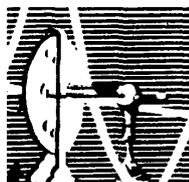


Marcio Ribeiro Fontenele

**Diferentes atividades da proteína Short
gastrulation requeridas para a padronização do
córion e do embrião de *Drosophila melanogaster*.**

Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de
Janeiro visando a obtenção do grau de mestre em Ciências
Biológicas (Biofísica).



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas -Biofísica
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marcio Ribeiro Fontenele

Diferentes atividades da proteína Short gastrulation requeridas para a padronização do córion e do embrião de *Drosophila melanogaster*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientadora: Helena Maria Marcolla Araújo

Professora adjunta do Departamento de Histologia e Embriologia.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chaga Filho
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biofísica

Rio de Janeiro

Maio / 2006

Ficha Catalográfica

Fontenele, Marcio Ribeiro

Diferentes atividades da proteína Short gastrulation requeridas para a padronização do córion e do embrião de *Drosophila melanogaster*. Marcio Ribeiro Fontenele. Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF, 2006.

xvii, 78f., il.; 29,7 cm.

Orientadora: Helena Maria Marcolla Araujo

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). Rio de Janeiro, 2004.

Referências Bibliográficas: f. 85– 90.

1. Formação do eixo dorso-ventral 2. Short gastrulation 3. BMPs 4. Morfógenos 5. *Drosophila melanogaster*. I. Araujo, Helena Maria Marcolla. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título.

Diferentes atividades da proteína Short gastrulation requeridas para a padronização do córion e do embrião de *Drosophila melanogaster*.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Aprovado por:

Prof. Dra. Helena Maria Marcolla Araújo
Prof. Adjunta do Departamento de Histologia e Embriologia / ICB
Orientadora

Prof. Dr. Ana Beatriz Furlanetto Pacheco
Prof. Adjunta do IBCCF
Banca examinadora

Prof. Dr. Ulisses Gazos Lopes
Prof. Adjunto do IBCCF
Banca examinadora

Prof. Dr. João Ricardo Lacerda de Menezes
Prof. Adjunto do Departamento de Anatomia / ICB
Banca examinadora

Prof. Dr. Ednildo de Alcantara Machado
Prof. Adjunto do IBCCF
Revisor e suplente

Prof. Dr. Cláudia dos Santos Mermelstein
Prof. Adjunta do Departamento de Histologia e Embriologia / ICB
Suplente externo

Rio de Janeiro
Maio / 2006

Dedico este trabalho a minha família.

Agradecimentos:

- A Deus por guiar a minha vida pelo caminho certo.
- Aos meus pais pelo esforço que fizeram para me dar uma boa educação e que sempre confiaram em mim.
- Aos meus irmãos que me aturam no pouco tempo, quando estou em casa.
- A Helena Araujo por me orientar e por dedicar um pouco de seu tempo.
- Ao pessoal do Laboratório: Adriana, Érika, Kátia, Rodrigo, Renato, Rafael, Tatiana.
- A Dulce pela ótima comida que faz para as moscas.
- Aos meus amigos: Wellington “Jurássico”, Sérgio “Pinguim”, Wagner “Cachaça”, Edgar e Raquel, pelo companheirismo e amizade que se fortaleceram durante o convívio na graduação.
- Ao amigos do Departamento de Histologia, principalmente a Silvana.
- Ao conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa concedida.
- E claro por último as Drosophilas.
- E aqueles que esqueci.

Resumo

Diferentes atividades da proteína Short gastrulation requeridas para a padronização do córion e do embrião de *Drosophila melanogaster*.

Marcio Ribeiro Fontenele

Orientadora: Helena Maria Marcolla Araujo

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

A formação do eixo dorso-ventral (DV) do embrião de *Drosophila melanogaster* requer as atividades das proteínas Short gastrulation (Sog) e Decapentaplegic (Dpp) durante a oogênese. Nesta etapa, Sog e Dpp atuam antagonisticamente na formação do eixo DV do embrião. Em etapas posteriores à da embriogênese e metamorfose, as metaloproteases Tollid (Tld) e Tolkin (Tok) processam a proteína Sog produzindo diferentes fragmentos, sendo que a proteína Twisted gastrulation (Tsg) modula este processamento. Analisamos o papel da proteína Sog e de seus fragmentos, durante a oogênese, na formação do córion e do eixo DV embrionário. Analisamos se as metaloproteases Tld, Tok e a proteína Tsg têm potencial impacto na geração e modulação das atividades de fragmentos de Sog. Nossos resultados mostram que a proteína Sog e diferentes fragmentos, produzidos durante a oogênese, são encontrados no embrião precocemente, antes da expressão de genes zigóticos. A proteína Sog exhibe diferentes atividades através de fragmentos gerados durante a oogênese possivelmente pelas metaloproteases. Além disto, estes fragmentos podem distribuir-se diferencialmente no espaço perivitelínico. Também evidenciamos que o gene *tsg* é expresso assimetricamente durante a oogênese, nas células foliculares ventrais. Com base nestes dados sugerimos que Tsg possa contribuir na modulação e/ou distribuição dos fragmentos de Sog durante a oogênese. Desta forma, as atividades de Sog, Tsg e metaloproteases podem atuar na formação de um gradiente da atividade de Dpp, através da geração de fragmentos de Sog com atividades distintas. Os fragmentos de Sog podem modular a atividade e/ou distribuição de Dpp e assim os fragmentos podem padronizar o eixo DV do embrião de *D. melanogaster*.

Palavras-chave: 1. Formação do eixo dorso-ventral 2. Short gastrulation 3. BMPs 4. Morfógenos 5. *Drosophila melanogaster*.

Rio de Janeiro
Maio / 2006

Abstract

Different activities of Short gastrulation protein required to patterning of chorion and embryo of *Drosophila melanogaster*.

Marcio Ribeiro Fontenele

Orientadora: Helena Maria Marcolla Araujo

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Dorsoventral (DV) patterning of the *Drosophila melanogaster* embryo requires the Dpp pathway and Sog protein activities during oogenesis. Sog and Dpp proteins act antagonistically to pattern the DV axis of the embryo. It has been shown that later in the embryo and during pupal development the metalloproteases Tolloid (Tld) and Tok (Tok) cleave Sog producing an array of fragments. In addition, Twisted gastrulation (Tsg) protein modulates this cleavage. We have analyzed the role of maternal Sog protein and its proteolytic fragments on chorion and embryonic dorsalventral patterning. In addition, we have analyzed whether the Tld and Tok metalloproteases as well as Tsg protein have potential roles in generating and modulating the activity of Sog fragments. Our results show that Sog protein and different fragments produced by follicle cells are observed in early embryo. We suggest that maternal Sog protein exhibits different activities through the generation of fragments, possibly by Tok and Tld. Our data is indicative of differential distribution of Sog fragments in the perivitelline space. Furthermore, we show that the *tsg* gene is expressed asymmetrically during oogenesis in ventral follicle cells, and thus Tsg protein may contribute to modulate and/or distribute Sog fragments in the egg chamber and future embryo. Thus, it is possible that the activities of Sog, Tsg and metalloproteases result in the formation of a Dpp activity gradient. Sog fragments may modulate Dpp activity and/or distribution during oogenesis, impacting on patterning the DV axis of the *D. melanogaster* embryo.

Key-words: 1. DV axis patterning 2. Short gastrulation 3. BMPs 4. Morphogen 5. *Drosophila melanogaster*.

Rio de Janeiro
Maio / 2006

Sumário:

Lista de abreviaturas	xii
Lista de nomenclatura e abreviaturas genéticas.....	xiv
Lista de ilustrações	xvi
Lista de tabelas	xviii
I. Introdução	19
1.1. Uma questão fundamental em Biologia do Desenvolvimento: A regulação da atividade de morfógenos.....	19
1.2. Modelo de estudo: <i>Drosophila melanogaster</i>	20
1.3. A formação do eixo dorso-ventral do embrião de <i>D. melanogaster</i>	20
1.3.1. Estabelecimento dos territórios ao longo do eixo dorso-ventral embrionário.	23
1.4. Genes maternos versus genes zigóticos.....	25
1.5. Regulação da atividade de Dpp zigótico através das atividades de Sog, Tld e Tsg zigóticos.....	26
1.6. O processamento de Sog produz fragmentos com atividades distintas durante o desenvolvimento de <i>D. melanogaster</i>	30
1.7. As atividades maternas de Sog e Dpp durante a formação do eixo dorso-ventral.	31
II. Objetivos.....	35
2.1. Geral	35
2.2. Específicos.....	35
III. Material e métodos.....	37
3.1. Linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizadas nos experimentos.	37
3.2. Cromossomos Balanceadores.	42
3.3. Manipulação das linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i>	43
3.3.1. Meio de cultura.....	43
3.3.2. Meio para oviposição.	44
3.3.3. Manutenção das linhagens.....	44
3.3.4. Coleta de fêmeas virgens.....	44
3.3.5. Coleta de embriões e ovários.....	45

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e imunotransferência.	46
3.4.1. Preparação de extratos proteicos.	46
3.4.2. Western blotting.	46
3.5. Hibridização <i>in situ</i>	45
3.5.1. Síntese de sondas RNA antisense.	47
3.5.2. Fixação de embriões.	48
3.5.3. Reação de hibridização <i>in situ</i>	48
3.6. Superexpressão de genes pelo sistema UAS/GAL4.	50
3.7. Geração de clones em células foliculares homozigotas para alelos nulos de genes de interesse.	51
3.7.1. Geração de clones marcados com <i>dec-1</i>	53
3.8. Preparação do córion.	55
IV. Resultados	56
4.1. Sog é protealizado durante a oogênese e os fragmentos gerados são transferidos para o embrião.	56
4.2. Diferentes fragmentos de Sog exibem atividades distintas.	58
4.2.1. Fenótipos embrionários:	61
4.2.2. Fenótipos de córion:	65
4.3. Assimetria na distribuição espacial de diferentes atividades de Sog.	68
4.4. Tsg é expresso assimetricamente durante a oogênese e atua na padronização do eixo DV	72
4.5. As metaloproteases Tok e Tld expressas durante a oogênese participam do estabelecimento do eixo DV.	74
4.6. Correlação entre as atividades dos fragmentos de Sog e a atividade de Dpp.	78
V. Discussão	81
5.1. Proteína Sog produzida pelas células foliculares é transferida para o embrião.	81
5.2. A proteína Sog materna exibe distintas atividades.	82
5.3. Distribuição assimétrica de fragmentos de Sog no espaço perivitelinico.	83
5.4. Sog e a modulação da atividade de Dpp.....	86
VI. Conclusões	90

VII. Referências91

Anexo A: Artigo publicado na Development Biology.....97

Lista de abreviaturas:

AD	Apêndices dorsais
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin (Soro de Albumina Bovina)
CR	Domínio rico em cisteínas
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DIG	Digoxigenina
DNA	Ácido Desoxinucleico
EDTA	Ethylenediamine-tetra-acetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor (Fator de desenvolvimento da epiderme)
EGFR	Receptor transmembrana de EGF
EGTA	Ethylene Glycol-bis (beta-aminoethyl ether) N'-Tetra-acetic Acid
FLP	Flipase (Recombinase sítio específica), oriundo de levedura
FRT	Flipase Recombination Target (alvo de recombinação da Flipase)
GAL4	Proteína regulatória (Fator de transcrição) oriundo de levedura
GFP	Green Fluorescent Protein
Grk	Proteína Gurken
HRP	Horseradish Peroxidase
I κ B	Inhibitory κ B (família de inibidores de κ B)
kD	Kilodalton(s)
M	Molar
NaN ₃	Azida sódica
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
Ndl	Proteína Nudel

NF- κ B	Nuclear Factor κ B (Família de fatores nucleares κ B)
NP40	Dertegente (também chamado de Igepal)
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Tampão fosfato salino)
PBT	Tampão PBS com Tween-20
PDT/BSA	Tampão PBS com deoxicolato de sódio, Triton-X100 e BSA
PMSF	Phenylmethanesulfonyl
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
Rpm	Rotações por minuto
Spz	Proteína Spätzle
SSC	Saline Sodium Citrate (solução citrato de sódio salino)
TGF- α	Transforming Factor Growth alfa (Fator de desenvolvimento transformante alfa)
TGF- β	Transforming Factor Growth beta (Fator de desenvolvimento transformante beta)
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminoethane
UAS	Upstream Activation Sequence, oriundo de levedura

Lista de nomenclatura e abreviaturas genéticas

+	Indica um gene, alelo ou cromossomo selvagem.
/	Separa cromossomos homólogos.
;	Separa cromossomos não homólogos.
Δ	Indica deleção, em uma construção, de uma sequência especificada logo após. Ex.: UAS-Sog Δ CR4, o domínio CR4 de Sog está deletado nesta construção.
Dp(x;y) <i>gene</i>	Duplicação de um gene localizado no cromossomo x para o cromossomo y.
Palavras em itálico	Indica um gene. Ex.: <i>decapentaplegic</i> ou <i>dpp</i> .
Palavras com inicial em maiúscula	Indica uma proteína. Ex.: Spätzle ou Spz
Caracteres sobrescritos	Indica determinado alelo de um gene. Ex.: <i>sog</i> ^{U2}
X	Cromossomo X.
Y	Cromossomo Y em machos.
F1	Primeira geração resultante de um 1° cruzamento
F2	Segunda geração resultante de um 2° cruzamento
CyO	Curly of Oster (Balanceador do segundo cromossomo)
<i>dec-1</i>	Gene <i>defective chorion 1</i>
<i>dpp</i>	gene <i>decapentaplegic</i>
FM7	First Multiple Seven (Balanceador do primeiro cromossomo)
<i>gbb</i>	gene <i>glass bottom boat</i>
<i>pip</i>	gene <i>pipe</i>
<i>scw</i>	gene <i>screw</i>
<i>sna</i>	gene <i>snail</i>
<i>sog</i>	gene <i>short gastrulation</i>

<i>tld</i>	gene <i>tolloid</i>
TM3	Third Multiple Three (balanceador do terceiro cromossomo)
<i>tok ou tlr</i>	gene <i>tolkin</i> ou <i>tolloid-related</i>
<i>tsg</i>	gene <i>twisted gastrulation</i>
<i>vnd</i>	gene <i>ventral nervous defective</i>

A nomenclatura genética citada acima foi baseada em (Greenspan, 1997) e na página da internet do Flybase (Flybase nomenclature, <http://www.flybase.org/docs/nomenclature/lk/nomenclature.html>).

Lista de ilustrações:

Introdução

Figura 1: Esquemática dos folículos ovarianos, córion e embrião. 21

Figura 2: Início da formação da polaridade dorso-ventral. 23

Figura 3: A via de sinalização de Toll no início da embriogênese 24

Figura 4: O gradiente de Dorsal é iniciado quando a via de Toll é ativada na região ventral do embrião, no início da embriogênese 25

Figura 5: Esquema mostrando a distribuição de Dpp zigótico, na região dorsal do embrião, através da formação do complexo Dpp/Tsg/Sog, durante a embriogênese..... 29

Figura 6: Estrutura da proteína Sog. 31

Figura 7: Esquema de sinalização das vias de Dpp e Toll 32

Material e Métodos

Figura 8: Esquema de cruzamento para obter fêmeas que superexpressam genes dirigidos pelo sistema UAS/GAL4..... 50

Figura 9: Etapas durante o cruzamento para obter fêmeas que geram clones de células foliculares homozigotas para um alelo nulo de *sog*..... 52

Figura 10: Esquema apresentando como são produzidos clones nulos em células foliculares. 53

Figura 11: Esquema mostrando como os clones nulos para *sog* marcados com *dec* são gerados..... 54

Resultados

Figura 12: Fragmentos de Sog são produzidos durante a oogênese estão presentes no embrião. 58

Figura 13: Fragmentos de Sog superexpressos pelo sistema UAS/GAL4 durante a oogênese. 59

Figura 14: Fragmentos de Sog superexpressos durante a oogênese são transferidos para o embrião. 59

Figura 15: Efeitos de clones nulos de *sog* e superexpressão de Sog e de fragmentos de Sog durante a oogênese na formação dos domínios dorso-ventrais do embrião. 64

Figura 16: Associação da localização dos clones nulos de *sog* marcados com os efeitos na padronização do córion e da cutícula do embrião. 67

Figura 17: Efeitos da superexpressão de *Sog* e de fragmentos de *Sog* na padronização de estruturas coriônicas. 71

Figura 18: *Tsg* é expresso nas células foliculares ventrais. 73

Figura 19: Efeitos de clones nulos de *tok* e *tsg* e superexpressão de *Tld* e *Tsg* durante a oogênese na formação do eixo dorso-ventral embrionário..... 76

Figura 20: Efeitos dos clones nulos de *tlk* e *tsg* e superexpressão de *Tld* e *Tsg* durante a oogênese na padronização de estruturas..... 77

Figura 21: Efeitos da superexpressão de *Dpp* durante a oogênese na padronização de estruturas coriônicas. 80

Lista de tabelas:

Material e métodos

Tabela 01: Linhagens de *D. melanogaster* utilizadas nos experimentos. 38

Resultados

Tabela 02: Efeitos da superexpressão de Sog e de fragmentos de Sog, clones de *sog*, *tok* e *tld* durante a oogênese na formação dos domínios dorso-ventrais do embrião. 63

Tabela 03: Efeitos da superexpressão de Sog e de fragmentos de Sog, clones de *tok* e *tld* na padronização de estruturas coriônicas. 66

Tabela 04: Associação da localização dos clones nulos de *sog* marcados com os efeitos na padronização do córion e da cutícula do embrião 70

I. Introdução

1.1. Uma questão fundamental em Biologia do Desenvolvimento: A regulação da atividade de morfógenos.

Como uma simples massa ou camada celular torna-se complexa ao longo do desenvolvimento formando vários tipos de tecidos e estruturas corporais? Quais são os fatores associados a essas mudanças e como eles funcionam e interagem para formar padrões corporais complexos? Como um campo de tecido homogêneo pode ser dividido em vários tipos de tecidos de expressões gênicas e morfologicamente diferentes? Isso é possível, em grande parte, devido à ação de moléculas sinalizadoras que possuem a função de modular a formação de territórios celulares que futuramente podem se tornar tecidos distintos. Um mecanismo típico para a formação de distintos territórios celulares é realizado através da ação de morfógenos.

Morfógenos são moléculas sinalizadoras que atuam induzindo respostas celulares em uma maneira dependente de concentração. A idéia de morfógeno foi estabelecida pela primeira vez no início do século XX. Em um simples modelo, proposto por Wolpert (1969), um fator de sinalização posicional (morfógeno), sintetizado em um determinado local, estabelece um gradiente de concentração no meio extracelular em um campo celular. O destino das células dentro deste campo celular é definido através da interpretação da concentração local do morfógeno, levando à ativação de um programa específico de expressão gênica. Os morfógenos podem atuar sem que haja um gradiente de concentração. Nestes casos, outras moléculas auxiliam na formação de um gradiente da atividade. Por exemplo, moléculas com atividade inibitória que podem estar em forma de gradiente, pode determinar um gradiente da atividade do morfógeno, mas não havendo um gradiente de concentração da molécula de morfógeno.

Várias questões permanecem ainda por responder: Como um gradiente de morfógeno é iniciado, mantido? e interpretado? Como os morfógenos se movem através dos tecidos? Quais são os fatores que regulam a formação do gradiente de concentração e como eles afetam o morfógeno? Como os morfógenos coordenam a padronização e o desenvolvimento? Estas questões estão intimamente relacionadas à regulação da atividade de morfógenos.

1.2. Modelo de estudo: *Drosophila melanogaster*.

A mosca da fruta *Drosophila melanogaster* é um dos modelos de estudo mais utilizados em Biologia do Desenvolvimento. A sua fácil manipulação, rápido ciclo de desenvolvimento, uma coleção de milhares de estoques com mutações em diversos genes e ferramentas genéticas diversas, a torna um dos principais organismos modelo de estudo que nos permitem tentar responder às questões colocadas anteriormente. Neste trabalho, utilizamos a *Drosophila melanogaster* como modelo de estudo para compreender melhor como os gradientes de atividade dos morfógenos são estabelecidos e regulados. Vários estoques mutantes com alelos nulos de diversos genes foram usados neste trabalho. Ferramentas genéticas nos permitem gerar populações de células que não expressam um determinado gene ou que superexpressam um gene em tecidos que não são expressos fisiologicamente. Estas ferramentas são utilizadas para compreender melhor a interação entre moléculas em *Drosophila melanogaster*.

1.3. A formação do eixo dorso-ventral do embrião de *D. melanogaster*.

A formação do eixo dorso-ventral do embrião de *D. melanogaster* é iniciada em uma primeira fase que ocorre durante a oogênese e continua em uma segunda fase a partir do início da embriogênese. Durante a oogênese ocorrem interações entre as

linhagens germinativa (oócito e células nutridoras) e somática (células foliculares) (fig. 1B), fundamentais ao estabelecimento da polaridade dorso-ventral do embrião (revisado por: Chasan e Anderson, 1993; Morisato e Anderson, 1995; Roth, 2003).

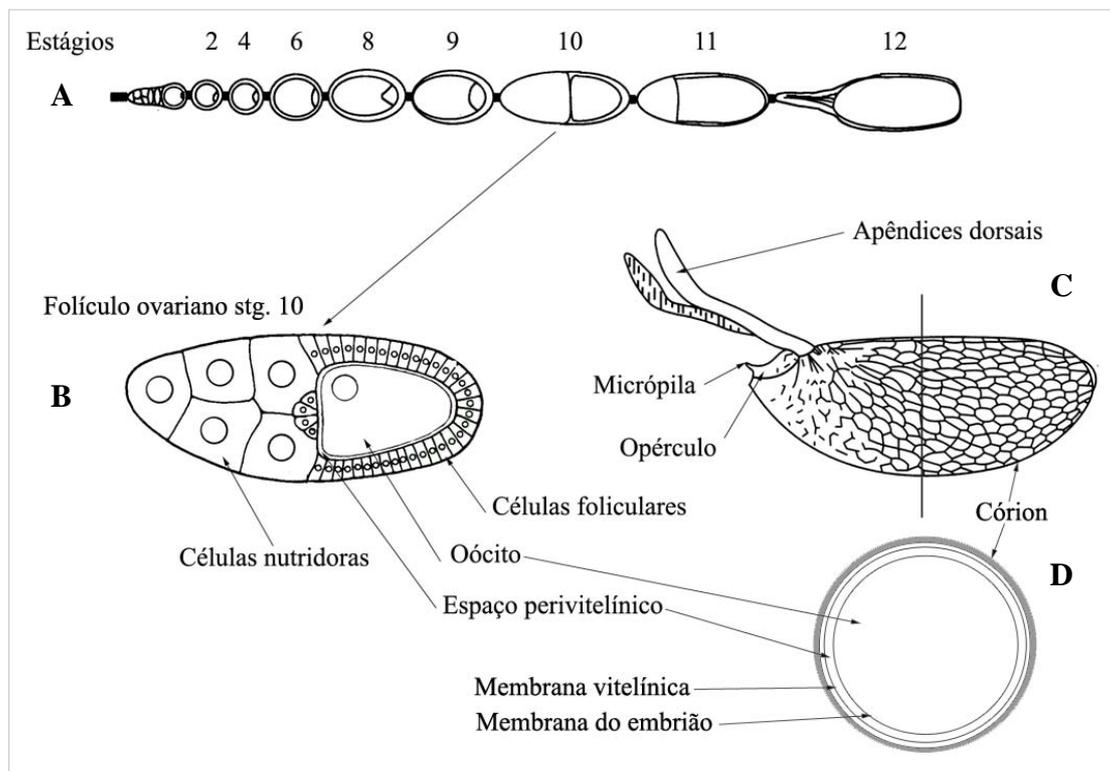


Figura 1: Esquemática dos folículos ovarianos, córion e embrião. (A) Os Folículos ovarianos passam por vários estágios de desenvolvimento durante o desenvolvimento até a formação do desenvolvimento. Os ovários são conjuntos de folículos ovarianos como mostrado em A. (B) Folículo ovariano, em corte mediano, no estágio 10. O espaço entre a membrana das células foliculares e do oócito é chamado de espaço perivitelínico. (C) Embrião com córion. Na região anterior do embrião, o córion abriga estruturas como os apêndices dorsais, opérculo e a micrópila. O córion é formado a partir das células foliculares que morrem no final da oogênese. No final do estágio 12, as células foliculares iniciam a deposição da membrana vitelínica. Esta membrana mantém o espaço perivitelínico no embrião, sendo então importante para guardar moléculas secretadas durante a oogênese que vão ter funções no embrião, como o fragmento de Spatzle. (D) Um corte transversal no embrião apresentando o espaço perivitelínico que está entre a membrana do oócito e da membrana vitelínica. Por ser o córion impermeável, os apêndices dorsais auxiliam na entrada de ar para o embrião. O opérculo é o local onde a larva eclode e a micrópila é o local de entrada do espermatozóide. Algumas imagens foram modificadas a partir de Sullivan *et al.*, 2000. Todos os esquemas de embriões e folículos estão orientados com o lado dorsal para cima, ventral para baixo, anterior à esquerda.

Durante a oogênese, a primeira assimetria dorso-ventral é observada quando o núcleo do oócito e o RNAm do gene *gurken* (*grk*) tornam-se localizados próximo ao

futuro lado ântero-dorsal do embrião (fig. 2A) (Neuman-Silberberg e Schüpbach, 1993). A produção local de um gradiente da proteína Grk, um homólogo de TGF- α (Transforming Growth Factor α), no espaço perivitelínico conduz à ativação do receptor de EGF (Epidermal Growth Factor) nas células foliculares dorsais (fig. 2B). A ativação desta via (via de EGFR) induz estas células foliculares a adotarem um destino dorsal (fig. 2C) e produzirem estruturas especializadas do córion no lado ântero-dorsal do embrião (fig. 1C). As células foliculares que não são ativadas pela via EGFR tornam-se ventrais expressando o gene *pipe* (*pip*), que codifica uma sulfotransferase de glicosaminoglicanos (Sen *et al.*, 1998). Pipe inicia uma cascata proteolítica no espaço perivitelínico, na região ventral do oócito, conduzindo à geração de um ligante ativado, chamado Spätzle (Spz) (fig. 2D). Somente após a fertilização, já no embrião, Spz (estocado na região ventral entre a membrana plasmática do embrião e a membrana vitelínica) por sua vez ativa o receptor Toll na região ventral do embrião (Stein e Nüsslein-Volhard, 1992; Smith e DeLotto, 1994; Morisato e Anderson, 1994). Ainda não se sabe como o receptor Toll é somente ativado após a fertilização, desde que a a geração da cascata proteolítica se dá na oogênese.

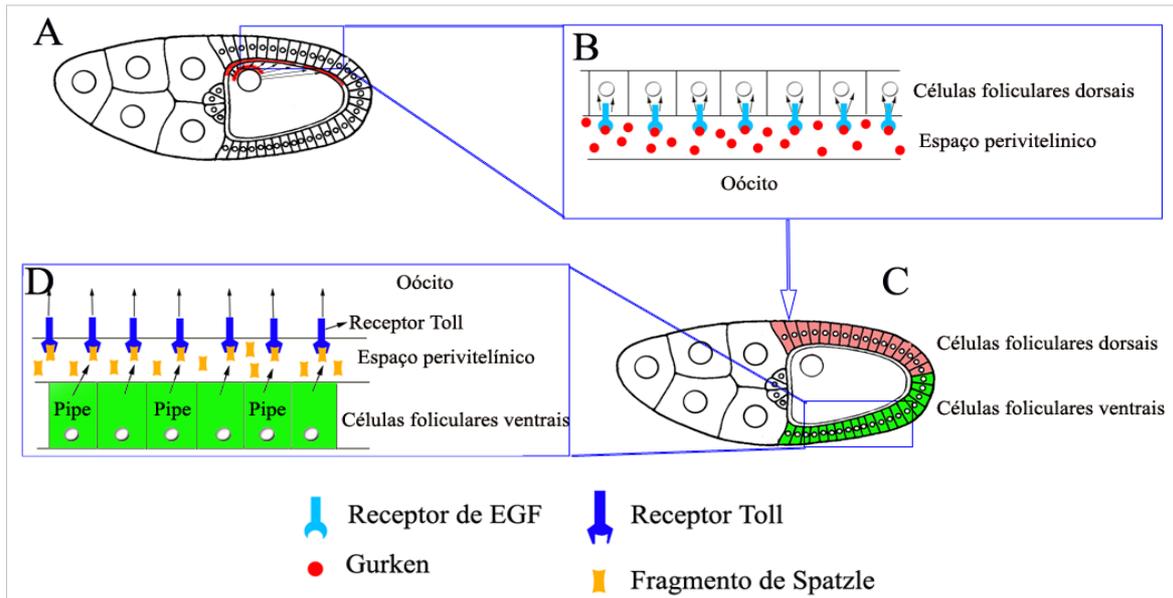


Figura 2: Início da formação da polaridade dorso-ventral. (A) No estágio 9 o núcleo do oócito, junto com vesículas de RNAm de Gurken, sintetiza a proteína e a secreta para o espaço perivitelínico (em vermelho). (B) Gurken então se liga ao seu receptor (azul claro) nas células foliculares próximas ao núcleo do oócito. (C) A ativação da via de EGFR nestas células foliculares induz o destino dorsal. As células foliculares não ativadas por Gurken tornam-se ventrais por “default”. (D) Estas células iniciam a produção de um sinal ventral, fragmento de Spatzle (amarelo), por meio de uma cascata extracelular, culminando na ativação do receptor de Toll (azul) no embrião, após a fertilização.

1.3.1. Estabelecimento dos territórios ao longo do eixo dorso-ventral embrionário.

Após a fertilização, no embrião em estágio de blastoderma sincicial, a sinalização ventral de Toll induz a degradação de Cactus (Whalen e Steward, 1993; Belvin *et al.*, 1995), uma proteína citoplasmática relacionada a $I\kappa B$ de vertebrados (Geisler *et al.*, 1992; Kidd, 1992) (fig. 3). Em todo o embrião, a proteína Cactus está complexada com Dorsal (DI), um fator de transcrição membro da família NF- κB (Steward, 1987; Blank *et al.*, 1992). Deste modo, somente na região ventral, DI é livre para translocar ao núcleo no estágio de blastoderma sincicial. Além da degradação de Cactus mediada pela sinalização de Toll há um segundo mecanismo, independente de sinal, que degrada Cactus (fig. 3) (Belvin *et al.*, 1995; Bergmann *et al.*, 1996).

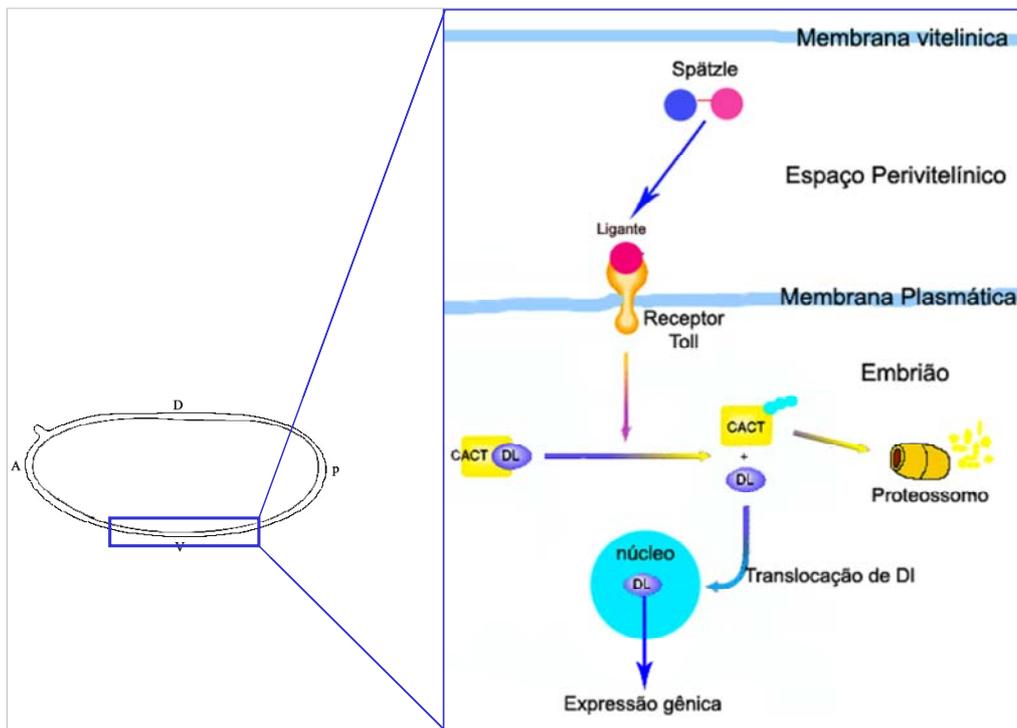


Figura 3: A via de sinalização de Toll no início da embriogênese. O fragmento de Spätzle gerado na região ventral induz a sinalização de Toll somente no início da embriogênese, após a fertilização. O sinal de Toll ocorre na região ventral e induz a degradação Cactus liberando Dorsal que por sua vez transloca ao núcleo. No núcleo, o fator de transcrição Dorsal inibe ou ativa a expressão de diversos genes zigóticos.

A degradação modulada de Cactus gera um gradiente nuclear de Dorsal na região ventro-lateral durante o estágio de blastoderma sincicial (Steward, 1989; Roth *et al.*, 1989; Rushlow *et al.*, 1989). Este gradiente especifica informações posicionais ao longo do eixo dorso-ventral pela repressão e ativação diferencial de genes zigóticos em um modo dependente de concentração (revisado por: St. Johnston e Nüsslein-Volhard, 1992; Morisato e Anderson, 1995). Assim, surgem três domínios primários de expressão de genes zigóticos ao longo do eixo dorso-ventral do embrião (fig. 4) (Rusch e Levine, 1996; Stathopoulos e Levine, 2002). Altos níveis de Dorsal na região ventral ativam a expressão de genes, tal como *snail (sna)* (Ip *et al.*, 1992), requeridos para a diferenciação do tecido mesodérmico. Baixos níveis de Dorsal na região lateral ativam genes neuroectodermiais tais como *short gastrulation (sog)* e *ventral nervous defective*

(*vnd*) (Kosman *et al.*, 1991; François *et al.*, 1994), que direcionam a formação do ectoderma neural. A ausência de Dl na região dorsal ativa a expressão dos genes *decapentaplegic (dpp)*, *tolloid (tld)*, *twisted gastrulation (tsg)*, *tok (tolkin)* (Ray *et al.*, 1991; Shimell *et al.*, 1991; Mason *et al.*, 1994) requeridos para a formação do ectoderma dorsal e amnioserosa.

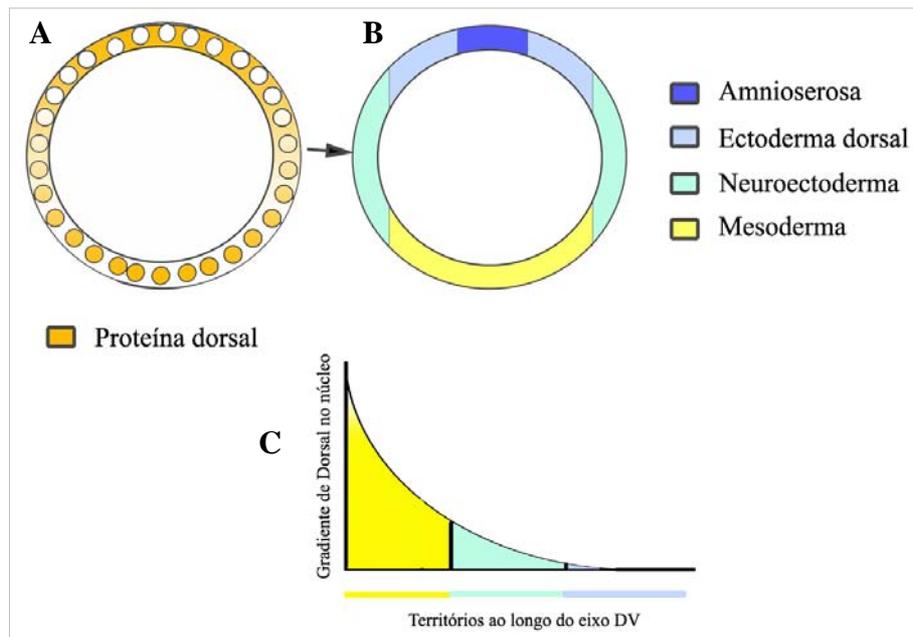


Figura 4: O gradiente de Dorsal é iniciado quando a via de Toll é ativada na região ventral do embrião, no início da embriogênese. (A) Esquema de um corte transversal de um embrião, no estágio de blastoderma sincicial. Após a sinalização de Toll, na região ventral altos níveis de Dorsal nuclear são encontrados, baixos níveis na região lateral e ausente em núcleos na região dorsal. (B) Este gradiente forma os três territórios dorso-ventrais de expressão de genes zigóticos: Ventral (mesoderma), lateral (neuroectoderma) e dorsal (ectoderma não neural). Na região dorsal, dois domínios são especificados posteriormente: amnioserosa e ectoderma dorsal. (C) Gráfico com gradiente de Dorsal versus a localização dos territórios formados. O lado dorsal está para cima e ventral para baixo.

1.4. Genes maternos versus genes zigóticos.

Durante a oogênese vários genes são expressos com funções no estabelecimento dos eixos corporais. Estes genes possuem funções maternas, isto é, são genes expressos pelas células foliculares em que as proteínas podem ser secretadas no espaço

perivitelinico ou genes expressos pelas células nutridoras e entregues em forma de RNA ou proteína para o interior do oócito. Os genes maternos que estabelecem a formação do eixo dorso-ventral possuem funções no estabelecimento do gradiente de nuclear de Dorsal ao longo do eixo dorso-ventral, no início da embriogênese. Por exemplo: *grk*, *pip*, *toll*, *dorsal* e *cactus*. Os genes zigóticos são expressos após o estabelecimento dos eixos corporais. Após a formação do gradiente nuclear de Dorsal vários genes zigóticos iniciam suas expressões em resposta ao gradiente de Dorsal. Estes genes zigóticos não possuem funções na formação do gradiente nuclear de Dorsal, mas possuem atividades na manutenção dos territórios dorso-ventrais ao longo da embriogênese. É interessante que alguns genes podem ter funções maternas e zigóticas, entretanto suas funções estão correlacionadas com a suas expressões em diferentes momentos, na oogênese ou na embriogênese após a formação do gradiente de Dorsal. Exemplos destes genes são *sog* e *dpp* que falaremos mais adiante.

1.5. Regulação da atividade de Dpp zigótico através das atividades de Sog, Tld e Tsg zigóticos.

Em *D. melanogaster*, o morfógeno Dpp é codificado pelo gene *dpp* (*decapentaplegic*) (Padgett *et al.*, 1987) que expressa uma proteína secretada membro da família BMP (Bone Morphogenetic Protein), que pertence à superfamília TGF- β (revisado por: Massagué, 1998). Dpp é um ortólogo funcional de BMP-2/4 de vertebrados (Padgett *et al.*, 1993; Sampath *et al.*, 1993). Outros BMPs em *D. melanogaster* são codificadas pelos genes *screw* (*scw*) (Arora *et al.*, 1994) e *glass bottom boat* (*gbb*) (Wharton *et al.*, 1991). A sinalização de BMPs em *D. melanogaster* é realizada através de receptores heterodiméricos formados pelos receptores cinases tipo I, codificados pelos genes *thick veins* (*tkv*) e *saxophone* (*sax*), e tipo II codificado pelo

gene *punt* (*put*) (Brummel *et al.*, 1994; Nellen *et al.*, 1994; Penton *et al.*, 1994; Letsou *et al.*, 1995; Ruberte *et al.*, 1995).

A atividade Dpp zigótico pode ser modulada através de seu antagonista Sog. O gene *short gastrulation* (*sog*) (François *et al.*, 1994) codifica uma proteína secretada, ortóloga funcional da proteína Chordin em vertebrados (Schmidt *et al.*, 1995; François e Bier, 1995). A proteína Sog possui quatro domínios conservados ricos em cisteínas (CRs) (fig. 6A). A função mais bem estabelecida de Sog é de antagonizar a atividade de Dpp, durante a embriogênese e no desenvolvimento das asas (Biehs *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996), por meio de interação direta com Dpp, não permitindo sua ligação a receptores alvo.

A atividade de Sog zigótico, durante a embriogênese e no desenvolvimento das asas, é por sua vez regulada por duas moléculas extracelulares. O primeiro regulador é a metaloprotease extracelular Tolloid (Tld). Tld pertence à família astacina de metaloproteases e possui o homólogo BMP-1 em *Xenopus laevis* (Shimell *et al.*, 1991). A função pressuposta de Tld é clivar Sog liberando Dpp para ligar a seus receptores alvo (Marques *et al.*, 1997). O segundo regulador é a proteína extracelular Twisted gastrulation (Tsg), a qual possui homólogos em vários vertebrados (Mason *et al.*, 1994; Oelgeschläger *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2001). A proteína Tsg aumenta a afinidade de ligação de Sog a Dpp (Ross *et al.*, 2001) e também modula a atividade de Tld ao clivar Sog (Marques *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2000; Shimi e O'Connor, 2003). Existe uma segunda metaloprotease semelhante a Tld expressa pelo gene *tolkin* (*tok*), ou denominado também de *tlr* (*tolloid-related 1*) (Nguyen *et al.*, 1994; Finelli *et al.*, 1995). Apesar da função biológica de Tok durante a embriogênese não estar definida, durante o desenvolvimento da asa de *D. melanogaster*, Tok também

processa Sog. A metaloprotease Tok processa Sog nos mesmos sítios em que Tld atua, porém possuem diferenças catalíticas (Serpe *et al.*, 2005).

No início da embriogênese, um gradiente de concentração extracelular do dímero Dpp/Scw zigóticos é estabelecido com altos níveis na linha média dorsal e baixos níveis na região dorso-lateral. Neste estágio, Dpp zigótico é expresso homogeneamente na região dorsal, enquanto que Sog na região lateral. A formação do gradiente de Dpp pode ser explicada através da formação do complexo Sog/Tsg/Dpp/Scw e a ação de Tld zigóticos sobre Sog neste complexo. Na região dorso-lateral, perto da fonte de síntese de Sog, este complexo é formado (Fig. 5C). Na região mais dorsal, longe da fonte de produção de Sog, Tld é estimulado a clivar Sog no complexo, liberando Dpp/Scw para ligar a seus receptores (Fig. 5D). Este mecanismo promoveria, através de um mecanismo cíclico de formação do complexo e degradação de Sog neste, o transporte de Dpp em direção à região mais dorsal do embrião (Holley *et al.*, 1996; Marques *et al.*, 1997; Decotto e Ferguson, 2001 e Ross *et al.*, 2001; Shimmi *et al.*, 2005). Deste modo, um gradiente de concentração de Dpp/Scw zigóticos é formado com pico de sua atividade na região mais dorsal (fig. 5A) (revisado por: Harland, 2001; Ashe, 2002).

Durante o desenvolvimento das asas, a distribuição de Dpp também é regulada através da atividade de Sog, Tsg e Tld, sinalizando para o correto posicionamento das veias da asa (Yu *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2000; Araujo *et al.*, 2003; Serpe, 2005).

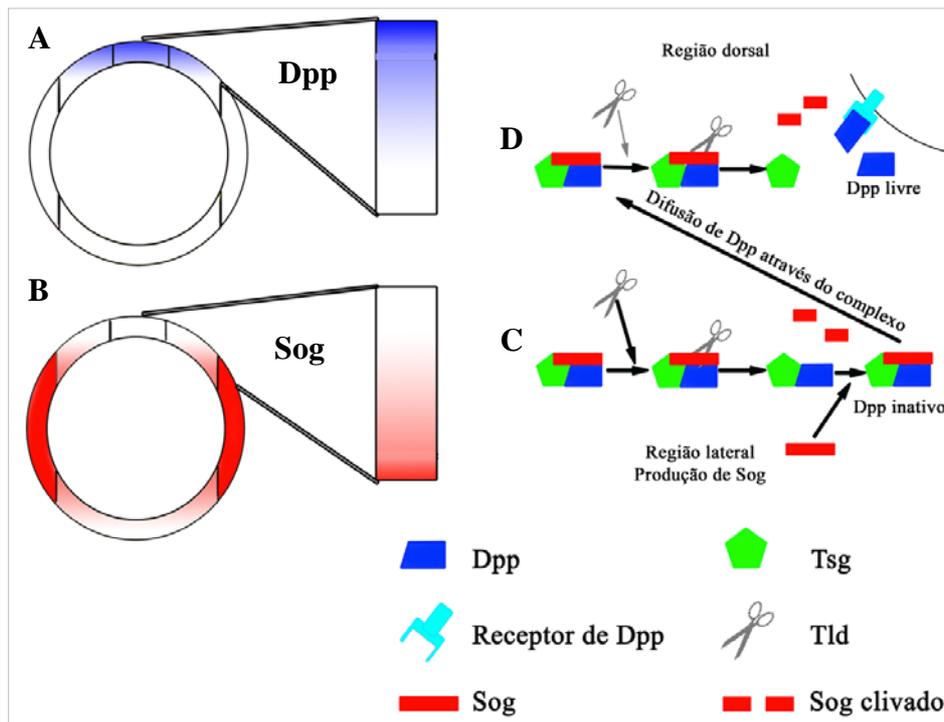


Figura 5: Esquema mostrando a distribuição de Dpp zigótico, na região dorsal do embrião, através da formação do complexo Dpp/Tsg/Sog, durante a embriogênese. A proteína Scw foi retirada para facilitar a visualização. (A) Azul indica um gradiente de Dpp zigótico formado na região dorsal e (B) Sog zigótico em vermelho, um gradiente oposto (Srinivasan *et al.*, 2001). Estes gradientes são estabelecidos a partir da formação do complexo trimérico (C) na região dorso-lateral. Nesta região, próxima ao local de síntese de Sog, Sog degradado por Tld é repostado por novas moléculas. Novos complexos são formados direcionando a difusão deste para região dorsal. Neste complexo Dpp é inativo não podendo se ligar a seus receptores. Na região mais dorsal, longe da produção de Sog, a molécula de Sog no complexo não é mais repostada quando degradada por Tld (D). Deste modo, o complexo é desfeito e Dpp é liberado para se ligar a seus receptores. Através deste mecanismo, forma-se gradientes de Dpp e Sog opostos na região dorsal. Na região mais dorsal, altos níveis de Dpp formam a amnioserosa e baixos níveis na região dorso-lateral direcionam a formação do ectoderma dorsal. Esquema baseado em Harland, 2001.

As relações antagônicas entre Sog e Dpp zigóticos, durante a embriogênese, em *D. melanogaster* foram conservados ao longo da escala evolutiva (Holley *et al.*, 1995; Schimidt *et al.*, 1995; Bier, 1997). Nos vertebrados, Chordin e BMPs interagem antagonisticamente para padronizar o eixo dorso-ventral (Hemmati-Brivanlou e Melton, 1997; Sasai e De Robertis, 1997). Apesar da inversão do eixo dorso-ventral ocorrida entre vertebrados e invertebrados (De Robertis e Sasai, 1996), tanto em vertebrados

como em invertebrados Sog/Chordin são expressos no domínio neurogênico e Dpp/BMP-4/2 no domínio não neural.

1.6. O processamento de Sog produz fragmentos com atividades distintas durante o desenvolvimento de *D.melanogaster*.

Estudos bioquímicos revelaram que a proteína Sog é clivado pela metaloprotease Tld em fragmentos de baixo peso molecular (fig. 6B), sendo que esta atividade de Tld depende da interação entre as moléculas de Sog e Dpp e é modificada por Tsg (Marques *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2000; Shimmi e O'Connor, 2003). A produção destes fragmentos é regulada durante o desenvolvimento: formas processadas de diferentes pesos moleculares são encontradas entre os tecidos que expressam Sog, durante a embriogênese e na formação das asas (Marques *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2000). Estes fragmentos podem apresentar distintas atividades. Estudos genéticos, mostram que durante o desenvolvimento das asas, a forma clivada de Sog denominada de Supersog, a qual contém o primeiro domínio CR1 e uma parte da região entre CR1 e CR2, possui uma atividade mais ampla que Sog em antagonizar BMPs (Marques *et al.*, 1997). Outros fragmentos de Sog deletados nos domínios CR4 ou CR3 e CR4 apresentam distintas atividades durante a embriogênese e desenvolvimento das asas. Fragmentos de Sog com o domínios CR1, CR2 ou CR3 deletados apresentam uma atividade sinérgica à sinalização por BMP, no desenvolvimento das asas. Por outro lado fragmentos com os domínios CR1, CR2 ou CR3 deletados apresentam atividades antagônicas, à semelhança de Sog (Yu *et al.*, 2004).

A atividade de Tld pode ser modulada por Tsg e estimulada por Dpp alterando o padrão de processamento e produzindo fragmentos diferentes (fig. 6B), mostrados em estudos bioquímicos e genéticos (Yu *et al.*, 2000; Shimmi e O'Connor *et al.*, 2003; Yu

et al., 2004). Deste modo, o processamento de Sog durante o desenvolvimento de *D. melanogaster* pode ser regulado e as atividades dos fragmentos de Sog podem consequentemente modular a atividade de BMPs.

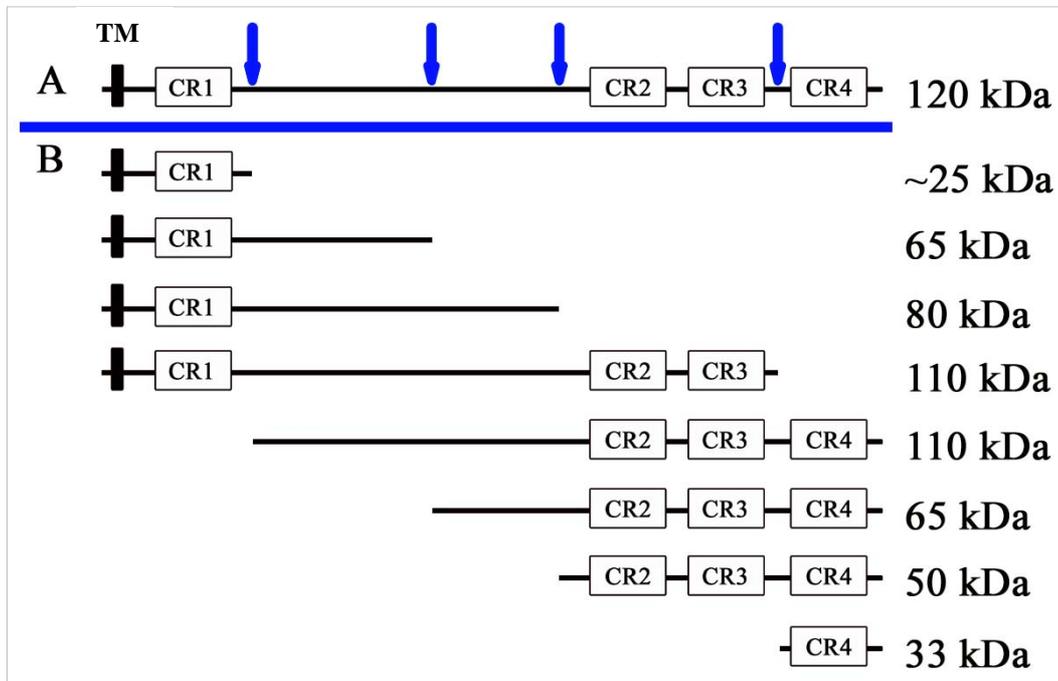


Figura 6: Estrutura da proteína Sog. (A) Os domínios CR e a sequência transmembrana (TM). Sog é clivado por Tld em quatro sítios (setas azuis). O segundo sítio de clivagem é utilizado somente quando Tsg está presente na reação com Sog e Tld (Shimmi e O'Connor, 2003). (B) Formas de Sog resultantes de reações *in vitro*. Estas formas são similares àquelas produzidas *in vivo*. Este esquema é baseado em: Shimmi e O'Connor, 2003; Marques *et al.*, 1997 e Yu *et al.*, 2000.

1.7. As atividades maternas de Sog e Dpp durante a formação do eixo dorso-ventral.

Durante a oogênese, o gene *dpp* é expresso por células foliculares anteriores adjacentes ao oócito nos estágios de 8 a 10 da oogênese (Twombly *et al.*, 1996 e Araujo e Bier, 2000). *sog* é expresso inicialmente no estágio 9 da oogênese em um amplo domínio de células foliculares que migram sobre o oócito, vindo a restringir-se, durante o estágio 10B, a um conjunto de células foliculares ântero-ventrais ao oócito, conforme determinado por hibridização *in situ* (Araujo e Bier, 2000).

Na oogênese, Sog e Dpp maternas funcionam antagonisticamente definindo a localização dos domínios dorso-ventral do embrião, por modificar o gradiente de Dl. Foi sugerido que o mecanismo pelo qual a sinalização Dpp reduz a translocação de Dl é através da inibição da via independente de sinal de degradação de Cactus (fig. 7) (Araujo and Bier, 2000). Como a via de Dpp materna tem função oposta na regulação da translocação de Dorsal em relação a via de Toll, é sugerido que a via de Dpp materna ocorra com pico de atividade na região dorsal. Esta sinalização de Dpp materna pode ocorrer em paralelo a via de Toll, portanto após a fertilização (Araujo and Bier, 2000). Desta forma, seria necessário a permanência de Dpp, secretado para o espaço perivitelínico pelas células foliculares, da oogênese até o início da embriogênese, sendo o mesmo válido para a proteína Sog materna.

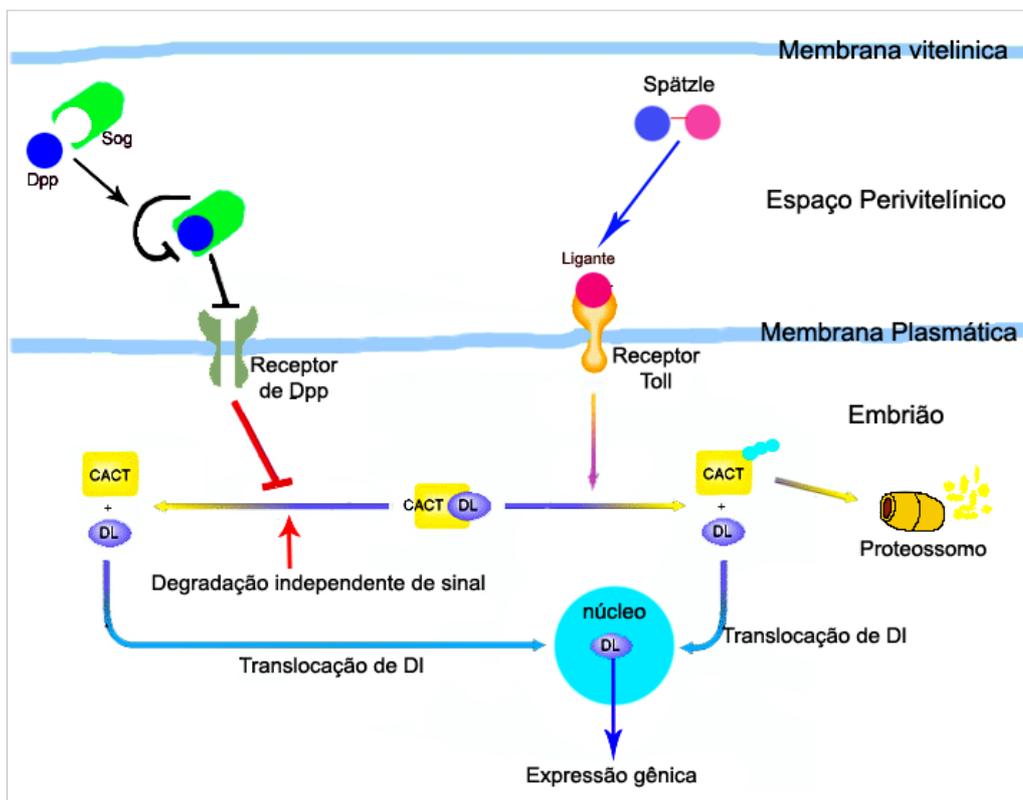


Figura 7: Esquema de sinalização das vias de Dpp e Toll. No início da embriogênese, a via de Toll é ativada pelo ligante de Spätzle. O receptor Toll envia um sinal ao recém embrião que culmina na ubiquitinação e degradação da proteína Cactus. Desta forma, a proteína Dorsal é livre para translocar ao núcleo. A via de sinalização de Dpp age provavelmente em paralelo à via de Toll. A via de Dpp degrada Cactus supostamente através da via independente de sinal.

Além da função em padronizar o eixo dorso-ventral embrionário, a proteína Dpp também especifica estruturas ântero-dorsais do córion. Na verdade, vias de Dpp e EGFR se interceptam para especificar e posicionar os apêndices dorsais e o opérculo na região dorsal do córion (Twombly *et al*, 1996; Peri e Roth, 2000). Sog também afeta a padronização dessas estruturas, desde que a sua superexpressão ou redução gera defeitos nos apêndices dorsais e no opérculo (Araujo e Bier, 2000). As funções de Sog e Dpp em padronizar estruturas anteriores do córion é independente da função em determinar o eixo dorso-ventral do embrião (Araujo e Bier, 2000). Ou seja, suas ações sobre a padronização do eixo dorso-ventral embrionário não é um efeito secundário de uma modificação da polaridade do folículo ovariano.

A função pressuposta de Sog maternal é impedir que Dpp se ligue a seus receptores na membrana plasmática do oócito. Assim, o balanço entre as atividades antagônicas de Sog e Dpp maternas podem contribuir para a formação dos três territórios dorso-ventrais do embrião. Para isto, pressupõe-se que a atividade da sinalização de Dpp maternal seja assimétrica. Resultados do grupo (Carneiro, Fontenele *et al.*, no prelo - Anexo A) mostram que as metaloproteases Tld e Tok são expressas nas células foliculares ventrais durante a oogênese. Além disto, é apresentado também que possa existir maior quantidade de fragmentos de Sog maternal com o domínio CR1 na região ventro anterior do oócito, no espaço perivitelinico (Carneiro, Fontenele *et al.*, no prelo - Anexo A). Isto inicia a possibilidade que formas de Sog maternal processadas durante a oogênese possa contribuir com distintas atividades na modulação da atividade de Dpp maternal. A formação de um gradiente de atividade de fragmentos de Sog ao longo do eixo dorso-ventral, durante a oogênese, poderia desta forma determinar a assimetria na atividade de Dpp percebida tanto no folículo ovariano quanto nos embriões resultantes.

A atividade de Tld pode ser modulada por Tsg e estimulada por Dpp alterando o padrão de processamento e produzindo fragmentos diferentes, mostrados em estudos bioquímicos e genéticos. Deste modo, o processamento de Sog pode também ser modulado por Tsg durante a oogênese, produzindo diferentes fragmentos com atividades que podem modular um gradiente assimétrico de Dpp na oogênese.

De acordo com estas hipóteses, nos analisaremos se existem fragmentos de Sog maternos e se estes podem permanecer até o início da embriogênese. Analisaremos se estes fragmentos podem ter atividades na modulação de Dpp maternal. Avaliaremos as atividades das metaloproteases maternas, assim como a atividade de Tsg. Entretanto primeiramente analisaremos se Tsg pode ser expresso nas células foliculares. Utilizaremos as estruturas dorso-anteriores do córion, como os apêndices dorsais e o opérculo, e o eixo dorso-ventral, com o uso de marcadores dos territórios DV, para avaliar as atividades de Sog, Tld, Tok, e Tsg. Nestes experimentos utilizaremos duas estratégias para análise de atividades: gerar populações de células foliculares que não expressam *tok*, *tsg* e *sog*, assim como, também superexpressaremos estes genes nas células foliculares. Utilizaremos técnicas de “*western blotting*”, hibridização *in situ* e de visualização de córion para avaliar as atividades destas moléculas.

II. Objetivos

2.1. Geral

Neste trabalho estamos interessados em analisar o papel de Sog maternal na formação do córion e do eixo dorso-ventral embrionário, estabelecendo a contribuição de suas diferentes atividades. Buscamos correlacionar as diferentes atividades detectadas com o padrão de fragmentos gerados pela proteólise. Além disto, analisaremos se as metaloproteases Tld, Tok e a proteína Tsg tem potencial impacto na geração e modulação das atividades de fragmentos de Sog e consequentemente na padronização do córion e do eixo dorso-ventral do embrião de *Drosophila melanogaster*.

2.2. Específicos

A) Caracterizar o padrão de fragmentos da proteína Sog produzidos durante a oogênese.

B) Analisar se a proteína Sog e os fragmentos gerados durante a oogênese podem permanecer no espaço perivitelínico até o início da embriogênese.

C) Avaliar a atividade de diferentes fragmentos de Sog sobre a padronização do córion e do embrião.

D) Avaliar as atividades das metaloproteases e da proteína Tsg na formação do córion e do eixo dorso-ventral do embrião.

E) Correlacionar os efeitos embrionários e coriônicos obtidos através de clones de células foliculares que não expressam *sog*, metaloproteases e da proteína Tsg com a modulação da atividade de Dpp maternal.

III. Material e métodos

3.1. Linhagens de *Drosophila melanogaster* utilizadas nos experimentos.

As linhagens utilizadas nos experimentos estão descritas abaixo. A maioria destas linhagens contém marcadores fenotípicos. Estes marcadores facilitam o rastreamento de cromossomos com o alelo mutante em estudo. Estas linhagens são obtidas no Bloomington Drosophila Stock Center, <http://fly.bio.indiana.edu>, com exceção das linhagens UAS que foram cedidas pelo Dr. Ethan Bier da Universidade da Califórnia, San Diego – EUA e a linhagem *dec-1* que foi dada pela Dr. Trudi Schupbach, de Universidade de Princeton, New Jersey - EUA. Todos os outros alelos mutantes estão descritos na base de dados do genoma de *Drosophila* - (Flybase. A Database of the Drosophila Genome, <http://www.flybase.org/>) e em Lindsley e Zimm, 1992.

Tabela 1: Linhagens de *D. melanogaster* utilizadas nos experimentos.

Linhagem (Genótipo)	Informações sobre a linhagem	Origem
CS (Canton Special)	Linhagem selvagem.	Bloomington.
<i>sog</i> ^{u2} FRT18E/FM7a	<i>sog</i> ^{u2} é um alelo recessivo; perda de função; letal em homozigose.	Bloomington, alelo gerado por (François <i>et al.</i> , 1994)
<i>Sog</i> ^{U2} <i>dec-1</i> ^{VA28} FRT18E/FM7a	Linhagem construída no laboratório com alelos nulos de <i>sog</i> e <i>dec-1</i> no mesmo cromossomo X. <i>dec-1</i> ^{VA28} é um alelo recessivo; perda de função. Em homozigose as fêmeas são estéreis.	Linhagem construída no laboratório*.
<i>tsg</i> ⁴ FRT18E/FM7a	<i>tsg</i> ⁴ é um alelo recessivo; perda de função; letal em homozigose.	Alelo de <i>tsg</i> oriundo de Bloomington. Linhagem com FRT construída no laboratório*.
<i>tok</i> ^{A2-41} FRT82B/ TM3 <i>Sb</i> ¹	<i>tok</i> é um alelo recessivo; perda de função; letal em homozigose.	Bloomington, alelo de <i>tok</i> gerado por Nguyen <i>et al.</i> , 1994. Linhagem com FRT construída no laboratório*.

w ⁻ FRT18E ubi- <i>gfp.nls</i> ; <i>gal4-e22c</i> , UAS- <i>flp</i> /CyO	Linhagem que expressa GAL4 nos precursores das células foliculares para a geração de clones. A flipase está orientada pelo promotor UAS. A construção de GFP é expressa ubiquitadamente e possui um sinal de localização nuclear. A sequência FRT está localizada no cromossomo X.	Linhagem construída no laboratório*.
<i>gal4-e22c</i> , UAS- <i>flp</i> /CyO; FRT82B ubi- <i>gfp.nls</i>	Linhagem que expressa GAL4 nos precursores das células foliculares para a geração de clones. A flipase está orientada pelo promotor UAS. A construção de GFP é expressa ubiquitadamente e possui um sinal de localização nuclear. A sequência FRT está localizada no braço direito do segundo cromossomo.	Linhagem construída no laboratório*.
CY2-GAL4	Linhagem que expressa <i>gal4</i> nas células foliculares que recobrem o oócito.	Bloomington, gerado por Queenan <i>et al.</i> , 1997.
E4-GAL4	Linhagem que expressa <i>gal4</i> nas células foliculares posteriores e anteriores que recobrem o oócito.	Bloomington, gerado por Queenan <i>et al.</i> , 1997.
55B-GAL4	Linhagem que expressa <i>gal4</i> nas células foliculares anteriores que recobrem o oócito.	Bloomington, gerado por Brand e Perrimon, 1993.
8UAS- <i>sog</i>	Linhagem que possui oito cópias de uma construção contendo a sequência codificante de Sog que está sob direção do promotor UAS.	Gerado no laboratório de Ethan Bier (Universidade de Califórnia – EUA).

UAS-CR1,2	Linhagem que possui uma construção com a sequência parcial de Sog tendo os domínios CR3 e CR4 deletados, sob direção do promotor UAS.	Gerado no laboratório de Ethan Bier (Universidade de Califórnia – EUA).
UAS- Δ CR1,2	Linhagem que possui a construção de Sog onde os domínios CR1, 2 e a região espaçadora são deletadas, contendo apenas os dominios CR3 e 4 sob direção do promotor UAS.	Gerado no laboratório de Ethan Bier (Universidade de Califórnia – EUA).
UAS- Δ CR1,stem	Linhagem que possui a construção de Sog onde o domínio CR1 e a região espaçadora são deletadas, contendo apenas os dominios CR2, 3 e 4 sob direção do promotor UAS.	Gerado no laboratório de Ethan Bier (Universidade de Califórnia – EUA).
UAS-SS1	Linhagem que possui a construção de Sog onde apenas o domínio CR1 e uma pequena região espaçadora são mantidas. Esta construção se assemelha a forma de Sog denominada de Supersog1 (SS1).	Gerado no laboratório de Ethan Bier (Universidade de Califórnia – EUA).
UAS- Δ CR4 + UAS-SS1	Linhagem que possui uma construção de UAS-Sog com o domínio CR4 deletado mais a construção UAS-SS1.	Gerado no laboratório de Ethan Bier (Universidade de Califórnia – EUA).
2UAS-SS4; 4UAS-SS4/TM3 Sb ¹	Linhagem que possui 6 inserções de uma construção de UAS-Sog somente com o domínio CR1 e uma parte (maior que a construção de SS1) da região entre CR1 e CR2, sob direção do promotor UAS.	Gerado no laboratório de Ethan Bier (Universidade de Califórnia – EUA).

UAS- <i>tld</i> ; UAS- <i>tsg</i> /CyO	Linhagem que possui uma construção com a região codificante de Tld e outro de Tsg, sob direção do promotor UAS.	Gerado no laboratório de Ethan Bier (Universidade de Califórnia – EUA).
UAS- <i>tsg</i> /CyO	Linhagem com uma construção contendo a região codificante de Tsg, sob direção do promotor UAS.	Gerado no laboratório de Ethan Bier (Universidade de Califórnia – EUA).
UAS- <i>tld</i> /FM7c	Linhagem com uma construção contendo a região codificante de Tld, sob direção do promotor UAS.	Gerado no laboratório de Ethan Bier (Universidade de Califórnia – EUA).
UAS-DppGFP	Linhagem com uma construção contendo a região codificante de Dpp fusionada a GFP, sob orientação do promotor UAS.	Bloomington, gerado por Entchev <i>et al.</i> , 2000.

* Estas linhagens foram construídas a partir de linhagens originais obtidas no Bloomington. Algumas linhagens construídas tiveram que ser recombinadas para ter o gene de interesse e a sequência FRT no mesmo braço do cromossomo. A recombinação requer vários cruzamentos e seleção de linhagens recombinantes a partir de fenótipos marcadores ou através de meio com antibiótico. Todas as linhagens construídas foram testadas antes de serem utilizadas nos experimentos.

3.2. Cromossomos balanceadores.

Realizamos vários cruzamentos para obter fêmeas que podem modificar a contribuição maternal de Sog, Tok, Tld e Tsg, na formação do eixo dorso-ventral. Para a geração destas fêmeas é necessária a realização de cruzamentos que necessitam de balanceadores. Estes também foram utilizados para podermos recombinar genes necessários para os diversos experimentos.

Os balanceadores são cromossomos que possuem inversões e são utilizados para suprimir a recombinação meiótica. A maioria dos balanceadores são letais em homozigose, e possuem marcadores fenotípicos visíveis que permitem distinguir genótipos da F1 ou F2 de um cruzamento, e assim selecionar as moscas com o genótipo de interesse. Os cromossomos balanceadores tem por função impedir que mutações localizadas em cromossomos homólogos aos balanceadores sejam “perdidas” durante as gerações por meio de recombinação meiótica. Além disto, muitas das mutações são letais em homozigose e os balanceadores sendo também letais impedem a perda destas mutações, sempre mantendo a linhagem em heterozigose (gene letal/balanceador), ou seja, a mutação torna-se balanceada. Outros detalhes sobre estes balanceadores podem ser encontrados em (Lindsley e Zimm, 1992) ou na página de internet do Flybase (Flybase stocks, <http://flystocks.bio.indiana.edu/browse.htm>).

Os balanceadores utilizados nas linhagens dos experimentos são:

a) No cromossomo I as linhagens podem ser balanceadas com os cromossomos FM7a ou FM7c. Estes balanceadores são letais em homozigose e possuem marcadores de cor do corpo como *y* (*yellow*), formato dos olhos como *B* (*Bar*), cor dos olhos, como *w* (*white*), *v* (*vermilion*), *g* (*garnet*) ou de cerdas e pêlos como *sn* (*singed*) e *f* (*forked*).

b) No cromossomo II as linhagens são balanceadas com *CyO*. Este balanceador também é letal em homozigose, tendo como marcador fenotípico uma mutação dominante do gene *Cy* (*Curly*) que torna as asas curvas.

c) No cromossomo III as linhagens são balanceadas com *TM3 Sb¹*, *TM6β Tb¹* ou *TM3β Ser*. Estes balanceadores possuem marcadores de cerdas dorsais torácicas curtas (*Sb¹* - *Stubble*), larvas e moscas adultas curtas (*Tb¹* - *Tubby*), ou com tufo anormais de cerdas na região dorso-torácica (*Hu* - *humeral*) ou perda da extremidade posterior das asas (*Ser¹* - *Serrate*).

3.3. Manipulação das linhagens de *Drosophila melanogaster*.

3.3.1. Meio de cultura.

Componentes	Volume
Água destilada	4200 mL
Melado	300 mL
Ágar	44 g
Fubá de milho	300 mL
Fermento biológico seco	124 g
p-hidroxibenzoato de metila 10% em Álcool etílico absoluto (Tegosept)	67 mL
Ácido Propiônico	24 mL

O melado é dissolvido em água destilada, sob aquecimento, até se obter uma mistura homogênea. O fubá é adicionado, misturando até dissolver-se e depois adiciona-se o extrato de levedura. Quando o meio estiver prestes a ferver, adiciona-se o ágar sob agitação. O meio é então fervido por 10 minutos. Após o cozimento, o tegosept e o ácido propiônico são adicionados. O meio é distribuído em frascos/garrafas que são tampados com algodão. Os frascos/garrafas são armazenados a 4 °C por uma semana (Adaptado de Ashburner, 1989).

3.3.2. Meio para oviposição.

Componentes	Volume
Água destilada	135,25 mL
Suco de uva sem aditivos	88,75 mL
Ágar	6,25 g
Álcool etílico 95%	1,86 mL
Ácido acético glacial	1,78 mL
Água destilada para resfriar o meio	50 mL

O ágar é dissolvido em água destilada e suco de uva sob aquecimento. Então, adiciona-se o álcool etílico 95% e o ácido acético. O meio é distribuído nas placas de coleta. O meio não usado e as placas de coletas com meio são armazenados a 4 °C até o uso (Adaptado de Ashburner, 1989).

3.3.3. Manutenção das linhagens.

Os estoques das linhagens do laboratório são mantidos em frascos com meio de cultura, à temperatura de 18 °C, sendo repicados a cada 20 dias. As linhagens em uso nos experimentos são mantidas em frascos ou garrafas a 25 °C ou a 22 °C e repicadas a cada 15 dias.

3.3.4. Coleta de fêmeas virgens.

As fêmeas virgens são coletadas a intervalos de 4 horas após o início da eclosão das pupas. A coleta ocorre ao longo de 5 dias, após este período, as fêmeas são cruzadas com machos numa proporção de três fêmeas para um macho. Após 5 dias, as moscas deste cruzamento são transferidas para um novo frasco/garrafa, com o objetivo de aumentar a prole. As fêmeas de interesse da F1 ou F2 resultante são selecionadas

através do uso de marcadores fenotípicos. A coleta destas fêmeas é realizada conforme o mesmo procedimento aplicado às primeiras.

3.3.5. Coleta de embriões e ovários.

Para a análise dos embriões ou de ovários, as fêmeas mutantes são cruzadas com machos selvagens em coletores plásticos. Nestes coletores, na placa de coleta com o meio de oviposição é adicionada uma mistura contendo levedura e água. A coleta de embriões é realizada a 25 °C, com intervalo de 4 horas para experimentos de hibridização *in situ* ou 2 horas para a preparação de extrato proteico para eletroforese (veja abaixo). Os intervalos de coletas são necessários para obter embriões na idade ideal (0-4 h) para análise em *in situ* de genes zigóticos ou para obter embriões que ainda não expressam genes zigóticos (0-2 h).

A coleta de ovários é realizada após dois ou três dias de cruzamentos. As fêmeas são coletadas e os ovários são dissecados em tampão PBS gelado (NaCl 1,3 M, Na₂HPO₄ 0,07 M e NaH₂PO₄ 0,03 M). Os ovários coletados são então tratados de acordo com experimentos a serem realizados.

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e imunotransferência.

3.4.1. Preparação de extratos proteicos.

Os embriões coletados de 0-2 h ou 2-5 h são decorionados e lavados com TXN (0,04% Triton X-100 e 0,7% NaCl) e, em seguida com PBS. Os ovários são coletados em PBS. Então, os embriões ou ovários são transferidos para tubo de 1,5 mL contendo 200 µL tampão de lise gelado (20 mM Tris 8,1, 150 mM de NaCl, 1mM de MgCl₂, 1 mM de CaCl₂, 0,5% NP40 e 0,02% NaN₃) com o coquetel de inibidor de proteases Complete (Roche) e 100mM PMSF (inibidor de proteases). Aproximadamente 200 embriões são macerados no tampão no gelo, com auxílio de um pistão. Após a maceração é adicionado o tampão de amostra (SB: 50 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 0,1% Bromophenol e 10% glicerol) e 100 mM DTT. As amostras são incubadas a 100 °C por 8 minutos e centrifugadas, para descartar os debris. Então, o sobrenadante é condicionado a -20 °C, até o uso.

3.4.2. Western blotting.

As amostras previamente preparadas são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10% no tampão de corrida (25 mM Tris, 250mM glicina e 0,1% SDS) com corrente constante de 30 mA. As amostras separadas no gel são transferidas para membrana de PVDF (Millipore) em voltagem constante de 80 V, com o tampão de transferência (25 mM Tris, 250mM glicina, 0,1% SDS e 20% de metanol). Após a transferência, a membrana é lavada em PBT e depois incubada em BSA 1,5% para bloquear ligações inespecíficas. A membrana é incubada com anticorpo primário policlonal, feito em camundongo, anti-Sog8A (1:500 - cedidos pelo Dr. Ethan Bier), por uma noite a 4 °C. Em seguida, a membrana é incubada por 1 hora com o anticorpo,

feito em cabra, anti-camundongo conjugado a peroxidase (Vector). Os complexos imunes são visualizados utilizando um sistema de quimioluminescência da Pierce (SuperSignal West Pico). A revelação é realizada em um sistema de revelação da Kodak, utilizando filme KODAK X-OMART AR para a detecção da quimioluminescência.

3.5. Hibridização *in situ*.

3.5.1. Síntese de sondas RNA antisense.

Os vetores contendo a sequência codante (cDNA) para os RNAm dos genes alvo (*vnd*, *sna* e *tsg*) são utilizados para transformar bactérias competentes. As culturas bacterianas são amplificadas em meio de cultura LB com 10 µg/mL de carbenicilina. Os plasmídeos são então extraídos e purificados, com o kit de purificação de plasmídeo da Quiagen. Para sintetizar as sondas, o DNA é linearizado com enzimas de restrição. O vetor é cortado entre o final da sequência codante e do outro promotor, o qual não é utilizado para a síntese da sonda antisense.

A síntese da sonda de RNA antisense para e a hibridização *in situ* são realizadas conforme descrito em (O'Neill e Bier, 1994; Tautz e Pfeifle, 1989). A síntese das sondas de *vnd*, *sna* e *tsg* é realizada com a RNA polimerase T3 ou T7 (Roche). A síntese é realizada a 37 °C por duas horas, utilizando na reação uma mistura de nucleotídeos com UTP ligado a digoxigenina (Roche) ou ligado a biotina (Roche), para sintetizar sondas marcadas com digoxigenina ou biotina, respectivamente. O RNA sintetizado é hidrolizado em solução alcalina de tampão carbonato (Na₂CO₃ 120 mM, NaHCO₃ 80 mM) a 65 °C por 20 minutos. A hidrólise é necessária para que se produza fragmentos de RNA marcado que penetrem com facilidade nos embriões fixados. A

sonda de RNA é precipitada e o pellet é dissolvido na Solução de Hibridização (veja abaixo) e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.2. Fixação de embriões.

Os embriões são decorionados em 50 % de água sanitária comercial por 3 minutos, e a seguir lavados em TXN. A Solução de Fixação (1,5 mL de PBS 10 mM, 200 μL de EGTA 0,5 M, 250 μL de Formaldeído 37% e 2 mL de Heptano) é então adicionada e os embriões incubados em agitação vigorosa por 25 minutos. A fase aquosa é removida e o álcool metílico absoluto é então adicionado, para remover o heptano. Os embriões em álcool metílico são agitados vigorosamente 10 vezes para retirar a membrana vitelínica do embrião. Os embriões são lavados com álcool etílico absoluto e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso.

3.5.3. Reação de hibridização *in situ*.

Após a fixação inicial (acima), os embriões são refixados e tratados com proteínase K por 8 minutos. Então, são lavados 3x a cada 5 minutos em PBT (PBS e 0,1% Tween-20). Em seguida, os embriões são refixados, com 5 % de formaldeído em PBS, por 25 minutos e pré-hibridizados em Solução de Hibridização (50% de Formamida, SSC 5x, 0,1 mg/mL de DNA de esperma de salmão, 0,05 mg/mL de heparina e 0,1% de Tween-20) por 3 horas a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a pré-hibridização as sondas são adicionadas. Sondas ligadas a digoxigenina são diluídas em 1:100 e ligadas a biotina 1:60. A hibridização é realizada por duas noites a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para dupla hibridização *in situ* na etapa de hibridização as sondas ligadas a digoxigenina e biotina são adicionadas juntas, mas a reação de revelação para digoxigenina é realizada primeiro e a seguir a de biotina:

Digoxigenina: Após a hibridização, os embriões são lavados em PBS e incubados por 1 hora com o anticorpo anti-digoxigenina, feito em camundongo, conjugado a fosfatase alcalina (Roche) e diluído a 1:2000. O substrato utilizado para a reação da fosfatase alcalina é o NBT/BCIP (Roche) com 0,4 mg/mL de NBT e 0,19 mg/ml de BCIP. A reação da fosfatase alcalina conduz à formação de um composto precipitado azul, no local da reação. A reação é interrompida lavando os embriões em álcool etílico a 95%.

Biotina: Os embriões são lavados em PDT/BSA (PBS, 0,2% BSA, 0,3% deoxicolato e 0,3% triton-X 100). Então eles são incubados por 1,5 hora com o anticorpo anti-biotina feito em camundongo (Vector ou Roche) diluído a 1:200. Em seguida, os embriões são lavados em PDT/BSA e incubados por 1 hora com o anticorpo anti-camundongo biotilado (Vector) diluído a 1:150. Os embriões são incubados com as soluções A (avidina) e B (peroxidase biotilada) do kit vectastain elite (Vector). Os embriões são lavados em PDT/BSA e em seguida com 0,12M Tris pH 7,3. O substrato utilizado é o DAB o qual é feito a partir de um tablete (Sigma) que fornece 0,7 mg/mL de DAB em solução. Então, os embriões são incubados por 15 minutos no DAB. Adiciona o peróxido de hidrogênio 30% em diluição de 1:1375 na solução com DAB. Durante a reação o DAB torna-se um composto precipitado de cor marrom, no local da reação. A reação é interrompida com lavagens sucessivas de 0,12M de Tris pH 7,3.

Os embriões são lavados sucessivamente em álcool etílico 50%, 70%, 95% e armazenados em álcool etílico absoluto até o uso. Para a preparação das lâminas, os embriões são lavados em glicerol 70% em PBT. As lâminas são vedadas com esmalte e guardadas a 4 °C. As contagens dos embriões são realizadas em microscópio ótico e fotografados utilizando contraste interferencial (DIC).

3.6. Superexpressão de genes pelo sistema UAS/GAL4.

A expressão das construções de *Sog*, *Tld* e *Tsg* é realizada utilizando o sistema de expressão dirigida UAS/GAL4 (Brand e Perrimon, 1993). Neste sistema, a sequência UAS (Upstream Activation Sequence) e GAL4 (fator de transcrição) são elementos oriundos de levedura. O fator de transcrição GAL4 se liga à sequência UAS e ativa a expressão do gene alvo sob controle desta sequência. A expressão de GAL4 depende do local de inserção no genoma de *D. melanogaster*. Por exemplo, se a inserção de *gal4* situar-se próxima de um enhancer de expressão tecido-específica, a expressão desta *gal4* responderá a este enhancer, ou seja, terá uma expressão tecido-específica. Deste modo, as construções são expressas no mesmo padrão de expressão da inserção de *gal4*.

Visando obter fêmeas que superexpressam *sog*, *tld*, *tsg* e *dpp*, no epitélio folicular dos ovários, foram realizados os cruzamentos esquematizados abaixo (fig. 8).

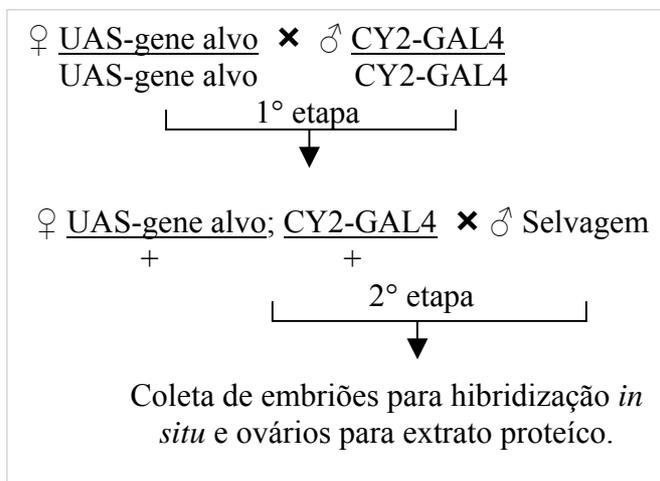


Figura 8: Esquema de cruzamento para obter fêmeas que superexpressam genes dirigidos pelo sistema UAS/GAL4. A 1º etapa do cruzamento é realizada a 25 °C, enquanto que a 2º etapa é realizada a 29 °C. O aumento da temperatura na última etapa é para elevar a expressão do fator de transcrição GAL4, conseqüentemente aumentando a expressão do gene alvo.

As linhagens de GAL4 utilizadas são CY2, E4 e 55B (tab. 01). A linhagem CY2-GAL4 expressa *gal4* em todas as células foliculares sobre o oócito (Queenan *et al.*, 1997). E4-GAL4 é expressa nas células foliculares posteriores e algumas células anteriores (Queenan *et al.*, 1997), enquanto que 55B-GAL4 é expressa nas células foliculares anteriores que estão sobre o oócito (Brand e Perrimon, 1993).

3.7. Geração de clones em células foliculares homozigotas para alelos nulos de genes de interesse.

Para analisar os efeitos da perda maternal de *sog* nos embriões, geramos fêmeas que apresentam populações de células foliculares que não expressam *sog*, *tok* ou *tsg*, denominados de clones. Utilizamos o sistema recombinação mitótica induzida GAL4/FLP/FRT (Duffy *et al.*, 1998) para obter células que não expressam o gene em estudo. Todos os componentes deste sistema são oriundos de levedura. Esta técnica permite a geração de clones com base na atividade de uma recombinase sítio-específica denominada de FLP (Flipase), que cataliza a recombinação sítio-específica na sua sequência alvo denominada de FRT (Flipase Recombination Target). A flipase está orientada por um promotor (UAS-FLP). Durante a mitose a expressão do fator de transcrição GAL4 dirige a expressão da flipase por se ligar à sequência UAS e iniciar a sua transcrição (fig. 10A). A flipase induz então a recombinação entre os cromossomos homólogos que possuem a sequência FRT (fig. 10C) (Golic, 1991). Assim, as duas células filhas terão genótipos diferentes entre si e da célula mãe (fig. 10B,D). Esta técnica permite produzir populações de células (clones) que não expressam um gene de interesse e outras populações de células que expressam o gene. O termo clone se refere a população de células que não expressam um determinado gene. Este termo é bem estabelecido em Biologia do Desenvolvimento.

A linhagem de GAL4 utilizada é GAL4-e22c, a qual expressa GAL4 no início da formação do epitélio folicular (Duffy *et al.*, 1998). Portanto, a expressão de GAL4 induz a recombinação mitótica durante o início da formação do epitélio folicular permitindo gerar clones de tamanho variável. Um esquema dos cruzamentos realizados para a geração de clones está apresentado abaixo (fig. 9).

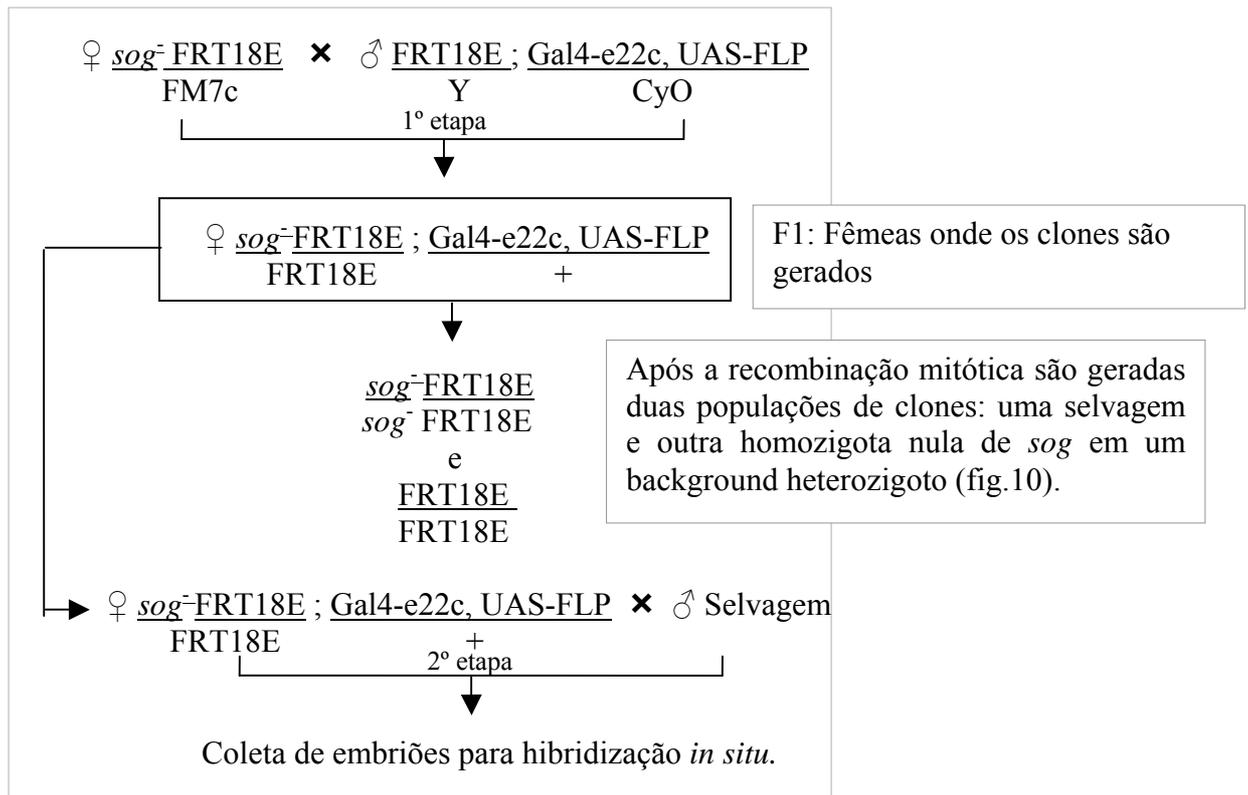


Figura 9: Etapas durante o cruzamento para obter fêmeas que geram clones de células foliculares homocigotas para um alelo nulo de *sog*. Na primeira etapa fêmeas virgens ($\text{♀ } \underline{sog^- FRT18E} / \text{FM7c}$) são cruzadas com machos ($\underline{FRT18E} / Y; \underline{GAL4 UAS-FLP} / \text{CyO}$) a 25 °C. Na segunda etapa, na F1 resultante selecionamos fêmeas virgens ($\text{♀ } \underline{sog^- FRT18E} / \underline{FRT18E}; \underline{GAL4, UAS-FLP} / +$) que são cruzadas com machos selvagens, a uma temperatura de 29 °C. Nesta temperatura a expressão de GAL4 é elevada e, portanto maiores são as chances de obter clones de tamanhos adequados para análise, nos folículos ovarianos. Os embriões de 0-4 h resultantes deste cruzamento são coletados para realizar hibridização *in situ*. Cruzamentos similares também são realizados para obter clones nulos de *tok* e *tsg* nas células foliculares.

Nos folículos ovarianos das fêmeas que gerarão clones de células foliculares nulo para *sog* são encontrados populações de células com genótipos selvagens (sem o alelo nulo de *sog*), populações de células homocigotas para o alelo nulo de *sog* e heterocigotas para o alelo nulo de *sog* (o genótipo da fêmea). Deste modo, quanto ao fenótipo, haverá duas populações de células: aquelas que expressam *sog* (selvagens e heterocigotas) e aquelas que não expressam *sog* (homocigotas para o alelo nulo) (fig. 10B,D). A sequência FRT é localizada no mesmo braço do cromossomo em que se encontra o locus do alelo mutante de interesse.

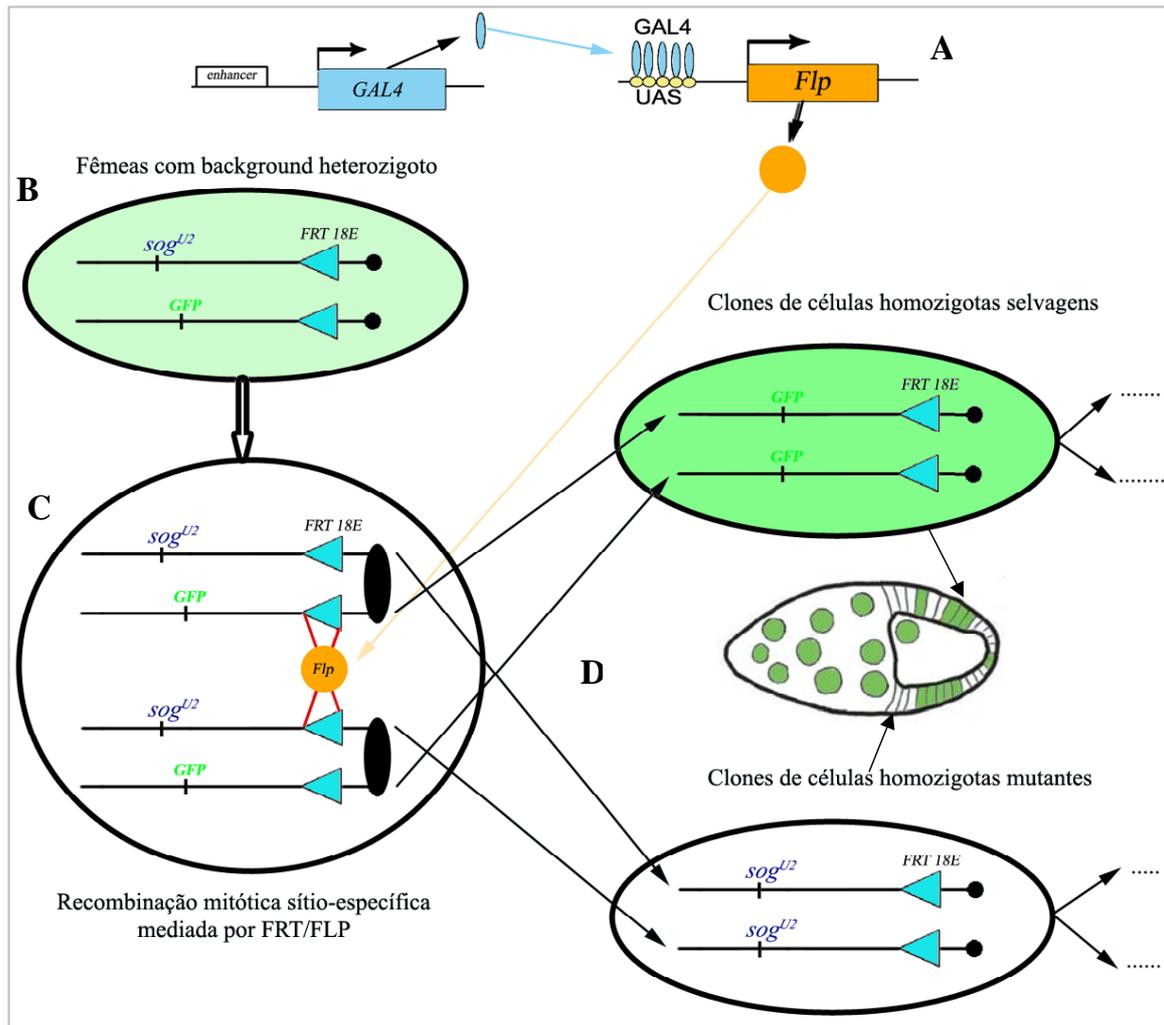


Figura 10: Esquema apresentando como são produzidos clones nulos em células foliculares. Utilizamos o sistema GAL4/FRT/FLP para gerar os clones. A) A *gal4* é expressa nas células precursoras das células foliculares ativando a expressão de *flp*, neste momento. B) Foi gerada fêmeas que sejam heterozigotas para um alelo nulo de *sog* com a sequência FRT. C) durante a divisão mitótica das células precursoras *flp* é expresso e induz a recombinação mitótica. D) Duas células filhas são geradas tendo genótipos diferentes: homocigota selvagem e homocigota nula. Este mesmo sistema pode ser usado também para visualizar o clone nulo marcado pela ausência de GFP, o qual não mostramos nesta tese pois somente mostramos os embriões resultantes. Podemos também distinguir todas as populações de células: heterozigotas (uma cópia de GFP, portanto baixa intensidade de fluorescência), homocigotas selvagens (duas cópias de GFPs com alta intensidade de marcação) e mutantes (sem marcação de GFP). A marcação de GFP permite usar técnicas de imunofluorescência ou hibridização *in situ* fluorescente para visualizar os efeitos no clone na distribuição de proteínas e/ou expressão de genes no folículo ovariano.

3.7.1. Geração de clones marcados com *dec-1*.

Para visualizar o tamanho e localização dos clones nulos de *sog* e correlacioná-los com defeitos na formação do eixo DV e do córion do embrião utilizamos a técnica de

recombinação mitótica com o marcador de clone no córion, denominado *dec-1* (*defective chorion 1*) (Nilson e Schüpbach, 1998). Dec-1 é uma proteína estrutural expressa nas células foliculares que participa na formação do córion. Os clones de células foliculares marcados com alelo nulo de *dec* (*dec*^{VA28}) possuem aspecto mais translúcido que as células selvagens (fig. 11A).

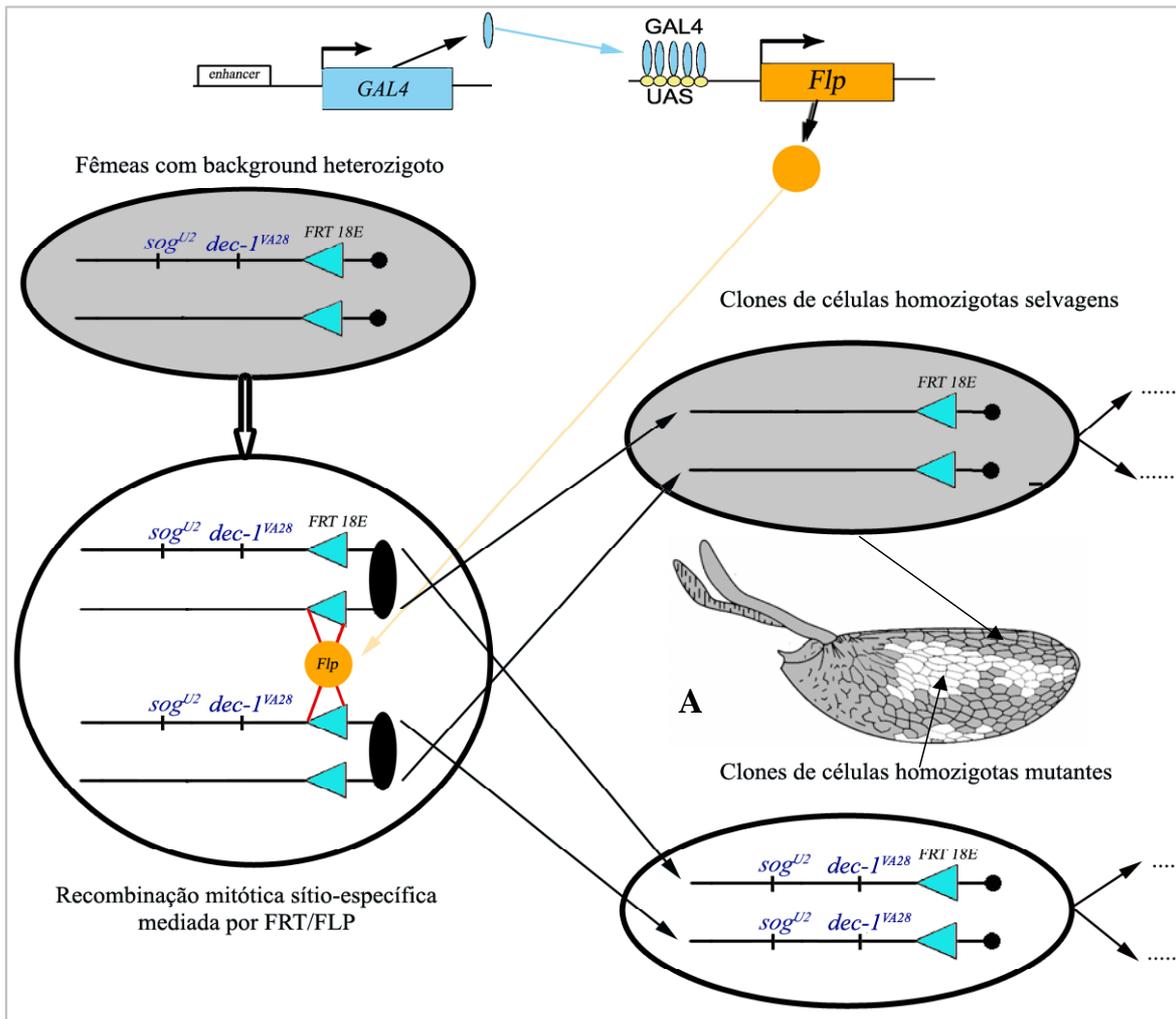


Figura 11: Esquema mostrando como os clones nulos para *sog* marcados com *dec* são gerados. Um elemento a mais é usado para marcar os clones: um alelo nulo de *dec-1* ao lado do gene que analisamos. A) As células heterozigotas ou homozigotas selvagens terão aspecto normal, enquanto que as células homozigotas mutantes para *sog* e *dec-1* terão aspecto mais translúcido que outras. Ao mesmo tempo a cutícula do embrião é visualizada e correlacionando os defeitos na cutícula com a localização dos clones no córion, assim podemos determinar o efeito das atividades de Sog materno ao longo do eixo dorso-ventral embrionário.

Utilizamos dois grupos de embriões, geneticamente diferentes, com clones de células foliculares nulos para *sog* no córion. Os embriões resultantes de fêmeas cruzadas com machos selvagens geram um quarto de embriões hemizigotos (machos) nulos para *sog*, portanto estes embriões não expressam *sog* (zigótico) durante a embriogênese. Para que todos os embriões expressem *sog* zigótico, as fêmeas foram cruzadas com machos que possuem uma duplicação do locus do gene *sog* do cromossomo X para o cromossomo Y (sog^+/Y (Dp (1,Y) sog^+)). Portanto, todos os embriões machos da prole expressam *sog* zigótico.

3.8. Preparação do córion.

Para a visualização de córion, cutícula e clones *dec*, os embriões são coletados e envelhecidos por ao menos 24 horas a 25 °C. Os embriões são envelhecidos vivos a 25 °C por 48 horas. Os embriões são lavados em TXN e então incubados por uma noite a 65 °C em uma solução com 75% de ácido acético glacial e 25% glicerol. Após este procedimento, os embriões são lavados em TXN. As lâminas são montadas em meio Hoyer's (Goma arábica, Cloral hidrato e Glicerol) (Ashburner, 1989), e então incubadas por uma noite a 65 °C (Nusslein-Volhard e Wieschaus, 1980). O meio Hoyer's é utilizado para tornar o córion e as cutículas transparentes. As cutículas e os córions são visualizados em microscópio ótico (Nikon), em campo escuro e então fotografados.

IV. Resultados

4.1 Sog é proteolizado durante a oogênese e os fragmentos gerados são transferidos para o embrião.

Foi demonstrado para diferentes tecidos que Sog é processado por metaloproteases em formas de menor peso molecular. Analisamos se isto também ocorre durante a oogênese. Através da técnica de “*western blotting*” analisamos o padrão de fragmentos de Sog. Utilizamos o anticorpo anti-Sog8A que reconhece um epítopo próximo ao primeiro domínio rico em cisteína (CR) de Sog (fig. 13), portanto todas as formas reconhecidas por este anticorpo devem possuir ao menos o primeiro domínio CR (CR1), ou seja, fragmentos N-terminais.

Observamos fragmentos com pesos moleculares de 120, 110, 100, 95 a 26 kDa em amostras de ovários selvagens (fig. 12). Os fragmentos com peso molecular abaixo de 95 kDa provavelmente contém o domínio CR1 e porções variáveis da região entre os domínios CR1 e CR2. A forma com peso de 110 kDa corresponde provavelmente a um fragmento contendo os domínios CR1, CR2 e CR3, enquanto que a forma migrando a 100 kDa corresponde a um fragmento com os domínios CR1 e CR2 (resultados não apresentados; Shimmi e O’Connor, 2003). Alguns destes fragmentos também são observados em embriões de 0-2 h, no estágio de pré-blastoderma, onde ainda não houve expressão zigótica de *sog* e portanto devem corresponder às formas geradas maternamente. Fragmentos migrando a 88 e 68 kDa não são observados em embriões no estágio de pré-blastoderma (fig. 12). Já em embriões de 2-5 h, onde a expressão zigótica de Sog foi iniciada, o fragmento de 88 kDa é presente (fig. 12). Outros fragmentos, como o de 80 kDa, são presentes majoritariamente em embriões de 2-5 h. Não podemos descartar a possibilidade de que haja um acúmulo de formas de Sog maternas e zigóticas nestes embriões.

Como o padrão de fragmentos de Sog observados durante a oogênese e em embriões no estágio pré-blastoderma é similar, mas não idêntico, testamos se há uma transferência preferencial de distintos fragmentos de Sog. Analisamos se diferentes fragmentos de Sog produzidos por expressão ectópica nas células foliculares podem ou não ser transferidas ao embrião. Superexpressamos construções de Sog que possuem alguns domínios deletados (fig. 13), usando o sistema UAS/GAL4 (Brand e Perrimon, 1993). Estas construções são similares em tamanho às formas endógenas de Sog. Utilizamos a linhagem CY2-GAL4 que dirige a expressão em todas células foliculares que recobrem o oócito. Todos os fragmentos de Sog superexpressos durante a oogênese são observados nos embriões (fig. 14), entretanto formas exógenas e endógenas nos embriões resultantes tem suas quantidades elevadas. Interessantemente, a construção SS1 gera um fragmento de 38 kDa que não é transferido ao embrião, enquanto que outro fragmento de 34 kDa correspondente a um forma endógena tem sua quantidade elevada tanto em ovários quanto em embriões (fig. 14). O processamento destes fragmentos em formas de menor peso sugere a ação de proteases, como ocorre em SS1 e SS4. Outra possibilidade é que o fragmento de 38 kDa represente a forma transmembrana, não clivada, presente no folículo ovariano, entretanto não encontrado nos embriões, a qual é somente encontrado a forma de 34 que pode ser a forma secretada. O mesmo pode está ocorrendo quando superexpressamos o fragmento SS4, onde a fragmento de de 90 kDa pode corresponder a forma transmembrana.

Os resultados acima indicam que Sog é produzido durante a oogênese e clivado em diferentes fragmentos que são transferidos ao embrião, provavelmente estocados no espaço perivitelínico, permanecendo neste local, até o início da embriogênese.

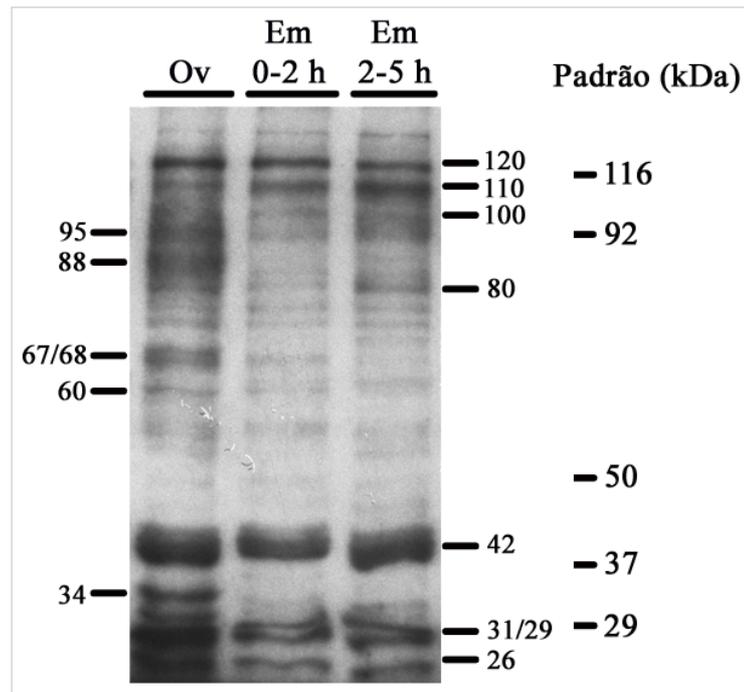


Figura 12: Fragmentos de Sog são produzidos durante a oogênese estão presentes no embrião. Fragmentos de Sog foram detectados com anticorpo Sog8A em extratos de ovários (Ov) ou embriões (Em) selvagens de 0-2 h ou 2-5 h. Todos os fragmentos detectados, neste e nos próximos experimentos, contém pelo menos o domínio CR1, epítipo o qual anticorpo Sog8A reconhece.

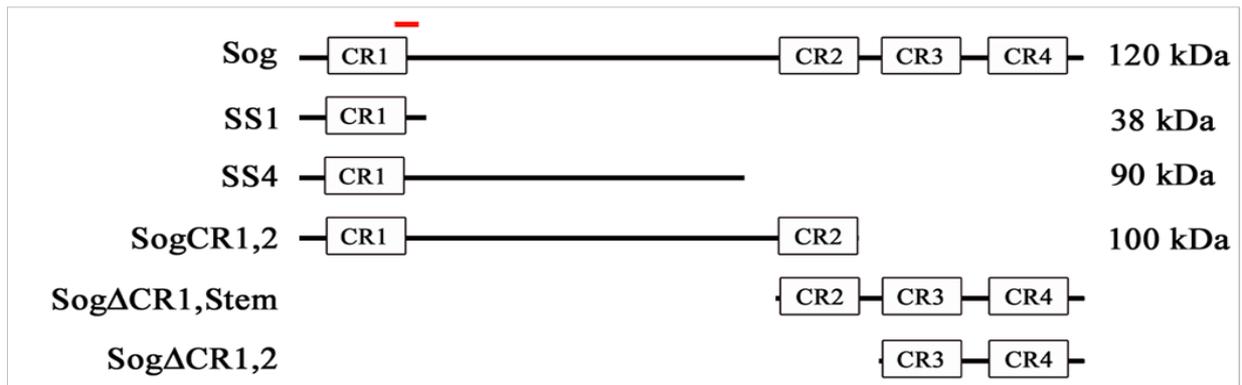


Figura 13: Fragmentos de Sog superexpressos pelo sistema UAS/GAL4 durante a oogênese. O anticorpo Sog 8A reconhece um epítipo próximo ao CR1 (barra vermelha). Os fragmentos Supersog1 (SS1) e Supersog4 (SS4) diferem apenas no comprimento da região variável entre CR1 e CR2. Sog CR1,2 é um fragmento com os domínios CR3 e CR4 deletados. Os fragmentos Sog Δ CR1,stem e Sog Δ CR1,2 contém os domínios CR2 a CR4 e CR3 a CR4, respectivamente. Os pesos moleculares foram determinados em eletroforese (veja abaixo).

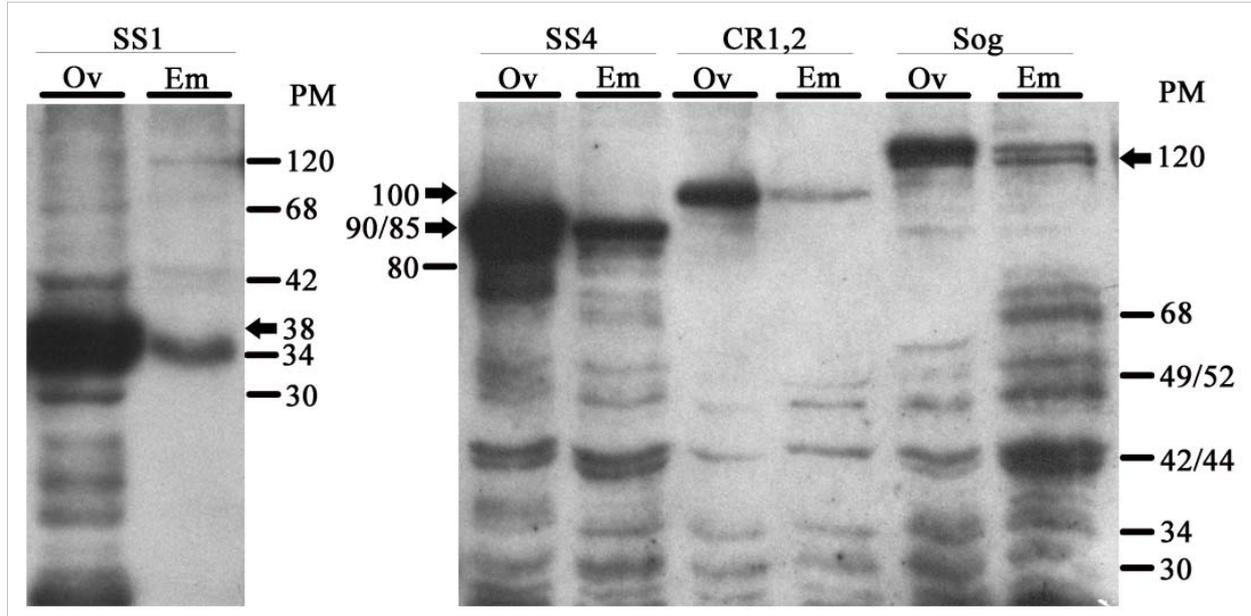


Figura 14: Fragmentos de Sog superexpressos durante a oogênese são transferidos para o embrião. Extratos proteicos de ovários (Ov) e embriões 0-2 h (Em) de fêmeas que superexpressam estas construções foram preparados e analisados em western blotting. Os pesos moleculares das formas geradas estão indicados pelas setas. Os fragmentos superexpressos por CY2-GAL4 induzem altas quantidades destes fragmentos detectados em ovários e nos embriões resultantes. As formas de Sog endógenas também possuem suas quantidades alteradas como em SS1, SS4 e Sog.

4.2. Diferentes fragmentos de Sog exibem atividades distintas.

Dados na literatura indicam que fragmentos de Sog podem ter distintas atividades. Assim, analisamos se estes fragmentos de Sog apresentam diferentes atividades durante a oogênese. Interessantemente, através da redução da expressão de *sog* em folículos ovarianos, usando o sistema GAL4/FLP/FRT de recombinação mitótica (Duffy *et al.*, 1998), embriões oriundos de fêmeas que apresentam grupos de células nulas (clones) para um alelo de *sog* (*sog^{U2}*) apresentam diversas alterações na formação do eixo dorso-ventral. De acordo com resultados de Araujo e Bier, 2000 esperávamos que a redução de *sog* produzisse fenótipos de dorsalização, desde que Sog antagoniza Dpp que tem, por sua vez, uma ação dorsalizante. Entretanto, ao expandirmos esta análise, observamos fenótipos opostos tanto de dorsalização e ventralização, além da expansão do domínio de expressão de *vnd* em direção à região dorsal do embrião, assim como, distorções no domínio de expressão de *vnd* (fig. 15C-E, tab. 02). Isto indica diferentes atividades de Sog maternal. Fenótipos similares foram observados quando superexpressamos a proteína Sog nas células foliculares, usando CY2-GAL4 (fig. 15F, tab. 02). A existência de fragmentos de Sog no espaço perivitelínico pode explicar estes fenótipos.

A superexpressão ou geração de clones no folículo ovariano não é homogênea em todas as células foliculares. A superexpressão pelo sistema UAS/GAL4 é elevada em algumas células enquanto que em outras células é baixa e os clones de células foliculares nulos são frequentemente de tamanhos variáveis e em diferentes localizações no folículo ovariano (resultados não apresentados). Desta forma, reduções ou aumentos pontuais na produção de Sog nos locais onde são gerados os clones de células foliculares nulos ou mediante a sua superexpressão, respectivamente, podem modificar o padrão de fragmentos processados. Estes fragmentos podem exibir distintas atividades

e/ou podem se distribuir diferencialmente ao longo do eixo dorso-ventral do folículo ovariano.

Analizamos se diferentes fragmentos de *Sog* exibem diferentes atividades e consequentemente apresentam ações distintas ao modular a atividade de *Dpp* durante a formação do eixo dorso-ventral embrionário e do córion. Superexpressamos construções de *Sog* que possuem alguns domínios CR deletados (fig. 13), utilizando o sistema binário de expressão GAL4/UAS. Analizamos os efeitos desta superexpressão durante a oogênese na formação do eixo dorso-ventral do embrião e de estruturas anteriores do córion.

4.2.1. Fenótipos embrionários.

Inicialmente dirigimos a expressão de diferentes construções em todas as células foliculares utilizando CY2-GAL4. As construções SS1 (Supersog 1) e SS4 (Supersog 4) geraram fenótipos opostos de dorsalização e ventralização (fig. 15G-I, tab. 02). Ambas as construções apresentaram expansão do domínio de expressão de *vnd* em direção à região dorsal do embrião. Já a construção *Sog*CR1,2, que possui os domínios CR3 e CR4 deletados, apresentou atividade de leve ventralização, com um aumento de duas a três células na largura do domínio mesodermal (fig. 15J, tab. 02). Entretanto, um fragmento sem o domínio CR1 e a região variável (*Sog*ΔCR1,stem) apresentou atividade oposta. Quando a deleção abrange toda região do domínio CR1 ao CR2 (*Sog*ΔCR1,2) nenhum fenótipo foi observado (tab. 02). Os fenótipos gerados com a superexpressão de *Sog* e formas que não possuem o domínio CR1 são mais homogêneos que aqueles gerados pela superexpressão de SS1 e SS4, que possuem fenótipos pontuais de expansão de *vnd* para a região ventral. Estes dados sugerem que os domínios CR1 e

CR2 podem ser responsáveis pela maior parte das atividades de Sog observadas durante a oogênese.

Os fenótipos observados sugerem que estas formas podem ter diferentes atividades e apresentar diferentes mobilidades no espaço perivitelínico, desde que observamos alterações locais abrangentes ou distorções nos territórios dorso-ventral do embrião, com os diferentes fragmentos expressos com com Gal4.

Subsequentemente, usamos outras linhagens GAL4 como 55B e E4-GAL4, que dirigem a expressão de GAL4 em células foliculares sobre o oócito nas regiões anterior e posterior, respectivamente. Quando a expressão da construção Sog Δ CR1,stem foi dirigida pela 55B-GAL4 gerou um fenótipo de leve expansão do domínio de *vnd* para região dorsal, observado em baixa frequência (tab. 02). As construções SS1 e Sog Δ CR1,2 dirigidas pela 55B-GAL4 não resultaram em fenótipos embrionários (tab. 02). Por outro lado, quando dirigimos a expressão de algumas destas construções com E4-GAL4 não observamos nenhuma alteração no eixo dorso-ventral embrionário (tab. 02).

Tabela 02: Efeitos da superexpressão de Sog e de fragmentos de Sog, clones de *sog*, *tok* e *tld* durante a oogênese na formação dos domínios dorso-ventrais do embrião.

GAL4	Construção UAS e clones	n com fenótipo [n total]	Fenótipos embrionários					
			Ventralização		Dorsalização	Outros		
			Expansão do domínio de <i>vnd</i> para o lado dorsal (fig. 14E) ¹	Expansão do Mesoderma (fig. 14D,H)	Redução do mesoderma (fig. 14C,J)	Expansão local do domínio de <i>vnd</i> para o lado ventral (fig. 14G,I)	Expansão do mesoderma e invasão ventral de <i>vnd</i> (fig. 14G; 18E,F)	Distorção (fig. 14F)
CY2	Sog	16 [429]	31%* (5)**	0	38% (6)	0	0	31% (5)
	SS1*	40 [150]	17.5% (7)	37.5% (15)	0	35% (14)	10% (4)	0
	SS4*	7 [87]	29% (2)	29% (2)	14% (1)	0	29% (2)	0
	CR1,2	8 [152]	0	100% (8)	0	0	0	0
	ΔCR1,stem	8 [36]	ND	0	38% (5)	ND	ND	62% (3)
	ΔCR1,2	0 [40]	ND	0	0	ND	ND	0
	Tld	14 [47]	7% (1)	71% (10)	0	14% (2)	7% (1)	0
	Tsg	9 [52]	45 (4)	11% (1)	22% (2)	22% (2)	0	0
	Tld, Tsg	15 [37]	13,3% (2)	80% (12)	0	6,7% (1)	0	0
55B	ΔCR1,stem	2 [63]	100% (2)	0		0	0	0
	ΔCR1,2	0 [42]	0	0	0	0	0	0
	SS1	0 [58]	0	0	0	0	0	0
E4	SS1	0 [45]	0	0	0	0	0	0
	ΔCR1,stem	0 [56]	0	0	0	0	0	0
Clones	<i>sog</i> - clones	21 [137]	9.5% (2)	9.5% (2)	24% (5)	38% (8)	0	19% (4)
	<i>tok</i> ⁻ clones	8 [35]	50% (4)	12,5% (1)	25% (2)	12,5% (1)	0	0
	<i>tsg</i> ⁻ clones	8 [55]	50% (4)	0	37,5% (3)	12,5% (1)	0	0

¹ As referidas figuras são exemplos de cada fenótipo listado na tabela.

* A percentagem é em relação ao total de embriões com fenótipos.

** Número de embriões que apresentam o fenótipo.

ND: Fenótipos não determinados, pois nestes casos não usamos *vnd* como marcador do eixo DV do embrião.

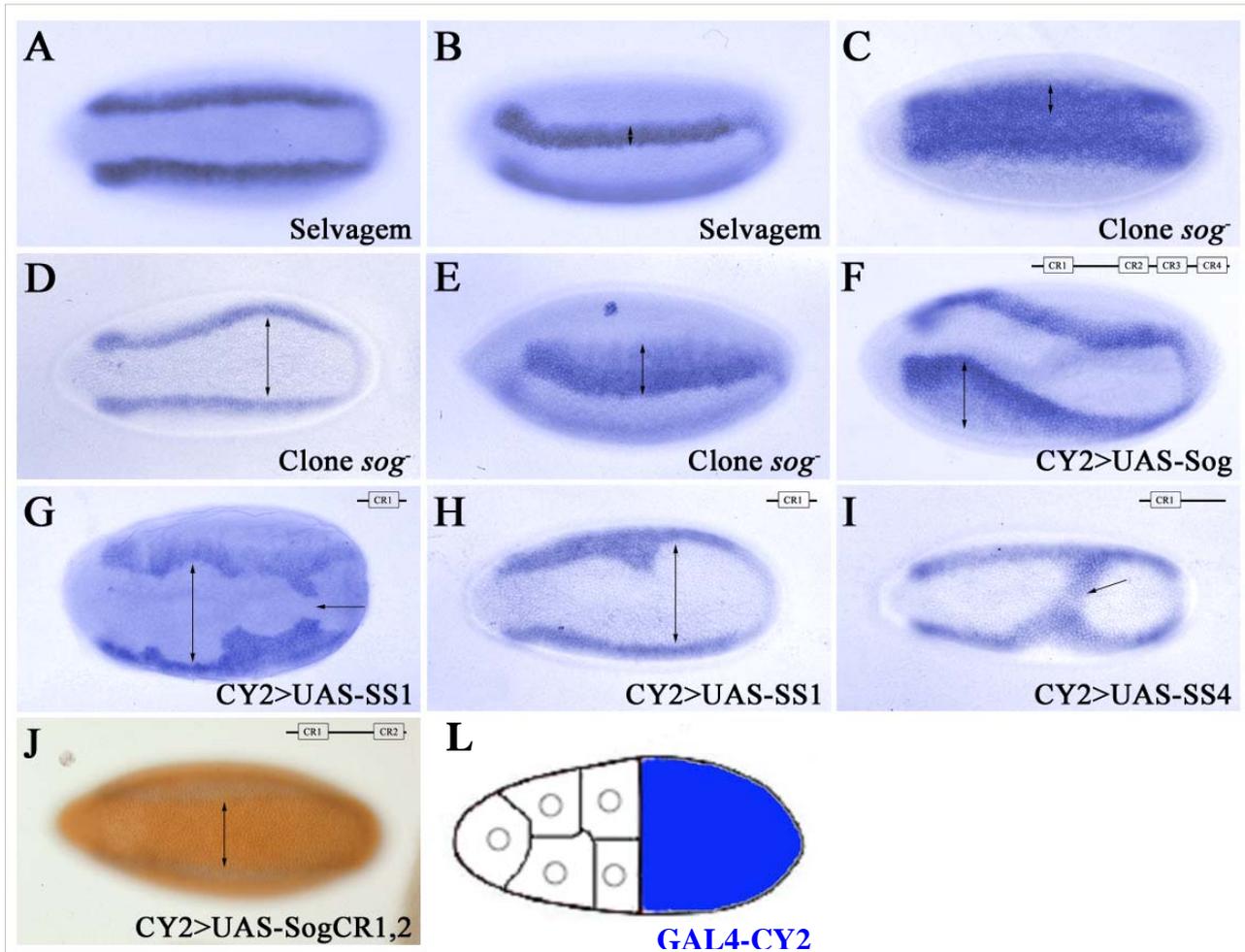


Figura 15: Efeitos de clones nulos de *sog* e superexpressão de Sog e de fragmentos de Sog durante a oogênese na formação dos domínios dorso-ventrais do embrião. Hibridização *in situ* usando a sonda antisense para o RNA de *vnd* (azul), gene expresso na região lateral do embrião, no limite do domínio mesodermal (ventral), como visualizado em A e B. A largura do domínio de expressão de *vnd* compreende de 3-4 células. Todos os embriões estão orientados com o lado anterior para esquerda e posterior para direita, todos os embriões estão com vista ventral, exceto em B e E com vista lateral. O domínio de expressão de *vnd* é alterado para a região ventral com expansão do seu domínio de expressão (C, seta dupla), expansão do mesoderma (D, seta dupla) ou expansão do domínio de expressão de *vnd* (E, seta dupla). Em F, embrião com distorção do eixo dorso-ventral e expansão domínio de *vnd* (seta dupla). O fragmento SS1 gera fenótipos restritos nos embriões, como visualizado em G, com expansão do mesoderma (dupla seta), e do domínio de *vnd* (seta simples). Alguns embriões apresentam expansão localizada do mesoderma (H, seta dupla). O fragmento SS4 gera fenótipos similares a SS1, como expansão de *vnd* para a região ventral (I, seta simples). A superexpressão de CR1,2 gera leve fenótipos de ventralização (J, seta dupla), com expansão do domínio mesodermal de 2 - 3 células em dupla *in situ* para *vnd* (azul) e *snail* (marron – região ventral, seta dupla). Outros fenótipos gerados pelos clones de *sog* estão listados na tabela 02. L) Padrão de expressão (azul) de GAL4 no foliculo ovariano utilizada para superexpressar Sog e seus fragmentos nas células foliculares que envolve o oócito.

4.2.2. Fenótipos de córion.

Já que Dpp tem um papel fundamental na padronização de estruturas anteriores do córion, analisamos os efeitos da superexpressão de fragmentos de Sog na formação destas estruturas. Quando analisamos os fenótipos do córion gerados por superexpressão com CY2-GAL4, as construções analisadas acima resultaram apenas em fenótipos de redução e/ou fusão dos apêndices dorsais (fig. 16B-D, tab. 03). Por outro lado, quando analisamos os efeitos resultantes da superexpressão pela linhagem 55B-GAL4, dos fragmentos SS1, Sog Δ CR1,2 e Sog Δ CR1,stem observamos fenótipos de ausência dos apêndices dorsais ou fusão destes (fig. 16F-H, tab. 03). Analisamos, também os efeitos fenotípicos da superexpressão das formas SS1 e Sog Δ CR1,stem com E4-GAL4, na região posterior do oócito, e observamos efeitos, em baixa frequência, somente com Sog Δ CR1,stem nos apêndices dorsais (tab. 03). Este último resultado sugere que os fragmentos de Sog podem ter diferentes mobilidades, desde que Sog Δ CR1,stem gera efeitos na região anterior quando expresso na região posterior, enquanto que SS1 não resulta em alterações nas estruturas ântero-dorsais do córion. Além disto, é sugestivo que fragmentos de Sog não tenham atividades posteriores na formação do córion. Provavelmente, isto se deve ao fato de *dpp* estar sendo expresso em toda a região anterior do oócito. Já que o antagonismo entre Sog e Dpp é bem estabelecido durante o desenvolvimento de *D. melanogaster*, Sog e seus fragmentos podem ter atividades na região anterior ou próximo, modulando a atividade de Dpp na padronização do eixo dorso-ventral embrionário.

Estes resultados mostram que podem existir atividades de Sog durante a oogênese com efeitos distintos na formação das estruturas anteriores do córion versus do eixo dorso-ventral do embrião. Esperávamos que a superexpressão das formas SS1

Tabela 03. Efeitos da superexpressão de Sog e de fragmentos de Sog, clones de *tok* e *tld* na padronização de estruturas coriônicas.

GALA	Construções UAS e clones	n com fenótipo [n total]	Fenótipos					
			Dorsalização			Ventralização		Outros
			AD curtos ou ausentes (fig. 15B) ¹	AD fusionados dorsalmente (fig. 15D)	AD curtos/ausentes e redução do opérculo (fig. 15G)	AD fusionados ventralmente ou afastados (fig. 19B)	Operculo reduzidos	Outros defeitos ²
CY2	Sog	9 [186]	100%* (9)**	0	0	0	0	0
	SS1	26 [640]	100% (26)	0	0	0	0	0
	SS4	20 [118]	65% (13)	35% (7)	0	0	0	0
	CR1,2	7 [517]	85,7% (6)	14,3% (1)	0	0	0	0
	Tld	19 [281]	84% (16)	0	0	0	0	1 % (3)
	Tsg	21 [275]	57,1% (12)	38,1% (8)	0	0	0	4,8% (1)
	Tld, Tsg	132 [801]	75,7% (100)	3% (4)	0	0	0	21,3% (28) ³
55B	Δ CR1,stem	26 [376]	30% (7)	70% (19)	0	0	0	0
	Δ CR1,2	5 [55]	0	40% (2)	20% (1)	40% (2)	0	0
	SS1	35 [485]	54,3% (19)	45,7% (16)	0	0	0	0
E4	SS1	0 [390]	0	0	0	0	0	0
	Δ CR1,stem	12 [397]	41,7% (5)	8,3% (1)	33,3% (4)	0	0	16,7% (2)
Clones	<i>tsg</i> clones	23 [385]	39% (9)	17,4% (4)	21,7% (5)	13% (3)	8,7% (2)	0
	<i>tok</i> clones	15 [99]	40% (6)	0	33,3% (5)	26,7% (4)	0	0

¹ As referidas figuras são exemplos de cada fenótipo listado na tabela.

² São diversos fenótipos nos apêndices dorsais que não são compreendidos.

³ Inclui fenótipos de apêndices dorsais extras como apresentado na fig. 19H.

* A percentagem é em relação ao total de embriões com fenótipos.

** Número de embriões que apresentam dado fenótipo.

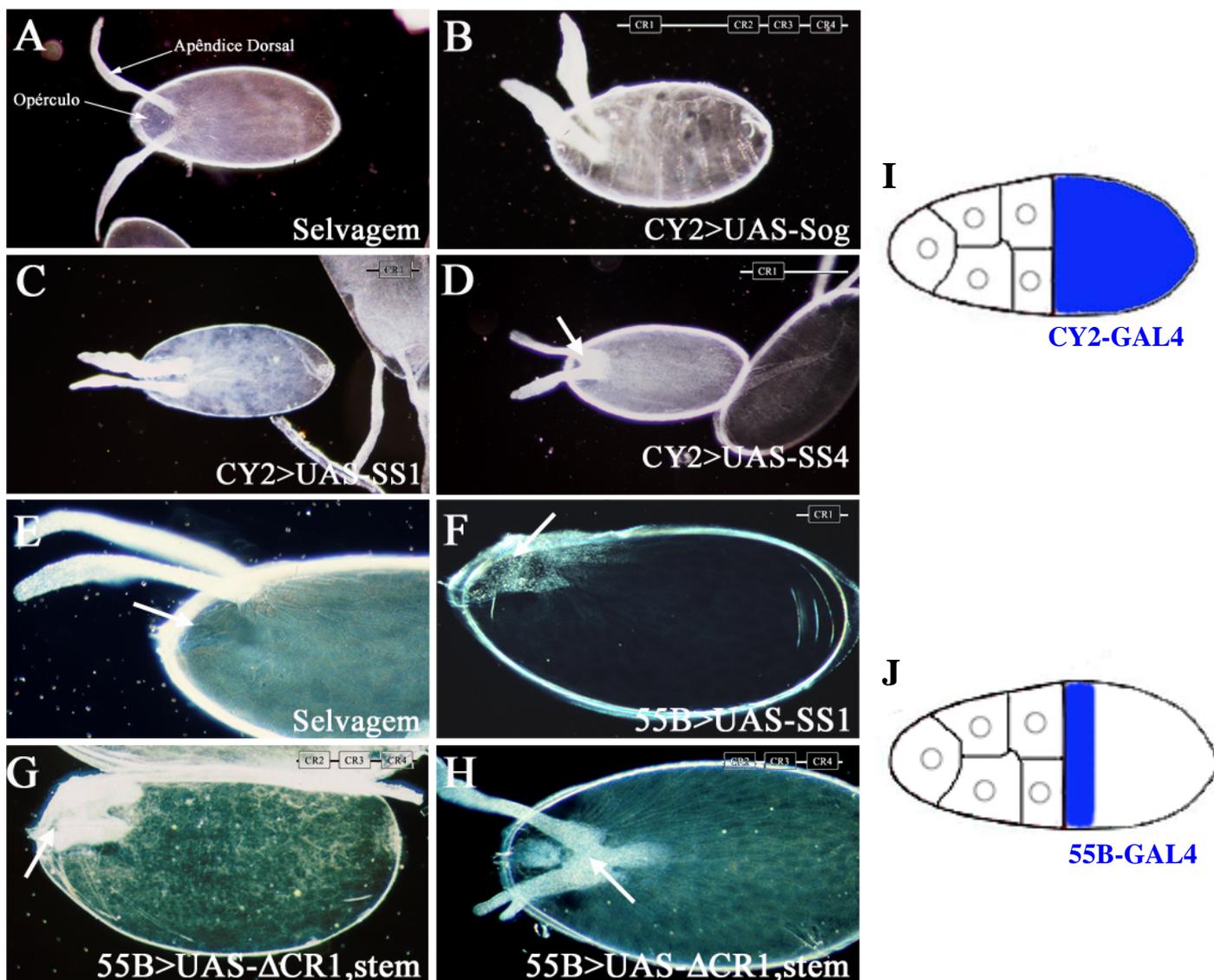


Figura 16: Efeitos da superexpressão de Sog e de fragmentos de Sog na padronização de estruturas coriônicas. (A, E) Embriões selvagens. Todos os embriões estão posicionados com o pólo anterior para esquerda. Os embriões A-D e H estão com vista dorsal e E, F e G com vista lateral. (B-D) Superexpressão com CY2-GAL4. A superexpressão de Sog e SS1 gera fenótipos de redução dos apêndices dorsais (B, C). O fragmento SS4 gera fenótipos de redução dos apêndices dorsais e fusão dos apêndices (D, seta). (E) Vista lateral de um embrião selvagem, com detalhes do opérculo (seta). (F-H) Superexpressão com 55B-GAL4. A superexpressão de fragmentos SS1 e $\Delta CR1,stem$ gera fenótipos de ausência ou redução dos apêndices e redução do opérculo, com material ectópico de apêndices dorsais na região anterior (F, G, setas). Além deste fenótipo, $\Delta CR1,stem$ gera fenótipos de fusão dos apêndices (H, seta) e apêndices bifurcados com material ectópico de apêndice dorsal no opérculo. I) Padrão de expressão de CY2-GAL4 (azul) nas células foliculares que envolve o oócito. J) Padrão de expressão de 55B-GAL4 (azul) nas células foliculares anteriores que envolve o oócito.

Sog Δ CR1,2 com 55B-GAL4 poderia gerar fenótipos embrionários. A ausência de defeitos no eixo dorso-ventral embrionário contraposta aos fenótipos apresentados no córion, quando estas construções de Sog são expressas com 55B-GAL4 em toda região anterior do oócito, indica que as atividades dos diferentes fragmentos de Sog podem ser requeridas diferencialmente na formação do córion e do eixo dorso-ventral do embrião de *D. melanogaster*.

4.3. Assimetria na distribuição espacial de diferentes atividades de Sog.

Clones de células foliculares nulos para *sog* geram efeitos diversos e opostos. Estas diferenças podem ser devidas ao tamanho ou localização dos clones nulos de células foliculares. Assim, é importante conhecer a localização dos clones de células foliculares e correlacioná-los com os fenótipos resultantes no embrião. Para isto, usamos a técnica de recombinação mitótica, com o uso do marcador de clone de células foliculares no córion chamado *dec* (Nilson e Schupbach, 1998). Embriões resultantes de folículos com clones de células foliculares nulos de *sog* localizados na região ventral ou ventro-lateral apresentaram defeitos nos dentículos da região ventral que são frequentemente bifucados ou interrompidos (fig. 17B, tab. 04), fenótipos muito difíceis de interpretar. No entanto, embriões homozigotos nulos para *sog* zigótico são dorsalizados, com a redução dos dentículos na região ventral (fig. 17C, tab. 04). Clones de células foliculares de *sog* nas células foliculares ventrais resultam em embriões *sog*⁻ com fenótipo mais dorsalizado, com perda parcial dos dentículos (fig. 17D, tab. 04). Assim, os fenótipos observados nas cutículas embrionárias associados a clones nulos de células foliculares na região ventral são todos considerados fenótipos de dorsalização. Clones nulos de *sog* nas células foliculares localizados na região dorsal não foram

associados a alterações na cutícula (tab. 04). Estes resultados sugerem que as atividades de Sog na formação do eixo dorso-ventral são produzidas na região ventral.

Também observamos várias alterações nas estruturas anteriores do córion associados aos clones de células foliculares nulos de *sog*. Clones de células foliculares nulos de *sog* localizados na região dorsal não resultam em alterações no córion (tab. 04). Entretanto, clones dorsais adjacentes aos apêndices dorsais frequentemente são associados a fusão destes (fig. 17F, tab. 04). Clones nulos de *sog* na região ventro-anterior frequentemente são associados com redução do opérculo, na região dorso-anterior do córion (fig. 17G, tab. 04). Estes resultados indicam que Sog influencia de uma forma não-autônoma a formação do córion. Isto é, os efeitos fenotípicos nas estruturas dorso-anteriores do córion são observados além do clones, indicando que fatores (fragmentos de Sog) podem difundir para padronizar estas estruturas.

Tabela 04: Associação da localização dos clones nulos de *sog* marcados com os efeitos na padronização do córion e da cutícula do embrião.

Localização do clone no embrião	Tamanho do clone (n ° cells)	Fenótipos na cutícula			Fenótipos coriônicos ^a		
		Dentículos bifurcados (fig. 16B) ¹	Embriões homocigotos nulos para <i>sog</i> zigótico mais dorsalizados (fig. 16D)	Sem fenótipos	Redução do opérculo (fig. 16G)	AD fusionados (fig. 16F)	Sem fenótipos
Ventral	<30			1			27 ^b
	>30	2	2			1	5
Lateral	<30						6
	>30						1
Posterior	<30			1			5
	>30						3
Ventral or anterior lateral	<30	1		1	10		7 ^c
	>30						
Dorsal	<30			1		9 ^d	24
	>30			1			10
Antero-dorsal	<30				1	2	2
	>30						
Dorsal e ventral	<30		2	1			5
	>30		1			6	1

^a Observamos fenótipos que não estavam associados a clones visíveis.

^b Frequentemente são observados vários pequenos clones na região dorsal de 1-5 células.

^c Os clones sem efeitos fenotípicos possuem tamanho menor que 15 células

^d Todos os clones associados a fenótipo de fusão dos AD foram localizados próximos ou junto a base dos AD, enquanto clones não próximos aos AD não geraram fenótipos.

¹ As referidas figuras são exemplos de cada fenótipo listado na tabela.

Os fenótipos gerados pelos clones foram em baixa frequência. Devemos considerar que nem todos os folículos geram clones e pela dificuldade técnica de obter estes embriões. Não consideramos nesta tabela embriões sem clones no córion.

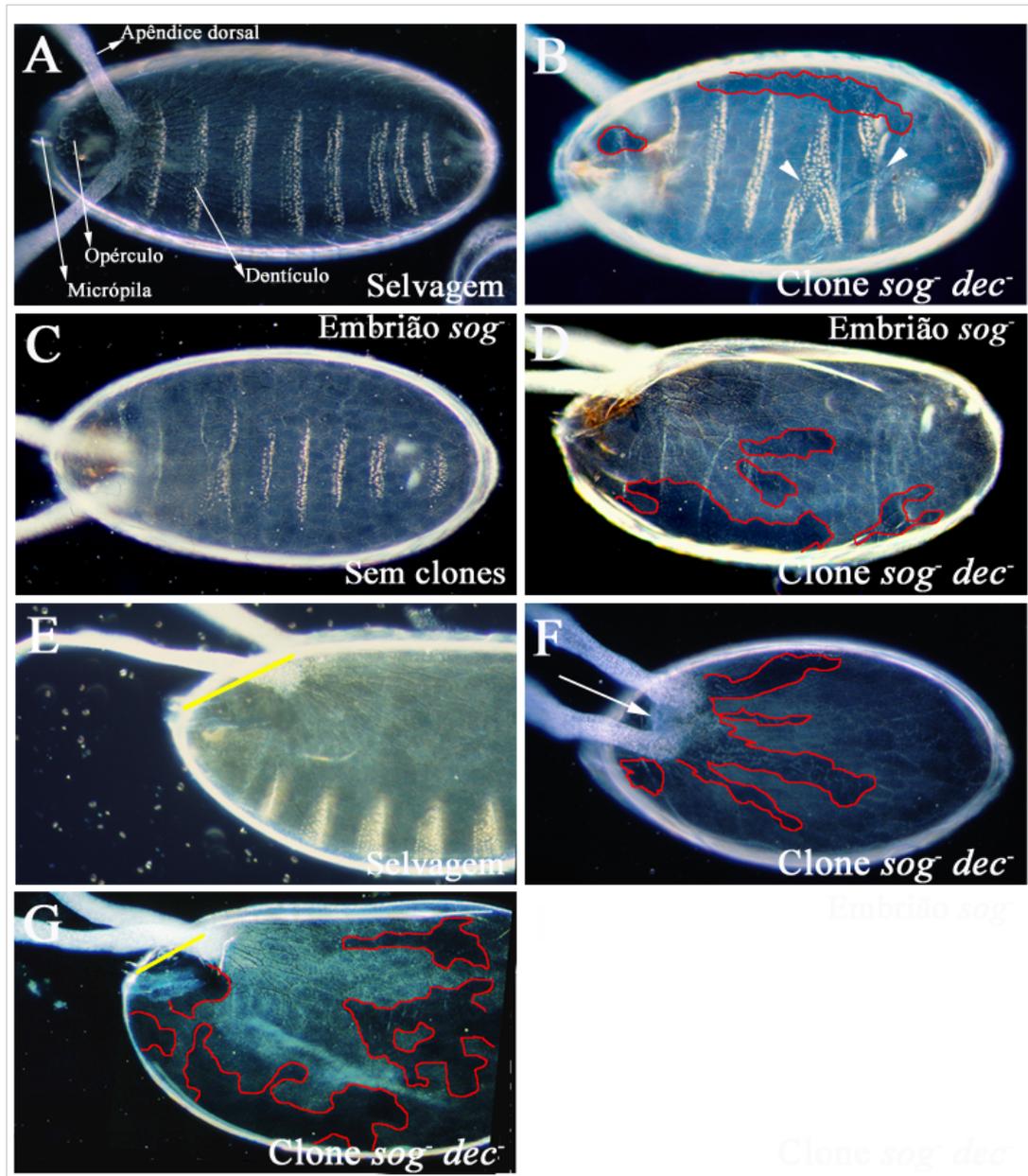


Figura 17: Associação da localização dos clones nulos de Sog marcados com os efeitos na padronização do córion e da cutícula do embrião. (A) Embrião selvagem com córion e cutícula apresentando os dentículos. Desenhos esquemáticos dos clones são apresentados em (B, D, F e G). Clones de nulos de *sog* localizados na região ventral geram defeitos nos dentículos ventrais que podem ser interrompidos ou bifurcados (B). Embriões mutantes homocigotos nulos para *sog* apresentam redução do comprimento dos dentículos, um fenótipo característico de dorsalização (C). Quando clones são localizados na região ventral destes embriões, eles se tornam mais dorsalizados, reduzindo mais o comprimento dos dentículos ou ausentes (D). (E) Embrião selvagem com vista lateral, apresentando opérculo em detalhe (seta). Clones localizados na região dorsal que são adjacentes aos apêndices dorsais, geram fusão dos apêndices (E, seta) ou quando localizados na região ventro-anterior o opérculo é reduzido (G), comparando com o selvagem em E (compare o comprimento da barra amarela).

4.4. *tsg* é expresso assimetricamente durante a oogênese e atua na padronização do eixo dorso-ventral.

A proteína Tsg é um importante regulador da atividade de Sog durante a embriogênese. Analisamos, então, se Tsg é expresso durante a oogênese por hibridização *in situ*. Testamos a sonda de RNA antisense inicialmente em embriões no estágio de blastoderma pois já é conhecido o padrão de expressão de *tsg* no ectoderma dorsal (Mason *et al.*, 1994). A expressão de *tsg* ocorre ao longo da fase de blastoderma no ectoderma dorsal (fig. 18A-B). Evidenciamos que durante a oogênese o mRNA de *tsg* é expresso inicialmente no estágio 8 em células foliculares migrando em direção ao oócito (resultado não apresentado). No estágio 9, a expressão de *tsg* é expandida posteriormente na região ventral (fig. 18C). A partir do estágio 10, a expressão de *tsg* é restrita à região ventral do oócito permanecendo até o estágio 11 na região ventral (fig. 18D-E).

Analisamos a atividade de Tsg durante a oogênese gerando clones de células foliculares homozigotas para um alelo nulo de *tsg* (*tsg*⁴). Os embriões resultantes apresentaram fenótipos tanto de dorsalização quanto de expansão da expressão de *vnd* para a região dorsal (fig. 19B, tab. 02). Os efeitos dos clones de células foliculares nulos de *tsg* no córion foram diversos e frequentemente resultaram em ausência, fusão ou afastamento dos apêndices dorsais associados ou não com a redução do opérculo (fig. 20B, tab. 03). Estes fenótipos também devem ser resultantes de um efeito não-autônomo já que a expressão de *tsg* é ventral e as alterações decorrentes da geração dos clones são nas estruturas dorso-anteriores do córion. Isto indica fortemente que fatores que difundem da região ventral, controlados por Tsg, padronizam as estruturas anteriores do córion.

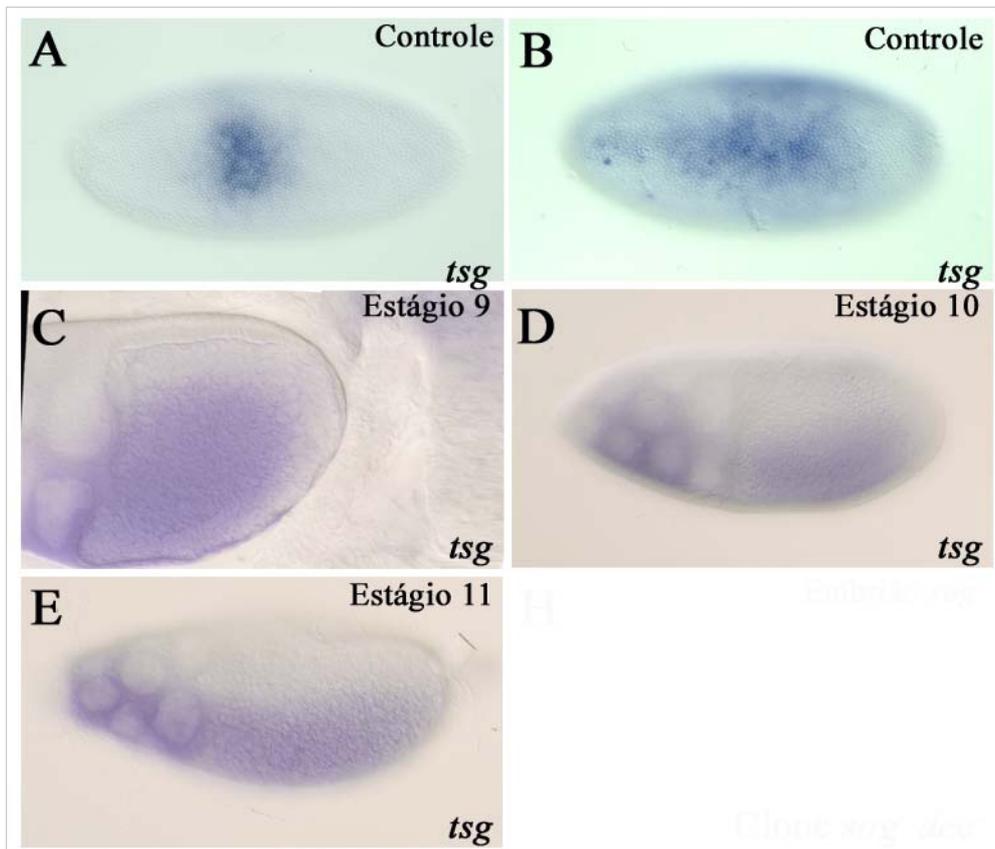


Figura 18: *tsg* é expresso nas células foliculares ventrais. Hibridização *in situ* em embriões e folículos ovarianos para o gene *tsg*. A sonda de de RNA antisense para o gene *tsg* foi testada em embriões selvagens. (A) *tsg* é expresso inicialmente em um pequeno domínio na região dorsal em um embrião no estágio de pré-blastoderma sincicial. (B) Embrião em estágio mais tardio, no blastoderma celular, *tsg* é expresso em um amplo domínio na região dorsal. Durante a oogênese, *tsg* é expresso inicialmente em células foliculares migrando sobre o oócito no estágio 8 (não apresentado), e seu domínio de expressão se expande em direção à região posterior no estágio 9 (C). Nos estágios 10 a 11 (D-E) *tsg* é expresso nas células foliculares ventrais.

Estes resultados mostram que *tsg*, expresso pelas células foliculares, participa na padronização do eixo dorso-ventral embrionário e sugerem que esta atividade é resultante do controle sobre o processamento de *Sog* e/ou sua distribuição no espaço perivitelínico. A expressão assimétrica de *tsg* é um forte indício para a geração e distribuição assimétrica de fragmentos de *Sog* ao longo do eixo dorso-ventral.

4.5. As metaloproteases Tok e Tld expressas durante a oogênese participam do estabelecimento do eixo dorso-ventral.

A existência de formas processadas de *Sog* durante a oogênese e nos embriões resultantes, sugerem a atividade de metaloproteases que podem estar atuando durante a oogênese. Resultados do laboratório (Carneiro, Fontenele *et al.*, no prelo - Anexo A) mostram que as metaloproteases Tok e Tld são expressas nas células foliculares ventrais e suas expressões controladas pela via de sinalização de EGFR. Clones de células foliculares de *tld* resultam em defeitos no córion e na formação do eixo dorso-ventral (Carneiro, Fontenele *et al.*, no prelo - Anexo A). Para determinar as atividades de Tok durante a oogênese, geramos clones homozigotos para um alelo nulo de *tok* (*tok*^{A2-41}).

Embriões oriundos de fêmeas com clones de células foliculares nulos de *tok*, apresentam defeitos no eixo dorso-ventral. Fenótipos de ventralização e dorsalização são observados nestes embriões (fig. 19C, tab. 02). Quando observamos efeitos dos clones de células foliculares nulos de Tok no córion destes embriões, as estruturas anteriores, como os apêndices dorsais e o opérculo, apresentaram defeitos na sua formação, com redução, perda ou aumento na distância entre os apêndices dorsais quase sempre associados a redução do opérculo (fig. 20C, tab. 03). Da mesma forma que ocorre com clones de células foliculares nulos de *tsg*, os efeitos dos clones nulos de *tok* são não-autônomos. Os fenótipos coriônicos de fusão dos apêndices dorsais e redução

do opérculo são similares aos observados resultantes de fêmeas que superexpressam as construções *SS1* e *Sog Δ CR1,stem*, sugerindo a atuação de Tok no processamento de Sog.

Realizamos, então, a superexpressão de Tld e/ou Tsg. Observamos, novamente, fenótipos opostos de ventralização e dorsalização nos embriões resultantes. Além disto, observamos os dois fenótipos simultaneamente (fig. 19D-H', tab. 02). Os fenótipos coriônicos observados foram frequentemente de redução dos apêndices dorsais, associados algumas vezes com redução do opérculo (fig. 20E-H, tab. 03). Além disto, observamos embriões com apêndices dorsais extras quando Tld e Tsg são expressos (fig. 20E-H). Estes dados sugerem que os fragmentos de Sog difundem no espaço perivitelínico tendo sua distribuição alterada ao longo do eixo dorso-ventral, quando a expressão de *tld*, *tok* e *tsg* é reduzida ou ectópica. A hipótese de processamento e regulação da distribuição das formas de Sog por Tld e Tok é reforçada quando observamos que os fenótipos coriônicos em embriões de fêmeas que superexpressam Tld e/ou Tsg apresentam fusão dorsal dos apêndices dorsais, similares aos fenótipos de superexpressão das construções de Sog.

A superexpressão de Tld e Tsg simultaneamente gera fenótipos extremos de expansão do domínio de *vnd* para região dorsal. Em alguns casos a região dorsal é totalmente comprometida e ocupada pela expressão de *vnd* (fig. 19H-H', tab. 02). Os fenótipos gerados pela superexpressão de Tld foram os mesmos, porém mais suaves. Já os fenótipos gerados por Tsg foram predominantemente de dorsalização. Além disto, a penetrância dos fenótipos apresentados com a superexpressão das duas moléculas é maior quando comparada com a superexpressão somente de Tsg ou Tld. Isto sugere que Tsg modifica a atividade de Tld provavelmente alterando o processamento de Sog.

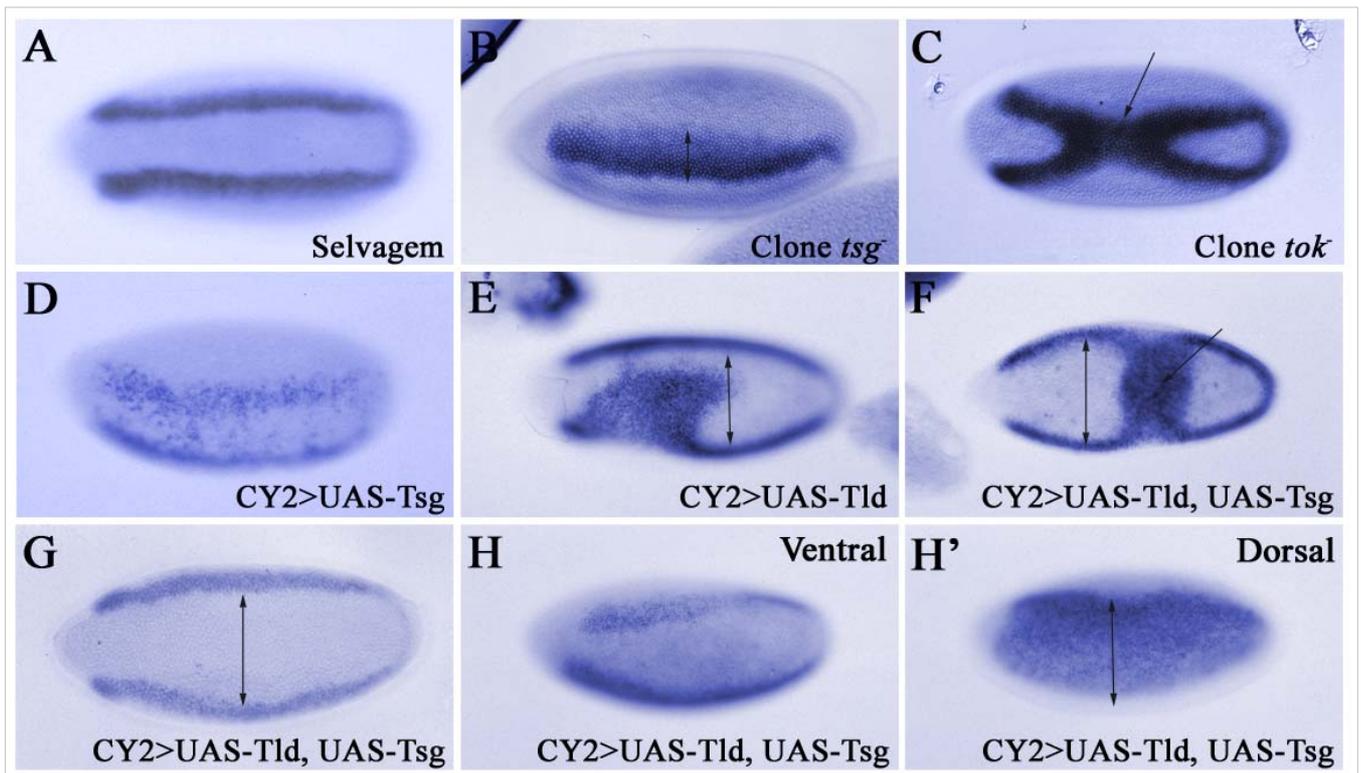


Figura 19. Efeitos de clones nulos de Tok e Tsg e superexpressão de Tsg e Tld durante a oogênese na formação do eixo dorso-ventral embrionário. Hibridização *in situ* para o gene *vnd*. (A) embrião selvagem. (B) Clones de Tsg geram fenótipos de expansão do domínio de *vnd* em direção a região dorsal além de outros descritos na tabela 02. Clones de Tok gerados no folículo ovariano resultam em embriões com redução do mesoderma (C, seta) além de outros fenótipos apresentados na tabela 02. A superexpressão de Tsg gera principalmente invasão da expressão de *vnd* na região do mesoderma (D). A superexpressão da metaloprotease Tld gera vários defeitos no eixo dorso ventral, entres estes defeitos a expansão do domínio de expressão de *vnd* na região ventral com simultâneo alargamento do mesoderma (E, seta dupla). A superxperessão simultanea de Tld e Tsg gera fenótipos mais frequentes que a superexpressão somente de Tsg ou Tld, como a expansão localizada de *vnd* para a região ventral e/ou expansão do mesoderma (F, G). Além disto os fenótipos são mais expressivos, como o fenótipo apresentado em H e H'. Em H, vista ventral do embrião com distorção do eixo dorso-ventral e em H', vista dorsal do mesmo embrião, onde o domínio de expressão de *vnd* expande totalmente para a região dorsal.

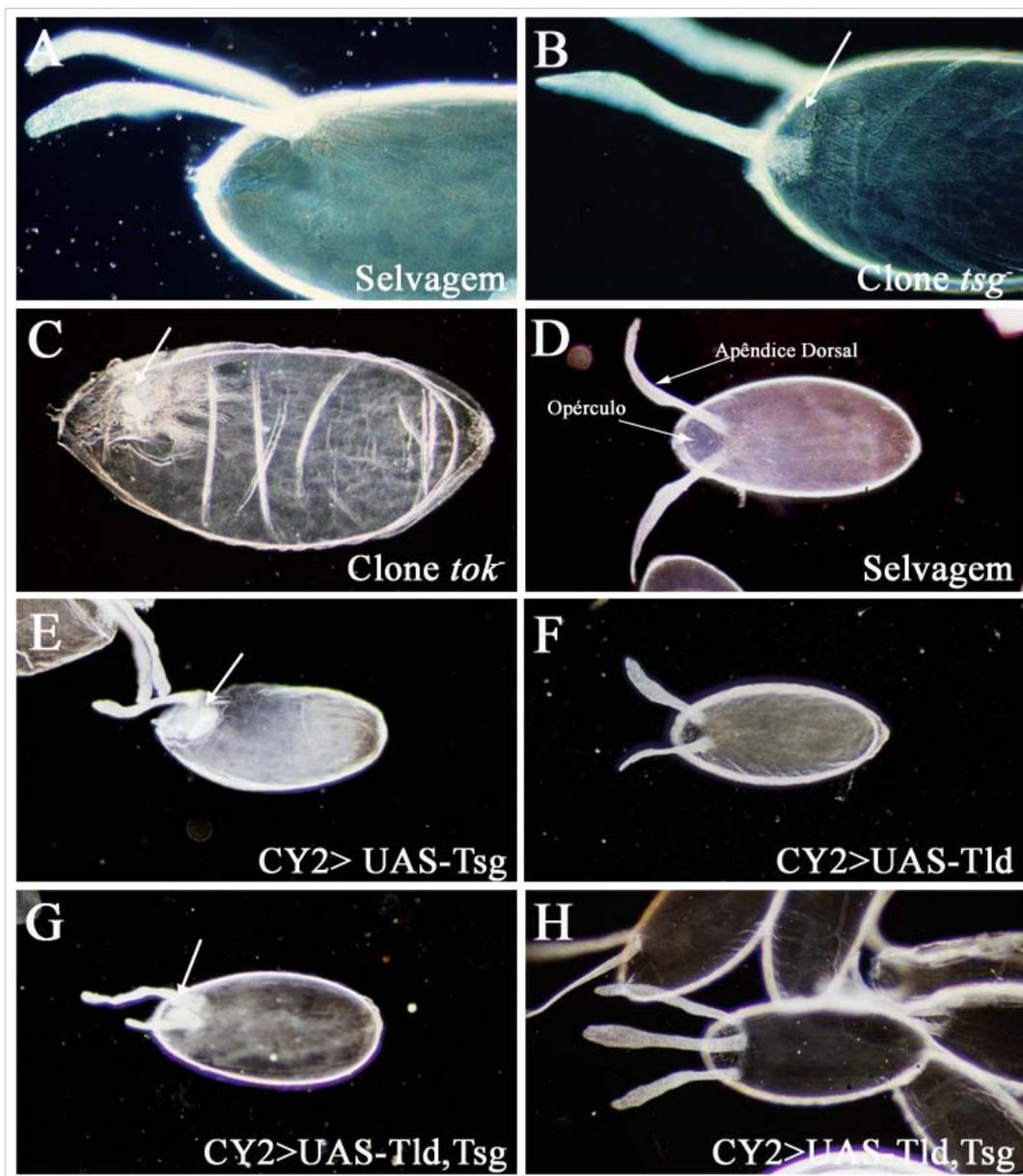


Figura 20: Efeitos dos clones nulos de *tok* e *tsg* e superexpressão de *Tld* e *Tsg* durante a oogênese na padronização de estruturas coriônicas. (A e D) embriões selvagens. (B) Embriões oriundos de clones de *tsg* a distância entre os apêndices dorsais é maior que no selvagem (B, compare com A), outros fenótipos estão listados na tabela 03. (C) Clones de *tok* geram fenótipos de redução dos apêndices dorsais e material ectópico na região antero-dorsal. A superexpressão de *Tsg*, *Tld* ou *Tld* + *Tsg* resulta em defeitos no córion como redução dos apêndices dorsais (E, F, G). A superexpressão de *Tld* e *Tsg* simultânea resulta, algumas vezes, apêndices dorsais extras (H). Os embriões A e B estão com vista lateral, C-H com vista dorsal.

Estes resultados indicam que Tok e Tld atuam na geração de fragmentos de Sog no espaço perivitelínico. Os fenótipos opostos gerados no embrião sugerem que Tld e Tok podem criar tanto um sinal dorsalizante assim como ventralizante, como os fragmentos de Sog com diferentes atividades, e Tsg alterar a produção destes sinais.

4.6. Correlação entre as atividades dos fragmentos de Sog e a atividade de Dpp.

Com o intuito de correlacionar as atividades de Sog e Dpp, superexpressamos Dpp com CY2 e 55B, e visualizamos seus efeitos sobre o córion. Quando superexpressamos Dpp com CY2-GAL4 a 29 °C, o opérculo é expandido e há perda dos apêndices dorsais (Twombly *et al.*, 1996; Dobens *et al.*, 2000) (fig. 21B). Provavelmente a formação do opérculo requer altos níveis de Dpp, enquanto que a formação dos apêndices dorsais requer um nível intermediário de sinalização de Dpp (Dobens *et al.*, 2000; Peri e Roth, 2000). Também superexpressamos Dpp com a linhagem 55B-GAL4, nas células foliculares anteriores sobre o oócito, sob diferentes condições de temperatura. Quando as fêmeas são expostas a 29 °C, geram embriões com fenótipo similar a Dpp expresso por CY2-GAL4 a 29 °C (fig. 21C). A 25 °C, os embriões apresentaram opérculo e material ectópico de apêndices dorsais na região anterior (fig. 21D). Quando a superexpressão de Dpp foi realizada a 18 °C, os apêndices dorsais com material ectópico entres estes (fig. 21E). Estes resultados mostram que o nível de Dpp expresso na região anterior é fundamental para padronização de estruturas anteriores. Interessantemente, os fenótipos observados a 18 °C são similares ao fenótipos observados com a superexpressão de SS1 e Sog Δ CR1,stem com 55B-GAL4 nas células foliculares anteriores ou associados a clones de células foliculares nulos de *tok* ou *tsg*. Dados na literatura convergem quanto ao papel de Sog em antagonizar a atividade de BMPs. Então, tais similaridades entre os fenótipos, indicam que os

fragmentos de Sog podem alterar a atividade e/ou a distribuição de Dpp endógeno no espaço perivitelínico. A visualização de fenótipos no embrião não foi possível nestas condições desde que a maioria dos embriões com Dpp superexpresso não são fertilizados devido à malformação da micrópila na região anterior do opérculo.

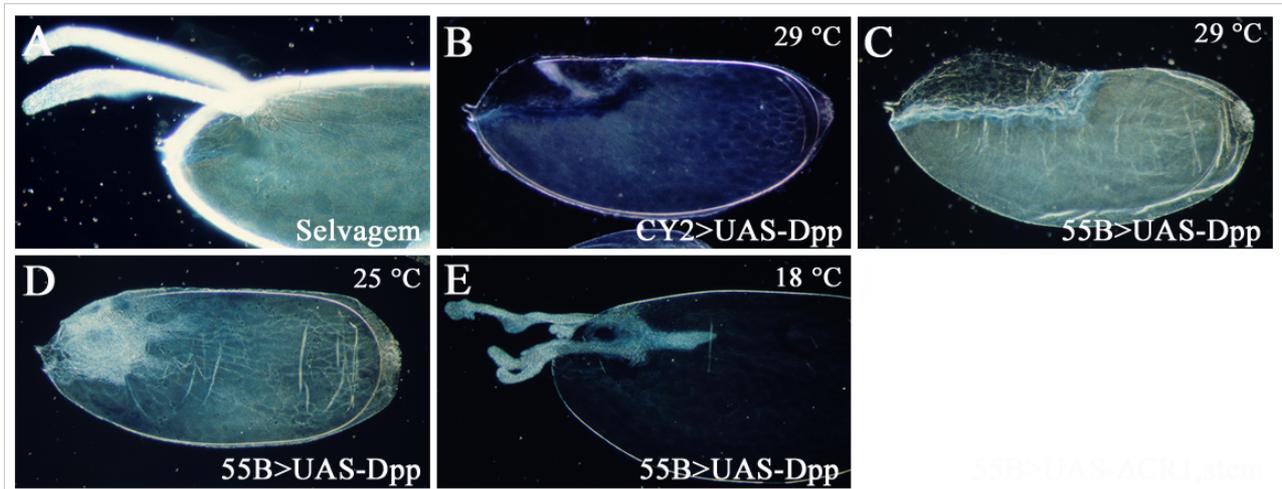


Figura 21: Efeitos da superexpressão de Dpp durante a oogênese na padronização de estruturas coriônicas. (A) embrião selvagem. (B) A superexpressão de Dpp pela CY2-GAL4, a 29 °C, resulta em expansão do opérculo em direção a região posterior e redução ou ausência dos apêndices dorsais. (C) O mesmo fenótipo é obtido quando Dpp é superexpresso pela 55B-GAL4 a 29 °C. (D) Entretanto, se a superexpressão é dirigida a temperatura de 25 °C vários embriões apresentam redução do opérculo e apêndices reduzidos. (E) Quando a superexpressão é realizada a 18 °C os embriões apresentam apêndices dorsais fusionados dorsalmente e material ectópico de apêndices na região anterior.

V. Discussão

5.1. Proteína Sog produzida pelas células foliculares é transferida para o embrião.

A atividade de Dpp, durante a embriogênese e no desenvolvimento das asas, é regulada pela atividade de Sog, Tsg e metaloproteases. Dados na literatura sugerem a participação de fragmentos de Sog na regulação da atividade de Dpp (Yu *et al.*, 2000). Da mesma forma, fragmentos de Chordin podem regular a atividade de BMPs durante o desenvolvimento de vertebrados (Millet *et al.*, 2001).

Neste trabalho, demonstramos que a proteína Sog, sintetizada pelas células foliculares permanece no espaço perivitelínico até o início da embriogênese. Observamos que vários fragmentos exógenos ou endógenos de Sog gerados durante a oogênese são encontrados também no embrião. No entanto, os fragmentos não são transferidos para o embrião de forma homogênea. É possível que alguns não sejam transferidos por estarem associados à membrana das células foliculares e conseqüentemente não são encontrados no espaço perivitelínico do embrião. Uma outra possibilidade, é de que alguns fragmentos sejam menos estáveis podendo ser degradados por outras proteases ou clivados em formas mais estáveis. A análise dos fragmentos de Sog superexpressos revelou que fragmentos N-terminais podem ser transferidos para o embrião.

Estudos revelam que algumas proteínas secretadas pelas células foliculares no espaço perivitelínico persistem neste local até o início da embriogênese. Um exemplo é a proteína Nudel (Ndl), que codifica uma serino protease (Hong e Hashimoto, 1995), secretada pelas células foliculares a qual permanece no espaço perivitelínico até o início da embriogênese. No embrião, a proteína Ndl somente atua após a fertilização, participando do início da cascata proteolítica que culmina na ativação do receptor Toll.

Assim, visto as atividades de Ndl e Pipe, as células foliculares geram uma assimetria no espaço perivitelínico para polarizar o embrião, e além disto, Ndl tem um papel na integridade do córion. (St Johnston e Nusslein-Volhard, 1992; Roth, 1998; Lemosy *et al.*, 1999). Resultados do grupo (Carneiro, Fontenele *et al.*, no prelo - Anexo A) indicam que Sog e seus fragmentos realmente estão presentes no espaço perivitelínico. Então, da mesma forma que Ndl, a proteína Sog e seus fragmentos gerados no folículo ovariano podem atuar no córion e embrião. Por outro lado, diferentemente de Ndl, Sog já se encontra ativa durante a oogênese, como discutimos abaixo.

5.2. A proteína Sog maternal exhibe distintas atividades.

Durante a embriogênese, tem sido proposto que Sog zigótico pode ter atividades antagônica e sinérgica em relação à atividade de Dpp. A atividade sinérgica se refere ao transporte de Dpp, que ligado no complexo com as proteínas Sog e Tsg, é levado para a região mais dorsal do embrião, formando um pico de atividade nesta região. A atividade antagônica se deve à proteína Sog impedir, por meio deste complexo, que Dpp ligue a seus receptores durante o transporte. Além disto, estudos indicam que alguns fragmentos de Sog possam ter atividade sinérgica em relação a Dpp em *D. melanogaster* (Yu *et al.*, 2004).

Durante a oogênese, a redução ou superexpressão de Sog gera diferentes fenótipos embrionários característicos de dorsalização ou ventralização, com alterações na posição e extensão da expressão de *vnd*. Isto sugere que Sog possua diferentes atividades. Da mesma forma, a superexpressão de fragmentos de Sog gerou fenótipos distintos. Já no córion, estes fragmentos também geram alterações nas estruturas anteriores. Os fenótipos apresentados nos apêndices dorsais e no opérculo são difíceis de interpretar pois a formação destas estruturas depende da interceptação de duas vias

de sinalização, EGFR e Dpp. Assim uma análise mais pormenorizada dos efeitos no córion, através da análise da expressão gênica no folículo ovariano seria necessária para evidenciar possíveis diferenças nas atividades dos fragmentos.

Quando realizamos clones de células foliculares nulas para *tok* e *tsg* ou superexpressão de Tok, Tld ou Tsg visualizamos fenótipos similares no embrião àqueles obtidos por superexpressão ou redução de Sog ou seus fragmentos. Da mesma forma, a redução da expressão de Tok ou Tsg resultou em alguns fenótipos similares no córion e também similares aos fenótipos gerados pelos clones de células foliculares nulas de Tld (Carneiro, Fontenele *et al.*, no prelo - Anexo A). Isto sugere a participação de fragmentos de Sog gerados provavelmente a partir do processamento por Tld e Tok, tendo Tsg como um agente que pode modificar o processamento de Sog. Desta forma, Sog pode exibir diferentes atividades através da geração de fragmentos produzidos durante a oogênese por ação das metaloproteases e Tsg.

Importante observar que a superexpressão destas moléculas durante a oogênese pode interferir na distribuição endógena de fragmentos ou relação substrato-metaloproteases. Este efeito pode gerar vários defeitos no eixo dorso-ventral ou na formação do córion que não necessariamente pode correlacionar com as atividades destas moléculas. Os resultados mais válidos para as atividades destas moléculas são os clones nulos destes genes onde somente retiramos ou reduzimos estas moléculas no espaço perivitelinico gerando efeito devido à sua falta.

5.3. Distribuição assimétrica de fragmentos de Sog no espaço perivitelinico.

Como elaborado acima, nossos resultados indicam que os fragmentos de Sog possuem atividades distintas, oriundos do processamento de Sog através da ação de metaloproteases como Tld e Tok. Resultados do grupo confirmam esta idéia e mostram

que as metaloproteases Tld e Tok são expressas em células foliculares ventrais durante a oogênese (Carneiro, Fontenele *et al.*, no prelo - Anexo A). A expressão assimétrica destas metaloproteases sugere uma produção assimétrica dos fragmentos de Sog. Nossos resultados mostram que os diferentes fenótipos no córion e no embrião estão associados com a localização de clones de células foliculares nulos de Sog marcados com *dec*. Somente clones de células foliculares nulos para *sog* ventrais são relacionados a fenótipos de dorsalização no embrião enquanto que clones nulos dorsais não geram fenótipos embrionários. Clones nulos na região ventro-anterior ou dorsal, adjacentes aos apêndices dorsais, são associados a fenótipos nas estruturas anteriores do córion, enquanto que clones nulos ventrais ou posteriores não geram fenótipos coriônicos. Isto sugere a distribuição de atividades de Sog no espaço perivitelínico. Estas atividades podem ser realizadas através dos fragmentos de Sog.

Paralelamente, a baixa superexpressão de Dpp (fig. 20E, 18 °C) nas células foliculares anteriores gera fenótipos coriônicos onde os apêndices dorsais apresentam material ectópico e estão fundidos em sua base (Muzzopappa e Wappner, 2005, Carneiro, Fontenele *et al.*, no prelo - Anexo A). Considerando a similaridade entre este fenótipo de fusão nos apêndices dorsais advindos de clones de células foliculares nulos para *sog*, localizados na região dorsal, assim como o antagonismo bem estabelecido entre Sog e Dpp, torna-se bastante provável que o fenótipo de fusão dos apêndices seja devido à perda de um antagonismo a Dpp exercido por Sog.

As metaloproteases Tld e Tok, e a proteína Tsg são expressas nas células foliculares ventrais. Isto sugere fortemente a produção de fragmentos de Sog na região ventral. Consequentemente, podemos sugerir que alguns fragmentos podem difundir para a região dorsal. Os fenótipos apresentados por clones nulos ventrais de Sog sugerem esta mobilidade. Além disto, os fenótipos dos clones células foliculares nulos de

tok e *tsg* possuem efeitos não-autônomos, isto é, os efeitos são observados além dos clones, em células vizinhas, indicando que a redução do processamento de Sog, via a redução de Tok e Tsg, altera a padronização das estruturas anteriores do córion.

Tem se sugerido que a proteína Tsg é importante para a mobilidade e processamento de Sog durante a embriogênese (Marques *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2000; Shimi e O'Connor, 2003). Mostramos que Tsg é expresso nas células foliculares ventrais durante a oogênese. Esta expressão assimétrica é similar à expressão de *tld* e *tok*. Tsg pode então modificar o processamento de Sog maternal e principalmente a mobilidade de fragmentos produzidos ventralmente. Os fenótipos extremos, de expansão do domínio de expressão de *vnd* para toda a região dorsal, gerados pela superexpressão de Tld e Tsg, simultaneamente, sugerem que Tsg modifica a atividade de Tld provavelmente alterando o processamento de Sog e/ou a mobilidade dos fragmentos.

Clones células foliculare nulos de *tld* e *sog* influenciam a distribuição de fragmentos de Sog ao longo do eixo dorso-ventral do folículo ovariano (Carneiro, Fontenele *et al.*, no prelo - Anexo A). Baseado nestes e nos resultados deste trabalho, sugerimos que os fragmentos de Sog com o domínio CR1 tem pouca mobilidade quando comparados com formas que contém o domínio CR2. Isto é confirmado quando superexpressamos SS1 e SS4 que geram alargamento do domínio de *vnd* localizados, enquanto que a superexpressão de Sog, CR1,2 e Sog Δ CR1,stem geram modificações homogêneas da expressão gênica ao longo de toda a extensão do embrião. Portanto, as atividades distintas dos fragmentos podem ser polarizadas no espaço perivitelínico. Outro dado que reforça esta hipótese são os fenótipos obtidos nas estruturas anteriores do córion quando expressamos Sog Δ CR1,stem na região posterior do oócito.

Quando as formas SS1 e Sog Δ CR1,stem são superexpressas nas células foliculares anteriores, com 55B-GAL4, estas não geram fenótipos no embrião, mas resultam em alterações no córion. Este efeito pode ter várias causas. Primeiramente estas formas podem se associar preferencialmente à membrana plasmática das células foliculares e portanto não são transferidas ao embrião. No entanto, se isto explica a ausência de fenótipos embrionários, a superexpressão com CY2-GAL4 também não deveria gerar fenótipos ou estes teriam penetrância muito reduzida, diferentemente do que observamos. Na segunda hipótese, é de que na região anterior a atividade de Dpp, em relação à padronização do embrião, seria mais robusta a alterações na atividade de Sog do que para a formação do córion. Assim, a superexpressão de alguns fragmentos com 55B-GAL4 pode não alterar a atividade de Dpp na padronização do eixo dorso-ventral do embrião. Talvez a superexpressão destas formas alterem a distribuição e/ou produção de outros fragmentos de Sog importantes para o córion e/ou para o embrião.

É importante observar que a superexpressão dos fragmentos de Sog, Tld, Tok e Tsg ou a redução da expressão destas moléculas resulta em fenótipos similares, tanto no córion como no embrião. No entanto, esperávamos que os fenótipos gerados pela superexpressão ou reduzindo a expressão destas moléculas gerassem fenótipos distintos. Os fenótipos similares observados pela superexpressão ou redução da expressão destas moléculas sugerem que o balanço e/ou a distribuição das formas de Sog, Tld, Tok e Tsg no espaço perivitelínico é importante para a formação do córion e do eixo dorso-ventral embrionário.

5.4. Sog e a modulação da atividade de Dpp

Nossos resultados indicam que Sog maternal possui uma função dual na padronização do córion e do eixo dorso-ventral do embrião. Esta dupla ação é similar à

estabelecida para a proteína Ndl, cuja atividade é responsável pela formação do córion e ativação de uma cascata proteolítica com ação no desenvolvimento do embrião (Lemosy e Hashimoto, 2000). De acordo com o modelo de atividade antagônica entre Sog e Dpp, durante a oogênese, é necessária a geração de um gradiente de Dpp no espaço perivitelínico para a padronização do eixo dorso-ventral do embrião de *D. melanogaster* (Araujo e Bier, 2000). A função mais bem estabelecida para Sog é de modular a atividade de Dpp (Biehs *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2003). Desta forma, os fenótipos apresentados no córion ou no embrião, quando aumentamos ou reduzimos a expressão de Sog são devidos a alterações na atividade de Dpp.

Os clones de células foliculare nulos de *tld*, *tok*, *tsg* e *sog* nas células foliculares anteriores geram fenótipos de fusão na base dos apêndices dorsais ou redução do opérculo e material ectópico de apêndice dorsal na região ântero-dorsal. Estes fenótipos são similares aos fenótipos observados quando superexpressamos Dpp a 25 ou 18 °C. A formação dos apêndices dorsais requer níveis intermediários de Dpp. Isto sugere que nestes clones houve uma perda no antagonismo na atividade de Dpp, exercida por Sog e seus fragmentos. Desta forma, o sinal de Dpp é elevado na região ântero-dorsal quando realizamos os clones nulos em células foliculare destas moléculas. Isto reforça a hipótese de que exista uma distribuição diferencial de fragmentos com atividades diferentes, pois os efeitos dos clones são não-autônomos.

Com bases nos dados da literatura e no modelo de transporte de Dpp durante a embriogênese propomos que na região ventro-anterior a taxa de clivagem de Sog é maior, pois neste local Sog, Tld e Dpp são encontrados simultaneamente. Isto poderia levar à distribuição diferencial de fragmentos de Sog ao longo do eixo dorso-ventral. A análise da distribuição da proteína Sog no folículo ovariano confirma estas expectativas, já que foi mostrado por imunohistoquímica que há visualmente maior quantidade de

fragmentos na região ventral (Carneiro, Fontenele *et al.*, no prelo - Anexo A). Podemos também especular que a presença de Tsg num domínio ventral, favorece o movimento de fragmentos de Sog em direção dorsal. Assim, uma distribuição assimétrica de fragmentos de Sog é formada com uma orientação oblíqua a partir da região ventro-anterior (veja esquema no artigo anexo). As moléculas de Dpp, Tsg e Sog ou fragmentos com o domínio CR2, seriam responsáveis pelo carregamento de Dpp para a região dorsal do folículo, local onde ele seria liberado para se ligar aos receptores na membrana, estejam eles presentes na células foliculares ou mais tarde na membrana plasmática do embrião. Os fragmentos de Sog com o domínio CR1, por terem menor mobilidade, se ligam a Dpp na região ventral. Estes fragmentos impedem que Dpp se ligue aos seus receptores na membrana do embrião e das células foliculares na região ventral. Desta forma, as células foliculares geram uma assimetria espacial através da atividade de diferentes fragmentos de Sog no espaço perivitelínico.

Os fenótipos constantemente obtidos com os clones de células foliculares homozigotas nulas de *sog*, *tld* e *tsg* e a superexpressão de Sog, Tld e Tsg e alguns fragmentos de Sog que geram modificações na largura de expressão do domínio de *vnd*, expandido para a região ventral ou em direção à região dorsal. Fenótipos com alterações na extensão do domínio de expressão de genes neuroectodermiais, que respondem a baixos níveis de Dorsal no núcleo, podem refletir alterações na inclinação do gradiente de Dorsal no embrião. Deste modo, as alterações no domínio de expressão de *vnd*, um gene neuroectodermal, sugere que a atividade de Dpp na padronização do eixo dorso-ventral é requerida provavelmente para ajustar a inclinação do gradiente de Dorsal.

Uma análise mais detalhada do papel de Tld, Tok e Tsg na geração assimétrica dos fragmentos de Sog é necessária para que se compreendam as funções particulares a cada molécula. Interessantemente, dados do laboratório (Carneiro, Fontenele *et al.*, no

prelo - Anexo A) mostram que a expressão de *tld* e *tok* é regulada pela via de EGFR. É provável que a expressão de *tsg* seja também regulada por esta via, desde que é a única via responsável pela polarização das células foliculares. Uma análise da expressão de *tsg* sob alterações da via de EGFR poderá esclarecer esta questão.

Em *D. melanogaster* existem outros dois BMPs: Scw e Gbb. A participação destes BMPs é improvável que ocorra na padronização do eixo dorso-ventral embrionário (Carneiro, Fontenele *et al.*, no prelo - Anexo A). Entretanto, não foi examinada ainda a participação destes BMPs na formação do córion, assim como não há dados de expressão destes BMPs nas células foliculares. Será interessante realizar esta análise no futuro, já que dados da literatura mostram que o fragmento SS1 pode antagonizar a ação de de Dpp e de Gbb durante o desenvolvimento das asas (Yu *et al.*, 2004). Assim, não descartamos a possibilidade de outros BMPs estarem atuando na padronização do córion do embrião.

VI. Conclusões:

A) A proteína Sog e diferentes fragmentos, produzidos durante a oogênese, são encontrados no embrião, antes da expressão de genes zigóticos

B) A proteína Sog exibe diferentes atividades na padronização do eixo dorso-ventral do embrião através de fragmentos gerados durante a oogênese, possivelmente pelas metaloproteases.

C) Evidenciamos que o gene *tsg* é expresso assimetricamente durante a oogênese, nas células foliculares ventrais. Então, Tsg pode contribuir para a geração assimétrica de fragmentos de Sog durante a oogênese.

D) As metaloproteases Tok e Tld e a proteína Tsg possuem atividades durante a oogênese, possivelmente na geração de fragmentos de Sog que estão atuando na padronização do eixo dorso-ventral do embrião de *D. melanogaster*.

E) Há forte possibilidade de existir uma distribuição espacial de diferentes fragmentos com atividades distintas. Além disto, estes fragmentos podem ter diferentes mobilidades.

F) As similaridades entre os fenótipos coriônicos de clones de *tok*, *tsg* e *sog* indicam que Sog e seus fragmentos atuam na modulação da atividade de Dpp, durante a oogênese.

VII. Referências

- Araujo, H. e Bier, E.** (2000). *sog and dpp exert opposing maternal functions to modify toll signaling and pattern the dorsoventral axis of the Drosophila embryo*. Development 127(16): 3631-44.
- Araujo, H., Negreiros, E. e Bier, E.** (2003). *Integrins modulate Sog activity in the Drosophila wing*. Development 130(16): 3851-64.
- Arora, K., Levine, M. S. e O'Connor, M. B.** (1994). *The screw gene encodes a ubiquitously expressed member of the TGF-beta family required for specification of dorsal cell fates in the Drosophila embryo*. Genes Dev 8(21): 2588-601.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ashe, H. L.** (2002). *BMP signalling: visualisation of the Sog protein gradient*. Curr Biol 12(8): R273-5.
- Belvin, M. P., Jin, Y. e Anderson, K. V.** (1995). *Cactus protein degradation mediates Drosophila dorsal-ventral signaling*. Genes Dev 9(7): 783-93.
- Bergmann, A., Stein, D., Geisler, R., Hagenmaier, S., Schmid, B., Fernandez, N., Schnell, B. e Nusslein-Volhard, C.** (1996). *A gradient of cytoplasmic Cactus degradation establishes the nuclear localization gradient of the dorsal morphogen in Drosophila*. Mech Dev 60(1): 109-23.
- Biehs, B., Francois, V. e Bier, E.** (1996). *The Drosophila short gastrulation gene prevents Dpp from autoactivating and suppressing neurogenesis in the neuroectoderm*. Genes Dev 10(22): 2922-34.
- Bier, E.** (1997). *Anti-neural-inhibition: a conserved mechanism for neural induction*. Cell 89(5): 681-4.
- Blank, V., Kourilsky, P. e Israel, A.** (1992). *NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats*. Trends Biochem Sci 17(4): 135-40.
- Bloomington Drosophila Stock Center** (<http://fly.bio.indiana.edu>). Acessado em 17/03/2006.
- Brand, A. H. e Perrimon, N.** (1993). *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development 118(2): 401-15.
- Brummel, T. J., Twombly, V., Marques, G., Wrana, J. L., Newfeld, S. J., Attisano, L., Massague, J., O'Connor, M. B. e Gelbart, W. M.** (1994). *Characterization and relationship of Dpp receptors encoded by the saxophone and thick veins genes in Drosophila*. Cell 78(2): 251-61.
- Chang, C., Holtzman, D. A., Chau, S., Chickering, T., Woolf, E. A., Holmgren, L. M., Bodorova, J., Gearing, D. P., Holmes, W. E. e Brivanlou, A. H.** (2001). *Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist*. Nature 410(6827): 483-7.
- Chasan, R., e Anderson, K. V.** (1993). *Maternal control polarity and pattern in the embryo. The developmental of Drosophila melanogaster*. Vol. 1. (Ed. M. Bate e A. Martinez Arias). pp. 387-424. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring harbor Laboratory Press.
- De Robertis, E. M. e Sasai, Y.** (1996). *A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria*. Nature 380(6569): 37-40.
- Decotto, E. e Ferguson, E. L.** (2001). *A positive role for Short gastrulation in modulating BMP signaling during dorsoventral patterning in the Drosophila embryo*. Development 128(19): 3831-41.

- Dobens, L. L., Peterson, J. S., Treisman, J. e Raftery, L. A.** (2000). *Drosophila bunched integrates opposing DPP and EGF signals to set the operculum boundary*. *Development* 127(4): 745-54.
- Duffy, J. B., Harrison, D. A. e Perrimon, N.** (1998). *Identifying loci required for follicular patterning using directed mosaics*. *Development* 125(12): 2263-71.
- Entchev, E. V., Schwabedissen, A. e Gonzalez-Gaitan, M.** (2000). *Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp*. *Cell* 103(6): 981-91.
- Finelli, A. L., Xie, T., Bossie, C. A., Blackman, R. K. e Padgett, R. W.** (1995). *The tolkin gene is a tolloid/BMP-1 homologue that is essential for Drosophila development*. *Genetics* 141(1): 271-81.
- Flybase** **nomenclature**
(<http://www.flybase.org/docs/nomenclature/lk/nomenclature.html>). *Genetic nomenclature for Drosophila melanogaster*. Acessado em 17/03/2006.
- Flybase stocks** (<http://flystocks.bio.indiana.edu/browse.htm>). *Bloomington Stocks*. Acessado em 17/03/2006.
- Flybase. A Database of the Drosophila Genome** (<http://www.flybase.org/>). Acessado em 17/03/2006.
- Francois, V. e Bier, E.** (1995). *Xenopus chordin and Drosophila short gastrulation genes encode homologous proteins functioning in dorsal-ventral axis formation*. *Cell* 80(1): 19-20.
- Francois, V., Solloway, M., O'Neill, J. W., Emery, J. e Bier, E.** (1994). *Dorsal-ventral patterning of the Drosophila embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene*. *Genes Dev* 8(21): 2602-16.
- Geisler, R., Bergmann, A., Hiromi, Y. e Nusslein-Volhard, C.** (1992). *cactus, a gene involved in dorsoventral pattern formation of Drosophila, is related to the I kappa B gene family of vertebrates*. *Cell* 71(4): 613-21.
- Golic, K. G.** (1991). *Site-specific recombination between homologous chromosomes in Drosophila*. *Science* 252(5008): 958-61.
- Harland, R. M.** (2001). *Developmental biology. A twist on embryonic signalling*. *Nature* 410(6827): 423-4.
- Hemmati-Brivanlou, A. e Melton, D.** (1997). *Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise*. *Cell* 88(1): 13-7.
- Holley, S. A., Jackson, P. D., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E. M., Hoffmann, F. M. e Ferguson, E. L.** (1995). *A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin*. *Nature* 376(6537): 249-53.
- Holley, S. A., Neul, J. L., Attisano, L., Wrana, J. L., Sasai, Y., O'Connor, M. B., De Robertis, E. M. e Ferguson, E. L.** (1996). *The Xenopus dorsalizing factor noggin ventralizes Drosophila embryos by preventing DPP from activating its receptor*. *Cell* 86(4): 607-17.
- Hong, C. C. e Hashimoto, C.** (1995). *An unusual mosaic protein with a protease domain, encoded by the nudel gene, is involved in defining embryonic dorsoventral polarity in Drosophila*. *Cell* 82(5): 785-94.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K. e Levine, M.** (1992). *dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo*. *Genes Dev* 6(8): 1518-30.
- Kidd, S.** (1992). *Characterization of the Drosophila cactus locus and analysis of interactions between cactus and dorsal proteins*. *Cell* 71(4): 623-35.

- Kosman, D., Ip, Y. T., Levine, M. e Arora, K. (1991). *Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the Drosophila embryo*. Science 254(5028): 118-22.
- LeMosy, E. K., Hong, C. C. e Hashimoto, C. (1999). *Signal transduction by a protease cascade*. Trends Cell Biol 9(3): 102-7.
- Letsou, A., Arora, K., Wrana, J. L., Simin, K., Twombly, V., Jamal, J., Staehling-Hampton, K., Hoffmann, F. M., Gelbart, W. M., Massague, J. e et al. (1995). *Drosophila Dpp signaling is mediated by the punt gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family*. Cell 80(6): 899-908.
- Lindsley, D. L. e Zimm, G. G. (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press.
- Marques, G., Musacchio, M., Shimell, M. J., Wunnenberg-Stapleton, K., Cho, K. W. e O'Connor, M. B. (1997). *Production of a DPP activity gradient in the early Drosophila embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins*. Cell 91(3): 417-26.
- Mason, E. D., Konrad, K. D., Webb, C. D. e Marsh, J. L. (1994). *Dorsal midline fate in Drosophila embryos requires twisted gastrulation, a gene encoding a secreted protein related to human connective tissue growth factor*. Genes Dev 8(13): 1489-501.
- Massague, J. (1998). *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem 67: 753-91.
- Millet, C., Lemaire, P., Orsetti, B., Guglielmi, P. e Francois, V. (2001). *The human chordin gene encodes several differentially expressed spliced variants with distinct BMP opposing activities*. Mech Dev 106(1-2): 85-96.
- Morisato, D. e Anderson, K. V. (1994). *The spatzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo*. Cell 76(4): 677-88.
- Morisato, D. e Anderson, K. V. (1995). *Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo*. Annu Rev Genet 29: 371-99.
- Muzzopappa, M. e Wappner, P. (2005). *Multiple roles of the F-box protein Slimb in Drosophila egg chamber development*. Development 132(11): 2561-71.
- Nellen, D., Affolter, M. e Basler, K. (1994). *Receptor serine/threonine kinases implicated in the control of Drosophila body pattern by decapentaplegic*. Cell 78(2): 225-37.
- Neuman-Silberberg, F. S. e Schupbach, T. (1993). *The Drosophila dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein*. Cell 75(1): 165-74.
- Nguyen, T., Jamal, J., Shimell, M. J., Arora, K. e O'Connor, M. B. (1994). *Characterization of tolloid-related-1: a BMP-1-like product that is required during larval and pupal stages of Drosophila development*. Dev Biol 166(2): 569-86.
- Nilson, L. A. e Schupbach, T. (1998). *Localized requirements for windbeutel and pipe reveal a dorsoventral prepatterning within the follicular epithelium of the Drosophila ovary*. Cell 93(2): 253-62.
- Nusslein-Volhard, C. e Wieschaus, E. (1980). *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. Nature 287(5785): 795-801.
- Oelgeschlager, M., Larrain, J., Geissert, D. e De Robertis, E. M. (2000). *The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling*. Nature 405(6788): 757-63.
- O'Neill, J. W. e Bier, E. (1994). *Double-label in situ hybridization using biotin and digoxigenin-tagged RNA probes*. Biotechniques 17(5): 870, 874-5.

- Padgett, R. W., St Johnston, R. D. e Gelbart, W. M.** (1987). *A transcript from a Drosophila pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family*. Nature 325(6099): 81-4.
- Padgett, R. W., Wozney, J. M. e Gelbart, W. M.** (1993). *Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo*. Proc Natl Acad Sci U S A 90(7): 2905-9.
- Penton, A., Chen, Y., Staehling-Hampton, K., Wrana, J. L., Attisano, L., Szidonya, J., Cassill, J. A., Massague, J. e Hoffmann, F. M.** (1994). *Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in Drosophila and evidence that Brk25D is a decapentaplegic receptor*. Cell 78(2): 239-50.
- Peri, F. e Roth, S.** (2000). *Combined activities of Gurken and decapentaplegic specify dorsal chorion structures of the Drosophila egg*. Development 127(4): 841-50.
- Queenan, A. M., Ghabrial, A. e Schupbach, T.** (1997). *Ectopic activation of torpedo/Egfr, a Drosophila receptor tyrosine kinase, dorsalizes both the eggshell and the embryo*. Development 124(19): 3871-80.
- Ray, R. P., Arora, K., Nusslein-Volhard, C. e Gelbart, W. M.** (1991). *The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the Drosophila embryo*. Development 113(1): 35-54.
- Ross, J. J., Shimmi, O., Vilmos, P., Petryk, A., Kim, H., Gaudenz, K., Hermanson, S., Ekker, S. C., O'Connor, M. B. e Marsh, J. L.** (2001). *Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist*. Nature 410(6827): 479-83.
- Roth, S.** (2003). *The origin of dorsoventral polarity in Drosophila*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 358(1436): 1317-29; discussion 1329.
- Roth, S.** (1998). *Drosophila development: the secrets of delayed induction*. Curr Biol 8(25): R906-10.
- Roth, S., Stein, D. e Nusslein-Volhard, C.** (1989). *A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the Drosophila embryo*. Cell 59(6): 1189-202.
- Ruberte, E., Marty, T., Nellen, D., Affolter, M. e Basler, K.** (1995). *An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and thick veins, for dpp signaling in vivo*. Cell 80(6): 889-97.
- Rusch, J. e Levine, M.** (1996). *Threshold responses to the dorsal regulatory gradient and the subdivision of primary tissue territories in the Drosophila embryo*. Curr Opin Genet Dev 6(4): 416-23.
- Rushlow, C. A., Han, K., Manley, J. L. e Levine, M.** (1989). *The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in Drosophila*. Cell 59(6): 1165-77.
- Sampath, T. K., Rashka, K. E., Doctor, J. S., Tucker, R. F. e Hoffmann, F. M.** (1993). *Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A 90(13): 6004-8.
- Sasai, Y. e De Robertis, E. M.** (1997). *Ectodermal patterning in vertebrate embryos*. Dev Biol 182(1): 5-20.
- Schmidt, J., Francois, V., Bier, E. e Kimelman, D.** (1995). *Drosophila short gastrulation induces an ectopic axis in Xenopus: evidence for conserved mechanisms of dorsal-ventral patterning*. Development 121(12): 4319-28.
- Scott, I. C., Blitz, I. L., Pappano, W. N., Maas, S. A., Cho, K. W. e Greenspan, D. S.** (2001). *Homologues of Twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signalling*. Nature 410(6827): 475-8.

- Sen, J., Goltz, J. S., Stevens, L. e Stein, D. (1998). *Spatially restricted expression of pipe in the Drosophila egg chamber defines embryonic dorsal-ventral polarity*. Cell 95(4): 471-81.
- Serpe, M., Ralston, A., Blair, S. S. e O'Connor, M. B. (2005). *Matching catalytic activity to developmental function: tolloid-related processes Sog in order to help specify the posterior crossvein in the Drosophila wing*. Development 132(11): 2645-56.
- Shimell, M. J., Ferguson, E. L., Childs, S. R. e O'Connor, M. B. (1991). *The Drosophila dorsal-ventral patterning gene tolloid is related to human bone morphogenetic protein 1*. Cell 67(3): 469-81.
- Shimmi, O. e O'Connor, M. B. (2003). *Physical properties of Tld, Sog, Tsg and Dpp protein interactions are predicted to help create a sharp boundary in Bmp signals during dorsoventral patterning of the Drosophila embryo*. Development 130(19): 4673-82.
- Shimmi, O., Umulis, D., Othmer, H. e O'Connor, M. B. (2005). *Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the Drosophila blastoderm embryo*. Cell 120(6): 873-86.
- Smith, C. L. e DeLotto, R. (1994). *Ventralizing signal determined by protease activation in Drosophila embryogenesis*. Nature 368(6471): 548-51.
- Srinivasan, S., Rashka, K. E. e Bier, E. (2002). *Creation of a Sog morphogen gradient in the Drosophila embryo*. Dev Cell 2(1): 91-101.
- St Johnston, D. e Nusslein-Volhard, C. (1992). *The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo*. Cell 68(2): 201-19.
- Stathopoulos, A. e Levine, M. (2002). *Dorsal gradient networks in the Drosophila embryo*. Dev Biol 246(1): 57-67.
- Stein, D. e Nusslein-Volhard, C. (1992). *Multiple extracellular activities in Drosophila egg perivitelline fluid are required for establishment of embryonic dorsal-ventral polarity*. Cell 68(3): 429-40.
- Steward, R. (1987). *Dorsal, an embryonic polarity gene in Drosophila, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel*. Science 238(4827): 692-4.
- Steward, R. (1989). *Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function*. Cell 59(6): 1179-88.
- Sullivan, W., Ashburner, M., Hawley, R. S. (2000). *Drosophila Protocols. Anatomical Drawings of Drosophila*. pp. 636-637. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring harbor Laboratory Press.
- Tautz, D. e Pfeifle, C. (1989). *A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in Drosophila embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback*. Chromosoma 98(2): 81-5.
- Twombly, V., Blackman, R. K., Jin, H., Graff, J. M., Padgett, R. W. e Gelbart, W. M. (1996). *The TGF-beta signaling pathway is essential for Drosophila oogenesis*. Development 122(5): 1555-65.
- Whalen, A. M. e Steward, R. (1993). *Dissociation of the dorsal-cactus complex and phosphorylation of the dorsal protein correlate with the nuclear localization of dorsal*. J Cell Biol 123(3): 523-34.
- Wharton, K. A., Thomsen, G. H. e Gelbart, W. M. (1991). *Drosophila 60A gene, another transforming growth factor beta family member, is closely related to human bone morphogenetic proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A 88(20): 9214-8.
- Wolpert, L. (1969). *Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation*. J Theor Biol 25(1): 1-47.

-
-
- Yu, K., Kang, K. H., Heine, P., Pyati, U., Srinivasan, S., Biehs, B., Kimelman, D. e Bier, E.** (2004). *Cysteine repeat domains and adjacent sequences determine distinct bone morphogenetic protein modulatory activities of the Drosophila Sog protein*. *Genetics* 166(3): 1323-36.
- Yu, K., Srinivasan, S., Shimmi, O., Biehs, B., Rashka, K. E., Kimelman, D., O'Connor, M. B. e Bier, E.** (2000). *Processing of the Drosophila Sog protein creates a novel BMP inhibitory activity*. *Development* 127(10): 2143-54.
- Yu, K., Sturtevant, M. A., Biehs, B., Francois, V., Padgett, R. W., Blackman, R. K. e Bier, E.** (1996). *The Drosophila decapentaplegic and short gastrulation genes function antagonistically during adult wing vein development*. *Development* 122(12): 4033-44.

Anexo A:

Os resultados apresentados neste trabalho fizeram parte dos resultados do artigo, intitulado “Graded maternal Short gastrulation protein contributes to embryonic dorsolventral patterning by delayed induction”, aceito na *Development Biology* a ser publicado nos próximos meses.

Accepted Manuscript

Graded maternal Short gastrulation protein contributes to embryonic dorsal-ventral patterning by delayed induction

K. Carneiro, M. Fontenele, E. Negreiros, E. Lopes, E. Bier, H. Araujo

PII: S0012-1606(06)00751-2
DOI: doi:[10.1016/j.ydbio.2006.04.453](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.04.453)
Reference: YDBIO 2585

To appear in: *Developmental Biology*

Received date: 2 December 2005
Revised date: 4 April 2006
Accepted date: 19 April 2006



Cite this article as: Carneiro, K., Fontenele, M., Negreiros, E., Lopes, E., Bier, E., Araujo, H., Graded maternal Short gastrulation protein contributes to embryonic dorsal-ventral patterning by delayed induction, *Developmental Biology*, doi:[10.1016/j.ydbio.2006.04.453](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.04.453)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review before it is published in its final citable form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Graded maternal Short gastrulation protein contributes to embryonic dorsal-ventral patterning by delayed induction

Carneiro, K* ; Fontenele, M.* ; Negreiros, E.; Lopes, E., Bier, E.+ and Araujo, H.

Dept. Histology and Embryology, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

+Section of Cell and Developmental Biology, University of California at San Diego, La Jolla, CA, USA

Correspondence:

H.M. Araujo

Departamento de Histologia e Embriologia, UFRJ

CCS, Bl. F, Sala F2-031

Av. Brig. Trompowski, s/n

21949-900 Rio de Janeiro, RJ

Brazil

E-mail: haraujo@histo.ufrj.br

Running title: Sog patterns embryo by delayed induction

Keywords: *short gastrulation (sog)*, *decapentaplegic (dpp)*, *tolloid (tld)*, oogenesis, DV patterning, *Drosophila*

*the two authors contributed equally to this work

Total words: main text: 7151

figure legends: 2512

Summary

Establishment of the Dorsal-Ventral (DV) axis of the *Drosophila* embryo depends on ventral activation of the maternal Toll pathway, which creates a gradient of the NFkB/c-rel related transcription factor Dorsal. Signaling through the maternal BMP pathway also alters the Dorsal gradient, probably by regulating degradation of the IkB homologue Cactus. The BMP4 homologue *decapentaplegic* (*dpp*) and the BMP antagonist *short gastrulation* (*sog*) are expressed by follicle cells during mid-oogenesis, but it is unknown how they affect embryonic patterning following fertilization. Here we provide evidence that maternal Sog and Dpp proteins are secreted into the perivitelline space where they remain until early embryogenesis to modulate Cactus degradation, enabling their dual function in patterning the eggshell and embryo. We find that metalloproteases encoded by *tolloid* (*tld*) and *tolkin* (*tok*), which cleave Sog, are expressed by follicle cells and are required to generate DV asymmetry in the Dpp signal. Expression of *tld* and *tok* is ventrally restricted by the TGF- α ligand encoded by *gurken*, suggesting that signaling via the EGF-Receptor pathway may regulate embryonic patterning through two independent mechanisms: by restricting the expression of *pipe* and thereby activation of Toll signaling, and by spatially regulating BMP activity.

Introduction

Establishing gene expression territories of precise size and position is a prerequisite for the formation of tissues and organs during development. In *Drosophila*, several loci are required to define domains along the embryonic dorsal-ventral (DV) axis. DV patterning is initiated during oogenesis, by the TGF α -like protein encoded by *gurken* (*grk*) (Neuman-Silberberg and Schupbach, 1993). Dorsal-anterior expression of *grk* in the oocyte activates EGF receptor signaling in overlying dorsal follicle cells, spatially restricting the expression of *pipe* (*pip*) to the ventral follicular epithelium (Peri et al., 2002; Sen et al., 1998). *pip* encodes a glucosaminoglycan modifying enzyme (Sen et al., 2000; Sen et al., 1998) believed to spatially regulate activation of the Toll receptor pathway. In addition to *pip*, *nudel* (*ndl*) is expressed by follicle cells (Hong and Hashimoto, 1995). *ndl* encodes a serine protease that is secreted into the perivitelline fluid, between the vitelline and oocyte plasma membranes, and then transferred to the future embryo where it acts following fertilization by a mechanism referred to as “delayed induction” (LeMosy et al., 1999; Roth, 1998; St Johnston and Nusslein-Volhard, 1992). Nudel most likely functions by triggering the proteolytic cascade required to generate the activated Toll ligand encoded by *Spätzle* (LeMosy et al., 1998).

After *Spätzle* is processed and activated ventrally by the maternal protease cascade, it binds to the maternal Toll receptor, triggering graded Toll signaling in a ventral-to-dorsal fashion (Ray and Schupbach, 1996). Toll signaling induces ubiquitination and degradation of the cytoplasmic I κ B homologue protein Cactus (Cact) (Anderson et al., 1985; Hecht and Anderson, 1993; Roth et al., 1991; Shelton and Wasserman, 1993) resulting in nuclear translocation of the Rel-like transcription factor Dorsal (Dl) (Steward, 1989). A ventral-to-dorsal gradient of nuclear Dl is thus formed, defining the primary domains of zygotic gene expression in the ventral mesoderm, lateral neuroectoderm and dorsal ectoderm (Stathopoulos and Levine, 2002). Although signaling via the Toll pathway is sufficient to establish several distinct domains of gene expression along the DV axis, there is evidence that other maternal pathways participate in embryonic DV patterning. For example, maternal Decapentaplegic (Dpp) signaling contributes to determining the relative sizes and positions of DV domains. *dpp* and the

BMP antagonist encoded by *short gastrulation (sog)* are both expressed during mid-oogenesis in subsets of follicle cells (Araujo and Bier, 2000; Twombly et al., 1996) where they function to pattern structures of the chorion (Araujo and Bier, 2000; Deng and Bownes, 1997; Peri and Roth, 2000; Twombly et al., 1996) as well as the embryonic DV axis (Araujo and Bier, 2000). With respect to its DV patterning role, genetic epistasis experiments suggest that Dpp signaling acts in parallel to Toll, by inhibiting degradation of Cact through a signal independent pathway (Araujo and Bier, 2000; Belvin et al., 1995; Liu et al., 1997).

It is not known how maternal *dpp* and *sog* impinge on embryonic patterning. BMPs signaling could act indirectly to pattern the embryo by regulating the expression of genes in the oocyte or follicle cells, which in turn establish DV patterning in the embryo. Alternatively, maternal *sog* and *dpp* could exert their effects directly on embryogenesis by delayed induction, as described for *ndl*. Here we provide evidence for the latter possibility. We show that Sog and Dpp proteins are secreted into the perivitelline space during mid-oogenesis and are stockpiled there for subsequent patterning during early embryogenesis. In addition, the restricted expression of the metalloproteases *tld* and *tok* in ventral follicle cells suggests that Sog is differentially cleaved along the DV axis of the egg chamber, generating Sog fragments that create an asymmetry in maternal Dpp signaling. A gradient of Dpp activity forms with the highest levels in the dorsal perivitelline space which then modifies the slope of the Dl gradient in the early embryo.

Methods

Fly stocks

Alleles used: Canton S, *sog*U2, *dII5* and *dII1*, *tld*(68-62), *tok*(?2-41). UAS constructs containing dominant-negative forms Tkv, Sax and Punt were a gift from Dr. O'Connor. The *mat α 4Gal4-VP16* line was a gift from Daniel St Johnston. UAS-*sog* constructs are described in Yu et al, 2004. UAS-Dpp-GFP was kindly provided by Dr. Gonzalez-Gaitán. Stocks for producing follicle cell clones were obtained from Dr J. Duffy. Lines for producing *dec* marked clones were a gift from Dr. Schüpbach.

Production of follicle cell clones

Follicle cell clones were generated as in Duffy et al., 1998. The absence of GFP was used to follow the location and size of clones in the egg chamber. *sog- dec* marked clones were generated as in Nilson and Schüpbach, 1998, however recombination was induced by use of *e22-GAL4/UAS-Flp*. FRT 82B insertions were recombined onto chromosomes containing the *tld* and *tok* alleles in order to generate clones by the Flp/FRT system.

Eggshell and cuticle preparations

Eggshells and cuticles were prepared and analyzed as in Araujo and Bier, 2000.

In situ hybridization and antibody staining

Double label *in situ* hybridization was performed as described previously (Araujo and Bier, 2000). For antibody staining in ovaries we used rabbit anti-Sog 8A or 8B antiserum (1:500) (Srinivasan et al., 2002). Anti-rabbit HRP was used as secondary antibody and visualized using the rhodamine TSA kit (Molecular Probes). To visualize DppGFP protein we made use of GFP autofluorescence. The perivitelline space was delimited through visualization of submembranous actin using Phalloidin 568 (1:80, Molecular Probes). The anti-Dorsal 7A4 antibody used for embryos was developed by Dr. Ruth Steward and obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, maintained by the University of Iowa. A secondary anti-mouse Alexa 488 (Molecular Probes) was used for visualization under confocal microscopy.

Frozen Sections of ovarian follicles

Egg chambers were fixed in 6% PF and heptane for 10 minutes, washed in PBS/0.3% Triton/0.5% BSA, cryopreserved in PBT/0,5M sucrose, embedded in OCT resin and frozen by immersion in liquid nitrogen. 8-micrometer-thick sections were cut in a cryostat and immunoreacted with the 8B antiserum and anti-actin (1:100).

Immunoblot analysis

Protein extracts were prepared by homogenizing 0- to 1-hour-old dechorionated embryos (referred to generally as pre-blastoderm embryos) or ovaries in electrophoresis sample buffer. Embryos were collected after several plate changes and visually inspected to make sure there were no contaminating older embryos. Extracts were separated by SDS-PAGE on 10% gels and electroblotted onto PVDF membranes (BIORAD). Blots were incubated with anti-Sog 8A (1:500). Immune complexes were visualized using HRP-conjugated secondary antibody and chemiluminescent enhancer system (Pierce).

Results

Sog is secreted into the perivitelline space

As a first step in assessing how maternal Sog and Dpp proteins produced during oogenesis function, we analyzed the distribution of Sog protein during oogenesis and in early embryonic stages, prior to the onset of zygotic *sog* and *dpp* expression. We used anti-Sog antibodies that recognize epitopes near the first (8A) or second (8B) (Srinivasan et al., 2002; Yu et al., 2000) cysteine rich (CR) repeats of the Sog protein (see diagram in Fig. 2C) to detect endogenous expression of Sog in follicle cells (Fig. 1A-C). This labeling represents authentic Sog staining since the signal is greatly reduced or undetectable in the vicinity of RNA null *sog*- follicle cells clones (Fig. 1A). From stage 10 onwards, Sog can be detected in the extracellular space between the plasma membranes of the follicle cell layer and the oocyte (Fig. 1D-I). This pattern remains stable once the impermeable vitelline membrane is completely formed (stage >13) and further transfer of proteins from follicle cells is no longer possible, although greater staining is observed associated to the vitelline membrane (Fig. 1G-I). The extracellular space between the embryo and perivitelline membrane will become the future perivitelline space, where a variety of maternally produced proteins may be stored until after fertilization.

sog mRNA is expressed in a broad band of follicle cells that migrate posteriorly over the oocyte during stage 9 (Araujo and Bier, 2000). This mRNA expression correlates with intracellular Sog protein staining during stage 9 and 10A, and is the likely site of production and secretion of Sog which then becomes evenly distributed in the extracellular compartment. By stage 10B, *sog* mRNA is restricted to a half ring of ventral-anterior follicle cells (Araujo and Bier, 2000). A similar DV asymmetry in Sog protein staining is also observed at this stage with the 8A anti-Sog antiserum, (Fig. 1C). The 8B anti-Sog antiserum detects a more homogeneous staining pattern throughout all stages analyzed (Fig. 1A,B).

Western blot analysis with the 8A antiserum indicates that several Sog protein species (29-120kDA) are produced during oogenesis and remain stable through early

embryogenesis (Fig. 2A). During early embryonic stages, before the onset of zygotic gene expression, a full length 120kDa Sog band is observed as well as lower M_r bands of 110, 68 and 42kDa (Fig. 2A). These later bands most likely correspond to fragments containing the first cysteine repeat (CR1) plus variable lengths of the stem based on the location of the 8A epitope (Yu et al., 2004; Yu et al., 2000). The pattern of bands in preblastoderm embryos and egg chambers is quite similar, although the relative amounts of bands are not completely equivalent. Upon initiation of zygotic gene expression, however, an overlapping but distinct pattern of Sog fragments is observed (be, Fig. 2A). As *sog* expression cannot be detected in the germline (Araujo and Bier, 2000), the protein bands detected by the 8A antiserum during oogenesis and early embryogenesis most likely result from expression in follicle cells. It has been observed that Sog can be cleaved *in vivo* and that different fragments of Sog exert distinct activities (Serpe et al., 2005; Yu et al., 2004; Yu et al., 2000). We tested whether there was any selectivity to the transfer of Sog fragments from follicle cells to the embryo that would suggest selective functions of different forms of maternal Sog protein in the embryo versus egg chamber. We used the follicle cell CY2 GAL4 driver to express full length or truncated UAS-*sog* constructs and assayed protein extracts from ovaries or embryos for Sog proteins. Although these experiments are not quantitative, all Sog forms expressed during oogenesis were detected in resulting embryos, indicating that there is little or no qualitative bias in transferring different forms of Sog (Fig. 2B). It should be noted that Sog fragments that lack CR1 cannot be detected by the 8A antiserum. In addition, the 8B antiserum is not well suited for western blot analysis, thus we could not examine formation of stable complementary fragments of Sog resulting from regulated proteolysis, which could also be produced and stored in the perivitelline space.

Dpp produced by follicle cells is stored in the perivitelline space

We were also interested in determining the distribution of Dpp during oogenesis, however, detecting endogenous Dpp protein with existing antibodies has proven challenging. Experiments in which Dpp protein is over-expressed in follicle cells are also somewhat problematic in that ectopic Dpp expression generates chorionic defects that interfere with fertilization of oocytes and thus prevent analysis of maternal Dpp function

in resulting embryos. These limitations notwithstanding, we drove expression of a GFP tagged form of Dpp (Dpp-GFP) (Entchev et al., 2000) in follicle cells. GFP fluorescence could be detected in the perivitelline space during mid-oogenesis and in late stage oocytes (Fig. 3A-I). We noticed that while not all follicle cells expressed the Dpp-GFP construct at high levels, the extracellular Dpp-GFP signal was still quite strong in cells adjacent to neighbors expressing high levels of Dpp-GFP (Fig. 3A-C,G-I). On the other hand, the Dpp-GFP signal declined sharply further away from cells expressing high levels of the construct (Fig. 3A,C arrow). Interestingly, Dpp-GFP fluorescence was more intense in dorsal than ventral regions of the perivitelline space. This asymmetry persisted until late stages of oogenesis (see Supplemental Figure 1). While the CY2-GAL4 line does not drive homogenous expression, it also does not generate asymmetric expression along the DV axis (Queenan et al., 1997), such as that observed for CY2>Dpp-GFP. Thus, the CY2>Dpp-GFP pattern most likely results from movement of Dpp protein inside the egg chamber, as is further supported by data presented in following sections. As CY2>Dpp-GFP mothers generate few embryos, most of which are unfertilized, it is difficult to test whether Dpp-GFP deposited in the perivitelline space persists until early embryogenesis. However, when we overexpressed Dpp-GFP at lower levels in anterior follicle cells, the resulting embryos had intense fluorescence in anterior regions (Fig. 3J). These results indicate that the Dpp-GFP protein is transferred to the embryo and can diffuse over limited distances, suggesting that the range of Dpp activity could be spatially regulated (Fig. 3A-C).

Maternal BMP signals transmitted through Tkv affect embryonic patterning

Since Dpp signaling is mediated by the Thick veins (Tkv receptor), we tested whether blocking this receptor prior to zygotic Dpp expression could alter DV patterning in the embryo, as might be expected if this receptor also mediated the effect of the maternal Dpp signal. We blocked endogenous Dpp signaling by expressing a dominant negative form of *thick veins* (*tkvDN*; (Haerry et al., 1998) with the maternal GAL4 driver *mata4GAL4-VP16*. This GAL4 driver has been used to rescue the maternal effect of *mom*- and *dome*- germline clones, as well as to drive early expression in the precellular blastoderm embryo (Brown et al., 2001; Dorfman and Shilo, 2001; Hacker and Perrimon,

1998). Maternally expressed *tkv* mRNA is delivered to the oocyte during nurse cell dumping, leading to uniform high level expression of this receptor throughout the embryonic plasma membrane (Affolter et al., 1994; Brummel et al., 1994). Blocking maternal *tkv* with *tkv*DN resulted in embryos with a range of phenotypes including: ventralized cuticles (data not shown), widening of the ventral neuroectodermal domain expressing *ventral nervous system defective* (*vnd*) (Fig. 4D), broadening of the *snail* (*sna*) expressing mesodermal domain (Fig. 4B), or narrowing of the mesoderm (Fig. 4C). The ventralized cuticle phenotypes could in part be due to reduction in zygotic Dpp signaling. The observed alterations in the *vnd* and *sna* expression domains, however, are likely to result solely from early interference with maternal Dpp signaling, since eliminating zygotic *dpp* activity does not grossly affect either *vnd* (Von Ohlen and Doe, 2000; Kosman et al, 2004) or *sna* expression (Biehs et al., 1996). Overexpression of dominant-negative *punt* (*punt*[DN]) produced similar results, while overexpression of *sax*[DN] had no effect on the gene expression patterns in ventral and lateral domains (not shown). This lack of DN-Sax phenotypes suggests that the BMPs Scw and Gbb, which signal via Sax receptors (Haerry et al., 1998; Neul and Ferguson, 1998; Nguyen et al., 1998), do not contribute substantially to the component of maternal BMP signaling that acts on the Dorsal gradient.

The embryonic phenotypes described above were variable and not fully penetrant (23% with DV phenotypes, 139 embryos analyzed), which may reflect robustness of the Dl pathway (see Discussion). Similarly, embryonic phenotypes resulting from an increase in the dose of maternal *dpp* were only manifest if accompanied by a reduction in *dorsal* (*dl*) (Araujo and Bier, 2000). Therefore we examined the effect of sensitizing the DV patterning system by reducing the maternal dose of *dl* and then blocking maternal Tkv function. We found that the resulting embryos exhibited a highly penetrant phenotype (81%, 178 embryos analyzed) consisting of a reduction in the *sna* domain and concomitant broadening of *vnd* expression both dorsally and ventrally into the mesoderm (Fig. 4E). This phenotype resembles that observed with certain dominant *Easter* alleles, where the presumptive mesoderm is narrowed and the lateral *rho* and *sog* expression domains are expanded (Chang and Morisato, 2002). These phenotypes may be interpreted

as a flattening of the nuclear D ℓ gradient, with levels of D ℓ increasing laterally and decreasing slightly ventrally. In embryos from Dp(*dpp*)/+; *dl*-/+ mothers ventral invasion of *vnd* expression is also observed, although the width of the neuroectoderm is not further altered. We interpret this phenotype as a general lowering of nuclear D ℓ levels with only a slight increase in the slope of the gradient, reflected by an overlap of adjacent expression domains (Araujo and Bier, 2000). Thus, the neuroectodermal phenotypes obtained by blocking maternal Tkv receptors are opposite to those generated by increasing the dose of maternal *dpp* in that increasing the dose of Dpp steepens the Dorsal gradient, while blocking Tkv receptors flattens it (Fig. 4K). This model is in agreement with the pattern of distribution of D ℓ protein upon blockage of maternal Tkv. Under these conditions, the ratio between nuclear/cytoplasmic D ℓ is lowered ventrally, while intermediary levels of D ℓ are shifted dorsally (See Supplementary Material S2).

In order to directly test whether the phenotypes described could be in part due to zygotic Dpp signaling, we blocked maternal Tkv in ventralized embryos generated from *Tl[3]*/+ mothers. In embryos from *Tl[3]*/+ mothers, dorsal zygotic *dpp* expression is entirely lacking and the *vnd* domain is slightly expanded dorsally throughout the embryo and more anteriorly circumnavigates the embryo in a ring (Fig. 4G, asterisk). A modest reduction of the presumptive mesodermal domain is also observed (Fig. 4H). When we also blocked maternal BMP signaling in a *Tl[3]*/+ background, however, embryos displayed a significant dorsal expansion of the *vnd* domain (Fig. 4I, 16% penetrance, 55 embryos analyzed), or a ventral expansion of *vnd* accompanied by loss of *sna* expression in the presumptive mesoderm (Fig. 4J, 18% penetrance, 55 embryos analyzed). As no dorsal *dpp* expression was detected in these embryos, the embryonic phenotypes resulting from *mat aGAL4 > tkv*[DN] can be attributed specifically to inhibition of maternal Dpp signaling. In aggregate, these results suggest that loss of signaling mediated by maternal Dpp deposited in the perivitelline space alters the pattern of embryonic gene expression along the DV axis, and can be understood as a flattening of the Dorsal gradient, which results in an expansion of lateral gene expression domains defined by intermediate levels of Dorsal.

Metalloproteases that cleave Sog are asymmetrically expressed in follicle cells

Since territories along the embryonic DV axis are specified by threshold responses to Dl, we wondered whether an inverse maternal gradient of Dpp might exist that helped shape the Dl gradient. One way to create asymmetry in Dpp signaling would be to process or degrade Sog in a localized fashion. One line of evidence for such a mechanism is that the zinc dependent metalloproteases encoded by *tolloid* (*tld*) and *tolkin* (*tok*) are expressed in ventrally restricted patterns in the follicular epithelium during the same stages that *sog* is expressed. *tld* expression is initiated during stage 8 in follicle cells migrating over the egg chamber (Fig. 5A), and by stage 10 becomes restricted to ventral follicle cells overlying the oocyte (FOC, Fig 5C). *tok* is expressed in a similar pattern as *tld*, but initiates at stage 9 (Fig. 5B), refining to a ventrally restricted pattern by stage 10 (Fig. 5D). At later stages, *tok* expression fades, beginning at the posterior end (not shown). The ventrally restricted expression of these metalloproteases suggests that Sog cleavage is likely to proceed primarily in ventral regions of the egg chamber. Expression of *tld* and *tok* is limited to ventral cells by the EGFR pathway, since in *grk*- egg chambers both genes are expressed throughout the follicular epithelium (Fig. 5E).

We next examined whether maternal *tld/tok* play a role in patterning the eggshell and embryonic DV axis by generating *tld*- follicle cell clones (Duffy et al., 1998). In egg chambers with *tld*- clones dorsal anterior structures of the eggshell, such as the dorsal appendages (DA) and operculum were reduced (Fig. 5F,G). *tok*- clones caused similar phenotypes (not shown). *tld*- and *tok*- clones are likely to act in a cell non-autonomous fashion since the operculum and DAs derive from dorsal cells (Dorman et al., 2004) that do not express *tld* or *tok*. Dpp signaling also influences the positions of anterior structures as ectopic *dpp* expression results in the formation of a large operculum at the expense of the DAs (Araujo and Bier, 2000; Twombly et al., 1996). One explanation for these results is that Tld acts non-autonomously to generate peak Dpp activity in dorsal progenitors of the operculum.

Loss of *tld* function during oogenesis also alters embryonic DV patterning. Most embryonic cuticles derived from mothers bearing *tld*- clones were ventralized (76%, Fig.

5L, compare with wild-type in Fig. 5K; 38 cuticles analyzed). However, 24% of the embryos had weakly dorsalized cuticles (not shown). This suggests that Tld activity is required primarily to generate a dorsalizing signal for patterning the embryo, but may also create a counteracting ventralizing activity.

Diffusion properties of different Sog forms

The localized expression of Tld in ventral follicle cells suggests that Sog processing is spatially restricted and raises the question of whether different forms of Sog protein have distinct diffusion properties within the perivitelline space. We examined the pattern of Sog staining in egg chambers carrying *sog*- null follicle cell clones using the domain specific 8A and 8B anti-Sog antisera. We found that Sog peptides containing the 8B epitope could be detected within *sog*- clones up to 8 cells away from wild-type or heterozygous *sog* expressing cells (Fig. 6C-E). This apparent range of Sog diffusion in the perivitelline space was independent of the location of clones, except in the vicinity of ventral anterior FOC where Sog diffusion seemed more limited (Fig. 6E). In contrast, Sog peptides detected by the 8A antiserum were observed well within the borders of dorsal *sog*- clones (Fig. 6F), but only along the borders of ventral clones and not in the perivitelline space adjacent to the clone (Fig. 6G). We interpret these results as evidence for a decreased ventral mobility of Sog fragments that lack the CR2 domain given that Sog fragments containing CR2 detected by the 8B antiserum appear to diffuse equally well in both dorsal and ventral clones.

Analysis of the distribution of Sog protein in egg chambers bearing *tld*- clones strengthened our interpretation of the *sog*- clonal phenotypes (Fig. 6H-J). The uniform staining for Sog protein detected by 8B was unaffected by *tld*- clones (Fig. 6H). On the other hand, near ventrally located *tld*- clones (Fig. 6I,J), Sog staining detected by the 8A antiserum was decreased in the perivitelline space within the clone. It is possible that Sog is still synthesized, but not cleaved, within these clones, while in adjacent *tld*+ cells Sog is cleaved to create CR1-containing fragments that remain associated with the *tld* expressing cells. In support of this hypothesis, CR1 containing Sog fragments can be produced in vitro by Tld and Tok (Shimmi and O'Connor, 2003; Yu et al., 2000). The

distribution of Sog detected by the 8A reagent was unaltered near dorsal *tld*- clones, in accord with the lack of *tld* expression in dorsal follicle cells.

Since Sog can bind to BMPs in various complexes and is thought to aid in the transport of BMPs, we asked whether ectopic expression of Dpp might alter the distribution of Sog. As presented earlier, we found that expression of Dpp-GFP driven by CY2 GAL4 resulted in greater GFP fluorescence in the dorsal extracellular space, accompanied by elevated dorsal Sog staining detected by the 8B antiserum (Fig. 6K-M and Fig. 2A,B). We observed the opposite result, however, when using the 8A antiserum. We found that Sog staining was intensified ventrally, both in the perivitelline space as well as within cells (Fig. 6N-P). Increased dorsal staining detected by 8B could be due to increased synthesis of Sog dorsally, increased breakdown of Sog ventrally, or redistribution of Sog protein within the extracellular compartment. We do not favor increased Sog synthesis as an explanation since elevated dorsal Sog staining was never observed using the 8A antibody, which should also recognize newly synthesized full length Sog. As altered degradation of Sog would not explain the greater level of Dpp-GFP staining dorsally (unless Dpp were also degraded in a ventrally biased fashion), we tentatively favor a model involving altered Sog transport, particularly as this can also account for the results with the 8A antiserum. The increase in ventral Sog staining with the 8A antiserum suggests that Dpp may increase the generation of CR1 containing Sog-like forms ventrally by increasing the rate of cleavage by ventrally restricted metalloproteases. Increased staining inside ventral cells, detected only by the antibody recognizing CR1, could be due to endocytosis of excess molecules. Based on the differences in the inferred mobility of Sog fragments revealed by clonal analysis, we propose that Dpp over-expression leads to increased cleavage of Sog by Tld ventrally, resulting in a greater redistribution of fragments between the ventral and dorsal regions of the egg chamber. As a result, N-terminal fragments containing CR1 only (referred to as N-Sog hereafter) remain locally restricted, while complementary fragments containing CR2 but not CR1 (referred to as C-Sog hereafter), which may also bind Dpp, diffuse dorsally resulting in increased levels of both Dpp and C-Sog.

Finally, further support for different Sog fragments having distinct mobilities is that overexpression of full-length versus N-Sog generates alternative phenotypes in the embryo. Misexpression of full length Sog resulted in a general broadening of the mesodermal domain (Fig. 7E), while expression of N-Sog fragments (Ssog-1 or Ssog-4) produced less regular effects with erratic mesodermal/neuroectodermal borders (Fig. 7F). These different phenotypes may arise as a consequence of the salt-and-pepper expression driven by the GAL4 system. Perhaps the uneven expression of transgenes is smoothed over in the case of the highly diffusible full length Sog, but not in the case of the less mobile ssog-like forms.

The phenotypes caused by *sog*- follicle cell clones vary as a function of DV position

We have previously shown that *sog*- follicle cell clones produce dorsalized embryos and eggshells (Araujo and Bier, 2000). In extending this analysis we noticed that there was also a minority of embryos that had ventralized patterns (Fig. 7 and Table 1). These opposite phenotypes may result from different locations or sizes of the *sog*- clones. We examined the basis for these different phenotypes by generating *sog*- clones marked by the chorion mutation *dec*, which results in the formation of clear zones in the chorion (Nilson and Schupbach, 1998). Several chorion defects were observed in conjunction with marked *sog*- clones (but not in control *dec*- clones) depending on their DV position (Table 2). Ventral anterior *sog*- clones were often associated with a smaller operculum (defined by the area between the base of the dorsal appendages and the micropyle) (Fig. 7O,P). Interestingly, *tld*- clones also resulted in a reduced operculum (Fig. 5G), whereas over-expression of *dpp* had the opposite effect of expanding the operculi (Fig. 5H). In contrast, *sog*- clones located dorsally (Table 2) were usually smaller and generated no phenotype. However, fused dorsal appendages were observed in the proximity of dorsal *sog*- clones that touched the base of the appendages (Fig. 7M,N).

We also observed embryonic cuticle defects associated with *dec* marked *sog*- follicle clones. We examined 117 chorions containing *sog*- clones, but the number of cuticles obtained for analysis under these conditions was considerably less (19), which may be explained by defects in the chorion blocking oocyte fertilization (Araujo and

Bier, 2000). These embryos had bifurcated or interrupted ventral denticle belts (Fig. 7G,H), a phenotype frequently observed in embryonic cuticles derived from unmarked *sog*- clones (Araujo and Bier, 2000). Cuticular defects were never observed in response to dorsal *sog*- clones of comparable sizes (10 dorsal clones versus 5 ventral or lateral clones with cuticular phenotype). These cuticle phenotypes do not result from a reduction in zygotic *sog* levels since females bearing follicle cell clones were crossed to males carrying a duplication of the *sog* locus on the Y chromosome, to generate zygotic *sog*+ embryos. Furthermore, zygotic *sog*- embryos generated from egg chambers bearing large *dec* marked ventral clones had cuticles that were more dorsalized than those only lacking zygotic *sog* function (17 cuticles analyzed, 7 with ventral or lateral clones associated to modified DV phenotypes, Fig. 7I-L). Dorsal *sog*- clones, on the other hand, did not modify the zygotic *sog*- phenotype (4 clones). Ventral and lateral *sog*- clones that generated no phenotype were either small (<15 cells) or located posteriorly. The chorion and cuticle phenotypes we observed as a function of the location of *sog*- clones reveal that the requirement for *sog* function varies as a function of DV position. These findings are also consistent with data described above suggesting that Sog peptides generated in dorsal versus ventral follicle cells have different activities.

Discussion

In this study we have shown that *sog*, *dpp*, and *tld* act during oogenesis to promote the formation of dorsal-anterior structures of the eggshell and to establish the embryonic DV axis. According to our proposed model (Fig. 8), Sog is produced in follicle cells and is processed into different forms depending on DV location and stored in the perivitelline space. These forms of Sog then persist until early stages of embryogenesis at which time they act by a delayed induction mechanism to alter signaling mediated by maternally derived Dpp. We propose that an asymmetric distribution of Sog peptides is produced through the action of the ventrally localized Tld and Tok metalloproteases. Different forms of Sog act locally to inhibit Dpp signaling ventrally (e.g., N-Sog) or diffuse over considerable distances to concentrate Dpp dorsally (e.g., full length Sog or C-Sog). According to this model, a dorsal-to-ventral gradient of Dpp activity is formed in the perivitelline space that counteracts and sharpens the inverse gradient of nuclear Dorsal.

Maternal Sog and Dpp pattern the embryonic DV axis by delayed induction

An important finding in this study is that Sog protein produced by follicle cells is secreted into the perivitelline space where it persists until the end of oogenesis and early embryogenesis, prior to initiation of zygotic *sog* expression. One way maternal Sog fragments might influence DV patterning in the embryo is to modify zygotic Dpp signaling. However, maternal Dpp signaling is involved in establishing the relative positions of the ventral mesoderm versus the lateral neuroectodermal territories, while zygotic Dpp activity determines the relative positions of dorsal and lateral domains. These distinct phenotypes suggest that maternal Sog acts by modulating the maternal rather than the zygotic component of Dpp signaling.

Our analysis also suggests that the Dpp synthesized by follicle cells is secreted into the perivitelline space and stored there until advanced stages of oogenesis. These maternally synthesized Sog and Dpp proteins may act on the embryo following fertilization when signaling through the Toll pathway is initiated. Several lines of

evidence support this hypothesis. First, through epistatic analysis (Araujo and Bier, 2000), we have shown that maternal Dpp does not act upstream of the Toll receptor. Therefore, genes expressed in the follicle cell epithelium that regulate DV patterning exclusively via the Toll pathway should not be targets of maternal Dpp signaling. Alternatively, undescribed non-Toll mediators of DV patterning could potentially be targets of maternal Dpp in the follicular epithelium. Second, blocking Tkv receptor function (not shown) or reducing maternal Dpp activity (by *8xhssog*, Araujo and Bier, 2000) in follicle cells has no effect on the pattern of *pip* expression. We have also previously shown that maternal *dpp* does not alter *grk* expression (Araujo and Bier, 2000). Thus, we have found no evidence that the embryonic effects here described are due to alterations in patterning of the follicular epithelium. Third, maternal *dpp* signaling increases the levels of Cactus protein in the embryo by a mechanism that is independent of Toll (Araujo and Bier, 2000). Finally, inhibition of Tkv with *tkvDN* expressed with an early maternal driver alters the embryonic expression domains of ventral and lateral genes such as *vnd* and *snail*, which are targets of Dorsal activation but not of zygotic BMP signaling. *tkvDN* expression also alters expression of DV genes in lateralized embryos, which lack dorsal ectoderm and early zygotic *dpp* expression. In aggregate, these various data support the view that maternal *dpp* and *sog* act by delayed induction on the embryo itself. We cannot currently rule out the possibility, however, that the embryonic DV phenotypes here described result from the combined effects of direct and indirect maternal *dpp* signaling with the predominant effect being direct.

Delayed inductive activities have been proposed for a variety of proteins synthesized during oogenesis. For example, activation of the terminal system relies on delayed inductive activity of the secreted product of the *torsolike* gene (*tsl*), which is expressed by follicle cells at the two poles of the oocyte and associates with the vitelline membrane (Stevens et al., 2003). *ndl* has a dual action on chorion integrity and embryonic patterning (LeMosy and Hashimoto, 2000). The embryonic patterning function of *ndl* is thought to be mediated by Nudel protein that is secreted into the perivitelline space where it associates with the embryonic plasma membrane and initiates a proteolytic cascade (LeMosy et al., 1998). We propose that Sog and Dpp secreted by

follicle cells also serve two roles. First, they contribute to patterning the follicle cell epithelium and chorion, and secondly, they are transferred to and stored in the perivitelline space where we propose that they function after fertilization to modify Toll patterning in the embryo.

Sog, Dpp and metalloproteases are asymmetrically distributed in the egg chamber

During embryogenesis Sog protein diffuses dorsally from the neuroectoderm (Srinivasan et al., 2002) and may carry Dpp dorsally in a complex with Tld, Tsg and Scw, resulting in the generation of peak Dpp activity in the dorsal midline (Chang et al., 2001; Dorfman and Shilo, 2001; Ferguson and Anderson, 1992; Mizutani et al., 2005; Shimmi and O'Connor, 2003; Sutherland et al., 2003). The spatial distribution of maternal Sog, Dpp, Tld and Tok during oogenesis could also create asymmetric BMP activity. Since *tld* and *tok* are expressed only in ventral follicle cells, a ventral-to-dorsal gradient of Sog fragments is likely to be produced. Because cleavage of Sog by *Drosophila* Tld and Tok is dependent on the amount of Dpp (Shimmi and O'Connor, 2003), cleavage of Sog by Tld and Tok should be increased near the source of Dpp, generating an oblique gradient of Sog fragments in the egg chamber (Fig. 8). The existence of such a gradient is supported by the greater staining seen in anterior ventral cells with the anti-Sog 8A antiserum during stage 10B. However, greater asymmetry may exist as a result of differential distribution of an array of Sog fragments throughout the egg chamber. Unfortunately, visualization of such asymmetry would be hard to achieve due to limitations in the ability to recognize several fragments by existing Sog antisera.

Our analysis of marked *sog*- and *tld*- follicle cell clones suggests that the mobility of Sog fragments in the extracellular compartment may contribute to creating a maternal Dpp activity gradient. Such clones resulted in different Sog staining patterns in the perivitelline space adjacent to the clones depending on where they were located along the DV axis. The staining pattern observed with the 8A antibody, suggests that ventrally generated N-Sog cleavage products may be less diffusible than intact Sog or than C-Sog, and remain restricted to their site of production. In contrast, full length Sog and C-Sog fragments appear to diffuse more readily.

Diffusion of Dpp may also contribute to patterning the eggshell. The expression of *dpp* in anterior follicle cells is consistent with its role in the formation of dorsal-anterior chorionic structures. An anterior-to-posterior gradient of Dpp activity in dorsal regions of the egg chamber is suggested by the Dpp dependent activation of the A359 enhancer trap and graded repression of *bunched* along the AP axis (Dobens et al., 2000). In addition, *BR-C* expression is lost in *mad*- clones away from the source of Dpp (Peri and Roth, 2000). *sog* is likely to contribute to establishing this BMP gradient since ventral *sog*- clones act non cell-autonomously to decrease the size of the operculum. Since ventral *tld*- clones also alter the extent and angle of the operculum, Tld may process Sog to generate a fragment that diffuses and carries Dpp to a dorsal-anterior location, concentrating and thus enhancing Dpp activity. Further evidence that a fragment with such activity exists derives from the observation that overexpression of a C-terminal Sog fragment generates chorionic phenotypes that strongly resemble *dpp* overexpression (Fig. 5I,J).

A dorsally produced form of Sog also appears to participate in patterning the eggshell since *sog*- clones located dorsally result in fusion of dorsal appendages along the dorsal midline. DV positioning of the dorsal appendages depends on several factors, most critically on EGFR signaling (Dobens and Raftery, 2000). On the other hand, mild overexpression of *dpp* generates fusion of the dorsal appendages. Considering the well established role of Sog in modulating Dpp activity, the fused appendage phenotype generated by dorsal *sog*- clones most likely reflects the loss of Dpp antagonism exerted by Sog.

In addition to the activities described above, N-Sog fragments which remain ventrally restricted could exert Supersog-like activity, antagonizing BMPs while acquiring resistance to further cleavage and degradation by Tld (Yu et al., 2000). This ventrally restricted activity most likely patterns the embryo but does not affect dorsal positioning of eggshell structures, which depends on the combined activity of

Dpp/BMP signaling and dorsally generated Grk/EGFR signals (Deng and Bownes, 1997; Dobens et al., 2000; Peri and Roth, 2000).

Different Sog activities may contribute to patterning the DV axis of the embryo

The assortment of Sog fragments in egg chambers is very similar to that in the embryo. Full length and processed forms of Sog generated by Tld during oogenesis might remain asymmetrically distributed during embryogenesis and exert distinct activities. This hypothesis is in agreement with the effect of *tld*- and *sog*- follicle cell clones on the embryo. In the majority of cases, *tld*- follicle cell clones result in ventralized cuticles, indicating that Tld generates some activity that synergizes with Dpp. Reciprocally, the great majority of *sog*- follicle cell clones result in dorsalized cuticles and embryos, indicating that Sog primarily acts by antagonizing Dpp. Since only ventral *sog*- clones generate cuticle defects, ventrally produced Sog presumably generates a ventralizing activity that blocks Dpp locally. On the other hand, since in a minority of cases we observe ventral shifts in embryonic gene expression domains resulting from *sog*- clones, as well as a minority of dorsalized cuticles from *tld*- clones, there may also be a form of Sog that can enhance Dpp signaling. This positive BMP promoting activity could be generated ventrally, as suggested above in the case of chorion patterning.

A model depicting the proposed effects of different Sog forms on formation of the chorion and embryonic patterning are shown in Fig 8. According to this model, ventrally restricted Tld cleaves Sog near the Dpp source in ventral anterior follicle cells generating N-Sog and C-Sog. We suggest that N-Sog fragments remain restricted near ventral anterior cells to antagonize Dpp, while C-Sog fragments diffuse dorsally concentrating Dpp in dorsal anterior cells that direct formation of the operculum. This asymmetric production of Sog molecules would generate a dorsal-to-ventral gradient of Dpp, with the highest levels dorsally near the anterior Dpp source. Although direct visualization of the predicted resulting Dpp gradient in the embryo is hard to achieve with the tools available, we propose that such a similarly oriented gradient persists until early embryogenesis based on the asymmetric pattern of Dpp-GFP distribution during late oogenesis and the

observed alterations in embryonic gene expression domains resulting from modifications in maternal Dpp signaling (see below).

Maternal Dpp activity alters the shape of the Dorsal gradient

The slope of the D_I nuclear gradient ultimately defines the extent of the mesoderm (Mes), neuroectoderm (NE), and dorsal ectoderm (DE). A uniform increase or decrease in nuclear D_I along the DV axis can only alter the extent of the Mes and DE and positioning of the NE, while a change in the slope of the gradient will modify the extent of NE territories such as the *vnd* expression domain. Under all conditions that Dpp signaling was altered we observed modifications in the width of the *vnd* domain. This suggests that graded maternal Dpp signaling helps determine the slope of the Dorsal gradient. Our earlier studies suggested that Dpp inhibits Cactus degradation and as a consequence decreases D_I translocation into the nucleus (Araujo and Bier, 2000). Increased Dpp signaling should result in more D_I retained in the cytoplasm, with consequent narrowing of the mesoderm and ventral shift in lateral and dorsal expression domains. Conversely, inhibition of Dpp signaling would result in increased levels of D_I becoming available for nuclear translocation. Considering our proposal that maternal Dpp is highest dorsally, and that Cactus may also act to prevent D_I diffusion along the DV axis, decreasing Dpp should lower Cactus levels in dorsal-lateral regions of the embryo and result in the redistribution of free D_I from ventral to lateral regions. As a consequence of this redistribution of D_I, there would be a slight decrease in D_I levels ventrally and an increase laterally, which would have the net effect of flattening the gradient. Such a mechanism would require a certain degree of mobility of Dorsal dimers in the syncytial blastoderm. In future studies it will be interesting to determine the relative mobilities of D_I/Cactus complexes in the cytoplasm.

Maternal BMP signaling may also increase the robustness of Dorsal patterning. The prevailing view of DV patterning is that signaling through the Toll pathway is sufficient to generate threshold-dependent activation of several Dorsal target genes along the entire DV axis. Activation of Toll triggered by the ON/OFF *pip* expression pattern must be transformed into a ventrally centered gradient of Toll signaling. Several

mechanisms may contribute to generate this gradient, based on autoregulatory feedback mechanisms (Chang and Morisato, 2002; Morisato, 2001). Although the Toll system may be internally robust, regulatory inputs from other signaling pathways could also contribute further to its stability, such as suggested for the *wntD* pathway (Ganguly et al., 2005; Gordon et al., 2005) and for maternal Dpp (Araujo and Bier, 2000; this report). While a significant body of evidence supports the standard view that establishment of the Dorsal gradient through the Toll pathway is central to DV axis specification, the maternal Dpp pathway may constitute an important secondary mechanism that sharpens and ensures robustness and stability of the Dorsal gradient in response to a rapidly changing embryonic environment.

Maternal BMP and EGF-R signaling may act in parallel to pattern the embryo

The initiating event in maternal DV patterning is localized activation of the Grk/EGFR pathway in dorsal cells (Neuman-Silberberg and Schupbach, 1993). Grk functions by restricting the expression of both *pip* and *tld/tok*, providing two potentially independent means for spatially regulating the activity of Toll and Dpp. This dual action of the Grk/EGFR pathway is consistent with our previous analysis (Araujo and Bier, 2000) in which we found that embryonic cuticles from *gd-; grk-; Tl[3]* mothers displayed a phenotype distinct from those collected from *gd-; Tl[3]* mothers. While cuticles from both genotypes had denticle belts surrounding the entire circumference of the embryo, cuticles from *gd-; grk-; Tl[3]* mothers were more elongated than those from *gd-; Tl[3]* mothers and exhibited a more ventral character. This suggests that *grk* provides an additional signal for asymmetry downstream or in parallel to *gd*. Based on our new and previous findings we suggest that the hypothetical system proposed to act downstream of *grk/EGFR* and in parallel to Toll may be the Dpp pathway.

Acknowledgments:

We thank Daniel St Johnston, Laurel Raftery, Joseph Duffy, Marcos Gonzalez-Gaitán and the Bloomington Stock Center for fly stocks. We are also grateful to Michael

O'Connor for fly stocks and cDNAs and to Trudi Schupbach for providing reagents. In addition, we thank Trudi Schüpbach, members of the Araujo laboratory, and the anonymous reviewers for helpful comments on the manuscript. This work was supported by CAPES and CNPq fellowships to K.C, M.F, E.L and E.N and by PRONEX/FAPERJ grant to H.A. and FIRCA/NIH TW001329-04 to E.B and H.A.

ACCEPTED MANUSCRIPT

References

- Affolter, M., Nellen, D., Nussbaumer, U., and Basler, K. (1994). Multiple requirements for the receptor serine/threonine kinase thick veins reveal novel functions of TGF beta homologs during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **120**, 3105-17.
- Anderson, K. V., Jurgens, G., and Nusslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* **42**, 779-89.
- Araujo, H., and Bier, E. (2000). *sog* and *dpp* exert opposing maternal functions to modify toll signaling and pattern the dorsoventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* **127**, 3631-44.
- Belvin, M. P., Jin, Y., and Anderson, K. V. (1995). Cactus protein degradation mediates *Drosophila* dorsal-ventral signaling. *Genes Dev* **9**, 783-93.
- Biehs, B., Francois, V., and Bier, E. (1996). The *Drosophila* short gastrulation gene prevents Dpp from autoactivating and suppressing neurogenesis in the neuroectoderm. *Genes Dev* **10**, 2922-34.
- Brown, S., Hu, N., and Hombria, J. C. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr Biol* **11**, 1700-5.
- Brummel, T. J., Twombly, V., Marques, G., Wrana, J. L., Newfeld, S. J., Attisano, L., Massague, J., O'Connor, M. B., and Gelbart, W. M. (1994). Characterization and relationship of Dpp receptors encoded by the *saxophone* and *thick veins* genes in *Drosophila*. *Cell* **78**, 251-61.
- Chang, A. J., and Morisato, D. (2002). Regulation of Easter activity is required for shaping the Dorsal gradient in the *Drosophila* embryo. *Development* **129**, 5635-45.
- Chang, C., Holtzman, D. A., Chau, S., Chickering, T., Woolf, E. A., Holmgren, L. M., Bodorova, J., Gearing, D. P., Holmes, W. E., and Brivanlou, A. H. (2001). Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature* **410**, 483-7.
- Deng, W. M., and Bownes, M. (1997). Two signalling pathways specify localised expression of the Broad-Complex in *Drosophila* eggshell patterning and morphogenesis. *Development* **124**, 4639-47.
- Dobens, L. L., Peterson, J. S., Treisman, J., and Raftery, L. A. (2000). *Drosophila* bunched integrates opposing DPP and EGF signals to set the operculum boundary. *Development* **127**, 745-54.
- Dobens, L. L., and Raftery, L. A. (2000). Integration of epithelial patterning and morphogenesis in *Drosophila* ovarian follicle cells. *Dev Dyn* **218**, 80-93.
- Dorfman, R., and Shilo, B. Z. (2001). Biphasic activation of the BMP pathway patterns the *Drosophila* embryonic dorsal region. *Development* **128**, 965-72.
- Dorman, J. B., James, K. E., Fraser, S. E., Kiehart, D. P., and Berg, C. A. (2004). *bullwinkle* is required for epithelial morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol* **267**, 320-41.
- Duffy, J. B., Harrison, D. A., and Perrimon, N. (1998). Identifying loci required for follicular patterning using directed mosaics. *Development* **125**, 2263-71.

- Entchev, E. V., Schwabedissen, A., and Gonzalez-Gaitan, M. (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* **103**, 981-91.
- Ferguson, E. L., and Anderson, K. V. (1992). Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the Drosophila embryo. *Cell* **71**, 451-61.
- Ganguly, A., Jiang, J., and Ip, Y. T. (2005). Drosophila WntD is a target and an inhibitor of the Dorsal/Twist/Snail network in the gastrulating embryo. *Development* **132**, 3419-29.
- Gordon, M. D., Dionne, M. S., Schneider, D. S., and Nusse, R. (2005). WntD is a feedback inhibitor of Dorsal/NF-kappaB in Drosophila development and immunity. *Nature* **437**, 746-9.
- Hacker, U., and Perrimon, N. (1998). DRhoGEF2 encodes a member of the Dbl family of oncogenes and controls cell shape changes during gastrulation in Drosophila. *Genes Dev* **12**, 274-84.
- Haerry, T. E., Khalsa, O., O'Connor, M. B., and Wharton, K. A. (1998). Synergistic signaling by two BMP ligands through the SAX and TKV receptors controls wing growth and patterning in Drosophila. *Development* **125**, 3977-87.
- Hecht, P. M., and Anderson, K. V. (1993). Genetic characterization of tube and pelle, genes required for signaling between Toll and dorsal in the specification of the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. *Genetics* **135**, 405-17.
- Hong, C. C., and Hashimoto, C. (1995). An unusual mosaic protein with a protease domain, encoded by the nudel gene, is involved in defining embryonic dorsoventral polarity in Drosophila. *Cell* **82**, 785-94.
- LeMosy, E. K., and Hashimoto, C. (2000). The nudel protease of Drosophila is required for eggshell biogenesis in addition to embryonic patterning. *Dev Biol* **217**, 352-61.
- LeMosy, E. K., Hong, C. C., and Hashimoto, C. (1999). Signal transduction by a protease cascade. *Trends Cell Biol* **9**, 102-7.
- LeMosy, E. K., Kemler, D., and Hashimoto, C. (1998). Role of Nudel protease activation in triggering dorsoventral polarization of the Drosophila embryo. *Development* **125**, 4045-53.
- Liu, Z. P., Galindo, R. L., and Wasserman, S. A. (1997). A role for CKII phosphorylation of the cactus PEST domain in dorsoventral patterning of the Drosophila embryo. *Genes Dev* **11**, 3413-22.
- Mizutani, C. M., Nie, Q., Wan, F. Y., Zhang, Y. T., Vilmos, P., Sousa-Neves, R., Bier, E., Marsh, J. L., and Lander, A. D. (2005). Formation of the BMP activity gradient in the Drosophila embryo. *Dev Cell* **8**, 915-24.
- Morisato, D. (2001). Spatzle regulates the shape of the Dorsal gradient in the Drosophila embryo. *Development* **128**, 2309-19.
- Neul, J. L., and Ferguson, E. L. (1998). Spatially restricted activation of the SAX receptor by SCW modulates DPP/TKV signaling in Drosophila dorsal-ventral patterning. *Cell* **95**, 483-94.
- Neuman-Silberberg, F. S., and Schupbach, T. (1993). The Drosophila dorsoventral patterning gene gurken produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell* **75**, 165-74.
- Nguyen, M., Park, S., Marques, G., and Arora, K. (1998). Interpretation of a BMP activity gradient in Drosophila embryos depends on synergistic signaling by two type I receptors, SAX and TKV. *Cell* **95**, 495-506.

- Nilson, L. A., and Schupbach, T. (1998). Localized requirements for windbeutel and pipe reveal a dorsoventral prepattern within the follicular epithelium of the *Drosophila* ovary. *Cell* **93**, 253-62.
- Peri, F., and Roth, S. (2000). Combined activities of Gurken and decapentaplegic specify dorsal chorion structures of the *Drosophila* egg. *Development* **127**, 841-50.
- Peri, F., Technau, M., and Roth, S. (2002). Mechanisms of Gurken-dependent pipe regulation and the robustness of dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development* **129**, 2965-75.
- Queenan, A. M., Ghabrial, A., and Schupbach, T. (1997). Ectopic activation of torpedo/Egfr, a *Drosophila* receptor tyrosine kinase, dorsalizes both the eggshell and the embryo. *Development* **124**, 3871-80.
- Ray, R. P., and Schupbach, T. (1996). Intercellular signaling and the polarization of body axes during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* **10**, 1711-23.
- Roth, S. (1998). *Drosophila* development: the secrets of delayed induction. *Curr Biol* **8**, R906-10.
- Roth, S., Hiromi, Y., Godt, D., and Nusslein-Volhard, C. (1991). cactus, a maternal gene required for proper formation of the dorsoventral morphogen gradient in *Drosophila* embryos. *Development* **112**, 371-88.
- Roth, S., and Schupbach, T. (1994). The relationship between ovarian and embryonic dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development* **120**, 2245-57.
- Sen, J., Goltz, J. S., Konsolaki, M., Schupbach, T., and Stein, D. (2000). Windbeutel is required for function and correct subcellular localization of the *Drosophila* patterning protein Pipe. *Development* **127**, 5541-50.
- Sen, J., Goltz, J. S., Stevens, L., and Stein, D. (1998). Spatially restricted expression of pipe in the *Drosophila* egg chamber defines embryonic dorsal-ventral polarity. *Cell* **95**, 471-81.
- Serpe, M., Ralston, A., Blair, S. S., and O'Connor M, B. (2005). Matching catalytic activity to developmental function: Tollid-related processes Sog in order to help specify the posterior crossvein in the *Drosophila* wing. *Development* **132**, 2645-56.
- Shelton, C. A., and Wasserman, S. A. (1993). pelle encodes a protein kinase required to establish dorsoventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **72**, 515-25.
- Shimmi, O., and O'Connor, M. B. (2003). Physical properties of Tld, Sog, Tsg and Dpp protein interactions are predicted to help create a sharp boundary in Bmp signals during dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Development* **130**, 4673-82.
- Srinivasan, S., Rashka, K. E., and Bier, E. (2002). Creation of a Sog morphogen gradient in the *Drosophila* embryo. *Dev Cell* **2**, 91-101.
- St Johnston, D., and Nusslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**, 201-19.
- Stathopoulos, A., and Levine, M. (2002). Dorsal gradient networks in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* **246**, 57-67.
- Stevens, L. M., Beuchle, D., Jurcsak, J., Tong, X., and Stein, D. (2003). The *Drosophila* embryonic patterning determinant torsolike is a component of the eggshell. *Curr Biol* **13**, 1058-63.

- Steward, R. (1989). Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell* **59**, 1179-88.
- Sutherland, D. J., Li, M., Liu, X. Q., Stefancsik, R., and Raftery, L. A. (2003). Stepwise formation of a SMAD activity gradient during dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Development* **130**, 5705-16.
- Twombly, V., Blackman, R. K., Jin, H., Graff, J. M., Padgett, R. W., and Gelbart, W. M. (1996). The TGF-beta signaling pathway is essential for *Drosophila* oogenesis. *Development* **122**, 1555-65.
- Yu, K., Kang, K. H., Heine, P., Pyati, U., Srinivasan, S., Biehs, B., Kimelman, D., and Bier, E. (2004). Cysteine repeat domains and adjacent sequences determine distinct bone morphogenetic protein modulatory activities of the *Drosophila* Sog protein. *Genetics* **166**, 1323-36.
- Yu, K., Srinivasan, S., Shimmi, O., Biehs, B., Rashka, K. E., Kimelman, D., O'Connor, M. B., and Bier, E. (2000). Processing of the *Drosophila* Sog protein creates a novel BMP inhibitory activity. *Development* **127**, 2143-54.

Figure Legends

Figure 1. Sog is secreted into the perivitelline space.

Sog protein in whole mounts (A-C) and frozen sections (D-I) of egg chambers, using the 8B (A,B,D-I) or 8A (C) antiserum. Sog is observed inside follicle cells from stages 8 to 10, and between follicle cells and oocyte beginning at stage 10 (A, arrow). Nuclear Topro staining in blue. A' and A'' show a stage 8 egg chamber with absence of 8B staining (red) in cell clones that do not express *sog* (asterisks). The same was observed for the 8A antiserum. (B) Mid-optical section of stage 10B egg chamber with even 8B staining between follicle cells and oocyte and decreased staining inside follicle cells. Even staining was observed in all sections analyzed. (C) Optical section of stage 10B egg chamber reveals greater 8A staining close to ventral anterior cells (arrow). This asymmetry could only be detected during stage 10B, in mid sections of the egg chamber, while in superior and inferior sections staining was even, as shown for the 8B antisera. Staining between follicle cells and oocyte corresponds to the future perivitelline space since protein detected by 8B (E,H) is seen between the plasma membrane of the two cell types, as detected by staining for sub-membranous actin (D,G and F,I) at stage 10 (D-F) and 13 (G-I) in frozen sections. oo, oocyte; fc, follicle cell. In B and C dorsal is up. The orientation of egg chambers was determined by the dorsal location of the oocyte nucleus (examined under phase contrast) and by the morphology of follicle cells, which is clearly distinct in dorsal and ventral regions at stage 10B. Double stains for anti-Sog 8A and anti-Grk antibody were also performed to unambiguously orient staining within the egg chamber. Since images for Sog single stains were of better quality, however, those are presented here.

Figure 2. Sog fragments are produced during oogenesis and present in the pre-blastoderm embryo.

(A) Western blots probed with the 8A antiserum in extracts from wild-type egg chambers (o), preblastoderm embryos (e, 0-2h old) or 2-5h embryos (be). Bands corresponding to full length Sog (120kDa) or N-terminal Sog fragments (110, 95, 88, 68, and 42kDa) are shown at the left. Fragments (100 and 80kDa) observed only in 2-5h embryos are shown at the right. Small fragments are detected in variable amounts (34-29kDa). Similar protein amounts were loaded for (o), (e) and (be), as determined by serial dilutions of samples. (B) Ectopic expression of full length Sog (UAS-Sog) or Sog fragments (UAS-ssog1, UAS-ssog 4, UAS-CR1,2) was driven in follicle cells with the CY2 GAL4 driver. High levels of the transgene encoded Sog protein (arrowheads) were detected in (o) and (e), as well as modified quantities of bands corresponding to endogenous fragments (68, 42 and 34-29kDa). Upon induction of *ssog1*, two bands were detected in ovaries (38 and 34kDa) probably corresponding to the entire fragment plus another form resulting from endogenous proteolysis. In A and B approximately 24 embryo equivalent/lane and corresponding protein amounts from egg chambers were loaded. ~18 embryo equivalent/lane were loaded in *ssog1* lanes due to the high levels of expression. (C) Schematic structure of Sog protein with transmembrane domain which is cleaved for secretion (black box), cysteine-rich domains (boxes) and putative Tld/Tok cleavage sites

(arrows). Structure of UAS-*sog* constructs utilized are indicated with the corresponding molecular weights.

Figure 3. Dpp can be secreted to the perivitelline space.

Over-expression of UAS-DppGFP in follicle cells attained with CY2 GAL4. (A-C) During stage 10 expression levels are similar in dorsal and ventral FOCs, although all cells do not express identical levels of the construct. Fluorescence is also present between the follicle cells and the oocyte, and co-localizes with anti-Sog 8B. GFP signal in the extracellular space (arrowheads) is strong near cells that do not express DppGFP (asterisks) when surrounded by DppGFP expressing cells, while further away fluorescence is absent (arrow). Staining for 8B is still strong in this region (B,C, arrow). (D-F) In late stage egg chambers (>stage 13) DppGFP still co-localizes with Sog in the extracellular space. (G-I) Double labeling for actin and GFP confirms that DppGFP is secreted to the perivitelline space between the oocyte (oo) and follicle cell (fc) membrane. Again, fluorescence is observed in the extracellular space (arrowheads) adjacent to cells that do not express DppGFP (asterisks). (J) GFP fluorescence is also observed in embryos resulting from egg chambers overexpressing DppGFP in anterior follicle cells by use of the 55B GAL4 driver. Fluorescence is most intense in anterior regions. (Insert) Control embryo without UAS-DppGFP. Detector gain was maximally increased to reveal embryo morphology. Dorsal is up, anterior is left.

Figure 4. Maternal Dpp alters gene expression via BMP-receptors present in the early embryo.

(A) In wild-type embryos ventral *sna* and ventro-lateral *vnd* expression is 12–18 and 3–5 cells wide respectively. (B-D) Upon blockage of the maternal Tkv receptor (*matαGAL4-VP16>tkv[DN]*) the extent of these domains is altered in several ways: *sna* expands dorsally (black arrow), occasionally splitting in two peaks (white arrows in B). This phenotype is reminiscent of the pattern duplications observed as a consequence of decreased *gurken* function (Roth and Schüpbach, 1994); *sna* expression is decreased or lost at 70% egg length (C); the *vnd* domain expands dorsally (D). Blocking maternal Tkv in embryos laid by mothers heterozygous for a *dorsal* null allele (*dl-/+*) results in all embryos with narrowed *sna* domains and dorsal expansion of *vnd* expression (81% penetrance, E). Wild-type embryos from *dl-/+* mothers show only a slight narrowing of the *sna* domain (Araujo and Bier, 2000). (F) Reduction of zygotic *dpp* (*dpp^{hin}/+* embryos) has no effect on *vnd* expression. (G) Embryos generated from mothers heterozygous for an activated *Toll* allele (*Tl[3]/+*) are ventralized, with a light expansion of the *vnd* domain along most of the embryo and entirely expanded at 70% egg length (asterisk). These embryos do not express zygotic *dpp* dorsally (arrowhead), but have remaining *dpp* expression in the poles of the embryo, regulated by the terminal system (arrows). The *sna* domain in these embryos is slightly narrower than in wild-type embryos (H). (I) Blocking Tkv in embryos obtained from *Tl[3]/+* mothers results in embryos with a dorsal expansion of the *vnd* domain (arrow), or expansion of the lateral *vnd* domain into the presumptive mesoderm at the expense of *sna* expression (J). In all panels above, phenotypes consisting of loss of mesodermal gene expression are significantly increased at 70% egg length, which may correspond to the site nearest *dpp* expressing cells (see Model Figure 8). (K) Graphical representation of the Dorsal nuclear gradient in embryos

from *dl*-/+ mothers, *Dp(dpp)*/+;*dl*-/+ mothers (Araujo and Bier, 2000), *Tl[3]*/+ mothers or *dl*-/*matαGAL4-VP16* mothers crossed to *UAS-tkv*[DN], based on the measurement of the *sna* and *vnd* domains at 50% egg length. The slope of the Dl gradient in embryos from *dl*-/+ mothers is similar to wild-type, with only a slight narrowing of the mesoderm. As all experimental genotypes represented were generated in a *dl*-/+ genotypes, the wt curve is not represented. Mesoderm (yellow), neuroectoderm (blue), dorsal ectoderm (red).

Figure 5. *tld* and *tok* are expressed in ventral follicle cells and regulate patterning of the chorion and embryo.

in situ hybridization shows *tld* expression in follicle cells migrating posteriorly over the egg chamber at stages 8 and 9 (A). *tok* expression comes on only at stage 9 (B). Note that between stages 8 and 10 *grk* expression moves from a posterior to a dorsal location in the oocyte. At stage 10, *tld* is restricted to an 18 cell wide band of ventral follicle cells, corresponding to 50% circumference (C). At stage 10 *tok* expression is ventrally restricted to a ventral band 21 cells wide, corresponding to 60% circumference (D). Although in the embryo the same RNA probes detected high and low levels of transcript for *tld* and *tok* respectively, during oogenesis we observed the inverse pattern. In *grk*- egg chambers *tok* (E) and *tld* (not shown) are expressed by all FOC. (F) Anterior portion of a wild-type eggshell showing the angle (dashed line) between the micropyle and the base of the dorsal appendages (DA), where the operculum is formed. (G) Eggshell generated from a mother with *tld*- clones. Observe the smaller size of the operculum and the modified angle. 88% of chorions examined presented this phenotype (n=42) while 12% had short or altered appendages (H) Eggshell generated from a mother overexpressing *dpp* in anterior follicle cells (*GAL4 55B>UAS DppGFP*), raised at 29°C. Note the expanded operculum. (I) Eggshell from a mother overexpressing low levels of *dpp*, raised at 18°C. With lower levels of Dpp DA material extends posteriorly. (J) A similar phenotype is generated upon overexpression of a C-terminal Sog fragment lacking the first CR and the stem (Yu et al, 2000). (K) Wild-type embryonic cuticle showing ventral denticle belts (d) and Filzkörper (fz). (L) Cuticle generated from a mother where *tld*- clones were induced. Note the expanded denticle belts. 76% of cuticles were ventralized as in the Figure and 24% were dorsalized (of 38 cuticles, from 232 non-hatching eggs). In C-E dorsal is up, anterior is left. F-I, side view with dorsal up; J, dorsal view; K,L, ventral view.

Figure 6. Sog fragments present distinct mobilities in the perivitelline space.

(A-G) The distribution of Sog protein in egg chambers bearing *sog*- follicle cell clones, which were detected by the absence of GFP. Sog protein was detected with the 8B (red in C-E) or 8A (pink in A,B,F,G) antisera. (A,B) Stage 9 egg chamber showing specificity of the 8A antisera. Note absence of staining inside *sog*- cells. (C) Stage 10B egg chamber presenting several *sog*- clones (arrows). Note the even distribution of Sog protein in the extracellular space. (D) Dorsal *sog*- clone. The arrowhead points to the anterior border of the clone. 8B detects Sog protein in the extracellular space at least 8 cells away from *sog* expressing cells. This phenotype is representative of most clones analyzed. (E) Ventral anterior *sog*- clone. The arrowhead points to the posterior border of the clone. Sog protein is seen in the extracellular space 4 cells away (arrow) from *sog*+ cells. (F) Sog protein detected by the 8A antiserum in the extracellular space adjacent to a dorsal *sog*- clone.

(G) Ventral anterior *sog*- clone. 8A detects Sog protein restricted (arrow) to *sog*+ cells, not surpassing the clonal border (arrowhead). (H-J) Distribution of Sog protein in egg chambers bearing *tld*- follicle cell clones. Sog protein is detected with the 8B (red in H) or 8A (pink in I,J) antiserum. (H) Distribution of Sog protein detected by 8B is unaltered close to *tld*- clones. Arrowheads point to the posterior limit of a large anterior clone that covers dorsal and ventral cells. (I) A large anterior clone covering dorsal and ventral cells shows a small alteration in the distribution of Sog protein in ventral cells as detected by 8A. Arrowheads point to the posterior border of the clone. The arrow shows Sog in the perivitelline space adjacent to *tld*- cells, for comparison with Sog adjacent to *tld*+ cells (asterisk). (J) High magnification of I, showing that staining is more intense close to *tld*+ cells, as compared to *tld*- cells (arrow). (K-P) The distribution of Sog protein is altered upon over-expression of DppGFP. Egg chambers from CY2>DppGFP females immunostained for Sog with 8B (red, K-M) or 8A (pink, N-P). Although expression of DppGFP is comparable among the ventral and dorsal FOC, GFP fluorescence (green) is greater in the dorsal than the ventral perivitelline space (arrowheads in L), followed by increased Sog 8B staining dorsally (arrowhead in K). (N-P) Conversely, Sog distribution detected with 8A is greater in ventral cells (arrowhead in N). In D-P dorsal is up, ventral down, anterior left and posterior is to the right.

Figure 7. Effect of Sog over-expression and *sog*- clones on patterning of the egg shell and embryo.

(A) A wild-type embryo with ventro-lateral expression of *vnd* and an unstained presumptive mesoderm. (B-D) Mothers with *sog*- follicle cell clones generate embryos with ventral widening of *vnd* expression and consequent reduction of the presumptive mesoderm (B), dorsal shift of *vnd* and widening of the mesoderm (C), dorsal widening of the *vnd* domain (D). These phenotypes were also obtained by over-expression of several UAS-*sog* constructs (Table I). (E) An embryo from a CY2>UAS-Sog mother showing distorted expression domains and slight expansion of *vnd*. (F) Embryos from CY2>UAS-*ssog1* mothers present a mixed phenotype consisting of mesoderm widening and ventral invasion of *vnd* expression. Phenotypes seem more restricted spatially. (G-P) Effect of *dec* marked *sog*- follicle cell clones on the embryonic cuticle (G-L) and egg shell (M-P). (G,I,K,M,O) Focal planes showing cuticle or egg shell phenotypes. (H,J,L,N,P) Focal planes showing the *dec* marked clones on the egg shell. (G-H) A lateral clone generates interrupted and bifurcated ventral denticle belts (arrowheads). This embryo is zygotically *sog*+ since mothers bearing *sog*- clones were crossed to males containing a duplication of the *sog* locus on the Y chromosome. (I,J) *sog*- embryo generated from an egg chamber containing a large ventral clone. The embryo is more dorsalized than an embryo that is only lacking zygotic *sog* function (K,L). (M,N) DA phenotype associated with dorsal *sog*- clones that touch the appendages. Bright appendage material is seen between the base of the DAs. (O,P) Opercular phenotype associated to a ventral-anterior *sog*- clone. The operculum is reduced as compared to wild-type (see Fig. 5).

Figure 8. Model for the production of different Sog fragments during oogenesis and their effect on the eggshell and embryo.

(A,B) Diagram depicting an egg chamber with nurse cells and oocyte. Colors represent proteins in the perivitelline space. Green arrows indicate Dpp produced and secreted from

follicle cells anterior to the oocyte. Sog protein (red) is evenly secreted to the perivitelline space and in ventral cells Tld and Tok may generate Sog fragments (purple). (B) As a consequence of Tld and Tok expression in ventral anterior regions of the perivitelline space, Sog fragments are generated that either remain ventrally restricted (N-Sog, pink) or diffuse dorsally (C-Sog, blue arrow) carrying Dpp dorsally and creating a peak of Dpp activity required for formation of the operculum. Ventral N-Sog as well as dorsal full length Sog antagonize Dpp. (C) In the embryo, a gradient of Dpp is formed with high levels dorsally and low levels ventrally, centered in the region of the embryo where the cephalic furrow will form. This geometry arises from the fact that during mid-oogenesis the distribution of proteins in the perivitelline space is consolidated before the oocyte grows anteriorly under the follicle cells and perivitelline space. (D,E) As a consequence of increased maternal *dpp* expression, the Dpp gradient increases ventrally and to the sides, generating embryos with a localized reduction in the levels of nuclear Dorsal and consequently shifting gene expression domains ventrally. The distribution of Dpp activity proposed for the embryo is in agreement with the phenotypes previously characterized, resulting from an increase in the dose of maternal *dpp* (Araujo and Bier, 2000). In those experiments the effect of gene expression of ventral and lateral genes were greater at 70% egg length, while further dorsally the effects were more widespread along the AP axis.

Supplementary Figure 1. Asymmetry in Dpp distribution generated by overexpression in follicle cells is maintained until the end of oogenesis.

A) Higher levels of Dpp-GFP driven by the CY2 GAL4 driver are observed in the dorsal perivitelline space, as shown by double-staining with Grk antiserum (arrow; on, oocyte nucleus); B) This pattern remains in stage 13 egg chambers; C) Dpp overexpression results in higher levels of Sog ventrally (compare with Fig 6N), however at this stage increased ventral staining is very subtle (arrow). D) Merged image of B and C; E) Although fertilized embryos resulting from Dpp overexpression are rare, increased dorsal fluorescence can be observed in a fully developed oocyte from a CY2>Dpp-GFP female. Compare dorsal versus ventral staining pointed by up and down arrows in A, B and E. Note the anterior defect caused by Dpp overexpression (asterisk).

Supplementary Figure 2. Early blockage of the maternal Tkv receptor alters the distribution of Dorsal protein between the cytoplasm and nucleus.

Optical sections of blastoderm embryos stained for Dl protein. (A) Wildtype embryos present a clear distinction between Dl distribution in dorsal (A') and ventral (A'') nuclei, with staining exclusively cytoplasmic in dorsal nuclei and exclusively nuclear in ventral nuclei. (B) Upon blockage of maternal Tkv receptors by use of the $mat\alpha$ GAL4VP16 driver ($mat\alpha$ >tkvDN) a great amount of Dl protein remains in the cytoplasm in ventral regions, making it difficult to discriminate the nuclei (B''). (C) Upon activation of the pathway by use of an activated form of the Tkv receptor ($mat\alpha$ >tkvA) Dl distribution is not greatly altered as compared to wildtype. (D) In embryos from heterozygous *dl* mothers the gradient is only slightly altered and the distribution between nuclear and

cytoplasmic DI is similar to wildtype. (E) In $mat\alpha>tkvDN$ embryos from heterozygous *dl* mothers, in addition to the alterations described in B the dorsal limit of high nuclear DI staining is pushed further dorsally (compare arrows in D and E).

Table 1. Maternal *sog* regulates the extent of embryonic expression domains along the DV axis. Embryos were collected from females containing *sog*- follicle cell clones (*sog*- clones) or expressing different UAS-constructs driven by the CY2 GAL4 line. Phenotypes classified in the Table are those exemplified in Figure 7. Mesoderm (Mes) reduction or widening was determined on the base of the *sna* expression domain and/or on the absence of *vnd* staining ventrally. The UAS-*sog* constructs used are described in Figure 2.

Genotype	n with NE and/or Mes phenotype (n total)	NE Phenotype % (n)	Mes Phenotype % (n)		distortion % (n)
		ventral NE domain widens ^a	mes reduction	mes widens	
<i>sog</i> - clones	32 (218)	40.6 (13)	47(15)	12.5 (4)	25 (8)
UAS-Sog [*]	16 (429)	31 (5)	38 (6)	0	31 (5)
UAS-ssog1 ^{**}	40 (150)	62.5 (25)	35 (14)	47.5 (19)	0

* Low penetrance of UAS-Sog phenotype as compared to UAS-ssog1 may reflect lower level expression of the construct (see Fig. 2)

** Phenotypes obtained with UAS-ssog1 (and UAS-ssog4, not shown) have spatially restricted effects as compared to UAS-Sog.

^a In this class are gathered embryos with widening of *vnd* either dorsally or ventrally, as represented in Fig 7B,D, due to a potential change in the slope of the Dorsal gradient. Ventral widening of *vnd* necessarily reduces the Mes domain.

Table 2. Chorion phenotype of *sog*- follicle cell clones depend on DV location of the clones. *sog*- follicle cell clones marked by the absence of *dec* were generated as in Methods. Phenotypes listed are exemplified in Figure 7. Numbers represent total of eggs with clones in a given location.

Clone location	Clone size (#cells)	Chorionic Phenotype ^a		
		decreased operculum	fused DAs ^b	none
Ventral	<30			27 ^c
	>30		1	5
Lateral	<30			6
	>30			1
Ventral or Lateral Anterior	<30	10		7 ^d
	>30			
Dorsal	<30		9 ^e	24
	>30			10
Dorsal Anterior	<30	1	2	2
	>30			
Mixed D+V	<30			5
	>30		6	1

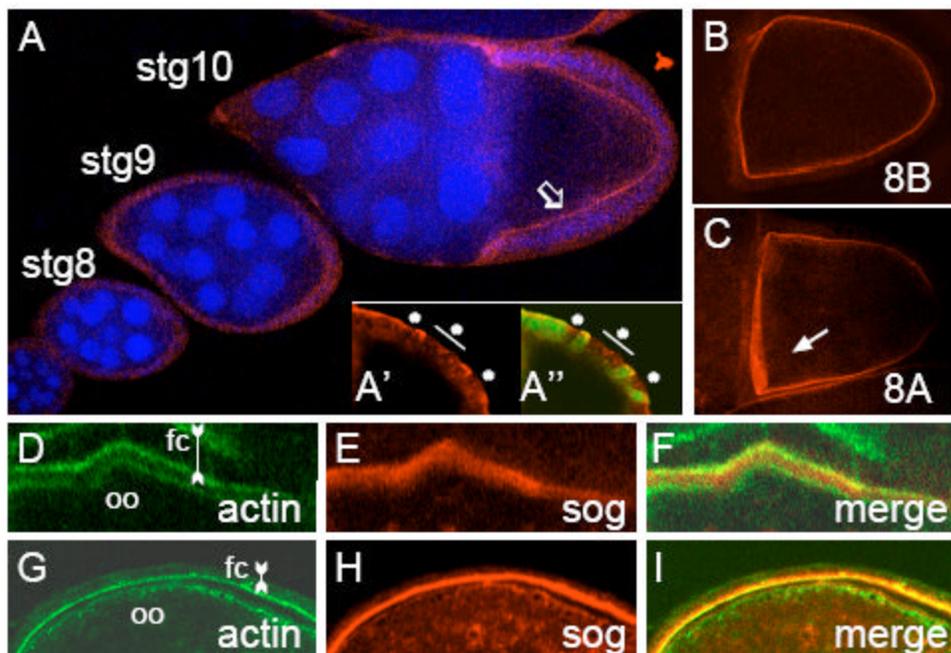
^a We have also encountered phenotypes that could not be associated with any visible clone. These include DA material extended ventrally around the entire DV axis. These phenotypes were not considered in the Table.

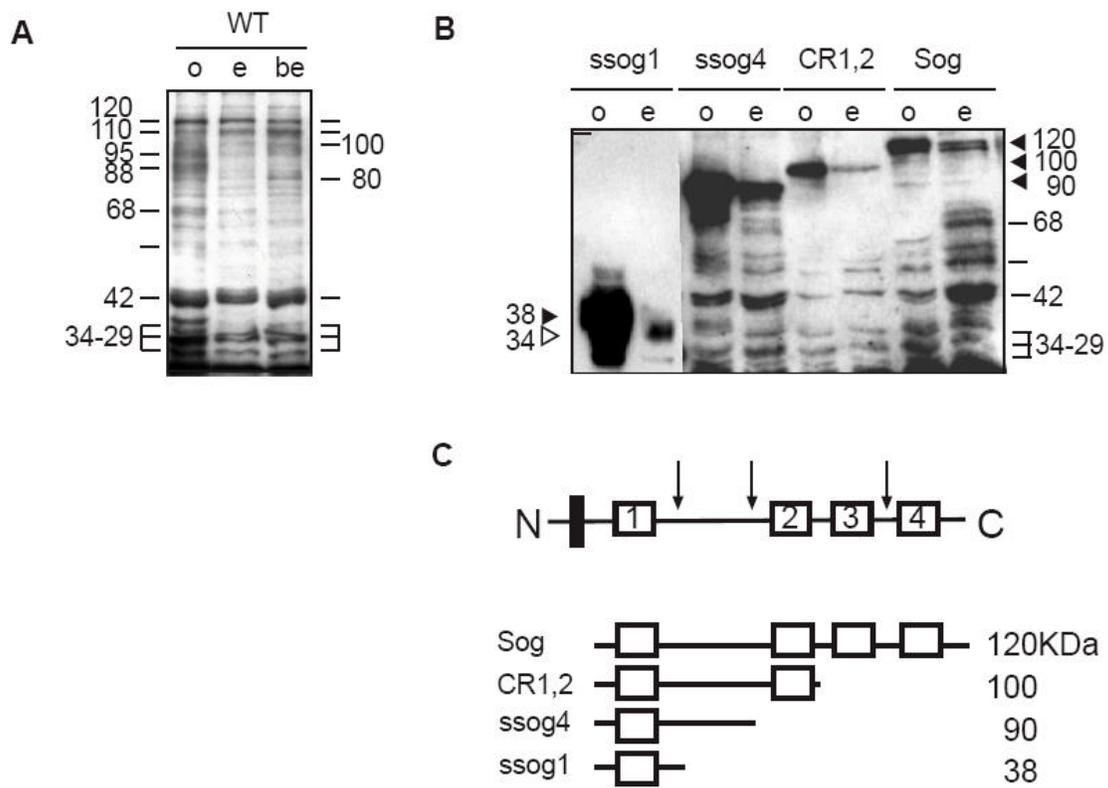
^b Phenotypes classified as “fused DAs” included those with brilliant light-scattering material at the base between DAs, as in Figure 7M,N, as well as truly fused appendages.

^c Usually these consisted of several salt and pepper clones of 1-5 cells

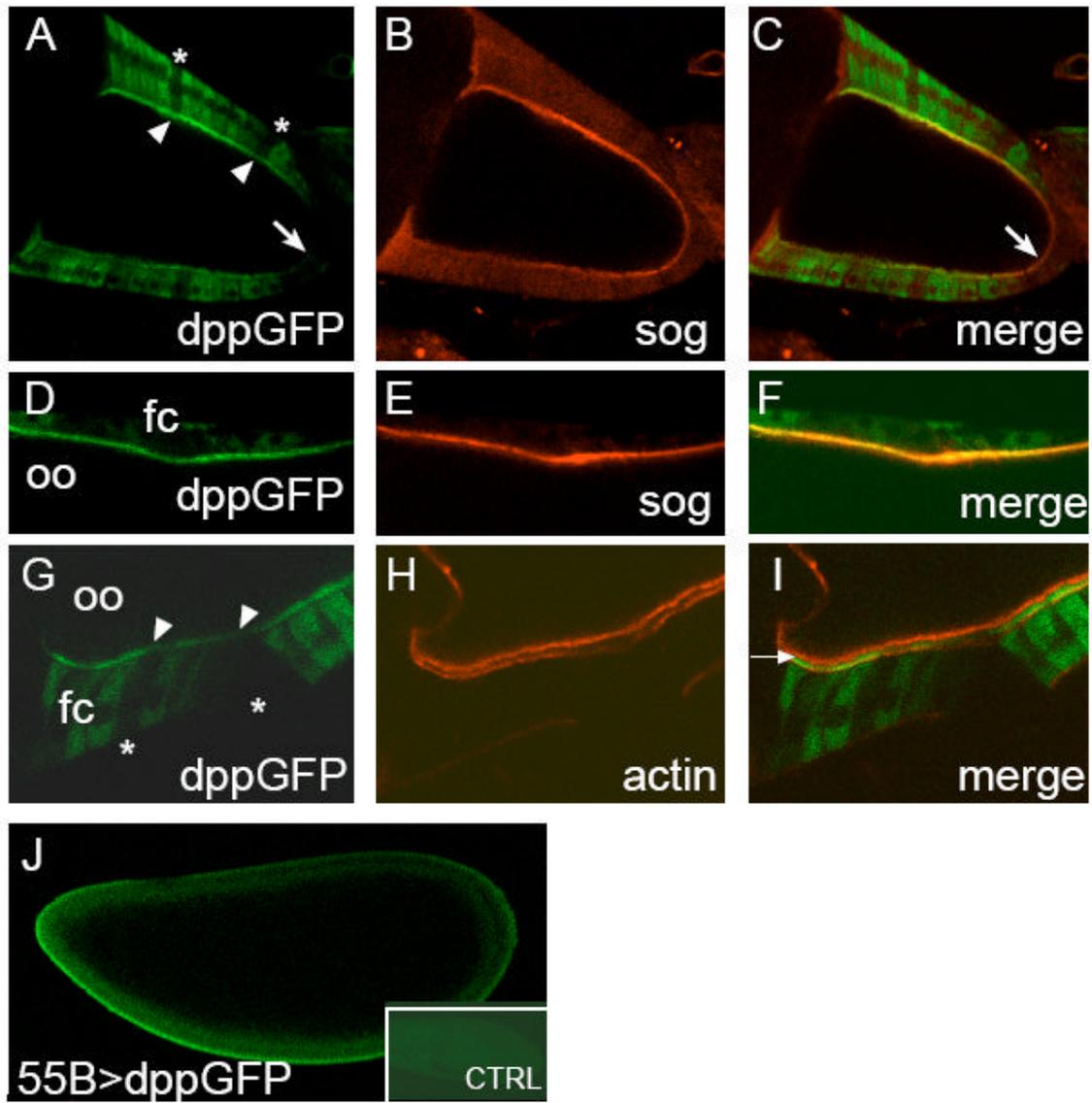
^d These clones were always smaller than 15 cells

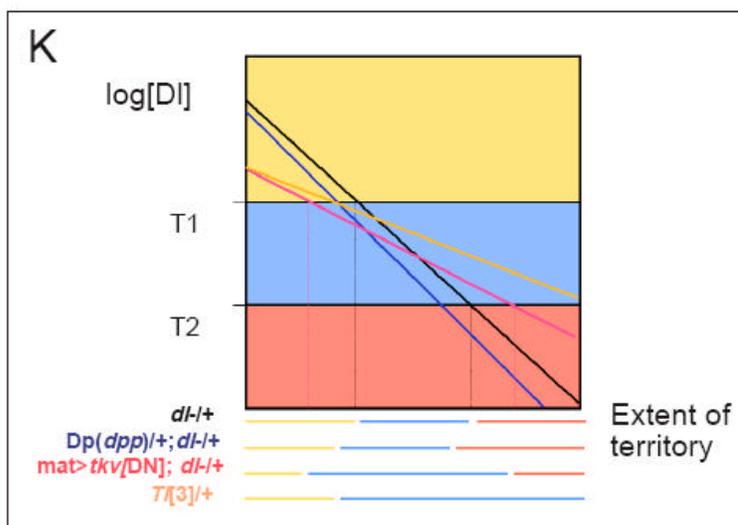
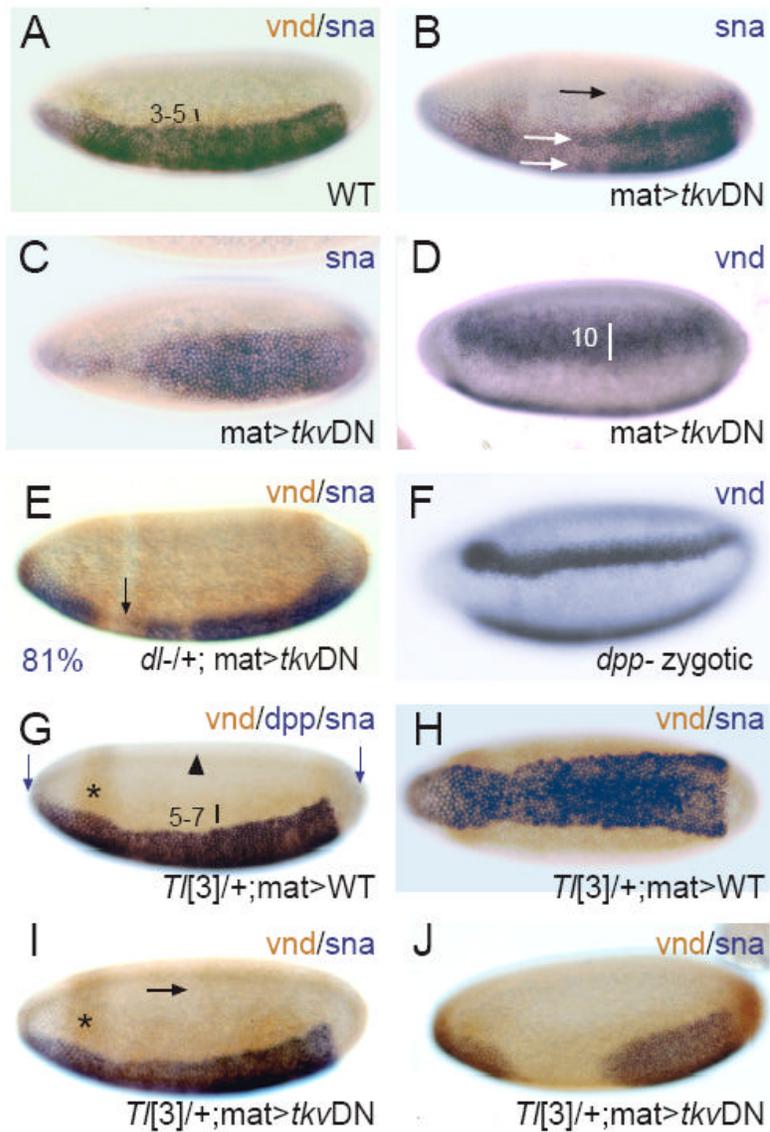
^e All clones associated to a dorsal appendage (DA) phenotype touched the base of the DAs, while those that did not present a DA phenotype did not touch the appendages.

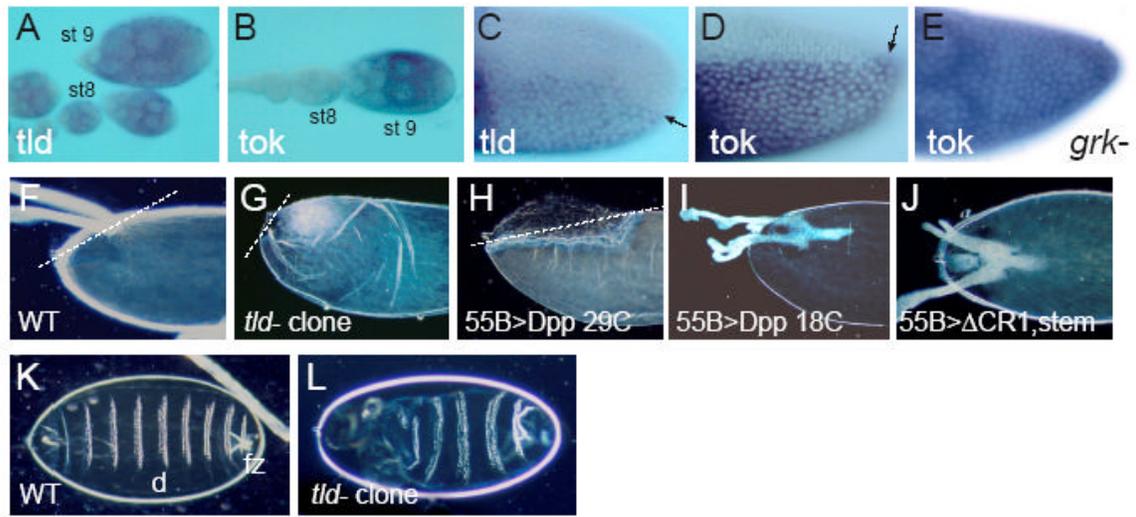




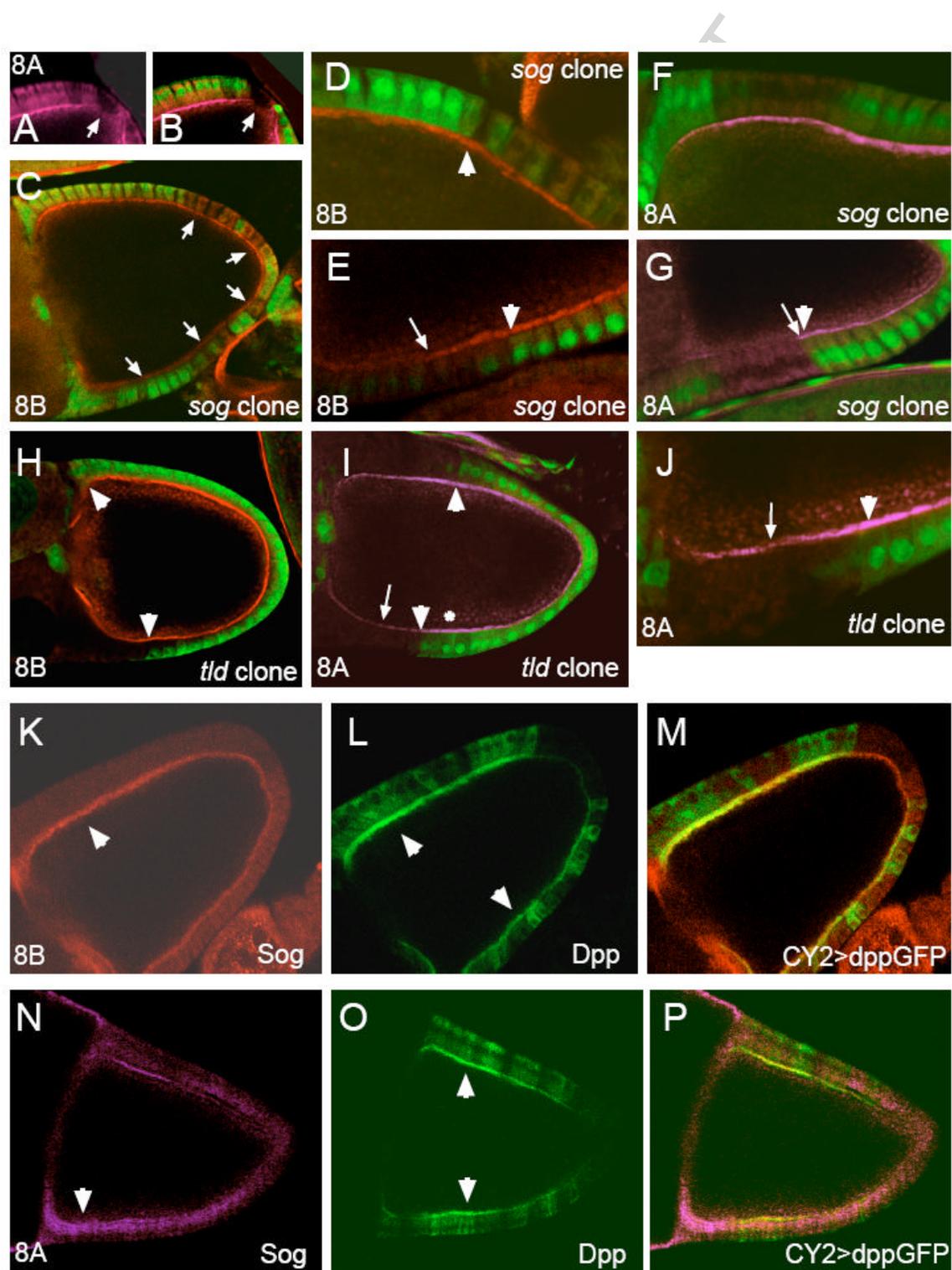
ACCEPTED

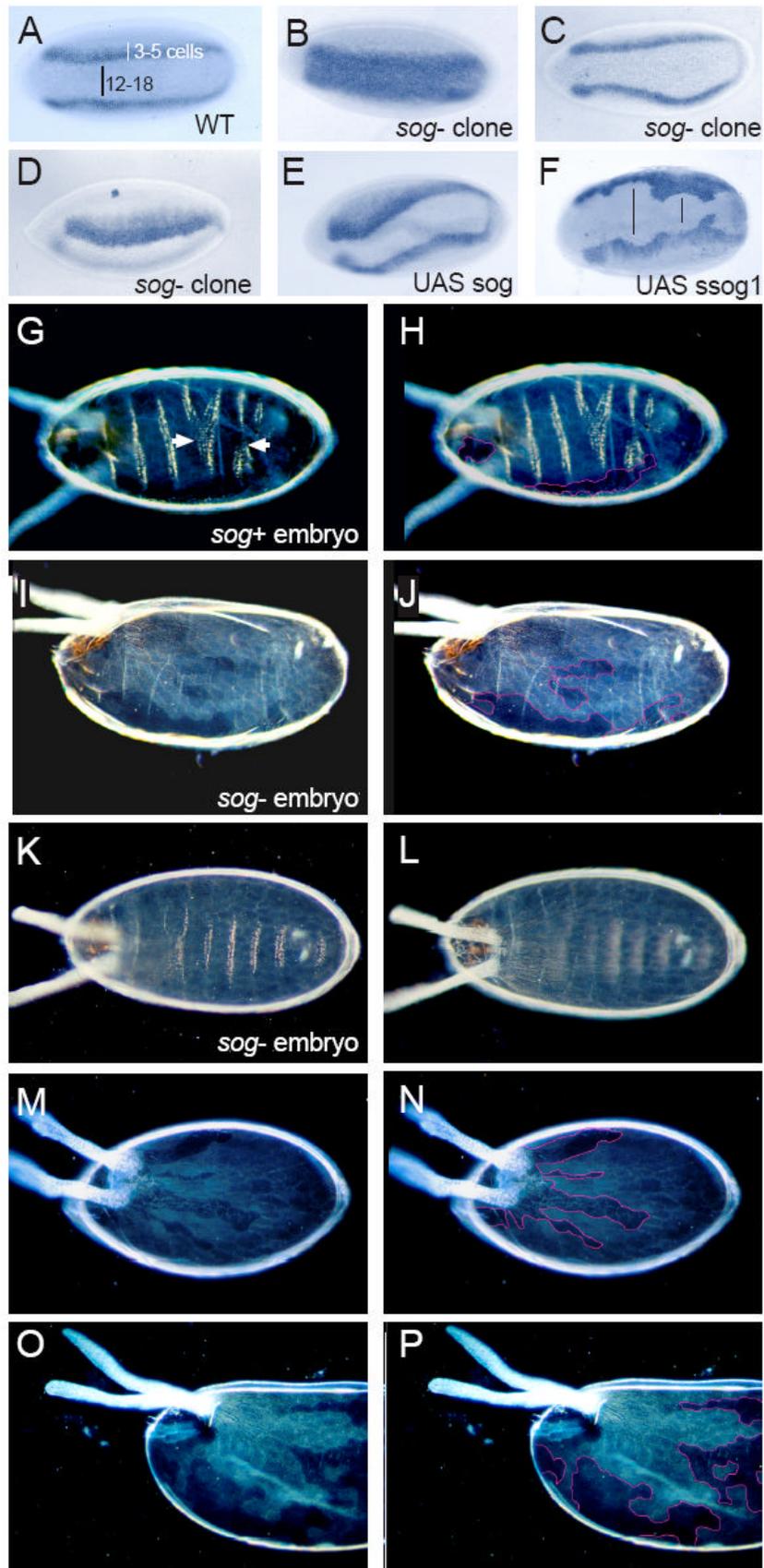






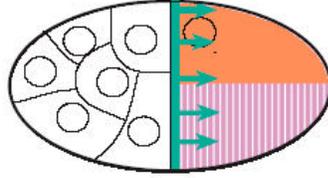
ACCEPTED MANUSCRIPT



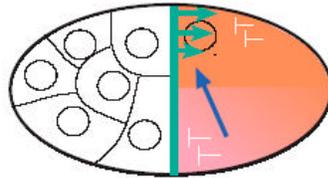


egg chamber

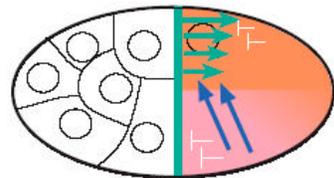
A



B

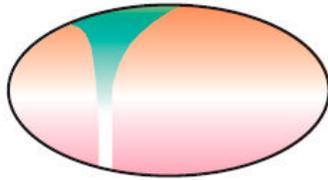


D

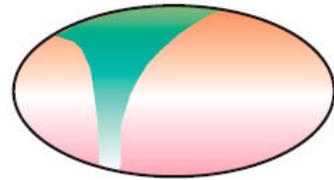


embryo

C



E



Wildtype

Increased maternal Dpp

ACCEPTED

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)