

TESI DOCTORAL

Regeneració en els discs imaginals
de *Drosophila melanogaster*

Anàlisi de la cicatrització, proliferació i
formació del patró



Manel Bosch Marimon

Barcelona, Novembre 2006

Programa de doctorat del Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Bienni 2000-2002

Regeneració en els discs imaginals de *Drosophila melanogaster*

Anàlisi de la cicatrització, proliferació i formació del patró

Memòria presentada per
Manel Bosch Marimon

Per optar al grau de
Doctor

Tesi doctoral sota la direcció del **Dr. Jaume Baguñà Monjo**
al departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de
Barcelona

El director

L'autor

Dr. Jaume Baguñà Monjo

Manel Bosch Marimon

Barcelona, Novembre 2006

Al meu pare

AGRAÏMENTS

En primer lloc voldria agrair al Jaume el fet que em donés l'oportunitat de poder fer aquesta tesi, per les explicacions magistrals sobre regeneració i per ensenyar-me que sense els clàssics no es podria entendre molta de la biologia que avui s'està fent. També voldria agrair-li a la Roser la seva contribució per fer que aquesta tesi fos possible.

Al Flo i la Montse els voldria agrair els seus consells i observacions durant tota la tesi. També els vull donar les gràcies per les exigències en els seminaris i en la presentació dels resultats que realment fan rumiar sobre el que un està fent.

No em puc deixar als “kefes” que he tingut en altres laboratoris. Primer el gran Antonio (AGB) per ensenyar-me la quantitat de marranades que se li pot fer a una mosca; l'Enrique que em va ajudar en el primer article; i en Juan Pablo per permetre'm que pe fi veiés, d'una vegada, que els discs imaginals poden regenerar.

Al galliner de genètica també els voldria agrair les estones que m'han fet passar dintre i fora del lab. A la Sese per ser una secretària tan eficient i cobrar tan poc; al Xenxi per tota la seva ajuda informàtica que no és poca; a la Rubita per ensenyar-me que ser fashion és més que portar camisa i pantalons de vestir; a l'Adrià per fer-me costat dintre el galliner a controlar les gallines i també per entendre que el cap de setmana s'ha de marxar d'aquest poble per poder descansar; a la Cris per tenir sempre el rebost ple de “xuxes”; a la Isabel per recordar-me a la Xampinyoneta; al Míguel i el seu puré de cigrons; a l'Ou per recordar-me cada dia que em dic Manel; i al Xavi, per canviar-me els stocks. Tampoc voldria oblidar a la Morey per ensenyar-me que val més parar-se a pensar abans de fer alguna cosa que potser no servirà per res; a en Dunlop i l'Amoròs pels bons consells que em van donar en els meus inicis; i a en Cayuso per compartir la passió per la ciència, les birres i les converses de bar.

També voldria donar les gràcies a tota la gent de genètica que m'ha ajudat al llarg d'aquesta tesi. En particular, a la Neus per la seva ajuda a les pràctiques de genètica molecular i molecular humana; al Francesc Mestres per tota la música que m'ha deixat i ha fet més amè el treball; al Lluís Serra per la seva ajuda en el món de l'estadística; al gran Jon per les estones de basket, els CDs de música i els jocs d'ordinador que tan bé m'han anat per distreure'm.

Gràcies també a dues noies que m'han acompanyat des dels inicis en la biologia i amb les que he rigut molt totes les vegades que hem anat de festa. A la Currupili per escoltar-me en els moments de penúries quan necessitava algú per parlar i, a la Raky per ser una persona tan oberta i disposada sempre a ajudar als altres.

A la gent que he anat coneixent pels diferents laboratoris i que m'han ajudat a fer que la vida fora de casa fos en molts moments divertida. Al LA per la quantitat de coses que m'ha enviat de Madrid; a l'Inyaki i l'Ibo per deixar-me estar a casa seva i a sobre cuinar-me com en un restaurant de 5 forquilles; a en Diego i en Johnny per les pintes de Guinness i els late nights al laboratori.

Als amics del club: Xapulin, Xavi, Genaro i Sònia, Ciscu i Eli, David i Marta que, tot i que cada vegada ens veiem menys sempre sabem on trobar-nos per fer algun que altre kubata i intentar arreglar el món. També a m'agradaria agrair a la gent que ha compartit pis amb mi, per suportar-me els dies de mal humor. En especial al Jaumet per compartir el Hap-kido, el karate, el gimnàs; quins grans atletes. No voldria descuidar-me tampoc la gent de Vallverd: l'Eva i el Francesc i, la Meritxel i la Gemma, per les calçotades que hem fet i per obrir-me sempre la porta de casa seva.

A la meva família: a la Inès per portar al món a dos nebots tan "guapos" i, en especial, a la meva mare que sempre hi és quan la necessito, que m'ha ensenyat que sempre s'ha de tirar endavant però, sobretot perquè sap com calmar-me en els moments dolents. També a la meva àvia per la seva ajuda i per ensenyar-me que als 90 anys encara es pot dir "visca la vida".

Per últim, però no per això menys important, la persona que ha estat al meu costat des de fa 11 anys, que ha vist la suor i llàgrimes d'alguns moments d'aquesta tesi, que ha aguantat els nervis, les anades i vingudes, però sobretot perquè ha aguantat el més trist de treballar en ciència, la inseguretat laboral. Gràcies Vero.

PRÒLEG

La capacitat de regenerar és un tema que ha fascinat a la humanitat des de l'antiguitat. Es pot observar la seva presència en la cultura popular fins i tot en éssers de la mitologia grega com la hidra de Lerna, que mostraven el do de la regeneració, en aquest cas dels caps, com un dels seus poders sobrenaturals. Aristòtil, que va viure del 384 al 322 abans de Crist, ja havia observat aquesta capacitat en la natura i n'havia parlat en els seus textos. Amb el temps aquesta fascinació va esdevenir una àrea d'investigació científica i la mare de la biologia experimental. Encara avui però, resta distant de la seva meta final: regenerar, refer, reconstruir un teixit o un òrgan i que aquest sigui plenament funcional.

El quid de la qüestió és sens dubte perquè uns organismes mostren una capacitat de regeneració quasi il·limitada i d'altres en canvi la tenen confinada només a alguns teixits del seu cos. És a dir, perquè per exemple la salamandra pot regenerar extremitats, ulls, cor, cua i els mamífers no? Algunes teories parlen de que la regeneració seria un tret ancestral que s'ha perdut en molts llinatges al llarg de l'evolució i s'ha mantingut en altres. Sigui com sigui, el primer que hem d'entendre és com la natura ha mantingut el poder de regeneració en alguns organismes per després utilitzar aquesta informació i millorar la capacitat regenerativa dels mamífers.

Així doncs, quina és la base de la regeneració? Què permet reconstruir un teixit o un òrgan? Un primer pas necessari és tancar, cicatritzar la ferida que ha provocat la pèrdua de part del teixit u òrgan. Aquest procés és essencial per evitar la invasió d'agents patògens i per iniciar el creixement que ha de permetre la regeneració. També cal generar de nou el teixit perdut i, en la majoria dels organismes amb capacitat de regenerar això es produeix a través de la divisió cel·lular. Al conjunt de cèl·lules que s'acumulen darrera una ferida i que es divideixen activament per regenerar, s'anomena blastema. Aquesta fase de proliferació és doncs la clau de la regeneració i per tant, entendre com es forma, de quins tipus cel·lulars es forma, i com s'ho fa el blastema per produir de nou la part perduda de manera precisa són punts importants a resoldre. De fet, la capacitat de formar un blastema és possiblement el tret distintiu entre els organismes que poden regenerar i els que tenen aquesta capacitat limitada. Per últim queda una fase de formació del patró on s'han de restablir els diferents tipus cel·lulars i les diferents identitats pròpies de cada teixit. Aquestes tres fases però, no s'han d'entendre com a entitats independents sinó que s'ha de considerar que s'encavalquen al llarg del procés.

Aquesta tesi ha intentat aportar una mica més de llum al procés de regeneració i a la dinàmica de funcionament del blastema en un organisme model i molt versàtil genèticament com és *Drosophila melanogaster*. El treball ha estat dividit en tres parts o capítols on s'han estudiat i correlacionat les tres fases que caracteritzen el procés de regeneració, proposant en cada una d'elles un model de funcionament.

Una primera part tracta de com es tanca una ferida estudiant com l'epiteli malmès respon, quin és el mecanisme de cicatrització i quines vies genètiques poden estar al darrera. En un segon capítol, potser el cos principal de la tesi, s'ha fet èmfasi en descriure el mecanisme de regeneració en si. Així, s'ha estudiat l'origen i

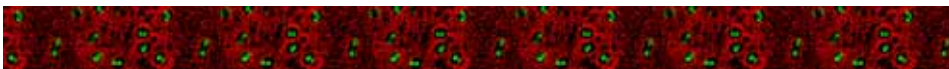
la dinàmica de proliferació del blastema al llarg de tot el procés per entendre millor com es construeix de nou el teixit de la part amputada. Per últim, un tercer bloc tracta bàsicament el desenllaç de la història, la formació de nou del patró del teixit eliminat. A *Drosophila* però, aquest últim punt va íntimament lligat amb la proliferació, ja que es donen simultàniament durant el desenvolupament, i per tant s'han de considerar conjuntament per entendre el funcionament de la regeneració. Aquest treball doncs, ajuda a conèixer millor com es produeix la regeneració a *Drosophila* i per tant podrà servir de base per entendre, ja des d'un punt de vista més molecular, com es regula tot el procés, quins gens hi intervenen, quines vies de senyalització necessiten ser activades, etc. Un cop conegut el nom propi dels gens responsables i assimilat tot el procés en *Drosophila* serà més fàcil aplicar la lliçó als altres organismes, entre ells l'home.

Índex

1. L'organisme model: <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.1. Cicle Biològic	1
2. El teixit estudiat: els discs imaginals	1
2.1. Estructura epitelial	3
2.2. Proliferació i mort cel·lular als discs imaginals	4
2.3. Formació del patró durant el desenvolupament	5
2.3.1. Formació del patró en el disc d'ala	6
2.3.2. Formació del patró en el disc de pota	8
3. El problema: La Regeneració	9
3.1. Etapes del procés de regeneració	9
3.2. Mecanismes per induir regeneració en els discs imaginals	11
3.2.1. Inducció de la regeneració per extirpació/fragmentació	13
3.3. Regeneració, Duplicació i Transdeterminació	15
3.4. Models de formació del patró durant la regeneració	17
3.4.1. Model de Coordenades Polars	17
3.4.2. Model de fronteres	18
4. Objectius	21
5. Article I: El procés de cicatrització en els discs imaginals i el paper de la via de senyalització de la JNK	23
5.1. Antecedents	23
5.2. Resum de l'article	24
5.3. Referència	25
6. Article II: Origen i formació del blastema. Paràmetres cel·lulars en la regeneració dels discs imaginals.	43
6.1. Antecedents	43
6.2. Resum de l'article	44
6.3. Referència	45
7. Article III: Estudi de la reformació del patró durant la regeneració pròxim-distal en discs imaginals de pota.	69
7.1. Antecedents	69
7.2. Resum de l'article	70
7.3. Referència	70
8. Discussió	83
8.1. El procés de cicatrització	84

8.1.1. La dinàmica d'epitelis durant la cicatrització _____	84
8.2. La dinàmica del blastema durant la regeneració _____	85
8.2.1. El blastema: definició i origen _____	86
8.2.2. Patrons de proliferació i mort cel·lulars _____	86
8.2.3. Anàlisi clonal durant la regeneració _____	88
8.2.4. El paper de dpp i wg durant la regeneració _____	90
8.3. El paper de la JNK en cicatrització i regeneració _____	91
8.3.1. La via de la JNK en la cicatrització _____	92
8.3.2. La via de la JNK en la regeneració _____	92
8.3.3. La funció de <i>puc</i> _____	93
8.4. Formació del patró durant la regeneració _____	94
8.4.1. La seqüència de regeneració en l'eix Pr/Ds _____	94
8.4.2. La regeneració en discs prepupals _____	96
9. Conclusions _____	99
10. Bibliografia _____	101

INTRODUCCIÓ



1. L'organisme model: *Drosophila melanogaster*

Els models principals emprats per estudiar la regeneració, entre ells esponges, planàries, anèlids, extremitats de vertebrats, pertanyen a espècies on fer genètica en sentit clàssic és molt difícil. Una excepció són els discs imaginals de *Drosophila*. Aquestes estructures embrionàries-larvàries que donaran lloc a pràcticament tota la cutícula de l'adult, tenen la capacitat de regenerar fragments extirpats durant la seva fase de proliferació. Per altra banda, *Drosophila melanogaster* és un organisme model en camps com el de l'herència genètica i el desenvolupament embrionari, amb un extens ventall de tècniques (cultius de cèl·lules i òrgans, immunocitologia, hibridacions *in situ*, etc.) que el converteixen en l'únic organisme amb un nivell de complexitat intermèdia capaç de permetre una aproximació tan multidisciplinària (Rubin, 1988).

1.1. Cicle Biològic

Coneguda comunament com la mosca de la fruita és un dípter d'uns 2-3mm de longitud. Té un desenvolupament holometàbol; és a dir, per passar de larva a adult ha d'haver-hi una metamorfosi completa. El seu cicle es divideix en tres grans etapes (Fig. 1): la primera comença quan la femella diposita els ous fecundats a l'exterior. En aquests ous s'iniciarà l'**embriogènesi** en la qual es determinarà la polaritat de l'embrió i s'originaran els discs imaginals, entre altres processos. Passades 22-26 hores, l'embrió surt de l'ou i comença una segona etapa on es produirà el **desenvolupament larval**. Aquest consta de tres estadis: LI (de 24 a 48 hores després de la posta; after egg laying AEL), LII (de 48 a 72 hores AEL) i LIII (de 72 a 120 hores AEL). En aquests estadis de desenvolupament larval té lloc el creixement dels discs imaginals i l'establiment en aquests del patró adult. Per últim, la larva esdevindrà crisàlide o pupa i començarà la tercera etapa on tindrà lloc la **metamorfosi**. En aquest procés els teixits larvals degeneren i són reemplaçats per la cutícula i les estructures adultes formades a partir dels discs imaginals i dels histoblasts.

2. El teixit estudiat: els discs imaginals

Els discs imaginals són sacs de cèl·lules que s'han invaginats de l'ectoderm de la larva, on resten connectats per mitjà d'un peduncle, fins al moment de la seva eversió per donar lloc a les estructures adultes. S'anomenen així per la seva forma discoide i perquè antigament s'anomenava "imago" a la forma adulta d'un insecte. La larva de *D. melanogaster* té 19 discs imaginals: 9 parells formen cap i tòrax, i 1 disc forma la genitèlia (Fig. 2).

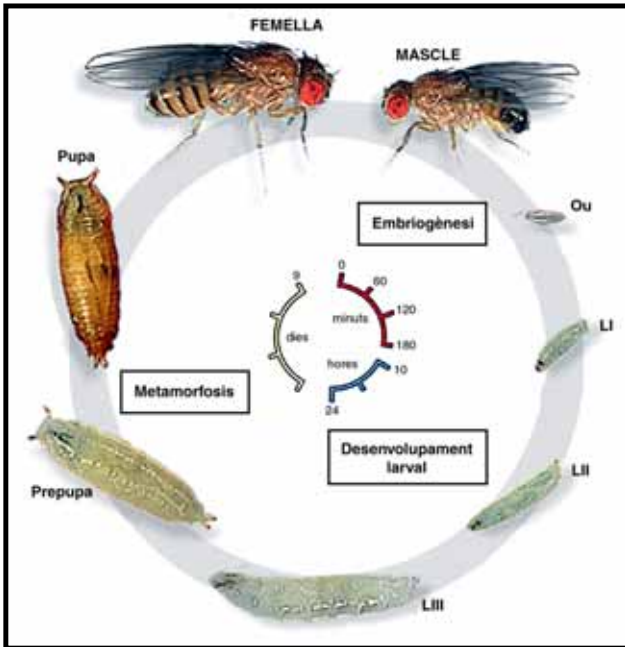
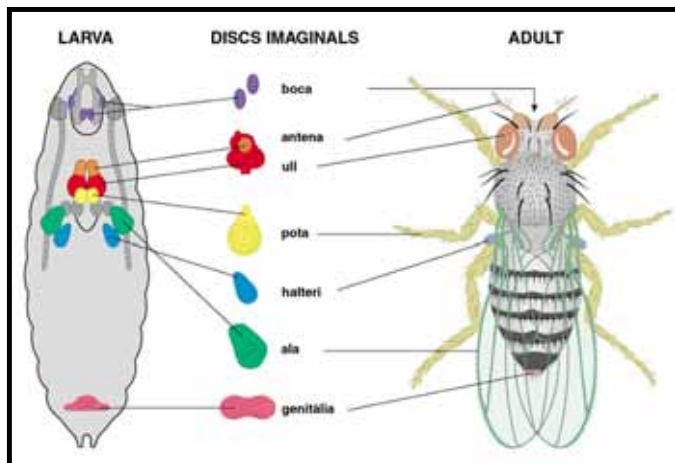


Figura 1. Cicle biològic de *Drosophila melanogaster* a 25°C. Adaptat de Flymove (Weigmann et al., 2003).

Figura 2. Els discs imaginals de *Drosophila melanogaster* localitzats en la larva i indicant les estructures que donaran en l'adult després de la metamorfosi. Adaptat de Wolpert et al. (1998).



Els precursors dels discs imaginals es determinen i es singularitzen a l'etapa de blastoderm cel·lular durant l'embriogènesi. Després de la retracció de la banda germinal, 9-10 hores AEL, comencen a invaginar-se de l'epidermis (Bate and Martinez-Arias, 1991). A l'estadi de LI contenen entre 20 i 70 cèl·lules i creixeran fins al final de LIII-inici de pupa arribant a valors d'entre 10.000 i 50.000 cèl·lules segons el disc.

2.1. Estructura epitelial

Estan formats per dos epitelis confrontats per les seves cares apicals (Fig. 3B,D). L'epiteli primordial és el que dona lloc als teixits i estructures de l'adult i és de tipus columnar (CE: **Columnar Epithelium**). A mesura que aquest epiteli creix es va plegant i va adquirint la morfologia pròpia de cada disc. L'altre epiteli s'anomena peripodial (PE: **Peripodial Epithelium**) i tot i ésser inicialment columnar es transforma en escamós amb cèl·lules aplanades i laxes a mitjans de l'estadi de LIII. Tot i que el paper del PE durant el desenvolupament ha estat menys estudiat, s'ha demostrat que intervé en processos de morfogènia (Milner et al., 1983) i en l'eversió dels discs durant la metamorfosi (Milner et al., 1984; Pastor-Pareja et al., 2004). També sembla tenir un paper important en la regulació de la proliferació i la formació del patró del CE a través d'unes prolongacions citoplasmàtiques entre els dos epitelis riques en tubulina i mitocondris que evidencien una capacitat de transport directe (Cho et al., 2000; Gibson and Schubiger, 2000). A més, els dos epitelis creixen en proporció durant els estadis larvals fet que suggereix una regulació coordinada del creixement (Gibson et al., 2002; Pallavi and Shashidhara, 2003). Així, es podria considerar el PE com una altra zona de desenvolupament diferent a la de CE amb uns requeriments genètics també diferents (Baena-Lopez et al., 2003).

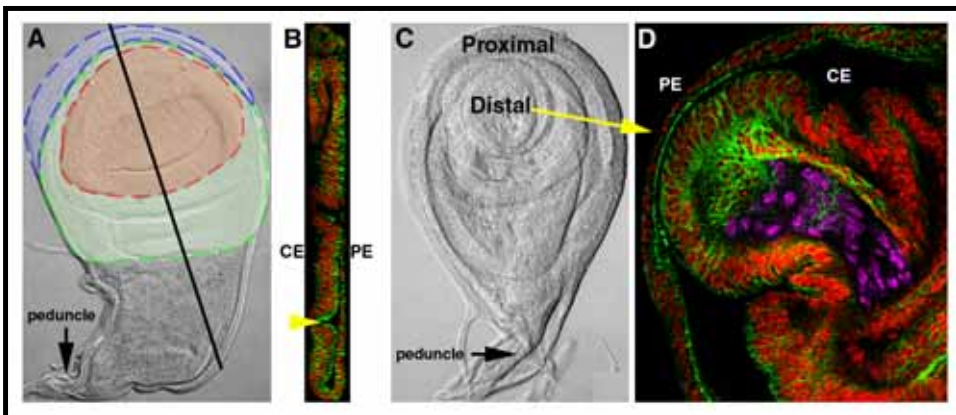


Figura 3. Estructura epitelial dels discs d'ala i pota de larva III tardana. (A) Disc d'ala. Ressaltat en vermell la regió que serà pròpiament l'ala (wing pouch, WP), en verd la regió de l'articulació amb el cos (hinge) i en blau la pleura (PL). S'indica el peduncle per on el disc queda unit a l'epidermis larval. (B) Tall z de confocal a nivell de la línia negra en A. Nuclis en vermell i Fasciclina III en verd. S'indiquen els dos epitelis (CE i PE) confrontats per la cara apical (punta de fletxa). (C) Disc de pota. S'indica la part distal (al centre), la proximal (a la perifèria) i el peduncle. (D) Pla confocal de la part distal (fletxa) d'un disc de pota vist de perfil. En vermell nuclis, i en verd Fasciclina III. En magenta s'han ressaltat els nuclis de les cèl·lules adipocel·lulars. S'indiquen els dos epitelis confrontats per la cara apical.

A part de les cèl·lules epitelials, els discs contenen entre l'epiteli i la làmina basal: neurones, cèl·lules traqueals, i cèl·lules adepitelials (Fig. 3D). Aquestes últimes, d'origen mesodèrmic, donaran lloc a la musculatura de l'adult (Holz et al., 1997) i, també es postula que poden intervenir en l'especificació d'estructures de CE com la regió del tars en els discs de pota (Percival-Smith and Hayden, 1998; Percival-Smith et al., 1997).

2.2. Proliferació i mort cel·lular als discs imaginals

El desenvolupament embrionari té lloc per un augment en la proliferació cel·lular però les cèl·lules cada vegada es van fent més petites. Per tant, es manté un volum fix d'embrió. En contraposició, el desenvolupament dels discs imaginals implica proliferació cel·lular però mantenint la mida de les cèl·lules. Per tant, el volum dels discs augmentarà a mesura que les cèl·lules vagin proliferant.

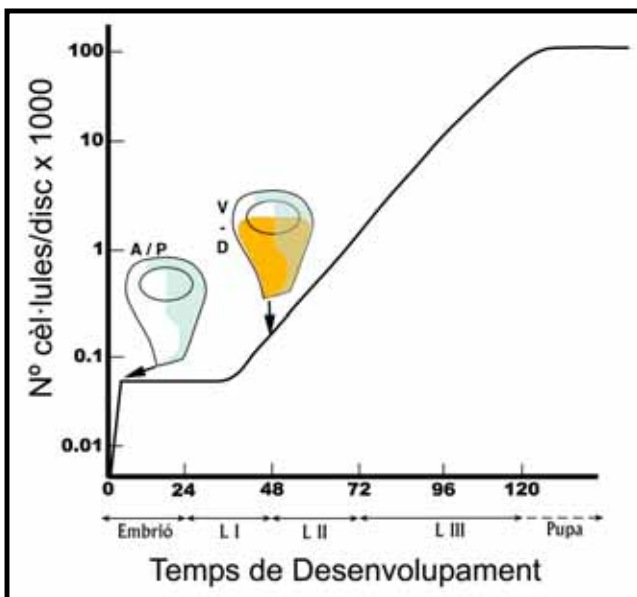


Figura 4. Corba de creixement dels discs imaginals de *Drosophila* durant el desenvolupament embrionari i larval. S'indiquen (fletxes) els temps de formació de les fronteres A/P (blau) i D/V (taronja). Els discs s'han representat en la seva mida i forma finals (LIII tardana).

Els discs creixen seguint una corba exponencial de proliferació (Fig. 4) durant tota la vida larval. Les cèl·lules del disc imaginal no proliferen a l'atzar sinó que ho fan en grups o "clusters" en les diferents fases del cicle cel·lular (Milán et al., 1996a). Les cèl·lules però, no progressen en el cicle a través dels clusters sinó que hi ha un procés de **sincronització**. Cada membre del grup és reclutat de cèl·lules veïnes que han passat, en temps diferents, una mateixa fase del cicle. Així doncs, la divisió cel·lular no és un fenomen clonal sinó que les cèl·lules d'un mateix grup poden provenir de llinatges cel·lulars diferents. En discs de LIII tardana aquesta sincronització en l'entrada a les diferents fases del cicle cel·lular es manté però el patró de proliferació ja no és homogeni com en estadis més joves. Regions com les

intervenes en els discs d'ala, funcionarien com a centres de proliferació; les venes i el marge de l'ala en canvi, resten sense proliferar (González-Gaitán et al., 1994; Milán et al., 1996b; Schubiger and Palka, 1987). Recentment, s'ha analitzat també l'orientació de les divisions cel·lulars durant el creixement dels discs imaginals. Aquesta orientació en el moment de la divisió juga una paper més important en la definició de la morfologia de les estructures adultes que la pròpia localització de les cèl·lules un cop dividides (Baena-Lopez et al., 2005).

El control del creixement dels discs depèn de varis factors, uns extrínsecs (hormones, nutrició, entre altres) i d'altres intrínsecs, autònoms dels propis discs (revisat a Day and Lawrence, 2000). Dintre els mecanismes intrínsecs cal destacar: la competència cel·lular, els fenòmens de compensació i els propis valors posicionals de les cèl·lules. La **competència cel·lular** permet que cèl·lules amb avantatge per proliferar es divideixin més ràpid que les menys avantatjades i per tant les acabin desplaçant de la població (de la Cova et al., 2004; Morata and Ripoll, 1975; Moreno and Basler, 2004). La **compensació** permet que si uns discs imaginals o zones concretes d'aquests estan malmesos, la resta (de discs o de teixit), mantinguin la seva mida normal i esperin a que els primers regenerin (Milán et al., 1997; Simpson et al., 1980). El **model de l'Entelèquia** (García-Bellido and García-Bellido, 1998) posa als propis **valors posicionals** de les cèl·lules com a mecanismes de control del creixement. Segons aquest model, les cèl·lules proliferen o moren d'acord a la seva identitat, al seu propi valor posicional integrat en el de les cèl·lules veïnes. La proliferació es produeix per intercalació mentre hi hagi diferències entre els valors posicionals de les cèl·lules i la mort apareix quan les diferències són inferiors al valor mínim propi de cada espècie.

La **mort cel·lular programada** o apoptosis, molt menys estudiada, també juga un paper important en el desenvolupament. És necessària en processos de canvis morfogenètics, formació de cavitats o tubs i, en l'eliminació de cèl·lules supèrflues. En diferents fases del desenvolupament de *Drosophila* es dona de forma organitzada en l'espai i el temps i és necessària per establir i mantenir les correctes densitats cel·lulars que es necessiten per una formació del patró eficient i precisa (Abrams et al., 1993; Milán et al., 1997). D'aquesta manera les proporcions correctes en el desenvolupament de les estructures adultes es mantenen a través d'una combinació de proliferació i mort cel·lular. Dita combinació assegura una plasticitat cel·lular en els processos de desenvolupament que permet un desenvolupament dinàmic d'acord a les circumstàncies (revisat a Bangs and White, 2000).

2.3. Formació del patró durant el desenvolupament

La formació del patró és el procés pel qual les cèl·lules adquireixen diferents identitats durant el desenvolupament. A *Drosophila* es pot explicar en tres fases concomitants (revisat a Lawrence and Struhl, 1996). Primer els discs es formen d'acord als eixos embrionaris ja establerts: anterior/posterior (A/P), dorsal/ventral

(D/V). Segon, les diferents regions adquireixen una expressió diferencial de gens. Un cop aquests gens queden activats, o no, es fixa el seu estat i així cada regió queda determinada per aquesta expressió diferencial. Tercer, les cèl·lules de regions adjacents interaccionen i porten a la formació de molècules difusibles o **morfògens** que organitzaran el patró de manera dosi-dependent és a dir, en funció de gradients de concentració. Alternativament i segons el model de l'entelèquia (García-Bellido and García-Bellido, 1998), són les interaccions entre cèl·lules les que organitzen la formació del patró enllloc dels gradients de concentració.

Experiments d'anàlisi clonal van permetre veure que tot i que la proliferació és ubiqua en tot un disc durant gran part del desenvolupament, existeixen restriccions de llinatge que les cèl·lules són incapaces de creuar. Aquestes restriccions per tant separen les cèl·lules d'un disc en diferents regions o **compartiments** (García-Bellido et al., 1973). Tant els discs d'ala com els de pota es formen amb els compartiments A i P ja establerts, heretant-los de les divisions A/P dels parasegments de l'embrió. Més endavant, en els discs d'ala, es forma una segona vora de restricció que separarà els compartiments D i V (Fig. 4).

Les **fronteres** entre compartiments són separacions perfectes entre dues poblacions de cèl·lules i per tant impliquen l'existència de mecanismes de segregació cel·lular perquè cèl·lules d'un compartiment no es barregin amb les del compartiment veí. Encara es desconeix com s'estableix aquest mecanisme de segregació però, la hipòtesi més acceptada proposa una adhesivitat o afinitat diferent entre cèl·lules; d'aquesta manera, les cèl·lules d'un mateix compartiment tendrien a maximitzar els contactes entre elles i a minimitzar-los amb les cèl·lules del compartiment adjacent (Morata and Lawrence, 1975). L'afinitat o adhesivitat cel·lular diferent entre compartiments juntament amb l'especificació de les estructures o patrons propis de cada compartiment és conseqüència d'una expressió diferencial de gens. Cada compartiment es caracteritza per l'expressió o la manca d'expressió d'un **gen selector** (García-Bellido, 1975). Aquesta expressió diferencial determina, fixa una identitat a tot el conjunt de cèl·lules d'un mateix compartiment sense fixar però, la contribució de cada cèl·lula al compartiment. Això confereix al sistema una flexibilitat capaç de compensar la pèrdua de cèl·lules.

2.3.1. Formació del patró en el disc d'ala

En la formació del patró del disc d'ala, el gen selector *engrailed* (*en*), que codifica per una proteïna amb domini homeòtic (d'unió al DNA), està ja expressat en el compartiment P. La seva funció com a gen selector és determinar que les cèl·lules del compartiment P formin només estructures P i alhora, evitar que aquestes cèl·lules es barregin amb les A (Morata and Lawrence, 1975; Tabata et al., 1995). Una de les seves funcions principals és activar *hedgehog* (*hb*) a les cèl·lules P i al mateix temps bloquejar que aquestes cèl·lules puguin respondre a aquest gen (Rodríguez and Basler, 1997; Zecca et al., 1995). HH per la seva banda difon fins a cèl·lules A que estan al costat de la frontera A/P on activa l'expressió de

decapentaplegic (*dpp*; Fig. 5A). D'aquesta manera HH regula la formació del patró en el compartiment P, on s'expressa, i en l'A, on actua (Basler and Struhl, 1994). DPP és un membre de la família dels TGF- β (Transforming Growth Factors- β) i actua de morfogen des del centre fins a les vores del disc. La seva funció principal és activar diferents gens segons la seva concentració per així, controlar el creixement i la formació del patró en els compartiments A i P (Capdevila and Guerrero, 1994).

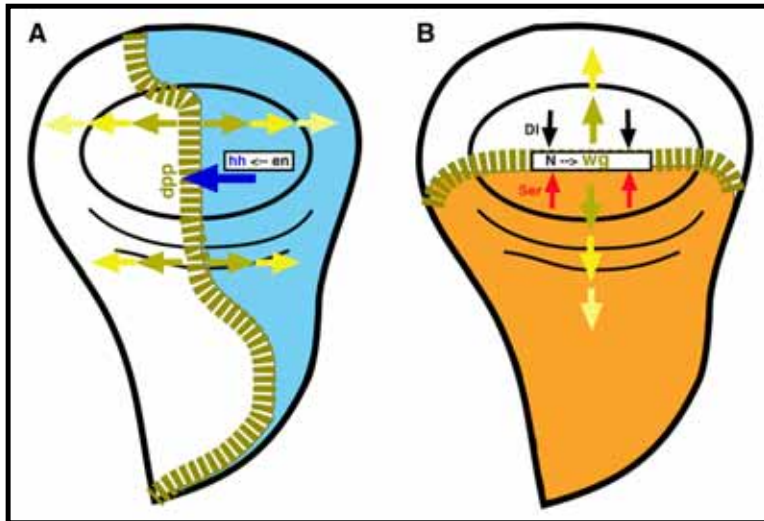


Figura 5. Formació del patró en el disc d'ala. (A) *en* a P (blau) activa *hh* que difon (fletxa blava fort) a cèl·lules A de la vora A/P on activa *dpp* (verd). DPP difon formant un gradient de concentració (fletxes verd a groc). (B) *Dl* (fletxes negres) des del compartiment V i *Ser* (fletxes vermelles) des del D (taronja) activen *N* a la vora D/V. *N* activa *wg* (verd) que difon formant un gradient de concentració (fletxes verd a groc).

Al final de l'estadi larval LI, inici de LII, apareix una segona restricció de llinatge en els discs d'ala, que separa els compartiments D i V. L'establiment d'aquesta nova frontera però, és més complexa que en el cas de la frontera A/P. Es requereixen més interaccions entre proteïnes i més interacció entre els dos compartiments per aconseguir mantenir la restricció de llinatge i activar la producció del morfogen que organitzarà el patró D/V a partir d'un gradient de concentració. En el mateix moment que apareix la frontera D/V es comença a expressar *apterous* (*ap*) al compartiment D, activat per la via de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor, Wang et al., 2000) i inhibit a V per *wingless* (*wg*), l'homòleg a *Wnt-1* de vertebrats (Williams et al., 1993). *ap*, com *en* a P, és el gen selector d'aquest compartiment D (Diaz-Benjumea and Cohen, 1993). La seva funció és per una banda fer que es segreguin les poblacions de cèl·lules D i V, donant a les D una afinitat cel·lular diferent a les V (Milán and Cohen, 2003) i, per altra banda, activar *fringe* (*fng*) i *Serrate* (*Ser*) al compartiment D i restringir

l'expressió de *Delta* (*Dl*) al compartiment V (Milán and Cohen, 2000). Aquests tres gens, *fng*, *Ser* i *Dl*, estan implicats en les interaccions cel·lulars que portaran a activar la via del receptor *Notch* (*N*); *Ser* i *Dl* ho fan com a lligands d'aquest receptor i *fng* com a modulador de les interaccions entre ells (Doherty et al., 1996; Fleming et al., 1997; Panin et al., 1997). *N*, que queda per tant activat a la frontera D/V, activarà per la seva banda a *wg* en aquesta frontera (Fig. 5B). *WG*, amb una funció diferent a la d'estadis més primerencs, serà l'encarregat d'organitzar el creixement i el patró al llarg de l'eix D/V a través de gradients de concentració (de Celis et al., 1996; Diaz-Benjumea and Cohen, 1995).

2.3.2. Formació del patró en el disc de pota

A diferència de les ales, les potes de *Drosophila* són apèndixs segmentats. Cada segment té les seves característiques pròpies i es pot diferenciar dels altres per la llargada, l'amplada, i el tipus, nombre i posició dels òrgans sensorials. Els diferents segments, de proximal (Pr) a distal (Ds) s'anomenen: coxa, trocànter, fèmur, tibia, tars (dividit alhora en 5 segments anomenats de 1 a 5) i pretars (PT; conté les dues urpes més distals de la pota). Cada segment de la pota adulta es troba especificat per un domini concèntric en el disc. Aquests dominis concèntrics es van formant de manera seqüencial per plegaments dels discs a mesura que aquests van creixent, quedant la part més Ds al centre i la part més Pr a la perifèria (Fig. 3C).

Quan es formen els discs de pota hereten la restricció de llinatge entre els compartiments A i P. Com en els discs d'ala, *en* és el gen selector de P i és l'encarregat d'activar *hb* que difondrà fins a cèl·lules A del costat de la frontera A/P. Aquí, *HH* activarà *dpp* i *wg* a regions D i V respectivament (Basler and Struhl, 1994). En els discs de pota no hi ha divisió de llinatge entre D i V i, la separació entre les dues regions es manté per les accions antagonistes entre *WG* i *DPP* (Brook and Cohen, 1996; Struhl and Basler, 1993), que a més formaran el patró al llarg de l'eix Pr/Ds a partir de gradients de concentració.

En els primordis dels discs de pota ja s'observen dos dominis d'expressió gènica diferencial en l'eix Pr/Ds que s'han heretat de l'embrió. En el centre del disc (futura part Ds) hi ha *Distal-less* (*Dll*), i a la perifèria (futura part Pr) hi ha *homothorax* (*hth*), ambdós amb dominis homeòtics. En estadi larval LII s'expressa un altre gen, *dachshund* (*dac*), entre els dos gens ja presents, i durant LIII expandirà el seu domini d'expressió. D'aquesta manera els discs queden dividits en diferents dominis a partir de la combinatòria d'aquests gens (revisat a Kojima, 2004). Aquests dominis els estableixen els gradient de *DPP* i *WG*: en regions d'elevada concentració regulen l'activació de *Dll*, en regions de concentració intermèdia l'activació de *dac* i, en regions de baixa quantitat de senyal, inhibeixen *hth* (Abu-Shaar and Mann, 1998; Lecuit and Cohen, 1997). D'aquesta manera *DPP* i *WG* especifiquen diferents regions discretes de l'eix Pr/Ds a partir de gradients de concentració, alhora que ajuden a formar el patró D i V respectivament.

En les zones de màxima concentració (la regió més Ds), WG i DPP activen *vein* (*vn*) que és el lligand de la via de l'EGFR. Aquesta via també s'activarà formant un gradient i regularà la formació del patró de les regions més Ds (Campbell, 2002; Galindo et al., 2002). El domini de *Dll*, el més Ds, es subdivideix per donar lloc als 5 segments tarsals i al PT. Aquesta divisió es duu a terme per processos d'intercalació de gens que aniran especificant les diferents regions (veure Article III: Fig. 5), tot i que cap d'aquestes regions correspondrà a un únic segment de la pota adulta. Aquests gens, anomenats PD perquè especificuen l'eix Pr/Ds, són entre altres: *C15*, *aristalless* (*al*), *Bar*, *ap*, *Lim1*, *bric-a-brac* (*bab*) i *rotund* (*rn*). Si bé l'activació d'aquests gens ve regulada pels gradient de DPP, WG i EGFR, el refinament de la seva localització ve donat per interaccions reguladores entre ells (revisat a Kojima, 2004).

L'especificació dels territoris on es formaran les articulacions de les potes també té lloc durant el desenvolupament dels discs. El procés és progressiu, seqüencial però, sense un ordre Pr/Ds clar. Està regulat per *N* i els seus lligands (*Ser*, *Dl*) i modulador (*fng*), els quals a la vegada estan regulats pels gens *hth*, *dac* i *Dll* (Rauskolb, 2001). La via de *N* a més, també es postula involucrada en regular de forma no autònoma el creixement dels disc de pota durant el desenvolupament larval (de Celis et al., 1998).

3. El problema: La Regeneració

La regeneració és la capacitat de generar o produir de nou una part del cos malmesa o amputada. Hi ha dues modalitats principals per les quals aquest procés pot tenir lloc (revisat a Wolpert et al., 1998): morfolaxis i epimorfosi. La **morfolaxis**, procés típic de *Hydra*, consisteix en reformar el patró complet a partir del teixit restant no malmès a través de la reespecificació cel·lular; no implica proliferació i per tant el resultat serà el patró sencer però en petit. L'**epimorfosi**, típic de planàries i de les extremitats dels amfibis, és un procés basat en la proliferació cel·lular, de manera que es restauen els elements perduts o malmesos durant el creixement del teixit.

Els discs imaginals de *Drosophila* principalment regeneren per un mecanisme d'epimorfosi (revisat a Baguñà, 2001): un grup de cèl·lules del voltant de la ferida o del teixit malmès es divideixen activament fins que es restaura el patró. No obstant això, no es descarten processos de reespecificació i per tant de morfolaxis, durant la regeneració epimòrfica.

3.1. Etapes del procés de regeneració

Un cop produïda una ferida, el primer pas en el procés de regeneració és cicatritzar-la, restablir la continuïtat de l'epiteli. El **tancament de la ferida** o **cicatrització** previndrà al teixit de l'entrada d'agents patògens, alhora que restablirà

la comunicació entre les cèl·lules de la vora permetent la regeneració del teixit malmès. Aquest procés de cicatrització ha estat estudiat en molts teixits diferents. A *Drosophila* ho ha estat en embrions (Wood et al., 2002), discs imaginals (Bryant and Fraser, 1988; Dale and Bownes, 1981; Mattila et al., 2005; Reinhardt and Bryant, 1981; Reinhardt et al., 1977), cutícula larval (Galko and Krasnow, 2004) i cutícula adulta (Rämet et al., 2002). Els mecanismes de cicatrització en els diferents teixits mostren similituds entre ells i amb processos morfogenètics que tenen lloc durant el desenvolupament. Això indica que moltes de les eines utilitzades per construir un teixit poden ser utilitzades també per reparar-lo i que per tant, el procés en si està bastant conservat (revisat a Martin and Parkhurst, 2004).

Un cop tancada la ferida, els valors posicionals de les cèl·lules de la vora d'aquesta ferida queden confrontats en els disc imaginals de *Drosophila*. L'aposió de cèl·lules amb valors posicionals diferents és un dels possibles estímuls per induir proliferació i per tant, formar el **blastema** (Reinhardt and Bryant, 1981). Altres processos com l'estrès o el fet de tenir un vora oberta a l'exterior, poden induir també la formació d'aquest blastema ja que es detecta proliferació cel·lular abans de que la cicatrització acabi (Dale and Bownes, 1980; O'Brochta and Bryant, 1987). En qualsevol cas, el resultat és que cèl·lules del voltant de la ferida augmenten la seva taxa de proliferació. Aquest blastema o conjunt de cèl·lules activament proliferatives, serà el que permetrà la regeneració del teixit perdut. En els òrgan o teixits que regeneren en tres dimensions és molt important també, la interacció amb el teixit subjacent per estimular la seva proliferació mitjançant el lliurament de factors de creixement. En canvi, en els òrgans o teixits com els discs imaginals, que regeneren en dues dimensions, la proliferació es produeix en el propi epiteli.

Durant la fase de proliferació del procés de regeneració i tal com succeeix durant el desenvolupament, té lloc també la **formació del patró**. En la formació del patró, les noves cèl·lules van adquirint les diferents identitats perdudes a conseqüència de l'amputació o tall fins a reproduir el mateix patró que s'aconsegueix en el desenvolupament. Globalment, els mecanismes que controlen la formació del patró i proliferació en estadis tardans de regeneració, semblen compartits amb els que controlen el desenvolupament. En concret, tant en el desenvolupament com en la regeneració, un mateix òrgan o teixit creixerà fins assolir la mateixa mida final per tant, els mecanismes que controlen el creixement han d'estar conservats (revisat a Potter and Xu, 2001). Per contra, la formació del blastema inicial sembla controlada per processos exclusius de la regeneració (Endo et al., 2004).

En aquesta tesi s'han tractat les tres etapes en que es divideix la regeneració: cicatrització, formació del blastema i formació del patró, en tres capítols diferents. Cada capítol inclou els antecedents (resultats, hipòtesis, teories i models) que hi ha de cada procés juntament amb els resultats d'aquest treball en forma d'articles.

3.2. Mecanismes per induir regeneració en els discs imaginals

La regeneració als discs imaginals es pot induir emprant metodologies diverses. Els mètodes més actuals empenen eines de caire químic, físic i/o genètic però, tot i el seu interès, no generen processos semblants al que és la regeneració típica.

Un d'aquests mètodes consisteix en induir **ablació cel·lular** i es pot aconseguir de diferents maneres, entre elles: irradiant amb UV o γ (ablació física) o, expressant el gen d'una substància tòxica per les cèl·lules (ablació molecular). Un exemple d'aquest últim cas és la cadena A de la ricina, molècula que inhibeix la síntesi proteica. Es pot controlar la síntesi d'aquesta toxina eliminant el pèptid senyal de secreció de la proteïna i a més, es pot utilitzar un al·lel sensible a la temperatura per controlar-ne el moment de síntesi (Moffat et al., 1992; Smith et al., 1996). Una altra manera d'induir ablació cel·lular és, utilitzant al·lells sensibles a la temperatura de gens letals cel·lulars com *suppressor of forked* (*su(f)*). Aquesta metodologia va permetre fer el primer rastreig de gens que poden regular o quedar afectats durant la regeneració (Brook et al., 1993).

Un altre mètode d'inducció de la regeneració és l'**expressió ectòpica** de gens clau en la formació del patró, com *en*, *hb*, *dpp*, *wg*, etc., generant així discontinuïtats posicionals. D'aquesta manera s'emula l'aposió de cèl·lules amb identitats posicionals diferents que té lloc durant la cicatrització d'una ferida però, en un disc intacte. Les discontinuïtats posicional generades per l'expressió ectòpica es resoldran per intercalació dels valors restants, per altra banda ja existents en el teixit, donant com a resultat un sobrecreixement o una duplicació (Bosch, 2000; Capdevila and Guerrero, 1994). Hi ha diverses tècniques per sobreexpressar gens (revisat a Brand et al., 1994) i, per aconseguir un major control del quan i on de l'expressió es poden utilitzar combinacions d'algunes d'elles:

- 1) Promotors sensibles a la temperatura. Aquests permeten activar el gen en un moment concret del desenvolupament aplicant un pols de calor (**heat-shock**) a l'animal. Aquest mètode permet regular l'expressió del gen variant la temperatura o la duració del heat-shock però, no és específic de teixits i a més pot presentar nivells basals d'expressió sense que s'hagi aplicat el pols de calor.

- 2) FLP recombinasa (**flipasa**) de *Saccharomyces cerevisiae*. Aquest enzim promou la recombinació entre dos **FRT** (Flipase Recombination Targets, dianes de recombinació de la flipasa). Si aquests FRT estan orientats en el mateix sentit, la recombinació duu a l'escissió de la seqüència existent entre elles. Per tant, si es col·loquen entre un promotor constitutiu (també pot ser sensible a la temperatura) i el gen d'interès, en produir-se la recombinació aquest últim queda sota el control del promotor (Fig. 6A). En aquest cas l'expressió es manté al llarg de tot el desenvolupament perquè està dirigida

per un promotor constitutiu, però no es dona en totes les cèl·lules sinó que es produeix en clons ja que el sistema no és efectiu al 100%. La formació d'aquests clons d'expressió gènica és a l'atzar i per tant, hi ha una variabilitat d'un individu a un altre.

3) Mètode **Gal4-UAS** (Brand and Perrimon, 1993). Consisteix en separar el gen d'interès del seu activador transcripcional en dues línies separades de mosques. Així, cada línia és viable i només en creuar-les el gen diana serà activat en la progènie. L'activador que s'utilitza és el Gal4 de llevat, que no té dianes endògenes a *Drosophila*. El Gal4 es clona darrera la seqüència del promotor que n'ha de dirigir l'expressió. El gen a sobreexpressar es fusiona darrera el UAS (Upstream Activation Sequence) que és la diana pel Gal4. Quan s'expressa el promotor s'indueix expressió del Gal4 el qual, s'unirà a les seqüències UAS i activarà el gen d'interès fusionat a aquesta seqüència (Fig. 6B). Aquesta tècnica permet determinar el lloc i el moment de l'expressió a través del promotor.

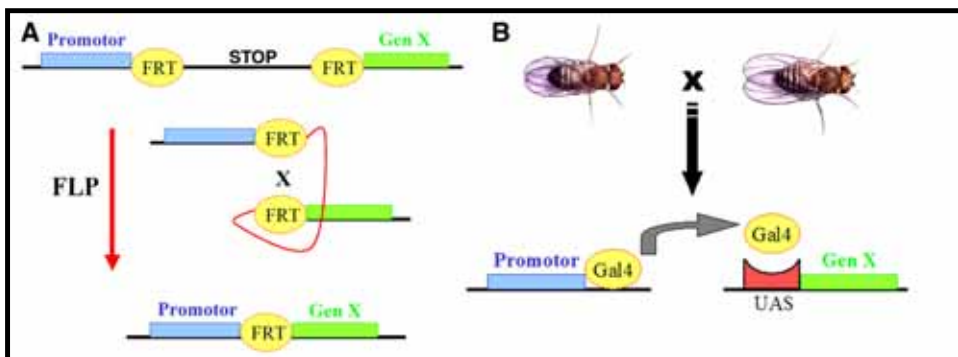


Figura 6. Tècniques de inducció de clons senzills i de sobreexpressió. (A) Tècnica de “flip out”. Els dos FRT en cis amb un codó stop entre ells. La FLP induirà la recombinació entre els FRT de manera que al final solament en queda un i sense el codó stop; per tant, el gen d'interès restarà activat pel promotor de davant el FRT. (B) Sistema Gal4/UAS per sobreexpressar gens. El gen d'interès (X) no pot ser activat fins que el Gal4 no s'uneixi a la seva seqüència de reconeixement (UAS). El Gal 4 està regulat a la vegada per un promotor que en determinarà el lloc i moment d'expressió.

En aquest treball s'han utilitzat aquests mètodes, de manera secundària i a mode de prova, per induir regeneració. Si que s'han utilitzat aquestes tècniques de manera important com a sistemes per monitoritzar l'expressió *in vivo* de gens (amb el sistema Gal4/UAS), per fer anàlisi clonal (amb el sistema FLP/FRT), o per fer estudis de llinatge (combinant els dos mètodes). La tècnica principal utilitzada per induir regeneració en els discs imaginals de *Drosophila* ha estat la d'extirpació/fragmentació. Un dels objectius d'aquest treball era aconseguir posar a

punt en el laboratori aquesta tècnica tan utilitzada en els estudis clàssics de regeneració per això, se'n farà una explicació més exhaustiva en el següent apartat.

3.2.1. Inducció de la regeneració per extirpació/fragmentació

La forma clàssica d'induir regeneració i la més utilitzada consisteix en tallar una part d'un teixit i cultivar el fragment a regenerar fins que el procés es completa. Aquesta metodologia implica la pèrdua de valors posicionals d'una manera neta, l'aposió dels valors posicionals restants en la vora de la ferida, i la generació de nou del teixit, aspectes que les diferents tècniques a dalt presentades no es podien abordar conjuntament i d'una manera clara.

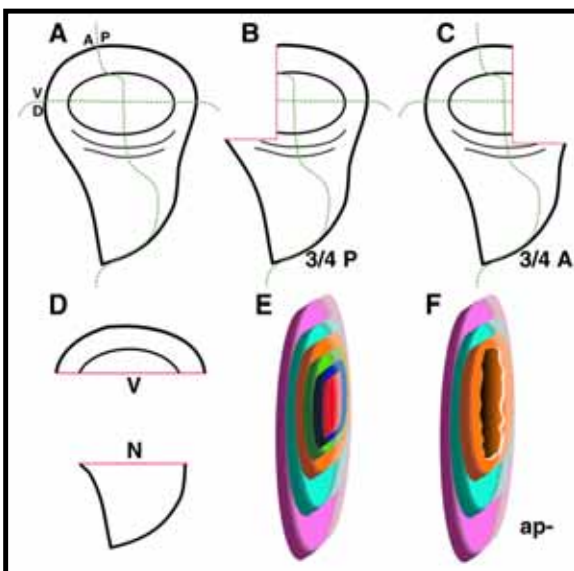


Figura 7. Esquemes dels principals talls realitzats. (A) Disc d'ala sencer utilitzat com a control. Les línies verdes marquen les vores de compartiments. Tots els discs estan orientats amb P a la dreta i D a baix. (B-D) Fragments generats en discs d'ala. Les línies vermelles indiquen el lloc de tall. (B) Fragment 3/4 P generat tallant en el compartiment anterior. (C) Fragment 3/4 A generat tallant en el compartiment P. (D) Fragments V (dalt) generats tallant en el compartiment ventral i D (baix) generats tallant en el dorsal. (E) Disc de pota sencer utilitzat com a control. Es representen alguns dels principals gens expressats al llarg de l'eix Pr/Ds del disc: *hth* (rosa), *dac* (blau cel), *rn* i *bab* (taronja), *ap* (verd), *Bar* (blau fort) i *al*, *Lim1* i *C15* (vermell). (F) Fragment ap- generat tallant per darrera de l'anell d'expressió d'*ap*.

La **dissecció** dels discs es va dur a terme utilitzant agulles de tungstè, esmolades per erosió amb nitrit sòdic. Es realitzava dins d'una gota de medi de cultiu de cèl·lules (medi Schneider, Sigma) per mantenir-los en les millors condicions possibles fins al moment d'implantar-los en l'hoste. Un cop disseccionats, es tallaven els discs de la manera desitjada utilitzant les mateixes agulles de tungstè. Els **talls** principalment estudiats han estat els 3/4 en els discs d'ala i els talls proximals en els discs de pota (Fig. 7), tot i que també se n'han practicat d'altres tal com es mostrarà en els resultats. Un cop tallats es procedia a adormir les mosques on s'implantaràn a raó de un disc per mosca, en sèries de 12-15 mosques. Les mosques s'immobilitzaven enganxant les ales a cinta adhesiva de

doble cara. La implantació es duia a terme utilitzant capil·lars amb punta bisellada i la punció es practicava a l'abdomen, entre el segon i tercer segment abdominal. Les mosques **hostes** eren femelles verges joves, on està descrit que és més fàcil la recuperació dels fragments implantats (Haynie and Schubiger, 1979); a més, tenen un abdomen prominent que en fa més fàcil la implantació. Un cop implantats els discs, es posaven les mosques en un tub de medi nou amb un paper de filtre que assecarà la ferida. El temps de **cultiu** anava des de les 5, 12 i 24 hores i de 2 a 7 dies per tenir una visió al llarg del temps de tot el procés. Les condicions de temperatura van ser sempre de 25°C. La **recuperació** dels discs o dels fragments de disc es feia submergint les mosques en etanol per tal de que perdessin la hidrofòbia de la seva cutícula, i després es submergien en el mateix medi de cultiu utilitzat per la dissecció. L'abdomen de les mosques s'obria i es manipulava utilitzant altre cop les agulles de tungstè fins que es trobava el disc. Un cop recuperada cada sèrie d'implants es procedia a la seva fixació, tinció i anàlisi. En cas de necessitar acumular més mostres es podien congelar les recuperades, en etanol o metanol segons si les mostres tenien, o no, expressió de GFP (Green Fluorescent Protein). El percentatge de supervivència dels hostes i de recuperació del teixit implantat era del 75-80%.

Existeixen altres mètodes de cultiu dels discs imaginals, utilitzant hostes o medis diferents, que tot i no haver estat utilitzats en aquest treball, cal esmentar:

1) Implantar els discs o fragments a l'interior de larves, on podran créixer fins que la larva entri en metamorfosi. L'individu adult resultant portarà en el seu interior el teixit adult derivat del fragment implantat i per tant es podrà estudiar quines estructures han regenerat i quines no. Aquesta metodologia normalment s'utilitzava després de períodes de cultiu en mosques adultes on es produïa el creixement i la regeneració i per tant, era només el sistema per veure el producte final de tot el procés. L'anàlisi d'aquest producte final (regenerat) però, era esbiaixat cap a estructures fàcils de reconèixer dels teixits adults i a més, presentava una alta variabilitat (Kirby et al., 1982).

2) Mantenir els discs dins la larva i produir el tall a través de la cutícula larval (Bryant, 1971; Postlethwait et al., 1971). Aquest sistema però, presenta els problemes de la poca precisió en el tall produït i la baixa supervivència de les larves.

3) Cultiu *in vitro*. Aquest sistema permet el creixement dels discs imaginals suplementant un medi de cultiu amb insulina, hormona juvenil i cossos grassos de larves. L'avantatge del sistema és que es pot monitoritzar tot el procés però, presenta el problema de que els discs tallats no aconseguixen cicatritzar ferides grans (Davis and Shearn, 1977; Shearn et al., 1978).

3.3. Regeneració, Duplicació i Transdeterminació

Un punt clau per entendre la regeneració ha estat conèixer abastament els diferents marcadors de les estructures adultes que ens permetran veure si hi ha hagut regeneració o no. Això es va aconseguir a través dels **mapes de destins** (Bryant, 1975). Aquests mapes es van obtenir a partir del cultiu de varis fragments de disc imaginal en larves a punt d'entrar en metamorfosis (Fig. 8). D'aquesta manera, quan la larva entra en metamorfosi, el fragment implantat també ho fa sense haver tingut temps per regenerar. El fragment un cop diferenciat mostra les diferents estructures que s'utilitzaran de marcadors. Així, els fragments on es permet el creixement i la regeneració (cultivats en adults) es compararan amb els mapes de destins per veure si hi ha hagut regeneració d'estructures noves i/o pèrdua d'estructures ja existents.

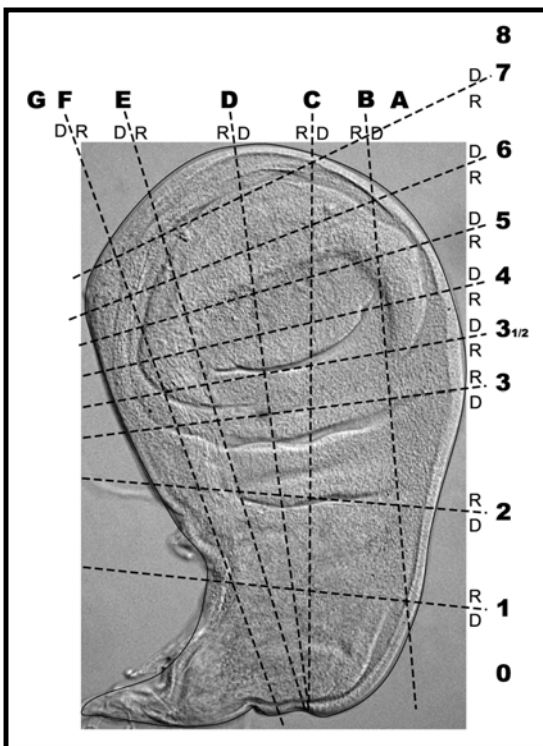


Figura 8. Esquema de talls en disc d'ala per fer el mapa de destins. S'indica per cada fragment si duplica (D) o regenera (R). Aquesta alternança regeneració-duplicació s'inverteix al centre del disc en ambdós plans. Adaptat de Bryant (1975).

Quan es talla un disc imaginal i es cultiva es poden donar diferents processos: el fragment pot duplicar estructures del seu propi patró, pot regenerar estructures no presents en el patró original, o pot regenerar estructures típiques del patró d'un altre disc imaginal a través d'un procés que s'anomena transdeterminació. Els tres processos estan associats sempre al creixement, a la proliferació de les cèl·lules del teixit restant, i la capacitat d'un fragment a regenerar, duplicar o transdeterminar

depèn majoritàriament de la seva posició original en el disc més que de la mida o el grau de dany produït en tallar (Schubiger, 1971). D'altra banda, la formació del patró durant els tres processos, igual que durant el desenvolupament, tampoc segueix una restricció de llinatge; és a dir, fent anàlisi clonal s'observa que el patró es forma a l'atzar respecte els clons (Lee and Gerhart, 1973; Postlethwait et al., 1971; Schubiger, 1971)

La **transdeterminació** tot i ser un fenomen clarament associat sempre a elevats nivells de proliferació depèn d'altres mecanismes ja que hi ha regions dels discs que transdeterminen més freqüentment que d'altres i s'ha observat també que es dona preferentment en el cultiu de discs de larves LIII tardanes més que no pas en discs més joves o ja prepupals (Lee and Gerhart, 1973). A més, la transdeterminació mostra una preferència en la direcció del canvi d'identitat; és a dir, un disc de pota per exemple, pot transdeterminar cap a ala més freqüentment que al revés, d'ala cap a pota (revisat a Maves and Schubiger, 2003).

La **regeneració** i la **duplicació** es donen normalment en fragments de disc complementaris, després de 7 dies de cultiu (Fig. 8). Impliquen un mateix fenomen: generar valors posicionals de nou però, en la regeneració els valors posicionals que es formen són els que s'havien perdut per amputació o dany en el teixit original; en la duplicació, els valors que es generen són els mateixos que han quedat en el teixit després de la ferida de manera que es produeixen dues còpies del patró en simetria especular (Bryant, 1975). Als dos processos els van anomenar amb un mateix terme, **regulació del patró**, per definir l'alteració dels destins cel·lulars que representaven, en resposta a una situació anormal durant el desenvolupament (Haynie and Bryant, 1976). Tot i donar-se en fragments complementaris es va observar més tard que no eren fenòmens exclusius ja que es podien donar ambdós en un mateix fragment (Karlsson, 1981; Kauffman and Ling, 1981; Schubiger and Schubiger, 1978) i, es va anomenar amb el nom de **regeneració duplicativa** al procés pel qual fragments que de normal haurien de duplicar també mostraven certes estructures regenerades (Karlsson and Smith, 1981; Kirby et al., 1982). Un punt interessant de la duplicació és que no implica que es dupliqui la mida del fragment inicial tal com seria d'esperar, degut en part a que no es duplica tot el patró i a que després del cultiu tan l'original com el duplicat són més petits (Adler, 1981). Això porta a pensar que la regulació del patró podria ser un procés híbrid entre l'epimorfosi i la morfolaxis.

Altres processos que es poden observar, associats sempre a la regeneració i/o duplicació, són: la multiplicació d'unitats i l'aparició d'estructures supernumeràries. La **multiplicació d'unitats** consisteix en l'aparició d'un marcador característic del patró, de manera repetida. Aquest fenomen es diferencia de la duplicació perquè aquesta implica que tot el patró present en el fragment original es repeteix un cop i queda separat formant una imatge especular amb l'original (Schubiger, 1971). Les **estructures supernumeràries** són un fenomen observat sobretot en experiments d'implants en extremitats d'escarabats o d'amfibis i, consisteixen en regenerar més d'una vegada l'extremitat en qüestió (Bryant et al., 1977).

3.4. Models de formació del patró durant la regeneració

Tal com hem vist en l'apartat anterior, des de finals dels 60s a finals dels 80s es varen publicar nombrosos treballs sobre regeneració de discs imaginals. Una conclusió important d'aquests treballs va ser que les cèl·lules havien de saber on estaven exactament en una extremitat per saber quines parts havien de regenerar després d'una amputació (Bohn, 1976). Aquesta qüestió va portar a definir el valor posicional com a un paràmetre cel·lular (Wolpert, 1971; Wolpert, 1989) i el que diferenciava als dos models principals que es van proposar per explicar el mecanisme de la regeneració era com s'establia aquesta **informació posicional**.

3.4.1. Model de Coordenades Polars

Aquest model parteix de dues premisses: 1) la regeneració és bàsicament epimòrfica i 2) cada cèl·lula té un únic valor posicional a partir de dos components; un component defineix la posició en la circumferència, dividida en 12 coordenades meridionals anomenades de 1 a 12 a mode de rellotge, i l'altre defineix el nivell Pr/Ds en termes de coordenades radials anomenades d'A a E (Fig. 9). Així 2 sistemes de coordenades són suficients per descriure la posició de qualsevol cèl·lula en un model de 2 dimensions (Bryant et al., 1977).

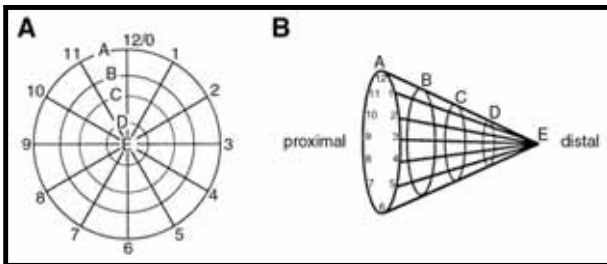


Figura 9. Model de Coordenades Polars. (A) Defineix la posició de les cèl·lules en un disc a partir de coordenades en la circumferència (1-12) i en el radi (A-E). Les posicions en el radi defineixen l'eix Pr/Ds (B). Adaptat de Bryant i col. (1981).

Aquest model explicava els resultats publicats sobre regeneració a partir de dues **regles**: la regla de la intercalació per la via més curta (Bryant et al., 1977; French et al., 1976) i la regla de la transformació distal o distalització (Bryant et al., 1981). La primera regla postula que en confrontar-se cèl·lules amb valors posicionals diferents es produeix una intercalació de valors intermedis però sempre en la direcció que impliqui menys teixit a formar. La segona regla considera que si els valors intermedis adoptats en la intercalació són iguals als existents en les cèl·lules confrontades, les noves cèl·lules seran forçades a tenir un valor més distal.

El primer model de coordenades polars que es va proposar considerava els valors posicionals distribuïts de manera uniforme en tot el teixit. Més endavant però, es va modificar per un sistema de coordenades asimètric a partir d'estudis sobre la distribució del potencial de regeneració en els discs imaginals i sobre les

capacitats de regenerar o duplicar dels diferents fragments. Així, on la freqüència de regeneració d'un fragment diferia de la freqüència de duplicació del complementari, indicava l'existència d'una desigualtat en la distribució dels valors posicionals (Karlsson, 1981).

El desenvolupament de les diferents extremitats també es podia explicar a partir d'aquest model si es considerava que el creixement es donava fins a assolir un patró de valors posicionals complet. Així, tal com s'havia suggerit (Wolpert, 1971), molts organismes diferents tindrien el mateix mecanisme bàsic (universal) per especificar la informació posicional i les diferències entre organismes apareixerien perquè les seves cèl·lules interpretarien de manera diferent aquesta informació posicional.

3.4.2. Model de fronteres

Aquest model tenia en compte ja l'existència dels compartiments en els discs imaginals i proposava que a les fronteres entre compartiments, les cèl·lules interaccionaven produint un morfogen que difonia en forma de gradient de concentració per tot el teixit (Meinhardt, 1983). D'aquesta manera l'estímul de proliferació en la regeneració no ve produït per la cicatrització d'una ferida (com en el model anterior) sinó per la **confrontació de compartiments**. El concepte de informació posicional i de com es forma, que en el model de coordenades polars no quedava clar, en el model de fronteres es defineix a partir de: 1) fronteres, respecte les quals s'especifica la posició, 2) gradient, que indica la distància a la frontera, i 3) polaritat, que indica la direcció per la qual la posició es mesura respecte la frontera (Wolpert, 1989).

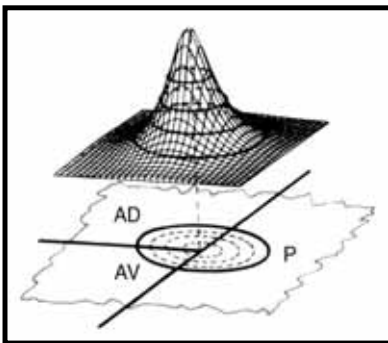


Figura 10. Model de les Fronteres. Les cèl·lules a la frontera entre compartiments interaccionen produint morfògens que difonen regulant la formació del patró en les dues dimensions del pla i en l'eix Pr/Ds. Adaptat de Meinhardt (1983).

Segons aquest model, per tenir una estructura sencera (en el cas que va considerar Meinhardt, la pota) es requereix la presència de tres compartiments: A-D, A-V i P (Fig. 10). Les fronteres entre compartiments actuaran com a centres organitzadors perquè d'elles difondran morfògens o molècules senyal que establiran el patró de cada disc. A més, en la regió on els tres compartiments

conflueixen (centre del disc) s'activa un morfogen que difondrà organitzant el patró al llarg de l'eix Pr/Ds. Així doncs, per regenerar una estructura es requeria primer una reespecificació compartimental que permetés de nou la formació de fronteres, cosa que podia implicar fenòmens de morfolaxis. En casos on no hi haguessin els tres compartiments és quan es produiria la duplicació d'estructures.

Anys més tard, es va validar i modificar lleugerament aquest model introduint les bases moleculars ja descobertes: *en*, *hb*, *dpp* i *wg* (Campbell and Tomlinson, 1995). Al fer experiments d'expressió ectòpica veuen que el creixement distal s'organitza on coincideixen les senyals de *wg* i *dpp*, i consideren aquesta regió com l'origen de l'organitzador distal que ha de controlar l'especificació i el creixement al llarg de l'eix Pr/Ds. Estudis sobre regeneració d'extremitats en grills (*Gryllus binaculatus*) també donen suport a aquest **model modificat de les fronteres** a partir de la observació dels patrons d'expressió d'*hb*, *wg* i *dpp* (Mito et al., 2002).

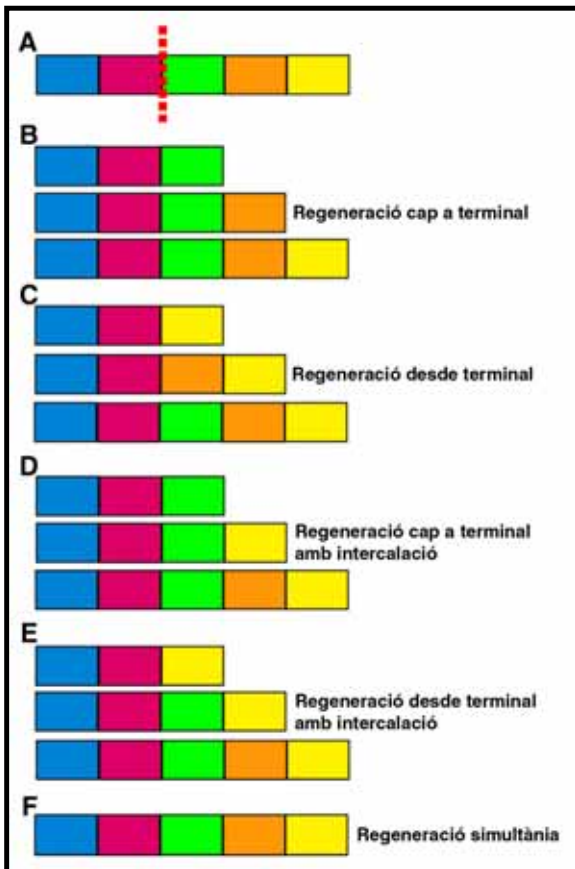
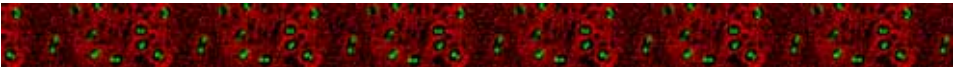


Figura 11. Mecanismes de regeneració dels valors posicionals perduts. (A) Representació d'un patró on cada color indica un valor posicional. La línia segmentada en vermell indica el lloc de tall. (B-F) Representació de diferents seqüències d'aparició dels valors. (B) Seqüencialment, del més proper al més llunyà a la vora de la ferida. (C) Seqüencialment, del més llunyà al més proper a la vora de la ferida. (D) Igual que B però intercalant algun valor llunyà abans que algun altre més proper. (E) Igual que C però intercalant algun valor proper abans que algun altre més llunyà. (F) Regeneració simultània, no seqüencial.

Tot i que el model de coordenades polars va assolir una fama notable, en el fons era (i és) un model formal; és a dir, un model que redescriu el que passa sense explicar per què passa d'aquesta manera i no d'una altra. Per contra, el model de fronteres, tot i ser un model teòric, es va mostrar molt més sòlid al basar-se en la realitat dels compartiments i en ser el primer model a postular les vores dels compartiments com a zones d'organització o organitzadors.

No obstant, resten encara qüestions que cap dels dos models ha resolt. Les estructures supernumeràries observades en experiments d'implants en escarabats (del gènere *Tenebrio*), no els explica clarament cap model. En aquests experiments rotaven una pota 180° invertint així els eixos A/P i lateral/medial i obtenien estructures supernumeràries en diferents posicions i orientacions. Els dos models prediuen l'aparició d'aquestes estructures supernumeràries però, en posicions i orientacions constants (French, 1986). A part, tot i que els dos models expliquen que en la regeneració es restauren els valors posicionals perduts, no expliquen com aniran apareixent aquests valors. Quins regeneren primer: els més propers o els més allunyats de la ferida? I després: la resta de valors apareix seguint un ordre o es van intercalant entre ells? Veure Figura 11 per possibles mecanismes de regeneració.

OBJECTIUS



4. **Objectius**

Els objectius d'aquest treball comporten per una banda, l'inici del projecte de l'estudi de la regeneració en *Drosophila melanogaster* en el laboratori posant a punt, la metodologia clàssica per induir regeneració i diferents tècniques d'anàlisi que s'han utilitzat. Per altra banda, i de manera més específica, els objectius d'aquesta tesi representen una redescrípció, emprant eines modernes, dels paràmetres bàsics del procés de cicatrització i regeneració als discs imaginals així com, un abordatge a algunes preguntes que restaven encara sense resposta, almenys de manera clara. Entre aquestes qüestions caben destacar: 1) com cicatritzen els discs imaginals de *Drosophila* i quines vies de senyalització ho controlen? 2) La regeneració, és un procés purament epimòrfic és a dir, basat en la proliferació, o hi caben processos de morfolaxis que impliquen remodelació del teixit existent? 3) En cas de ser només epimòrfic, com es forma i quina dinàmica segueix el blastema de regeneració i, com es correlacionen els patrons de proliferació i la formació d'estructures? 4) D'on provenen les cèl·lules formades de nou i en quin ordre o sentit apareixen els valors posicionals: de proximal a distal, al revés o bé hi ha processos d'intercalació?

En concret, s'han dut a terme els següents objectius:

1.- Posada a punt de la tècnica d'aïllament, fragmentació, implantació, extracció i observació dels discs imaginals d'ala i pota en regeneració de *Drosophila*.

2.- Estudi del procés de cicatrització, emprant *puckered (puc)* com a marcador i analitzant el paper del citoesquelet d'actina durant el procés.

3.- Ús de mutants i formes dominant negatives de diferents elements de la via *Jun kinasa N-terminal (JNK)* per esbrinar si la via és necessària tan en el procés de cicatrització com en el de regeneració.

4.- Descripció de la dinàmica de proliferació durant la regeneració analitzant les fases S i M del cicle cel·lular, correlacionant el patró observat amb el procés de cicatrització.

5.- Descripció de la dinàmica de mort cel·lular durant la regeneració, analitzant si és un procés necessari i correlacionant el patró observat amb els patrons de proliferació.

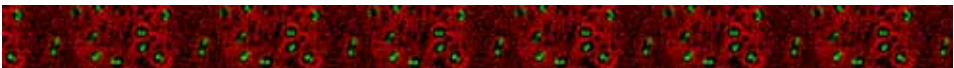
6.- Anàlisi de la dinàmica de proliferació i del mecanisme de regeneració emprant la tècnica d'anàlisi clonal de clons senzills, correlacionant el resultat amb els patrons de fase S, M, mort cel·lular, així com amb el procés de cicatrització.

7.- Estudi del llinatge cel·lular de les cèl·lules de la vora de la ferida en fragments de discs d'ala, emprant *puc-Gal4*, per intentar definir l'origen del teixit nou regenerat. Ús també de la tècnica de llinatge cel·lular per veure si la regeneració manté les restriccions dels compartiments observades durant el desenvolupament.

8.- Anàlisi de l'aparició de diferents dominis d'expressió gènica al llarg de l'eix Pròxim/Distal (Pr/Ds) durant la regeneració en discs de pota.

9.- Estudi del llinatge cel·lular de les cèl·lules de la vora de la ferida en fragments de discs de pota per veure si hi ha fenòmens de desdeterminació i, la direcció de la regeneració al llarg de l'eix Pr/Ds.

CAPÍTOL I



5. Article I: El procés de cicatrització en els discs imaginals i el paper de la via de senyalització de la JNK

5.1. Antecedents

El procés de cicatrització és el pas previ a la regeneració provocada per una ferida o per l'amputació d'estructures. En primer lloc, és essencial per aïllar el teixit malmès de l'exterior i per evitar la intrusió d'agents patògens. Segonament, té un paper molt important en l'estimulació de la regeneració, entenent aquesta com el resultat d'interaccions cèl·lula-cèl·lula entre cèl·lules normalment no adjacents que hi queden després de la cicatrització (Dale and Bownes, 1985).

La cicatrització en els discs imaginals té lloc en les primeres 24-48 hores de regeneració i no implica reorganització de cèl·lules lluny de la ferida (Bryant and Fraser, 1988). Es va descriure el procés utilitzant la microscopia electrònica (Reinhardt and Bryant, 1981; Reinhardt et al., 1977). Aquesta tècnica va permetre observar la formació de **contactes**, anomenats **heterotípics**, entre l'epiteli PE i el CE en les primeres hores del procés. Més tard aquests contactes es perden i es formen **contactes homotípics** entre cèl·lules d'un mateix epiteli. Aquests contactes homotípics entre cèl·lules adjacents per la cicatrització, es van proposar estar involucrats en les interaccions cel·lulars que controlaran la regeneració (Reinhardt and Bryant, 1981). Tot i així altres treballs on s'estudiava la cicatrització conjuntament amb la regeneració van demostrar que tot i que els màxims nivells de proliferació són observats en fragments ja cicatritzats, les cèl·lules de la vora de la ferida comencen a proliferar abans que finalitzi la cicatrització i s'hagin pogut produir els contactes homotípics (Karpen and Schubiger, 1981; Kiehle and Schubiger, 1985; O'Brochta and Bryant, 1987). A més, el retard de la cicatrització induït per microcauterització de la ferida tampoc frena la proliferació cel·lular associada a la regeneració (Dale and Bownes, 1981). Aquests resultats deixen oberta doncs la problemàtica de l'estímul inicial de la regeneració podent ser, entre altres, la formació dels contactes heterotípics o, el simple fet de tenir una vora tallada lliure. Més recentment, s'ha demostrat com cèl·lules del PE en fragments 1/4 A de discs de pota, que en teoria haurien de duplicar, poden estimular (a través dels contactes heterotípics) cèl·lules del CE a adquirir identitat posterior i així, permetre la regeneració (Gibson and Schubiger, 1999).

Tot i aquests treballs però, no queda encara especificat el mecanisme pel qual té lloc el procés de cicatrització. Si que es coneixen però altres processos morfogènics que tenen lloc durant el desenvolupament de *Drosophila* que comporten un tancament d'epitelis equivalent al que succeeix durant la cicatrització. Aquests processos són el tancament dorsal de l'embrió i el tancament toràcic en la pupa. En el **tancament dorsal** les cèl·lules epidèrmiques, després de la retracció de la banda germinal, acabaran de cobrir la part dorsal de l'embrió per

sobre de l'amnioserosa. El tancament es produeix a partir de la contracció d'un cable d'actina al voltant de la vora de l'epidermis, contactes entre cèl·lules a través de filopodis i, a través de forces d'estira i arronsa entre l'epidermis i l'amnioserosa (Glise et al., 1995; Jacinto et al., 2002; Martin-Blanco et al., 1998). En el **tancament toràcic** els dos discs d'ala després d'evertir, es fusionaran pels nòtums donant lloc al tòrax. Aquest procés també té lloc amb l'ajuda de filopodis d'actina i de forces d'estira i arronsa (Agnes et al., 1999; Martin-Blanco et al., 2000; Zeitlinger and Bohmann, 1999). Recentment a més, s'ha demostrat que també hi intervenen processos de transició epiteli-mesènquima (EMT; epithelial-mesenchymal transition) que donaran una major capacitat dinàmica, invasiva al CE (Pastor-Pareja et al., 2004). D'altra banda, s'ha estudiat el procés de cicatrització en diferents teixits com ara l'epidermis embrionària, l'epidermis larval o la cutícula adulta de *Drosophila* i, en tots els casos també s'ha observat un paper molt important del citoesquelet d'actina (Galko and Krasnow, 2004; Rämetsch et al., 2002; Wood et al., 2002).

Tots aquest processos de tancament i de cicatrització pròpiament tenen en comú que són controlats, entre altres, per la via de senyalització de la *Jun Kinasa N-terminal* (JNK). *puckered* (*puc*, Martin-Blanco et al., 1998) és un gen activat per aquesta via i, una de les seves funcions és la d'inhibir la via fent un loop negatiu. L'expressió de *puc* s'ha fet servir en molts casos com a marcador de l'activitat de la via i s'ha vist sempre en la vora dels epitelis que han de tancar-se. A més, mutants d'aquesta via, com per exemple *hemipterous* (*hep*; *Jun kinase kinase*), *basket* (*bsk*; *Jun kinase*), o *Dfos*, donen fenotips de manca de tancament i de cicatrització (Glise et al., 1995; Zeitlinger and Bohmann, 1999; Zeitlinger et al., 1997).

Amb tots aquest resultats al darrera, es va dur a terme un estudi del procés de cicatrització en els discs imaginals de *Drosophila melanogaster* analitzant-ne el comportament dels dos epitelis, del citoesquelet d'actina i, el mecanisme de tancament. També es va analitzar el paper de la JNK durant el procés, monitoritzant-ne l'activitat i estudiant els fenotips mutants.

5.2. Resum de l'article

S'ha examinat el procés de cicatrització durant la regeneració de fragments de discs d'ala de *Drosophila* utilitzant la microscopia confocal i, s'ha valorat el paper d'alguns components de la via de senyalització de la JNK durant aquest procés. Després de tallar, les cèl·lules de la vora de la ferida dels epitelis columnar i peripodial comencen a tancar la ferida a través de la formació i la contracció d'un cable d'actina. A més, també té lloc un procés de tancament a partir de filopodis emesos per cèl·lules dels dos epitelis que, cosiran la vora de la ferida formant una cremallera des del centre o vèrtex de la ferida cap als seus extrems. L'activació de la via JNK està involucrada en aquest procés. L'expressió de *puc* s'indueix en vàries fileres de cèl·lules a la vora de la ferida, mentre que la manca d'activitat de la via, aconseguida utilitzant mutants per *hep*, *bsk*, o *Dfos*, impedeix la cicatrització.

Aquests defectes van acompanyats a més, per una disminució de l'expressió de *puc*. Donant suport al paper de *puc* en la cicatrització, s'han rescatat mutants per *hep* reduint la funció de *puc*, i s'ha inhibit la cicatrització sobreexpressant-lo. En conjunt doncs, aquests resultats demostren un paper de la JNK en la cicatrització dels discs imaginals semblant a l'observada en processos com els tancaments dorsal i toràcic i, semblant també a la cicatrització de l'epidermis embrionària, l'epidermis larval o de la cutícula adulta de *Drosophila*.

5.3. Referència

Dev Biol (2005) **280**, 73-86

De la pàgina 27 a la 40 d'aquesta tesi consta l'article científic: *JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating Drosophila wing imaginal discs*. Aquest article es troba publicat a la revista *Developmental Biology*, amb referència: *Dev Biol* (2005) 280, 73– 86.

A través de la Universitat de Barcelona es té accés on-line al format pdf de l'article:

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6WDG-4FF8WJ9-1-1&_cdi=6766&_user=145085&_orig=search&_coverDate=04%2F01%2F2005&_sk=997199998&_view=c&_wchp=dGLbVlz-zSkWW&_md5=e51550098a8f41b4dfe8fd5c7d5cef26&_ie=/sdarticle.pdf

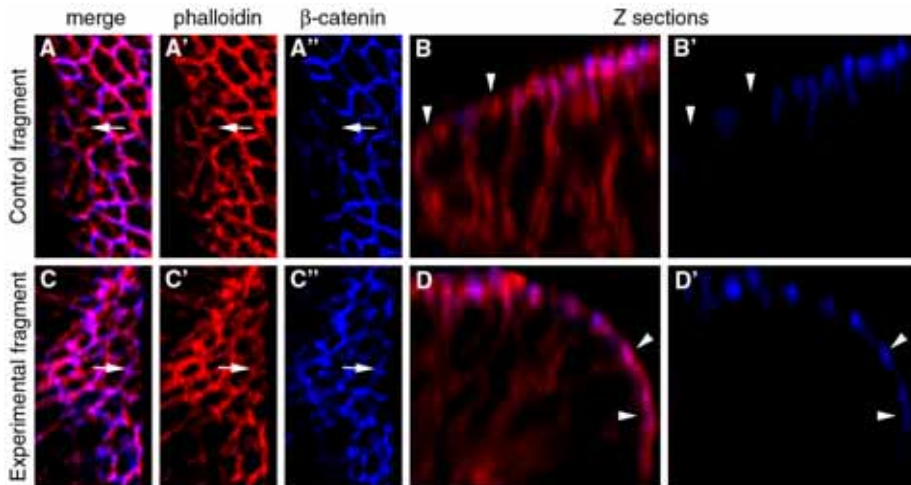
Supplemental Data

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) during wound healing.

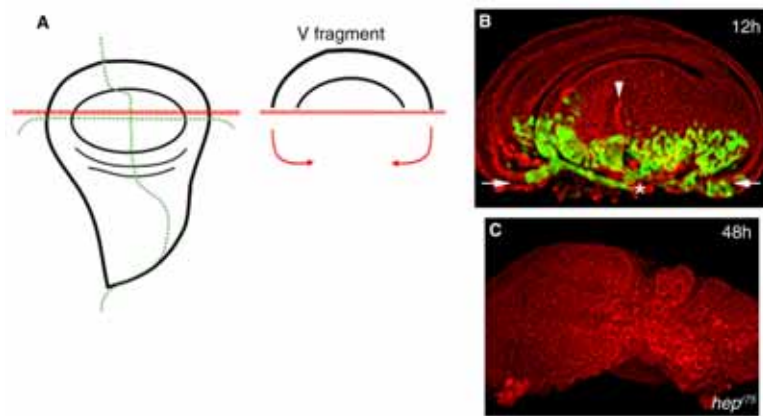
To further investigate cellular and epithelial changes that take place during the wound healing process in wing imaginal discs, we looked for evidences of EMT. EMT implies a change in cell morphology, loss of cell-cell adhesion, and activation of migratory abilities. It is a key process for morphogenesis during embryonic development. In intact epithelia, β -catenin protein is specifically localized in the apical part of cells, in the adherens junctions. During EMT however, β -catenin, like other cell adhesion proteins, disappears from its apical position and accumulate in the nucleus (reviewed in Lee et al., 2006). To study β -catenin localization, wing discs from *en-Gal4; UAS-GFP/UAS- bsk^{DN}* were cut to produce 3/4 control and experimental fragments (see Fig. 5 for comparison). After 6 h of *in vivo* culture, β -catenin decreased at the LE in control fragments (Suppl. Fig. 1A-B'). In experimental discs, however, where cuts were performed on the P compartment overexpressing the *bsk^{DN}*, this decrease was not detected and β -catenin expression remained in the LE cells (Suppl. Fig. 1C-D').

Wound healing in ventral (V) and notum (N) wing fragments.

3/4 fragments of wing imaginal discs heal the wound by a proximal-distal and basal-apical zippering process completed at 24 h of culture. To study the process in different regenerating fragments we performed a cut inside the V compartment parallel to the DV boundary, generating a complete V fragment (Suppl. Fig. 2A). This fragment shows a lineal LE instead of the 90° angle generated in 3/4 fragments, and wound healing is more complex. V fragments however, healed similarly to 3/4 fragments but with a delay. Therefore, a complete healed morphology was not observed until 48 h. After 12 h of *in vivo* culture, V fragments curled the A and P tips of the wound contracting them towards the wound vertex; as a consequence, folds appeared in the middle of the wing pouch (Suppl. Fig. 2B). Moreover, JNK signalling pathway activity, monitored through *puc* expression, was strongly activated in LE cells at 12 h. In addition, under *hep^{r75}* mutant conditions V fragments remained unhealed after 48 h of culture (Suppl. Fig. 2C). This supports the JNK signalling pathway as a main player in wound healing processes.



Suppl. Fig. 1. Effects of *bsk^{DN}* mutants on EMT during wound healing. Triple staining: *en* expression domain (not shown; *en-Gal4; UAS-GFP/UAS-bsk^{DN}*), phalloidin (red) and β -catenin (blue). Only insets of the LE are shown. Discs orientation: P right, V up. (A-B') Control fragment after 6 h of culture. (A-A'') Confocal section of the LE cells. β -catenin expression decreases at the LE cells (arrows). (A', A'') red and blue channels respectively. (B, B') Cross section view of the LE cells. β -catenin is lost from the apical part of cells at the very edge of the wound (arrowheads). (B') Blue channel only. (C-D') Experimental fragment after 6 h of culture. (C-C'') Confocal section of the LE cells. β -catenin expression remains at the LE (arrows). (C', C'') red and blue channels respectively. (D, D') Cross section view of the LE cells. β -catenin remains in the apical part of all cells (arrowheads). (D') Blue channel only.

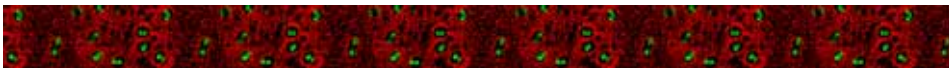


Suppl. Fig. 2. Wound healing of V fragments. (A) Left: wing imaginal disc showing the cutting lines (thick red lines) used to generate the V fragment (right). Green lines indicate compartmental boundaries. Arrows indicate the way this fragment curls during wound healing. (B) V fragment after 12 h of culture showing *puc* expression at the LE (green; *UAS-GFP;puc-Gal4*) and FasIII staining (red). Arrows indicate A and P folds. Asterisk marks the wound vertex. Arrowhead points out a fold in the wing pouch. (C) V fragment from *hep⁷⁵* mutant disc after 48 h of culture. No evidence of wound healing seen.

Supplemental References

- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* **172**, 973-81.

CAPÍTOL II



6. Article II: Origen i formació del blastema. Paràmetres cel·lulars en la regeneració dels discs imaginals.

6.1. Antecedents

Com hem esmentat, a les dècades dels 70 i 80 nombrosos treballs van analitzar els fenòmens de regulació del patró (regeneració i duplicació) als discs imaginals. Molts d'aquests estudis anaven dirigits a investigar com apareix el teixit nou i quin era el seu origen. Per això es van estudiar els patrons de proliferació cel·lular en diferents tipus de talls i de discs, concloent sempre que la regeneració en els discs imaginals es dona per un procés epimòrfic.

El punt més estudiat va ser la **fase S** del cicle cel·lular. Cèl·lules de la zona de la ferida mostraven un elevat marcatge de timidina tritiada (timidina- H^3) o de incorporació de Bromodeoxiuridina (BrdU). Aquesta localització específica va portar a definir el **blastema** com a conjunt de cèl·lules en proliferació, vora la ferida, amb capacitat per regenerar independentment de la resta de teixit (Karpen and Schubiger, 1981) i que, abasta una amplada de 8 i fins a 50 fileres de cèl·lules (Adler and MacQueen, 1984; Dale and Bownes, 1980; O'Brochta and Bryant, 1987). La mida del blastema estava directament lligada a la mida de la ferida, la qual cosa va portar a definir la regulació del patró com un **mecanisme de mitjana** on les noves cèl·lules adopten valors posicionals intermedis als de les cèl·lules ja existents, en lloc d'un **mecanisme seqüencial** on la mida del blastema es manté igual en tot el procés i les cèl·lules noves adopten valors adjacents a les veïnes (Bryant and O'Brochta, 1986). També es va estudiar el blastema al llarg del temps i es va observar que apareixia abans de que la cicatrització fos completa (com s'ha esmentat en el capítol anterior) i que a més durava més del que en teoria seria necessari per regenerar les parts amputades dels diferents fragments i discs estudiats (O'Brochta and Bryant, 1987). La **fase M** durant la regeneració, tot i que menys estudiada, va donar també els mateixos resultats: específica de cèl·lules de vora la ferida i observada abans de que la cicatrització fos completa (Karpen and Schubiger, 1981; Kiehle and Schubiger, 1985; Mattila et al., 2005; Mattila et al., 2004). Recentment, s'ha estudiat la dinàmica del **cicle cel·lular** en cèl·lules en regeneració (Sustar and Schubiger, 2005). Els resultats mostren que les cèl·lules en regeneració proliferen seguint un cicle igual que les cèl·lules intactes, no afectades. Així doncs, el fet que s'observi una major proliferació en el blastema no és degut a que les cèl·lules del blastema cicle més ràpid sinó que la resta deixa de ciclar i s'aturen a G1 i G2.

La regeneració també es va estudiar a partir de la variació del nombre de cèl·lules i la variació del volum inicial de fragments de discs imaginals. Estudiant el **nombre de cèl·lules** es va veure que tot i haver-hi un augment en els primers dies

de cultiu després tornava a disminuir, quasi tant com havia augmentat (Dunne, 1981). En termes de **variacions de volum**, el que es va observar va ser que aquest ja no variava en els últims dies del cultiu i que no s'arribava mai a aconseguir un volum concret (Adler, 1981). Aquests treballs van deixar oberta doncs, la possibilitat de que la **mort cel·lular** pogués jugar un paper en la regulació del procés de regeneració.

Un altre punt important d'estudi de la regeneració va ser l'ús fet de l'**anàlisi clonal**. Aquest anàlisi però, resultava complicat pel fet que es perdien clons pels plegaments del teixit després de la metamorfosi (Adler, 1981). Tot i així, es van obtenir resultats molt interessants que evidenciaven un canvi en la localització de la proliferació. Clons induïts al principi de la regeneració eren majoritàriament localitzats en el teixit original mentre que, clons induïts al final del procés eren observats majoritàriament a la part nova (Abbott et al., 1981). Un altre resultat que va donar l'estudi de clons va ser el fet que durant la regeneració es poden saltar, de manera temporal, les restriccions de llinatge que representen les vores de compartiment. Per tant, cèl·lules que originalment tenien una identitat poden diferenciar estructures del compartiment adjacent (Abbott et al., 1981; Gibson and Schubiger, 1999; Szabad et al., 1979)

Amb aquests resultats en ment, es va estudiar el blastema al llarg del temps durant la regeneració en fragments 3/4 A de discs d'ala i la distribució espacial de les cèl·lules en proliferació. També es va fer llinatge de les cèl·lules de la vora de la ferida per veure'n la contribució al teixit nou i per establir les fronteres del blastema. A més, es va estudiar la topologia, freqüència, mida i forma de clons analitzats en els propis discs regenerats i induïts a diferents temps de regeneració així com, el manteniment de les restriccions de llinatge produïdes durant el desenvolupament. D'altra banda s'ha analitzat per primer cop el patró de mort cel·lular durant la regeneració dels discs imaginals de *Drosophila*. El paper de la JNK durant la regeneració també ha estat estudiat, juntament amb els patrons d'expressió de *dpp* i *wg*, gens clau en el control del creixement i formació del patró durant el desenvolupament.

6.2. Resum de l'article

Després d'un temps de descuit, els discs imaginals de *Drosophila* tornen a ser utilitzats com a model per analitzar les relacions entre el creixement i la formació del patró durant la regeneració. Per ampliar el coneixement d'aquest procés hem (1) examinat la distribució de cèl·lules en fase S i en mitosis i, de cèl·lules mortes en fragments 3/4 de discs d'ala en regeneració; (2) utilitzat tècniques de llinatge cel·lular per marcar l'origen i les fronteres del blastema i, per testar si hi ha canvis en les identitats dels compartiments; i (3) produït un anàlisi clonal per determinar la topologia de la proliferació cel·lular i la seva relació amb la formació del patró. Hem demostrat que tant la síntesi de DNA com les mitosis s'activen abans no es completa la cicatrització, sobre una distància de 10-15 fileres de cèl·lules des de la

ferida, just on la via de JNK és activada. En experiments de llinatge cel·lular amb la fosfatasa de la JNK *puckered* (*puc*), s'ha vist que un nombre substancial de cèl·lules del blastema s'origina de cèl·lules amb la via JNK activa. L'activitat de *puc* ha resultat ser un molt bon marcador de les fronteres del blastema. De manera interessant, la mort cel·lular no sembla jugar un paper important en la regeneració dels discs d'ala. L'anàlisi clonal mostra una estreta relació entre el nombre, la freqüència i la forma (orientació de la divisió cel·lular) dels clons, amb la disparitat de valors posicionals confrontats per la cicatrització. Finalment, els experiments de llinatge suggereixen que els compartiments no es reespecifiquen durant la regeneració. Aquests resultats són consistents amb la idea de que la regeneració dels discs imaginals de *Drosophila* no és un procés epimòrfic estricte i que la proliferació és estimulada, de manera independent de la cicatrització, en una àmplia àrea de la ferida per l'activitat de la via JNK. Després de la cicatrització, la regeneració és conduïda per les disparitats posicionals entre les superfícies contraposades, a través d'una proliferació diferencial i una divisió cel·lular orientada.

6.3. Referència

Aquest treball ha estat enviat a la revista *Development*.

Growth dynamics, cell lineage, and clonal analysis of blastema cells during the regeneration of *Drosophila* wing imaginal discs.

Manel Bosch, Florenci Serras and Jaume Baguña*

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

*Author for correspondence (e-mail: jbaguna@ub.edu)

Abstract

After a period of neglect, *Drosophila* imaginal discs are becoming again useful models to analyze the relationships between growth and pattern formation during regeneration. To broaden the understanding of this process we have (1) examined the distribution of S-phase, mitotic, and dead cells in regenerating 3/4 wing discs fragments; (2) used cell lineage techniques to trace the origin of blastema cells and the early and late boundaries of the blastema and to test changes, if any, in compartmental fate; and (3) produced a clonal analysis to determine the topology of cell proliferation and its relationship to pattern formation. We demonstrate that DNA synthesis and mitosis are activated, well before wound healing is completed, over a distance of 10-15 cell diameters from the wound where the JNK pathway is activated. A substantial number of blastema cells was found to originate from JNK activated cells lineage-

tagged with the JNK phosphatase *puckered* (*puc*). *puc* activity was found to be a convenient marker for late blastema boundaries. Interestingly, cell death plays a negligible role in wing disc regeneration. Clonal analysis show a close relationship between number, frequency, and shape (orientation of cell division) of clones to disparities in positional values between the apposed surfaces. Finally, and rather unexpectedly, lineage methods suggest that compartments are not re-specified during regeneration. These results are consistent with the idea of wing disc regeneration in *Drosophila* as a so strict epimorphic process in which proliferation is first stimulated, in a healing-independent manner, within a broad area of the wound by JNK activity. After healing is completed, regeneration is driven by positional disparities between apposed surfaces through differential cell proliferation and oriented cell division.

Introduction

Regeneration of lost structures in animals is achieved either by local stimulation of cell proliferation (epimorphosis; Morgan, 1901) or through cellular respecification of the regenerant without cell division (morphallaxis; Morgan, 1901). Removal of normal cell neighbors by surgery and the apposition of new neighbors resulting from wound healing, brings into contact cells which were previously widely separated in the disc. Such discontinuity in positional information (Wolpert, 1969) created by wound healing triggers local cell proliferation (French et al., 1976). The new cells generated would adopt the positional values that usually occur between the confronted cells until sufficient new cells have been added to replace the missing tissue and restore all positional values.

This framework, encapsulated among others in the polar coordinate model of pattern formation (French et al., 1976), was tested in regenerating imaginal discs of *Drosophila* analyzing the patterns of cell proliferation (Dale and Bownes, 1980), incorporation of ³H-thymidine (Dale and Bownes, 1980, 1981; Adler, 1984; Kiehle and Schubiger, 1985; Bryant and O'Brochta, 1986; O'Brochta and Bryant, 1987) or bromodeoxyuridine (Bryant and Fraser, 1988) into S-phase cells, and flow cytometry (Fain and Alvarez, 1987). Main conclusions were: 1) DNA synthesis but not mitosis precedes the

completion of healing (for mitosis preceding healing in regenerating leg discs, see Kiehle and Schubiger, 1985); 2) the regenerative blastema is made by clusters of S-phase labelled cells spanning width ranges of 25-75 μ m (equivalent to 8-25 cell diameters); 3) time to complete regeneration was roughly proportional to the amount of tissue removed; hence, larger positional value discontinuities produced larger and more persistent blastemas than do smaller discontinuities. Finally, (4) patterns of proliferation matched better averaging models, in which proliferation first localizes close to the wound to spread later on all over the blastema, than sequential models in which proliferation remains always localized within a thin stripe of blastema cells.

In parallel, clonal analyses were used to analyze the distribution of clones between the old fragment (regenerant) and the blastema (regenerate), and to establish whether compartmental restrictions (García-Bellido et al., 1973) are maintained or, were it not, whether and when they are reformed again. Clones produced by X-irradiation at fragmentation or during *in vivo* culture in duplicated and regenerated leg discs fragments were first found in areas close to the wound in the old fragment shifting to (or adjacent to) the regenerate/duplicate at later stages (Abbot et al., 1981). Moreover, clonal analyses showed transformation from

anterior to posterior compartments but not the converse in regenerating/duplicating leg discs (Girton and Russell, 1980; Abbot et al., 1981; Kiehle and Schubiger, 1985), or clones encompassing structures of both anterior and posterior compartments in regenerating wing discs whenever they were induced one day prior to cutting but not later on (Szabad et al., 1979). The last result suggested that the descendants of some cells originally committed to the anterior compartment can differentiate posterior structures and *viceversa*, though restrictions were rapidly re-established (Szabad et al., 1979).

Altogether, regeneration of *Drosophila* imaginal discs was, and still is, viewed as a clear-cut epimorphic process in which cells close to the wound area proliferate and form a blastema from which new cells, produced by intercalary proliferation, restore the lost pattern and positional continuity. Moreover, and if needed, cells at the border lose the compartmental commitment which is re-established soon after.

Despite these advances, key questions were left unexplored and several problems remained open. First, the extent of tissue near the wound edges from which cells are recruited to proliferate and form the blastema is unknown, as it is whether late blastema boundaries correspond to the original (early) wound edges. Second, the topology of cell proliferation within the blastema, and namely whether spatial and temporal differences in clone frequency, size and shape occur along the proximodistal and circumferential directions remains unexplored. Third, the role, if any, of apoptosis in the dynamics of regeneration has yet to be analyzed. Finally, among the plethora of growth factors and signal transduction pathways involved in imaginal disc development which one carries positional information and how it operates to trigger cell proliferation and restore the pattern by intercalary growth remains in the midst of mystery.

In this paper we have (1) measured the main parameters of blastema dynamics (DNA synthesis, cell proliferation, and cell death) in wing imaginal discs fragments at different stages of regeneration; (2) used cell lineage methods to determine the boundaries of the blastema and correlate it to the area of cell proliferation, as well as to test whether compartments hold or do not during regeneration; and (3) used clonal analysis to monitor the topology of cell proliferation and pattern formation. We found, as already reported by Kiehle and Schubiger (1985) and Mattila et al. (2005), that both DNA synthesis and mitosis begin prior to completion of wound closure. Further, DNA synthesis and cell division increase dramatically along both wound areas, holds within the growing blastema, but remains very low in distant areas. In contrast, cell apoptosis shows only slight increases all over the fragment. Cell lineage-tracing methods indicate that most blastema cells originate from cells at the wound boundary, and that compartmental fates are not re-specified during regeneration. Finally, clonal analyses reveal a shift in maximal proliferation

from wing pouch to pleura areas and clear differences in preferred mitotic orientations between disto-proximal and circumferential axes, features likely related to different positional values disparities.

Materials and Methods

Drosophila stocks and genetics

A description of genetic markers and chromosome balancers used in this study can be found in FlyBase. Fly cultures and crosses were grown on standard fly medium at 25°C. The study of cell proliferation and cell death was done using Canton S as a wild type stock. *hep^{r75}* (Glise et al., 1995) was used as a JNK mutant and *UAS-GFP;puc^{E69-A}-Gal4/TM6B* (Pastor-Pareja et al., 2004) as a marker of JNK activity.

In vivo disc culture and microsurgery

Imaginal discs manipulation was performed as described (Bosch et al., 2005). Wing imaginal discs were removed from mid-late third instar larvae, 100–120 hr after egg laying (AEL), into Schneider's insect medium (Sigma). A 90° sector was cut out, using tungsten needles, from the posterior (P) compartment leaving a 3/4 anterior (3/4A) fragment. Experimental (3/4A fragments) and control (uncut) discs were implanted into recently eclosed Canton S females and kept at 25°C. Following a culture period of 12 hr or 1, 2, 3, 5 and 7 days, implants were removed from the hosts and analyzed. Implants with unclear morphologies were discarded. For each experiment and time point a minimum of 8 discs were used for further analyses.

BrdU incorporation

Control and regenerating implants were removed from adult hosts, incubated in 100 µg/ml bromodeoxyuridine (BrdU) in Schneider's insect medium for 30 min and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min. After washing in PBS they were frozen in methanol at -20°C for 30 min. Implants were then washed in PBT (PBS+0.3% Triton X100), hydrolysed for 45 min with HCl 2N, and washed again in PBT. Incorporated BrdU was localized using a monoclonal mouse anti-BrdU (1:20; Beckton and Dickinson) and a secondary fluorescent antibody (1:200, Jackson ImmunoResearch), following an immunohistochemistry standard protocol. Implants were mounted in SlowFade Light Antifade kit (Molecular Probes, Inc).

Mitosis labelling

Control and regenerating implants were removed from adult hosts and immunostained using anti-PhosphoHistone3 (PH3, 1:1000, Upstate Biotechnology) and a secondary fluorescent antibody (1:200, Jackson ImmunoResearch). Implants were mounted in SlowFade Light Antifade kit (Molecular Probes, Inc).

Tunel Assay

Control and regenerating implants were removed from adult hosts and fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized in PBT for 30 min, and incubated

with the terminal deoxynucleotidyl transferase (Roche) in the reaction mix containing Chromatide BODIPY® Texas Red-14-dUTP (Molecular Probes, Inc) for 1 hr 30 min at 37°C. After washes, implants were mounted in SlowFade Light Antifade kit (Molecular Probes, Inc).

Measurements and statistics

Labeled cells were counted in areas of similar size in P and A compartments on confocal projection images. These areas roughly correspond to 10% of the total area of each disc. In control uncut discs they are named Control P (Ctrl P) and Control A (Ctrl A), and in experimental discs Exp P and Exp A (see Figs. 1,2,3A,B). In unhealed fragments (0 and 12 hr), the Exp P areas were drawn following the edge of the wound and covering an area equal to control and healed discs. Drawing and cell counting were done using the ImageJ software (NIH Image; www.rsb.info.nih.gov/ij). For statistical analyses we used an average comparison test, only significant differences with probabilities of 0.01 and 0.001 being considered.

Clonal analysis

Flip out clones were generated using the *FLP/FRT* system (Xu and Rubin, 1993). *yw hs-flp 1.22* homozygous females were crossed to *w;+;act5c-FRT CD2 FRT-Gal4 UAS-GFP* males. Adult hosts, bearing regenerating implants, were heat-shocked for 20 min at 29°C, at different times of regeneration: 2 hr (n=10), 24 hr (n=11), 60 hr (n=10) and 96 hr (n=11) and regenerating discs removed at 7 days of regeneration and analyzed. As controls, 7 days regenerating discs (n=9) implanted into adult hosts not submitted to heat-shock were used to estimate the number of spontaneous clones. In all discs, clones were outlined over CE confocal planes of regenerated discs, stained for nuclei to count the number of cells, plotted, and drawn (see Fig. 6A,C,E,G). Clone outlines and plots were done using Freehand 9.0 software (Macromedia, Inc). Nuclei were stained using Sytox Orange (1:20000, Molecular Probes, Inc)

The number of clones per disc (clone frequency) and the number of cells per clone (clone size) in 7 days regenerating discs were measured in two areas of the disc: the wing pouch (WP) and the ventro-lateral (pleura-hinge region; abbreviated: pleura, PL) in both A and P compartments at different times of regeneration (see Fig. 6). Clone frequencies were calculated as the mean number of clones per disc in the A and P areas. Clone sizes were determined by counting the number of GFP-labelled cells in each clone and expressed as the mean number of cells per clone in the A and P areas. Plots of clones bearing 4 or more cells and with major (long)/minor (short) axis ratios >2, were analyzed to determine the orientation of its main axis in reference to the dorsal-ventral (D/V) boundary. Clones with angles lower than 30° to the D/V boundary were considered parallel, while those with angles higher than 60° were considered perpendicular to that boundary (see Figs. 6B,D,F,H).

Cell lineage experiments and enhancement procedures

Act5c-FRT-stop-FRT-lacZ/CyO;UAS-flipase/TM6B line was crossed to different *Gal4/UAS-GFP* lines: *UAS-GFP;puc^{E69-A}-Gal4/TM6B* (Pastor-Pareja et al., 2004), *ap-Gal4 UAS-GFP/CyO* (Calleja et al., 1996), and *en-Gal4/CyO;UAS-GFP* (Brand and Perrimon, 1993). To study cell lineage of *puc* and *ap*, wing discs from larvae of each cross were cut and the 3/4A fragment kept (Fig. 4A-B', 7B-C'). Cell lineage of *en* was analyzed in wing discs where the 90° sector was cut out from the A compartment crossing the A/P boundary (Fig. 7D-F'). All fragments were implanted inside adult hosts and left to regenerate for 7 days. To detect *lacZ* expression, an anti-βgalactosidase (1:1000, Cappel) was used, and was detected with a secondary fluorescent antibody (1:200, Jackson ImmunoResearch). Implants were mounted in SlowFade Light Antifade kit (Molecular Probes, Inc).

In *UAS-GFP; puc-Gal4* discs at 7 days of regeneration, *puc* is no longer active despite weak GFP signals are still detectable due to perdurance of the GFP protein (Bosch et al., 2005). To have a better display of the GFP signals, the voltage of the Olympus Flouview 500 confocal laser was increased and the image enhanced using Photoshop 7.0 software (Adobe Corp.).

Results

Spatial and temporal dynamics of cell proliferation in regenerating discs

The number and distribution of S phase cells after BrdU incorporation was used to analyze the temporal and spatial pattern of cell proliferation. BrdU incorporation and PH3 labelled mitoses at time 0 (discs isolated but not injected) showed higher number of proliferating cells than discs cut, injected into hosts, and recovered 12 hr after implantation, indicating a drastic drop in cell proliferation. Similar drops in mitotic indices and number of [³H]-thymidine-labeled cells in whole leg discs cultured for 1 or 2 days in adults had already been reported by Kiehle and Schubiger (1985). These decreases could either be the consequence of discs getting close to the end of the 3rd instar larval period (144hr AEL) when cell proliferation stops, or result from *in vivo* culture conditions. To check it, early third instar discs, which still have to undergo several rounds of cell divisions, were isolated, injected into hosts, recovered at 12 hr, and the number of proliferating cells (labelled with PH3) analyzed. As for late third instar discs, they showed similar drops in the number of proliferating cells (results not shown), suggesting cutting and implantation into adults as the most likely cause of such decreases. Therefore, in this work we used the 0,5 day after implantation as the starting point of our experimental design.

The dynamics of BrdU incorporation is summarized in Fig. 1D. Overall, the number of BrdU labelled cells was always higher at the Exp P domain (regenerating area) than in other areas (Fig. 1A-C). From 0.5 days on,

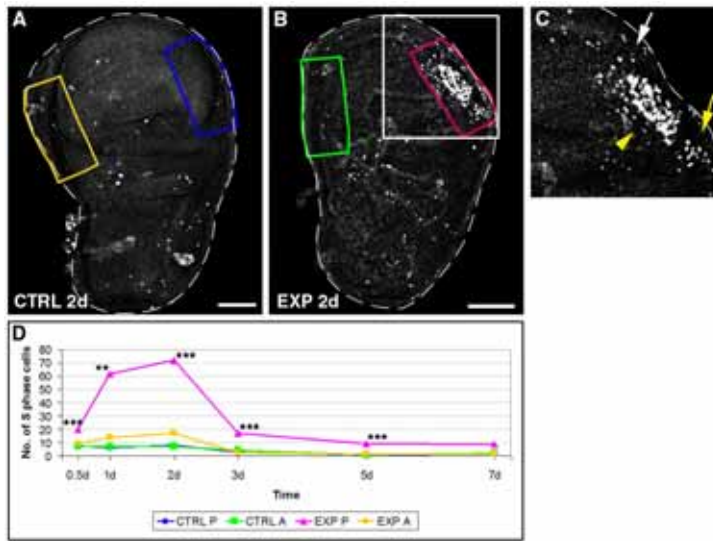


Fig. 1. Patterns of incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) into 3/4A wing disc fragments after various periods of culture *in vivo*. (A,B) Control (A) and experimental (B) discs after 2 days of culture. Areas in A and P compartments in which BrdU-labelled cells (white dots) were measured are boxed: yellow (Ctrl A) and blue (Ctrl P) in control discs; green (Exp A) and magenta (Exp P) in experimental discs. (C) Enlargement of white square in (B). BrdU labelled cells cluster at the vertex (yellow arrowhead) close to the healed wound (white dashed line), and at dorsal (yellow arrow) and ventral (white arrow) healing folds. (D) Average number of S-phase labelled cells in each area at different times of regeneration. Significant differences between control (Ctrl A, Ctrl P, and Exp A) and experimental discs (Exp P) are

highlighted (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Table 1). White dashed lines mark the contour of the discs. In all figures, anterior is to the left and ventral is up. Scale bar: 50 μ m.

the number of BrdU labelled cells increase steadily in the Exp P area peaking at 2 days. From the third day on, the number of labelled cells decreased progressively reaching control levels at 7 days though significant differences between Exp P and the remaining areas still held at 5 days (Fig. 1D, Table1). From 0.5 to 1 day of regeneration, S-phase cells concentrated at the vertex of the wound, while dorsal (D) and ventral (V) folds showed few scattered labelled cells. At 2 days (Fig. 1B) most S-phase cells were still at the vertex (Fig. 1C, arrowhead) often in large clusters, whereas in the D (Fig. 1C, white arrow) and V (Fig. 1C, yellow arrow) folds few scattered labelled cells were still present. From the third day on, the number of labelled cells decreased steadily, D and V folds were no longer recognizable, and S-phase cells were evenly scattered in the wing pouch (WP) and pleura (PL) areas of the regenerated tissue, a pattern still maintained in 5 day regenerates (not shown).

Cell proliferation was further analyzed from the number and pattern of mitotic cells labelled with PH3 in areas identical to those for BrdU incorporation (Fig. 2A-H). At 0.5 days, with the wound still unhealed, the number of mitoses was significantly higher in regenerating areas than in the rest of the disc. At 1 day, mitoses had the lowest values in all areas and resumed again only in Exp P areas peaking at 3 days. From then on, the number of mitoses decreased reaching control values at 7 days (Fig. 2H, Table1). At 0.5 and 1 day of regeneration, mitoses were evenly distributed at the vertex (Fig. 2D) and in D and V folds of the wound (Fig. 2C). At 2 days, the wound was healed, the shape of the disc smoothed, and mitotic activity was detected at the vertex, and in D and V folds, mitoses often occurring in

pairs or very small clusters. At 3 days, vertex and D and V folds were no longer distinguishable and mitoses appeared uniformly distributed at the WP and PL regions (Fig. 2E-G).

Because the JNK signalling pathway plays a central role in wound healing (Bosch et al., 2005; Galko and Krasnow, 2004; Ramet et al., 2002) we tested whether impairment of this pathway alters the pattern of cell proliferation in regenerating discs. We chose an hypomorphic allele of the c-Jun amino-terminal kinase kinase *hemipterous* (*hep*) (Glise et al., 1995) which inhibits wound healing and regeneration (Bosch et al., 2005; Mattila et al., 2005). Mitoses were measured in anterior (*hep* A) and posterior (*hep* P) areas of *hep^{r75}/Y* regenerating discs at 0.5 and 3 days after cutting and compared to wild type regenerating counterparts (Exp A and Exp P). As expected, the number of mitoses in *hep* A and Exp A areas was very low. Interestingly, the number of mitoses in *hep* P at 0.5 and namely at 3 days (Fig. 2I) were significantly much lower than in Exp P areas. This indicates that *hep* mutant condition also inhibits cell proliferation after injury.

Cell death in regenerating discs

To test whether cell death plays a role in regenerating discs, cell death in A and P areas of control and experimental discs was measured at different stages of regeneration using the TUNEL assay (Fig. 3A,B). During the first 12 hr of regeneration cell death was non significantly higher in the Exp P area compared to other areas, levelled off in all areas at 1-2 days, and increased again all over in control and experimental discs peaking at 5-7 days (Fig. 3E, Table1). At all time points examined no significant differences were found between

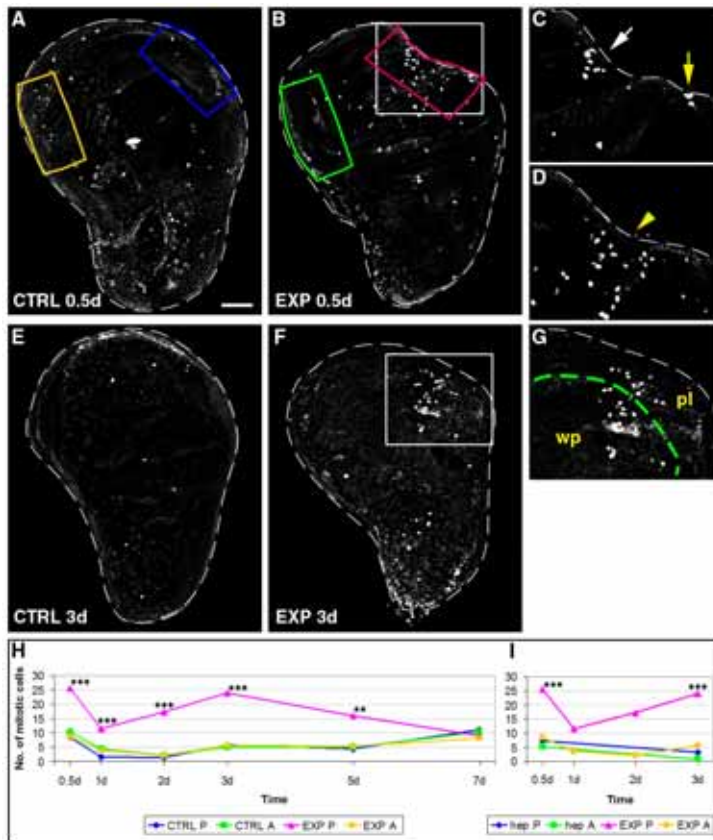


Fig. 2. Patterns of mitoses (white dots) assessed using anti-phosphohistone 3 (PH3) in 3/4 wing disc fragments after various periods of culture *in vivo*. (A,B) Control (A) and experimental (B) discs after 0.5 day of culture. Areas where mitoses were counted are outlined as in Fig. 1. Mitoses cluster close to the wound area (Exp P, boxed in magenta). (C,D) Two confocal planes of the enlarged white square in (B). Mitoses are located in the ventral (white arrow) and dorsal (yellow arrow) healing folds (C), and in the vertex of the wound (yellow arrowhead, D). (E,F) Control (E) and experimental (F) discs after 3 days of culture. Mitoses concentrate at the blastema (white square in F). (G) Enlargement of white square in (F). Mitoses are evenly distributed in the wing pouch (wp) and pleura-hinge (pl) regions. Green dashed line marks the edge of the wing pouch. (H) Average number of mitoses in control and experimental areas at different times of regeneration. Exp P values differ significantly from controls and Exp A throughout regeneration (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Table 1). (I) Effect of the JNK mutant *hemipterous* (*hep⁷⁵*) on the average number of mitoses at 0.5 and 3 days of regeneration. Number of mitoses

in regenerating *hep⁷⁵* fragments (hep P, hep A) were compared to the Exp P and Exp A curves of (H) which served as controls. hep P values are significantly much lower than those of Exp P (*** $p < 0.001$). White dashed lines mark the contour of the discs. Scale bar: 50 μ m.

the Exp P area and the rest of disc areas. Therefore, the increasing numbers of dead cells all over the discs from the third day on is likely a response of discs to *in vivo* culture conditions into female host abdomens. To test whether suppression of apoptosis influenced regeneration we activated *p35*, a suppressor of cell apoptosis, at the posterior compartment driven by *en-Gal4*. Compared to normal levels in the anterior compartment, cell death was almost completely suppressed in the P compartment (Fig. 3C,D). Even so, discs regenerated normally.

The extent and boundaries of the regenerating blastema
To explore the origin of cells forming the blastema, and to define more precisely the extent and boundaries of the blastema, we took advantage of the expression of the JNK phosphatase *puckered* (*puc*) in several rows of cells at the edges of the wound (Bosch et al., 2005) using a cell lineage-tracing method (Weigmann and Cohen, 1999). We lineage-tagged cells at the *puc*-positive wound area using *puc-Gal4* to direct expression of the Flp recombinase. In regenerating discs from larvae

carrying *puc-Gal4*, *UAS-Flp*, *UAS-GFP* and *act-FRT-stop-FRT-lacZ*, Flp recombinase is expressed in cells expressing *puc-Gal4* and excise the flip-out 'stop' cassette from the inactive reporter construct to generate an active *act>lacZ* transgene. After excision, the reporter gene expression is regulated by the actin promoter and is clonally inherited in all the progeny of *puc-Gal4* expressing cells in which the recombination event took place. The expression of *lacZ* thereafter is independent of *Gal4*.

At 7 days of regeneration, cells expressing *lacZ* (red) fill most of the regenerated tissue. In contrast, the actual *puc-Gal4* domain, here visualized through *UAS-GFP* (green), delineated a complementary narrower proximal domain (see Fig. 4A,B). This GFP domain is faintly visible in the regenerated tissue due to perdurance of the GFP protein (Bosch et al., 2005), and corresponds to the original *puc-Gal4* expressing cells at the wound margin. To have a better seeing of the GFP domain, we used enhancement procedures (see Material and Methods). Figure 4A is a projection of all confocal images from a

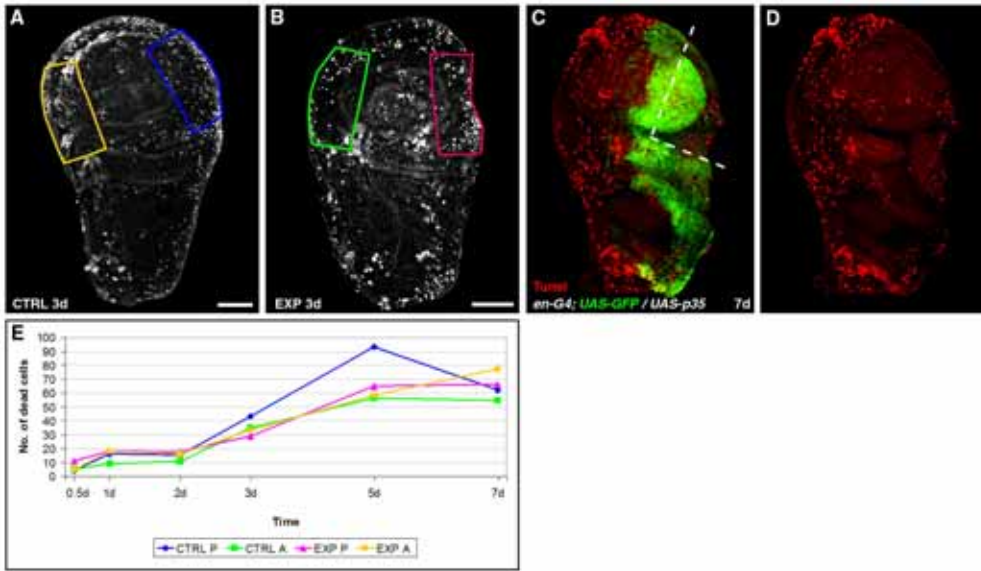


Fig. 3. Pattern of cell death during regeneration of 3/4A wing disc fragments after various periods of incubation *in vivo*. Dead cells (white dots in A,B and red dots in C ,D) were identified by TUNEL. Areas where dead cells were counted are outlined as in Fig. 1. Dead cells are found scattered throughout. (C,D) 3/4A fragment at 7 days of regeneration of a disc overexpressing p35 and GFP (C, green) in the P compartment driven by *en-Gal4*. The dashed white line marks the approximate cutting lines. Dead cells are shown in red (C,D). (D) Same disc without the green channel. Despite cell death is dramatically reduced in the P compartment, regeneration is achieved normally. (E) Average number of dead cells in each area at different times of regeneration. No significant differences are seen among the areas. Scale bar: 50 μ m. (C,D) Same scale as (B).

7day regenerating disc including peripodial cells which also expresses *puc* (see big red cells proximal to the green GFP belt). In contrast, Figure 4B shows the same disc without the planes corresponding to the peripodial membrane (no red cells proximal to the GFP green belt). Therefore, most blastema cells are lineage-tagged with *lacZ* and, hence, likely derived from *puc-Gal4* positive cells at the wound edge of early stages of regeneration. Interestingly, some regenerated cells lacked *lacZ* labelling (see Fig. 4A',B'). Because some cells at the wound and within the blastema do not express *puc* (Bosch et al., 2005), blastema cells negative for *lacZ* might originate from these *puc*-negative cells.

We also measured the number of *puc*-positive and *puc*-negative cells in mitosis in the Exp P area of *UAS-GFP; puc-Gal4* discs at 0.5, 1, 5 and 7 days of regeneration (n=10 discs). At 0.5 days, with *puc* expression at its height, 60 % of mitotic cells were *puc*-positive (Fig. 4E), while 40% of cells were not (arrowhead in Fig. 4C). The percentage of *puc*-positive mitotic cells decreased in the Exp P area along regeneration (Fig. 4C,D) in agreement with the increasing number of cells proliferating beyond the JNK signalling domain (Fig. 4A-B). At 7 days of regeneration, we should not expect *puc*-positive cells within the blastema. However, we found a percentage of 15% (Fig. 4E) because most Exp P areas measured (magenta rectangle in Fig. 4D) included some GFP

expressing cells. Importantly, a substantial number of mitoses are still present in 7 day blastema boundaries (yellow and red dots in the GFP green belt of Fig. 4D), well within the regenerating.

Clonal analysis

To characterize the patterns of growth and intercalation during regeneration we used the flip-out technique to activate stochastically *Gal4* transcription factor in individual cells, thereby labelling single cells and its descendants with expression of a *UAS-GFP* transgene. We first determined the frequency and mean sizes of spontaneous clones in cut and implanted discs (n=9) not submitted to heat shock and analyzed at 7 days of regeneration (results not shown). Clones were rare and variable in size, the majority being small (most with 1-4 cells, except four large clones of 5, 7, 8 and 9 cells). The distribution of spontaneous clones was subtracted from the corresponding distribution in each time class before further analyses.

Results are summarized in Figures 5, 6 and Table 2. In heat-shock regenerating discs, total clone number and clone frequency increased 3 times from 2 hr to 96 hr of regeneration. WP showed no significant differences, in contrast to PL where clone numbers and frequencies increased 6 times between 2 and 96 hr. Differences between WP and PL areas are also revealed from the increasing ratio of PL/ WP clones along this period indicating either more cells or more cycling cells in PL

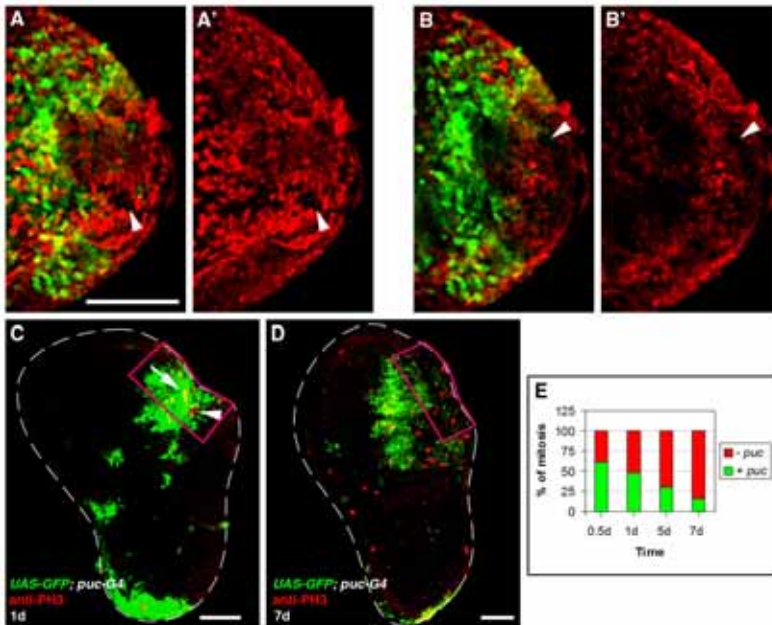


Fig. 4. Lineage tracing of *puc-Gal4* in the blastema of 3/4A regenerating fragments. (A,B) Lineage tracing in *UAS-Flp; puc-Gal4 UAS-GFP/act5c>stop>LacZ* discs at 7 days of regeneration shows that the region of cells that have once expressed *puc-Gal4* (marked by an anti-β-galactosidase, in red) is substantially broader and deeper than the region of cells that still express *puc-Gal4/UAS-GFP*, in green. (A',B') without green channel. Disc in (A) is a projection of all confocal planes which included big peripodial cells (in red), which also expresses *puc*, proximal to the green GFP belt. Disc in (B) is a confocal plane at the level of the columnar epithelium, skipping the peripodial cells. Note that red

cells fill the whole regenerant (blastema) except in some cell clones (arrowheads), while green cells (much enhanced) mark the broad boundary of the blastema. (C,D) 3/4A fragments at 1 (C) and 7 (D) days of regeneration to compare patterns of *puc* expression (labelled by GFP, in green) and mitotic distribution (labelled by anti-PH3, in red). At 1 day (C) mitoses (yellow) co-localize (arrow) with *puc* expression (green) though some do not (red dots, arrowhead). At 7 days (D) mitoses are mainly located in the blastema (red dots), distal to the *puc* expression belt (in green) though some mitotic cells (yellow and red dots) still occur in the blastema boundary. (E) Percentage of mitoses, measured within the exp P area (magenta rectangles in C and D) colocalizing (green bars) or not (red bars) with *puc* expression at 0.5, 1, 5 and 7 days of regeneration. Note the decreasing percentage of mitosis expressing *puc* (green bars) as regeneration goes on. Scale bar, 50 μm.

than in WP areas during regeneration. The average clone sizes were similar for all time periods and areas studied (Table 2), ranging from 2.3 (±1.5) to 5.2 (±5.7) cells per clone. Distribution of clones per size classes and areas, including those found in WP and PL areas of the A compartment, show several regularities (Fig. 5): 1) lower frequencies of small clones (e.g 1-2 cells) in 2 hr regenerates than in 60 and 96 hr regenerates; 2) higher frequencies of large (≥4 cells) than small clones at 2 and 24 hr; and 3) conversely, higher frequencies of small than large clones at 60 and 96 hr.

Preferential orientations of cell division along axes of growth and lineage-boundaries have been related to positional disparities and, hence, to final organ and tissue shape (Baena-López et al., 2005). Figure 6 illustrates the topology of large clones (≥4 cells) and its preferred orientations for WP and PL areas in regenerants of the four time periods. Elongated clones, perpendicular to the D/V boundary and often parallel to the circumferential proximal border, are more frequent (3-5 times) than parallel oriented clones, both in number and percentage, in PL areas. In contrast, growth in the WP is isometric as seen by the similar percentages of perpendicular and parallel clones.

Compartment re-specification using cell lineage markers 3/4A fragments used in this study result from cuts within the P compartment crossing the dorso-ventral (D/V) boundary but sparing the A/P boundary (Fig. 7). Therefore, cells from the D and V compartments are both expected to contribute to the regenerant (blastema). However, whether apposed D and V cells at the early wound shift their compartmental determination giving rise to progeny belonging to the other compartment is an open question.

To examine it, we used again the lineage method of Weigmann and Cohen (1999) with a flipout cassette activated by an *ap-Gal4* driver in the D compartment. Discs from larvae carrying *act5c-FRT-stop-FRT-lacZ/ap-Gal4 UAS-GFP;UAS-flp* were cut into 3/4A fragments and cultured for 7 days. We asked whether cells with initial *ap* expression at the wound boundary (labelled with *lacZ*; in red) and those actually expressing *ap* (labelled with GFP; green) co-localized or not within the same cells in 7 days regenerates. *lacZ* and GFP expressing cells were found in identical domains bounded by the DV compartmental boundary (Fig. 7B-C') as those seen in control uncut discs at 0 (Fig. 7A) and 7 days (not shown). High magnification images

Table 1. Average number \pm SD of S phase, mitotic and apoptotic cells in control and regenerating 3/4 A wing discs fragments.

S Phase										
Time	N _C	CTRL P	SD _{CP}	CTRL A	SD _{CA}	N _E	EXP P	SD _{EP}	EXP A	SD _{EA}
0.5d	10	7,9	4,4	7,2	6,5	8	20,4	9,8	9,8	6,0
1d	8	6,3	3,0	7,1	4,0	9	61,4	49,7	14,0	21,2
2d	9	8,0	6,1	7,4	3,7	10	72,0	33,9	17,2	13,7
3d	14	2,9	3,4	4,6	4,2	9	17,4	7,3	2,4	3,1
5d	9	0,8	0,7	0,7	1,1	9	9,1	6,3	1,4	0,9
7d	8	1,5	1,2	2,4	2,5	9	8,7	9,4	1,6	1,3

M Phase										
Time	N _C	CTRL P	SD _{CP}	CTRL A	SD _{CA}	N _E	EXP P	SD _{EP}	EXP A	SD _{EA}
0.5d	9	8,4	5,5	10,2	8,3	8	25,6	10,1	8,5	5,8
1d	9	1,6	1,5	3,6	2,5	9	11,6	6,4	3,6	4,9
2d	8	1,4	1,6	2,3	3,0	9	17,2	9,8	2,2	1,8
3d	8	5,6	2,4	5,0	2,4	9	24,0	8,7	5,6	3,6
5d	9	4,3	3,3	5,0	4,8	9	15,9	13,0	5,3	3,0
7d	10	11,0	5,9	10,2	11,2	8	9,1	8,2	8,0	7,6

Cell Death										
Time	N _C	CTRL P	SD _{CP}	CTRL A	SD _{CA}	N _E	EXP P	SD _{EP}	EXP A	SD _{EA}
0.5d	8	4,3	5,5	5,3	5,1	11	11,1	8,8	5,0	4,0
1d	10	16,1	13,3	9,2	6,1	8	18,1	10,1	18,1	13,8
2d	8	15,5	5,1	11,0	3,9	8	17,9	10,4	16,1	8,6
3d	8	43,0	16,7	34,6	28,4	13	29,1	18,9	33,5	31,5
5d	9	93,2	34,0	56,6	29,4	9	64,9	29,1	58,2	25,1
7d	8	62,0	35,8	54,9	15,6	8	66,3	30,1	77,3	29,4

N_C, N_E: number of control (Ctrl) and regenerating (Exp) discs analyzed.

SD_{CA}, SD_{CP}: standard deviation for anterior (Ctrl A) and posterior (Ctrl P) areas analyzed in control discs.

SD_{EA}, SD_{EP}: standard deviation for anterior (Ctrl A) and posterior (Ctrl P) areas analyzed in experimental discs

showed the D compartment completely filled by cells labelled with *lacZ* and GFP (Fig. 7C). In contrast, *lacZ*-positive/GFP-negative cells were never seen beyond the D/V border (Fig. 7C') as it should have been if early *ap* expressing cells (D) had reverted to an *ap* negative expression (V).

The A/P compartmental commitment was also tested using wing discs from *actin-FRT-stop-FRT-lacZ/en-Gal4; UAS-GFP/UAS-flp* larvae. As expected, at 0 (Fig. 6D) and 7 days (not shown) of culture control discs showed *lacZ*-labelled cells within the P compartment. Regenerating discs were produced cutting a 90° sector at the A compartment but with one of the wounds made within the P compartment well beyond the A/P boundary (Fig. 7E). After 7 days of regeneration, expression of *lacZ* and GFP colocalized at the same cells at the P compartment delimiting the A/P boundary (Fig. 7E,F'). Had posterior *en*-expressing cells changed its determination to anterior cells, *lacZ*-positive cells have had to be found at the A compartment well beyond the GFP positive cells at the A/P boundary.

Discussion

This study has examined the temporal and spatial patterns of cell proliferation and cell death in regenerating imaginal discs, the origin, lineage, and boundaries of the blastema, and the links, as assessed by clonal analysis, between changes in the topology of proliferation and orientation of cell division and the extent of positional disparities. Our results support five main conclusions: (1) DNA synthesis and cell division increase prior to the completion of wound closure along both sides of the wound and are maintained thereafter; hence, wound healing is not a prerequisite for any of them; (2) increasing levels in cell proliferation from wing pouch to pleura blastema areas during regeneration, together with the preferred perpendicular orientation of cell division in the later, indicates that large positional value discontinuities produce large intercalar growth; (3) whereas cell proliferation plays a main role in blastema formation and growth, cell death seems dispensable in both processes; (4) cell-lineage tracing methods indicate that blastema cells originate locally from wound cells

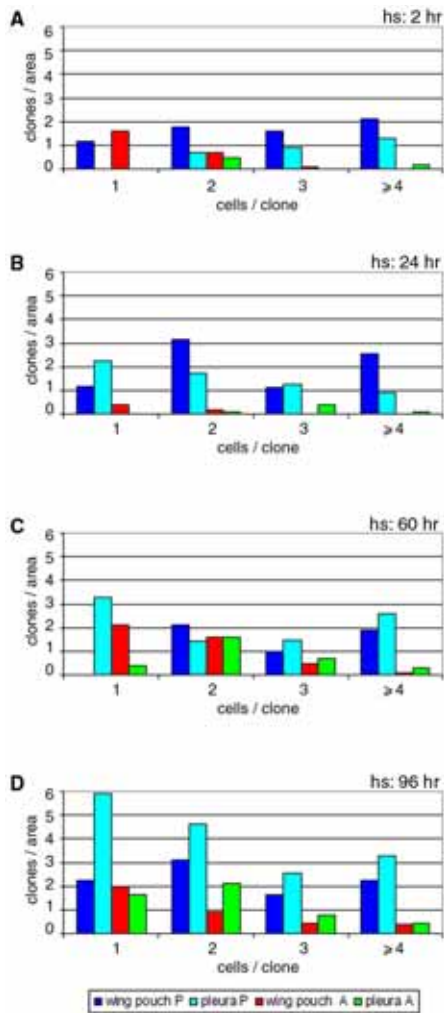


Fig. 5. Histograms showing clone frequency (clones/area) and clone size (cells/clone) distribution of all GFP expressing clones generated by heat-shock (hs) at 2 hr (A), 24 hr (B), 60 hr (C) and 96 hr (D) of regeneration and measured within the blastema at 7 days of regeneration. Clones were plotted and measured in the wing pouch and pleura areas of the blastema (see Fig 6). Clones measured in similar sized areas of the anterior compartment served as controls. For colour code of each area, see bottom of the figure. For further details, see text.

with JNK activity; in addition, JNK expression appears as a good marker to delineate late blastema boundaries; and (5) compartmental restrictions are maintained during regeneration.

The wing disc blastema: growth dynamics

Our results confirm previous studies (see Introduction) that the response of wing imaginal discs to wounding includes the local stimulation of DNA synthesis (here measured through BrdU incorporation) in cells close to the wound prior to wound healing completion. However, in agreement with Kiehle and Schubiger (1981) and Mattila et al. (2005) and contrary to most previous reports, we also detected a significant increase in mitosis previously to wound healing. Therefore, homotypic healing of the wound edges is not a prerequisite to enhance both DNA synthesis and mitosis. Even so, wound healing may later on be a necessary requirement

for regeneration. Dominant negative mutants of *basket* (*bsk^{DN}*), a member of the JNK pathway needed for wound healing and regeneration, keeps the wound open and lowers the number of mitoses 2.5 times at 2 days of regeneration when compared to regenerating WT discs (Mattila et al., 2005). This mitotic decrease may either result from lack of proper healing or from low or null JNK expression. Here, we found that in mutants of *hemipterus* (*hep*), another member of the JNK pathway which also delays wound healing and regeneration (Bosch et al., 2005), the number of mitoses in 12 hr and 3 day regenerating fragments decreased 5 and 10 times respectively when compared to regenerating WT discs (Fig 2I). The strong mitotic decrease detected as early as 12 hr suggests that besides its key role in wound healing (stimulating actin-cable contraction and filopodia formation; Bosch et al., 2005), activation of the JNK signalling pathway is also essential for cell proliferation

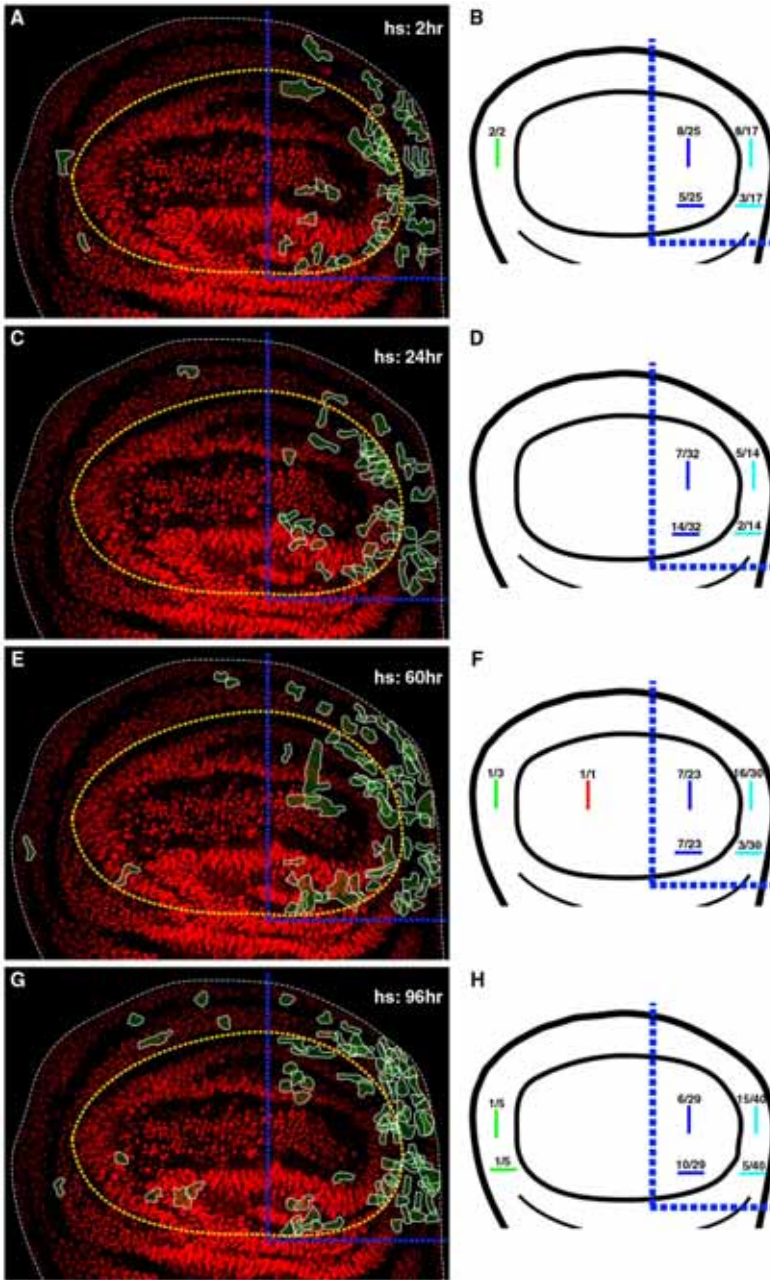


Fig. 6. Plots summarizing the distribution (left panels) and the preferred orientations in respect to the D/V boundary (right panels) of large (≥ 4 cells) GFP-expressing clones generated at 2 hr (A,B), 24 hr (C,D), 60 hr (E,F) and 96 hr (G,H) of regeneration of 3/4A wing disc fragments and visualized in blastemas at 7 days of regeneration. Clones in the A wing pouch and pleura are also plotted. Clones are represented as green shadows over a confocal plane of a seven-day regenerated disc stained for the nuclei (red). White dashed lines mark the contour of the discs, yellow dashed lines the wing pouch margin, and blue broken lines the approximate cutting site. On the right panels, horizontal and vertical bars represent clones in the wing pouch and pleura with angles of 0-30° and 60-90° respectively to the D/V boundary. Numbers above bars is the number of clones of each orientation/total number of clones in each area. Green and cyan bars: clones in the A and P pleura region respectively. Red and blue bars: clones in the A and P wing pouch respectively. Notice that in the P pleura clones increase in number during regeneration and grow preferentially perpendicular to the D/V boundary, whereas in the P wing pouch clones do not increase in number nor show preferred orientations, resulting in isometric growth. For further details, see text.

in regenerating wing discs. JNK signalling is known to stimulate epidermal cell proliferation (Zhang et al., 2004), is activated in many tumor types (Eferl and Wagner, 2003), downregulates genes of the *Polycomb* group (*PcG*) enabling reprogramming and transdetermination (Lee et al., 2005), and one of its components, *c-Jun*, regulates the transcription of numerous genes (references in Bennett et al., 2001).

How JNK signalling is activated at the wound edges is unknown. Besides the usual suspects (release of growth factors, changes in the extracellular matrix,...), activation of JNK signalling due to loss of cell polarity (Igaki et al., 2006) and/or to mechanical stresses at contracting wound edge cells (Nelson et al., 2005) also merits to be explored.

Table 2. Number, frequency and size of clones in regenerating 3/4 A wing disc fragments at different times of regeneration.

Time ^a	N ^b	No. of clones ^c				clones/area ^d						No. of cells/clone ^e					
		Total	WP	PL	≥4 cells	Total	SD _t	WP	SD _{wp}	PL	SD _{pl}	Total	SD _t	WP	SD _{wp}	PL	SD _{pl}
2 hr	10	89	67	22	42	8,9	6,8	6,7	7,5	2,2	5,3	3,5	3,0	3,4	3,0	4,0	2,8
24 hr	11	155	85	70	46	14,0	7,3	7,7	8,4	6,3	6,2	2,7	1,7	3,0	1,8	2,3	1,5
60 hr	10	130	43	87	53	13,0	9,7	4,3	5,9	8,7	12,4	3,7	4,0	5,2	5,7	2,8	2,3
96 hr	11	284	102	182	69	25,8	10,1	9,3	7,9	16,5	11,2	2,6	2,1	2,7	1,8	2,5	2,3

^a time (in hours, hr) of heat-shock treatment after cutting.

^b number of discs analyzed

^c number of clones in the blastema (total), wing pouch (wp) and pleura (pl); and number of clones with 4 or more cells (≥ 4 cells)

^d clone frequency (number of clones/area) in the blastema (total), wing pouch (wp) and pleura (pl)

^e clon size (number of cells/clon) in the blastema (total), wing pouch (wp) and pleura (pl).

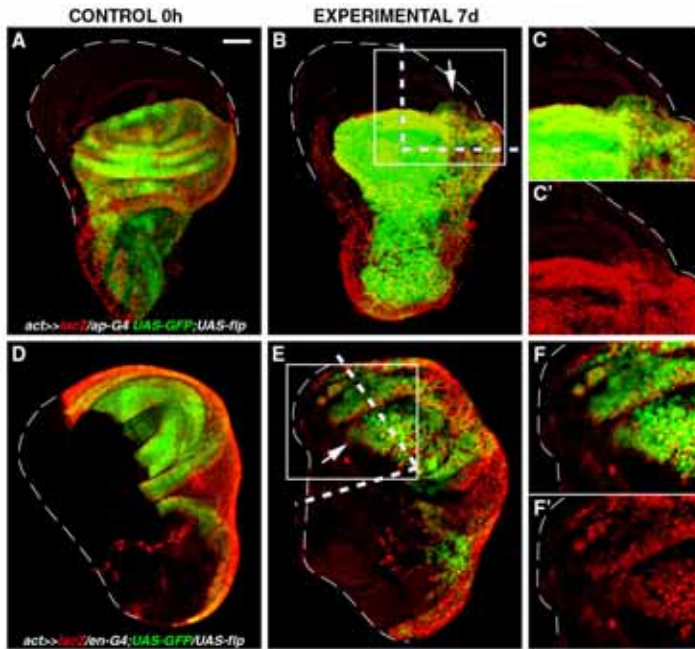


Fig. 7. Lineage tracing the progeny of *ap-Gal4* in blastemas of 3/4 A fragments (A-C) and of *en-Gal4* in blastemas of 3/4 P fragments (D-F) to test compartment re-specification during regeneration. Optical sections through *UAS-Flp; ap-Gal4 UAS-GFP/act5c>stop>lacZ* (A-C) and *UAS-Flp; en-Gal4 UAS-GFP/act5c>stop>lacZ* (D-F) discs at 7 days of regeneration. White dashed thin lines delineates the contour of the discs. (A) Control uncut discs shows that *ap* lineage-tagged expression (marked by an anti-β-galactosidase, in red) and the actual *ap* expression (labelled with *UAS-GFP*, in green) co-localize in all cells of the dorsal compartment. (B) 7 day regenerating disc. White dashed thick line indicate the approximate cutting lines. Both, lineage-tagged (in red) and actual (in green) expression of *ap* co-localize within the dorsal compartment. No red-only (*ap* lineage-tagged only) cells are seen within the ventral compartment (white arrow). (C) Enlargement of white square in (B). (C') Green channel excluded. (D) Control uncut discs showing co-localization of lineage-tagged and actual expression of *engrailed* (*en*) in the posterior compartment. (E) 7 day regenerating disc. White dashed thick lines indicate the approximate cutting lines; the vertical one was made within the posterior compartment. Lineage-tagged (in red) and actual (in green) expression of *en* co-localize in the posterior compartment (white arrow). (F) Enlargement of white square in (E). No red-only (*en* lineage-tagged only) cells are noticed within the anterior compartment. (F') Green channel excluded. Scale bar: 50 μm; all discs same scale.

Green channel excluded. (D) Control uncut discs showing co-localization of lineage-tagged and actual expression of *engrailed* (*en*) in the posterior compartment. (E) 7 day regenerating disc. White dashed thick lines indicate the approximate cutting lines; the vertical one was made within the posterior compartment. Lineage-tagged (in red) and actual (in green) expression of *en* co-localize in the posterior compartment (white arrow). (F) Enlargement of white square in (E). No red-only (*en* lineage-tagged only) cells are noticed within the anterior compartment. (F') Green channel excluded. Scale bar: 50 μm; all discs same scale.

Temporal patterns of S-phase cells and mitotic cells in regenerating blastemas were found to be similar (Figs. 1D, 2H). As expected, mitotic maximum lagged one day after the S-phase cell maximum and the overall number of mitoses was 5 times lower than the number of S-phase cells. From 3 days on, however, the slope of the mitotic curve has a slower decrease than that of S-phase so that overall numbers for mitotic and S-phase cells level off at 5 days (Figs. 1D, 2H). Both features reflect the sequential and different durations of cell-cycle phases in *Drosophila* imaginal discs. The topography of S-phase

and mitotic cells within the regenerative blastema is important as regards models of epimorphic regeneration (O'Brochta and Bryant, 1986). Sequential models predict that growth will be highly localized throughout regeneration. On the other hand, averaging models predict that growth will be localized at first, that the growth zone (the blastema) will expand during regeneration, and that at later stages proliferating cells will be dispersed throughout the blastema. In agreement with previous reports (Dale and Bownes, 1980; O'Brochta and Bryant, 1987; Bryant and Fraser, 1988),

cell proliferation as seen through BrdU incorporation and mitosis is intense and highly localized in the region immediately adjacent to the wound during the first two days of regeneration (Fig. 1B,C, 2C). Later, they are found homogeneously scattered. The number and the topographic distribution of clones induced by flip out at different times of regeneration also support the averaging model (Fig. 6, Table 2). Firstly, total number and frequency of clones per area (WP and PL) increase, as expected, as regeneration goes on. Secondly, the distribution of clones does not show much variations besides the increase in clone number in PL areas, namely along the circumferential direction, at late stages of regeneration (Fig. 6E,G). Altogether, these data back the averaging models indicating that proliferation occurs throughout the blastema and, therefore, that growth is intercalar.

The wing disc blastema: boundaries and origin of cells

In most regenerating systems, blastema and blastema boundaries are easily delimited until late regenerative stages. In imaginal discs, the lack of suitable morphological or molecular markers has precluded to clearly define them. The sole attempt was O'Brochta and Bryant (1987) definition of blastema in regenerating wing imaginal discs as the area where most S-phase labelled cells cluster. As applied to 2-3 days regenerating fragments, that meant an area 25-75 μm wide, equivalent to 8-25 cell diameters. In older regenerants (e.g. 4-7 days) though, the extent and limits of the blastema became blurred (Fig. 2 in O'Brochta and Bryant, 1987). Using BrdU we found average widths of 50 μm for 2 day old blastemas (Fig. 1B,C), a value fairly close to that reported by O'Brochta and Bryant (1987). At late stages, the JNK phosphatase *puckered* (*puc*) appeared as a useful marker to define late blastema boundaries. *puc* is activated in 10-15 depth rows of cells from the wound edges at 5 hr of regeneration, decreases from 24 hr on when the wound is healed, and is still faintly detectable at 3-5 days (Bosch et al., 2005). Cells positive for GFP driven by *puc-Gal4* at the early wound margin were still detected, due to GFP long perdurance and after enhancement procedures, in 7 day old blastemas (Fig. 4A,B). This GFP belt (Fig. 4A,B, in green), 10-15 cells deep (30-45 μm), corresponds to the original *puc*-activated region at the wound margin, and bounds the 100-125 μm wide and 50-70 μm deep 7 day old blastema (labelled with *lacZ*; Fig. 4B, in red). This is the first report of a useful, however coarse, marker for blastema boundaries in regenerating imaginal wing discs.

If *puc*-activated cells at the early wound margin mark late blastema boundaries, it follows that most blastema cells should stem from these early *puc*-activated cells. Indeed, most cells of 7 days old regenerated tissue (Fig. 4B') are lineage-tagged with *lacZ* activated by *puc-Gal4*. Further evidence comes from the percentages of *pucGFP*-positive and *pucGFP*-negative mitotic cells within the blastema. Whereas in 12 hr blastemas

pucGFP-positive mitotic cells reach 60% (Fig. 4C,E), this percentage dwindles to a mere 15% at 7 days (Fig. 4D,E). Altogether, this indicates that (1) while a substantial number of cells at the wound margin are *puc*-positive others are *puc*-negative. These *puc*-negative cells might well be the progenitors of cells or groups of cells with null or very low levels of GFP seen in 7 day regenerated tissue (arrowhead in Fig 4A',B'); (2) during blastema growth new cells are progressively displaced by intercalar growth beyond the JNK signalling domain. These cells switch off GFP expression, explaining the decreasing percentages of GFP-positive mitotic cells (Fig. 4E); and (3) the presence, as late as 7-days of regeneration, of a substantial number of cells in mitosis in the former wound area (yellow and red dots in the GFP belt; Fig. 4D,E) strongly suggests that pattern restoration involves a larger than expected area of the old regenerant. The role and fates of these late mitotic cells are currently unknown.

While experimental areas far from the wound (Exp A) of regenerating 3/4 A wing disc fragments show no significant increases in mitotic activity as compared to control areas, the finding of cell proliferation within the Exp P areas of the regenerant at early (0,5-1 days, before blastema formation and wound healing completion) and late stages (7 days of regeneration, in areas far beyond the actual blastema) is not fully compatible with regenerating wing discs as strict epimorphic models. In canonical epimorphosis (Morgan, 1901) mitosis is expected to occur within the blastema and not in the regenerant, whereas in canonical morphallaxis (Morgan, 1901) a blastema does not form and regeneration occurs through cell respecification (in current terms, dedifferentiation and redifferentiation) within the regenerant and without cell proliferation. In regenerating leg discs of *Drosophila* (Bosch et al. submitted) and regenerating legs of cockroaches (Truby, 1983), however, cell proliferation extends well beyond the vicinity of the wound within the regenerant, whereas in vertebrate regeneration blastema formation implies substantial levels of dedifferentiation within the regenerant (Odelberg, 2004). In contrast, regenerating *Hydra*, considered by most the canonical morphallactic model, cell proliferation is highly activated 1 day after cutting in areas close to the wound in the regenerant and is required for complete regeneration of head structures (Holstein et al., 2003). Altogether, results in most regenerating systems considered as strict epimorphic, as those reported here, or strict morphallactic, do not fit Morgan's old black and white concepts of epimorphosis and morphallaxis. This call for either redefine them or simply leave them out.

Cell proliferation, orientation of cell division, and pattern formation

Clones of cells produced by flip out recombination have shown clear correlations between the shape of the clones and the morphology of the organ where the clones sit in

(Resino et al., 2002; Baena-López et al., 2005). In the developing wing blade, most clones are elongated and grow perpendicular to the D/V border; in contrast, clones within the wing margin grow along the DV border while clones in the notum grow isometrically. On the other hand, a wealth of regeneration experiments has demonstrated that intercalary growth depends on discrepancies in positional values between neighbouring cells leading to differential cell proliferation (Bohn, 1974). From these data, we anticipated that the number of cells added by proliferation to restore the original pattern in 3/4 regenerating wing disc fragments should be related to the positional disparity between apposed surfaces after wound healing. Such disparities are likely small at the vertex of the wound, larger in the WP, and substantially larger in the peripheral PL area. Therefore, we expected higher rates of proliferation in PL than in WP areas (including the vertex). Moreover, PL clones which have to fill a long and thin stretch of tissue perpendicular to the D/V boundary would be preferentially oriented perpendicular to it, whereas WP clones would have isometric growths because they will fill positional values in an area extending both perpendicular and parallel to the D/V boundary.

Such predictions are borne out from results of clonal analyses (Fig. 5, 6, Table 2). Firstly, the frequency of clones in PL areas, and hence cell proliferation, increase dramatically along regeneration and most large clones are elongated and oriented perpendicular to the DV axis. Secondly, in WP areas (comprising the wound vertex and the WP proper) clone frequency does not increase significantly during regeneration and clone shape is not preferentially oriented to the D/V boundary. Finally, clones tend to avoid the WP/PL boundary (yellow dotted line; Fig 6); and wherever close to them, they usually grow in parallel. The isometric growth of WP clones during regeneration found here differs from growth patterns in developing wing discs (Resino et al., 2002; Baena-López et al., 2005). We should bear in mind, however, that blastemas of 3/4A fragments must regenerate the missing posterior half of the WP with its D/V boundary, which widens the wing, as well as a new P/D axis which lengthens the wing. Under *wingless* (*wg*) influence the first would orient mitoses along the D/V boundary, whereas the second, under the influence of *vestigial* (*vg*) gradient of expression (Baena-López and García-Bellido, 2006), would orient mitoses perpendicular to the D/V axis. It could be speculated that both influences concur together to give the isometric growth of the regenerating WP.

Taken together our results suggest that pattern formation during regeneration in wing imaginal discs results from the concurrent effects of heterogeneities in both cell proliferation and preferred orientations of cell division among different areas of the disc. Such heterogeneities may, in turn, result from cells reading local differences in the expression of key molecules. The nature of these molecules and how cells integrate their

signals to elicit oriented cell division are still poorly understood.

Are compartment boundaries crossed during regeneration?

The ability of cells abutting compartment boundaries to change its compartment commitment during regeneration has been studied in prothoracic and mesothoracic leg discs and in wing discs of *Drosophila*, and in the regeneration of segment boundaries, taken as compartment borders, in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Wright and Lawrence, 1981). In prothoracic leg discs, fragments composed entirely of cells from the anterior compartment regenerated entire legs (bearing posterior structures) but the converse transformation (posterior to anterior) was never observed (Abbot et al., 1981; Kiehle and Schubiger, 1985). The ability of these all-anterior fragments to regenerate was later found to be due to the fusion at the wound site of peripodial cells expressing *hedgehog* (*hh*) with columnar epithelial cells (Gibson and Schubiger, 1999). In these columnar cells, *hh* activates *engrailed* (*en*) which transforms A cells into P cells establishing a new A/P boundary which drives full regeneration. In mesothoracic leg discs, A cells transformed into P cells, but neither P to A transformation nor full regeneration was reported (Girton and Russell, 1980). Absence of full regeneration in these discs was later shown to be due to lack of *hh*-expressing peripodial cells in them (Gibson and Schubiger, 1999). In contrast, wing imaginal discs in which fast growing Minute clones were induced one day prior to cutting were able to cross A/P and D/V compartment boundaries in either ways (A to P, P to A, D to V and V to D; Szabad et al., 1979). Clones induced just after cutting or one day after never did so. In contrast to leg disc regeneration, these results suggested that compartment boundaries can be crossed in both ways during regeneration and, more importantly, that they are re-established soon after. In sheer variance, when a segment boundary in *Oncopeltus* is burnt by cauterization or extirpated, clonal analyses showed that migrating cells from both segments first form a convoluted frontier which later straightens without a single cell crossing the line; hence cell lineage restrictions are conserved (Wright and Lawrence, 1981).

Our results fit the above-mentioned lineage restriction data in *Oncopeltus*. However, differences between our results (Fig. 7) and those of Szabad et al. (1979) in wing discs and Kiehle and Schubiger (1985) in prothoracic discs, are clear cut and need to be explained. Fast growing Minute cells and clone induction prior to cutting were crucial in Szabad et al. (1979) to get clones large enough to overlap across compartmental boundaries. Indeed, even with the advantages of faster growth and close apposition to boundaries, clones induced at or after cutting did not cross the A/P and D/V compartment boundaries (Szabad et al., 1979). The temporal frame of our experiments is

fairly similar to the last set of experiments reported by Szabad et al. (1979), without the bonus of fast growing cells. In addition, our experimental design could test D to V and P to A transformations but not the opposite. Finally, whereas lack of P to A transformation reported here for wing discs matches a similar behaviour in leg discs (Girton and Russell, 1980; Kiehle and Schubiger, 1985), the transformation of A to P cells observed in leg discs could not be tested under our experimental design.

The reported inability of posterior cells to shift compartmental commitment to anterior cells in leg discs had been theoretically predicted by Kauffman (1975) based on the selector-gene hypothesis (García-Bellido, 1975). Such prediction holds that activated states (ON states) of selector genes are more stable than inactivated states (OFF states); in other words it would be more likely for the selector gene to change its state in anterior cells (OFF) than in posterior cells (ON). A similar argument has been applied to dorsal (ON) versus ventral (OFF) fates. Similarly, developing imaginal disc cells can be shifted from low-level responses to high level responses by exposure to increased levels of morphogens (see Weigmann and Cohen, 1999, for references, and for some confronting results in developing leg discs). Further, in *Xenopus* embryos shifts from high-level response to a low-level response are not allowed (Dyson and Gurdon, 1998). This ‘molecular ratchet effect’ seems to operate, however, in systems where growth and patterning is uncoupled. This is not the case in developing (Weigmann and Cohen, 1999) or regenerating leg imaginal discs (Bosch et al., submitted) in which cell fate specification along the proximo-distal (PD) axis is largely reversible while the discs grow.

New cell lineage-tagging experiments together with clonal analysis using fast growing Minute cells needs to be devised to test in regenerating *Drosophila* imaginal discs whether all compartment transformations are possible, whether A to P and V to D transformation are more likely than P to A and V to D or, as here reported, compartmental fates are not re-specified.

Acknowledgements

We thank M. Corominas for comments and suggestions. The help of Ll. Serra in statistical analysis is acknowledged. MB was a recipient of a PhD grant from the University of Barcelona. JB and FS are funded by grants from DGICYT, Ministerio de Ciencia y Tecnología, and the Generalitat de Catalunya.

References

Abbott, L. C., Karpen, G. H., Schubiger, G., 1981. Compartmental restrictions and blastema formation during pattern regulation in *Drosophila* imaginal leg discs. *Dev Biol* **87**, 64-75.

Adler, P. N., 1984. DNA replication and pattern regulation in the imaginal wing disc of *Drosophila*. *Dev Biol* **102**, 300-8.

Baena-López, L. A., Baonza, A., García-Bellido, A., 2005. The orientation of cell divisions determines the shape of *Drosophila* organs. *Curr Biol* **15**, 1640-4.

Baena-López, L. A., García-Bellido, A., 2006. Control of growth and positional information by the graded vestigial expression pattern in the wing of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 13734-9.

Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O'Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S. S., Manning, A. M., Anderson, D. W., 2001. SP600125, an anthracycline inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 13681-6.

Bohn, H., 1974. Extent and properties of the regeneration field in the larval legs of cockroaches (*Leucophaea maderae*) III. Origin of the tissues and determination of symmetry properties in the regenerates. *J Embryol Exp Morphol* **32**, 81-98.

Bosch, M., Baguna, J., Couso, J. P., (Submitted). Pattern formation during regeneration abridges the normal limb developmental program. *Curr Biol*.

Bosch, M., Serras, F., Martin-Blanco, E., Baguna, J., 2005. JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* **280**, 73-86.

Brand, A. H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.

Bryant, P. J., Fraser, S. E., 1988. Wound healing, cell communication, and DNA synthesis during imaginal disc regeneration in *Drosophila*. *Dev Biol* **127**, 197-208.

Bryant, P. J., O'Brochta, D. A., 1986. Growth patterns in *Drosophila* imaginal discs. *Prog Clin Biol Res* **217A**, 297-300.

Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S., Morata, G., 1996. Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-5.

Dale, L., Bownes, M., 1980. Is regeneration in *Drosophila* the result of epimorphic regulation? *Wilhelm Roux's Archives* **189**, 91-96.

Dale, L., Bownes, M., 1981. Wound healing and regeneration in the imaginal disc of *Drosophila*. *Wilhelm Roux's Archives* **190**, 185-190.

Dyson, S., Gurdon, J. B., 1998. The interpretation of position in a morphogen gradient as revealed by occupancy of activin receptors. *Cell* **93**, 557-68.

Eferl, R., Wagner, E. F., 2003. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 859-68.

Fain, M. J., Alvarez, C., 1987. The cell cycle and its relation to growth during pattern regulation in wing discs of *Drosophila*. *J. Insect. Physiol.* **33**, 697-706.

French, V., Bryant, P. J., Bryant, S. V., 1976. Pattern regulation in epimorphic fields. *Science* **193**, 969-81.

Galko, M. J., Krasnow, M. A., 2004. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol* **2**, E239.

García-Bellido, A., 1975. Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. In ‘‘Cell Patterning’’. *CIBA Foundation Symposium, Vol 29*, pp 161-183. Associated Scientific Publications, London

- García-Bellido, A., Ripoll, P., Morata, G., 1973. Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* **245**, 251-3.
- Gibson, M. C., Schubiger, G., 1999. Hedgehog is required for activation of *engrailed* during regeneration of fragmented *Drosophila* imaginal discs. *Development* **126**, 1591-9.
- Girton, J. R., Russell, M. A., 1980. A clonal analysis of pattern duplication in a temperature-sensitive cell-lethal mutant of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **77**, 1-21.
- Glise, B., Bourbon, H., Noselli, S., 1995. *hemipterous* encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* **83**, 451-61.
- Holstein, T.W., Hobmayer, E., Technau, U., 2003. Cnidarians: An evolutionary conserved model system for regeneration? *Dev Dyn* **226**, 257-267
- Igaki, T., Pagliarini, R. A., Xu, T., 2006. Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*. *Curr Biol* **16**, 1139-46.
- Kauffman, S.A., 1975. Control circuits for determination and transdetermination: Interpreting positional information in a binary epigenetic code. In "Cell Patterning". *CIBA Foundation Symposium, Vol 29*, pp 201-221. Associated Scientific Publications, London
- Kiehle, C. P., Schubiger, G., 1985. Cell proliferation changes during pattern regulation in imaginal leg discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **109**, 336-46.
- Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L., Paro, R., 2005. Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* **438**, 234-7.
- Mattila, J., Omelyanchuk, L., Kyttila, S., Turunen, H., Nokkala, S., 2005. Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. *Int J Dev Biol* **49**, 391-9.
- Morgan, T. H., 1901. "Regeneration." Macmillan, London.
- Nelson, C. M., Jean, R. P., Tan, J. L., Liu, W. F., Sniadecki, N. J., Spector, A. A., Chen, C. S., 2005. Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11594-9.
- O'Brochta, D. A., Bryant, P. J., 1987. Distribution of S-phase cells during the regeneration of *Drosophila* imaginal wing discs. *Dev Biol* **119**, 137-42.
- Odelberg, S.J., 2004. Unraveling the molecular basis for regenerative cellular plasticity. *PLoS Biology* **2**(8): E232.
- Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martin-Blanco, E., Garcia-Bellido, A., 2004. Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev Cell* **7**, 387-99.
- Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D., Manfrulli, P., 2002. JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol* **241**, 145-56.
- Resino, J., Salama-Cohen, P., García-Bellido, A., 2002. Determining the role of patterned cell proliferation in the shape and size of the *Drosophila* wing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7502-7.
- Szabad, J., Simpson, P., Nothiger, R., 1979. Regeneration and compartments in *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* **49**, 229-41.
- Truby, P.R., 1983. Blastema formation and cell division during cockroach limb regeneration. *J Embryol Exp Morphol* **75**, 151-164.
- Weigmann, K., Cohen, S. M., 1999. Lineage-tracing cells born in different domains along the PD axis of the developing *Drosophila* leg. *Development* **126**, 3823-30.
- Wolpert, L., 1969. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* **25**, 1-47.
- Wright, D.A., Lawrence, P.A., 1981. Regeneration of segment boundaries in *Oncopeltus*: cell lineage. *Dev Biol* **85**, 328-333.
- Xu, T., Rubin, G. M., 1993. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-37.
- Zhang, J. Y., Green, C. L., Tao, S., Khavari, P. A., 2004. NF-kappaB RelA opposes epidermal proliferation driven by TNFR1 and JNK. *Genes Dev* **18**, 17-22.

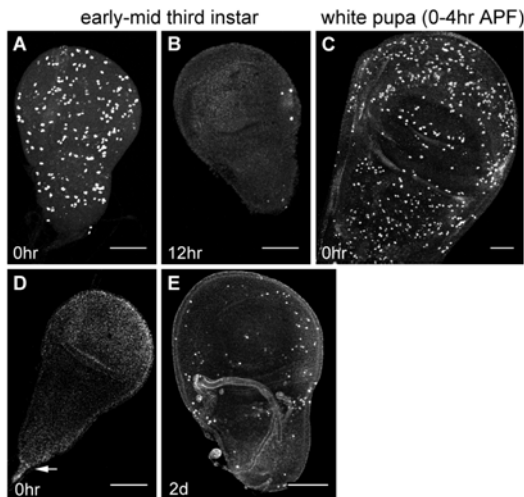
Supplemental Data

Effects of culture on proliferation and cell death.

To investigate whether the decrease in cell proliferation observed at the beginning of the regeneration process was due to the effects of dissecting and implanting the disc or a consequence of discs ending up its developmental program, proliferation was analyzed in control discs at different developmental stages. At early-mid instar, disc cells divide exponentially (Suppl. Fig. 1A). However, after a 12 hr *in vivo* culture a sharp decrease in cell division is clearly seen (Suppl. Fig. 1B). Moreover, white pupa wing discs (0-4 hr APF), which are 12 to 24 hr older than discs used in this work, still showed an elevated number of cell divisions (Suppl. Fig. 1C). We also checked cell death in early-mid instar wing discs cultured for 2 days. Early-mid instar discs at 0 hr, show very few dead cells and mainly located to the stalk likely due to dissection (Suppl. Fig. 1D). After 2 days of culture, discs have grown but they show increasing numbers of dead cells (Suppl. Fig. 1E). Therefore, the decrease in cell proliferation observed at the beginning of regeneration and the increase in cell death at later regenerating stages, are likely due to the effects of manipulation rather than to discs reaching the final developmental program.

Alternative induction of regeneration in imaginal discs.

To avoid the problems caused by dissection, cut, implantation, and culture of discs to study regeneration, we tested two alternative methods to induce regeneration.

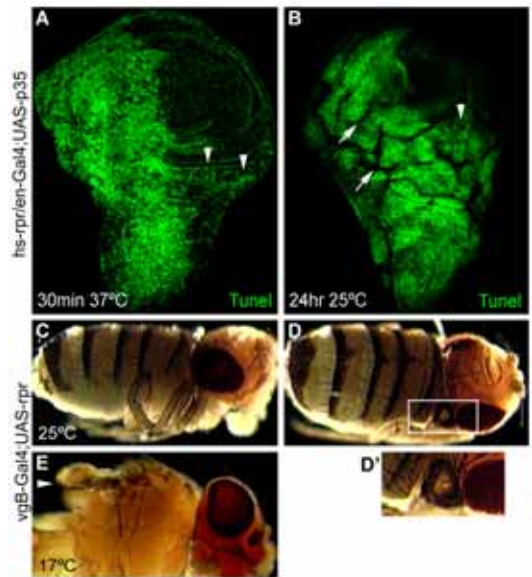


Suppl. Fig. 1

Effects of *in vivo* culture on proliferation and cell death. (A-C) PH3 staining. (D,E) Tunnel assay. (A,B) Early-mid third instar wing discs at 0 and 12 hr of culture respectively. A drastic drop in the number of mitoses is observed between these two time points. (C) White pupa wing disc (0-4 hr APF) showing abundant mitoses scattered around. (D,E) Early-mid third instar wing discs at 0 and 2 days of culture respectively. Cell death increase from 0 to 2 days of culture. Arrow (D) points out dead cells in the stalk. Scale bars: 50µm.

In a first set of experiments we induced cell death in the whole larvae through activation of a heat shock inducible line of *reaper* (*rpr*), an activator of apoptosis during development (White et al., 1994). Moreover, cell death was prevented by *p35*, an apoptosis repressor, only in the P compartment through *en-Gal4; UAS-p35*. When 100-110 hr AEL larvae were heat shocked for 30 min at 37°C cell death was detected, by Tunnel assay, in all the A compartment. Instead the P compartment showed only few tunnel positive cells (Suppl. Fig. 2A). If larvae were submitted to longer heat shocks (for 24 hr at 25°C), cell death was again detected in all the A compartment and increased in P compared to discs with shorter pulses of heat shock. Moreover, discs showed some folds in the tissue (Suppl. Fig. 2B).

Alternatively, cell death was induced by a specific expression of *rpr*. We used the *vestigial* (*vg*) border enhancer, expressed along the D/V boundary in the wing discs, to direct *rpr* expression. Flies carrying *vgB-Gal4* were crossed to flies with *UAS-rpr*. When the cross was kept at 25°C, the resulting adult flies carrying *vgB-Gal4; UAS-rpr* showed a complete loss of all wing disc derived adult structures (wing and thorax; Suppl. Fig. 2C) although in some cases a small part of the thorax could be observed (Suppl. Fig. 2D,D'). When kept at 17°C, flies

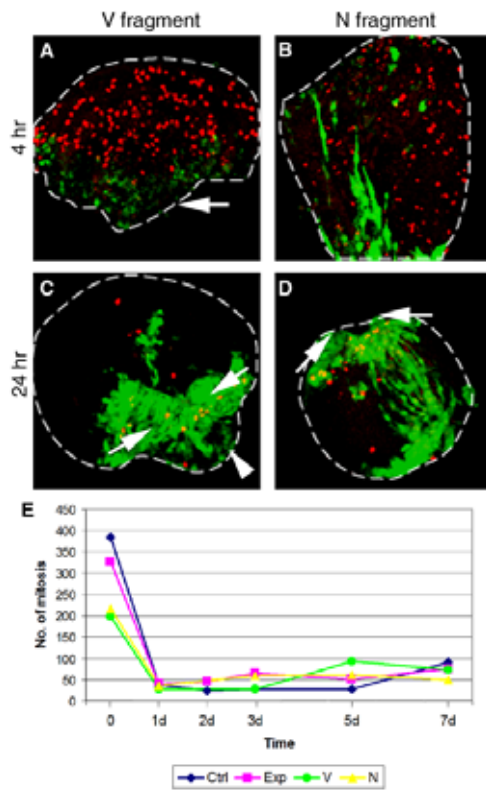


Suppl. Fig. 2

Alternative methods to induce regeneration. (A-B) *hs-rpr/en-Gal4; UAS-p35* wing discs after a 30 min heat shock at 37°C (A) and 24 hr at 25°C (B). Tunnel assay in green. (A) Most A compartment cells are positive for tunnel assay. P compartment only shows few positive cells (arrowheads). (B) Disc showing abnormal folds (arrows) while P compartment shows more tunnel positive cells (arrowhead) than in (A). (C-E) *vgB-Gal4; UAS-rpr* flies grown at 25°C (C-D') and 17°C (E). (C) Lack of thorax structures and wings. (D) A small part of the thorax present. (D') Magnification of white square in (D). (E) Normal thorax with a completely abnormal wing (arrowhead).

showed less severe phenotypes. Thorax was normally formed but wings appeared abnormal, resembling more a disc than a proper wing (Suppl. Fig. 2E).

Whereas a specific region of the discs is eliminated by cell death in both methods, the second technique (specific induction of cell death) needs an on/off system to ensure regeneration after cell death induction. Moreover, dead cells remained in the discs which is known to induce proliferation in the remaining tissue as it occurs after irradiation or activation of proapoptotic genes (Huh et al., 2004; Perez-Garijo et al., 2004; Ryoo et al., 2004).

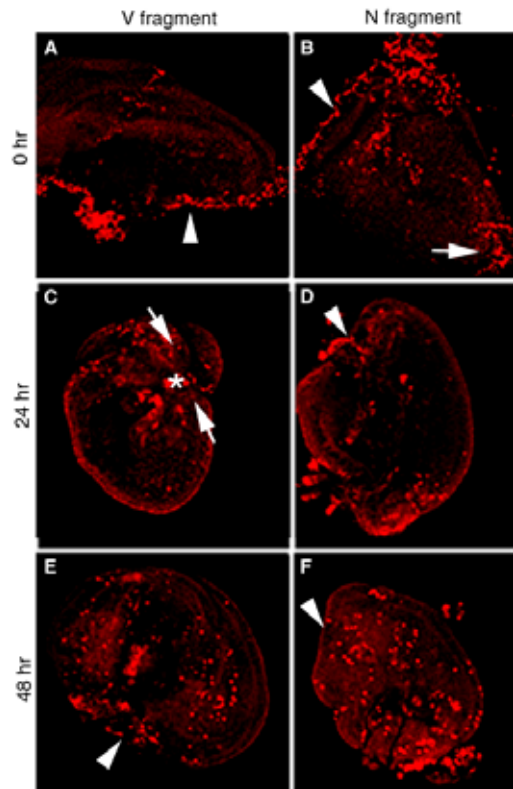


Suppl. Fig. 3

Proliferation in different wing disc fragments. *puc* expression (green; *UAS-GFP;puc-Gal4*) and mitoses (red; anti-PH3). Dashed lines indicate the contour of the fragments. (A,C) V fragments after 4 and 24 hr respectively. (B,D) N fragments after 4 and 24 hr respectively. (A) Mitoses are seen scattered behind the LE where *puc* starts to be expressed (arrow). (B) Mitoses are seen scattered around the whole fragment. (C) Few mitoses present, almost all located in the LE overlapping with *puc* expression. Arrows indicate the A and P folds forming during wound healing, and arrowhead indicates the wing pouch. (D) Few mitoses observed, most overlapping *puc* expression. (E) Graphical representation of the total number of mitoses in control and regenerating fragments at different times of regeneration.

Pattern of mitosis and cell death in different wing disc fragments.

To further investigate cell proliferation and cell death during regeneration the number of mitoses and dead cells was analyzed in two different fragments. We obtained identical ventral (V) fragments as described in (Bosch et al., 2005), and additional fragments keeping only the notum (N fragment). 100-110 hr AEL wing discs were cut parallel to the DV boundary, first inside the V compartment to get V fragments and then inside the D compartment getting N fragments. Mitoses were counted in whole fragments at different times of regeneration (0, 1, 3, 5 and 7 days) and results compared to total number of mitoses in Exp and Ctrl discs. Results are summarized in Suppl. Fig. 3E. At 0 hr V and N fragments showed less mitoses than Exp and Ctrl discs. This was expected as V



Suppl. Fig. 4

Patterns of cell death in different wing disc fragments. TUNEL staining shown in red. (A,C,E) V fragments after 0, 24 and 48 hr of culture respectively. (B,D,F) N fragments after 0, 24 and 48 hr of culture respectively. (A,B) Dead cells are mainly detected along the LE (arrowheads) and in the stalk region (arrow, B). (C,D) Lower numbers of dead cells seen when compared to 0 hr though still mainly located at the LE (C,D) and stalk (D) regions. Asterisk (C) and arrowhead (D) indicate the vertex of the wound. Arrows in C indicate the A and P folds formed during wound healing. (E,F) Dead cells scattered around the whole tissue. Arrowheads point out the vertex of the wound.

and N fragments are smaller than 3/4 and control discs. After 1 day, the number of mitoses dropped drastically and it is not until 3 days that the total number of mitoses in Exp and N fragments increased significantly compared to Ctrl and V fragments. Interestingly, increments in V occurred after 5 days of culture. Such a delay is likely a consequence of the delay in wound healing in V fragments (Bosch et al., 2005). At 7 days, the number of mitoses increased again in all disc fragments.

Mitoses were also correlated with *puc* expression pattern in *UAS-GFP;puc-Gal4* V and N fragments. After 4 hr of culture, mitoses appeared, namely in V fragments, behind the leading edge cells where *puc* started its expression (Suppl. Fig. 3A,B). On the contrary, after 1 day of culture mitoses were mainly detected in the blastema and most of them overlapped *puc* expression (Suppl. Fig. 3C,D).

Patterns of cell death were also studied in V and N fragments to test whether this process plays any role during regeneration. The number of dead cells was counted in both fragments at different times of regeneration (0, 1, and 2 days). After cutting (0 hr) cell death occurred at the injured tissue: the LE of the wound and the cells in the stalk (Suppl. Fig. 4A,B), as it was in Exp fragments. 24 hr later, the number of dead cells decreased but were mainly found close to the wound area (Suppl. Fig. 4C,D). At 48 hr, cell death increased slightly and occurred far from the regenerating area (Suppl. Fig. 4E,F) suggesting again, as in the Exp fragments, that cell death has only a role at early regenerative stages. Moreover, it supports the idea that long periods of culture cause general cell death (Dunne, 1981).

***dpp* and *wg* during imaginal disc regeneration.**

During embryonic and larval development *dpp* plays a very important role in cell survival, cell proliferation and pattern formation. To investigate whether it is also involved in regeneration we first analysed its expression pattern at different times of regeneration. Imaginal discs were cut within the P compartment leaving 3/4 A fragments. They were also cut within the A compartment leaving 3/4 P fragments but then the most ventral A/P boundary was crossed (Suppl. Fig. 5A).

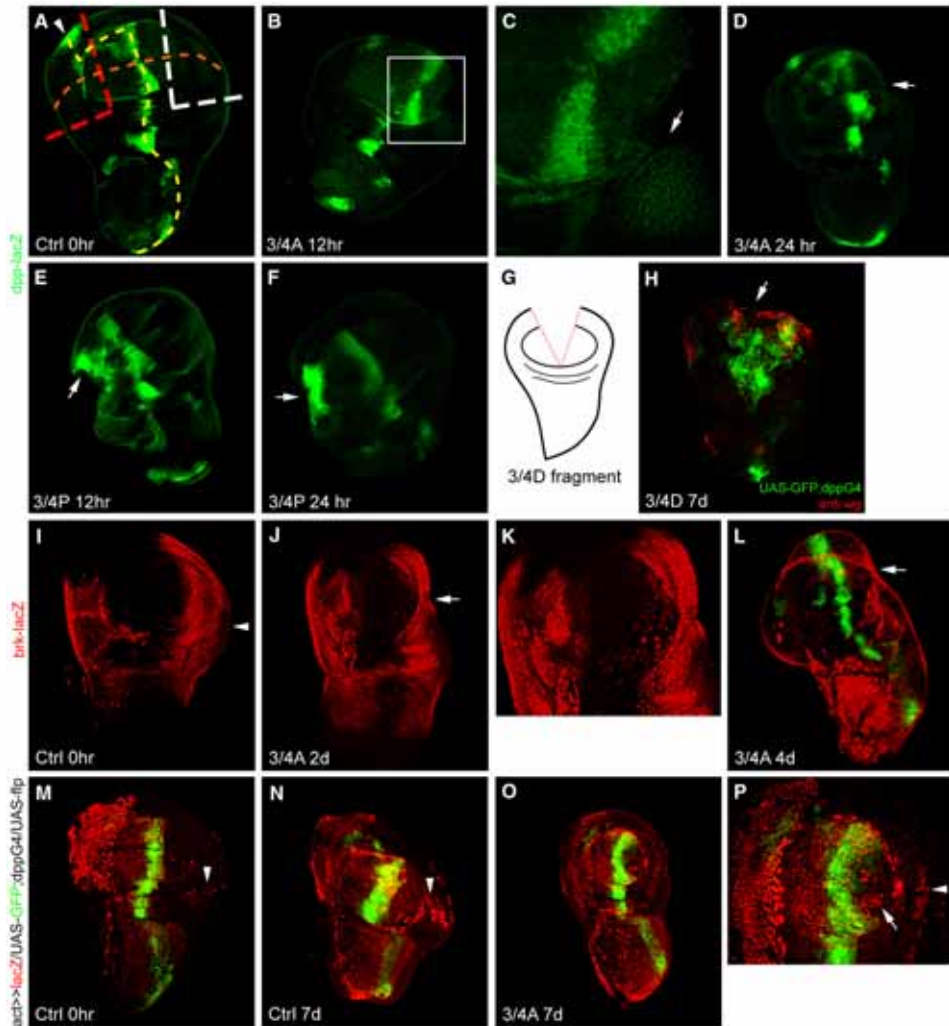
After 12 and 24 hr of culture, *dpp*, monitored by a *lacZ* reporter (see Suppl. Fig. 5A for normal pattern), was not detected in the blastema of 3/4 A fragments (Suppl. Fig. 5B-D). Instead, it was observed in 3/4 P fragments at both time points of regeneration (Suppl. Fig. 5E,F). This could be due to apposition of A and P cells because the A/P boundary in its most V position is cut, precisely where *dpp* is observed at 12 hr (Suppl. Fig. 5E). In all cuts, the normal expression of *dpp* in the central A/P boundary was not affected. When cut ventrally, crossing the A/P boundary and leaving a 3/4 D fragment (Suppl. Fig. 5G), imaginal discs showed a broadening of *dpp* expression even after 7 days of regeneration. Moreover, *wg* was also observed in the V compartment surrounding the regenerated area (Suppl. Fig. 5H).

To further study *dpp* expression during regeneration we analysed the expression pattern of *brinker* (*brk*), a repressor of the *dpp* pathway that in turn is negatively regulated by the *dpp* pathway (reviewed in Affolter et al., 2001). *brk* has a complementary expression to *dpp*, and is excluded from the centre of the discs (Suppl. Fig. 5I). Imaginal discs bearing the *brk-lacZ* reporter were cut in the P compartment leaving 3/4 A fragments. If *dpp* were expressed in the blastema we would expect a decrease in *brk* expression. However, after 2 or 4 days of regeneration this was not the case (Suppl. Fig. 5J-L) indicating that when the A/P boundary is maintained intact, *dpp* is not expressed during regeneration.

To confirm these results, we used the lineage-tracing experiment for *dpp-Gal4* to study whether the regenerated tissue derived from cells that had previously expressed *dpp*. Control discs showed that cells derived from *dpp* expression covered the A compartment whereas only a few scattered cells were detected in the P compartment (Suppl. Fig. 5M). Control discs cultured for 7 days showed the same pattern although the cells detected in the P compartment at 0 hr increased in number (Suppl. Fig. 5N). After 7 days of regeneration, 3/4 A fragments showed a similar pattern to control discs although some cells close to the A/P boundary expressed *lacZ* indicating they derived from cells having expressed *dpp* (Suppl. Fig. 5O,P). Altogether, these results point out that *dpp* is not specifically activated by regeneration unless the A/P boundary is affected by cutting.

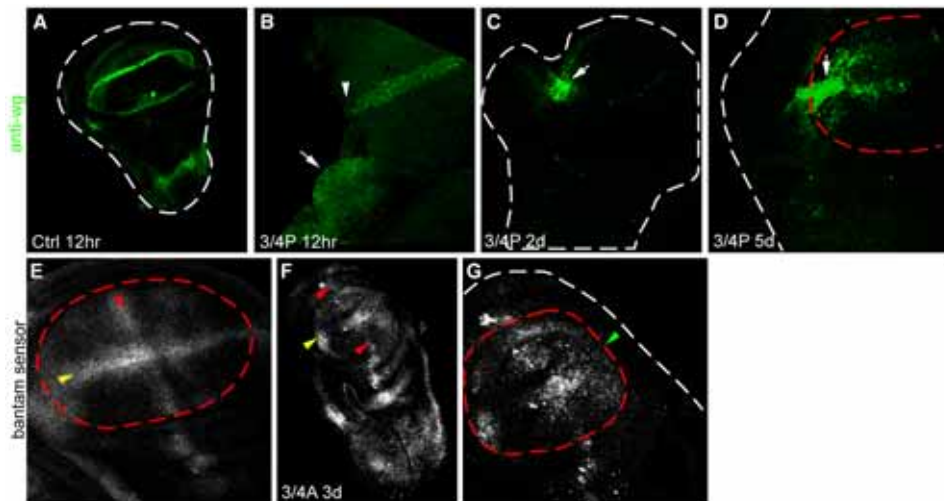
wg is also a key gene in activation of cell proliferation, cell survival and pattern formation during development. Accordingly, its expression pattern during regeneration was also analysed. WG is strongly expressed in the wing pouch along the D/V boundary (Suppl. Fig. 6A). After 12 hr of culture however, 3/4 P fragments do not show WG expression in LE cells at the D/V boundary. Moreover, WG expression increases in the D side of the cut (Suppl. Fig. 6B). Later on, WG was detected in the vertex of the wound (Suppl. Fig. 6C). This was expected because in 3/4 A fragments D/V boundary is crossed and thus, D and V cells will be apposed again during wound healing activating *wg* in these cells. After 5 days WG could still be detected in the apposed D and V cells of the wing pouch but not in the pleural region (Suppl. Fig. 6D).

We also studied the expression of *bantam*, a microRNA that stimulates proliferation and inhibits cell death during development, and is negatively regulated by the *wg* pathway (Brennecke et al., 2003). *bantam* expression was monitored through a *bantam-GFP* sensor. When the endogenous *bantam* is activated, it represses, by RNA interference, the *bantam* sensor and thus the GFP expression. In 100-110 hr AEL discs, GFP is detected in the D/V and A/P boundaries where *bantam* is repressed to stop proliferation (Suppl. Fig. 6E). Interestingly, GFP was also observed, at lower levels than in compartmental boundaries, in the P wing pouch in 3/4 A fragments after 3 days of regeneration (Suppl. Fig. 6F,G) matching *wg* expression in this region.



Suppl. Fig. 5

dpp expression during imaginal disc regeneration. In green: (A-F) *dpp-lacZ*; (H,L-P) *UAS-GFP*; *dpp-Gal4*. (A) Normal pattern of *dpp* at the A/P boundary (yellow dashed line). D/V boundary orange dashed line. Arrowhead points out the most V stripe of *dpp*. White and red dashed lines indicate cuts done to generate the 3/4 A (white) and 3/4 P (red) fragments. (B) 3/4 A fragment after 12 hr. No changes in *dpp* expression detected. (C) Magnification of white square in (B). No *dpp* expression seen at the LE (arrow). (D) 3/4 A fragment after 24 hr showing the normal *dpp* expression pattern along the A/P boundary and lack of expression in the regenerating area (arrow). (E,F) 3/4 P fragment after 12 and 24 hr respectively. *dpp* has increased in the most V stripe of the A/P boundary (arrow, E) and in the healed region (arrow, F). (G) Schematic representation of a 3/4 D fragment. Red lines indicate the cut. (H) 3/4 D fragment after 7 days of regeneration. *dpp* expression has increased around the regenerated area (arrow) together with *wg* (red). (I-L) *brk-lacZ* (red). (I) Control disc showing *brk* expression in lateral areas of A and P compartments. *brk* expression is weak in P cells at the edge of the disc (arrowhead). (J) 3/4 A fragment after 2 days showing *brk* expression at the vertex of the wound (arrow). (K) Magnification of the wing pouch in (J). (L) 3/4 A fragment after 4 days showing *brk* at the wound vertex (arrow) and a normal pattern of *dpp* in the A/P boundary. (M-P) Lineage-tracing experiments in *act>>lacZ/UAS-GFP*; *dpp-Gal4/UAS-flp* discs. *LacZ* is shown in red. (M) Control disc showing *dpp* in the A/P boundary, *LacZ* almost covering the whole A compartment and few scattered cells in the P compartment (arrowhead). (N) Control discs after 7 days showing identical pattern as in M and an increase in the number of P *LacZ* positive cells (arrowhead). (O) 3/4 A fully regenerated fragment at 7 days, showing normal pattern of *dpp* expression. (P) Magnification of wing pouch in (O). *LacZ* is detected in a few scattered cells in the P compartment (arrowhead) and in some cells close to the A/P boundary (arrow) not seen in controls.



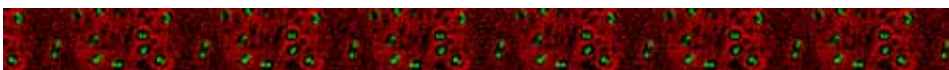
Suppl. Fig. 6

wg during imaginal disc regeneration. (A-D) WG expression (green). (A) 12 hr control disc showing normal pattern of WG. (B-D) 3/4 P fragment after 12 hr, 2 and 5 days respectively. (B) Magnification of the wing pouch in the A compartment. WG is lost in the LE cells of the D/V boundary (arrowhead) and increases in the dorsal LE cells (arrow). (C) WG detected in the wound vertex (arrow). (D) Magnification of the wing pouch in the A compartment. WG is detected in D and V cells of the wing pouch (arrow). (E-G) *bantam* sensor expression showed in black and white. (E) Magnification of the wing pouch of a control disc. GFP is detected in the A/P (red arrowhead) and D/V (yellow arrowhead) boundaries. (F-G) *bantam* sensor expression showed in black and white. (F) 3/4 A fragment after 3 days of regeneration. GFP appears in the compartmental boundaries. (G) Magnification of wing pouch in (F). GFP slightly increases in P wing pouch cells (green arrowhead). White and red dashed lines mark the contour of the discs and the wing pouch respectively.

Supplemental References

- Affolter, M., Marty, T., Vigano, M. A. and Jazwinska, A. (2001). Nuclear interpretation of Dpp signaling in *Drosophila*. *Embo J* **20**, 3298-305.
- Bosch, M., Serras, F., Martín-Blanco, E. and Baguna, J. (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* **280**, 73-86.
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. and Cohen, S. M. (2003). *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* **113**, 25-36.
- Dunne, J. F. (1981). Growth dynamics in the regeneration of a fragment of the wing imaginal disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **87**, 379-82.
- Huh, J. R., Guo, M. and Hay, B. A. (2004). Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr Biol* **14**, 1262-6.
- Perez-Garijo, A., Martín, F. A. and Morata, G. (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* **131**, 5591-8.
- Ryoo, H. D., Gorenc, T. and Steller, H. (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* **7**, 491-501.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677-83.

CAPÍTOL III



7. Article III: Estudi de la reformació del patró durant la regeneració pròxim-distal en discs imaginals de pota.

Els discs imaginals de pota tot i ser més petits i de menys fàcil manipulació que els d'ala presenten dues avantatges molt interessants per l'estudi de la regeneració. D'una banda, el seu creixement es dona principalment en l'eix Pr/Ds i per tant la regeneració pot ser estudiada en aquest eix mentre que difícilment ho pot ser en discs d'ala. Per altra banda i tal com s'ha explicat anteriorment (secció 2.3.2), els diferents segments de la pota adulta queden determinats durant el desenvolupament dels discs per l'activitat de diferents gens, els quals presenten un patró d'expressió concèntric i específic al llarg de l'eix Pr/Ds. A més, la seqüència de formació d'aquest patró i les interaccions entre els diferents gens per formar-lo, han estat molt estudiades durant el desenvolupament i per tant són un important punt de partida per interpretar els resultats que s'obtinguin en l'estudi de la regeneració.

7.1. Antecedents

La regeneració Pr/Ds en discs imaginals de pota també va ser un fenomen molt estudiat a les dècades dels 70 i 80. A més, els resultats eren comparats amb els obtinguts en la regeneració d'extremitats d'altres organismes com paneroles i amfibis.

Un focus de discussió va ser si la regeneració es donava en sentit de Pr a Ds, al revés (de Ds a Pr) o si es donava per fenòmens de intercalació (Fig. 11). En alguns treballs es va observar que la capacitat de regenerar dels fragments Pr era més alta que la dels fragments Ds i que per tant si cèl·lules Pr podien regenerar estructures Ds però no al revés la regeneració havia de donar-se en **sentit Pr → Ds** (Lee and Gerhart, 1973; Schubiger, 1971). Tot i això van aparèixer treballs que demostraven que la regeneració d'extremitats en paneroles es duia a terme des de **Ds a Pr** ja que, en posar en contacte fragments de potes de diferent valor posicional al llarg de l'eix Pr/Ds el nou teixit format provenia de la part Ds i no de la Pr (Bohn, 1976). També en paneroles es va estudiar la seqüència de formació del patró en regeneració mostrant que els primers valors que apareixien eren distals (Truby, 1983). El desenvolupament tampoc segueix un patró Pr/Ds clar sinó que es donen processos d'**intercalació** de valors posicionals entre la part més Ds i la més Pr. Com hem explicat anteriorment primer es determinen les parts més Pr i més Ds i després es van intercalant la resta de valors però tampoc estrictament en sentit Pr → Ds.

Per resoldre el problema de la regeneració en l'eix Pr/Ds es va estudiar l'aparició de marcadors posicionals al llarg d'aquest eix durant la regeneració en discs imaginals de pota. Per fer-ho, es va utilitzar el sistema *Gal4/UAS-GFP* per marcar l'expressió in vivo de gens PD concrets (*rn* o *ap*) i així assegurar la posició

del tall al llarg de l'eix Pr/Ds. Així, es van poder analitzar els patrons d'expressió d'aquests gens a través de la GFP i dels altres gens més Pr o més Ds a través de immunotincions. D'altra banda també es va estudiar la direcció de la regeneració amb experiments de llinatge cel·lular que permeten veure de quines cèl·lules prové la part regenerada.

7.2. Resum de l'article

Els discs imaginals de *Drosophila* creixen principalment al llarg de l'eix Pr/Ds durant el desenvolupament. Recentment, s'ha mostrat com la formació del patró en aquest eix té lloc seguint una seqüència precisa i com la determinació dels nous destins està mitjançada per la distalització i intercalació, on els nous destins s'afegeixen a la punta o són intercalats entre dos destins preexistents respectivament. A més, els mecanismes genètics i moleculars d'aquests processos estan sent aclarits. En contrast, no està encara clar si la regeneració dels discs de pota requereix la mateixa xarxa gènica utilitzada en el desenvolupament normal, ni quin és el mecanisme per a la formació del patró al llarg de l'eix Pr/Ds. En aquest treball hem estudiat la regeneració al llarg de l'eix Pr/Ds de discs imaginals de pota i mostrem com la regeneració, des d'un punt de partida diferent, provarà de reproduir el patró normal que s'aconsegueix durant el desenvolupament. Demostrem que la regeneració no segueix la mateixa seqüència de formació del patró que en el desenvolupament. Durant la regeneració, els marcadors posicionals reapareixen de manera semi-simultània i amb solapaments i després, quan el teixit creix, són refinats en dominis discrets reproduint el patró normal.

7.3. Referència

Aquest treball ha estat enviat a la revista *Current Biology*.

Pattern formation during regeneration abridges the normal limb developmental program

Manel Bosch⁺, Jaume Baguna⁺ and Juan Pablo Couso^{*}

^{*}School of Life Sciences, University of Sussex, Falmer, Brighton BN1 9QG, UK

⁺Department de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, SPAIN

Author for correspondence: j.p.couso@sussex.ac.uk

Summary

Drosophila leg imaginal discs grow mainly along the proximal-distal (PD) axis during development. In recent years it has been shown how pattern formation along this axis occurs in a precise sequence, and how the determination of new PD fates is mediated both by distalization and intercalation, where new fates are either added at the tip or intercalated between two pre-existing fates respectively. In addition, the genetic and molecular mechanisms of these processes are being unravelled. In contrast, it is still unclear whether leg disc regeneration requires the same genetic network used during normal development, and what is the mechanism for PD pattern formation. Here we study PD regeneration in leg imaginal discs and show that from a different starting point, regeneration will try to reproduce the normal pattern achieved during development. We demonstrate that regeneration does not follow the same sequence of pattern formation events as normal development. Instead, during regeneration PD positional markers reappear in a semi-simultaneous and overlapping manner, and later, as the regenerate expands, are refined into domains reproducing the normal pattern.

Introduction

Regeneration is one of the most fascinating phenomena in biology. All animals have the ability to develop, most have some ability to repair damaged structures, but only a minority have the ability to regenerate entirely lost organs. The ability to regenerate is not linked to a particular level of body complexity, or position in a phylogenetic scale. Likewise, regenerative abilities are not restricted, or present, in all members of particular families. This irregular distribution of regeneration ability is surprising and must be based on the evolutionary and developmental

trade-offs that a particular species must pay to acquire, or conserve from an ancestor. The lack of established experimental systems for the study of regeneration has hampered our understanding of this phenomena and the answering of very important questions. To begin with, it is not known if regeneration proceeds by the same procedure in all animals that is, if there are universal rules and constraints to regeneration, and what are its relationships to normal developmental processes.

Regeneration implies the re-development of a whole or part of an organ after amputation or loss, and/or the re-development of a cell type in a tissue after its ablation. Two main types of regeneration can be distinguished: the first type is carried out by pre-existing stem cells, located either in the affected tissues or in systemic reservoirs elsewhere in the body. The second type of regeneration is carried out by a blastema, a group of de-differentiated cells originating from either the injured or surrounding tissues. Humans show a limited ability to regenerate some structures, and the possibility to uncap hidden regenerative abilities raises important therapeutic expectations. The adult appendages of *Drosophila* differentiate from imaginal discs inside the larval body. Imaginal discs that have finished their normal proliferation can still regenerate extirpated parts if extra time to grow is provided by appropriate culture. These properties led in the 70s and 80s to an explosion of papers analysing the processes of wound healing, cell proliferation, growth and pattern formation that end up with general models which formally accounted for a good deal of data from *Drosophila* and were extrapolated to other regenerating systems [1-3]. It was also suggested that these models underpinned normal development and thus, regeneration would be a recapitulation of normal development. Understanding of appendage development in *Drosophila*, and in particular the patterns of expression and mutant phenotypes of key signalling molecules, suggested ways in which the

developmental programme could simultaneously support normal and regenerative development [4, 5]. However, several observations suggest that regeneration is not a simple recapitulation of normal development. Firstly, regeneration starts with different starting conditions than normal development. Cells involved in regeneration are in a different developmental state than the ones that produced the original limb. Most notably, their patterns of expression of developmental genes are different. Thus, in several cases, the first step of regeneration seems to be a redeployment of key signalling molecules in patterns similar, but not identical, to the ones found in normal developing limbs [6]. Secondly, the process of relocation of specific transcription factors that identify different cell fates or types in a limb might be different than in normal development [7, 8]. Thirdly, regenerating cells may be involved, or affected, by wound healing processes involving activation of JNK signalling and cell death [9-11]. Thus, more detailed studies of regeneration in insects are needed before its relationship with normal development is understood.

Here we report a new study on *Drosophila* leg imaginal discs regeneration. For the first time we report the expression of developmental genes during regeneration and reveal the cell lineage of the regenerating cells. Our results demonstrate that regeneration in *Drosophila* occurs by a local blastema. We show that the expression of developmental genes is reconstructed along the PD axis to recreate the pattern of a fully developed normal leg, but this redeployment follows a different sequence and timing than in normal development. Our results show that the imaginal discs of *Drosophila* are an optimal experimental system where to study the cellular, genetic and molecular basis of regeneration.

Results

Proliferation and pattern formation

To study the relationship between proliferation and pattern formation during regeneration, leg discs from 100-110 hr larvae were dissected and cut proximal to the *ap* expression domain (Fig. 1A). The *ap-Gal4 UAS-GFP* line was used to visualize *ap* expression at T4 to ensure it was completely removed. *ap* was also detected in ad epithelial cells but the GFP observed in these cells was weaker than the GFP detected in T4 and easily distinguished. Proximal (*ap*-) fragments were analysed for mitotic activity at 2 and 4 days of regeneration. After 2 days a clear increase of the number of dividing cells was observed (Fig. 1B) where cuts had been performed. After 4 days a more general distribution of cell proliferation was found and *ap* expression was already detected where the proliferating area had been observed (Fig. 1C).

Pattern formation during *ap*-regeneration was studied analysing by immunostaining of the PD genes whose expression domains had been removed in the amputation: *C15*, *al* and *Lim1* that are localized in the PT and *Bar* that is localized in the T5. *C15* expression was already observed after 4 days of regeneration however, this regenerated pattern showed differences with normal development. Surprisingly *C15* was found engulfed by and partially overlapping with the *ap* expression (Fig. 2A) which has been never observed during normal development. After 7 days *ap* and *C15* were already found in separate domains although too close to each other (Fig. 2B). Control discs cultured for 7 days showed a normal pattern (Fig. 2C). AI was also analysed after 4 days of regeneration and surprisingly although few *ap* cells could be already detected, no AI was observed close to the regenerating area (Fig. 2D-D''). After 7 days of culture discs had regenerated the *ap*, and AI expression domains with *Bar* between them (Fig. 2E,E') resembling the normal pattern. At this time however, some *ap*-fragments still showed *ap* overlapping with AI (not shown). *In vivo* culture of intact discs (Fig. 2F) showed the same pattern of *ap*, *Bar* and AI expression than in normal development. When *Lim1* expression was studied during regeneration some *ap*-fragments after 7 days showed overlap of *Lim1* with *ap* in some cells (Fig. 2G,G'), with more overlapping cells than between *ap* and *C15*. Discs with discrete expression domains of *ap* and *Lim1* were also found (Fig. 2H).

To further investigate the process of pattern formation during regeneration two other markers were studied: *bab*, a tarsal gene, and *vn*, the EGFR pathway ligand (Fig. 3). *ap*-fragments after 4 days showed a decrease in *Bab* levels where *vn* expression was detected, suggesting EGFR could repress tarsal genes as during normal development [12, 13].

The origin of the regenerated cells

We also wanted to explore the origin of cells that formed the regenerated area using a cell lineage-tracing method [11, 14]. We lineage-tagged cells expressing *ap-Gal4* in regenerating *ap*-fragments. Discs were dissected from larvae carrying *ap-Gal4 UAS-GFP/act-FRT-stop-FRT-lacZ; UAS-Flp*. *Flp* recombinase, expressed in cells expressing *ap-Gal4*, excise the flip-out 'stop' cassette from the inactive reporter construct to generate an active *act>lacZ* transgene. After excision, the reporter gene expression is regulated by the actin promoter and is clonally inherited in all the progeny of *ap-Gal4*-expressing cells in which the recombination event took place. The expression of *lacZ* thereafter is independent of *Gal4*. When lineage-tagging control discs at 0 hr, *lacZ* expression was detected in ad epithelial cells, the ring of *ap* epithelial cells,

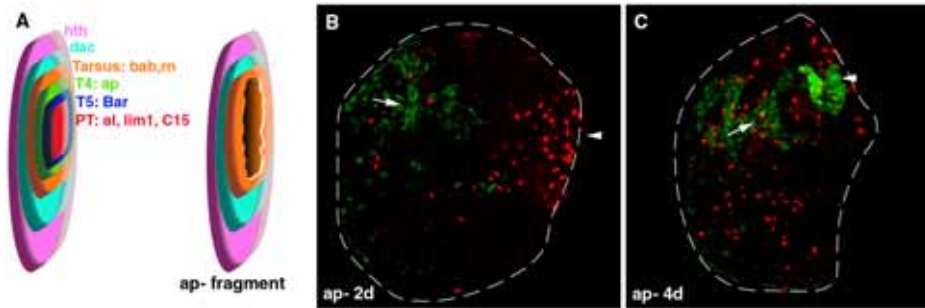


Figure 1. Proliferation in distal leg disc regeneration. (A) Right: Schematic representation of a leg disc and some of the genes expressed along its PD axis. All discs are oriented dorsal down and distal right. Left: *ap*- fragment after cutting. (B, C) *ap*- fragments after 2 and 4 days of culture respectively. (B) Blastema cells are detected where the cut was performed (arrowhead). Arrow indicates the ad epithelial cells inside the disc lumen. (C) Mitoses are more generally distributed in the disc. *ap* epithelial expression is already observed (arrowhead), more intense than the ad epithelial *ap* expression (arrow). White dashed lines indicate the disc contour. *ap*-*Gal4* *UAS*-*GFP* (green), anti-PH3 (red).

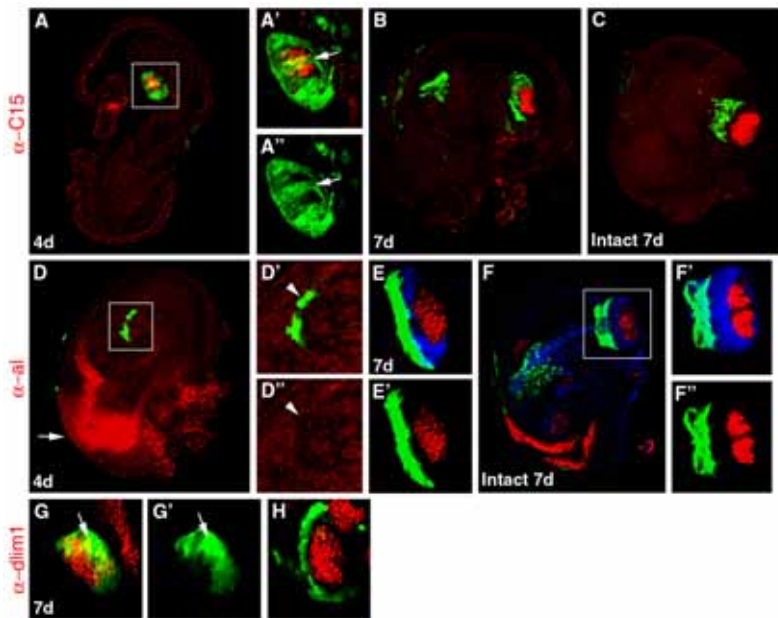


Figure 2. Pattern formation during regeneration. In all cases *ap*-*Gal4* *UAS*-*GFP* is showed in green. Arrows point out cells overlapping *ap* with the distal markers (C15 and Lim1). (A-B) *ap*- fragments after 4 and 7 days of culture respectively. (A) *ap* and C15 (red) are detected overlapping in some cells. (A', A'') Magnification of white square in (A). (A'') red channel excluded. (B) *ap* and C15 are expressed in different cells but very close to each other. (C) Control disc after 7 days of culture showing normal pattern of *ap* and C15. (D) *ap*- fragment after 4 days of culture showing *ap* expression in few cells and Al (red) only in its proximal domain (arrow). (D', D'') Magnification of white square in (D). Arrowheads point out *ap* cells and the lack of Al expression. (D'') green channel excluded. (E) Inset of a regenerated tip from an *ap*- fragment after 7 days. Bar expression is shown in blue. (E') Blue channel excluded. (F) Control disc after 7 days of culture. (F', F'') Magnification of white square in (F). (F'') Blue channel excluded. (G, H) Insets of *ap*- fragment tips after 7 days of regeneration. (G) Lim1 (red) also overlaps with *ap*. (G') Red channel excluded. (H) Inset of a regenerated tip.

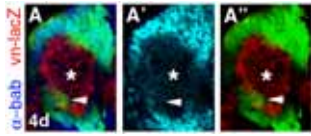


Figure 3. (A-A'') Tip of an *ap-* fragment after 4 days showing *vn* expression (red) where Bab levels decrease (blue, asterisks). (A') Blue channel showed as cyan to visualize the reduction of Bab levels. (A'') Blue channel excluded. Arrowhead indicates *ap* expression overlapping *vn*.

and in a ventral stripe of cells that slightly overlapped with C15 expression (Fig. 4A). *ap-* fragments after 7 days of regeneration showed as well *lacZ* expression in ad epithelial cells and in the regenerated ring of *ap* expression. Intriguingly, *lacZ* expression was also observed in many of the distal cells expressing C15 and in cells between the GFP ring and C15 (Fig. 4B), giving support to the idea that there is overlapping of proximal and distal markers during regeneration and that later on, these markers segregate as regeneration proceeds.

We also studied the origin of all the newly formed cells by lineage-tagging the expression of *rn-Gal4* in cuts performed in the middle of *rn* domain leaving therefore, *rn* expressed in all leading edge cells. In control discs *lacZ* expression correlated perfectly with *rn* actual expression and no overlapping with C15 was observed (Fig. 4C). After 7 days of culture fragments showed that regeneration of C15 had derived completely from proximal cells that had expressed *rn*, as C15 and *lacZ* overlap in all cells (Fig. 4D). At this stage the distal regenerated cells had ceased actual *rn* expression, as revealed by non-overlap of C15 and *rn-Gal4*-driven GFP.

Discussion

Pattern formation during regeneration

Our results on leg discs regeneration show that it proceeds through blastema formation and not by systemic stem cells. This is supported by the observation of increased levels of mitotic activity in the vicinity of the wound described in wing and leg disc regeneration [11, 15-17] and with the *rn-Gal4* lineage-tracing showing that all regenerated cells originate from around the wound. Interestingly, the concept of blastema in vertebrate regeneration mostly seems to imply a degree of de-differentiation [reviewed in 18]. In this sense, cells involved in *Drosophila* leg disc regeneration seem to undergo a de-determination process as cell lineage experiments show that the distal leg is regenerated from the proximal leg so proximal cells have to change their expression of developmental markers.

During regeneration the expression of developmental genes is re-acquired, and thus the cell types that they specify are regenerated. Nevertheless, several observations suggest that this is achieved in a different way than during normal development. During normal development, observation of gene expression profiles suggests that PD cell fates are established in a 'naïve' primordium and increasingly subdivide it [reviewed in 19]. Establishment of a fate precedes its growth via cell proliferation. This inference is supported by the results of lineage tracing experiments. Although clones in final legs can appear over several segments, lineage tracing in normal developing discs reveal only a limited amount of cells crossing fate boundaries as defined by developmental gene expression [20, 21]. Thus, although normal legs do not have strict lineage restrictions along the proximal-distal axis, and distal cells must, in principle, originate from the proximal part (the body), each PD region develop largely from a small population of founder cells that originally acquired the expression of the relevant PD genes (*dac*, *bab/rn*, *Bar*, *ap*, *C15/Lim1/al*). In contrast, during regeneration, all distal leg fates originate from the proximal cells near the wound. These proximal cells, or their descendants, must lose their proximal markers and acquire more distal ones. Our observations support this inference since we observe the loss of tarsal markers such as *bab* where *vn* starts to be expressed, as well as overlaps in gene expression of proximal and distal markers, such as the overlap between *ap* and the distal PT markers Lim1, Al and C15 which are not found in the wild-type. These overlaps could be due to perdurance of GFP and not to proper *ap* expression, but lineage-tracing experiments also show that some of the C15 cells and the cells between C15 and T4 descend from cells that had expressed *ap* at some prior point during regeneration. These results also indicate that the expression of distal markers is acquired in a sequence Ap-to-C15 that is different than the wild-type C15-to-Ap. We interpret our observations of a mixture of cells with and without overlapping PD markers as meaning that the timing of gene expression events is different, faster and almost semi-simultaneous in blastema cells, and then resolved into discrete PD domains.

The timing of distal tarsus formation during regeneration

The developmental cascade producing PD fates in the distal region [12, 13] is able to support this scenario and the overlaps observed. Thus, in a wild-type leg, *Bar* can be detected in the middle of the disc at early third instar, activated by EGFR signalling (Fig. 5A). Slightly later, raising levels of EGFR activity activate the most distal fate (PT) through activation of C15/Al [22, Fig. 5B, 23] which then repress *Bar* in this region. Later on, more proximal fates (tarsus 1-4) develop, through the activation of *bab*

and *rn* around Bar (Fig. 5C). The last PD gene to be expressed is *ap* that appears in the most proximal Bar cells (T4) by a Bar-dependent activation and is always kept separated from Al, Lim1 or C15 (Fig. 5D). In contrast, after amputation tarsal identity is the most distal one (Fig. 5E). After 3-4 days, EGFR can activate *Bar*, and Bar already can activate *ap* (Fig. 5F). Later on, EGFR activates the PT genes in regeneration (Fig. 5G) and they will try to repress Bar directly and *ap* gene expression indirectly as it occurs during normal development [22-24] thus leaving a disc resembling the normal pattern (Fig. 5H). In addition, these PT transcription factors have also the ability to shut off *ap* expression directly even when in wild-type development, their expression patterns never overlap [24], precisely the situation we find in regenerating discs. In this way, emergent properties of the developmental programme, which normally provide a fail-safe during normal development, can be exploited to indirectly as it occurs during normal development [22-24] thus leaving a disc resembling the normal pattern (Fig.

5H). In addition, these PT transcription factors have also the ability to shut off *ap* expression directly even when in wild-type development, their expression patterns never overlap [24], precisely the situation we find in regenerating discs. In this way, emergent properties of the developmental programme, which normally provide a fail-safe during normal development, can be exploited to resolve a new situation created during regeneration. Thus, regeneration exploits and exposes the remarkable resilience of developmental programmes in their attempt to achieve an optimal outcome.

This early *ap* expression during regeneration, before PT genes, suggests the possibility of a signal coming from more proximal cells that triggers *ap* expression and is already present in the *ap*- fragment. In normal development a requirement for this signal [whose existence is suggested by the inability of Bar to raise Ap expression outside the tarsal region, 25, Pueyo and Couso, unpub. obs.] would trigger *ap* only after tarsus determination, and therefore after PT formation. Thus, the normal

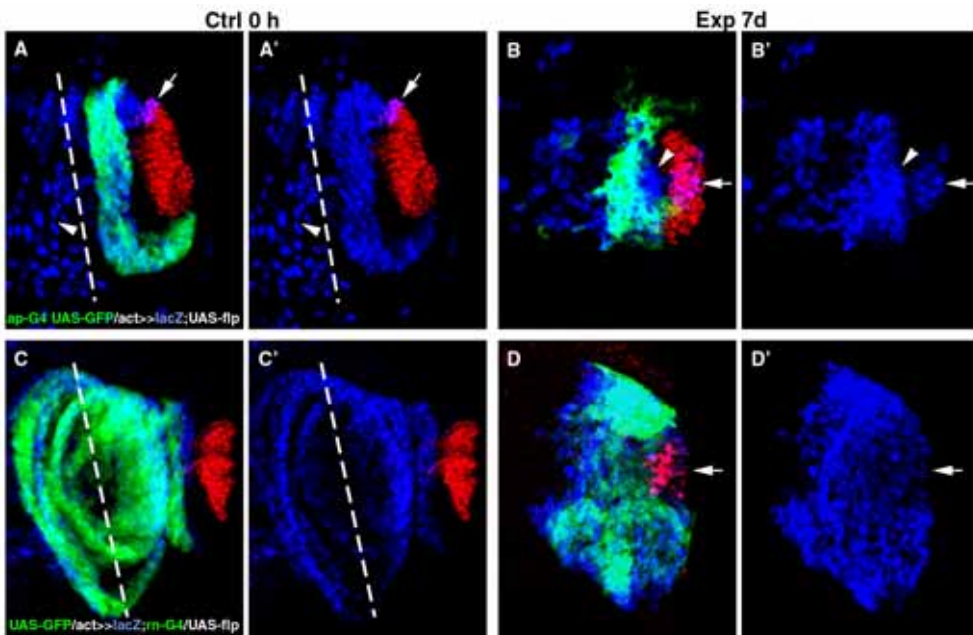


Figure 4. Origin of distal regenerated cells. Arrows point out cells overlapping *lacZ* and C15. (A-B') *ap-Gal4 UAS-GFP/act-FRT-stop-FRT-lacZ; UAS-Flp* distal tips. (A) Control discs at 0 hr showing *lacZ* expression (blue) in ad epithelial cells (arrowhead), in the tarsal ring of *ap* and in a ventral stripe slightly co-localizing with C15 (red). *ap* expression in ad epithelial cells could be excluded from confocal analysis due to its weaker signal compared to T4 *ap* expression. (B) *ap*- fragment after 7 days showing *ap* and C15 regenerated. *LacZ* is observed in the same cells as in (A) and overlapping with some of the C15 regenerated cells. *LacZ* is also detected alone between T4 and C15 (arrowhead). (C-D') *UAS-GFP/act-FRT-stop-FRT-lacZ; rn-Gal4/UAS-Flp* distal tips. (C) Control discs at 0 hr showing *lacZ* expression where *rn* is expressed (green). White dashed lines indicate the cut site. (D) *ap*- fragment after 7 days of regeneration. C15 is observed distally to *rn* actual expression. *LacZ* marks all *rn* and C15 cells. (A', C') Green channel excluded. (B', D') Only blue channel.

developmental sequence allows the establishment of a solid Bar domain, and its subsequent exclusion from the PT, before the activation of Ap. The presence of Ap leads to the formation of Ap/Bar dimers [24] that might diminish the availability of Bar/Bar homodimers to counteract repression by C15/Al/Dlim1 complexes [22, 24]. Simultaneously, widespread co-localization of Ap and Bar reduces the pool of Bar-only cells necessary for T5 determination. Both effects combined would reduce the size of tarsus 5 and compromise the orderly differentiation of coherent tarsus 4, 5 and PT territories from proximal to distal. Interestingly, tarsus 4 and 5 are often not fully resolved after either mutant or regenerative development [24, 26, 27].

Altogether, our results make clearer that the whole regenerate is a coherent structure whose organisation along the PD axis mimics a normal leg. Our observations do not favour a purely ‘Proximal to Distal’ mode of regeneration, since the lineage-tracing experiments also show that the whole leg tip does not develop from *ap* expressing cells. In this view the fates and gene expression patterns appear concentrated and mixed-up and are only released when the regenerate expands. Previous studies in wing disc regeneration pointed out similar conclusions as regenerated fates could be already observed after 4 days although final growth was not achieved until 7 days [28]. This model can also be extrapolated to the results in regenerating amphibian limbs [8], corroborating again the remarkable similarity between both systems. The question is then why normal development proceeds in its normal way when regeneration demonstrates it can be done in a perhaps simpler and in principle, faster way. A likely answer might be that during regeneration a high degree of variability is observed and often only a sub-optimal final situation is achieved [this work, 29]. Hence the ‘normal development’ way appears as a more robust and reliable process.

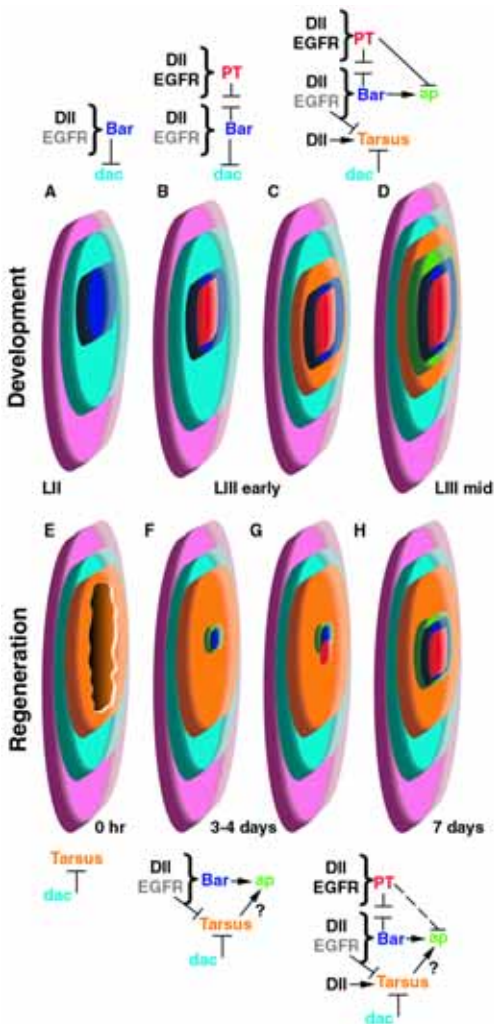


Figure 5. Models summarizing the process of pattern formation in tarsal segments during development and regeneration. Genetic interactions driving the process are drawn above the developmental model (A-D) and below the regeneration model (E-H). (A) At LII leg disc is subdivided in *hth*, *dac* and *Dll* (not shown) domains. As EGFR pathway is activated, together with Dll, induce *Bar* in the centre of the disc. (B) In early third instar higher levels of EGFR activate, together with Dll, the pretarsal (PT) genes (*C15*, *al* and *Lim1*) that repress *Bar* in the centre. (C) The tarsal genes (*rn* and *bab*) are activated by Dll proximally to *Bar* and are inhibited distally by EGFR and proximally by *Dac*. (D) At mid third instar *ap* is activated at T4 by *Bar* and inhibited indirectly by PT genes. (E) *ap*- fragments at 0 hr have tarsus as the more distal identity. (F) After 3-4 days of regeneration, EGFR pathway is activated and its low levels activate *Bar* that already induces *ap* expression probably in collaboration with a proximal signal. (G) Higher EGFR levels activate the PT genes close to or overlapping with *Bar* and *ap*. Then PT genes will repress *Bar* and *ap* and will occupy the centre of the disc thus reproducing the normal pattern (H).

Experimental Procedures

Drosophila stocks and genetics

A description of genetic markers and chromosome balancers used in this study can be found in FlyBase. Fly cultures and crosses were grown on standard fly medium at 25°C.

Stocks used in this work were: *vn-lacZ* is the *vn^{RF}* reporter *lacZ* allele [30]; *ap-Gal4 UAS-GFP* [31]; *UAS-GFP;rn-Gal4/TM6B* [32].

In vivo disc culture and microsurgery

Male foreleg imaginal discs were removed from wandering larvae (100-110 hr AEL, after egg laying), into Schneider's insect medium (Sigma) and were cut across the Proximal-Distal (PD) axis. Cuts were performed proximal to the *ap* expression domain (Tarsus 4, T4) monitored by *ap-Gal4 UAS-GFP*. Experimental (*ap-* fragments) and control (uncut) discs were implanted into the abdomen of recently eclosed Canton S females and kept at 25°C. Following a culture period of 2, 4, and 7 days, implants were removed from the hosts and analyzed.

Immunohistochemistry

Antibody staining on imaginal discs was done using a standard protocol. Primary antibodies used in this study were: anti- β galactosidase (1:1000, Cappel), anti-PH3 (1:1000, Upstate Biotechnology), anti-C15 [1:1000, 23], anti-A1 [1:1000, 33], anti-Bar [1:1000, 34], anti-Lim1 [1:1000, 35] and anti-Bab (D. Godt). Secondary antibodies were provided by Jackson Immunoresearch and were used 1:200 in all cases. After staining, samples were mounted on SlowFade Light Antifade kit (Molecular Probes, Inc). Fluorochrome-labelled samples were analysed and captured using a Zeiss confocal microscope. Images were processed using the ImageJ (NIH Image; www.rsb.info.nih.gov/ij). Final artwork was processed by Adobe Photoshop 7.0 software.

Cell lineage experiments

Two sets of experiments were performed. In the first set *Act5c-FRT-stop-FRT-lacZ;UAS-flipase/TM6B* line was crossed to *ap-Gal4 UAS-GFP/CyO* and leg discs from the larval offspring were cut proximally to the GFP ring in T4. In the second set *Act5c-FRT-stop-FRT-lacZ;UAS-flipase/TM6B* line was crossed to *UAS-GFP;rn-Gal4/TM6B* and leg discs from the larval offspring were also cut proximally to T4 although any specific T4 marker was present. In all cases *ap-* fragments were implanted inside adult hosts and left to regenerate for 7 days before they were recovered and analysed.

Acknowledgments

We thank F. Serras, M. corominas, J.I. Pueyo and M.I. Galindo for their advice and helpful comments on the

manuscript. This research was supported by the Marie Curie Training Program in the University of Sussex.

References

1. Bryant SV, French V, Bryant PJ: **Distal regeneration and symmetry.** *Science* 1981, **212**:993-1002.
2. French V, Bryant PJ, Bryant SV: **Pattern regulation in epimorphic fields.** *Science* 1976, **193**:969-981.
3. Meinhardt H: **Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields.** *Dev Biol* 1983, **96**:375-385.
4. Campbell G, Tomlinson A: **Initiation of the proximodistal axis in insect legs.** *Development* 1995, **121**:619-628.
5. Couso JP, Bate M, Martinez-Arias A: **A wingless-dependent polar coordinate system in Drosophila imaginal discs.** *Science* 1993, **259**:484-489.
6. Mito T, Inoue Y, Kimura S, Miyawaki K, Niwa N, Shinmyo Y, Ohuchi H, Noji S: **Involvement of hedgehog, wingless, and dpp in the initiation of proximodistal axis formation during the regeneration of insect legs, a verification of the modified boundary model.** *Mech Dev* 2002, **114**:27-35.
7. Carlson MR, Komine Y, Bryant SV, Gardiner DM: **Expression of Hoxb13 and Hoxc10 in developing and regenerating Axolotl limbs and tails.** *Dev Biol* 2001, **229**:396-406.
8. Gardiner DM, Blumberg B, Komine Y, Bryant SV: **Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs.** *Development* 1995, **121**:1731-1741.
9. Bosch M, Serras F, Martin-Blanco E, Baguna J: **JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating Drosophila wing imaginal discs.** *Dev Biol* 2005, **280**:73-86.
10. Mattila J, Omelyanchuk L, Kytälä S, Turunen H, Nökkälä S: **Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a Drosophila melanogaster wing imaginal disc.** *Int J Dev Biol* 2005, **49**:391-399.
11. Bosch M, Serras F, Baguna J: **Growth dynamics, cell lineage, and clonal analysis of blastema cells during the regeneration of Drosophila imaginal wing discs.** *Development* Submitted.
12. Galindo MI, Bishop SA, Greig S, Couso JP: **Leg patterning driven by proximal-distal interactions and EGFR signaling.** *Science* 2002, **297**:256-259.
13. Campbell G: **Distalization of the Drosophila leg by graded EGF-receptor activity.** *Nature* 2002, **418**:781-785.
14. Weigmann K, Cohen SM: **Lineage-tracing cells born in different domains along the PD axis of the developing Drosophila leg.** *Development* 1999, **126**:3823-3830.
15. Karpen GH, Schubiger G: **Extensive regulatory capabilities of a Drosophila imaginal disk blastema.** *Nature* 1981, **294**:744-747.
16. Kiehle CP, Schubiger G: **Cell proliferation changes during pattern regulation in imaginal leg discs of Drosophila melanogaster.** *Dev Biol* 1985, **109**:336-346.
17. Bryant PJ, Fraser SE: **Wound healing, cell communication, and DNA synthesis during imaginal disc regeneration in Drosophila.** *Dev Biol* 1988, **127**:197-208.
18. Odelberg SJ: **Unraveling the molecular basis for regenerative cellular plasticity.** *PLoS Biol* 2004, **2**:E232.

19. Kojima T: **The mechanism of *Drosophila* leg development along the proximodistal axis.** *Dev Growth Differ* 2004, **46**:115-129.
20. Wu J, Cohen SM: **Proximodistal axis formation in the *Drosophila* leg: subdivision into proximal and distal domains by Homothorax and Distal-less.** *Development* 1999, **126**:109-117.
21. Wu J, Cohen SM: **Proximal distal axis formation in the *Drosophila* leg: distinct functions of teashirt and homothorax in the proximal leg.** *Mech Dev* 2000, **94**:47-56.
22. Kojima T, Tsuji T, Saigo K: **A concerted action of a paired-type homeobox gene, *aristales*, and a homolog of *Hox11/tlx* homeobox gene, *clawless*, is essential for the distal tip development of the *Drosophila* leg.** *Dev Biol* 2005, **279**:434-445.
23. Campbell G: **Regulation of gene expression in the distal region of the *Drosophila* leg by the Hox11 homolog, C15.** *Dev Biol* 2005, **278**:607-618.
24. Pueyo JI, Couso JP: **Chip-mediated partnerships of the homeodomain proteins Bar and Aristaless with the LIM-HOM proteins Apterous and Lim1 regulate distal leg development.** *Development* 2004, **131**:3107-3120.
25. Kojima T, Sato M, Saigo K: **Formation and specification of distal leg segments in *Drosophila* by dual Bar homeobox genes, *BarH1* and *BarH2*.** *Development* 2000, **127**:769-778.
26. Tanaka A, Akahane H, Ban Y: **The problem of the number of tarsomeres in the regenerated cockroach leg.** *J Exp Zool* 1992, **262**:61-70.
27. Pueyo JI, Couso JP: **Parallels between the proximal-distal development of vertebrate and arthropod appendages: homology without an ancestor?** *Curr Opin Genet Dev* 2005, **15**:439-446.
28. Adler PN: **Growth during pattern regulation in imaginal discs.** *Dev Biol* 1981, **87**:356-373.
29. Tanaka A, Akahane H, Ban Y: **The problem of the number of tarsomeres in the regenerated cockroach leg.** In: *Book The problem of the number of tarsomeres in the regenerated cockroach leg.* (Editor ed.^eds.), vol. 262. pp. 61-72. City; 1992: 61-72.
30. Spradling AC, Stern D, Beaton A, Rhem EJ, Laverty T, Mozden N, Misra S, Rubin GM: **The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes.** *Genetics* 1999, **153**:135-177.
31. Calleja M, Moreno E, Pelaz S, Morata G: **Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*.** *Science* 1996, **274**:252-255.
32. St Pierre SE, Galindo MI, Couso JP, Thor S: **Control of *Drosophila* imaginal disc development by *rotund* and *roughened eye*: differentially expressed transcripts of the same gene encoding functionally distinct zinc finger proteins.** *Development* 2002, **129**:1273-1281.
33. Campbell G, Weaver T, Tomlinson A: **Axis specification in the developing *Drosophila* appendage: the role of wingless, decapentaplegic, and the homeobox gene *aristales*.** *Cell* 1993, **74**:1113-1123.
34. Higashijima S, Kojima T, Michiue T, Ishimaru S, Emori Y, Saigo K: **Dual Bar homeobox genes of *Drosophila* required in two photoreceptor cells, R1 and R6, and primary pigment cells for normal eye development.** *Genes Dev* 1992, **6**:50-60.
35. Lilly B, O'Keefe DD, Thomas JB, Botas J: **The LIM homeodomain protein dLim1 defines a subclass of neurons within the embryonic ventral nerve cord of *Drosophila*.** *Mech Dev* 1999, **88**:195-205.

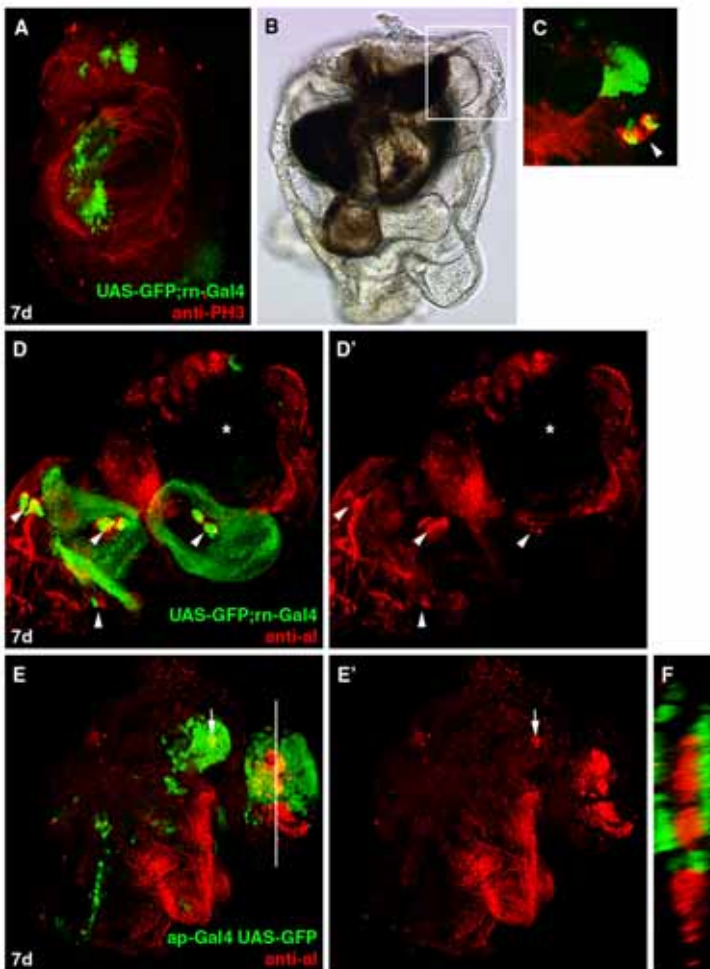
Supplemental Data

PD regeneration in white pupa discs

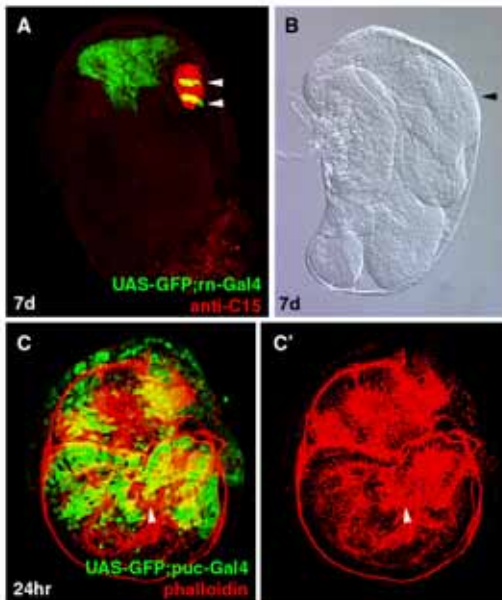
During development, leg imaginal disc grows in a PD direction. When pupal stages are reached it everts and enters metamorphosis. At 0-4 hr after pupa formation (APF), folds and segments appear in leg discs serving as markers to cut them at any PD level. Hence, 0-4 hr APF leg discs were cut proximally to the tarsus using *rotund* (*rn*) as marker. *rn*- fragments, *UAS-GFP; rn-Gal4*, were cultured for different periods of time. Unexpectedly, control (uncut) discs cultured for 7 days showed disrupted patterns of *rn* expression (Suppl. Fig. 1A). Moreover, control and *rn*- fragments (Suppl. Fig. 1B), showed completely abnormal morphologies and cuticle formation suggesting they were into metamorphosis. Although discs

showed abnormal morphologies and adult cuticle in the middle of the fragment, *rn*- fragments regenerate, after 4 to 7 days of culture, *rn* and distal AI expressions outside the adult cuticle (Suppl. Fig. 1C). Examples of duplication and even tetrareplication of structures were observed after 7 days of regeneration (Suppl. Fig. 1D-D').

To avoid highly variable and abnormal morphologies we generated *ap*- fragments from 0-4 hr APF discs carrying *ap-Gal4 UAS-GFP*. After culture, *ap*- fragments formed adult cuticle and their morphologies resembled a normal disc. In addition, distal markers appeared engulfed by and partially overlapping with *ap* expression (Suppl. Fig. 1E-F). This indicates that regeneration reproduces the normal pattern achieved during development though following a different sequence.



Suppl. Fig. 1. PD regeneration in white pupa discs. (A) Control disc after 7 days of culture showing a disrupted pattern of *rn* expression (green) and very few scattered mitoses (red). (B-D') *rn*-fragments after 7 days of culture. (B) Nomarski optics image. Highly folded tissue with black cuticle. (C) Magnification of white square in B showing the regenerated patterns of *rn* and AI (red). (D) Tetrareplication of the tarsus and the distal tip (AI, red). Arrowheads mark four regenerated distal tips. Asterisk indicates the cuticle. (D') Green channel excluded. (E-F) *ap*-fragment after 7 days. (E) Duplication of the distal tip. *ap* and AI expressions overlap (arrow) and AI is engulfed by *ap* (white line; see F). (E') Green channel excluded. (F) Z section along the white bar in E. *ap* and AI do not overlap.



Suppl. Fig. 2. PD regeneration in late third instar discs. (A) Control disc after 7 days of culture with normal patterns of *rm* (green) and C15 (red). Arrowheads point out *rm* expression in the future claws. (B) *ap*- fragment after 7 days of regeneration with no cuticle and normal morphology (compare to Suppl. Fig. 1B). Arrowhead indicates the distal tip of the fragment. (C-C') *UAS-GFP; puc-Gal4* (green) fragments after 24 hr of culture. Phalloidin (red). (C) *puc* is expressed all over the disc. Arrowhead indicates the centre of the wound. (C') Green channel excluded.

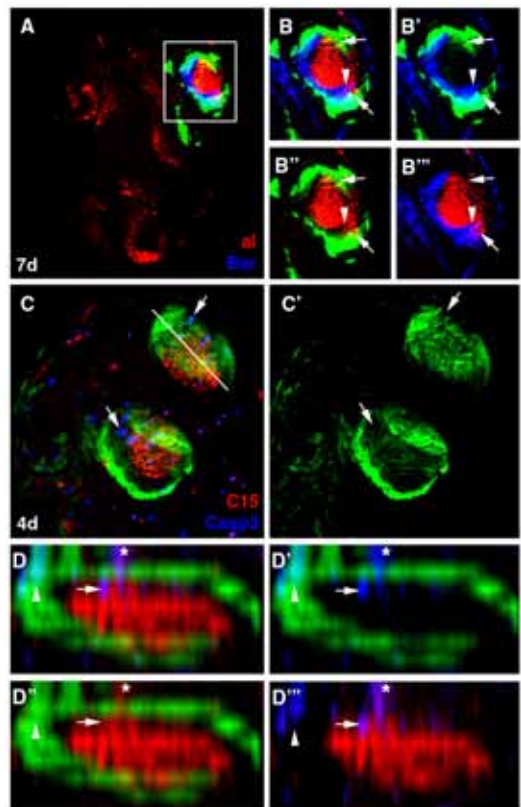
PD regeneration in late third instar discs

When cultured, 0-4 hr APF discs show abnormal morphologies and disrupted patterns of *rm* expression turning difficult to study the process of regeneration. Instead, cultured late third instar discs (100-110 hr AEL) preserve normal *rm* pattern including late *rm* expression in the future claw (Suppl. Fig. 2A). Moreover, *ap*- fragments showed normal disc morphology and adult cuticle was not formed (Suppl. Fig. 2B). Unfortunately, 100-110 hr AEL discs could not be cut proximal to the *rm* domain because they were too small in size compared to 0-4 hr APF.

JNK signalling pathway plays a very important role during wound healing [1] and regeneration [2, 3]. *puckered* (*puc*), a downstream gene of the pathway, labels specifically the leading edge (LE) cells during wound healing as well as in regeneration [1, 3]. We used *puc* as a LE marker in leg disc regeneration. *UAS-GFP; puc-Gal4* leg discs were also cut proximally to T4. After 24 hr of culture, fragments showed a more spread expression of *puc* (Suppl. Fig. 2C-C') than wing 3/4 fragments [1] likely due to a bigger injury/ intact tissue ratio in the former than in the later.

Pattern remodelling during regeneration

At early regeneration stages, *ap* expression slightly overlaps C15 and Lim1 at the most distal tip. This overlap



Suppl. Fig. 3. Pattern remodelling during regeneration. (A-B''') *ap*- fragment after 7 days of culture. *ap* (green), Al (red), Bar (blue). (A) Confocal section of the fragment showing *ap*, Al and Bar after regeneration. (B) Magnification of white square in A. Arrows point out to overlapping *ap* and Al. Arrowhead indicates overlap of Bar and Al. (B', B'', B''') Exclusion of red, blue and green channels respectively. (C-D''') *ap*- fragment after 4 days. *ap* (green), C15 (red), Casp3 (blue). (C) Confocal projection of a duplicated distal tip. C15 is engulfed by *ap* expression. Dead cells and regeneration markers colocalize (arrows). (C') Green channel alone. (D) Z section along the white line level in B. Cell death in cells expressing *ap* alone (arrowhead), in a cell with overlapping C15 and *ap* (arrow) and in a C15 cell close to the *ap* ring and partially outside the C15 domain (asterisk). (D', D'', D''') Exclusion of red, blue and green channels respectively.

disappears likely due to tissue growth and to repression of *ap* by PT genes. Accordingly, *ap* is expressed earlier in early regeneration stages than Al. Later on, after Al regenerates, *ap* and Al expressions overlap. After 7 days of regeneration, some cells in *ap*- fragments show overlapping expressions of *ap* and Al (Suppl. Fig. 3A-B'''). In addition, Al and Bar expression overlap in some cells. This Al-Bar overlapping was already described at early third instar during development. Later on, mutual repression [4] confines Al and Bar expression to non overlapping domains.

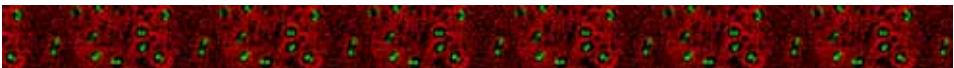
Overlapping between proximal (T4, T5) and distal (PT) genes could be due to *ap* and Bar repression by PT.

Alternatively, cells with overlapping expressions of *ap* and PT genes might be discarded if this dual positional information is not properly interpreted. To investigate whether cell death plays a role during pattern formation in regeneration of *ap*- fragments, we analysed cell death (with an anti-cleaved caspase 3 antibody) and pattern formation. At 4 days of culture, we detected C15 engulfed by *ap* expression. There was cell death around the regenerated pattern, in cells expressing *ap* alone, in cells with overlapping expression of C15 and *ap*, and in C15 cells close to the *ap* domain (Suppl. Fig. 3C-D'''). This suggests a role of cell death in re-patterning during regeneration, a role never described in normal development. Further analyses needs to be done to confirm this hypothesis.

Supplemental References

1. Bosch M, Serras F, Martin-Blanco E, Baguna J: **JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs.** *Dev Biol* 2005, **280**:73-86.
2. Mattila J, Omelyanchuk L, Kyttala S, Turunen H, Nokkala S: **Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc.** *Int J Dev Biol* 2005, **49**:391-399.
3. Bosch M, Serras F, Baguna J: **Growth dynamics, cell lineage, and clonal analysis of blastema cells during the regeneration of *Drosophila* imaginal wing discs.** *Development* Submitted.
4. Kojima T, Tsuji T, Saigo K: **A concerted action of a paired-type homeobox gene, *aristaleless*, and a homolog of *Hox11/tlx* homeobox gene, *clawless*, is essential for the distal tip development of the *Drosophila* leg.** *Dev Biol* 2005, **279**:434-445.

DISCUSSIÓ



8. Discussió

Globalment, aquesta tesi representa una descripció detallada de com els discs imaginals de *Drosophila melanogaster* regeneren després de tallar-ne una part. D'una banda, ha permès corroborar, precisar i en alguns casos desmentir, conceptes considerats ja clars del procés de regeneració. Per altra banda, ha aportat noves dades, genètiques i cel·lulars, en la descripció del procés intentant respondre preguntes clàssiques que encara avui restaven sense resposta (veure objectius). En conjunt, ha assentat les bases que permetran interpretar els experiments de regeneració que es puguin fer en el futur.

Primerament s'ha analitzat el procés de cicatrització en diferents fragments de discs imaginals d'ala. En aquest sentit, s'ha demostrat la importància del citoesquelet d'actina i dels canvis en la polaritat apical-basal i en la morfologia de les cèl·lules de la vora de la ferida (LE, leading edge cells), per aconseguir una correcta cicatrització.

Segonament, s'ha estudiat el mecanisme de regeneració mesurant els paràmetres principals de la dinàmica del blastema, proliferació i mort cel·lulars i, el nombre, morfologia, mida i distribució de clons induïts durant el procés. A més, s'han fet estudis de llinatge per veure quines són les fronteres del blastema, d'on prové el teixit format de nou i si es mantenen o no les fronteres entre compartiments. D'aquesta manera s'ha pogut demostrar que la regeneració és un procés local és a dir, només hi responen cèl·lules properes a la ferida. Aquestes cèl·lules augmenten la taxa de proliferació per intercalar-ne de noves entre elles. Les noves cèl·lules aniran deixant endarrera les cèl·lules que originalment estaven al LE.

Tan en el procés de cicatrització com en el de regeneració, s'ha estudiat el paper que hi juga la via de senyalització de la JNK. Per una banda, l'expressió del gen *puc*, controlada per aquesta via, ha demostrat ser una eina molt útil per marcar les cèl·lules del LE tant en la cicatrització com en la regeneració. Per altra banda, s'ha mostrat que sense un correcte funcionament de la via, els canvis en el citoesquelet d'actina, en la polaritat apical-basal i en la morfologia de les cèl·lules, no es porten a terme correctament i, conseqüentment, no es produeix la cicatrització. Així mateix, l'increment en la proliferació que es produeix durant el procés de regeneració també es veu afectat en condicions mutants per aquesta via.

Per últim, s'ha dut a terme un estudi del procés de regeneració en base a l'aparició de marcadors específics del patró un cop aquests han estat eliminats, analitzant la seqüència i la manera en que es tornen a expressar. En aquest aspecte, s'ha pogut concloure que la regeneració no és un procés purament epimòrfic ja que també implica reespecificació del teixit no malmès. A més, tot i que els marcadors del patró són restablerts, s'ha observat que es segueix una seqüència diferent a la que es segueix quan es forma el patró durant el desenvolupament.

8.1. El procés de cicatrització

En el capítol I d'aquest treball s'ha analitzat com les cèl·lules responen un cop s'ha extirpat part del teixit dels discs imaginals d'ala. En concret, s'ha estudiat el comportament del citoesquelet d'actina, els canvis de morfologia cel·lular i el que succeeix amb la seva polaritat apical-basal.

8.1.1. La dinàmica d'epitelis durant la cicatrització

Els resultats obtinguts mostren una **resposta activa dels dos epitelis**, CE i PE, per aconseguir tancar la ferida el més ràpid possible (24-48 hores; Article I: Fig. 1,2). D'una banda, les cèl·lules del PE canvien de morfologia i s'allarguen en direcció a la ferida cobrint-la en el seu vèrtex, alhora que formen un cable d'actina i emeten filopodis a tot el llarg de la vora. Per altra banda, les cèl·lules del CE també contribueixen al procés amb canvis de morfologia i la formació d'un cable d'actina i de filopodis. S'han observat però, menys cèl·lules amb canvis en la seva morfologia que en el PE. Això és possiblement degut a que el PE té una estructura epitelial més laxa que permet a les seves cèl·lules canviar de forma amb més facilitat. En el CE també s'ha observat la pèrdua de marcadors de polaritat apical-basal en les cèl·lules més extremes del LE, indicatiu de processos de **transició epiteli-mesènquima** (EMT; Article I: Suppl. Fig. 1A-B'). El fet que es puguin donar processos d'EMT en el CE pot ajudar a que cèl·lules típicament columnars i que formen una estructura epitelial més compacta puguin canviar de forma i envair l'espai deixat per la ferida, tal com succeeix en el tancament toràctic (Pastor-Pareja et al., 2004). De fet, en cultius de cèl·lules de mamífers s'ha observat que la inducció del procés d'EMT porta a una cicatrització més ràpida (Robson et al., 2006).

Una diferència important respecte els processos morfogenètics que tenen lloc durant el desenvolupament o respecte els processos de cicatrització en teixits diferents als discs, és que les cèl·lules del LE en els discs imaginals no tenen un **substrat** sobre el que moure's. Aquest fet pot afectar la durada del procés així com el nombre de cèl·lules que s'hi veuran implicades i fins i tot, alguns dels mecanismes utilitzats. Així per exemple, s'ha descrit que el tancament dorsal es dona en 2 hores (Martinez-Arias, 1993) i el toràctic en unes 7 hores (Martin-Blanco et al., 2000; Usui and Simpson, 2000; Zeitlinger and Bohmann, 1999) comparats amb les 24-48 hores que s'ha descrit dura el procés de cicatrització en els discs imaginals. Per altra banda, la cicatrització de la cutícula adulta (Rämet et al., 2002) o de larva (Galko and Krasnow, 2004) dura unes 18 i 24 hores respectivament, més semblant a la durada de la cicatrització en discs però, no s'ha descrit la formació d'un cable d'actina. De fet, tant en el tancament dorsal com en estudis de cicatrització en la cutícula embrionària, s'ha demostrat que la formació de filopodis i del cable d'actina intervenen en el procés però que ambdós (filopodis i cable) són redundants ja que tancament i cicatrització es poden donar igualment si un dels dos es veu afectat (Jacinto et al., 2002; Wood et al., 2002). Assegurar un ràpid, eficient i correcte tancament pot ser la causa d'aquesta redundància en la maquinària del

citoesquelet. En la cicatrització dels discs imaginals, resta per comprovar l'existència d'aquesta redundància o si, pel contrari, filopodis i cable d'actina són ambdós imprescindibles per compensar la manca de substrat.

Fins ara, el procés de cicatrització en els discs imaginals s'havia descrit a partir de dos models: regular i irregular (Reinhardt et al., 1977). Ambdós explicaven la variabilitat observada en el procés de regeneració (regeneració, duplicació, transdeterminació, estructures supernumeràries), a partir de la variabilitat detectada en la cicatrització. En el **model regular** (Fig. 12B) les dues vores de la ferida cicatritzen l'una amb l'altra totalment com una cremallera. Per tant, l'aposició de valors posicionals de les dues vores és perfecte i el teixit regenerarà. En el **model irregular** (Fig. 12C) les dues vores cicatritzen independentment l'una de l'altra, corbant-se sobre elles mateixes. L'aposició dels valors posicionals entre cèl·lules d'una mateixa vora de cicatrització portarà a que es donin fenòmens de duplicació. En aquesta tesi s'ha observat un model intermedi entre els dos fins ara descrits. Per una banda, el teixit es corba sobre si mateix en els extrems minimitzant la superfície exposada a l'exterior i per altra banda, les cèl·lules del LE es van unint, a mode de cremallera, des del vèrtex o centre de la ferida cap a fora és a dir, de distal a proximal (Fig. 12D; Article I: Fig. 9).

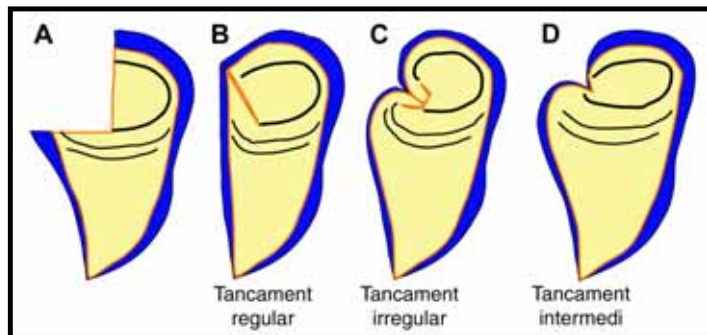


Figura 12. Models de cicatrització. (A) Fragment 3/4 P acabat de tallar. En blau CE, en groc PE. (B) Cicatrització regular. Les vores de la ferida han tancat com una cremallera. (C) Cicatrització irregular. Les vores de la ferida s'han corbat completament sobre elles mateixes. (D) Cicatrització intermèdia, descrita en aquest treball (Article I: Fig. 9).

8.2. La dinàmica del blastema durant la regeneració

En el capítol II d'aquesta tesi s'han estudiat els patrons de proliferació i mort cel·lular que es donen durant tot el procés de regeneració i, per anàlisi clonal i estudis de llinatge cel·lular, s'ha analitzat la topologia i les constriccions d'aquesta proliferació. Això ha permès fer un seguiment de la dinàmica, origen i fronteres del blastema, així com de la manera en que les noves cèl·lules van ocupant el territori en regeneració.

8.2.1. El blastema: definició i origen

El blastema de regeneració s'entén com el conjunt de cèl·lules que proliferen activament i de manera localitzada per regenerar la pèrdua de part o de la totalitat d'un teixit (Adler, 1984; Dale and Bownes, 1980; O'Brochta and Bryant, 1987). En aquest treball s'ha corroborat un mida semblant a la fins ara descrita en talls de discs imaginals: unes 50 µm d'extensió (O'Brochta and Bryant, 1987). A més però, se n'han definit les seves fronteres. Utilitzant l'expressió de *puc* com a marcador (veure 8.3) i amb la tècnica de llinatge s'ha pogut demostrar que les cèl·lules noves que es formaran i que per tant derivaran del blastema s'originen a partir de les cèl·lules del LE (Article II: Fig. 4A-B'). A més, la formació de noves cèl·lules va desplaçant aquestes cèl·lules del LE cap endarrera de manera que al final, el LE original queda dintre el teixit definint on es localitzava el blastema de regeneració en l'inici del procés (Article II: Fig. 4C,D).

8.2.2. Patrons de proliferació i mort cel·lulars

La primera reacció observada, 4 hores després de tallar, és una davallada en el nombre de mitosis només en cèl·lules del LE (Article II: Suppl. Fig. 3). Aquesta davallada podria ser deguda a l'estrès produït per la ferida i/o la pèrdua de tensió en l'epiteli com a conseqüència de la ferida. Recentment, s'ha demostrat que diferències en la tensió entre cèl·lules estan directament involucrades en generar patrons de proliferació en monocapes de cèl·lules (Nelson et al., 2005).

Més endavant (12-24 hores de cultiu), les fases S i M mostren una disminució generalitzada de la proliferació (Article II: Fig. 1D,2H, Suppl. Fig. 3E). En alguns treballs s'havia argumentat que la baixada en la proliferació en estadis primerencs de regeneració era el resultat de la fi del programa de desenvolupament dels discs (O'Brochta and Bryant, 1987). En aquest treball però, s'ha mostrat que és deguda al mètode de inducció de regeneració. Discs més joves (larva III jove-mitja) i que per tant encara han de créixer, mostren també una davallada en el nombre de cèl·lules que proliferen quan són sotmesos a cultius curts (12 hores; Article II: Suppl. Fig. 1A,B). Així mateix, discs més grans (0-4 hores després de l'entrada a pupa) que equivalen als discs utilitzats en tot l'estudi de la dinàmica del blastema després de 12-24 hores de cultiu, mostren encara nivells elevats de proliferació (Article II: Suppl. Fig. 1C). Aquest **efecte del cultiu** també es reflexa en el fet que discs més joves (larva III jove-mitja) després de 2 dies de cultiu mostren nivells elevats de mort cel·lular (Article II: Suppl. Fig. 1D,E) quan en realitat la mort cel·lular s'ha demostrat no intervenir en el desenvolupament dels discs.

Tot i aquesta resposta a l'estrès de la dissecció, tall i implantació, les cèl·lules del LE proliferen més que la resta fins i tot, abans de que s'assoleixi una cicatrització completa (Article II: Fig. 1D,2H). Aquesta **proliferació pre-cicatrització** es dona sobretot en les cèl·lules del vèrtex de la ferida i també, però en menor grau, en cèl·lules dels plegaments dorsal (D) i ventral (V) que es formen per la contracció de l'epiteli (Article II: Fig. 1B,D). El fet que la proliferació estigui

associada a cèl·lules activament implicades en la cicatrització dóna suport al paper de la tensió entre cèl·lules en l'activació de la proliferació (Nelson et al., 2005). Si això fos cert però, caldria explicar perquè processos com el tancament dorsal, on també hi ha fenòmens de contracció epitelial, es donen sense que hi hagi proliferació cel·lular. Possiblement, la resposta és que si les cèl·lules del LE proliferessin, no podrien migrar tan ràpid ni tan eficientment com ho fan i per tant, el tancament dorsal tardaria més en finalitzar. També cal demostrar si aquesta proliferació pre-cicatrització és necessària per la regeneració. Estudis de regeneració en paneroles, on es pot diferenciar el procés de cicatrització del de regeneració pròpiament, demostraven que tot i que la proliferació és necessària en ambdós processos, la proliferació en la regeneració no ve causada pel procés de cicatrització (Truby, 1985). A més, s'ha demostrat que el retard de la cicatrització retarda la regeneració però no la proliferació inicial (Dale and Bownes, 1981). Per tant, si la proliferació pre-cicatrització és dispensable pel propi procés de regeneració, seria oportú pensar que l'estímul principal per regenerar sigui l'aposió de valors posicionals que representa el tancament. Així, un cop el teixit ha cicatritzat del tot i s'ha restablert la continuïtat de l'epiteli és quan hi hauria una proliferació màxima, tal com s'observa en els resultats presentats.

Com s'ha demostrat, l'increment en la proliferació es dóna sense que es creuin les **fronteres entre compartiments** (Article II: Fig. 7). Aquest resultat estaria a favor de que els compartiments actuessin com a unitats independents de control del creixement (Simpson and Morata, 1981). En contraposició, s'havia detectat la possibilitat de que clons induïts abans o just després de tallar els discs, poguessin creuar les fronteres entre compartiments (Szabad et al., 1979). Una possible explicació pels resultats obtinguts en l'article II seria que les cèl·lules dels compartiments P i D estiguessin més fortament determinades que les dels compartiments oposats. Kiehle i Schubiger (1985), van observar que fragments completament A podien regenerar P però, fragments completament P no regeneraven A. Podria ser que les cèl·lules dels compartiments amb el gen selector activat (P i D) tinguin menys capacitat de perdre aquesta activitat i esdevenir cèl·lules del compartiment oposat, que aquestes d'adquirir l'activitat del gen selector (Kauffman, 1973). En aquest treball s'ha vist que cèl·lules P i cèl·lules D no contribueixen en la regeneració de teixit amb identitat A i V respectivament. S'hauria de comprovar si a la inversa (d'A a P i de V a D) hi ha contribució i es creuen les fronteres entre compartiments.

Tampoc s'han detectat fenòmens de **compensació** (Milán et al., 1997; Simpson et al., 1980) per part de la resta de teixit no malmès. De fet, la resta de teixit manté uns nivells basals de proliferació que cap al final del cultiu mostren una tendència a augmentar. Aquest augment pot ser degut a l'increment que hi ha, de manera generalitzada, en el nombre de cèl·lules que moren, causat possiblement per un cultiu prolongat dels discs (Dunne, 1981).

La **mort cel·lular** no s'ha vist associada significativament al procés de regeneració excepte a l'inici, segurament a causa del dany produït per la ferida (Article II: Fig. 3A,B,E, Suppl. Fig. 4). Si que s'ha vist associada en alguns casos, als marcadors que regeneren en talls en l'eix Pr/Ds en discs de pota (Article III: Suppl. Fig. 3C-D'''). Aquests marcadors, com es discutirà més endavant, poden expressar-se en les mateixes cèl·lules i per tant pot ser que algunes s'eliminin per refinar correctament el patró. Tot i així, són resultats preliminars que s'han d'estudiar més a fons per veure si la mort cel·lular és realment important per la formació del patró durant la regeneració. De fet, quan s'inhibeix l'apoptosis en fragments de discs d'ala, el teixit regenera normalment (Article II: Fig. 3C,D). Interessantment, quan s'inhibeix la mort cel·lular durant la regeneració no s'observen processos de sobrecreixement com els descrits quan s'indueix expressament la mort (Huh et al., 2004; Perez-Garijo et al., 2004; Ryoo et al., 2004). Aquesta diferència pot ser deguda a que no hi hagi els mateixos nivells de mort cel·lular durant la regeneració que quan s'indueix de manera intencionada. De fet, quan s'utilitza la inducció de mort com a mecanisme per induir regeneració (Article II: Suppl. Fig. 2A,B), es detecten plecs i malformacions en gran part del teixit.

8.2.3. Anàlisi clonal durant la regeneració

Els estudis previs d'anàlisi clonal durant la regeneració presentaven certes limitacions pel fet que els clons es detectaven en el teixit adult i per tant, els diferents fragments s'havien d'implantar en larves per entrar en metamorfosi. Això feia que es perdessin molts clons pel replegament del teixit en la metamorfosi dins de la larva (Adler, 1981). En aquest treball s'ha realitzat per primera vegada l'anàlisi clonal en els mateixos discs imaginals, induint els clons en els fragments implantats dins la cavitat abdominal dels adults. Els resultats d'aquest anàlisi mostren per una banda, com la zona de més discontinuïtat de valors posicionals, la pleura (PL), és on augmenta més la proliferació al llarg de la regeneració. A més, aquesta proliferació es dona preferentment en una **orientació** perpendicular a la vora D/V (Article II: Fig. 5,6) indicant que està clarament dirigida a intercalar cèl·lules entre els dos extrems de la ferida. Per altra banda, la proliferació en el que serà pròpiament l'ala (WP, wing pouch), on la disparitat entre valors posicionals és menor, es manté equivalent al llarg de tot el procés de regeneració i no apareix una clara direcció en el creixement. Així, clons en el WP creixen per igual de manera perpendicular que de manera paral·lela a la frontera D/V i a més, la suma de les dues orientacions no supera en la majoria dels casos el 50%. La resta de clons del WP mostren orientacions isomètriques indicant que les cèl·lules en aquesta zona poden créixer en tots els sentits (Article II: Fig. 5,6). Durant el desenvolupament, s'ha observat que els clons al WP induïts aviat (50 hores AEL) mostren un creixement allargat al llarg de l'eix Pr/Ds i que, clons induïts més tard (72 hores AEL) són menys allargats però més amples (Resino et al., 2002). Per tant, el WP creix distalment primer i de manera més isomètrica cap al final del desenvolupament i també durant la regeneració.

Sorprenentment, en aquest anàlisi clonal no s'ha observat una gran diferència en la **mida dels clons** generats aviat respecte clons generats més tard. En estadis primerencs de regeneració hi ha per una banda, una davallada en la proliferació deguda a la manipulació i per altra banda, el procés de cicatrització a través de filopodis, cable d'actina, canvis de forma cel·lular i contraccions. Ambdós, baixada de la proliferació i cicatrització, poden ser els responsables de que clons induïts aviat no creixin prou per poder mostrar diferències significatives amb la mida de clons més tardans. També s'han de tenir en compte però, el que s'anomenen clons partits (split clones). Aquests es produeixen en baixa freqüència en clons induïts aviat en el desenvolupament però amb més freqüència en clons tardans (Resino et al., 2002). Per altra banda, els experiments de llinatge mostren que les cèl·lules d'un compartiment no creuen al compartiment oposat. Per tant, els clons no creixeran molt més enllà de la regió on s'han originat. Un altre resultat que pot explicar aquesta homogeneïtat en la mida dels clons al llarg del procés de regeneració és l'increment generalitzat que hi ha de mort cel·lular degut a l'efecte del cultiu.

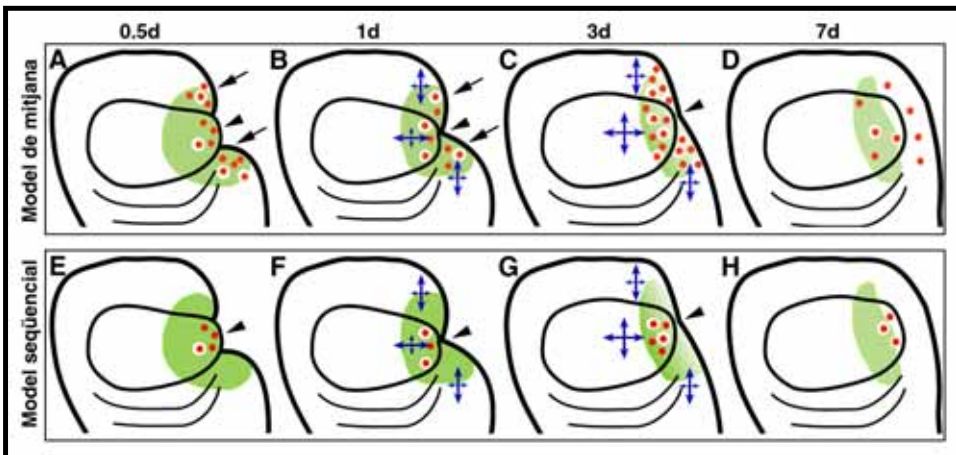


Figura 13. Models de regeneració epimòrfica en fragments 3/4 A. Els temps de regeneració estan indicats sobre els esquemes. (A-D) Model de mitjana observat en aquest treball. (A) Les mitosis (punts vermells) es localitzen al vèrtex (punta de fletxa), i als plec V i D (fletxes). La majoria coincideix amb l'expressió de *puc* (verd) però algunes no (punts vermells sobre punts blancs). (B) Baixa la proliferació però es localitza igual que en A. Les fletxes blaves indiquen la tendència de creixement de les cèl·lules; més perpendicular a la vora D/V en la zona PL i, més paral·lela a aquesta vora en el WP. (C) Les mitosis es troben escampades per tot el blastema. Hi ha menys mitosis que expressen *puc*. L'expressió de *puc* queda endarrera del teixit nou. La proliferació a PL segueix la mateixa tendència que a B. A WP la proliferació és isomètrica. (D) Disc regenerat. Poques mitosis i escampades per tot el blastema. L'expressió de *puc* queda marcant el blastema original. (E-H) Model seqüencial adaptat a la regeneració estudiada en aquest treball. Les mitosis es localitzarien sempre en el vèrtex de la ferida (punta de fletxa). Les cèl·lules noves anirien intercalant entre elles i les veïnes, adquirint valors adjacents a aquestes últimes. La colocalització amb l'expressió de *puc* també aniria disminuint amb el temps. Possiblement les tendències de creixement es mantindrien iguals al model de mitjana.

En resum, els patrons de proliferació que s'han observat en el blastema de regeneració i els resultats de l'anàlisi clonal, mostren una proliferació elevada i molt localitzada primer i difosa en tota l'extensió del blastema després. Aquest patró confirma un model de mitjana de regeneració epimòrfica (Fig. 13A-D, Bryant and O'Brochta, 1986) i, va en contra del model seqüencial que prediu una proliferació sempre molt localitzada on les cèl·lules que es van generant adopten valors adjacents a les veïnes (Fig. 13E-H).

8.2.4. El paper de *dpp* i *wg* durant la regeneració

dpp i *wg* són dos gens directament implicats en el creixement dels discs i en la seva formació del patró en els eixos A/P i D/V respectivament (Capdevila and Guerrero, 1994; de Celis et al., 1996; Diaz-Benjumea and Cohen, 1995). També han estat relacionats en la regulació de la transdeterminació de pota a ala, estímul proliferació i l'expressió de gens característics d'ala, com *vestigial* (*vg*), en cèl·lules de disc de pota (Johnston and Schubiger, 1996; Maves and Schubiger, 1998). Recentment a més, s'ha demostrat la necessitat de les dues senyals per estimular la proliferació compensatòria que es produeix en induir i bloquejar alhora, mort cel·lular (Huh et al., 2004; Perez-Garijo et al., 2004; Perez-Garijo et al., 2005; Ryoo et al., 2004). Així, estan clarament relacionats amb funcions d'estimular proliferació fins i tot durant els processos de regeneració.

En aquest treball s'ha observat d'una banda, que l'expressió de *wg* desapareix en cèl·lules del LE de la vora D/V. Per altra banda però, s'ha detectat expressió de *wg*, a la vora D del tall, abans de que hi hagués una cicatrització completa i per tant, aposició entre cèl·lules V i D (Article II: Suppl. Fig. 6B). Per últim, s'ha observat expressió de *wg* en la zona de regeneració (Article II: Suppl. Fig. 6C,D). La pèrdua de *wg* en la vora D/V podria ser deguda a que aquestes cèl·lules han de perdre *wg* per poder proliferar en aquella zona ja que *wg* és en part responsable d'aquesta inhibició (Johnston and Edgar, 1998). En canvi, l'expressió ectòpica de *wg* en el LE abans de la cicatrització podria ser induïda independentment de la funció de bloquejar la proliferació i estar més relacionada amb la funció de *wg* en estimular supervivència cel·lular (Johnston and Sanders, 2003), en resposta a l'estrès que representa la ferida. *wg* s'ha observat també en talls que creuen completament la vora A/P i que mostren molta expressió de *dpp* (Article II: Suppl. Fig. 5H). Aquest resultat podria donar suport a un paper de *wg* com a fre de la proliferació que podria ser induïda per *dpp* (Johnston and Sanders, 2003; Perez-Garijo et al., 2005). L'expressió de *wg* en la zona de regeneració possiblement es deu a la nova confrontació entre el compartiment D i el V produïda com a conseqüència de la cicatrització.

En fragments de discs d'ala en regeneració, s'ha observat una disminució de l'expressió de *bantam* (Article II: Suppl. Fig. 6F,G), un microRNA implicat en l'estímul de la proliferació alhora que inhibeix l'apoptosis (Brennecke et al., 2003; Jaklevic and Su, 2003; Thompson and Cohen, 2006). En estadis joves de

desenvolupament, *bantam* s'activa per promoure proliferació i reprimir l'apoptosis per assegurar que es generin suficients cèl·lules. En canvi, en estadis tardans, l'activitat de *bantam* disminueix per frenar la proliferació i permetre l'apoptosis, cosa que permetrà esculpir, refinar el patró (Jaklevic and Su, 2003). En aquests estadis tardans, s'ha demostrat que *wg* és responsable de reprimir *bantam* per frenar la proliferació (Brennecke et al., 2003), donant suport de nou a *wg* com a fre de la proliferació.

Alternativament, la via de *wg* també s'ha demostrat necessària en el tancament dorsal, en col·laboració amb la JNK, per estimular per una banda l'expressió de *dpp* en cèl·lules del LE i per altra, promoure canvis de morfologia cel·lular (McEwen et al., 2000). Aquestes funcions confereixen a *wg* un paper de regulador de la dinàmica epitelial de la cicatrització més que no pas un paper com a regulador de la proliferació. Caldrà doncs, un estudi detallat del paper de la via de *wg* per veure quina o quines funcions realitza durant el procés de regeneració.

Contràriament a *wg*, *dpp* només es veu activat quan la ferida toca o creua la frontera A/P (Article II: Suppl. Fig. 5E-H). No es veu quan el tall es fa completament dins el compartiment P (Suppl. Fig. 5B-D, Article II), tal com han mostrat també Mattila i col. (2004). L'augment en els nivells d'**expressió de *dpp*** en fragments 3/4 P, tot i que són talls fets dins el compartiment A, podria ser degut a la confrontació de cèl·lules del PE, que són P, amb cèl·lules del CE, que són A. Aquest tipus de contacte ja ha estat descrit en regeneració i ha permès explicar com fragments mancats del compartiment P podien regenerar (Gibson and Schubiger, 1999).

A part d'analitzar el patró d'expressió de *dpp* durant la regeneració, s'ha comprovat que l'**expressió de *brinker* (*brk*)**, repressor transcripcional de gens diana de *dpp* i reprimint alhora per aquest gen (revisat a Affolter et al., 2001), no desapareix durant la regeneració de fragments 3/4 A (tallats completament en el compartiment P; Article II: Suppl. Fig. 5I-L). Per altra banda, l'estudi de **llinatge de *dpp*** tampoc ha mostrat una contribució significativa d'aquest gen en la formació del teixit nou (Article II: Suppl. Fig. 5M-P).

dpp s'ha demostrat necessari en els processos de tancament dorsal i toràcic regulant el citoesquelet d'actina de les cèl·lules del LE però, així com en el tancament dorsal està sota el control de les vies de la JNK i de *wg* (McEwen et al., 2000), en el toràcic no (Martin-Blanco et al., 2000). Caldrà també doncs, un estudi més a fons de la via de *dpp* per veure si juga algun paper en el procés de regeneració.

8.3. El paper de la JNK en cicatrització i regeneració

La via de la JNK és principalment una via de resposta a estrès i a processos inflamatoris però s'ha demostrat que intervé també en l'activació de processos com la proliferació, la supervivència, l'apoptosis, la diferenciació, canvis de morfologia

cel·lular, etc. S'ha vist que pot jugar un paper diferent segons el tipus cel·lular de que es tracti, del context i/o d'altres influències que puguin rebre les cèl·lules (revisat a Leppa and Bohmann, 1999). En aquesta tesi s'ha investigat el paper d'aquesta via durant el procés de cicatrització, analitzant a quin nivell afectaven al procés, mutacions de diferents elements de la via. També s'ha estudiat el seu paper en la regeneració analitzant la dinàmica del blastema en condicions mutants per la via.

8.3.1. La via de la JNK en la cicatrització

En el capítol I s'ha demostrat que la via de senyalització de la JNK juga un **paper clau en el procés de cicatrització**. En primer lloc, s'ha demostrat que *puc* s'activa específicament a les cèl·lules del LE (Article I: Fig. 3). Aquesta activació és conseqüència de l'activació de la via ja que mutants pel gen *hep* (*hep⁷³*) mostren una disminució en l'expressió de *puc* (Article I: Fig. 4). En segon lloc, s'ha demostrat com mutacions i formes dominant negatives de gens de la via de la JNK no sols afecten l'expressió de *puc* sinó que també es veuen afectats: la formació del cable d'actina, la formació de filopodis (Article I: Fig. 8), la pèrdua de marcadors de polaritat apical-basal (Article I: Suppl. Fig. 1C-D') i els canvis de morfologia cel·lular (Article I: Fig. 4D); tots implicats en aconseguir un correcte tancament de la ferida. Així, talls en els discs imaginals mutants per aquesta via es mantenen oberts sense evidències de cicatrització i amb la conseqüent manca de regeneració del teixit extirpat (Article I: Fig. 4B,C).

8.3.2. La via de la JNK en la regeneració

En el capítol II, s'ha mostrat com la JNK també juga un paper en la regeneració. En condicions de manca de funció de la via hi ha una davallada en la proliferació durant el procés de regeneració comparat amb la proliferació observada en fragments de discs salvatges (Article II: Fig. 2I, Mattila et al., 2005). Aquesta davallada s'observa fins i tot en la proliferació pre-cicatrització. En mutacions de la via JNK no hi ha contracció de l'epiteli tallat, degut a que no hi ha emissió de filopodis, ni formació d'un cable d'actina, ni canvis en la morfologia cel·lular. Si els canvis en la tensió entre cèl·lules fossin l'estímul de la proliferació (Nelson et al., 2005), el fet de que no n'hi hagi en mutants per la JNK podria explicar la baixada en la proliferació pre-cicatrització. De fet, Mattila i col. (2005) mostren com en fragments mutants per la via, les mitosis, reduïdes en nombre respecte els controls, semblen produir-se preferentment en zones on l'epiteli està més contret. Per altra banda, si els fragments de discs imaginals mutants per la via no cicatritzen, no hi haurà l'aposició de valors posicionals que sembla haver de disparar la proliferació durant la regeneració. Aquesta hipòtesi per tant, explica el paper de la JNK en la proliferació durant la regeneració com a un efecte secundari de la manca de cicatrització. Alternativament, la via de la JNK s'ha demostrat que té un paper directe en estimular proliferació durant la regeneració. En estudis de regeneració hepàtica en ratolins s'ha descrit que la JNK estimula la proliferació

bloquejant la p53 la qual sinó duria a aturar el cicle cel·lular (Stepniak et al., 2006). També s'ha demostrat que la JNK pot induir una proliferació desenfrenada en resposta a una inducció generalitzada de mort cel·lular (McEwen and Peifer, 2005; Ryoo et al., 2004). Podria ser també, que la mateixa JNK induís la mort observada durant la regeneració, tal com s'ha demostrat pot fer durant el desenvolupament (Igaki et al., 2002; Moreno et al., 2002). Una altra possibilitat és que la JNK pugui estar involucrada en el manteniment de la memòria cel·lular durant la regeneració. Recentment, s'ha demostrat que la JNK té capacitat per reprimir gens del grup Polycomb (PcG), involucrats en el manteniment d'estats transcripcionals silenciats la qual cosa, pot desencadenar fenòmens de transdeterminació (Lee et al., 2005). Caldrà doncs, un estudi més detallat per discernir quin paper juga la JNK, i si és directe o indirecte, durant la regeneració dels discs imaginals de *Drosophila*.

8.3.3. La funció de *puc*

L'expressió de *puc* ha demostrat ser un molt bon marcador de l'activitat de la pròpia via JNK. També, ha demostrat ser una eina molt útil per monitoritzar les cèl·lules del LE durant la cicatrització i també durant la regeneració en si. PUC és una fosfatasa que reprimeix la via de la JNK. En tancaments dorsal i toràcic ha demostrat ser crucial per anivellar, estabilitzar correctament l'activitat de la JNK (Martin-Blanco et al., 1998; Zeitlinger and Bohmann, 1999). Interessantment, s'ha observat una major expressió de *puc* en talls en l'eix proximal-distal (Pr/Ds) de discs de pota (fragments ap-; Article III: Suppl. Fig. 2C) que en talls en els discs d'ala (fragments 3/4 i V; Article I: Fig. 3 i Suppl. Fig. 2; Article II: Suppl. Fig. 3). En el tancament dorsal s'ha descrit que només la primera filera de cèl·lules del LE expressa *puc* (Glise et al., 1995) mentre que en el tancament toràcic se n'ha observat en les 6-8 primeres fileres aproximadament (Usui and Simpson, 2000). En altres teixits on s'han estudiat processos de cicatrització, com la cutícula de la larva (Galko and Krasnow, 2004) i de l'adult (Rämet et al., 2002), se n'han descrit de manera aproximada 3 i 8 fileres respectivament. Val a dir però, que aquests estudis de cicatrització en larva i adult estaven basats en ferides produïdes per un tall o punció, sense extirpar teixit. Aquesta heterogeneïtat en l'extensió de l'expressió de *puc* pot estar relacionada amb el nivell d'organització del procés, així com amb la mida de la ferida i el nombre de cèl·lules que hi poden intervenir. Processos més ben organitzats (tancament dorsal, tancament toràcic) i amb menys nombre de cèl·lules implicades tindran una activitat JNK més controlada i per tant caldrà menys activitat de *puc* per estabilitzar-la. Per contra, ferides més grans que impliquin un major nombre de cèl·lules mostraran una major expressió de *puc*. Així, talls en l'eix Pr/Ds dels discs de pota mostren una relació ferida/teixit restant major (s'han de manipular més degut a la seva mida més reduïda) i per tant, tindran una expressió de *puc* més extensa aportant així un major control d'estabilització de la via.

L'expressió de *puc*, monitoritzada per *UAS-GFP; puc-Gal4*, es manté durant la regeneració. Val a dir però, que l'expressió de GFP detectada a estadis tardans de

regeneració era molt dèbil en la zona de regeneració, en comparació amb l'expressió detectada a tots els estadis, a nivell del peduncle. Per visualitzar-la correctament es va haver de incrementar la potència del làser en el microscopi confocal. Això porta de nou a la pregunta de quina funció fan la JNK i *puc* i, si són necessaris en la regeneració. Per una banda, com ja s'ha comentat, la JNK podria ser només necessària durant la cicatrització i per tant, *puc* s'encarregaria d'estabilitzar la via en aquest procés. D'altra banda, també s'ha demostrat el paper de *puc* com a fre de l'activitat pro-proliferativa de la JNK (McEwen and Peifer, 2005). De nou, són necessaris més experiments per demostrar fins a quin punt és necessària i quin paper juga la via de la JNK en la regeneració dels discs imaginals.

8.4. Formació del patró durant la regeneració

En l'últim capítol d'aquesta tesi s'ha analitzat el procés de regeneració però ara des del punt de vista de la formació del patró, comparant-ho amb el que ja hi ha descrit durant el desenvolupament. S'ha estudiat la regeneració distal, des del tars 3-4 (T3-4) fins al pretars (PT), per veure la seqüència Pr/Ds de formació del patró d'aquesta regió. També s'han fet experiments de llinatge per veure d'on venen les noves cèl·lules i si hi han hagut fenòmens de pèrdua d'identitat en cèl·lules proximals per poder donar lloc a les noves cèl·lules amb identitats més distals.

8.4.1. La seqüència de regeneració en l'eix Pr/Ds

La seqüència d'aparició de marcadors determinants per a cada regió durant el desenvolupament dels discs de pota és prou coneguda (Article III: Fig. 5A-D. Veure revisió Galindo and Couso, 2000). En la zona d'interès (T3-PT) primer s'expressa *Bar*, que especifica segments (T3-T5) però, seguidament apareixen els marcadors més distals (*C15*, *aristales* (*al*), *Lim1*) que reprimiran *Bar* al centre del disc (Campbell, 2005). Aquests dominis es mantindran per regulacions negatives entre *BAR* i *AL/C15/LIM1* (Campbell, 2005; Kojima et al., 2005) quedant definits així, els dominis T5 (*BAR*) i PT (*AL/C15/LIM1*). Més tard apareixen els gens que determinaran la part més proximal de tars (T1-T4): *rotund* (*rn*) i *bric-a-brac* (*bab*). Per últim apareix *apterous* (*ap*) que determinarà el segment T4. En aquest procés de determinació d'identitats al llarg de l'eix Pr/Ds es pot donar col·localització entre marcadors de segments diferents com *BAR* i *AL* en estadis de larva III jove (Kojima et al., 2005). Aquesta coexpressió de marcadors es resol ràpidament deixant els dominis ben definits.

En aquest treball, s'ha demostrat que discs imaginals de pota poden regenerar de nou els marcadors eliminats per extirpació i que ho fan prèvia formació d'un blastema de proliferació (Article III: Fig. 1). Tot i així s'ha observat que la seqüència que es segueix és diferent a la que es dona durant el desenvolupament. Els resultats obtinguts mostren d'una banda, expressió d'*ap* (marcador utilitzat per definir la zona de tall) abans que apareguin marcadors més distals com *AL* (Article III: Fig. 2D-D"). Per altra banda mostren com *ap* pot col·localitzar, en algunes

cèl·lules, amb marcadors més distals (C15, AL, LIM1; Article III: Fig. 2 i Suppl. Fig. 3A-B’’). A més, els experiments de llinatge d’*ap* mostren que T5 i part de PT deriven de cèl·lules que, tot i no expressar *ap* als 7 dies de regeneració, si ho han fet prèviament (Article III: Fig. 4B,B’). Tot plegat dona suport a la possibilitat de que *ap* aparegui abans i hi hagi col·localització d’*ap* amb marcadors més distals durant la regeneració perquè aquests marcadors apareixen més tard. Això no es produeix mai durant el desenvolupament perquè quan apareix *ap*, com s’ha comentat, ja hi ha els dominis de tars proximals, T5 i PT ben establerts. Per tant, la formació del patró en regeneració mostra una alteració de l’ordre d’activació dels gens tot i que al final, s’acabarà formant el mateix patró que es produeix durant el desenvolupament (Article III: Fig. 2B,E,H). Aquest mecanisme de regeneració concorda amb models de regeneració seqüencials cap a terminal, amb o sense intercalació (Fig. 14). No es pot concloure però que la regeneració segueixi una direcció estricta de Pr a Ds ja que faltaria veure com van apareixent els marcadors intermedis que en aquests experiments no s’han pogut estudiar.

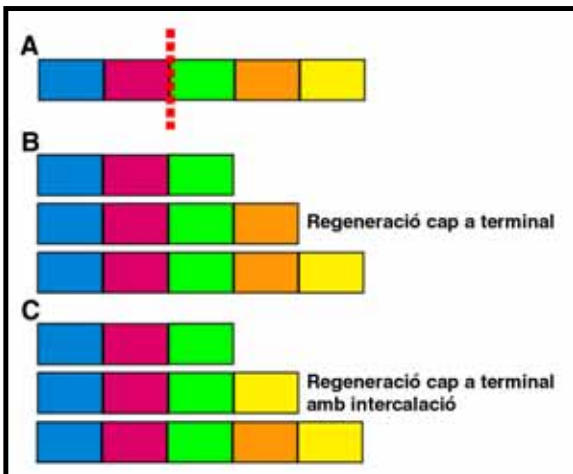


Figura 14. Possibles mecanismes de regeneració dels valors posicionals segons aquest treball. (A) Representació d’un patró on cada color indica un valor posicional. La línia segmentada en vermell indica el lloc de tall. (B-C) Representació de diferents seqüències d’aparició dels valors suggerides pels resultats d’aquest treball. (B) Seqüencialment, del més proper al més llunyà a la vora de la ferida. (C) Igual que B però intercalant algun valor llunyà abans que algun altre més proper.

Corroborant aquests resultats, estudis de regeneració amb extremitats d’amfibis han mostrat també com la seqüència temporal d’aparició de gens PD es veu alterada de manera que, gens que en desenvolupament s’expressen més tard que d’altres, durant la regeneració ho fan més aviat (Gardiner et al., 1995). Estudis del desenvolupament de les extremitats de paneroles també recolzen aquesta hipòtesi. En aquests organismes, hi ha variabilitat en la mida de segments i potes en estadis primerencs de desenvolupament tot i que, al final, les variacions es compensen i les estructures finals mostren una mida molt estereotipada (Norbeck and Denburg, 1991). Això per tant, suggereix que a l’inici del desenvolupament, quan s’estableixen els diferents destins, el procés és menys estricte i per tant, els mecanismes per generar la informació posicional estan poc regulats. Així doncs, en estadis primerencs de regeneració i desenvolupament podrien aparèixer els valors

posicionals seguint seqüències diferents perquè després, seran refinats fins a arribar a un mateix patró final.

El **refinament del patró** inicial produït durant la regeneració es pot produir fent servir les mateixes eines que en el desenvolupament. Així, tot i que primer apareix *ap*, quan s'expressen C15 i AL, aquests podran reprimir *ap* directa i indirectament, tal com succeeix en el desenvolupament (Campbell, 2005; Pueyo and Couso, 2004).

Els patrons de proliferació obtinguts en aquesta tesi mostren un màxim als 2-3 dies. Aquest pic de proliferació pot permetre l'aparició dels valors posicionals perduts i després, mentre el teixit acaba de créixer, aquests valors s'aniran ajustant entre ells. Segons Adler (1981) la regeneració s'aconsegueix sobre els 4 dies però la mida no es restaura fins als 7.

Queda per determinar però, què permet l'expressió d'*ap* abans que la dels marcadors més distals. És evident que es parteix d'unes condicions diferents a les que es donen en el desenvolupament ja que en la regeneració dels fragments *ap-*, la identitat més distal és la de tars. D'aquesta manera, podria ser que aquesta diferència fos la que permetés expressar *ap* abans. *Bar* és l'activador d'*ap* durant el desenvolupament (Kojima et al., 2000) però no l'activa fins que la resta de segments tarsals estan també determinats. Així, es podria requerir una senyal proximal perquè s'activés *ap*; una senyal que en fragments *ap-* ja és present i per tant, permetrà l'expressió d'*ap* tan bon punt regeneri la senyal de *Bar* (Article III: Fig. 5).

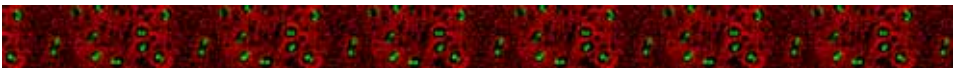
El fet que fragments *ap-* tinguin tars proximal com a identitat més distal planteja el problema de com s'adquireixen els nous valors posicionals durant la regeneració. En aquest sentit s'ha observat que l'activació de nou de la via de l'EGFR porta a la repressió de marcadors d'identitats de tars proximal (Article III: Fig. 3). Per tant, algunes cèl·lules del LE hauran de perdre la seva identitat, hauran de desdeterminar-se, per poder adquirir valors més distals. Donant suport a aquesta hipòtesi, els experiments de llinatge mostren que tota la punta distal regenerada deriva d'identitats proximals (Article III: Fig. 4D,D'). Aquests resultats indiquen doncs, que la regeneració dels discs imaginals de *Drosophila* no és un procés purament epimòrfic ja que segons aquesta definició, tot el teixit regenerat hauria de provenir de la proliferació cel·lular, sense la reorganització de cèl·lules del teixit intacte.

8.4.2. La regeneració en discs prepupals

En aquest treball també es va estudiar la capacitat de regenerar de discs de pupa; discs que acaben d'entrar en el procés de metamorfosis (0-4 hores després de la formació de pupa). La raó era poder fer talls més proximals a T4 per tenir més marcadors a estudiar i per tant poder establir més clarament la seqüència Pr/Ds de regeneració. Un estudi sobre regeneració en discs imaginals de pota de l'estadi prepupal va mostrar que un cop iniciat completament el procés de diferenciació

cel·lular, la regeneració ja no es podia donar (Lee and Gerhart, 1973). Si que podien regenerar però, discs recentment entrats a prepupa tot i que les seves cèl·lules havien començat ja a diferenciar-se. L'estudi de regeneració de discs de prepupa d'aquesta tesi confirmen aquests resultats. S'ha observat la formació de cutícula adulta en el centre del teixit tant en discs tallats com en controls (sense tallar; Article III: Suppl. Fig. 1B). A més, s'ha observat que el patró d'expressió de *m* es disgrega pel cultiu (Article III: Suppl. Fig. 1A), corroborant l'expressió temporal de *m* descrita fins a larva III tardana (St Pierre et al., 2002). Tot i així, s'han pogut observar processos de regeneració difícils d'analitzar pels canvis de morfologia i a la formació de cutícula per part del teixit. A més, s'ha observat molta variabilitat en el patró regenerat, donant-se fins a processos de tetrareplicació del regenerat (Article III: Suppl. Fig. 1D,D'), potser també deguts als canvis de morfologia i a la formació de cutícula. De manera repetida però, s'ha observat *ap* regenerat envoltant completament a marcadors de PT (Article III: Suppl. Fig. 1E-F), tal com hem vist en regeneració de discs de larva III. Això pot indicar, d'acord amb els resultats previs, que *ap* s'ha expressat primer i que un cop s'expressen els gens de PT, reprimiran *ap* per reproduir el patró normal.

CONCLUSIONS



9. Conclusions

En conjunt, en aquesta tesi s'ha demostrat com la regeneració dels discs imaginals de *Drosophila* és un procés local i específic de la zona malmesa tot i que implica processos de desdeterminació en el teixit restant i per tant, no segueix un model purament epimòrfic. També s'ha demostrat que la via de senyalització de la JNK és clau per una correcta cicatrització i posterior regeneració. Per últim, s'ha mostrat que la formació del patró durant la regeneració es produeix en una seqüència diferent a l'observada durant el desenvolupament reproduint però, el mateix patró final.

En concret, aquest treball permet concloure els punts següents:

1.- Els discs imaginals de *Drosophila melanogaster* són un excel·lent sistema per estudiar regeneració donats el coneixement del seu procés de desenvolupament, la gran quantitat de marcadors de patró coneguts, i les possibilitats genètiques de l'organisme.

2.- Els discs imaginals cicatritzen a través de canvis de morfologia cel·lular, formació d'un cable contràctil d'actina, emissió de filopodis i, pèrdua de polaritat apical-basal. A més, els dos epitelis, columnar i peripodial, contribueixen activament en el procés.

3.- L'expressió de *puc* és una eina molt útil per marcar les cèl·lules de la vora de la ferida durant la cicatrització i per indicar, durant la regeneració, on estava aquesta vora inicialment.

4.- La via de la JNK juga un paper clau en la cicatrització, regulant la formació del cable d'actina i dels filopodis i els canvis en la morfologia i en la polaritat apical-basal de les cèl·lules. També és important, directa o indirectament, en la proliferació que permetrà la regeneració.

5.- *dpp* no s'expressa en cèl·lules de la vora de la ferida durant la regeneració si no es creua la frontera A/P. *wg* per la seva banda, sí s'expressa en cèl·lules de la vora de la ferida indicant un possible paper d'aquesta via en la regeneració.

6.- La proliferació durant la regeneració dels discs imaginals mostra un patró clarament localitzat a la zona afectada, essent més elevada on es contraposen, per la cicatrització, valors posicionals més dispersos.

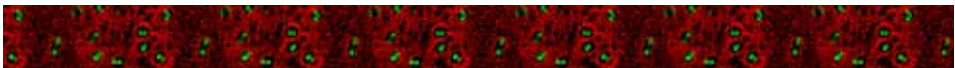
7.- La mort cel·lular no sembla tenir un paper rellevant en la regeneració detectant-se de manera generalitzada per tot el teixit.

8.- El teixit regenerat deriva de les cèl·lules de la vora de la ferida i implica processos de desdeterminació perquè puguin aparèixer alguns dels valors posicionals perduts.

9.- La regeneració en discs imaginals reproduceix un patró idèntic a l'obtingut durant el desenvolupament però segueix una seqüència d'aparició dels destins que falten diferent a la que es dona durant el desenvolupament.

Globalment, aquesta tesi ha servit per posar en marxa el projecte de regeneració en el laboratori i principalment, per establir les bases del procés de cicatrització i regeneració en els discs imaginals de *Drosophila melanogaster*. Aquestes bases podran servir per interpretar els resultats de treballs futurs en el camp de la cicatrització i la regeneració en *Drosophila*. També podran ser utilitzades però, per interpretar els resultats d'estudis de regeneració en altres organismes, tal com indica el fet de que molts dels resultats aquí presentats es veuen corroborats per estudis en paneroles, amfibis o fins i tot, en cultius de cèl·lules de mamífers.

BIBLIOGRAFIA



10. **Bibliografia**

A

Abbott, L. C., Karpen, G. H. and Schubiger, G. (1981). Compartmental restrictions and blastema formation during pattern regulation in *Drosophila* imaginal leg discs. *Dev Biol* **87**, 64-75.

Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I. and Steller, H. (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **117**, 29-43.

Abu-Shaar, M. and Mann, R. S. (1998). Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development. *Development* **125**, 3821-30.

Adler, P. N. (1981). Growth during pattern regulation in imaginal discs. *Dev Biol* **87**, 356-73.

Adler, P. N. (1984). DNA replication and pattern regulation in the imaginal wing disc of *Drosophila*. *Dev Biol* **102**, 300-8.

Adler, P. N. and MacQueen, M. (1984). Cell proliferation and DNA replication in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **103**, 28-37.

Affolter, M., Marty, T., Vigano, M. A. and Jazwinska, A. (2001). Nuclear interpretation of Dpp signaling in *Drosophila*. *Embo J* **20**, 3298-305.

Agnes, F., Suzanne, M. and Noselli, S. (1999). The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development* **126**, 5453-62.

B

Baena-López, L. A., Baonza, A. and García-Bellido, A. (2005). The orientation of cell divisions determines the shape of *Drosophila* organs. *Curr Biol* **15**, 1640-4.

Baena-López, L. A., Pastor-Pareja, J. C. and Resino, J. (2003). Wg and Egfr signalling antagonise the development of the peripodial epithelium in *Drosophila* wing discs. *Development* **130**, 6497-506.

Baguña, J. (2001). Regeneration model systems: invertebrate epimorphic. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-6.

Bangs, P. and White, K. (2000). Regulation and execution of apoptosis during *Drosophila* development. *Dev Dyn* **218**, 68-79.

Basler, K. and Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by *hedgehog* protein. *Nature* **368**, 208-14.

Bate, M. and Martinez-Arias, A. (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development* **112**, 755-61.

Bohn, H. (1976). Insect Development. Tissue interactions in the regenerating cockroach leg. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Bosch, M. (2000). Estudi de la regeneració dels discs imaginals de *Drosophila* mitjançant tècniques de sobreexpressió del gen *hedgehog* i de inducció de mort cel·lular. In *Màster Experimental en Biologia. Universitat de Barcelona*, (ed., pp. 46.

Brand, A. H., Manoukian, A. S. and Perrimon, N. (1994). Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol* **44**, 635-54.

Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.

Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. and Cohen, S. M. (2003). *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* **113**, 25-36.

Brook, W. J. and Cohen, S. M. (1996). Antagonistic interactions between Wingless and Decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* Leg. *Science* **273**, 1373-7.

Brook, W. J., Ostafichuk, L. M., Piorecky, J., Wilkinson, M. D., Hodgetts, D. J. and Russell, M. A. (1993). Gene expression during imaginal disc regeneration detected using enhancer-sensitive P-elements. *Development* **117**, 1287-97.

Bryant, P. J. (1971). Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **26**, 637-51.

Bryant, P. J. (1975). Pattern formation in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*: fate map, regeneration and duplication. *J Exp Zool* **193**, 49-77.

Bryant, P. J., Bryant, S. V. and French, V. (1977). Biological regeneration and pattern formation. *Sci Am* **237**, 66-76, 81.

Bryant, P. J. and Fraser, S. E. (1988). Wound healing, cell communication, and DNA synthesis during imaginal disc regeneration in *Drosophila*. *Dev Biol* **127**, 197-208.

Bryant, P. J. and O'Brochta, D. A. (1986). Growth patterns in *Drosophila* imaginal discs. *Prog Clin Biol Res* **217A**, 297-300.

Bryant, S. V., French, V. and Bryant, P. J. (1981). Distal regeneration and symmetry. *Science* **212**, 993-1002.

C

Campbell, G. (2002). Distalization of the *Drosophila* leg by graded EGF-receptor activity. *Nature* **418**, 781-5.

Campbell, G. (2005). Regulation of gene expression in the distal region of the *Drosophila* leg by the HoxII homolog, Ci5. *Dev Biol* **278**, 607-18.

Campbell, G. and Tomlinson, A. (1995). Initiation of the proximodistal axis in insect legs. *Development* **121**, 619-28.

Capdevila, J. and Guerrero, I. (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *Embo J* **13**, 4459-68.

Cho, K. O., Chern, J., Izaddoost, S. and Choi, K. W. (2000). Novel signaling from the peripodial membrane is essential for eye disc patterning in *Drosophila*. *Cell* **103**, 331-42.

D

Dale, L. and Bownes, M. (1980). Is regeneration in *Drosophila* the result of epimorphic regulation? *Wilhelm Roux's Archives* **189**, 91-96.

Dale, L. and Bownes, M. (1981). Wound healing and regeneration in the imaginal disc of *Drosophila*. *Wilhelm Roux's Archives* **190**, 185-190.

Dale, L. and Bownes, M. (1985). Pattern regulation in fragments of *Drosophila* wing discs which show variable wound healing. *J Embryol Exp Morphol* **85**, 95-109.

Davis, K. T. and Shearn, A. (1977). In vitro growth of imaginal disks from *Drosophila melanogaster*. *Science* **196**, 438-40.

Day, S. J. and Lawrence, P. A. (2000). Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* **127**, 2977-87.

de Celis, J. F., Garcia-Bellido, A. and Bray, S. J. (1996). Activation and function of *Notch* at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* **122**, 359-69.

de Celis, J. F., Tyler, D. M., de Celis, J. and Bray, S. J. (1998). Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* **125**, 4617-26.

de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P. and Johnston, L. A. (2004). *Drosophila* Myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* **117**, 107-16.

Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-52.

Diaz-Benjumea, F. J. and 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**, 4215-25.

Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev* **10**, 421-34.

Dunne, J. F. (1981). Growth dynamics in the regeneration of a fragment of the wing imaginal disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **87**, 379-82.

E

Endo, T., Bryant, S. V. and Gardiner, D. M. (2004). A stepwise model system for limb regeneration. *Dev Biol* **270**, 135-45.

F

Fleming, R. J., Gu, Y. and Hukriede, N. A. (1997). *Serrate*-mediated activation of *Notch* is specifically blocked by the product of the gene *fringe* in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **124**, 2973-81.

French, V. (1986). Regeneration within the insect thoracic segment. *Prog Clin Biol Res* **217A**, 273-87.

French, V., Bryant, P. J. and Bryant, S. V. (1976). Pattern regulation in epimorphic fields. *Science* **193**, 969-81.

G

Galindo, M. I., Bishop, S. A., Greig, S. and Couso, J. P. (2002). Leg patterning driven by proximal-distal interactions and EGFR signaling. *Science* **297**, 256-9.

Galindo, M. I. and Couso, J. P. (2000). Intercalation of cell fates during tarsal development in *Drosophila*. *Bioessays* **22**, 777-80.

Galko, M. J. and Krasnow, M. A. (2004). Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol* **2**, E239.

García-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Found Symp* **29**, 161-183.

García-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* **245**, 251-3.

García-Bellido, A. C. and García-Bellido, A. (1998). Cell proliferation in the attainment of constant sizes and shapes: the Entelechia model. *Int J Dev Biol* **42**, 353-62.

Gardiner, D. M., Blumberg, B., Komine, Y. and Bryant, S. V. (1995). Regulation of *HoxA* expression in developing and regenerating axolotl limbs. *Development* **121**, 1731-41.

Gibson, M. C., Lehman, D. A. and Schubiger, G. (2002). Luminal transmission of Decapentaplegic in *Drosophila* imaginal discs. *Dev Cell* **3**, 451-60.

Gibson, M. C. and Schubiger, G. (1999). Hedgehog is required for activation of *engrailed* during regeneration of fragmented *Drosophila* imaginal discs. *Development* **126**, 1591-9.

Gibson, M. C. and Schubiger, G. (2000). Peripodial cells regulate proliferation and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **103**, 343-50.

Glise, B., Bourbon, H. and Noselli, S. (1995). *hemipterous* encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* **83**, 451-61.

González-Gaitán, M., Capdevila, M. P. and García-Bellido, A. (1994). Cell proliferation patterns in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mech Dev* **46**, 183-200.

H

Haynie, J. and Schubiger, G. (1979). Absence of distal to proximal intercalary regeneration in imaginal wing discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **68**, 151-61.

Haynie, J. L. and Bryant, P. J. (1976). Intercalary regeneration in imaginal wing disk of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **259**, 659-62.

Holz, A., Meise, M. and Janning, W. (1997). Aepithelial cells in *Drosophila melanogaster*: origin and cell lineage. *Mech Dev* **62**, 93-101.

Huh, J. R., Guo, M. and Hay, B. A. (2004). Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr Biol* **14**, 1262-6.

I

Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T. and Miura, M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *Embo J* **21**, 3009-18.

J

Jacinto, A., Wood, W., Woolner, S., Hiley, C., Turner, L., Wilson, C., Martinez-Arias, A. and Martin, P. (2002). Dynamic analysis of actin cable function during *Drosophila* dorsal closure. *Curr Biol* **12**, 1245-50.

Jaklevic, B. and Su, T. T. (2003). Cell turnover: flexible coupling meets the needs of development. *Curr Biol* **13**, R805-7.

Johnston, L. A. and Edgar, B. A. (1998). Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* **394**, 82-4.

Johnston, L. A. and Sanders, A. L. (2003). Wingless promotes cell survival but constrains growth during *Drosophila* wing development. *Nat Cell Biol* **5**, 827-33.

Johnston, L. A. and Schubiger, G. (1996). Ectopic expression of *wingless* in imaginal discs interferes with *decapentaplegic* expression and alters cell determination. *Development* **122**, 3519-29.

K

Karlsson, J. (1981). The distribution of regenerative potential in the wing disc of *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* **61**, 303-16.

Karlsson, J. and Smith, R. J. (1981). Regeneration from duplicating fragments of the *Drosophila* wing disc. *J Embryol Exp Morphol* **66**, 117-26.

Karpen, G. H. and Schubiger, G. (1981). Extensive regulatory capabilities of a *Drosophila* imaginal disk blastema. *Nature* **294**, 744-7.

Kauffman, S. A. (1973). Control circuits for determination and transdetermination. *Science* **181**, 310-8.

Kauffman, S. A. and Ling, E. (1981). Regeneration by complementary wing disc fragments of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **82**, 238-57.

Kiehle, C. P. and Schubiger, G. (1985). Cell proliferation changes during pattern regulation in imaginal leg discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **109**, 336-46.

Kirby, B. S., Bryant, P. J. and Schneiderman, H. A. (1982). Regeneration following duplication of imaginal wing disc fragments of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **90**, 259-71.

Kojima, T. (2004). The mechanism of *Drosophila* leg development along the proximodistal axis. *Dev Growth Differ* **46**, 115-29.

Kojima, T., Sato, M. and Saigo, K. (2000). Formation and specification of distal leg segments in *Drosophila* by dual *Bar* homeobox genes, *BarH1* and *BarH2*. *Development* **127**, 769-78.

Kojima, T., Tsuji, T. and Saigo, K. (2005). A concerted action of a paired-type homeobox gene, *aristaleless*, and a homolog of *Hox11/tlx* homeobox gene, *clawless*, is essential for the distal tip development of the *Drosophila* leg. *Dev Biol* **279**, 434-45.

L

Lawrence, P. A. and Struhl, G. (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *Drosophila*? *Cell* **85**, 951-61.

Lecuit, T. and Cohen, S. M. (1997). Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature* **388**, 139-45.

Lee, L. W. and Gerhart, J. C. (1973). Dependence of transdetermination frequency on the developmental stage of cultured imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **35**, 62-82.

Lee, N., Murance, C., Ringrose, L. and Paro, R. (2005). Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* **438**, 234-7.

Leppa, S. and Bohmann, D. (1999). Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* **18**, 6158-62.

M

Martin, P. and Parkhurst, S. M. (2004). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* **131**, 3021-34.

Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. and Martinez-Arias, A. (1998). *puckered* encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 557-70.

Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. and Garcia-Bellido, A. (2000). JNK and *decapentaplegic* signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7888-93.

Martinez-Arias, A. (1993). Development and patterning of the larval epidermis of *Drosophila*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mattila, J., Omelyanchuk, L., Kyttila, S., Turunen, H. and Nokkala, S. (2005). Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. *Int J Dev Biol* **49**, 391-9.

- Mattila, J., Omelyanchuk, L. and Nokkala, S.** (2004). Dynamics of *decapentaplegic* expression during regeneration of the *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. *Int J Dev Biol* **48**, 343-7.
- Maves, L. and Schubiger, G.** (1998). A molecular basis for transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: interactions between *wingless* and *decapentaplegic* signaling. *Development* **125**, 115-24.
- Maves, L. and Schubiger, G.** (2003). Transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: a model for understanding pluripotency and selector gene maintenance. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 472-9.
- McEwen, D. G., Cox, R. T. and Peifer, M.** (2000). The canonical Wg and JNK signaling cascades collaborate to promote both dorsal closure and ventral patterning. *Development* **127**, 3607-17.
- McEwen, D. G. and Peifer, M.** (2005). Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. *Development* **132**, 3935-46.
- Meinhardt, H.** (1983). Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields. *Dev Biol* **96**, 375-85.
- Milán, M., Campuzano, S. and García-Bellido, A.** (1996a). Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11687-92.
- Milán, M., Campuzano, S. and García-Bellido, A.** (1996b). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 640-5.
- Milán, M., Campuzano, S. and García-Bellido, A.** (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5691-6.
- Milán, M. and Cohen, S. M.** (2000). Temporal regulation of Apterous activity during development of the *Drosophila* wing. *Development* **127**, 3069-78.
- Milán, M. and Cohen, S. M.** (2003). A re-evaluation of the contributions of Apterous and Notch to the dorsoventral lineage restriction boundary in the *Drosophila* wing. *Development* **130**, 553-62.
- Milner, M. J., Bleasby, A. J. and Kelly, S. L.** (1984). The role of the peripodial membrane of leg and wing imaginal discs of *Drosophila melanogaster* during evagination and differentiation in vitro. *Roux's Archives of Developmental Biology* **193**, 180-186.
- Milner, M. J., Bleasby, A. J. and Pyott, A.** (1983). The role of the peripodial membrane in the morphogenesis of the eye-antennal disc of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Archives of Developmental Biology* **192**, 164-170.
- Mito, T., Inoue, Y., Kimura, S., Miyawaki, K., Niwa, N., Shinmyo, Y., Ohuchi, H. and Noji, S.** (2002). Involvement of *hedgehog*, *wingless*, and *dpp* in the initiation of proximodistal axis formation during the regeneration of insect legs, a verification of the modified boundary model. *Mech Dev* **114**, 27-35.
- Moffat, K. G., Gould, J. H., Smith, H. K. and O'Kane, C. J.** (1992). Inducible cell ablation in *Drosophila* by cold-sensitive ricin A chain. *Development* **114**, 681-7.
- Morata, G. and Lawrence, P. A.** (1975). Control of compartment development by the *engrailed* gene in *Drosophila*. *Nature* **255**, 614-7.
- Morata, G. and Ripoll, P.** (1975). Minutes: mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol* **42**, 211-21.
- Moreno, E. and Basler, K.** (2004). dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* **117**, 117-29.

Moreno, E., Yan, M. and Basler, K. (2002). Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr Biol* **12**, 1263-8.

N

Nelson, C. M., Jean, R. P., Tan, J. L., Liu, W. F., Sniadecki, N. J., Spector, A. A. and Chen, C. S. (2005). Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11594-9.

Norbeck, B. A. and Denburg, J. L. (1991). Pattern formation during insect leg segmentation: studies with a prepattern of a cell surface antigen. *Roux's Archives of Developmental Biology* **199**, 476-491.

O

O'Brochta, D. A. and Bryant, P. J. (1987). Distribution of S-phase cells during the regeneration of *Drosophila* imaginal wing discs. *Dev Biol* **119**, 137-42.

P

Pallavi, S. K. and Shashidhara, L. S. (2003). Egfr/Ras pathway mediates interactions between peripodial and disc proper cells in *Drosophila* wing discs. *Development* **130**, 4931-41.

Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. and Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-12.

Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martin-Blanco, E. and Garcia-Bellido, A. (2004). Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev Cell* **7**, 387-99.

Percival-Smith, A. and Hayden, D. J. (1998). Analysis in *Drosophila melanogaster* of the interaction between Sex Combs Reduced and Extradenticle activity in the determination of tarsus and arista identity. *Genetics* **150**, 189-98.

Percival-Smith, A., Weber, J., Gilfoyle, E. and Wilson, P. (1997). Genetic characterization of the role of the two HOX proteins, Proboscipedia and Sex Combs Reduced, in determination of adult antennal, tarsal, maxillary palp and proboscis identities in *Drosophila melanogaster*. *Development* **124**, 5049-62.

Perez-Garijo, A., Martin, F. A. and Morata, G. (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* **131**, 5591-8.

Perez-Garijo, A., Martin, F. A., Struhl, G. and Morata, G. (2005). Dpp signaling and the induction of neoplastic tumors by caspase-inhibited apoptotic cells in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17664-9.

Postlethwait, J. H., Poodry, C. A. and Schneiderman, H. A. (1971). Cellular dynamics of pattern duplication in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **26**, 125-32.

Potter, C. J. and Xu, T. (2001). Mechanisms of size control. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 279-86.

Pueyo, J. I. and Couso, J. P. (2004). Chip-mediated partnerships of the homeodomain proteins Bar and Aristaless with the LIM-HOM proteins Apterous and Lim1 regulate distal leg development. *Development* **131**, 3107-20.

R

Rämet, M., Lanot, R., Zachary, D. and Manfruelli, P. (2002). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol* **241**, 145-56.

Rauskolb, C. (2001). The establishment of segmentation in the *Drosophila* leg. *Development* **128**, 4511-21.

Reinhardt, C. A. and Bryant, P. J. (1981). Wound healing in the imaginal discs of *Drosophila*. II. Transmission electron microscopy of normal and healing wing discs. *J Exp Zool* **216**, 45-61.

Reinhardt, C. A., Hodgkin, N. M. and Bryant, P. J. (1977). Wound healing in the imaginal discs of *Drosophila*. I. Scanning electron microscopy of normal and healing wing discs. *Dev Biol* **60**, 238-57.

Resino, J., Salama-Cohen, P. and García-Bellido, A. (2002). Determining the role of patterned cell proliferation in the shape and size of the *Drosophila* wing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7502-7.

Robson, E. J., Khaled, W. T., Abell, K. and Watson, C. J. (2006). Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines. *Differentiation* **74**, 254-64.

Rodriguez, I. and Basler, K. (1997). Control of compartmental affinity boundaries by Hedgehog. *Nature* **389**, 614-8.

Rubin, G. M. (1988). *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science* **240**, 1453-9.

Ryoo, H. D., Gorenc, T. and Steller, H. (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev Cell* **7**, 491-501.

S

Schubiger, G. (1971). Regeneration, duplication and transdetermination in fragments of the leg disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **26**, 277-95.

Schubiger, G. and Schubiger, M. (1978). Distal transformation in *Drosophila* leg imaginal disc fragments. *Dev Biol* **67**, 286-95.

Schubiger, M. and Palka, J. (1987). Changing spatial patterns of DNA replication in the developing wing of *Drosophila*. *Dev Biol* **123**, 145-53.

Shearn, A., Davis, K. T. and Hersperger, E. (1978). Transdetermination of *Drosophila* imaginal discs cultured in vitro. *Dev Biol* **65**, 536-40.

Simpson, P., Berreur, P. and Berreur-Bonnenfant, J. (1980). The initiation of pupariation in *Drosophila*: dependence on growth of the imaginal discs. *J Embryol Exp Morphol* **57**, 155-65.

Simpson, P. and Morata, G. (1981). Differential mitotic rates and patterns of growth in compartments in the *Drosophila* wing. *Dev Biol* **85**, 299-308.

Smith, H. K., Roberts, I. J. H., Allen, M. J., Connolly, J. B., Moffat, K. G. and O'Kane, C. J. (1996). Inducible ternary control of transgene expression and cell ablation in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **206**, 14-24.

St Pierre, S. E., Galindo, M. I., Couso, J. P. and Thor, S. (2002). Control of *Drosophila* imaginal disc development by *rotund* and *roughened eye*: differentially expressed transcripts of the same gene encoding functionally distinct zinc finger proteins. *Development* **129**, 1273-81.

Stepniak, E., Ricci, R., Eferl, R., Sumara, G., Sumara, I., Rath, M., Hui, L. and Wagner, E. F. (2006). c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes Dev* **20**, 2306-14.

Struhl, G. and Basler, K. (1993). Organizing activity of Wingless protein in *Drosophila*. *Cell* **72**, 527-40.

Sustar, A. and Schubiger, G. (2005). A transient cell cycle shift in *Drosophila* imaginal disc cells precedes multipotency. *Cell* **120**, 383-93.

Szabad, J., Simpson, P. and Nothiger, R. (1979). Regeneration and compartments in *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol* **49**, 229-41.

T

Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. and Kornberg, T. B. (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of *engrailed*, and the compartment border hypothesis. *Development* **121**, 3359-69.

Thompson, B. J. and Cohen, S. M. (2006). The Hippo pathway regulates the *bantam* microRNA to control cell proliferation and apoptosis in *Drosophila*. *Cell* **126**, 767-74.

Truby, P. R. (1983). Blastema formation and cell division during cockroach limb regeneration. *J Embryol Exp Morphol* **75**, 151-64.

Truby, P. R. (1985). Separation of wound healing from regeneration in the cockroach leg. *J Embryol Exp Morphol* **85**, 177-90.

U

Usui, K. and Simpson, P. (2000). Cellular basis of the dynamic behavior of the imaginal thoracic discs during *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol* **225**, 13-25.

W

Wang, S. H., Simcox, A. and Campbell, G. (2000). Dual role for *Drosophila* epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev* **14**, 2271-6.

Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G., Jackle, H., Janning, W. and Klambt, C. (2003). FlyMove—a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet* **19**, 310-1.

Williams, J. A., Paddock, S. W. and Carroll, S. B. (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* **117**, 571-84.

Wolpert, L. (1971). Positional information and pattern formation. *Curr Top Dev Biol* **6**, 183-224.

Wolpert, L. (1989). Positional information revisited. *Development* **107 Suppl**, 3-12.

Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P. and Meyerowitz, E. (1998). Principles of Development: Oxford University Press.

Wood, W., Jacinto, A., Grose, R., Woolner, S., Gale, J., Wilson, C. and Martin, P. (2002). Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* **4**, 907-12.

Z

Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G. (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 2265-78.

Zeitlinger, J. and Bohmann, D. (1999). Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development* **126**, 3947-56.

Zeitlinger, J., Kockel, L., Peverali, F. A., Jackson, D. B., Mlodzik, M. and Bohmann, D. (1997). Defective dorsal closure and loss of epidermal *decapentaplegic* expression in *Drosophila fos* mutants. *Embo J* **16**, 7393-401.

