llevan a cabo procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular para dar origen a las estructuras correspondientes en el adulto. En el disco imagal del ala, el transcrito se encuentra únicamente en la porción que dará lugar a la parte ventral del ala adulta (Fig. 9B). Esta distribución no explica claramente la presencia de alas pequeñas en las mutantes ya que tanto la superficie ventral como la dorsal son menores. Sin embargo, sugiere que deben existir procesos de comunicación intercelular entre el dominio dorsal y el ventral del ala que permitan mantener las proporciones entre estos compartimentos. Recientemente se ha reportado que si se induce genéticamente una reducción en tamaño de un compartimento, el otro es afectado en proporciones similares, sugiriendo la existencia de un sistema compensatorio que permite que el ala adulta mantenga sus proporciones (Mesquita et al., 2010). Por otra parte, en el disco de ojo observamos que el transcrito está presente principalmente en el surco morfogenético (Fig. 9D y 9D'). El surco morfogenético es la estructura donde se inicia la diferenciación de las células fotorreceptoras. Este patrón de expresión en el disco de ojo, en conjunto con los defectos en los fotorreceptores observados en las mutantes *sl* (Thackeray et al., 1998), sugiere que la PLC- γ tiene una función durante la diferenciación celular en el desarrollo del ojo. También existe expresión del transcrito de *sl* en la porción del disco imagal de ojo-antena que dará origen a la antena, aunque no se han descrito defectos en esta estructura debidos a la falta de *sl*.

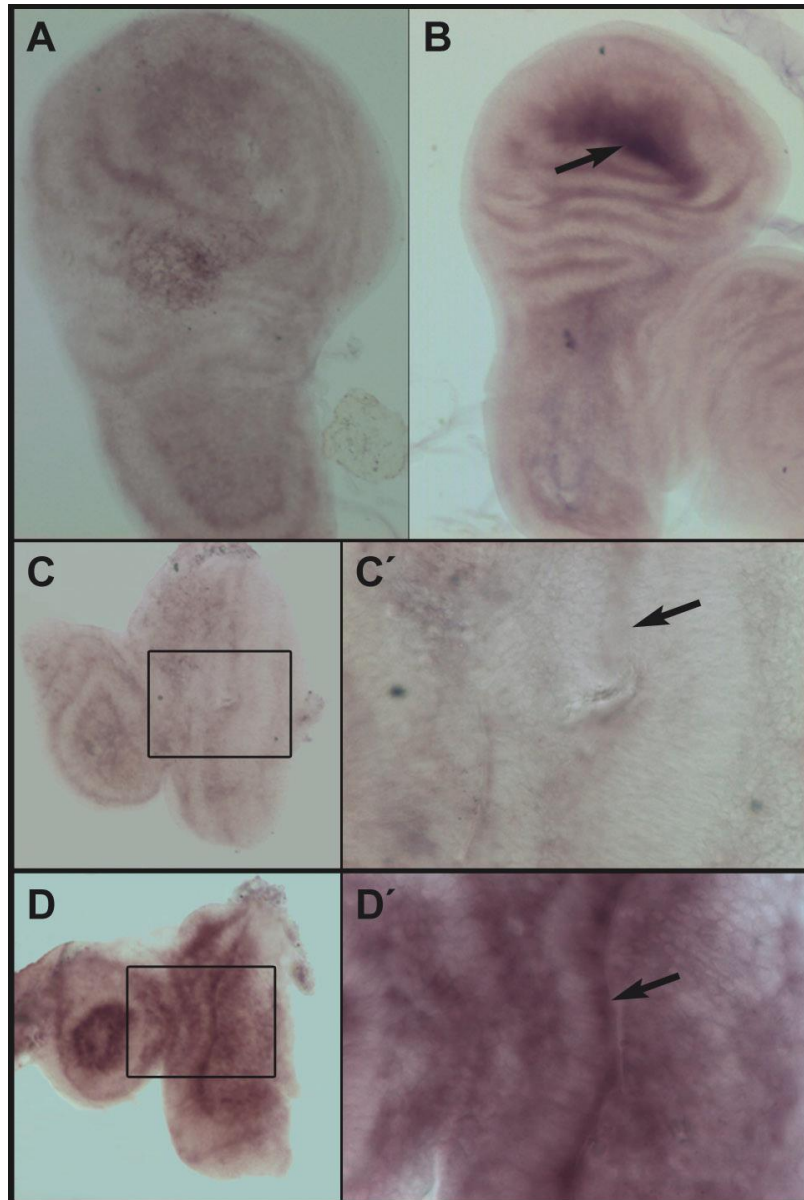


Figura 9. Distribución espacial del mRNA de la PLC- γ en discos imagales de ala y de ojo-antena de tercer estadio larvario. Discos imagales de ala (B) y de ojo-antena (D) incubados con la sonda antisentido. (D') Acercamiento del recuadro en D. El mRNA se observa en el compartimento ventral del ala (flecha en B) y en el surco morfogenético (flecha en D'). Controles negativos: discos imagales de ala (A) y de ojo-antena (C) incubados con la sonda sentido. (C') Acercamiento del recuadro en C.

Los resultados y la discusión continúan como parte del artículo titulado “Insulin Receptor-Mediated Signaling via Phospholipase C- γ Regulates Growth and Differentiation in *Drosophila*”.

7.3 Artículo

OPEN ACCESS Freely available online



Insulin Receptor-Mediated Signaling via Phospholipase C- γ Regulates Growth and Differentiation in *Drosophila*

Juan M. Murillo-Maldonado¹, Fouad Bou Zeineddine², Rachel Stock², Justin Thackeray², Juan R. Riesgo-Escovar^{1*}

¹ Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla, Querétaro, Querétaro, México, ² Biology Department, Clark University, Worcester, Maine, United States of America

Abstract

Coordination between growth and patterning/differentiation is critical if appropriate final organ structure and size is to be achieved. Understanding how these two processes are regulated is therefore a fundamental and as yet incompletely answered question. Here we show through genetic analysis that the phospholipase C- γ (PLC- γ) encoded by *small wing* (*sl*) acts as such a link between growth and patterning/differentiation by modulating some MAPK outputs once activated by the insulin pathway; particularly, *sl* promotes growth and suppresses ectopic differentiation in the developing eye and wing, allowing cells to attain a normal size and differentiate properly. *sl* mutants have previously been shown to have a combination of both growth and patterning/differentiation phenotypes: small wings, ectopic wing veins, and extra R7 photoreceptor cells. We show here that PLC- γ activated by the insulin pathway participates broadly and positively during cell growth modulating EGF pathway activity, whereas in cell differentiation PLC- γ activated by the insulin receptor negatively regulates the EGF pathway. These roles require different SH2 domains of PLC- γ , and act via classic PLC- γ signaling and EGF ligand processing. By means of PLC- γ , the insulin receptor therefore modulates differentiation as well as growth. Overall, our results provide evidence that PLC- γ acts during development at a time when growth ends and differentiation begins, and is important for proper coordination of these two processes.

Citation: Murillo-Maldonado JM, Zeineddine FB, Stock R, Thackeray J, Riesgo-Escovar JR (2011) Insulin Receptor-Mediated Signaling via Phospholipase C- γ Regulates Growth and Differentiation in *Drosophila*. PLoS ONE 6(11): e28067. doi:10.1371/journal.pone.0028067

Editor: Efthimios M. C. Skoulakis, Alexander Flemming Biomedical Sciences Research Center, Greece

Received: July 11, 2011; **Accepted:** October 31, 2011; **Published:** November 21, 2011

Copyright: © 2011 Murillo-Maldonado et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (grants # 81864 and 46133), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) to JRR-E (IN201707) and by the National Institutes of Health (NIH) awarded to J.T. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: juanriesgo@prodigy.net.mx

Introduction

During development, proper coordination of growth, proliferation, and cellular differentiation is critical for appropriate final organ structure and size. These processes involve signal transduction cascades that determine the spatial and temporal pattern of cellular instructions. Many of these signaling pathways are activated by growth factors via receptor tyrosine kinases (RTKs). In vertebrates, phospholipase C- γ (PLC- γ) is required by some RTKs to regulate these cellular processes. PLC- γ is an intracellular enzyme activated by a multistep process; the initial step involves membrane association via RTKs (or non-receptor tyrosine kinases) through an SH2 (Src-homology 2) domain in PLC- γ with a phosphotyrosine residue in the intracellular domain of the activated receptor. Following this binding, PLC- γ is phosphorylated by the RTK on one or more tyrosines and then catalyzes the hydrolysis of the membrane phospholipid phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PIP₂), generating two intracellular messengers: inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG). IP₃ promotes the release of Ca²⁺ from intracellular stores, via its association with the inositol triphosphate receptor (IP₃R), while DAG, together with Ca²⁺, activates protein kinase C (PKC) [1,2,3,4].

In *Drosophila melanogaster*, a single PLC- γ gene has been identified, encoded by the locus *small wing* (*sl*) [5]. The mRNA is expressed throughout development, with overall expression

highest during embryogenesis [6]. Surprisingly, given this early expression, a large fraction of homozygotes reach adulthood; homozygous *sl* null mutants are recovered, and are viable and fertile. Yet, *sl* homozygotes do have developmental defects: their eyes have a mildly rough phenotype, due to some ommatidia containing one or more extra R7 photoreceptor cells, and their wings are smaller than wild type and contain patches of ectopic veins [5]. These phenotypes indicate that *sl* is involved in regulating differentiation of R7 photoreceptor cells and wing veins, as well as growth control in the wing.

Genetic experiments suggest that the extra R7 photoreceptor phenotype results from over activation of the MAPK cascade, showing that *sl* is a negative regulator of this pathway during photoreceptor development [5]. *sl* was also identified in a cell-based RNAi screen for loss-of-function phenotypes that inhibit endoplasmic reticulum (ER) accumulation of processed Spitz (Spi), which is an EGF receptor ligand [7]. This suggests that the *sl*-encoded PLC- γ participates in a Spi retention mechanism in the ER. Genetic rescue experiments indicate that *sl* is required specifically in cells processing the ligand (a non-cell autonomous effect), as demonstrated by the rescuing capacity in *sl* mutant flies of wild type *sl* expression in R8 photoreceptor cells only [7]. Taken together, these results suggest that *sl* inhibits the MAPK pathway through controlled retention of Spi in the ER of R8 cells in developing compound eyes.

Nevertheless, other questions remain. What is the mechanism by which SI regulates these different processes (growth, differentiation), and how is SI itself activated? Do other RTKs activate SI, as is the case for PLC- γ in vertebrates? Besides the EGF receptor, an interesting additional RTK candidate for SI activation is the insulin receptor, because the insulin pathway regulates growth and cellular proliferation in all tissues in *Drosophila* [8]. Most notably, this pathway was recently shown to be involved in controlling the timing of differentiation by modulating EGF/MAPK target genes in developing photoreceptors [9].

Here, we show that SI stimulates growth. We use the wing to show through genetic experiments that together with the insulin and EGF/MAPK pathways and in a manner dependent on components downstream of SI such as the IP₃R and Pkc53E, SI stimulates cellular growth. Also, in the developing wing and eye, SI activated by the insulin receptor inhibits MAPK signaling and thus cellular differentiation in a manner again dependent on PLC- γ signaling downstream components, such as the IP₃R. We also show that PLC- γ genetically interacts with Star and Rhomboid, suggesting modulation of the processing of the EGF ligand Spitz as an avenue of SI function in all these different phenotypes.

Finally, we also show that the C-SH2 and N-SH2 domains individually are not required for cellular growth, whereas only the N-SH2 domain is required for patterning/differentiation.

Results

SI modulates cellular growth in the wing

Wings from *sl*¹ and *sl*² mutants were previously shown to be reduced in length by about 20% [5]; although these are not null alleles, they are strong hypomorphs. We compared wild-type and *sl* mutant wings and found that the area of the wing blade is also reduced by 20% (Fig. 1A, B, C). To determine whether this phenotype results from a reduction in growth or cellular proliferation, we determined cell density in an area between veins 3 and 4 in the wing (Fig. 1A and 1B). Mutant wings showed significantly higher cell density than wild-type wings (mean of 8653 and 7106 cells/mm², respectively; Fig. 1A', 1B' and 1D), indicating that the mutant wing blade cells are 21% smaller than wild-type. This means that the reduced area of the wing can be fully explained by a reduction in cell size. Consistent with this model, we found that the number of cells in wild-type and *sl* mutant wings is not significantly different (Fig. 1E). This demonstrates that SI normally acts to stimulate cell growth in the wing, but does not affect cell proliferation in this tissue.

To determine how SI stimulates cell growth, we examined the effects of reductions in gene dosage in the EGF/MAPK and insulin signaling pathways on the size of *sl* mutant wings, since both the MAPK [10] and insulin pathways [8] have been shown to regulate growth in the wing. The EGFR has multiple ligands: Spitz (Spi) and Vein (Vn) are activating ligands, whereas Argos (Aos) is inhibitory. Once activated, the EGFR binds to a cytoplasmic scaffold protein, Daughter of sevenless (Dos), and to an adaptor protein, Downstream of receptor kinase (Drk), which leads to the membrane translocation of the guanine nucleotide exchange factor Son of sevenless (Sos). There, Sos favors exchange of bound GDP for GTP in Ras85D, and that, in turn, leads to activation of the MAPKKK Pole hole (Phl; also known as Raf1), which in turn activates the Downstream of raf1 (Dsor1) MAPKK; activated Dsor1 then activates Rolled (Rl), the *Drosophila* MAPK [10]. All mutant *sl*² flies heterozygous for mutations in MAPK pathway components tested have a small but significant further reduction in the area of the wing blade compared to *sl*² mutants (Fig. 2A).

In the insulin pathway, the activated insulin receptor (Inr) binds to the cytoplasmic substrate Chico (a *Drosophila* homolog of IRS), which leads to the activation of the lipid kinase phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and, further downstream, the ser/thr kinase protein kinase B (PKB, also referred to as Akt1) [11]. Mutant *sl*² flies heterozygous for mutations in *Inr* and *Dp110* (the catalytic subunit of PI3K) showed a similar effect to mutations in genes of the MAPK pathway (Fig. 2B). In contrast, *sl*² flies with a mutation in *PKB* have bigger wings than *sl*² alone, suggesting a negative feedback loop on pathways stimulating cellular growth in this context. Taken together, these data indicate that SI normally participates with the EGF/MAPK and insulin pathways as a positive mediator of cell growth in the wing.

PLC- γ catalytic activity generates IP₃ and DAG by PIP₂ hydrolysis, leading to modulation of Ca²⁺ release by IP₃ receptors and PKC activation. In order to study PKC involvement, we characterized a mutation in one of the fly homologs of PKC, *PKC53E*. *PKC53E* mutants are homozygous viable and fertile, yet have a reduction in wing size of 11.5%, similar to *sl* mutants; by contrast, *PKC53E* heterozygotes have wild-type wings (Fig. S1A). We therefore tested whether the *PKC53E* growth phenotype can be tied to known PLC second messengers. In an *sl* mutant background, reduced gene dosage of *IP3R* or *PKC53E* produced further reductions in wing size (Fig. 2C). In the same *sl* mutant background, heterozygosity for a mutation in *Rack1*, a gene that encodes an scaffold protein for various signaling molecules including PKC [12], generated a similar effect (Fig. 2C). These results are consistent with the idea that the cell growth defect in *sl* mutants operates via the classic PLC second messengers IP₃ and DAG, with a concomitant effect on PKC.

Further downstream, we sought to investigate whether processing of Spitz is required for *sl* dependent wing growth, as SI has been shown to participate in a Spi retention mechanism in the ER during eye development [7]. To do so, we evaluated the function of *rhomboid* (*rho*), which encodes a Golgi membrane protease that cleaves the inactive, membrane bound Spi precursor to generate mature, secretable Spi [13]; *Star* (*S*), which encodes a type II transmembrane protein involved in trafficking Spi from the ER to the Golgi [13,14], and *spi* itself. Flies heterozygous for mutations in these three genes in an *sl*² mutant background indeed showed greater reductions in wing size than solely *sl*² mutant flies (Fig. 2). Heterozygosity for *spi* in an *sl* mutant background gave the biggest reduction of all tested interactions: wings were reduced a further 65% assuming *sl*² reduction as 100%, while heterozygosity for *IP3R*, *PKC53E*, *Rack1*, *rho* and *S* gave reductions between 10 and 45%. This suggests that SI regulates cellular growth in the wing by positively modulating Spi processing. Heterozygosity for *aos* and *vm* also gave further reductions in wing size, indicating their involvement in modulating MAPK pathway activity by *sl* (Fig. 2A).

We repeated some of these genetic interactions with the molecular null allele *sl*⁰. We found that mutations in the MAPK and insulin pathways, as well as in the *IP3R*, do not modify the wing size of *sl*⁰ mutant flies (Fig. 2D). As *sl*⁰ is a molecular null, this means that at the time of SI function, the MAPK/insulin pathways regulate wing size solely through SI-dependent avenues.

SI has a broad role in cell growth

Since SI normally acts to stimulate cellular growth in the wing, we wondered whether it plays a similar role in other tissues. As *sl* mutant eyes have extra R7 photoreceptor cells, indicative of *sl* function there [5], we sought to investigate whether growth phenotypes are present in this structure as well. We found that indeed, the area of the eye in *sl*⁰ homozygotes is reduced by about 8% compared to wild-type controls ($p < 0.002$; Figs. 3A, B, C).

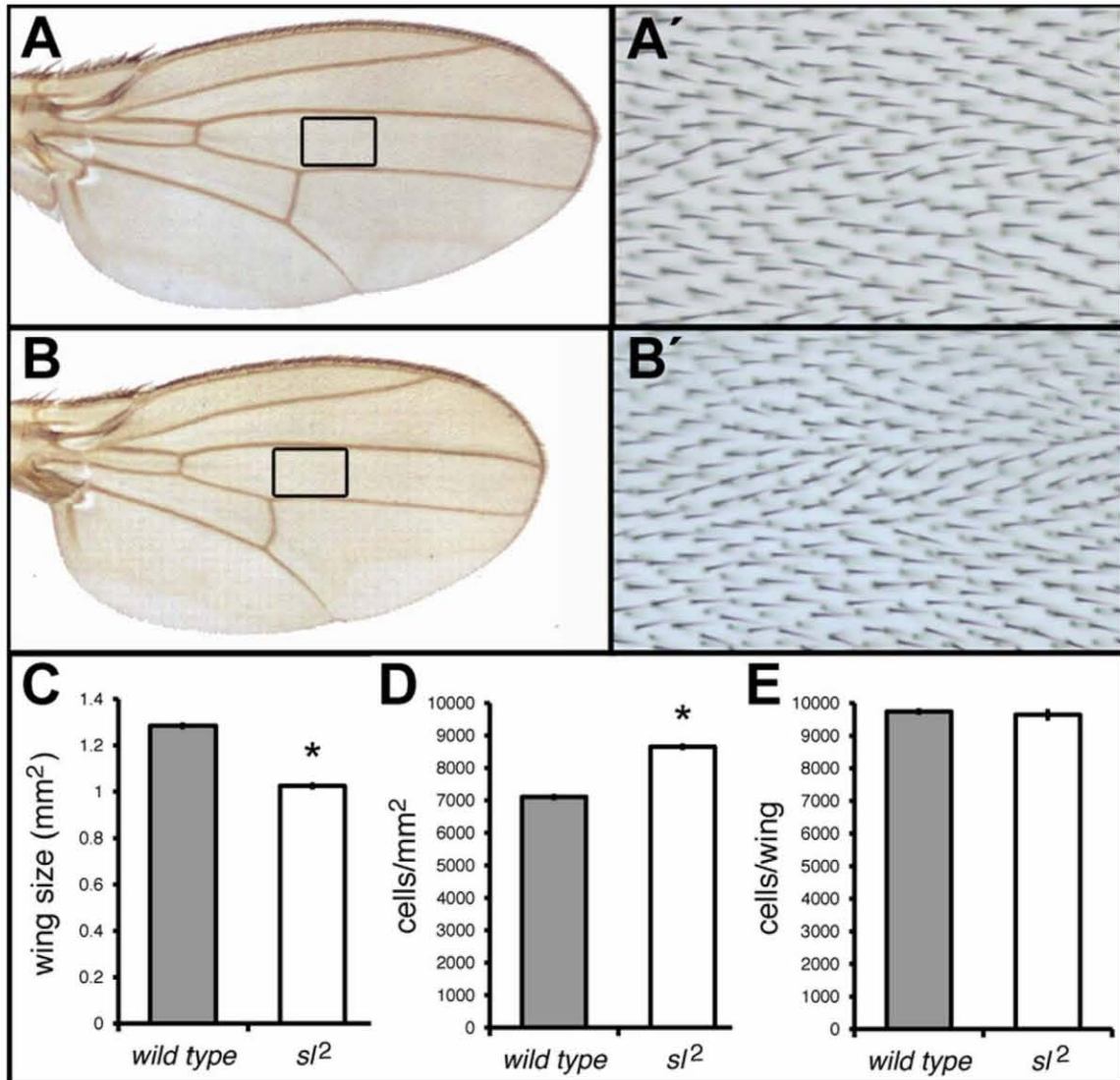


Figure 1. Wing phenotype of *sl*² mutants compared to ORR (Oregon R) controls. Only male flies were used in this and subsequent figures unless otherwise noted. (A) Wild type wing. (A') shows a higher magnification of boxed area in (A), illustrating the wing region used to determine cell density. (B) *sl*² mutant wing. (B') shows an amplification of boxed area in (B), used to determine cell density. (C) Histogram showing the reduced mutant *sl*² wings area. n = 100. (D) Histogram showing an increase in cell density in *sl* mutant wings. n = 100. (E) Histogram showing the averages of total number of cells of complete wing surfaces. n = 5. *sl*² and ORR do not differ significantly. **p* < 0.001; error bars represent SEM. doi:10.1371/journal.pone.0028067.g001

This reduction can largely be explained by a 9% reduction in the number of ommatidia, as we found a mean of 765 ommatidia in wild-type controls compared to only 698 in *sl*² homozygous eyes (*p* < 0.0001; Fig. 3D).

Given that *sl* mutants show smaller cells in the wing, we also tested whether there might also be a cell size change in the eye, using the FLP-FRT system to generate mutant clones in otherwise wild-type tissue. Because loss of *sl* results in the recruitment of additional R7 photoreceptors [5], we compared the combined area of the rhabdomeres in R1–R6 photoreceptor cells between adjacent *sl*²/+ and *sl*² mutant patches. We found that this area was

reduced in mutant patches by an average of 15.2% compared to adjacent *sl*²/+ patches in the same section (Figs. 3E and 3F).

If *Sl* is involved more globally in growth control we might expect to see a change in the overall size of the fly, as observed for mutations in the insulin signaling pathway [8]. One way in which this might be manifest is in the animal's mass. We compared two-day-old *sl*² homozygous females with sibling *sl*² heterozygotes and found the mutants are about 8% lighter: 1.29 ± 0.019 mg compared to 1.41 ± 0.017 mg. This difference is highly significant (*p* < 0.001; *n* = 70 per genotype; mean \pm SEM). We also evaluated pupae using the same genotypes, measuring both pupal length

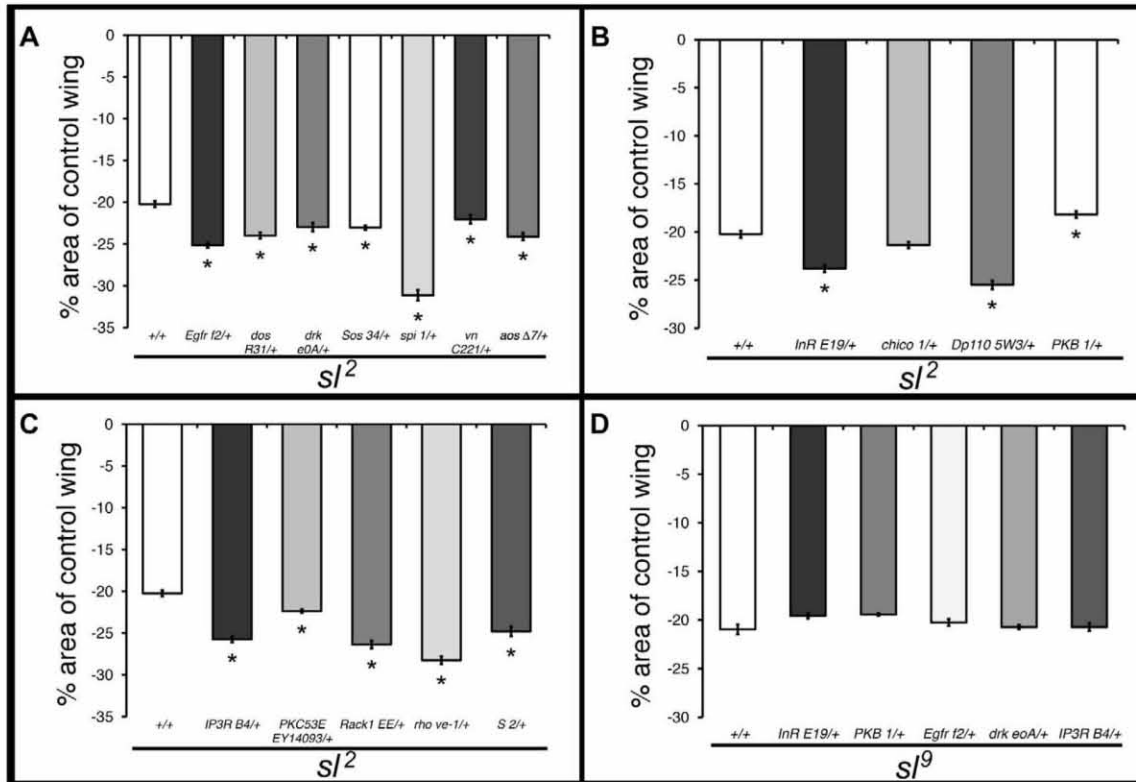


Figure 2. Reduced gene dosage of MAPK and insulin pathway genes on s/l mutant wings. Heterozygous mutant conditions for EGF/MAPK (A) and insulin (B) signaling genes, and genes downstream of SI (C) change the s/l^2 mutant wing size. Histogram in (D) shows the effects on s/l^9 mutant wing size of heterozygosity for genes of the insulin and MAPK pathways and of the IP_3R . $n = 100$ in all cases, * $p < 0.001$; error bars represent SEM. In this and subsequent figures showing genetic interactions, tests were done with hemizygous s/l^2 or s/l^9 males and heterozygous or wild type for the genes tested unless otherwise noted.
doi:10.1371/journal.pone.0028067.g002

[15,16] and weight of stage 12–15 pupae. There were no significant differences (3.16 ± 0.01 mm for s/l^2 homozygotes to 3.14 ± 0.009 mm for s/l^2 heterozygotes measuring pupal longest axis, and 1.446 ± 0.012 mg for s/l^2 homozygotes, to 1.464 ± 0.012 mg for s/l^2 heterozygotes. $n = 73$ for s/l^2 homozygotes, and $n = 79$ for s/l^2 heterozygotes; mean \pm SEM). These analyses show that SI plays a more general role in the promotion of cell growth, beyond the one classically described in the wing.

Insulin receptor via SI inhibits wing vein differentiation

s/l^2 mutant flies sometimes show small ectopic wing veins, indicating an excess of cellular differentiation [5]. Vein differentiation in the wing is regulated by various pathways, including the EGF/MAPK, amongst others [review in 17,18]. We found that reductions in gene dosage of most MAPK pathway genes tested partially rescued the ectopic vein phenotype of s/l^2 mutant wings, indicating that the ectopic veins are a result of over activation of MAPK signaling, the exceptions being *aos* and *spi*. Consistent with its role as an EGFR inhibitory ligand, heterozygosity for *aos* significantly augmented the ectopic vein s/l phenotype, strongly implying AOS in the regulation of vein differentiation. In contrast, heterozygosity for *spi* had no significant effect, indicating that for vein differentiation Vn, rather than Spi, is critical (Fig. 4A).

s/l^2 mutant flies heterozygous for mutations in the insulin pathway show no consistent change in the ectopic veins phenotype of s/l^2 wings; one shows a significant increase (*InR*), one shows a significant decrease (*Dp110*) and two others (*chico* and *PKB*) are unchanged (Fig. 4B). Given that the *sl*-encoded PLC- γ requires the insulin receptor to regulate cell differentiation in the wing, but the pathway downstream of the receptor may not be the standard one described in other contexts.

To explore further the possibility of a role for insulin signaling in wing vein formation we examined viable heteroallelic combinations of both *InR* and *PKB* (*InR*^{E19/313} and *PKB*^{1/3}). In each case we observed low percentages of wings with small ectopic vein-like patches (12.7%, $n = 79$ for *InR* and 8% $n = 87$ for *PKB*), confirming their participation in vein differentiation (Fig. 4C and 4D).

We wondered whether the excess vein differentiation in the s/l mutants occurs via the canonical downstream PLC effectors, so we determined the effect of changes in dosage of some of these. Heterozygosity for mutations in the *IP3R* and *Rack1* significantly increased the ectopic vein area in s/l^2 mutant wings; in addition, we observed a dramatic increase in the vein phenotype when the dosage of *PKC53E* was reduced in an s/l^2 mutant background (Fig. 4E). This is consistent with a previous report describing

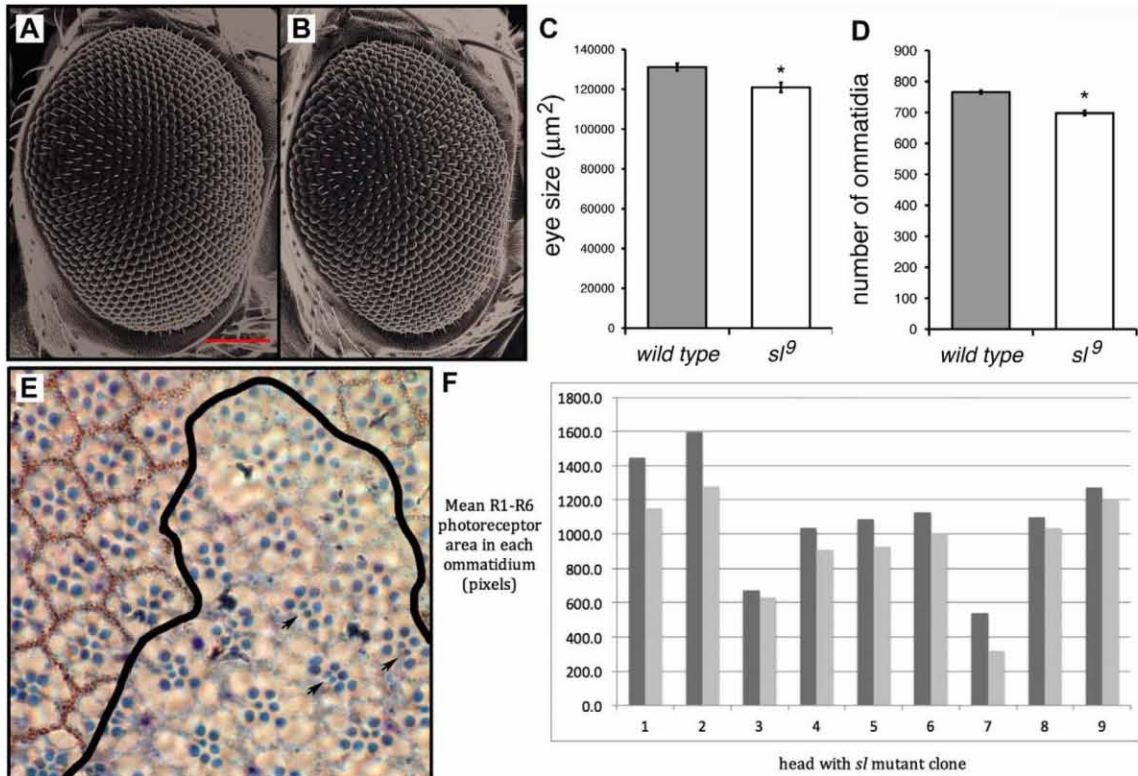


Figure 3. *Sl* affects eye size. Images in (A, B) are SEMs of control (A; Canton S) and (B) *sl^l* homozygote female flies. Notice mild roughness of *sl^l* mutant eye; red bar in A is 100 μm. (C) Average areas of whole eyes of control (Canton S) and *sl^l* homozygotes. Areas are expressed in μm²; n = 18 for Canton S and 16 for *sl^l*. (D) Average number of ommatidia in eyes of Canton S and *sl^l* homozygotes (n = 13 for both Canton S and *sl^l*). Digitized images of eyes were used for measurements in (C) and (D), and in both cases differences are significant at p < 0.002 (C) and p < 0.0001 (D). (E) Plastic section through an eye containing a *y w sl^l* homozygous clone, marked by the absence of red pigment surrounding the ommatidia; a black line indicates the approximate edge of the mutant clone. Three ommatidia showing the extra R7 photoreceptors characteristic of *sl* mutants are indicated by arrows. (F) A comparison of *sl^l* and *sl* mutant tissue in nine heads (each pair of bars represents data from an individual head; dark grey bars represent wild-type cells, light grey bars represent cells in mutant patches). The area of R1–R6 rhabdomeres was determined in three to fifteen pairs of nearby ommatidia in each head, each pair consisting of one *sl^l* (*w⁺*) ommatidium and one *sl^l* homozygous (*w⁻*) ommatidium. doi:10.1371/journal.pone.0028067.g003

ectopic expression of the PKC53E kinase domain, suggesting that PKC53E regulates vein differentiation in the wing [19]. In agreement with this finding, we found that flies homozygous for a hypomorphic allele of *PKC53E* also show ectopic veins (Fig. S1B), even if surveyed in an *sl^l* background. This argues that function of this PKC homolog, PKC53E, is particularly important for vein formation.

As mentioned earlier, the mechanism by which *Sl* affects R7 photoreceptor differentiation is proposed to be via its involvement in ER retention of the EGF ligand Spitz, in a pathway that also involves Rho and Star [7]. Does the same mechanism operate in the wing? We found that heterozygosity for mutant alleles of *rho* and *Star*, but not *spz*, increased the vein phenotype of *sl^l* mutants (Fig. 4E), suggesting a Spi-independent role for Rho and Star in modulation of vein differentiation, perhaps by their involvement in the processing of a MAPK pathway ligand other than Spi, such as Keren.

We looked at some of the same interactions with the null allele *sl^l* and found that mutations in the MAPK and insulin pathways in general, as well as in the *IP₃R*, affect the extent of ectopic vein

territory in *sl^l* mutant flies in a similar fashion to that seen in *sl²* mutants (Fig. S2). Because a further increase in severity of the wing vein phenotype can be seen in *sl^l*, this indicates that *Sl* is not the only avenue of vein differentiation modulation by insulin signaling. *IP₃R* activity is also required independent of *Sl*, most likely regulated by cytoplasmic calcium concentrations as the *IP₃R* is known to be regulated by calcium [20], and this could account for the exacerbation of the ectopic vein phenotype in an *sl^l* null mutant background. Taken together, these results confirm a previously unrecognized role for insulin receptor signaling in differentiation and imply that there are both *Sl*-dependent and *Sl*-independent ways of regulating vein differentiation by insulin signaling in the wing.

Insulin receptor participates in R7 photoreceptor differentiation via *Sl*

sl mutant flies have extra R7 photoreceptors in the eye, indicating that *Sl* normally inhibits cellular differentiation of this cell type [5]. A reduction in gene dosage of components of the MAPK pathway partially rescues the extra R7 photoreceptor

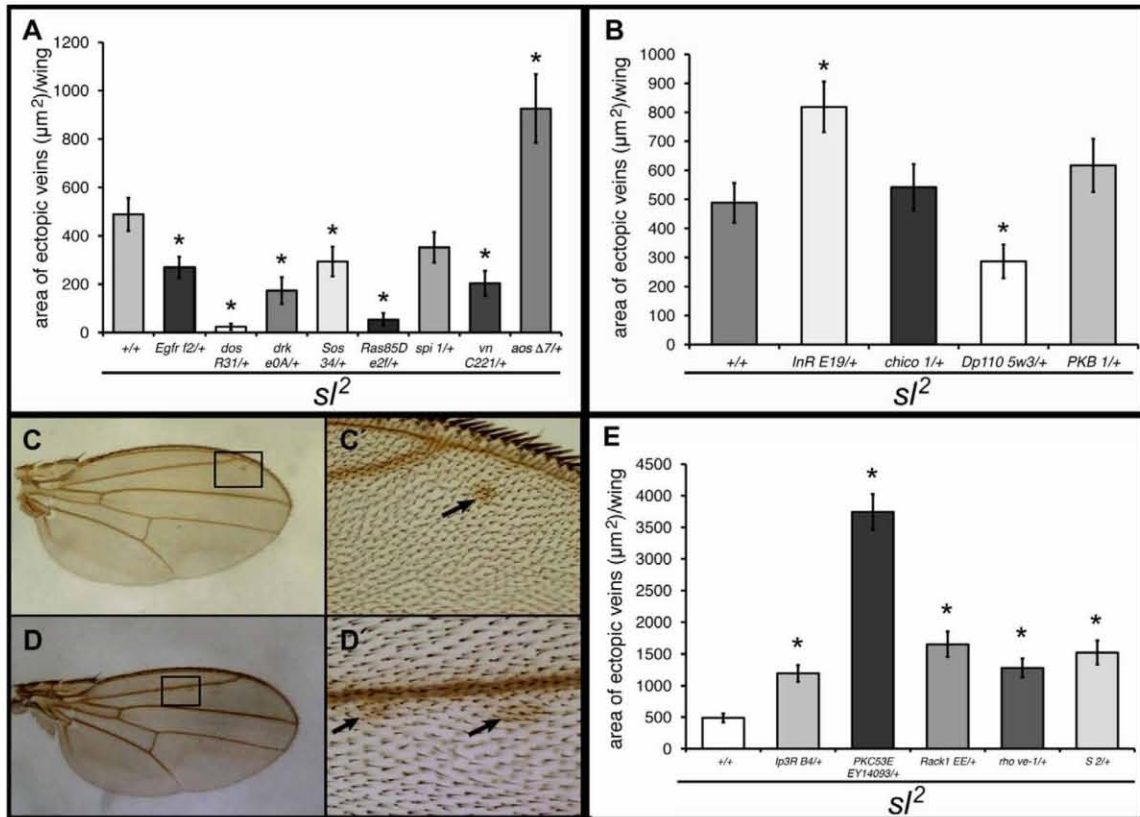


Figure 4. Reduced gene dosage of MAPK and insulin pathway genes on *sl*² ectopic wing veins. Shown are effects of heterozygous mutant conditions for EGF/MAPK (A) and insulin (B) pathway genes on the *sl*² ectopic vein phenotype. (C, D) show wings of heteroallelic mutant *InR*^{E19/315} (C) and *PKB*^{1/3} (D) flies with small ectopic vein-like patches. (C') and (D') show close-ups of boxed areas in (C) and (D), respectively. Arrows point to vein-like material present. As heterozygotes, neither *InR* nor *PKB* show ectopic wing vein-like material. (E) Effects of heterozygosity for *IP₃R*^{B4}, *PKC53E*^{EY14093}, *Rack1*^{EE}, *rho*^{ve-1} and *S2* on the extent of *sl*² ectopic wing veins. n = 100. *p < 0.001; error bars represent SEM. doi:10.1371/journal.pone.0028067.g004

phenotype in *sl* mutant flies ([5] and Figs. 5B and 5C), indicating that the differentiation defect, like the ectopic vein phenotype, is due to pathway over activation. The sole exception, of the genes tested, is *aos*. As expected, and consistent with its role as an EGFR inhibitory ligand, heterozygosity for *aos* in an *sl* mutant background resulted in a dramatic increase in the *sl* mutant extra R7 phenotype. Male *sl*²; *aos*^{Δ7}/+ eyes also have noticeably increased roughness (Fig. S3).

We examined next whether the insulin pathway is also involved in this process by analyzing the effect of heterozygous mutations in this pathway on the number of ommatidia with extra R7 cells in *sl*² mutant eyes. Similar to our findings with the ectopic wing vein phenotype, only heterozygosity for mutations in the insulin receptor itself showed a significant increase in the photoreceptor phenotype (Fig. 6B and 6C). The average number of R7 cells per ommatidium rose dramatically: from 1.25 ± 0.003 in *sl*² males to 1.89 ± 0.36 (n = 4–6 eyes, p < 0.002) for sibling *sl*² males with a copy of *InR*^{G25}. We found the same result with another hypomorphic allele of PLC-γ: *sl*¹ (Fig. S4A). The average number of R7 cells per ommatidium rose from 1.10 ± 0.037 in *sl*¹ males to 1.58 ± 0.038 (n = 5–7 eyes, p < 0.002) for sibling *sl*¹ males with a copy of *InR*^{G25}. By contrast, in an *sl*² background, the *InR* mutation did not increase the severity of the R7 phenotype (Fig.

S4B), but given that *sl*² is a molecular null, this result is expected if SI is the only avenue of modulation for the insulin receptor in the eye. This contrasts with the vein differentiation results, suggesting different modes of activity for SI in these processes. We also found that reduced dosage of *chico*, *Dp110* and *PKB* significantly decreased the extra R7 phenotype of *sl*² mutants (Fig. 6C).

Heterozygosity for a mutation in the *IP₃R* in an *sl*² mutant background showed an increase in the number of ommatidia with extra R7 cells (Fig. 6F), and in the number of R7 cells per ommatidium (Fig. 6E) (from 1.25 ± 0.003 in *sl*² males, to 1.76 ± 0.11 in sibling *sl*² males with a copy of *IP₃R*^{B4}, n = 5, p < 0.001). A similar effect was observed for the same *IP₃R* mutation in an *sl*¹ mutant background (Fig. S4B), indicating that the *IP₃R* regulates R7 differentiation in SI-dependent and SI-independent ways, as is the case for ectopic vein differentiation. Mutant *sl*² flies heterozygous for a mutation in *PKC53E* also showed a significant increase in the extra R7 photoreceptor phenotype (Fig. 6F). However, flies homozygous for a *PKC53E* mutation alone showed <1% of ommatidia with extra R7 cells (Fig. S1C); in contrast, about 50% of these mutant flies showed ectopic veins in the wing, indicating that this protein has an important role in the regulation of vein differentiation but not in R7 differentiation. In agreement with this, heterozygosity for

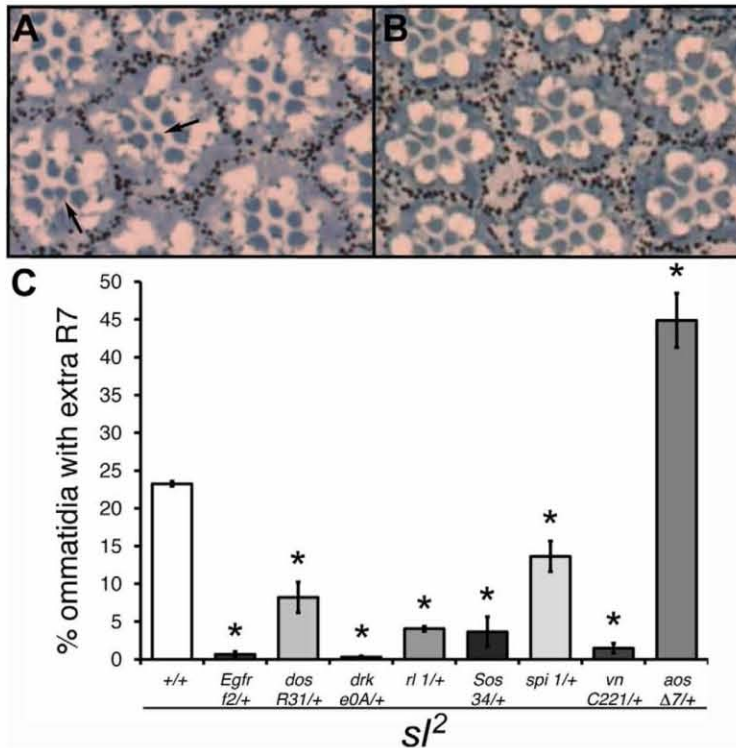


Figure 5. Reduced gene dosage of MAPK pathway genes on sl^2 R7 phenotype. Tangential sections of the distal part of eyes from sl^2 (A) and sl^2 heterozygous for Drk^{e0A} (B) flies, stained with toluidine blue. The arrows indicate extra R7 cells. (C) Histogram showing the effect of heterozygosity for mutations in genes of the MAPK pathway on extra R7 cells in sl^2 mutants. $n=5$ eyes each with ≤ 150 ommatidia per eye. $*p<0.001$; error bars represent SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0028067.g005

Rack1 did not modify the number of extra R7 cells in an sl^2 mutant background (Fig. 6F).

We found that heterozygosity for *rho* and *spi* mutant alleles produced a significant decrease in the extra R7 phenotype of sl^2 mutants, from 1.25 ± 0.003 in sl^2 to 1.09 ± 0.019 for sl^2 heterozygous for *rho* and to 1.13 ± 0.015 for sl^2 heterozygous for *spi* (Fig. 6F and 5C show these reductions as percentages). *S* mutations have a dominant phenotype in the eye; one of these is a discrete loss of R7 cells in S^2 (4.97 ± 0.42 percent of ommatidia without R7 cells or 0.95 ± 0.004 R7 cells per ommatidium). We examined whether this dominant phenotype could be modified in an *sl* mutant background, and found that in S^2 heterozygotes the R7 phenotype is not changed if also mutant for sl^2 (Fig. S5).

Overall, these data are consistent with a role for SI in a Spi retention mechanism in the ER in photoreceptor cells [7], suggesting that SI normally inhibits R7 differentiation by negatively modulating processing of Spi, which in turn modifies the strength of MAPK signaling. In summary, these results suggest that SI, activated by the insulin receptor, modulates photoreceptor differentiation via the IP₃R and PKC53E through negative regulation of the EGF/MAPK pathway ligands.

Role of SH2 domains in SI function

In order to study in more detail the relationship between SI and receptor tyrosine kinases (insulin and EGF receptors) in the wing and eye, we examined the role of the SI SH2 domains, which are

known to be involved in the binding of PLC- γ to RTKs in vertebrates. We generated *sl* genomic rescue constructs with either the N- or C-terminal SH2 domains carrying mutations that disable their function in other systems (Fig. 7A) [21,22]. Transgenic flies containing a wild type *sl* construct (X10), C-SH2 mutant (C-SH2) or N-SH2 mutant (N-SH2) constructs rescued the wing size defect in sl^2 mutants (Fig. 7B). However, while the wild type and C-SH2 mutant constructs rescued the ectopic veins and extra R7 photoreceptors phenotype, the N-SH2 mutant construct did not (Figs. 7C and 7D). These results are consistent with experiments in mammals, in which the two SH2 domains have differential roles in the binding and activation of PLC- γ by RTKs[21].

Discussion

SI modulates cellular growth in the wing

We show, by measuring cell density, that *sl* mutant wings have a reduction in cell growth but not cell proliferation. This defect is qualitatively similar to mutations in MAPK signaling; cells with homozygous mutations for members of this pathway have higher cell densities, suggesting smaller cells [10]. Of the several signaling pathways known to be involved in *Drosophila* wing growth [23], only the MAPK and insulin pathways are triggered by tyrosine kinase receptors that are likely to activate SI. Our results show that indeed both pathways are genetically linked to SI in promoting cell growth, probably acting in a concerted fashion; further molecular studies will be required to reveal the molecular mechanisms and

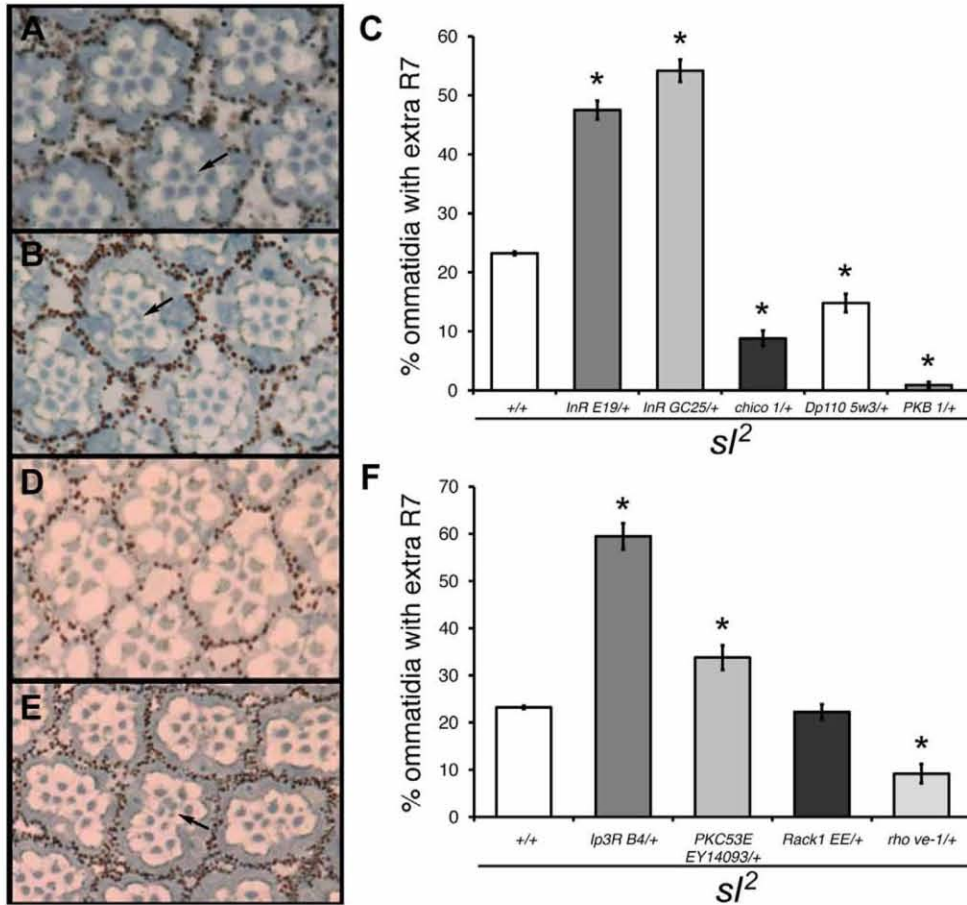


Figure 6. Reduced gene dosage of insulin pathway and downstream components on the *sl*² extra R7 phenotype. Tangential sections of the distal part of eyes from *sl*² (A) and *sl*² heterozygous for *InR*^{E19} (B) flies, stained with toluidine blue. Arrows indicate extra R7 cells. (C) Histogram showing the effect of heterozygosity for mutations in genes of the insulin pathway on the percentage of ommatidia with extra R7 cells in *sl*² mutants. n = 5 eyes each with ≤150 ommatidia per eye. **p*<0.001; error bars represent SEM. Tangential sections of the distal part of eyes from *sl*² (D) and *sl*² heterozygous for *lp3R*^{B4} (E) flies, stained with toluidine blue. Arrow indicates ectopic R7 cells. (F) Histogram showing the effect of heterozygosity for *lp3R*^{B4}, *PKC53E*^{EY14093}, *Rack1*^{EE} and *rho*^{ve-1} on the percentage of ommatidia with extra R7 cells in *sl*² mutants. n = 5 eyes each with ≤150 ommatidia per eye. **p*<0.001; error bars represent SEM. doi:10.1371/journal.pone.0028067.g006

physical interactions that allow this link. Sl signaling thus provides a means for coordinating growth by forming a regulatory link between the MAPK and insulin pathways. In this scenario, Sl activated by the insulin pathway would function by modulating MAPK output; that is to say, to reduce somewhat the levels of MAPK activity, but not to stop it, as no MAPK activity leads to no growth and cell death [10,24], and too much MAPK activity leads to ectopic differentiation and reduced growth (our results, and [7]) (Fig. 8A).

Sl modulates cellular growth in the eye

We found that Sl regulates cellular growth in the eye. Whole eyes are smaller, and the difference in size can be largely explained by the presence of fewer ommatidia. This means that *sl* mutant eyes very likely contain fewer cells, despite the fact that some ommatidia sport one or two extra R7 cells, as the number of cells missing due to reduced numbers of ommatidia is bigger than the

number of extra R7 cells present. This suggests either reduced proliferation or increased cell death in differentiating *sl* mutant eyes, and is different from the growth defect found in wings, yet consistent with a moderate requirement of MAPK output to promote growth and cellular survival.

We also surveyed whether mutant eye cells are smaller, in a situation where a direct comparison could be made between mutant and wild-type cells. By studying *sl* loss-of-function clones in the eye, we determined that *sl* mutant cells are smaller than neighboring wild-type cells. This growth defect is similar to that seen in wings, suggesting a more general growth regulation by Sl in different tissues, albeit in a situation where competition between cells of different genotype does take place.

Sl also has growth effects beyond the eye and wing

Not only is cell size reduced to a similar extent in both the eye and wing of *sl* homozygotes; we found that the adult animal as a

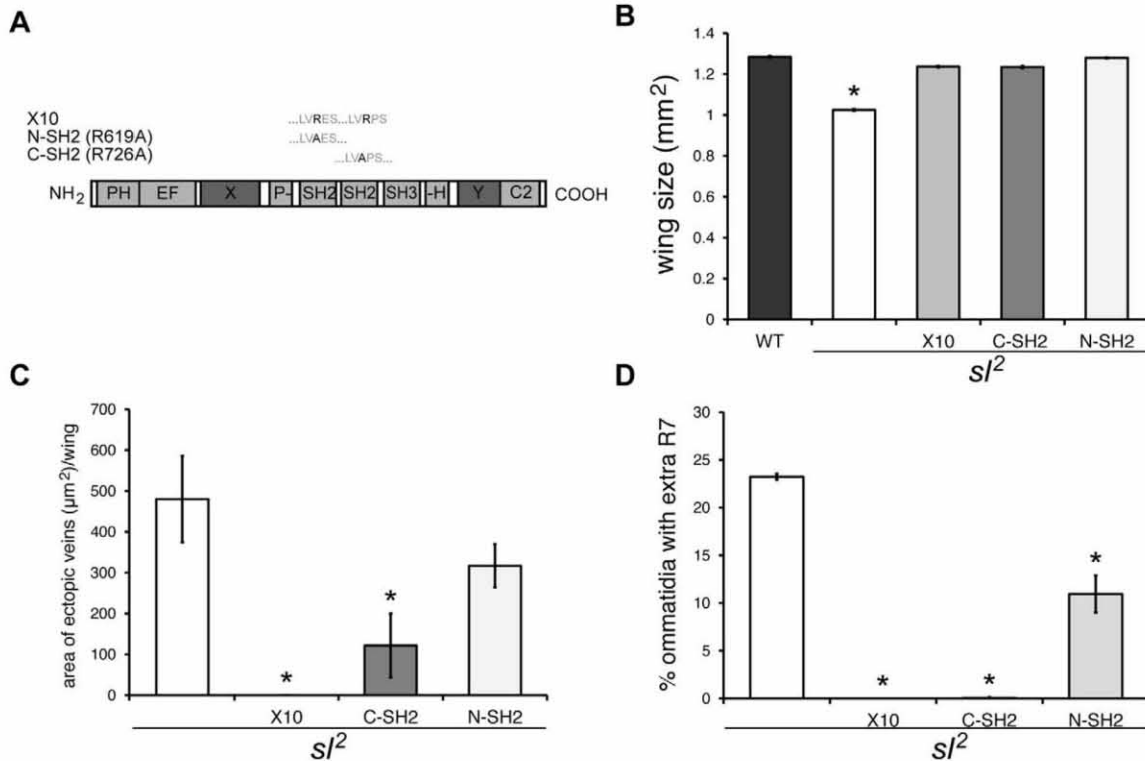


Figure 7. Expression of wild type (X10) and mutant *sl* constructs in a mutant *sl*² background. (A) Schematic representation of mutations in the SH2 domains of PLC-γ. (B) Histogram showing the effect of expression of *sl* constructs on *sl*² wing size. n = 100. *p < 0.001; error bars represent SEM. (C) Histogram showing the effect of expression of *sl* constructs on ectopic wing veins of *sl*² mutant flies. n = 100. *p < 0.001; error bars represent SEM. (D) Histogram showing the effect of expression of *sl* constructs on extra R7 cells in *sl*² mutant eyes. n = 5 eyes each with ≤ 150 ommatidia per eye. *p < 0.001; error bars represent SEM. doi:10.1371/journal.pone.0028067.g007

whole has reduced mass. Given that the reduction in mass (8%) is of a similar magnitude to the reduction in cell size in the eye (15%) and wing (20%), the most parsimonious explanation for this change in mass is that the same SI functions found in the eye and wing are required more generally throughout the animal, suggesting that cell size may be reduced in many tissues. However, we found that the reduced growth observed in the adult was not reflected by a reduction in length of *sl* mutant pupae. This is in contrast to mutations of other genes involved in growth control, such as the neurofibromin 1 gene [15,16], which shows a significant reduction in pupal length. This might be because *sl* has a relatively small effect on growth, varying between 5% and 20% in different contexts, so our sample may not have been large enough to observe a small change in mean length. Given that SI does not appear to affect the length of appendages other than the wing (J. Thackeray, unpublished data), it may be that there are other compensatory effects resulting from lost SI function that maintain the pupal case at an approximately wild-type length.

Another complementary explanation for the reduction in adult mass is via a role for SI on nutrient sensing. As SI is clearly involved in insulin signaling, and as insulin is required for integrating nutrient sensation in *Drosophila* [25], the effect on mass might be a combination of impacts on both growth signaling and nutrient sensing.

We propose that the overall role for SI is to act as a pro-growth agent, allowing cells and tissues to attain normal numbers and sizes. This is achieved by dampening MAPK output in growth control in a non-cell autonomous manner, by restricting processing of EGFR ligand(s), as shown previously for R7 cell differentiation [7]. Since both the MAPK and insulin pathways initially act to favor proliferation and growth, we propose that SI functions here under insulin pathway control, allowing growth to continue, preventing ectopic differentiation (Fig. 8A). There are several ways in which it could do so: by directing activated MAPK to a different cellular compartment (cytosolic versus nuclear [26]) or by controlling overall strength and duration of signaling [27], examples of which have been shown to elicit such changes in developing wing cells in both *Drosophila* and PC12 cells.

SI inhibits wing vein differentiation

As opposed to promoting wing cell growth, SI inhibits wing vein formation. Positioning and differentiation of pro vein and intervein territories in the wing are determined by at least five different signaling pathways: Hedgehog (Hh), Decapentaplegic (Dpp, a bone morphogenetic protein homolog), epidermal growth factor (EGF)/MAPK, Wingless (Wg; Wnt), and Notch [17]. Genes of the EGF/MAPK signaling pathway are expressed at higher levels in pro vein territories; activation of this pathway is required for pro vein to vein differentiation [28]. As mentioned above, *sl* mutant

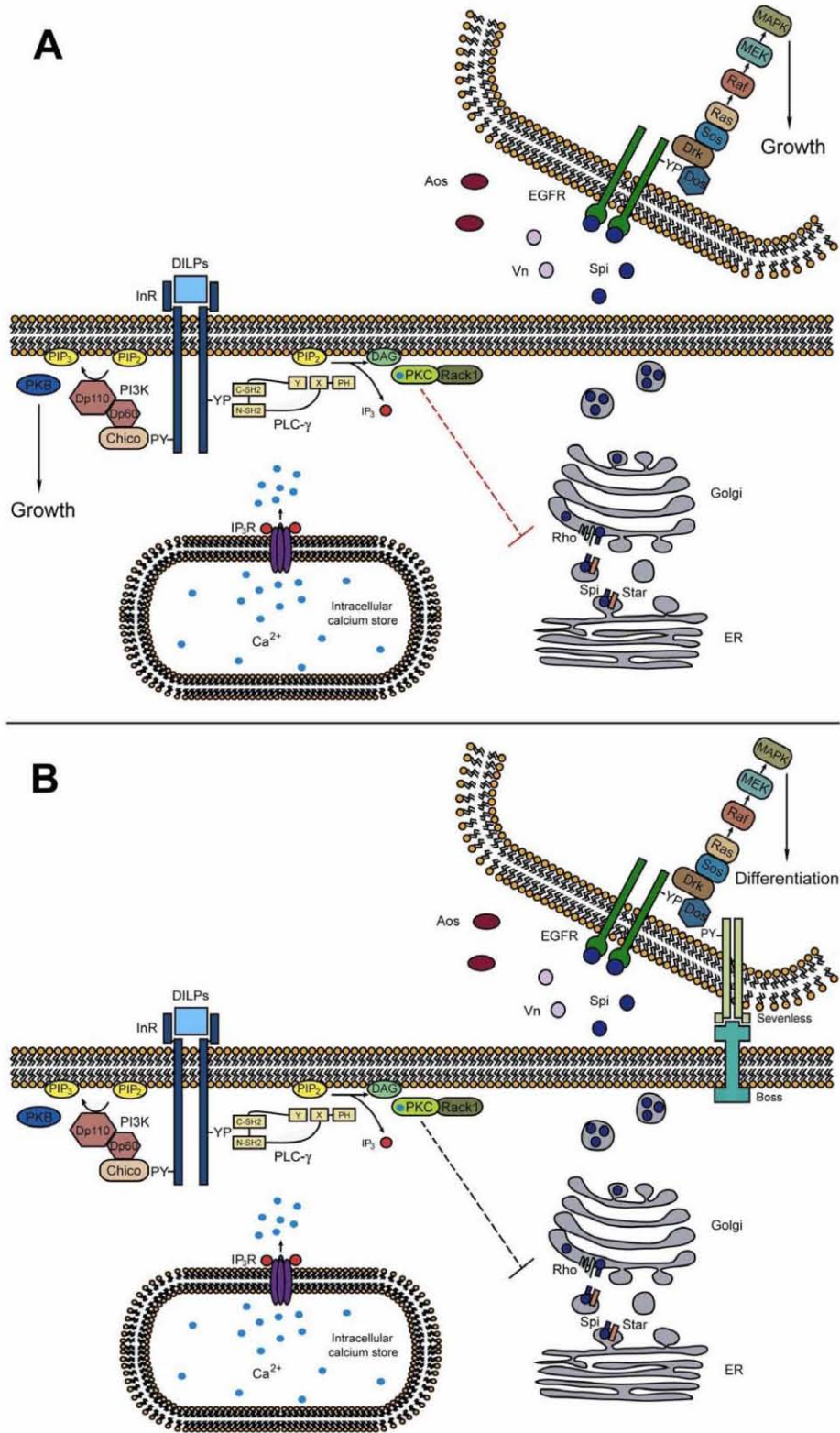


Figure 8. Sl modes of action in growth and differentiation. Panel (A) shows Sl, activated by the insulin pathway, acting as a liaison regulating MAPK pathway ligand processing, to foster MAPK activation to a level promoting growth (red inhibitory interaction). (B) Conversely, for differentiation, reduced insulin receptor signaling leads to lower levels of Sl activation and augmented Spi processing (different from A, gray inhibitory interaction; possibly other targets from those in A), and this, in turn, allows MAPK activation in a manner consistent with promotion of differentiation.

doi:10.1371/journal.pone.0028067.g008

flies show ectopic vein patches indicating an excess of vein differentiation. Here we show that heterozygosity for MAPK pathway genes, in a sensitized *sl* mutant background, caused a partial rescue of the *sl* vein differentiation defect, indicating that the *sl* phenotype is a consequence of MAPK over activation. In this case, Sl acts as a negative regulator of MAPK signaling.

The dual roles played by Sl in the wing via the same MAPK pathway – promotion of growth and subsequently, promotion of differentiation – can be explained if Sl is helping to establish appropriate MAPK activity at each developmental stage. Alternatively, given that growth and differentiation tend to be temporally separated [29], these distinct effects probably occur in cells that are at different stages of development and therefore different effector molecules are likely to be present. Furthermore, these results also suggest that PI3K (of which Dp110 is a component), which inhibits Sl ectopic veins, might have a negative role in regulation of PLC- γ (figure 4B), in addition to the positive effect described in mammals [30]. Given that PI3K and Sl compete for the same substrate, the interaction we see between them in the wing might be due to an altered ratio of phosphatidyl biphosphates to phosphatidyl trisphosphates available at the membrane near the activated RTK.

Insulin receptor involvement in wing vein differentiation

Strikingly, there appears to be no role for the insulin pathway in vein differentiation, save for the insulin receptor itself; however, this finding is consistent with studies showing that the insulin pathway as a whole is generally not involved in differentiation [8]. Despite this, we found that mutations in the insulin receptor generate dramatic increases in ectopic wing veins in *sl* mutant backgrounds. These results clearly indicate a requirement for the insulin receptor in Sl-mediated inhibition of vein differentiation, suggesting that Sl is activated by this receptor. In mammalian cells there is some evidence for this type of association [31], but this is the first evidence of such an interaction in *Drosophila*. Such an interaction might be direct via one of the Sl SH2 domains, or indirectly through an adaptor such as Lnk.

The insulin receptor inhibits R7 photoreceptor differentiation via Sl

Photoreceptor differentiation begins in the third larval instar with the passage of the morphogenetic furrow across the eye imaginal disc. The R8 photoreceptor differentiates first, nucleating developing ommatidia without requiring EGF/MAPK activation. In contrast, the R7 photoreceptor is the last to differentiate and requires MAPK-mediated activation involving both the EGF and Sevenless receptors [32,33]. The presence of extra R7 photoreceptors in *sl* mutant eyes indicates that Sl normally inhibits R7 differentiation, resulting in only one R7 cell per ommatidium [5]. We confirmed that this phenotype is a consequence of over activation of MAPK signaling, because heterozygous mutant conditions for genes in this pathway almost completely rescue the *sl* eye defect [5,7]. We also found a role for insulin signaling in R7 development, but as in vein differentiation, only mutations for the insulin receptor itself augmented the *sl* phenotype in an *sl* mutant background. Thus, in this instance as well, the insulin receptor appears to activate Sl to enable it to regulate R7 differentiation.

This eye phenotype therefore follows the same logic as vein differentiation, constituting another case of close association between the insulin receptor and Sl. As Sl does not show the same interaction with Chico as with InR, activation of Sl via InR may require either direct binding of Sl to InR or another insulin pathway adaptor molecule, such as Lnk [34]. It will be of interest to see if there is physical interaction between Sl and InR or Lnk in this context. Taken together, these results are consistent with Sl acting to reduce MAPK output to prevent ectopic differentiation (Fig. 8B).

Sl mode of action

A central function of all phospholipase C enzymes is hydrolysis of PIP₂. In this study we showed that regulation of growth and differentiation by Sl must depend on PIP₂ hydrolysis to some extent, because of the interaction between *sl* and mutations in *IP₃R*, *PKC53E* and *Rack1*. Also, by means of genetic tests, we found that Sl requires the Spi processing machinery (S, Rho) to regulate growth and differentiation. It has previously been shown that Sl acts on Spi processing during R7 differentiation, by favoring Spi retention in the endoplasmic reticulum [7]. In order to rationalize Sl function in all the phenotypes studied, we reason that by inhibiting Spitz processing, Sl could delay initiation of differentiation, allowing still undifferentiated cells to grow and attain a normal size before the onset of differentiation. Sl modes of action in growth and differentiation may be different; *sl* alleles affecting the wing but not the eye is strong evidence for this assertion [35].

In general, during growth, Sl activated by the insulin pathway acts as a liaison regulating MAPK pathway ligand processing, to promote MAPK activation to a level permitting growth. In agreement with a well-characterized case in mammalian cells [27], we propose that this level of activity of MAPK is different from the level required for differentiation; either it is of a different duration, or of an overall different stimulation level, or happening at a different time. Alternatively it occurs in a different subcellular compartment from that required for differentiation [26], acting thru Sl regulation of Spi processing (Fig. 8A, red inhibitory interaction). This scenario also requires both the MAPK and the insulin pathways to be active for cellular growth. Conversely, for differentiation, reduced insulin receptor signaling leads to altered (lower) levels of Sl activation and augmented Spi processing (Fig. 8B, different from Fig. 8A, gray inhibitory interaction; possibly other targets from those in Fig. 8A), and this in turn allows MAPK activation in a manner consistent with promotion of differentiation. This could either be caused by longer or stronger MAPK stimulation, as documented for PC12 cells [27], since lower Sl activity now allows higher levels of MAPK ligand processing, and/or by compartmentalization of the activated MAPK pathway, as shown for the *Drosophila* wing [26], besides happening at different times during development. In this second case, only the MAPK pathway is required to be fully active. Finally, loss-of-function mutant conditions for *sl* lead to ectopic differentiation at the expense of growth.

We found that genomic *sl* constructs carrying either a mutant C-SH2 or N-SH2 domain rescued the wing size defect of *sl* mutants, to an extent equivalent to a wild type *sl* construct. The amino acid sequence of Sl is well conserved compared to

mammals, suggesting that the mode of enzyme activation has not changed since flies and mammals diverged; if this is so, our results imply that PIP₂ hydrolysis is not required for Sl's role regulating cell growth. This is consistent with previous reports showing that mitogenic activity triggered by PLC- γ in mammals does not depend on its phospholipase function [36]. In mammals, in some contexts, this is due to an SH3-mediated interaction between PLC- γ and PIKE (PI3K enhancer) for nuclear PI3K activity [37]. Another mammalian study showed that the PLC- γ PH domain is sufficient for both membrane association and activation of mammalian PLC- γ following activation of PI3K [30]. If any of these scenarios also occur in *Drosophila*, this would be consistent and explain why the N-SH2 domain of Sl is dispensable for its role in regulating cell growth, while providing a possible tie-in with the PI3K activation triggered during insulin signaling.

In contrast to the results for cell growth, we found that the N-SH2 domain is necessary for Sl to regulate proper differentiation of R7 photoreceptors and wing veins. In mammals, the PLC- γ N-SH2 domain binds to a phosphotyrosine either on the activated receptor or an adaptor; whereas the PLC- γ 1 C-SH2 domain is thought to be necessary for activation of phospholipase activity, binding to a phosphotyrosine within PLC- γ itself, this site having been phosphorylated before by the activated RTK after PLC- γ binding [38]. This suggests that differentiation depends on the more traditional model of PLC- γ activity, requiring binding of the N-SH2 domain to either a receptor or an adaptor. The SH2 mutant constructs therefore confirm earlier findings that the growth and differentiation defects seen in *sl* mutants are driven by distinct and mutationally separable pathways [35].

"Parental control" by Sl

Taken together, our results indicate that Sl participates in fine coordination of growth and differentiation during development. Although Sl is not essential for wing or eye growth and development, it is necessary to achieve appropriate final structure and size. In the absence of Sl function, these tissues arrest growth prematurely and probably initiate differentiation earlier, resulting in ectopic differentiation while attaining smaller cellular sizes. As such, Sl can be seen as exerting a kind of "parental control" that protects cells from differentiating before attaining a normal size. This function requires Sl to change cellular behavior from growth (or possibly inhibition of differentiation) to differentiation in a short period of time.

PLC- γ 1 has been demonstrated to be a phosphorylation target of MAPK [39,40], and some PKC isoforms can phosphorylate PLC- γ without affecting PIP₂ hydrolysis [41] so it is clear that there is a complex interplay of signaling among this set of molecules following RTK activation. Further study of the dynamics of Sl-regulated EGF/MAPK signaling in space and time during wing and eye development in *Drosophila* may help to expose more of this network.

Materials and Methods

Drosophila stocks

Flies were raised at 25°C under standard conditions. Fly stocks used were: *sl*¹/FM7c and *sl*²/FM7c obtained from J. Carlson (Yale University, USA). The *sl*¹ allele is produced by an insertion of a 412 transposable element in the exon encoding the C-terminal end of the split PH domain, resulting in loss of the region Y catalytic domain as well as the C2 domain; *sl*² carries a 13 bp deletion just before the exon encoding the N-terminal SH2 domain, resulting in the loss of both SH2 domains, the SH3 domain, region Y and the C2 domain. Both alleles are strong hypomorphs [35]. *sl*¹/FM7c was

generated in a Canton S background and characterized by one of us (J. Thackeray); *sl*² is a point mutation that changes a tryptophan to a stop codon at the beginning of the open reading frame, and thus, creates a null allele [35,42]. *InR*^{E19}/TM3, *InR*^{GC25}/TM3, *InR*^{3T5}/TM3, *chico*¹/Cyo, *Dp110*^{5W3}/TM6, *PKB*¹/TM3 and *PKB*³/TM3 were obtained from E. Hafen (ETH, Switzerland); *aos*^{Δ7}/TM3, *Egfr*²/Cyo, *Dos*^{R31}/TM3, *drk*^{0A}/Cyo, *rl*¹/Cyo, *Ras85D*^{e2f}/Cyo, *Sos*³⁴/Cyo, *Sos*^{dm7}/Cyo, *Rack1*^{EE}/Cyo, *rho*^{se-1}/TM3, *S*²/In(2LR)bw^{V1}ds^{33K}, *spi*¹/Cyo, *Ip3R*^{B4}/TM3, *PKC53E*^{EY14093}/Cyo, *vn*^{C221}/TM3 and P{ \emptyset -FLP.N}6, *ry*⁵⁰⁶ were from the Bloomington *Drosophila* stock center at Indiana University, USA.

Genetics

Genetic interactions were made by crossing *sl*¹, *sl*², or *sl*^β homozygous virgin females with males of the following genotypes: *InR*^{E19}/TM3, *InR*^{GC25}/TM3, *chico*¹/Cyo, *Dp110*^{5W3}/TM6, *PKB*¹/TM3, *aos*^{Δ7}/TM3, *Egfr*²/Cyo, *Dos*^{R31}/TM3, *drk*^{0A}/Cyo, *rl*¹/Cyo, *Ras85D*^{e2f}/Cyo, *Sos*³⁴/Cyo, *Sos*^{dm7}/Cyo, *Rack1*^{EE}/Cyo, *rho*^{se-1}/TM3, *S*²/In(2LR)bw^{V1}ds^{33K}, *spi*¹/Cyo, *Ip3R*^{B4}/TM3, *vn*^{C221}/TM3 and *PKC53E*^{EY14093}/Cyo. We selected male progeny hemizygous for *sl*¹, *sl*² or *sl*^β and heterozygous for mutations under study by the absence of the marked balancer chromosomes. For rescue experiments, we likewise crossed males with the different rescue constructs to *sl*² mutant females, and selected male progeny hemizygous for *sl*² with the rescue construct.

Body Weight and Length Measurements

For adult body weight measurements, sibling *sl*^β homozygotes and *sl*^β/FM7 females were collected and aged for two days in groups of ten in fresh vials before use. Individual cold-killed flies were measured in a microbalance (Cahn C-31, USA) with 0.1 μg sensitivity and a range of 0.1 μg–25 mg. n = 70 flies/genotype. For pupal measurements, we crossed *sl*^β males to *sl*^β/FM7 females in non-crowded conditions in fly bottles. Third instar larvae were recovered and sexed, and females, in groups of twenty, were housed in food vials. From these, female pupae from stages P12–P15 [43] were used. Pupae were weighed as above. Also, and similar to [15,16], the long axis of the pupal case was measured for each pupae under a dissecting microscope with the aid of a micrometer grid.

Analysis of wings

Flies were anesthetized with CO₂ and wings were dissected, placed in absolute ethanol and mounted in a mixture of lactic acid:ethanol (6:5) [10]. Wings were examined under a compound microscope. Measurements of wing surface and ectopic vein areas were made manually using IPLab software. For measurements of cellular density in wings, a small region between veins 3 and 4 was selected, and the total number of cells within this region was counted on one wing surface. In order to calculate cell densities, we divided the number of cells counted by the area surveyed (0.0298 mm²). This measurement was validated as representative of total wing area by counting the total number of cells in one wing surface in a few experiments.

Scanning Electron Microscopy (SEM) of Whole Eyes

Flies were cold anesthetized, mounted and oriented sideways unto stubs by means of carbon paint. They were then viewed with a JEOL 1010 SEM under high vacuum conditions, with 20 KeV accelerating voltage, and whole eyes positioned perpendicular to the electron beam were digitized at 230x. Only one eye was accessible per fly. Digitized images were used to measure eye area and number of ommatidia using ImageJ.

Eye Histology

Histology was performed according to Riesgo-Escovar, et al. [44]. Briefly, flies were anesthetized with CO₂ and decapitated. Heads were placed on slides and cut in half by a medial sagittal section. The eyes were then fixed in 2% glutaraldehyde, 1% OsO₄ in 1x cacodylate buffer (50 mM, pH 7.4) on ice for 30 minutes. The eyes were post-fixed in 2% OsO₄ in 1x cacodylate buffer on ice for 2 hours. The OsO₄ solution was then removed and the eyes were dehydrated through a graded acetone series. Absolute acetone was replaced with a mixture of Spurr's resin:acetone (1:1) overnight. This mixture was replaced with 100% fresh Spurr's for at least 4 hours to allow the resin to infiltrate the tissue. The eyes were placed in plastic molds in 100% Spurr's and oriented using a fine needle. The molds were incubated at 60–65°C for 24–70 hours. Eyes were sectioned tangentially with a microtome (Leica RM2265) using glass knives. Sections of 1 μ m thick were obtained, placed on slides, and stained with toluidine blue for approximately 30 seconds [45]. Finally, sections were mounted in Entellan (Electron Microscopy Sciences) and viewed on a compound microscope. Sections with fewer than 150 ommatidia were always selected for analysis, to assure that all ommatidia examined were at the level of the R7 rhabdomere.

Analysis of loss-of-function clones in eyes

Patches of tissue lacking *sl* function were generated by the FLP-FRT system as described [46], by subjecting 2–4 day old larvae of genotype *y w sl^l FRT19A/FRT19A;hsFLP/+* to heat shock. Heads containing at least one *w* clone were embedded in resin, sectioned and stained with toluidine blue as described [44,45]. Ommatidia were scored for area of the R1–R6 rhabdomeres as a series of matched pairs from each head; each pair consisted of one *w+* ommatidium surrounded by all *w+* ommatidia, and one *w-* ommatidium surrounded by *w-* ommatidia. Each member of the pair was separated from the other member by no more than 3 other ommatidia, so that differences that occur due to the angle of section were minimized. The area of each rhabdomere was determined using the wand tool within ImageJ version 1.43u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

small wing constructs

A series of constructs were prepared from a 10 kb genomic DNA fragment (X10), that includes the entire *sl* transcription unit. The X10 fragment was subcloned into pBluescript KS, reisolated as a *KpnI*/*NcoI* digest and ligated into the *KpnI* and *NcoI* sites of *pCaSpeR-4*. Modified versions of X10 were produced by site-directed mutagenesis using the Quikchange kit (Stratagene). The X10 fragment was modified in R619 to A (R619 is a critical amino acid for the function of the N-SH2 domain) and independently in R726 to A (R726 is a critical amino acid for the function of the C-SH2 domain). The mutations were generated in a 1.7 kb *BamHI* fragment subcloned from X10 and confirmed by sequence analysis. The fragments were reconstructed in pBluescript and recloned into the *KpnI* and *NcoI* sites of *pCaSpeR-4*. The plasmids were injected into syncytial blastoderm embryos at a final concentration of 1 μ g/ μ l together with 0.1 μ g/ μ l $\Delta 2-3$ helper plasmid in a buffer containing 0.1 mM sodium phosphate (pH 7.8)

References

1. Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70: 281–312.
2. Patterson RL, van Rossum DB, Nikolaidis N, Gill DL, Snyder SH (2005) Phospholipase C- γ : diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem Sci* 30: 688–697.

and 5 mM KCl. The plasmids were detected by the presence of the *w⁺* gene marker of *pCaSpeR-4* in transformed progeny [35].

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM. The mean values were compared using Student's *t* test.

Supporting Information

Figure S1 *PKC53E* mutant flies have wing phenotypes. Homozygous mutant *PKC53E^{E1714093}* flies are viable and fertile, but have reduced wings (A) and ectopic wing veins (B), yet normal numbers of R7 photoreceptors in the eye (C). Each test is accompanied by corresponding control siblings. **p*<0.001; error bars represent SEM, n=100 for (A) and (B), and n=4 eyes for each genotype, \leq 150 ommatidia examined per eye. (TIIF)

Figure S2 Reduced gene dosage of signaling genes on the *sl^l* ectopic wing vein phenotype. n=100. **p*<0.001; error bars represent SEM. (TIIF)

Figure S3 *aos* acts as a strong enhancer of *sl* in the eye. (A) Shows a scanning EM of an eye from an *aos* heterozygote male fly, with normal morphology. (B) Shows a scanning EM of an eye from a male *sl^l* fly, sibling to the fly in (C) that also carries a mutant copy of *aos* (*aos^{Δ7}*). Note slight roughness of the eye on (B), enhanced in the eye in (C). Scale bar in (B) is 100 micrometers. (TIIF)

Figure S4 Reduced gene dosage of signaling genes on *sl^l* and *sl^l* extra R7 phenotypes. (A, B) show histograms with the effects of heterozygosity for different signaling genes on the number of ommatidia with extra R7 cells in *sl^l* (A) and *sl^l* (B) mutants. n=50–100 ommatidia per eye, from 4–7 eyes. **p*<0.001; error bars represent SEM. (TIIF)

Figure S5 Homozygosity for *sl^l* does not modify the dominant *S²* R7 phenotype in the eye. Histogram showing the average number of R7 cells per ommatidium in eyes from heterozygous *S²* flies, or from flies also mutant for *sl^l*. n=5 eyes each with \leq 150 ommatidia per eye. Error bars represent SEM. (TIIF)

Acknowledgments

We would like to acknowledge the expert technical assistance of Dr. María Teresa Peña-Rangel, and for her help with the pupal measurement experiments. We also thank Joshua Suhl and Arooj Hyat for their help in generating the SH2 knockout constructs. We also thank UNAM, the PDCB PHD program, and CONACYT for student support to JMMM (#162563).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JRR-E, JMM-M, JT. Performed the experiments: JMM-M, JRR-E, JT, RS, FBZ. Analyzed the data: JRR-E, JMM-M, JT. Contributed reagents/materials/analysis tools: JT, JRR-E, JMM-M. Wrote the paper: JMM-M, JRR-E, JT.

5. Thackeray JR, Gaines PC, Ebert P, Carlson JR (1998) small wing encodes a phospholipase C- γ that acts as a negative regulator of R7 development in *Drosophila*. *Development* 125: 5033–5042.
6. Emori Y, Sugaya R, Akimaru H, Higashijima S, Shishido E, et al. (1994) *Drosophila* phospholipase C- γ expressed predominantly in blastoderm cells at cellularization and in endodermal cells during later embryonic stages. *J Biol Chem* 269: 19474–19479.
7. Schlesinger A, Kiger A, Perrimon N, Shilo BZ (2004) Small wing PLC- γ is required for ER retention of cleaved Spitz during eye development in *Drosophila*. *Dev Cell* 7: 535–545.
8. Bohni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, et al. (1999) Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97: 865–875.
9. McNeill H, Craig GM, Bateman JM (2008) Regulation of neurogenesis and epidermal growth factor receptor signaling by the insulin receptor/target of rapamycin pathway in *Drosophila*. *Genetics* 179: 843–853.
10. Diaz-Benjumea FJ, Hafen E (1994) The sevenless signalling cassette mediates *Drosophila* EGF receptor function during epidermal development. *Development* 120: 569–578.
11. Garofalo RS (2002) Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrinol Metab* 13: 156–162.
12. McCahill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, Yarwood SJ (2002) The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol* 62: 1261–1273.
13. Lee JR, Urban S, Garvey CF, Freeman M (2001) Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell* 107: 161–171.
14. Kolodkin AL, Pickup AT, Lin DM, Goodman CS, Banerjee U (1994) Characterization of Star and its interactions with sevenless and EGF receptor during photoreceptor cell development in *Drosophila*. *Development* 120: 1731–1745.
15. The I, Hannigan GE, Cowley GS, Reginald S, Zhong Y, et al. (1997) Rescue of a *Drosophila* NF1 mutant phenotype by protein kinase A. *Science* 276: 791–794.
16. Walker JA, Tchoudakova AV, McKenney PT, Brill S, Wu D, et al. (2006) Reduced growth of *Drosophila* neurofibromatosis 1 mutants reflects a non-cell-autonomous requirement for GTPase-Activating Protein activity in larval neurons. *Genes Dev* 20: 3311–3323.
17. Blair SS (2007) Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 293–319.
18. De Celis JF (2003) Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *Bioessays* 25: 443–451.
19. Betson M, Settleman J (2007) A rho-binding protein kinase C-like activity is required for the function of protein kinase N in *Drosophila* development. *Genetics* 176: 2201–2212.
20. Choe CU, Ehrlich BE (2006) The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) and its regulators: sometimes good and sometimes bad teamwork. *Sci STKE* 2006: re15.
21. Chattopadhyay A, Vecchi M, Ji Q, Mernaugh R, Carpenter G (1999) The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C- γ 1 with the activated EGF receptor. *J Biol Chem* 274: 26091–26097.
22. Marengere LE, Pawson T (1992) Identification of residues in GTPase-activating protein Src homology 2 domains that control binding to tyrosine phosphorylated growth factor receptors and p62. *J Biol Chem* 267: 22779–22786.
23. Day SJ, Lawrence PA (2000) Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* 127: 2977–2987.
24. Raabe T, Riesgo-Escovar J, Liu X, Bausenwein BS, Deak P, et al. (1996) DOS, a novel pleckstrin homology domain-containing protein required for signal transduction between sevenless and Ras1 in *Drosophila*. *Cell* 85: 911–920.
25. Hietakangas V, Cohen SM (2009) Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet* 43: 389–410.
26. Marenca DR, Vrtilas AD, Rodrigues AB, Cook S, Powers MA, et al. (2006) MAP kinase subcellular localization controls both pattern and proliferation in the developing *Drosophila* wing. *Development* 133: 43–51.
27. Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179–185.
28. Crozatier M, Glise B, Vincent A (2004) Patterns in evolution: veins of the *Drosophila* wing. *Trends Genet* 20: 498–505.
29. Zhu L, Skoultschi AI (2001) Coordinating cell proliferation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 11: 91–97.
30. Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, et al. (1998) Activation of phospholipase C- γ by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* 17: 414–422.
31. Kayali AG, Eichhorn J, Haruta T, Morris AJ, Nelson JG, et al. (1998) Association of the insulin receptor with phospholipase C- γ (PLC- γ) in 3T3-L1 adipocytes suggests a role for PLC- γ in metabolic signaling by insulin. *J Biol Chem* 273: 13808–13818.
32. Voas MG, Rebay I (2004) Signal integration during development: insights from the *Drosophila* eye. *Dev Dyn* 229: 162–175.
33. Mollereau B, Domingos PM (2005) Photoreceptor differentiation in *Drosophila*: from immature neurons to functional photoreceptors. *Dev Dyn* 232: 585–592.
34. Werz C, Kohler K, Hafen E, Stocker H (2009) The *Drosophila* SH2B family adaptor Lnk acts in parallel to chico in the insulin signaling pathway. *PLoS Genet* 5: e1000596.
35. Mankidy R, Hastings J, Thackeray JR (2003) Distinct phospholipase C- γ -dependent signaling pathways in the *Drosophila* eye and wing are revealed by a new small wing allele. *Genetics* 164: 553–563.
36. Smith MR, Liu YL, Matthews NT, Rhee SG, Sung WK, et al. (1994) Phospholipase C- γ 1 can induce DNA synthesis by a mechanism independent of its lipase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6554–6558.
37. Ye K, Aghdasi B, Luo HR, Moriarty JL, Wu FY, et al. (2002) Phospholipase C- γ 1 is a physiological guanine nucleotide exchange factor for the nuclear GTPase PIKE. *Nature* 415: 541–544.
38. Poulin B, Sekiya F, Rhee SG (2005) Intramolecular interaction between phosphorylated tyrosine-783 and the C-terminal Src homology 2 domain activates phospholipase C- γ 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4276–4281.
39. Seedorf K, Shearman M, Ullrich A (1995) Rapid and long-term effects on protein kinase C on receptor tyrosine kinase phosphorylation and degradation. *J Biol Chem* 270: 18953–18960.
40. Buckley CT, Sekiya F, Kim YJ, Rhee SG, Caldwell KK (2004) Identification of phospholipase C- γ 1 as a mitogen-activated protein kinase substrate. *J Biol Chem* 279: 41807–41814.
41. Chen P, Xie H, Wells A (1996) Mitogenic signaling from the egf receptor is attenuated by a phospholipase C- γ /protein kinase C feedback mechanism. *Mol Biol Cell* 7: 871–881.
42. Tweedie S, Ashburner M, Falls K, Leyland P, McQuilton P, et al. (2009) FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res* 37: D555–559.
43. Bainbridge SP, Bownes M (1981) Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 66: 57–80.
44. Riesgo-Escovar JR, 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.
45. Wolff T (2000) *Histological Techniques for the Drosophila Eye*. Part 2: Adult. In: Sullivan W, Ashburner M, Hawley RS, eds. *Drosophila* protocols. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 229–243.
46. Xu T, Rubin GM (1993) Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117: 1223–1237.

Supporting Information

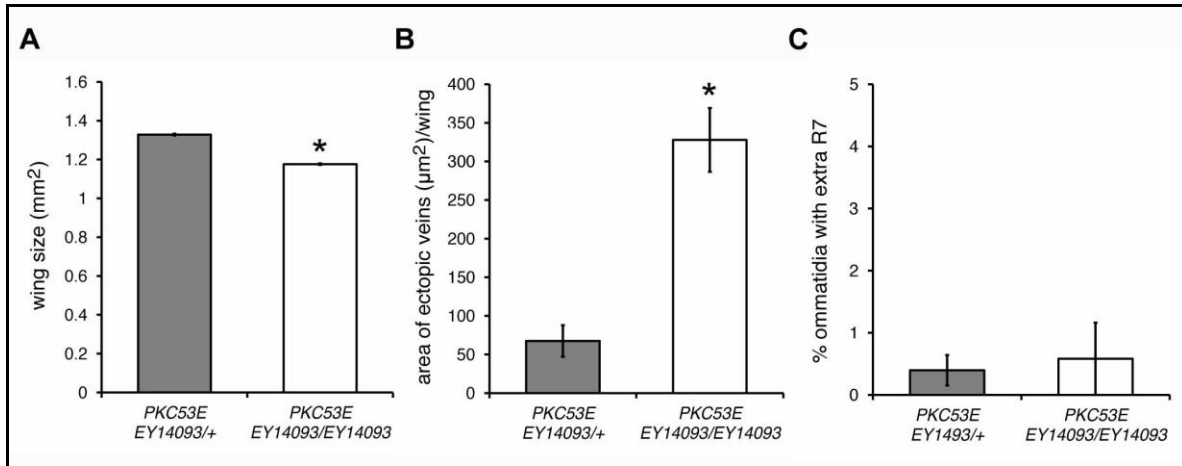


Figure S1. *PKC53E* mutant flies have wing phenotypes. Homozygous mutant *PKC53E*^{EY14093} flies are viable and fertile, but have reduced wings (A) and ectopic wing veins (B), yet normal numbers of R7 photoreceptors in the eye (C). Each test is accompanied by corresponding control siblings. **p*<0.001; error bars represent SEM, *n* = 100 for (A) and (B), and *n* = 4 eyes for each genotype, ≤150 ommatidia examined per eye.

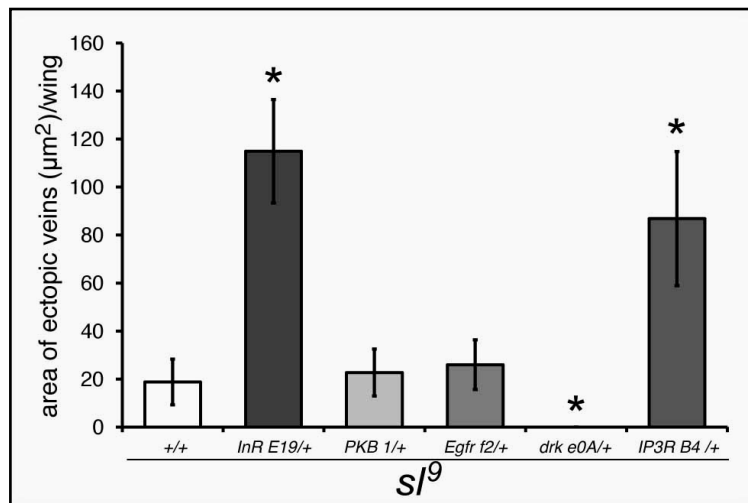


Figure S2. Reduced gene dosage of signaling genes on the *sI*⁹ ectopic wing vein phenotype. *n* = 100. **p*<0.001; error bars represent SEM.

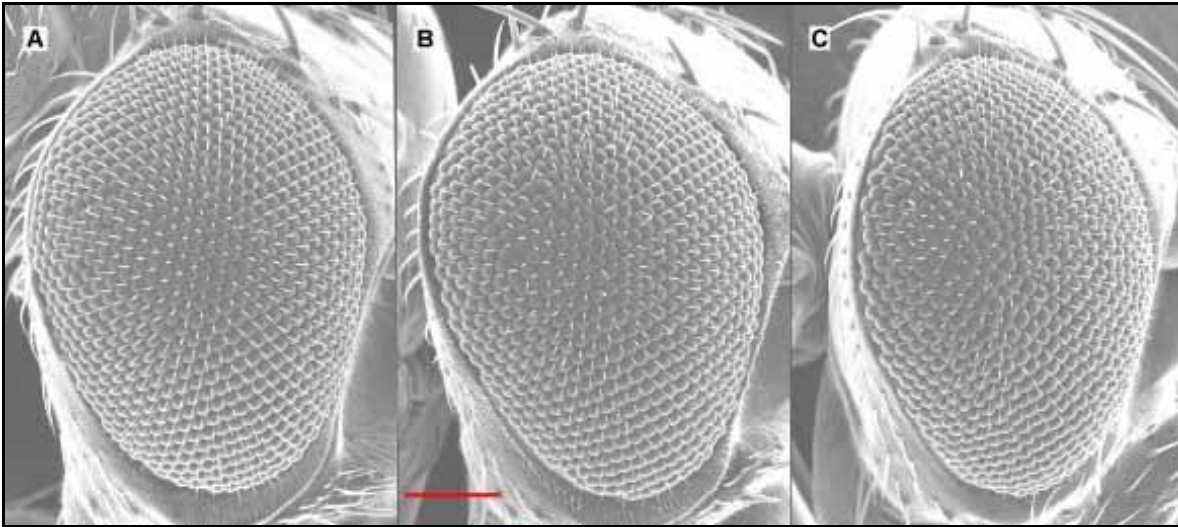


Figure S3. *aos* acts as a strong enhancer of *sl* in the eye. (A) Shows a scanning EM of an eye from an *aos* heterozygote male fly, with normal morphology. (B) Shows a scanning EM of an eye from a male *sl*² fly, sibling to the fly in (C) that also carries a mutant copy of *aos* (*aos*^{Δ7}). Note slight roughness of the eye on (B), enhanced in the eye in (C). Scale bar in (B) is 100 micrometers.

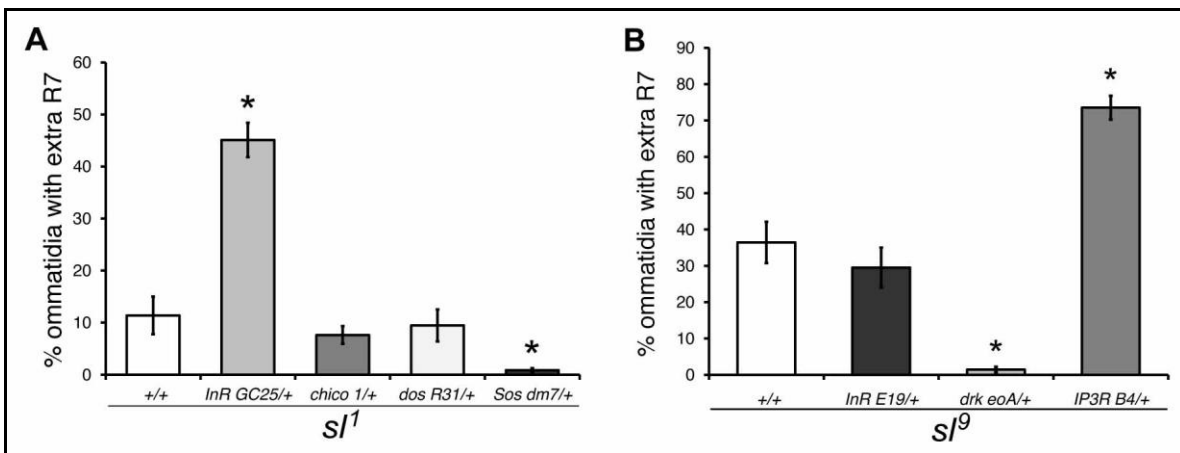


Figure S4. Reduced gene dosage of signaling genes on *sl*¹ and *sl*⁹ extra R7 phenotypes. (A, B) show histograms with the effects of heterozygosity for different signaling genes on the number of ommatidia with extra R7 cells in *sl*¹ (A) and *sl*⁹ (B) mutants. n = 50–100 ommatidia per eye, from 4–7 eyes. **p* < 0.001; error bars represent SEM.

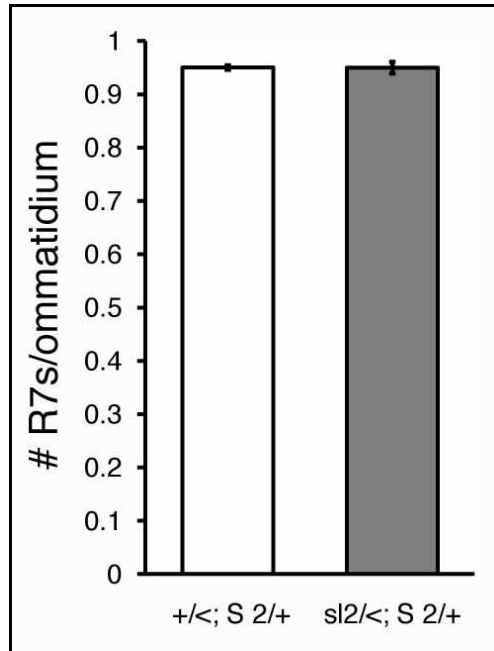


Figure S5. Homozygosity for sl^2 does not modify the dominant S^2 R7 phenotype in the eye. Histogram showing the average number of R7 cells per ommatidium in eyes from heterozygous S^2 flies, or from flies also mutant for sl^2 . $n = 5$ eyes each with ≤ 150 ommatidia per eye. Error bars represent SEM.

8. CONCLUSIONES

En *D. melanogaster*, la PLC- γ promueve el crecimiento y suprime la diferenciación celular durante el desarrollo del ala y del ojo. En el ala, la PLC- γ estimula el crecimiento celular en conjunto con la vía de la insulina y de las MAPKs. En el ojo, la PLC- γ promueve tanto el crecimiento como la proliferación celular. La función de la PLC- γ en el crecimiento, aunque discreta, parece requerirse en el organismo completo, ya que el peso de organismos mutantes es menor.

Durante la diferenciación de fotorreceptores en el ojo y de venas en el ala, la PLC- γ , activada por el receptor de insulina, suprime la diferenciación celular mediante la regulación negativa de la vía de las MAPKs. Tanto en el crecimiento como durante la diferenciación, la función de la PLC- γ requiere de proteínas efectoras de la vía de señalización clásica para modular posiblemente el procesamiento de ligandos homólogos al EGF de vertebrado. La PLC- γ emplea modos de acción diferentes para estimular el crecimiento y suprimir la diferenciación dado que el requerimiento de los dominios SH2 es diferente en cada proceso.

En conclusión, se propone que la PLC- γ , después de ser activada por el receptor de insulina, favorece el crecimiento e inhibe la diferenciación celular permitiendo que las células alcancen un número y un tamaño adecuados antes de que éstas se diferencien. El mecanismo de acción de la PLC- γ se circunscribe aparentemente a regular la producción de ligandos del EGFR, lo que explicaría los fenotipos mutantes estudiados en este trabajo.

9. PERSPECTIVAS

Sin duda, la obtención de nuevos datos trae consigo nuevas interrogantes que serán la motivación para nuevas investigaciones.

Con un enfoque principalmente genético, el proyecto tuvo el objetivo de caracterizar la función del gen *small wing* que codifica para la PLC- γ , en el crecimiento y la diferenciación celular durante el desarrollo del ala y del ojo de *D. melanogaster*. Los resultados contenidos en el presente trabajo amplían nuestros conocimientos a cerca de la función de la PLC- γ en *Drosophila*. Sin embargo, una caracterización completa de la función de la PLC- γ requerirá estudios adicionales que aborden aspectos bioquímicos y moleculares como son: un análisis bioquímico en donde se evalúen las características y funciones de los productos lipídicos así como del calcio generados de la reacción enzimática de la PLC- γ , estudios moleculares para confirmar las interacciones genéticas de *sl* con las vías de señalización de las MAPKs y de la insulina como por ejemplo, determinar si se modifica la actividad de las vías de señalización (utilizando elementos reporteros como la expresión de genes de respuestas a la vía de las MAPKs) en las mutantes de *sl* o determinar la presencia de interacciones físicas entre las proteínas implicadas mediante ensayos de interacción proteína-proteína.

Además de lo anterior, una cuestión que resalta de los resultados obtenidos es saber cómo la PLC- γ regula el procesamiento de los ligandos del EGFR. Una forma de abordar el tema es determinar la localización de la PLC- γ y éstos ligandos o sus precursores a un nivel celular, a través de estudios de co-localización con marcadores de retículo endoplásmico, del aparato de Golgi, de la membrana celular, etc. La distribución de los ligandos a nivel celular puede evaluarse también en condiciones mutantes para *sl*. Estudios posteriores podrían encaminarse a evaluar la conservación de estos procesos moleculares en otros sistemas biológicos.

10. BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. (New York, USA: Garland Science), pp. 1101-1112. ISBN 978-0815341055.

Bar-Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A., Mandiyan, V., y Schlessinger, J. (1993). SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* 74, 83-91.

Barker, S.A., Caldwell, K.K., Pfeiffer, J.R., y Wilson, B.S. (1998). Wortmannin-sensitive phosphorylation, translocation, and activation of PLCgamma1, but not PLCgamma2, in antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Mol Biol Cell* 9, 483-496.

Blair, S.S. (2007). Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 293-319.

Burgering, B.M., de Vries-Smits, A.M., Medema, R.H., van Weeren, P.C., Tertoolen, L.G., y Bos, J.L. (1993). Epidermal growth factor induces phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 via multiple pathways. *Mol Cell Biol* 13, 7248-7256.

Butler, M.J., Jacobsen, T.L., Cain, D.M., Jarman, M.G., Hubank, M., Whittle, J.R., Phillips, R., y Simcox, A. (2003). Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* 130, 659-670.

Carthew, R.W. (2007). Pattern formation in the *Drosophila* eye. *Curr Opin Genet Dev* 17, 309-313.

Conlon, I., y Raff, M. (1999). Size control in animal development. *Cell* 96, 235-244.

Crozatier, M., Glise, B., y Vincent, A. (2004). Patterns in evolution: veins of the *Drosophila* wing. *Trends Genet* 20, 498-505.

Day, S.J., y Lawrence, P.A. (2000). Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* 127, 2977-2987.

De Celis, J.F. (2003). Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *Bioessays* 25, 443-451.

de Moed, G.H., De Jong, G., y Scharloo, W. (1997). Environmental effects on body size variation in *Drosophila melanogaster* and its cellular basis. *Genet Res* 70, 35-43.

Diaz-Benjumea, F.J., y Cohen, S.M. (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* 121, 4215-4225.

Emori, Y., Sugaya, R., Akimaru, H., Higashijima, S., Shishido, E., Saigo, K., y Homma, Y. (1994). *Drosophila* phospholipase C-gamma expressed predominantly in blastoderm cells at cellularization and in endodermal cells during later embryonic stages. *J Biol Chem* 269, 19474-19479.

Falasca, M., Logan, S.K., Lehto, V.P., Baccante, G., Lemmon, M.A., y Schlessinger, J. (1998). Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* 17, 414-422.

Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 87, 651-660.

Gonzalez, A., Chaouiya, C., y Thieffry, D. (2006). Dynamical analysis of the regulatory network defining the dorsal-ventral boundary of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Genetics* 174, 1625-1634.

Hafen, E., y Stocker, H. (2003). How are the sizes of cells, organs, and bodies controlled? *PLoS Biol* 1, E86.

Horstman, D.A., DeStefano, K., y Carpenter, G. (1996). Enhanced phospholipase C-gamma1 activity produced by association of independently expressed X and Y domain polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7518-7521.

Ji, Q.S., Winnier, G.E., Niswender, K.D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnuson, M.A., y Carpenter, G. (1997). Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2999-3003.

Kumar, J.P. (2001). Signalling pathways in *Drosophila* and vertebrate retinal development. *Nat Rev Genet* 2, 846-857.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., y Darnell, J. (2004). *Molecular Cell Biology*, 5th ed. (New York, USA: W. H. Freeman), pp. 155, 563. ISBN 978-0716743668.

Marengere, L.E., y Pawson, T. (1992). Identification of residues in GTPase-activating protein Src homology 2 domains that control binding to tyrosine phosphorylated growth factor receptors and p62. *J Biol Chem* 267, 22779-22786.

Mesquita, D., Dekanty, A., y Milan, M. (2010). A dp53-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in *Drosophila*. *PLoS Biol* 8, e1000566.

Mollereau, B., y Domingos, P.M. (2005). Photoreceptor differentiation in *Drosophila*: from immature neurons to functional photoreceptors. *Dev Dyn* 232, 585-592.

Nagaraj, R., y Banerjee, U. (2004). The little R cell that could. *Int J Dev Biol* 48, 755-760.

- Noh**, D.Y., Shin, S.H., y Rhee, S.G. (1995). Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim Biophys Acta* 1242, 99-113.
- Patterson**, R.L., van Rossum, D.B., Nikolaidis, N., Gill, D.L., y Snyder, S.H. (2005). Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem Sci* 30, 688-697.
- Poulin**, B., Sekiya, F., y Rhee, S.G. (2000). Differential roles of the Src homology 2 domains of phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) in platelet-derived growth factor-induced activation of PLC-gamma1 in intact cells. *J Biol Chem* 275, 6411-6416.
- Ralston**, A., y Shaw, K. (2008). Gene expression regulates cell differentiation. *Nature Education* 1, 1.
- Reiter**, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., y Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11, 1114-1125.
- Rhee**, S.G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70, 281-312.
- Schlesinger**, A., Kiger, A., Perrimon, N., y Shilo, B.Z. (2004). Small wing PLCgamma is required for ER retention of cleaved Spitz during eye development in *Drosophila*. *Dev Cell* 7, 535-545.
- Seedorf**, K., Shearman, M., y Ullrich, A. (1995). Rapid and long-term effects on protein kinase C on receptor tyrosine kinase phosphorylation and degradation. *J Biol Chem* 270, 18953-18960.
- Sekiya**, F., Poulin, B., Kim, Y.J., y Rhee, S.G. (2004). Mechanism of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1. Tyrosine 783 phosphorylation is not sufficient for lipase activation. *J Biol Chem* 279, 32181-32190.
- Suh**, P.G., Park, J.I., Manzoli, L., Cocco, L., Peak, J.C., Katan, M., Fukami, K., Kataoka, T., Yun, S., y Ryu, S.H. (2008). Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* 41, 415-434.
- Tautz**, D., y Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98, 81-85.
- Thackeray**, J.R., Gaines, P.C., Ebert, P., y Carlson, J.R. (1998). *small wing* encodes a phospholipase C-(gamma) that acts as a negative regulator of R7 development in *Drosophila*. *Development* 125, 5033-5042.
- Voas**, M.G., y Rebay, I. (2004). Signal integration during development: insights from the *Drosophila* eye. *Dev Dyn* 229, 162-175.

Wang, D., Feng, J., Wen, R., Marine, J.C., Sangster, M.Y., Parganas, E., Hoffmeyer, A., Jackson, C.W., Cleveland, J.L., Murray, P.J., y Ihle, J.N. (2000). Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity* 13, 25-35.

Weinkove, D., y Leervers, S.J. (2000). The genetic control of organ growth: insights from Drosophila. *Curr Opin Genet Dev* 10, 75-80.

Yan, S.J., Zartman, J.J., Zhang, M., Scott, A., Shvartsman, S.Y., y Li, W.X. (2009). Bistability coordinates activation of the EGFR and DPP pathways in Drosophila vein differentiation. *Mol Syst Biol* 5, 278.

Zhu, L., y Skoultchi, A.I. (2001). Coordinating cell proliferation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 11, 91-97.