



Función del Represor Capicua en la Interpretación de Señales RTK-Ras-MAPK en *Drosophila*

Leiore Ajuria Astobiza

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Departamento de Genética
Programa de Doctorado de Genética
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona

**FUNCIÓN DEL REPRESOR CAPICUA EN LA
INTERPRETACIÓN DE SEÑALES
RTK-RAS-MAPK EN *DROSOPHILA***

Memoria presentada por

Leiore Ajuria Astobiza

Para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología del Desarrollo del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Parc Científic de Barcelona (PCB), bajo la supervisión del Dr. Gerardo Jiménez Cañero

El director

El alumno

El tutor

Dr. Gerardo Jiménez

Leiore Ajuria

Dr. Florenci Serras

TESIS DOCTORAL

FUNCIÓN DEL REPRESOR CAPICUA EN LA
INTERPRETACIÓN DE SEÑALES
RTK-RAS-MAPK EN *DROSOPHILA*

Leiore Ajuria Astobiza

Barcelona, mayo 2012

A Bittori, Jon y Olatz

Ya hemos llegado hasta aquí, a la parte en la que doy las gracias a todos los que de alguna manera habéis participado en esta tesis. Soy muchos y os prometo que si me quedan fuerzas después de todo esto, lo celebraremos juntos alrededor de una mesa o una barra.

Empiezo dando las gracias a la persona que más importancia ha tenido en esta tesis, a Gerardo. Miles de gracias por haberme enseñado tanto y por ofrecerme todo el tiempo que he necesitado para acabar esta tesis, que no ha sido poca! Tengo que decir que hemos superado mis expectativas.

Sergio. Gracias por aportar siempre un punto de vista distinto al trabajo. Creo que tu contribución ha sido muy importante para mejorarlo. Han sido divertidas las discusiones sobre ciencia y otros temas.

Gracias a los colaboradores, Stas, Ze'ev, Albert Courey a los miembros de sus laboratorios por aportar experimentos y discusiones a nuestro proyecto.

Gracias a los miembros del PBB32. Sergi, gracias por hacer que desde el primer momento me sintiera a gusto en el laboratorio y, fuera de él! Parece mentira que con el poco tiempo que coincidimos en Barcelona incluso me hayas abierto las puertas de tu casa en NY! Érica, mi compañera de... de todo! Hemos trabajado, hemos salido, hemos montado un mercadillo y hasta hemos ido a una boda juntas. Siempre serás "mi compañera de laboratorio". Nuria, tu vales para todo. Lo mismo compras puntas, que regalos, que haces in situs o nos dices cuáles son los mejores cócteles de Barcelona. Gracias por todo lo que me has ayudado durante todo este tiempo. Claudia, nadie te agradecerá nunca tanto el resultado de un EMSA. Mariajo, no te creas que has tenido un papel fácil en el laboratorio, has sido la "substituta" de Érica y eso no es nada fácil. Gracias por ofrecerte siempre a echar una mano de manera desinteresada.

Gracias a los vecinos de los lados. Carol, te acuerdas cuando llegamos a la habitación del hotel de Washington? Gracias por acogerme en NY y hacerme pasar unos días tan divertidos. Gemma, gracias por compartir tantos momentos conmigo, sobre todo al principio de mi estancia en Barcelona y por haberme prestado "El Tracker". Jose, echamos de menos tu ironía. A ver si buscamos una ciudad con mar para seguir navegando! Louis, ya que no hemos vuelto a repetir la salida a Nuria, tendremos que hacer alguna por Francia, no? Nico, eres el Google maps (versión siglo XX) pero ¿qué haríamos sin estos momentos? Andreu, gracias por acompañarme desde el JFK a casa de Sergi y Carol y por la conversación del trayecto. Gracias también por haber aceptado estar en el tribunal de la tesis. El clan de las mamis: Sofia, por las barbacoas en tu casa, porque antes se pillaba al mentiroso que al cojo, mira que intentar engañarnos con que estabas enferma... Anni, la persona lista, divertida, deportista y más estilosa del pasillo, la palabra estupenda está inspirada en ti. Kyra, the person who made all of us to switch the language without complainig (because we like you). Saint Patrick's days are much more fun since you are around. Remember that you offered me a job in your future lab! Nareg, its nice to have such a positive person around. Work and live discussions with you were fun and beers too! El clan de los "predocs": Bárbara, la persona con más energía que conozco. Hemos reído y hemos pasado malos momentos pero hemos llegado hasta (casi) el final, no? Seguro que acabamos encontrándonos en el futuro. Elisenda, por invitarme tantas veces a Vilanova (a ese gran pueblo!), por haber compartido salidas en barco, meriendas por las tardes y algunas noches de viernes. Marco, tu deberías ir de coautor en esta tesis y con asterisco al lado del nombre. Me has ayudado con la informática, con experimentos,

con la escritura y muchas cosas más sin poner una mala cara. Gracias por los momentos divertidos dentro y fuera del laboratorio. Delia, la persona que con diferencia, acumula más locura. Me lo he pasado muy bien contigo sobre todo cuando el trío calavera estaba en activo. Oscar, espero que nuestra “colaboración” sea fructífera. Gracias por compartir tu infinito conocimiento sobre restaurantes de Barcelona. Alessandro, todavía alguien que explotar pero un gran fichaje para este clan.

Gracias a Esther, una de las personas más alegres del pasillo junto con Neus, si me imagino vuestras caras siempre me salen sonriendo y esto es una gran virtud en nuestro pasillo.

Gracias a los otros vecinos. Isa, por enseñarme a hacer inmundos de discos de ala, por compartir tantos y tantos pasteles de chocolate con nosotros y por divertirnos tanto viendo partidos de fútbol. Neus, por compartir tantas cosas conmigo. Por haberme invitado a la transegre, a tu boda... Ha sido un placer tenerte cerca, ahora que estamos lejos te he hecho de menos.

Cristina, la mejor compañera de piso y de ensayos de charlas! Mira que hemos compartido penurias en el piso hippy pero siempre sin perder los nervios (aunque alguna vez lo pareciera). Tu me has enseñado que la pintura blanca de pared sirve para todo!

Gracias a Lidia (la del confo), Ainoa, Georgina, Lara, Arzu, Pilar, Gaylord, Duarte, Héctor, Sergi, Andrés, Lidia, Friedemann, Marc, Xavi, Sara, Marta, Jordi Casanova y Jordi Bernués, por ayudarme con el confocal, inyectar embriones, aceptar ser suplentes en el tribunal de la tesis, dejarme reactivos, explicarme protocolos, por los comentarios divertidos en el pasillo...

Gracias a los no científicos, sobre todo a Oscar y a Claudia porque vosotros habéis sido la base de lo que he construido durante este período en Barcelona y porque nos lo hemos pasado bien, no? A Paula, Alex, Berni, David, Miriam, Helena, Ignasi, Mónica, Nacho, Marta, Esteve, por haberme acogido tan bien en Barcelona, por tantas cenas, partidos de fútbol, salidas, fiestas, “frikadas” como las de la casa rural...

Gracias a Loidi y a Patri, porque aunque hayáis estado miles de veces en Barcelona, siempre volvéis a visitarme y me contagiáis con un poco de espíritu bilbaíno.

Eskerrik asko ama, aita eta Olatz. Ez zan momenturik onena ni Bartzelonara etortzeko baina halan eta guztiz etortzera bultzatu ninduzuen, pozik nago emaitzarekin eta espero dot zuek be holan egotea. Hurrengo orrietan daukazue denbora guzti honetan egin dodan lanaren emaitza, zuentzako.

Miles de gracias a todos!

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Introducción.....	3
1. Las vías de señalización.....	3
1.1 Las vías de señalización Receptor Tirosina Kinasa (RTK)	6
1.2 Especificidad de las vías de señalización Ras-MAPK	7
2. La regulación transcripcional por factores de transcripción	8
2.1 El factor represor Cic	10
2.1.1 La conservación evolutiva de Cic	10
2.1.2 La función de Cic en el desarrollo y enfermedades	10
2.2 Correpresores: Gro y Atxn	11
3. El desarrollo temprano de <i>Drosophila</i>	13
3.1 El control materno del desarrollo temprano de <i>Drosophila</i>	13
3.2 Establecimiento de los ejes en el oocito.....	13
3.3 Establecimiento de los ejes en el embrión	15
3.3.1 El sistema terminal de <i>Drosophila</i>	17
3.3.2 El sistema dorsoventral de <i>Drosophila</i>	19
4. El establecimiento del patrón de las venas en el disco imaginal de ala	20
Objetivos.....	23
Informe sobre el factor de impacto de las publicaciones.....	25
Discusión	27
1. El mecanismo de regulación de Cic	28
1.1 Cic regula la expresión de los genes terminales a través del octámero TG/CAATGAA.....	28
1.2 Los lugares de unión a Cic son suficientes para mediar represión in vivo	29
1.3 Cic regula la expresión de <i>ind</i> en el eje D/V del embrión	29
1.4 Cic regula la expresión de <i>argos</i> en el disco imaginal de ala.....	31
1.5 La regulación de <i>hkb</i> por Cic requiere la función de Gro.....	33
2. El establecimiento del eje D/V en las células foliculares del ovario ...	34
3. Circuitos represores similares definen el patrón A/P y D/V de <i>Drosophila</i>	36

4. Interacciones competitivas entre substratos de la MAPK revelan un nuevo mecanismo de control en respuesta a la señal de Torso.....	37
Conclusiones	41
Bibliografía.....	43
Publicaciones	49
Las secuencias de unión a Capicua son elementos de respuesta generales a la señalización por RTKs en <i>Drosophila</i>	49
Mirror reprime la expresión de <i>pipe</i> en la células foliculares para iniciar la formación del eje dorsoventral en <i>Drosophila</i>	61
La competición entre substratos de la MAPK, integra las señales implicadas en la formación del patrón del embrión de <i>Drosophila</i>	69
Informe del director sobre la contribución en las publicaciones	77

ABREVIATURAS

Abreviatura Nombre completo

A/P	Antero-Posterior
ADN	ácido desoxirribonucleico
<i>aos</i>	<i>argos</i>
<i>ara</i>	<i>araucan</i>
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
<i>atxn</i>	<i>ataxina</i>
<i>bcd</i>	<i>bicoid</i>
<i>bs</i>	<i>blistered</i>
<i>bwk</i>	<i>bullwinkle</i>
<i>caup</i>	<i>caupolican</i>
<i>cic</i>	<i>capicua</i>
<i>clos</i>	<i>closca</i>
D/V	Dorso-Ventral
<i>dl</i>	<i>dorsal</i>
dpERK	doubly phosphorylated extracellular signal-regulated kinase
<i>dpn</i>	<i>deadpan</i>
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>
E(SPL)-C	Enhancer of Slipt Complex
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ETS	E-Twenty Six
<i>eve</i>	<i>even skipped</i>
<i>fet</i>	<i>fettucine</i>
Fig	Figura
<i>fs(1)N</i>	<i>female sterile nasrat</i>
<i>fs(1)ph</i>	<i>female sterile polhole</i>
<i>grg</i>	<i>groucho related gene</i>
<i>grk</i>	<i>gurken</i>
<i>gro</i>	<i>groucho</i>
<i>h</i>	<i>hairy</i>
HAT	Histone acetiltransferase
<i>hb</i>	<i>hunchback</i>
HDAC	Histone deacetilase
HMG	<i>high mobility group</i>
<i>hkb</i>	<i>huckebein</i>
HMT	Histone methiltransferase
<i>ind</i>	<i>intermediate neuroblast defective</i>
<i>iro</i>	<i>iroquois</i>
ISC	Intestinal stem cell
kb	kilobase
<i>kni</i>	<i>knirps</i>
<i>kr</i>	<i>Kruppel</i>
<i>lz</i>	<i>lozenge</i>
<i>M</i>	<i>Minute</i>
min	minuto
<i>mirr</i>	<i>mirror</i>
nc	nurse cell

Abreviaturas

NCOR2	Nuclear Receptor Correpresor 2
<i>nos</i>	<i>nanos</i>
OD	oligodrendrogloma
<i>osk</i>	<i>oskar</i>
pb	pares de bases
<i>pnt-P2</i>	<i>pointed P2</i>
<i>pros</i>	<i>prospero</i>
<i>rtn</i>	<i>retained</i>
<i>rho</i>	<i>rhomboid</i>
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
<i>sna</i>	<i>snail</i>
TGF α	Transforming Growth Factor α
TLE	Transducin Like Enhancer of Split
<i>ill</i>	<i>tailless</i>
<i>tor-RE</i>	<i>torso response element</i>
<i>trk</i>	<i>trunk</i>
<i>tsl</i>	<i>torso like</i>
<i>ttk</i>	<i>tramtrack</i>
<i>twi</i>	<i>twist</i>
μ g	microgramo
μ l	microlitro
<i>vnd</i>	<i>ventral nervous system defective</i>
<i>vvl</i>	<i>ventral veinless</i>
<i>w</i>	<i>white</i>
wt	wild type

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un organismo pluricelular a partir del cigoto requiere la determinación de multitud de tipos celulares distintos y su organización espacial y temporal de acuerdo con un plan invariable. Estudios embriológicos, genéticos y moleculares llevados a cabo en distintos sistemas modelo han mostrado que al menos una parte de la información de la organización espacial se encuentra ya presente en el huevo fertilizado. Estos primeros determinantes maternos interactúan con genes cigóticos y así, una red compleja de regulaciones tempranas determina el plan corporal del futuro adulto.

Las vías de señalización juegan un papel muy importante en la formación de las primeras asimetrías del embrión y durante todo el desarrollo animal como veremos a lo largo de esta introducción.

1. LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

La señalización celular controla diversos procesos biológicos determinando el desarrollo, supervivencia e incluso la muerte en algunos casos. El funcionamiento de estas vías es sorprendentemente similar en la mayoría de los organismos con un origen evolutivo común mostrándose como un mecanismo celular robusto que regula funciones clave del desarrollo de un animal. La disfunción de alguna vía de señalización puede conducir a problemas en el desarrollo y provocar enfermedades tan notables como el cáncer. Es por esta razón por la que el estudio de las vías de señalización no solamente es importante para entender el funcionamiento normal de la célula sino que es además de vital importancia para entender el crecimiento y la actividad de células aberrantes.

Las vías de señalización modulan la expresión de genes cigóticos, a menudo modificando la actividad de factores de transcripción en el núcleo. Barolo y Posakony han descrito tres hábitos o principios por los que operan las vías de señalización para regular la transcripción génica (Fig. 1) (Barolo and Posakony, 2002). El primero consiste en la insuficiencia activadora (Fig. 1A). Un solo evento de señalización de una vía no activa todos sus genes diana ni tampoco una diana es activada por todos los eventos de señalización de dicha vía. Esta observación sugiere que la activación de una vía de señalización a niveles fisiológicos resulta a menudo insuficiente para la activación de todas sus dianas. Esta insuficiencia

puede deberse a la presencia de elementos reguladores en el promotor o *enhancer* que unen represores transcripcionales para restringir la expresión del gen o activadores adicionales para facilitar su expresión. Un ejemplo de este último caso lo encontramos en la expresión de *prospero* (*pros*) en el receptor neuronal R7 en el desarrollo del ojo de *Drosophila* (Xu et al., 2000). La expresión de *pros* se da únicamente en aquellas células donde además de la vía de señalización de EGFR, la vía de Sevenless también está activa y cuando estos dos eventos ocurren en presencia del factor de transcripción Lozenge (Lz) (Fig. 2). De este modo ninguno de estos eventos en solitario posee la capacidad exclusiva de activar la expresión de *pros* en el receptor neuronal R7.

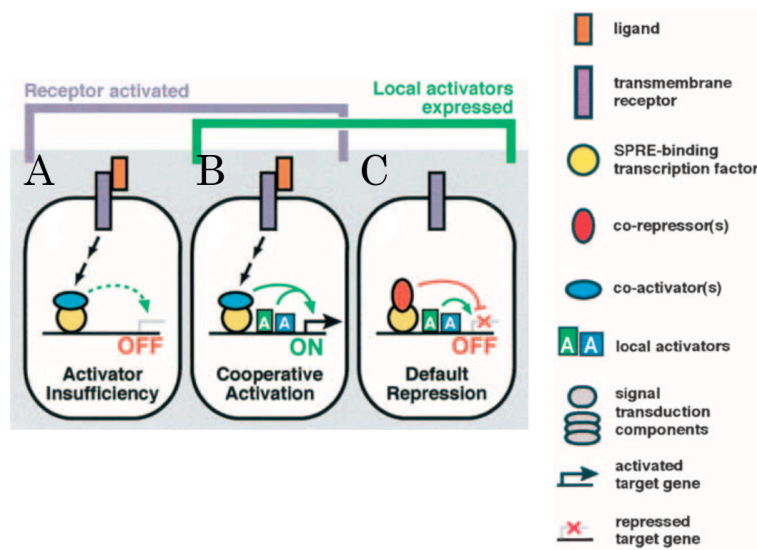


Fig. 1. Los tres hábitos que toman las vías de señalización. **(A)** Insuficiencia activadora. La expresión del gen diana bien está reprimida por un represor local o bien necesita un activador adicional. **(B)** Activación cooperativa. La combinación entre la señalización y activadores locales inducen la transcripción localizada. **(C)** Represión por defecto. Los activadores locales no son suficientes para la expresión de un gen. (Adaptado de Barolo and Posakony, 2002)

El segundo de los hábitos se denomina activación cooperativa (Fig. 1B). La confluencia entre la vía de señalización y factores activadores independientes en el *enhancer* de un gen diana ofrece un contexto apropiado para su expresión. El ejemplo anterior también es adecuado para explicar este hábito donde la presencia de Lz es imprescindible para la expresión de *pros* en los receptores neuronales R7 (Fig. 2).

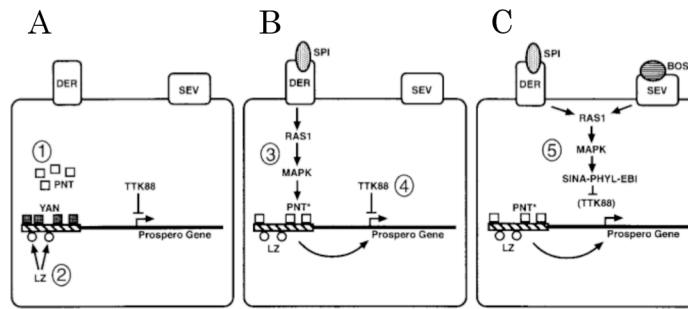


Fig. 2. La expresión de *pros* requiere varias aportaciones para su expresión en el receptor R7. **(A)** Las vías de EGFR y Sevenless no están activas por lo que los represores Yan y TTK88 reprimen *pros*. **(B)** La vía de EGFR substituye el factor Yan por Pnt en presencia de Lz pero *pros* sigue reprimido por TTK88. **(C)** Además del factor Lz EGFR y Sevenless están activos substituyendo Yan por Pnt y aliviando la represión de *pros* por TTK88. (Adaptado de Xu et al., 2000)

Por último, encontramos el tercer hábito, que se denomina represión por defecto (Fig. 1C). Este mecanismo evita el fenómeno de “suficiencia débil” donde uno de los factores activadores proporciona un nivel de expresión débil de su diana. Existen cuatro mecanismos por los que las vías de señalización controlan los genes que contienen sus elementos de respuesta para sobreponerse a la represión por defecto: Tipo I. La represión por defecto y la activación por la vía de señalización se dan a través del mismo elemento de la secuencia del gen diana. En este caso la vía de señalización se emplea para convertir el factor represor en activador y proceder simultáneamente a desreprimir y activar el gen diana (Fig. 3A).

Tipo II. La vía de señalización substituye el factor represor por el activador los cuales reconocen secuencias iguales o solapantes. Las vías RTK que modifican la unión a ADN de Pointed-P2 (Pnt-P2) y Yan encajarían en este tipo de represión por defecto (Fig. 3B).

Tipo III. Los factores activadores y represores reconocen distintas secuencias. La señalización estimula los promotores diana por activación directa sobreponiéndose a la represión y/o por desrepresión (Fig. 3C).

Tipo IV. La señal solamente induce la desrepresión dependiendo en unos activadores locales o ubicuos que dirigen la expresión de la diana (Fig. 3D). Este es el caso de la vía de señalización de Torso que alivia la represión ejercida por el factor de transcripción Capicua (Cic) (Jimenez et al., 2000).

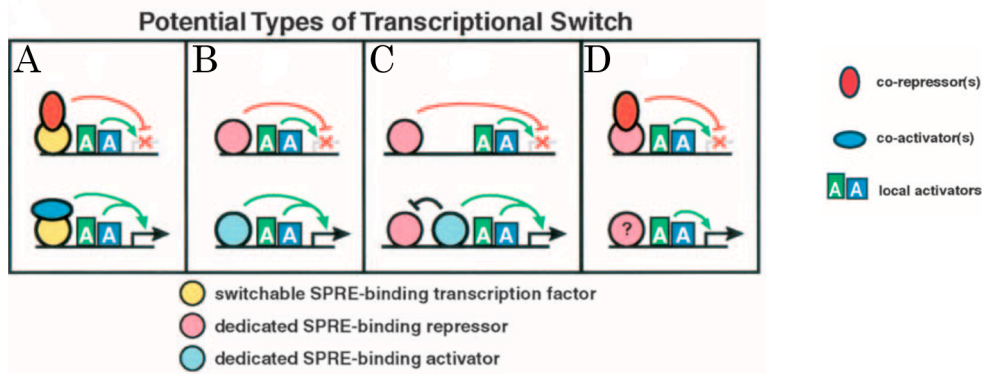


Fig. 3. (A) La señalización es necesaria para intercambiar el cofactor represor (rojo) por el activador (azul). (B) La vía desasocia el represor (rosa) de la región reguladora del gen para posibilitar la unión del activador (azul) a la misma secuencia o a otra solapante. (C) El efecto del activador (azul) se sobrepone al efecto del represor (rosa) tras recibir la señal de la vía. (D) La señalización inactiva o desasocia el factor represor (rojo) de la región reguladora expresando y desreprimiendo al mismo tiempo la expresión de la diana. (Adaptado de Barolo and Posakony, 2002)

El resultado de la acción combinada de los tres hábitos es el establecimiento de patrones de expresión definidos.

1.1 LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RECEPTOR TIROSINA KINASA (RTK)

Las vías de señalización RTK regulan multitud de procesos biológicos como la proliferación, diferenciación, morfogénesis y supervivencia. Muchas RTK señalizan mediante la vía conservada Ras-MAPK que resulta en la fosforilación de factores de transcripción y otras proteínas a fin de inducir una amplia gama de respuestas celulares en diferentes contextos (Fig. 4).

Todos los RTKs tienen una arquitectura molecular similar, un dominio de unión a ligando extracelular, una única hélice transmembrana y una región citoplasmática que contiene el dominio de tirosina kinasa. El mecanismo de transducción de la señal en las vías RTK comienza al activarse el receptor de membrana por un ligando extracelular induciendo la oligomerización del receptor y su autofosforilación en varios residuos de tirosina intracelulares. Este primer evento proporciona lugares de anclaje para complejos citoplasmáticos que estimulan una cascada intracelular a través de distintas vías como fosfolipasa $C\gamma$ (PLC γ), fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y GTPasa pequeña Ras seguida de las quinasas serina/treonina, Raf, Mek y MAPK/Erk (Fig. 4) (Lemmon and Schlessinger, 2010). La señalización por las RTK suele a menudo provocar modificaciones en la expresión transcripcional por lo que los componentes nucleares fosforilados por la vía son claves para la interpretación de las respuestas RTK. En *Drosophila* y

vertebrados, los efectores de la cascada RTK-Ras-MAPK mejor estudiados han sido los de la familia de E-twenty-six (ETS), Pnt-P2 y Yan, que median múltiples decisiones celulares (Brunner et al., 1994; Gabay et al., 1996; O'Neill et al., 1994; Rebay and Rubin, 1995; Tootle and Rebay, 2005). No obstante, diferentes trabajos han mostrado que el factor de transcripción Cic se encuentra fosforilado por la MAPK por debajo de las vías de Torso y EGFR sugiriendo que puede estar mediando respuestas transcripcionales (Astigarraga et al., 2007; Goff et al., 2001; Jimenez et al., 2000; Lohr et al., 2009; Roch et al., 2002; Tseng et al., 2007). En este trabajo profundizaremos en la función de Cic como efector de las vías RTK.

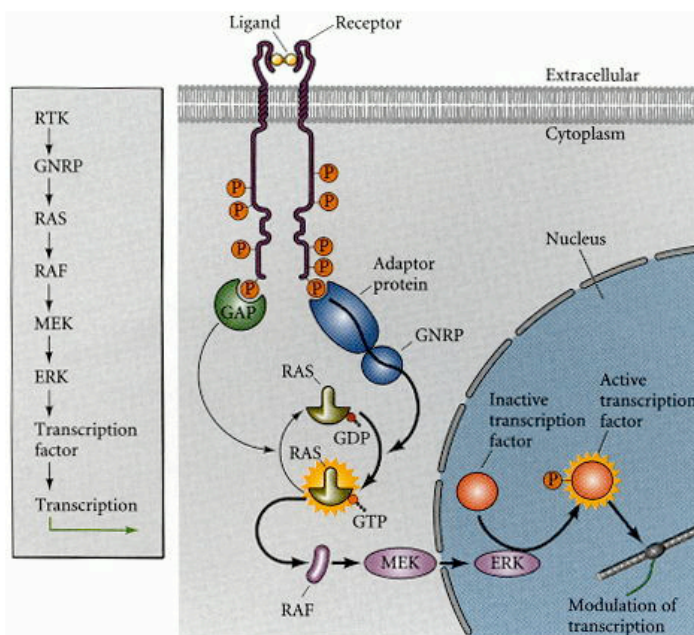


Fig. 4. Esquema de la vía RTK. El ligando se une al receptor causando su dimerización y la consiguiente autofosforilación. La proteína adaptadora reconoce los residuos de tirosina fosforilados y activa una proteína intermediaria, GNRP. Seguidamente, Ras-GTP activa a Raf que fosforila una serie de quinasas que alteran la transcripción génica a través de la modulación de factores de transcripción. (Tomado de Gilbert, 2003)

1.2 ESPECIFICIDAD DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RAS-MAPK

Una de las cuestiones más discutidas en torno a las vías de señalización es cómo un grupo inicial de células equivalentes desarrollan tejidos complejos que contienen diferentes tipos celulares. Muchas investigaciones han mostrado que el destino celular viene, a menudo, determinado por la activación de receptores transmembrana de la familia de las RTKs.

Existen dos modelos para explicar la especificidad en la respuesta a eventos de señalización por RTKs. El primero postula que hay diferencias intrínsecas en la cascada de señalización que pueden ser cuantitativas o cualitativas. En cuanto a las cuantitativas, se pueden diferenciar entre la fuerza y la duración de la señal.

En las células PC12 por ejemplo, la activación del receptor EGF debe ser fuerte pero corta ya que su prolongación artificial resulta en la diferenciación de las células en vez de la proliferación (Traverse et al., 1994). Referente a las diferencias cualitativas, cada tipo de célula puede contener diferentes factores para dar una u otra respuesta a la señalización. Por ejemplo, las proteínas de ensamblaje de las cascadas son importantes para reclutar otros factores en respuesta a un evento de señalización específico y aproximarlos entre ellos (Yu et al., 1998). Estas proteínas proporcionan una mayor estabilidad a algunos componentes de la cascada para determinar el umbral de la señalización y reclutar distintos sustratos de componentes individuales de la cascada a fin de mediar diferentes respuestas. La localización subcelular de los componentes de la vía Ras-MAPK y su relocalización en el momento de la estimulación puede representar otro mecanismo de especificidad. De esta manera, la señalización en distintos compartimentos de la célula puede resultar en diferentes respuestas (Mor and Philips, 2006; Pouyssegur et al., 2002; Yoon and Seger, 2006). Un tercer mecanismo de especificidad puede deberse a la existencia de diálogo entre la cascada de MAPK y otras vías intracelulares. Aunque la cascada de MAPK normalmente forma entre 3 y 5 eslabones lineales, otras vías pueden regular la actividad de los componentes de la vía modificando su activación en distintas condiciones fisiológicas. Estas modificaciones, que a menudo afectan a la cinética y localización de señales, suelen deberse a la fosforilación/defosforilación por kinasas y fosfatasas que no siempre forman parte de la cascada de Ras-MAPK (Shaul and Seger, 2007). Por último, pueden existir varias isoformas de los componentes de la vía con distintas funciones o que atienden a una regulación diferente que conllevan una respuesta específica de la señalización.

2. LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

La expresión localizada de genes es un balance entre mecanismos activadores y represores. Clásicamente el mecanismo más estudiado entre ellos ha sido la activación ya que en una célula eucariota típica sólo alrededor del 7% del ADN se transcribe a ARN pareciendo muy improbable que exista un mecanismo específico de represión para el 93% restante (Alberts, 1983). Estudios más recientes, sin embargo, han demostrado que la represión transcripcional es esencial para el establecimiento localizado y el refinamiento de la expresión génica en líneas,

bandas y patrones específicos durante el desarrollo de *Drosophila* (Nibu et al., 1998).

La clasificación de los mecanismos de represión resulta difícil por la complejidad y diversidad de las interacciones proteína-proteína en la regulación de la transcripción. Además se conoce que un gran número de represores actúan mediante distintos mecanismos y estos, habitualmente, son dependientes de promotores particulares. No obstante, una de las posibles clasificaciones que podemos realizar se basa en el rango de acción. Los de rango corto actúan a una distancia de unos 50-100 pb para silenciar los activadores o la maquinaria de transcripción. Este modo de acción permite a los *enhancers* actuar independientemente para generar patrones de expresión complejos como por ejemplo los de *even-skipped* en el embrión de *Drosophila* (Small et al., 1992). Los represores de rango largo pueden actuar incluso a más de 1 kb de distancia pudiendo silenciar varios promotores o *enhancers* al mismo tiempo (Barolo and Levine, 1997; Cai et al., 1996). El mecanismo de acción de la represión en rango corto puede implicar la remodelación de la cromatina, la unión del represor a un promotor o bien la formación de complejos con activadores o componentes de la maquinaria de transcripción (Bulger and Groudine, 1999). La represión de rango largo puede a menudo implicar el ensamblaje de un complejo represor llamado “represeosoma” que sería análogo al “enhanceosoma”, complejo que media la activación (Courey and Jia, 2001). Estos dos mecanismos de represión según el rango de acción no necesariamente son excluyentes entre ellos, pudiendo ejercer la represión de ambas maneras (Paroush et al., 1994; Poortinga et al., 1998).

Por otro lado, podemos distinguir diferentes tipos de represores dependiendo de si se unen o no a ADN. Uno de los aspectos que queremos estudiar en este trabajo es si la proteína Cic de *Drosophila* ejerce la represión uniéndose a sus genes diana o por el contrario actúa indirectamente sobre ellos. Además se ha documentado que el correpresor general Groucho (Gro) está implicado en la represión mediada por Cic pero está por definir si lo hace uniéndose directamente a la proteína o formando un “represeosoma”.

2.1 EL FACTOR REPRESOR CIC

2.1.1 LA CONSERVACIÓN EVOLUTIVA DE CIC

Cic es una proteína identificada por su función por debajo de la vía RTK de Torso. Contiene 3 dominios conocidos de los cuales 2 están altamente conservados desde los cnidarios hasta los vertebrados. Uno de los motivos es la HMG-box que es importante para la localización nuclear de la proteína (Fig. 5). El segundo motivo es el C1 con una función molecular aún sin identificar pero distintos estudios han revelado su importancia para la represión transcripcional (Fig. 5) (Astigarraga et al., 2007; Jimenez et al., 2000; Kawamura-Saito et al., 2006; Lee et al., 2002). El tercer motivo y el menos conservado de ellos es el C2 (Fig. 5), motivo al que se ancla la MAPK Rolled para así fosforilar la proteína y dirigir su desactivación de una manera aún desconocida (Astigarraga et al., 2007).

Existen al menos dos isoformas de Cic en *Drosophila* y mamíferos, Cic-S y Cic-L, que se diferencian en la región N-terminal de la proteína, siendo Cic-L la más larga. La función de la isoforma larga ha sido menos estudiada pero se ha identificado un motivo muy conservado llamado N1 del que no se conoce su función (Fig. 5).

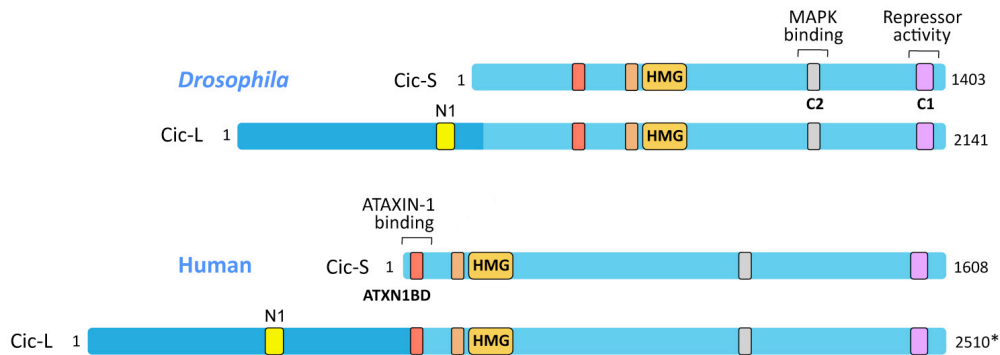


Fig. 5. Las dos isoformas principales de Cic en *Drosophila* y humanos con los motivos conservados resaltados en cuadros de colores. (Tomado de Jimenez et al., 2012)

2.1.2 LA FUNCIÓN DE CIC EN EL DESARROLLO Y ENFERMEDADES

En *Drosophila*, la señalización por EGFR-Ras-MAPK promueve la proliferación de las células de los discos imaginales como los del ojo y ala por ejemplo, donde la pérdida de la vía reduce la tasa de crecimiento de dichas estructuras (Diaz-Benjumea and Hafen, 1994; Karim and Rubin, 1998; Prober and Edgar, 2000). Este

efecto se debe, al menos en algunos casos, a la presencia ectópica de Cic que actúa como inhibidor de la proliferación. Mutaciones que afectan la función de Cic incrementan la tasa de proliferación celular resultando dispensable la señalización de EGFR para dicha función (Tseng et al., 2007). Además de en los discos imaginales, otro estudio sugiere que Cic actúa mediante un mecanismo similar regulando la proliferación de células madre intestinales (ISC) (Jiang et al., 2010). En este contexto la desactivación de Cic causa efectos similares a la activación ectópica de la vía de EGFR dando lugar a la sobreproliferación de las ISC.

La desregulación de Cic ha sido asociada a varias enfermedades humanas como al Sarcoma de Ewing, cáncer de mama o oligodendroglioma (OD), que es un tipo de cáncer cerebral (Bettegowda et al., 2010; Kawamura-Saito et al., 2006; Tseng et al., 2007). En las células tumorales que generan la enfermedad del Sarcoma de Ewing, *CIC* sufre una translocación cromosómica con *DUX4* mediando la activación, en lugar de la represión, de genes diana de *CIC*. Entre los genes sobreexpresados se encuentran los de la familia *PEA3*, que codifican para factores de transcripción Ets. Estos factores muestran una actividad potenciada en las células que expresan la quimera aberrante *CIC-DUX*.

Al menos en la mitad de los tumores de OD analizados por Bettegowda *et al.* se ha detectado que la proteína *CIC* se encuentra mutada en su dominio HMG box probablemente impidiendo la unión a ADN y afectando a la regulación de sus dianas.

Estos resultados sugieren que la función de *CIC* es importante para el control de la proliferación celular. Por ello, es de gran importancia investigar el mecanismo de acción de la proteína a fin de entender qué ocurre en las células aberrantes responsables de las enfermedades mencionadas.

En *Drosophila* Cic es un factor muy importante en la proliferación celular y el establecimiento del patrón corporal. Este último aspecto lo estudiaremos en más detalle en el apartado 3 y 4 de la introducción.

2.2 CORREPRESORES: GRO Y ATXN

Gro forma parte de la familia de correpresores que incluyen a los factores transducin-like Enhancer of split (TLE) y Groucho related gene (Grg) de vertebrados (Courey and Jia, 2001; Jennings et al., 2008). Es un factor nuclear

implicado en distintos procesos como la neurogénesis, segmentación del embrión, determinación del sexo, determinación del eje dorsoventral (D/V) y la formación del patrón de ala (Chen and Courey, 2000; Paroush et al., 1994; Paroush et al., 1997; Roch et al., 2002). Estas funciones las lleva a cabo mediante interacciones proteína-proteína generalmente a través del motivo WD40 con factores que se unen directamente a ADN (revisado en van der Voorn and Ploegh, 1992). Se conoce que *gro* interacciona específicamente con *hairy* (*h*) y proteínas relacionadas codificadas por el complejo de *Enhancer of split E(SPL)-C* y *deadpan* (*dpn*) uniéndose al motivo WRPW. Este motivo, en el caso de *h* por ejemplo, es necesario durante la segmentación y la formación del patrón de las quetas (Paroush et al., 1994).

Una de las maneras en la que los correpresores pueden llevar a cabo su función es modificando el estado de la cromatina. La eucromatina alberga la mayoría de los genes que se expresan en una célula mientras que la heterocromatina consiste en cromatina altamente compactada donde solamente unos pocos genes son activos. El cambio de estado de la cromatina entre eucromatina y heterocromatina puede implicar cambios en los contactos nucleosoma-ADN y/o contactos entre nucleosomas. Estos contactos se pueden alterar mediante enzimas con capacidad de modificar las histonas. Existen enzimas con actividad acetiltransferasa (HAT), deacetilasa (HDAC) y metiltransferasa (HMT) (Berger, 2002). La activación transcripcional está generalmente asociada a la acetilación de las histonas mientras que la represión se asocia a la deacetilación (Struhl, 1998). Se ha propuesto que Gro interacciona directamente con acetilasas de histonas como Rpd3 para llevar a cabo la represión (Chen and Courey, 2000). Por otro lado, Gro forma tetrámeros en solución y esta conformación parece ser indispensable para la función de la proteína ya que mutaciones puntuales en la región N-terminal, implicada en la capacidad de oligomerizar, bloquean la función represora de Gro (Chen et al., 1998).

Un segundo factor que se ha asociado a Cic en células de mamíferos es el correpresor Ataxina (ATXN1) (Lam et al., 2006). ATXN1 parece asociarse con otros correpresores como Nuclear receptor correpressor (NCOR2) y deacetilasas de histonas como HDAC 3 y HDAC 4 (Bolger et al., 2007; Tsai et al., 2004). En *Drosophila* sin embargo, no se han realizado estudios que relacionen las proteínas Cic y Atx1 pero parece improbable que esta asociación sea relevante ya que el dominio de unión de Atx1 a Cic está poco conservado y es prescindible para mediar

la represión (Fig. 13). En Astigarraga *et al* se analizan varias formas de Cic, entre ellas Cic^{mini}, que carece del motivo putativo de unión a Atx1 y, sin embargo, rescata el fenotipo *cic^l*.

En los siguientes apartados estudiaremos la función del factor de transcripción Cic y el correpresor Gro en el contexto del desarrollo de *Drosophila*.

3. EL DESARROLLO TEMPRANO DE *DROSOPHILA*

3.1 EL CONTROL MATERNO DEL DESARROLLO TEMPRANO DE *DROSOPHILA*

Los embriones tempranos de *Drosophila* están organizados en gradientes, bandas y rayas de expresión génica que generan un esbozo de la morfología adulta. Parte de esta información se encuentra ya presente en el oocito en maduración. Los estudios realizados han permitido identificar y caracterizar con detalle diversos mecanismos de control materno que se originan durante el proceso de oogénesis y dirigen el establecimiento de la polaridad inicial del embrión.

3.2 ESTABLECIMIENTO DE LOS EJES EN EL OOCITO

El oocito maduro de *Drosophila* es una célula altamente compleja que contiene la información para establecer los ejes A/P y D/V del futuro embrión. El ovario de *Drosophila* consiste en 16-20 estructuras tubulares denominadas ovariolas. Cada una de estas estructuras contiene cámaras ováricas en diferentes estadios de maduración a lo largo de su eje A/P, donde las más jóvenes se encuentran en anterior y las más maduras en posterior.

El oocito se desarrolla junto a quince células hermanas denominadas células nutricias y envueltas por una monocapa de células foliculares somáticas (Fig. 6). Tanto las células nutricias como las foliculares proporcionan al oocito constituyentes citoplasmáticos, además de una serie de determinantes específicos necesarios para la formación del patrón inicial del embrión. Determinantes de las células nutricias (en su mayoría ARN mensajeros) se acumulan de forma asimétrica en el oocito y se activan en el momento de la fertilización. Por otro lado, las células foliculares secretan factores de desarrollo que se asocian a la superficie extracelular del embrión, donde se generan las señales que activan los receptores transmembrana en posiciones restringidas (Jimenez et al., 2002; St Johnston and Nusslein-Volhard, 1992).

En el estadio 4-5 de la ovogénesis el núcleo del oocito se encuentra en el lado contrario de las células nutricias y sintetiza una proteína de la familia de factores de crecimiento secretados, Transforming growth factor α (TGF α), Gurken (Grk). Las células foliculares que envuelven el oocito expresan el receptor EGF en la membrana que es activado por Grk de forma localizada iniciando una cascada de señalización. La actividad de EGFR junto con el ARNm de *oskar* (*osk*) proporcionan un destino posterior a estas células foliculares (Gonzalez-Reyes et al., 1995; Gonzalez-Reyes and St Johnston, 1994; Neuman-Silberberg and Schupbach, 1993; Roth et al., 1995). En la región anterior el ARNm de *bicoid* (*bcd*) es transportado a través de los canales en forma de anillo de las células nutricias al oocito y se ancla a los microtúbulos anteriores confirmando un destino anterior.

Entre el estadio 6 y 7 de la ovogénesis el núcleo del oocito migra a la región dorsoanterior junto con el ARNm de *grk*. Grk una vez más activa la señalización de EGFR localmente confirmando un destino dorsal a las células foliculares adyacentes en detrimento del ventral (Manseau and Schupbach, 1989). La activación de la vía provoca la degradación de Cic, induce la expresión de *mirror* (*mirr*) en la región dorsoanterior y la restricción de *pipe* (*pip*) a las células foliculares ventrales (Goff et al., 2001). Este proceso tiene dos efectos: generar la polaridad D/V del embrión y formar la cubierta del embrión, el corion (Fig. 7).

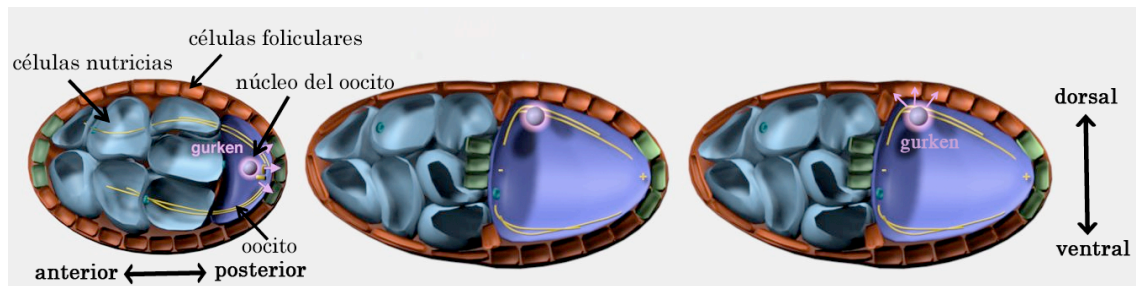


Fig. 6. Desarrollo del oocito. En el estadio 4 el núcleo del oocito está posicionado en la zona posterior donde secreta la proteína Grk y confiere un destino posterior a esta región. El núcleo migra hacia anterior donde una vez más Grk activa la vía de EGFR atribuyendo una identidad dorsoanterior a las células foliculares adyacentes. Este proceso inicia el establecimiento de los ejes del oocito. (Adaptado de Flymove)

pipe codifica para una proteína sulfotransferasa que modifica componentes estructurales de la membrana vitelina. Este proceso es necesario para la activación de un segundo receptor, Toll, que en el momento de la fertilización provoca la

translocación del factor Dorsal (Dl) al núcleo formando un gradiente a lo largo del eje D/V (Fig.7). La formación del gradiente de Dl es un paso clave para la posterior subdivisión del eje D/V del embrión.

En el presente trabajo estudiaremos la relación a nivel molecular entre la activación de la vía EGFR en las células foliculares dorsoanteriores y la expresión de *pipe* en la región ventral para la correcta formación del eje D/V en el ovario.

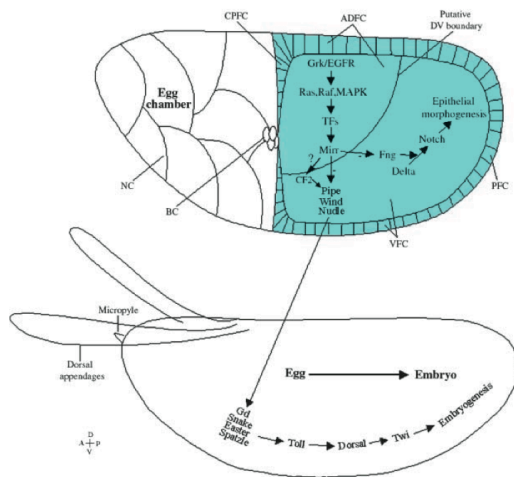


Fig. 7. El intercambio de señales entre el oocito y las células foliculares posicionan las expresiones de *mirr* y *pipe* en sus respectivos dominios formando el futuro eje del embrión. La expresión de *mirr* en dorsoanterior es importante para la formación de los apéndices dorsales y la expresión de *pipe* para formar el gradiente de Dl que subdivide el embrión a lo largo del eje D/V. (Adaptado de Zhao et al., 2000)

3.3 ESTABLECIMIENTO DE LOS EJES EN EL EMBRIÓN

La información posicional generada durante la ovogénesis se mantiene a lo largo del desarrollo del embrión. Tras la fertilización, comienzan una serie de divisiones nucleares sin citocinesis donde el citoplasma del embrión se encuentra ya polarizado. Esta subdivisión inicial del blastodermo sincitial se encuentra regulada por cuatro sistemas de control materno: los sistemas Anterior, Posterior, Terminal y Dorsoventral. El sistema Anterior determina la región del embrión que da lugar a la cabeza y el tórax; el Posterior especifica la región del abdomen y la línea germinal; el Terminal especifica las regiones no segmentadas que se encuentran en los dos extremos del embrión y por último, el sistema Dorsoventral controla la polaridad a lo largo del eje dorsoventral. La actividad localizada de estos sistemas maternos genera una distribución de factores de transcripción a lo largo de los ejes. De esta manera, la subdivisión se da mediante un proceso jerárquico en el que intervienen 3 clases de genes de segmentación cigóticos: los genes *gap*, *pair rule* y *segment polarity* (Fig. 8). Los genes maternos controlan la expresión de los genes *gap* y estos controlan a los de su misma clase y a los grupos que les suceden. Esta

red de regulaciones subdivide el eje anteroposterior en 14 segmentos corporales: 3 segmentos en la cabeza, 3 segmentos torácicos y 8 segmentos abdominales.

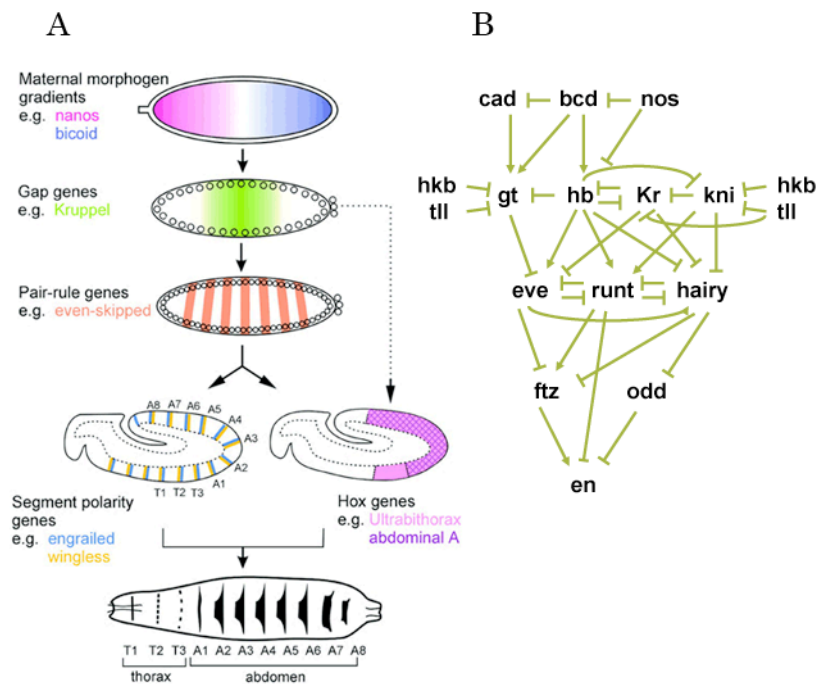


Fig. 8. La formación del patrón en el eje A/P. **(A)** Las primeras asimetrías las especifican los genes maternos que forman bandas y gradientes para controlar la expresión de los genes *gap*. Estos a su vez regulan los genes *pair rule* que dividen el embrión en regiones que abarcan dos segmentos. Posteriormente los genes *segment polarity* se expresan en regiones diferenciando cada segmento y por último, la expresión de los genes homeóticos proporciona una identidad única a cada segmento. **(B)** Esquema de regulaciones entre los genes de distintas clases para formar el patrón A/P del embrión. (Adaptado de Sanson, 2001)

A nivel molecular uno de los primeros factores clave para esta subdivisión es el factor Bcd. El ARNm de *bcd* como ya hemos comentado previamente es depositado en la región anterior del oocito y tras la fecundación forma un gradiente de proteína regulando varios factores de transcripción y contribuyendo a la especificación de la región anterior (Driever and Nusslein-Volhard, 1988a; Driever and Nusslein-Volhard, 1988b). Por el contrario el factor posterior Nanos (Nos) especifica la región posterior para la formación de la zona abdominal (Lehmann and Nusslein-Volhard, 1991; Wang and Lehmann, 1991) reprimiendo genes anteriores. Así, el gen *hunchback* (*hb*), por ejemplo, se encuentra activado en la región anterior por Bcd y reprimido en posterior por Nos (Fig. 8B).

El sistema terminal junto con el anterior y posterior es también responsable de la formación del eje A/P del embrión. Este sistema, a través de la activación

localizada de la vía de señalización de Torso regula la expresión de los genes *gap* terminales *tailless (tll)* y *huckebein (hkb)* formando las estructuras de acron y telson.

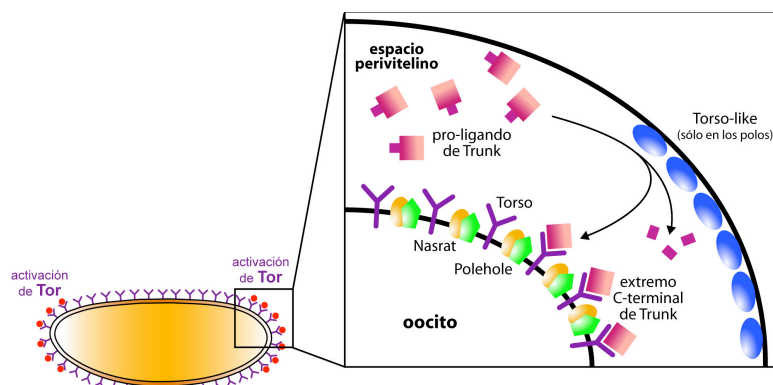
Existen una serie de genes cigóticos que no participan en la metamerización del embrión. Estos genes regionalizan el eje D/V a través de la localización nuclear del factor Dl. La activación del receptor Toll en la región ventral del oocito provoca la translocación del factor Dl al núcleo creando así un gradiente de dicha proteína. Este gradiente regula varios genes en el eje D/V subdividiéndolo en tres regiones: mesodermo, neuroectodermo y ectodermo dorsal.

En los siguientes apartados profundizaremos en los sistemas terminal y dorsoventral.

3.3.1 EL SISTEMA TERMINAL DE *DROSOPHILA*

El sistema terminal, como ya se ha comentado anteriormente, especifica las estructuras más terminales del embrión. Esta especificación se obtiene a través de la expresión de los genes cigóticos *tll* y *hkb* en respuesta a la vía de señalización de Torso. El receptor de membrana Torso se encuentra uniformemente distribuido por toda la superficie del embrión en el estadio de blastodermo sincitial. La activación del receptor, sin embargo, ocurre solamente en los polos por la acción localizada de varios elementos: *female sterile (1) Nasrat [fs(1)N]* (Degelmann et al., 1986), *female sterile (1) polehole [fs(1)ph]* (Perrimon et al., 1986), *torso-like (tsl)* (Degelmann et al., 1986; Nusslein-Volhard et al., 1987), *trunk (trk)* (Schupbach and Wieschaus, 1986) y *closca (clos)* (Ventura et al., 2010). Trk, el ligando del receptor Torso, se secreta al espacio perivitelino en forma de pro-ligando donde debe ser procesado por Torso-like dando lugar a un ligando activo (Casali and Casanova, 2001; Casanova et al., 1995; Schupbach and Wieschaus, 1986) (Fig. 9). Este mecanismo de procesamiento local del ligando permite la activación localizada del receptor.

Fig. 9. La activación localizada del receptor Torso requiere el procesamiento del ligando Trk por Torso-like. Este proceso ocurre exclusivamente en los polos ya que la expresión de Torso-like se limita a esta región por mecanismos aún sin describir. (Adaptado de Furriols and Casanova, 2003)



La unión de Trk a Torso induce una cascada de fosforilaciones a través de la vía Ras-MAPK que provoca la degradación de la proteína Cic en el núcleo. El mecanismo de degradación de Cic aún está por describir pero se ha documentado que el último componente de la vía, Rolled, se une a Cic (Astigarraga et al., 2007) degradándolo y provocando un gradiente de proteína ascendente hacia el centro del embrión (Fig. 10B). Esta degradación de Cic por la vía de Torso es imprescindible para la correcta formación de los polos del embrión ya que permite la expresión de los genes *tll* y *hkb* y así especificar esta región (Fig. 10C, 10F e 10I). La presencia de Cic en la región central del embrión se requiere para mantener restringidos a los genes terminales ya que se ha documentado que embriones hipomorfos para la proteína Cic muestran un patrón expandido de *tll* y *hkb* (Fig. 10G y 10J). Uno de los temas que vamos a abordar en este trabajo es la relación de Cic con los genes terminales *tll* y *hkb* y su respuesta a la vía de Torso ya que se desconoce el mecanismo de acción de Cic como factor de transcripción.

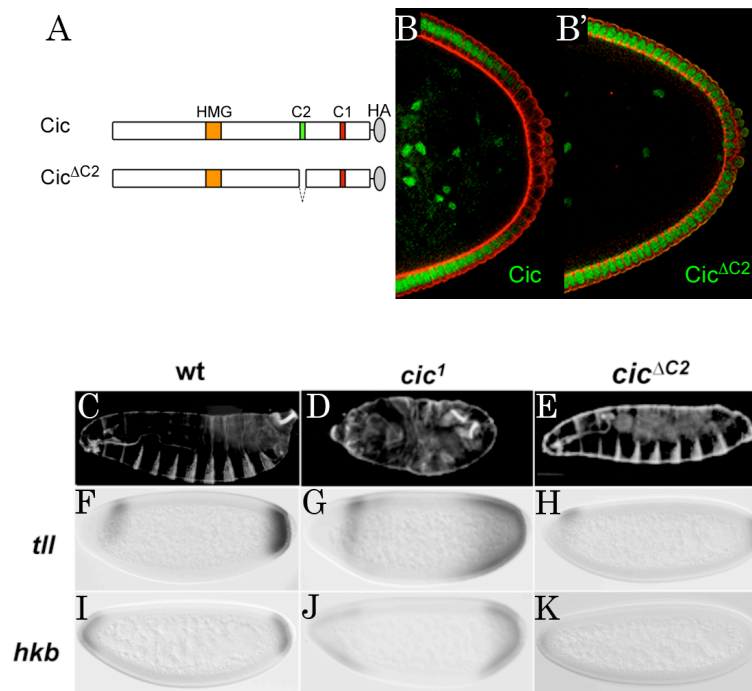


Fig. 10. (A) Esquema de la proteína Cic con sus dominios conservados resaltados en cuadros de colores. (B) Inmunotinciones contra Cic en un embrión silvestre y en un embrión con una forma de Cic que carece el dominio de unión a Rolled (C2). Cutículas e hibridaciones in situ de *tll* y *hkb* en embriones silvestres (C, F, I), *cic¹* (D, G, J) y *cic^{ΔC2}* (E, H, K). (Adaptado de Astigarraga et al., 2007)

3.3.2 EL SISTEMA DORSOVENTRAL DE *DROSOPHILA*

El eje D/V embrionario, como el A/P, comienza su polarización durante la oogénesis. Esta polarización subdivide el embrión en territorios de mesodermo, neuroectodermo y ectodermo dorsal (Fig. 11A y 11B). Al igual que en el sistema terminal, este sistema está esencialmente controlado por vías RTK tanto en el ovario como en el embrión.

El patrón D/V del embrión, como ya hemos comentado anteriormente, viene determinado en primera instancia por el gradiente de Dl. Este factor inicia la subdivisión en el eje D/V regulando la expresión de unos ~30-50 genes dependiendo de su concentración (Stathopoulos and Levine, 2002). Estos genes se pueden clasificar en tres grupos: los genes con bajo requerimiento de Dl forman el mesodermo; los de medio, forman el neuroectodermo y los de alto requerimiento forman el ectodermo dorsal.

Se ha postulado que, de la misma manera que los represores *gap* regulan los bordes de los genes *pair-rule* durante la segmentación a lo largo del eje A/P, los represores del mesodermo pueden restringir la expresión de los genes del ectodermo neurogénico, definiendo el borde mesodermo/neuroectodermo (Stathopoulos and Levine, 2005). Estudios previos han mostrado que la expresión del gen *intermediate neuroblast defective (ind)* es activada por la combinación de las acciones de Dl, EGFR y Dpp (Skeath, 1998; von Ohlen and Doe, 2000) y que su represión en el borde ventral se debe al represor *ventral nervous system defective (vnd)* (Weiss et al., 1998). En cuanto al borde dorsal de *ind*, al igual que el resto de los genes del eje D/V, se ha creído que lo delimitaba la cantidad decreciente de Dl. Sin embargo, los niveles de Dl parecen no variar demasiado a partir del dominio de expresión de *ind* (Kanodia et al., 2009; Liberman et al., 2009), pareciendo improbable que dicho mecanismo sea el responsable de marcar su límite dorsal. Respecto a esta cuestión, diferentes grupos han postulado que la señalización de EGFR juega un papel importante y que existe un elemento represor clave en el enhancer de *ind* para marcar su límite dorsal (Stathopoulos and Levine, 2005; von Ohlen and Doe, 2000; Weiss et al., 1998).

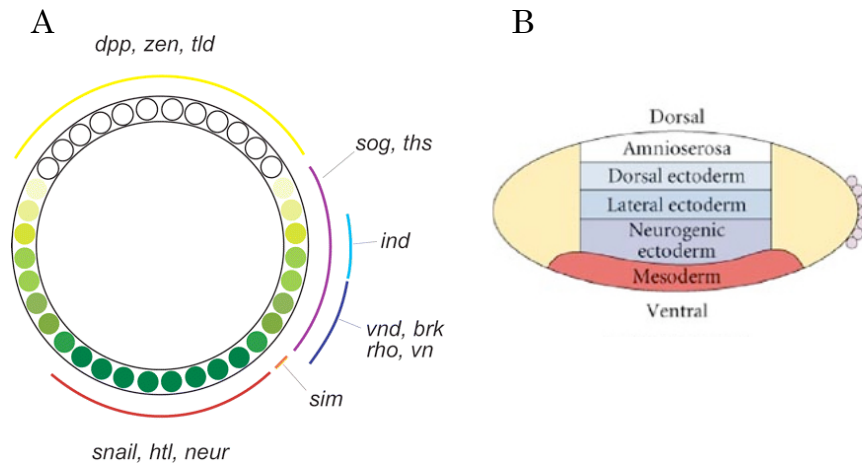


Fig. 11. Esquema de los genes que responden al gradiente de Dorsal en el eje D/V en una visión transversal. **(B)** Esquema de la subdivisión del embrión en el eje D/V. (Adaptado de Gilbert, 2003 y Hong et al., 2008)

4. EL ESTABLECIMIENTO DEL PATRÓN DE LAS VENAS EN EL DISCO IMAGINAL DE ALA

En el laboratorio hemos aprovechado el disco imaginal de ala y el hecho de que la señalización por EGFR está implicada en la especificación de las venas para poder estudiar en más detalle la función de Cic en la regulación de genes inducidos por la vía. Uno de dichos genes es *argos* que codifica para un factor difusible formando un bucle de regulación negativa sobre la vía de EGFR (Freeman et al., 1992; Golembo et al., 1996; Roch et al., 2002) (Fig.12C).

El proceso de diferenciación de venas es un proceso que se da a continuación de la proliferación celular en el disco imaginal de ala y representa un modelo distinto a la especificación de los segmentos y diferenciación celular en embriones, donde existe poca proliferación celular (St Johnston and Nusslein-Volhard, 1992). Además, a diferencia del embrión, la definición de las venas depende de relaciones inductivas entre células de diferente linaje. Estas propiedades hacen que el disco imaginal de ala sea un buen modelo para estudiar interacciones implicadas en la proliferación celular, comunicación célula-célula, diferenciación celular y la caracterización de los correspondientes mecanismos moleculares.

El ala de *Drosophila* está compuesta por dos capas epidérmicas, la dorsal y la ventral. Las únicas estructuras visibles en ella son los órganos sensoriales: una queta en cada una de las células, y las venas; 5 de ellas la atraviesan longitudinalmente y 2 transversalmente (Fig. 12A). Las venas son esclerotizaciones

epidérmicas que conducen axones y tráqueas a través de ellas (Garcia-Bellido and de Celis, 1992).

La diferenciación de las células de las venas y las de la intervena implica una actividad coordinada de diferentes vías de señalización que promueven (EGFR y Dpp) o antagonizan (Notch) la formación de las venas (De Celis, 1998). La activación localizada de estos receptores depende de la regionalización previa del disco de ala (de Celis and Barrio, 2000) y la actividad de la proteasa Rho y los ligandos de EGFR (como por ejemplo Vein) en las células que darán lugar a las futuras venas (Schnepp et al., 1996; Sturtevant et al., 1993). Así, clones de células mutantes para EGFR o para cualquier componente de la vía de señalización previenen la formación de las venas. Por el contrario, mutantes de ganancia de función resultan en la formación de tejido venoso ectópico (Diaz-Benjumea and Hafen, 1994).

El modelo de la desactivación de Cic por vías RTK y la consiguiente expresión de sus genes diana podría aplicarse en el caso del disco de ala aunque varios resultados sugieren que esta regulación podría ser más compleja (Roch et al., 2002). De acuerdo con el modelo propuesto en el embrión, la pérdida de función de *cic* causa la formación de tejido venoso ectópico (Fig. 12C), indicando que Cic restringe las venas a las regiones apropiadas. En la región de intervena Cic actúa como represor de genes específicos de vena como *argos* y *vvl* (*ventral veinless*) de una manera autónoma celular (Fig. 12F).

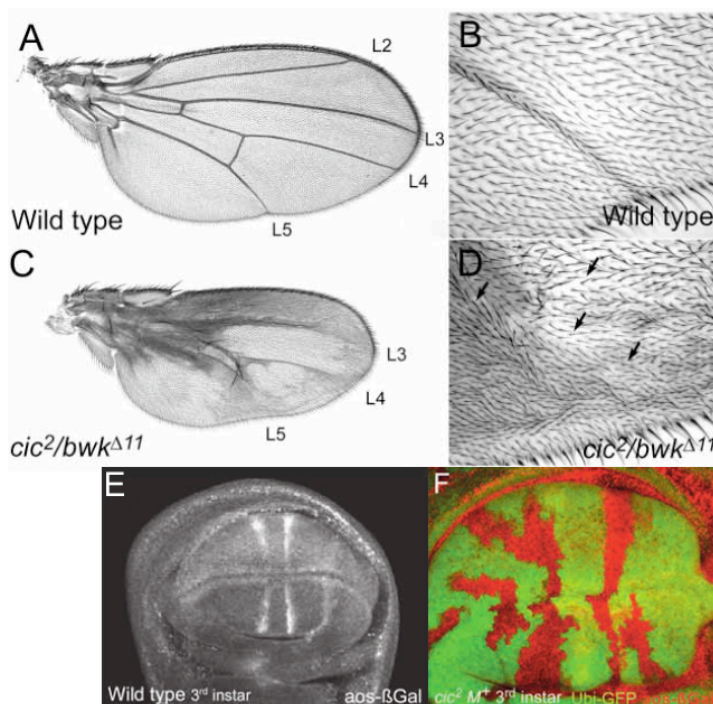
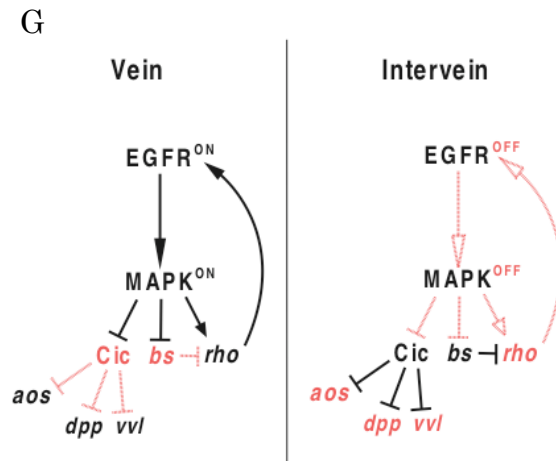


Fig. 12. (A, B) Patrón de venas y quetas en alas de moscas silvestres. (C, D) Mutaciones en el gen *cic* causan el desarrollo de venas ectópicas. (E) La expresión de *argos* está restringida a las células que dan lugar a las futuras venas. (F) Clones de *cic* expresan *argos* ectópico en la región de intervena. (G) Esquema de la vía de EGFR en las regiones de vena e intervena donde se encuentra activada en el primer caso permitiendo la expresión de los genes diana y se encuentra inactivado en el segundo caso manteniéndolos reprimidos. (Adaptado de Roch et al., 2002)



Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de *rho*, que actúa como diana de la vía, no se ve afectada en mutantes *cic* sugiriendo que no todos los genes activados por la vía se regulan de la misma manera.

Nuestro objetivo en este contexto será investigar el mecanismo de acción de Cic respecto a la regulación de *argos* y en respuesta a la vía de EGFR.

OBJETIVOS

Durante los últimos años, estudios genéticos y moleculares han permitido identificar al factor represor Cic como un efector general de señales Ras-MAPK en *Drosophila*. Cic reprime la expresión de genes inducidos por las vías Ras-MAPK de Torso y EGFR, mientras que la activación de dichas vías inhibe la función de Cic para facilitar la transcripción de genes diana. Dado que la actividad de Cic es esencial para la correcta interpretación de señales Ras-MAPK en diferentes sistemas modelo de regulación génica y desarrollo, el análisis de la función de Cic resulta fundamental para avanzar en la comprensión de dichos modelos a nivel molecular. Además, la actividad represora de Cic se encuentra conservada en mamíferos y ha sido implicada en enfermedades cancerosas y neurodegenerativas, por lo que el estudio de Cic resulta también relevante desde el punto de vista biomédico.

Al iniciar nuestro trabajo, diversos aspectos de la función de Cic permanecían poco conocidos. Uno de ellos está relacionado con la capacidad de Cic de actuar como represor directo mediante su unión a las regiones reguladoras de genes diana. Aunque existían datos genéticos acerca de posibles interacciones directas de Cic con distintos genes específicos, dichas interacciones no habían sido caracterizadas a nivel molecular ni tampoco se conocían otras posibles funciones o mecanismos de acción de Cic. Por ejemplo, se sabía que Cic juega un papel esencial en la regulación del gen *pipe* durante el establecimiento de la polaridad D/V embrionaria, pero se desconocía cómo ejerce dicha función. Por otra parte, disponíamos de escasa información sobre el mecanismo represor de Cic, particularmente en relación con la posible interacción entre Cic y el correpresor Gro.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, esta tesis ha tenido los siguientes objetivos:

- Analizar el mecanismo represor de Cic sobre los genes terminales *hkb* y *tll*, e identificar las secuencias reguladoras en *cis* responsables de dicha regulación.
- Identificar nuevas funciones de Cic como regulador de genes inducidos por vías Ras-MAPK.

Objetivos

- Determinar la función de Cic en la regulación del gen *pipe* en las células foliculares del ovario.
- Analizar la relación funcional entre Cic y el correpresor Gro en el embrión temprano.
- Investigar el modo en que Cic responde a la actividad de MAPK in vivo.

INFORME SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES

Los artículos presentados en esta tesis presentan resultados de gran relevancia y que suponen un avance de interés general para la comunidad científica. Los tres artículos listados se han publicado en las revistas *Development* y *Current Biology*, siendo las dos de ámbito internacional y ampliamente reconocidas en los campos de la Biología del Desarrollo, Molecular y Celular. Los índices de impacto para estas revistas en el 2010 son: 6.898 para *Development* y 10.026 para *Current Biology*. Estos índices de impacto sitúan a ambas revistas en el primer cuartil de publicaciones en sus categorías.

DISCUSIÓN

Aunque las células están envueltas por una membrana que marca la separación entre el ambiente exterior e interior, éstas son capaces de responder a estímulos extracelulares como mitógenos y hormonas, convirtiendo la señal en distintas respuestas celulares. Esta conversión está mediada por la unión de un ligando extracelular a un receptor específico, que se activa y transmite la señal a través de vías de señalización intracelulares. Estas vías operan mediante redes complejas para transmitir la señal a varias dianas, regulando la inducción de procesos celulares como la transcripción, traducción, proliferación, diferenciación y apoptosis entre otros. Una de las rutas esenciales para la transmisión de señales es la cascada Ras-MAPK. Esta cascada transmite la señal de receptores RTK como Torso y EGFR, generando respuestas específicas en cada caso. Así, la vía de Torso en el estadio 5 de la embriogénesis induce la expresión de *tll* y *hkb* en los polos del embrión y más tarde, la vía de EGFR a través de la misma cascada induce la expresión de *ind* en el eje D/V. Es evidente pues, que aunque estas dos vías hagan uso de una misma cascada, la célula las interpreta de manera distinta expresando distintos genes y especificando distintas regiones del embrión.

En *Drosophila* y otros sistemas los factores de transcripción Ets han sido considerados como los efectores nucleares predominantes de las señales RTK. Sin embargo, trabajos más recientes han mostrado que el factor de transcripción Cic funciona como represor de genes inducidos por las vías RTK, manteniéndolos silenciados en ausencia de señalización. En presencia de la vía activa, la proteína Cic es desactivada y de esta manera la represión que ejerce sobre sus dianas queda aliviada (Astigarraga et al., 2007; Jimenez et al., 2000).

En el disco imaginal de ojo curiosamente, operan los dos tipos de efectores arriba mencionados, los de la familia de Ets, Pnt-P2 y Yan, y Cic. En este caso la vía Ras-MAPK regula la diferenciación de fotorreceptores a través de Pnt-P2 y Yan y la proliferación celular a través de Cic (Tseng et al., 2007). ¿Cómo una misma vía de señalización elige distintos efectores para regular distintos procesos? ¿Qué mecanismos regulan estos efectores y cómo lo hacen para que se dé una respuesta específica? El mecanismo molecular por el que Pnt-P2 y Yan regulan sus genes diana ha sido extensamente estudiado. Cuando estos dos factores son fosforilados por MAPK, Yan se desasocia del ADN aliviando la represión, mientras que Pnt-P2

ocupa su lugar ejerciendo la activación (Xu et al., 2000). El mecanismo molecular por el que Cic regula a sus dianas no ha sido descrito y puede ser de gran ayuda para profundizar en el conocimiento sobre la función y especificidad de las vías RTK durante el desarrollo.

1. EL MECANISMO DE REGULACIÓN DE CIC

La presencia de un dominio HMG box en la proteína Cic y resultados de trabajos previos han hecho pensar que se trata de un factor de transcripción de unión a ADN. Además estudios realizados en tumores humanos han identificado que Cic regula genes de la familia *PEA3* a través de una unión directa a ADN (Kawamura-Saito et al., 2006). Sin embargo, el mecanismo molecular por el que Cic regula sus genes diana en *Drosophila* ha permanecido sin determinar. Tomando este punto de partida junto con la caracterización del *enhancer* mínimo de *hkb* previamente descrito (Hader et al., 2000) hemos planteado distintos experimentos para esclarecer el mecanismo molecular por el que Cic regula sus genes diana. Además, esta caracterización nos ha permitido la identificación de nuevas funciones de Cic reguladas por mecanismos de acción similares.

1.1 CIC REGULA LA EXPRESIÓN DE LOS GENES TERMINALES A TRAVÉS DEL OCTÁMERO TG/CAATGAA

En este trabajo hemos mostrado que las funciones reguladoras de Cic por debajo de la vía de Torso y EGFR dependen en la secuencia TG/CAATGAA. Notablemente, esta secuencia corresponde al elemento *tor-RE* (TGCTCAATGAA) de la región reguladora de *tll* descrito anteriormente. A lo largo de los años se han propuesto varios factores nucleares con capacidad de unión al motivo *tor-RE* pero ninguno de ellos ha conectado de manera clara la señalización de Torso con la expresión de *tll*. Cic, en cambio, es un factor represor que responde a la vía de Torso y regula la expresión de *tll* y *hkb*. Nuestro primer objetivo ha consistido en esclarecer si la regulación de los genes terminales por Cic es directa o indirecta. El análisis de la expresión de los transgenes *hkb^{0.4}-lacZ* y *tll^{0.15}-lacZ* muestra una expansión similar a la falta de función de *cic* y a la mutación de la secuencia central del *tor-RE* (Fig. 1 y S3 (Ajuria et al., 2011)). Este resultado, junto con los experimentos de EMSA que muestran la unión de Cic al octámero TG/CAATGAA (Fig. S2 (Ajuria et al., 2011)) in vitro, sugirieron que la unión de Cic a los genes terminales es directa y que ocurre a través de dicho octámero. El mecanismo de regulación de *tll* y *hkb* por Cic

sería el siguiente: en los polos del embrión donde la vía de Torso está señalizando, Cic se desactiva permitiendo la activación de los genes terminales por factores distribuidos ampliamente en el embrión. En cambio, en las regiones centrales del embrión, donde Torso está inactivo, Cic reprime *tll* y *hkb* (Fig. 14A). Esta restricción de los genes terminales a los polos es esencial para la formación segmentada del tronco ya que su expansión reprime genes *gap* centrales, como *kni* y *Kr*, impidiendo la correcta formación del eje A/P.

1.2 LOS LUGARES DE UNIÓN A CIC SON SUFICIENTES PARA MEDIAR REPRESIÓN IN VIVO

La unión de Cic a *hkb*^{0.4} es imprescindible para la regulación de dicho *enhancer* en respuesta a la vía de Torso pero este mecanismo podría implicar otros factores que también estuvieran regulados por la vía. Los experimentos realizados con los *enhancers* artificiales de *hbC-lacZ* y *CBcdC-lacZ* (Fig. 2A, 2C y 2F (Ajuria et al., 2011)) nos muestran que la expresión de estos transgenes no requiere ningún otro factor para su represión, ya que estos *enhancers* contienen únicamente las secuencias de unión a Cic en comparación con sus controles, *hb-lacZ* y *Bcd-lacZ* (Fig. 2A, 2B y 2E (Ajuria et al., 2011)). Los experimentos realizados con *CBcdC^{TRE}-lacZ* (Fig. 2A y 2I (Ajuria et al., 2011)), *tll*^{0.15(x3)}-*lacZ* (Fig. S3 (Ajuria et al., 2011)) y el EMSA (Fig. S2 (Ajuria et al., 2011)) indican que Cic posee una capacidad represora similar cuando actúa a través de los elementos TGAATGAA y TCAATGAA y que resulta en gran medida independiente de otros factores o de un contexto regulador específico.

1.3 CIC REGULA LA EXPRESIÓN DE *ind* EN EL EJE D/V DEL EMBRIÓN

Con el objetivo de investigar si el mecanismo de acción de Cic es aplicable potencialmente a nuevas dianas hemos buscado genes inducidos por señales RTK que alberguen al menos un elemento de unión a Cic. Uno de los genes identificados es *ind*, que se encuentra activado por la vía de EGFR y el morfógeno D1 en el neuroectodermo. El eje D/V del embrión está subdividido en diferentes territorios principalmente por el factor D1 que presenta valores más altos en los núcleos ventrales y niveles progresivamente más bajos en los núcleos laterales y dorsales. Estudios genéticos han sugerido que el gradiente mencionado subdivide el eje D/V en distintos territorios determinando el límite de expresión dorsal de distintos genes cigóticos. Estudios más recientes, sin embargo, han propuesto que los niveles

de *Dl* se mantienen constantes a partir de la región de *ind* (Karim and Rubin, 1998; Liberman et al., 2009) lo que sugiere que deben existir otros mecanismos para definir los límites de expresión dorsales. Estudios previos del *enhancer* de *ind* identificaron una secuencia de 12 pares de bases (A-box) que mediaba su represión dorsal (Stathopoulos and Levine, 2005). El análisis de esta secuencia nos ha mostrado que la A-box contiene un octámero de unión a Cic en la cadena complementaria, TTCATTCA, por lo que hemos estudiado la posibilidad de que Cic sea el represor dorsal de *ind*. En primer lugar hemos analizado la regulación post-transcripcional de Cic por la vía de EGFR en este contexto. Según nuestra hipótesis, la inhibición de la proteína en respuesta a la fosforilación por la MAPK es un paso necesario para la expresión de sus dianas. La doble tinción para visualizar la MAPK fosforilada y Cic-HA correlaciona el alto nivel de acumulación de la primera con la disminución de la segunda (Fig. 4B (Ajuria et al., 2011)) indicando que la vía Ras-MAPK también modifica los niveles de Cic en el neuroectodermo.

En segundo lugar hemos analizado la expresión de *ind* endógeno en embriones *cic¹*. En el caso de que Cic fuera el represor que actúa a través de la A-box, la banda de *ind* debería verse expandida hacia dorsal. Estos embriones muestran un patrón de expresión expandido en unas 2-3 células, respecto a las 4-5 del embrión silvestre, pero también una banda más corta (Fig. 4E (Ajuria et al., 2011)). En una situación donde la actividad de Cic es aún más baja, *ind* se ensancha unas 6-7 células reduciendo todavía más su longitud (Fig. 4F (Ajuria et al., 2011)). Estos resultados nos indican que Cic tiene dos efectos sobre *ind*: define su borde dorsal y mantiene su expresión en el eje A/P. Este último resultado puede deberse a un efecto secundario derivado de la previa expansión de los genes *gap* terminales. Además, hemos analizado la expresión de *ind* en embriones donde la vía de Torso se encuentra constitutivamente activa, *torso^{D4021}*, y en consecuencia, la expresión de *tll* completamente expandida y el resultado muestra que *ind* es indetectable (Fig. 4G (Ajuria et al., 2011)). Estos resultados muestran una relación inversamente proporcional entre la intensidad de la desrepresión de los genes terminales con la expresión de *ind* sugiriendo que se encuentra regulada por factores que determinan el eje D/V y también el A/P.

Con el objetivo de analizar si Cic actúa a través de la secuencia de la A-box, hemos generado transgenes con el posible lugar de unión de Cic intacto y mutado. El gen

reportero *ind^{0.5}-lacZ* recapitula en parte la expresión del gen endógeno pero parece no estar afectada por los efectos indirectos derivados del papel de Cic en el sistema terminal (Fig. 4A, 4H y 4J (Ajuria et al., 2011)). Esta herramienta junto con *ind^{0.5mut}-lacZ* (Fig. 4A (Ajuria et al., 2011)) permite analizar el efecto de Cic en el contexto exclusivo de la regulación de *ind* así como caracterizar la contribución de la vía de EGFR sobre los transgenes. Una de las cuestiones planteadas en cuanto a la interpretación de la señal de EGFR por *ind*, fue si toda ella pasa a través de la desactivación de Cic o por el contrario, la vía se desdobra en algún punto para activar *ind* de una forma independiente de Cic. La expresión expandida de *ind^{0.5mut}-lacZ* en embriones mutantes *Ras^{AC40b}* en la línea germinal, indica que esta construcción es insensible a la vía en contraposición a *ind^{0.5}-lacZ* en el mismo fondo genético (comparar Fig. 4I y 4N (Ajuria et al., 2011)). Estos resultados muestran que los octámeros de unión a Cic en el enhancer de *ind* son claves para la interpretación de la señal de EGFR. De esta manera, proponemos que la función principal de EGFR en este contexto es desactivar Cic para aliviar la represión que ejerce sobre *ind* (Fig. 14A).

1.4 CIC REGULA LA EXPRESIÓN DE *argos* EN EL DISCO IMAGINAL DE ALA

La señalización por EGFR en el disco imaginal de ala está implicada en la diferenciación de las células de las futuras venas, al menos en parte, por la desactivación de la proteína Cic (Roch et al., 2002). Aún no conocemos genes que dan lugar a la diferenciación de las venas para poder estudiar la influencia del sistema EGFR-Cic sobre ellas, pero conocemos que el gen *argos* se encuentra directamente regulado por EGFR-Cic. *argos* codifica para una proteína secretada que forma un bucle de regulación negativa sobre la vía de EGFR, necesaria para la correcta formación del patrón de las venas de la mosca adulta (Freeman et al., 1992; Golembo et al., 1996; Roch et al., 2002). El estudio del gen *argos* nos condujo a definir un *enhancer* mínimo que incluía 5 secuencias octaméricas de unión a Cic (Fig. 5E (Ajuria et al., 2011)). La mutación de estas secuencias provoca la expresión generalizada del gen reportero sugiriendo que el patrón restringido del gen es el resultado de los octámeros de unión a Cic (Fig. 5F y 5G (Ajuria et al., 2011)). Además de la identificación de las secuencias que restringen la expresión de *argos* a la región de las futuras venas, hemos analizado la suficiencia de estos octámeros en llevar a cabo dicha represión. Para ello hemos generado una construcción artificial que contiene dos octámeros de unión a Cic flanqueando secuencias

activadoras *UAS* (Fig. 5E (Ajuria et al., 2011)). Esta simple combinación es capaz de limitar el patrón de un gen reportero, ampliamente expresado en todo el primordio del ala, a una región limitada por la señalización por EGFR (Fig. 5J, 5K y 5M). Este resultado nos indica que las secuencias de unión a Cic son capaces de restringir un patrón de expresión general a posiciones donde la vía Ras-MAPK está señalizando. Sin embargo, el transgén artificial *CUASC-lacZ* no recapitula todos los aspectos de *argos* ya que discos mutantes *cic* no muestran un mismo patrón de expresión de ambos (Fig. 5C y 5I (Ajuria et al., 2011)). La expresión fuerte de *argos* en las regiones L3 y L4 que observamos en mutantes *cic* se ve suprimida en discos donde además de *cic* la vía de EGFR también se encuentra inactiva.

Los resultados obtenidos en el disco imaginal de ala indican que, la inducción de *argos* por la vía de EGFR requiere la desactivación de Cic pero que no es el único mecanismo implicado en la activación. Sin embargo, Cic tiene un papel determinante, a través de sus secuencias de unión a ADN, en la restricción del patrón de *argos* a la región de las venas.

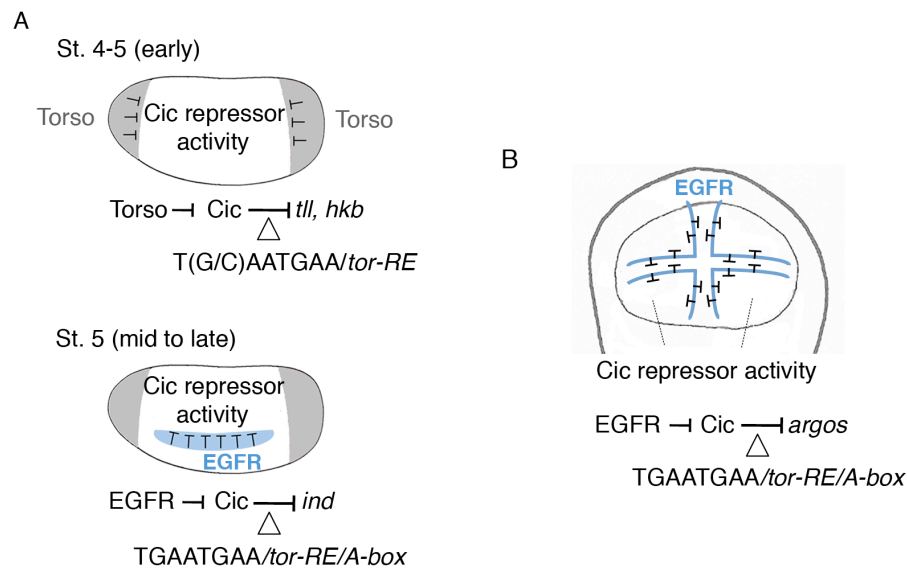


Fig. 14. Los elementos reguladores de Cic median las respuestas de Torso y EGFR. **(A)** Activaciones secuenciales de Torso y EGFR desactivan Cic en el eje A/P y D/V del embrión permitiendo la expresión de sus dianas. **(B)** EGFR induce la expresión de *argos* principalmente a través de los octámeros de unión a Cic.

1.5 LA REGULACIÓN DE *hkb* POR CIC REQUIERE LA FUNCIÓN DE GRO

Los represores de unión a ADN son frecuentemente asistidos por factores correpresores que son reclutados a la región reguladora diana mediante la unión al represor. Un factor correpresor general es Gro, una proteína con dominios repetidos WD que interacciona con diversas familias de represores. Estudios genéticos han mostrado que embriones mutantes para *cic* y *gro* muestran el mismo efecto de desrepresión de los genes terminales *tll* y *hkb* (Jimenez et al., 2000) por lo que hemos postulado un modelo en el que Cic recluta Gro para mediar la represión. Para abordar esta cuestión, hemos llevado a cabo una inmunoprecipitación de cromatina con el objetivo de detectar la asociación de Gro a las secuencias de unión a Cic del *enhancer* de *hkb*. La comparación de la detección de Gro en la condición silvestre frente a la mutante nos muestra una diferencia de ~4.5 veces menos Gro en la condición mutante. Este resultado avala nuestro modelo en el que Cic recluta Gro para mediar la represión. Sin embargo, aún no podemos afirmar que exista una unión directa entre Cic y Gro. Trabajos previos han mostrado que los motivos WRPW y eh1 de las proteínas de la familia de Hairy y Engrailed respectivamente, son importantes para la unión de Gro (Jiménez et al., 1997; Paroush et al., 1994) pero Cic no contiene ninguno de ellos. Además hemos observado que motivos importantes para mediar la represión de Cic (C1) no unen Gro in vivo (C.N y G.J. datos no publicados). Una posibilidad es que la interacción Cic-Gro se encuentre condicionada por otros factores. Existen dos candidatos que contienen secuencias de unión en el *enhancer* de *hkb* y que previamente se han asociado a Gro: Retained (Rtn) y Dl (Hader et al., 2000). Estos dos factores junto con Cic podrían formar una plataforma para reclutar Gro, idea que vendría apoyada por los resultados de la inmunoprecipitación de cromatina donde Gro es detectado en dominio amplio del *enhancer* de *hkb*. Sin embargo, esta detección tan amplia puede reflejar un mecanismo alternativo no necesariamente ligado a la existencia de una plataforma represora. Se ha observado que Gro forma asociaciones oligoméricas consigo misma capaces de extenderse a lo largo de un molde de cromatina (Chen et al., 1998). Esta polimerización podría explicar la razón por la que la expresión de *hkb* no se ve afectada de la misma manera en embriones mutantes *gro* y *retn* (Hader et al., 2000). Por otro lado, Dl parece que tampoco esté implicado en el reclutamiento de Gro a las secuencias octaméricas de Cic ya que en embriones mutantes *dl* y *gro* no

vemos el mismo efecto de expansión, de hecho, en embriones mutantes *dl*, vemos una expresión reducida de *hkb*.

Actualmente, estamos estudiando si la actividad represora mediada por lugares de unión a Cic aislados, se ejerce a través de Gro. Este resultado nos ayudará a discernir entre las dos posibilidades arriba discutidas referentes a si Cic requiere otros factores para reclutar Gro o lo hace directamente, sin la necesidad de un contexto específico.

Finalmente, es importante destacar que Torso y EGFR desactivan la actividad de Gro por la fosforilación de la MAPK (Cinnamon et al., 2008; Helman et al., 2011) pero la coordinación de dicha regulación no se entiende todavía. Es sorprendente que embriones que expresan el transgén *cic^{ΔC2}*, que escapa a la regulación de la MAPK, muestran un patrón reprimido de *tll* y *hkb* en el polo donde Gro está desactivado. Futuros experimentos deberán esclarecer la relación molecular de Cic y Gro en la regulación transcripcional.

2. EL ESTABLECIMIENTO DEL EJE D/V EN LAS CÉLULAS FOLICULARES DEL OVARIO

Otro contexto en el que hemos estudiado el mecanismo molecular por el que la señalización de EGFR regula la transcripción génica, es en el establecimiento del eje D/V en el ovario. Un factor clave en este proceso es el gen *pipe* que se encuentra reprimido por la vía en las células dorsales. Nuestros estudios han contribuido a definir que Mirr es el represor de *pipe* en respuesta a la señalización de EGFR. Además, hemos descrito el mecanismo por el que Cic es importante en el mantenimiento de la expresión de *pipe*: Cic reprime Mirr que a su vez es el represor de *pipe*.

El mecanismo por el que la señalización de EGFR regula la expresión de *pipe* ha sido extensamente estudiado anteriormente. Se han propuesto mecanismos en el que la señalización ejerce una represión a distancia a través del factor Mirr y la vía de Notch-Fringe, ya que las dianas de EGFR (como *mirr*) en el estadio 10A de la oogénesis únicamente se expresan en el 30% dorsal del epitelio folicular y la expresión de *pipe* se encuentra en el 40% ventral (Jordan et al., 2000). Sin embargo, trabajos posteriores han mostrado que la pérdida de la actividad EGFR-Ras-MAPK causa una desrepresión autónoma celular de *pipe*. En este trabajo hemos mostrado que Mirr, diana de la señalización de EGFR, reprime *pipe* a través

de la secuencia ACACGA de un nuevo *enhancer*. La mutación de este elemento regulador convierte a *pipe* independiente de Cic (Fig. 3E (Andreu et al., 2012)), lo que sugiere que su función en este contexto es la de reprimir el represor de *pipe*, *Mirr*. Esta observación, sin embargo, no parece fácil de interpretar ya que cámaras ováricas mutantes *cic*, únicamente muestran expresión ectópica de *mirr* en la región anterior, aunque *pipe* requiere Cic en cualquier posición (Fig. 3A (Andreu et al., 2012)). Conviene darse cuenta, que en cámaras con clones de *iro^{EGFP5}*, *pipe* se encuentra desreprimido en posiciones donde normalmente no detectamos la expresión de *mirr*. Esta observación nos hizo pensar que quizás, en cámaras mutantes *cic*, tuviéramos los mismos niveles de expresión de *mirr* en la región posterior como en la posición dorsoposterior en cámaras silvestres. Este aspecto lo hemos podido demostrar en ovarios mutantes *cic* sobre los que hemos generado clones de *iro^{EGFP5}*. Estas cámaras ováricas no expresan *pipe* en su posición endógena por falta de la actividad de Cic y por consiguiente expansión de *Mirr*. Únicamente son capaces de expresar *pipe* aquellas células que además de Cic, carecen de la proteína *Mirr*. Este resultado no solamente confirma el mecanismo regulador propuesto donde Cic reprime *Mirr* para expresar *pipe*, sino que además, nos muestra que existe una actividad de *Mirr* más amplia de la que podemos detectar, la cual es suficiente para reprimir *pipe* (Fig. 16).

En cuanto a los altos niveles de expresión de *mirr* en las células foliculares dorsoanteriores, varios trabajos han sugerido que es el resultado de la acción combinada de la señalización de EGFR pero también, de una señal anterior independiente que puede depender de Dpp (Deng and Bownes, 1997; Peri and Roth, 2000; Twombly et al., 1996). De esta manera, Cic sería necesario para reprimir la señal positiva de Dpp en la región anterior-ventral donde la acción de EGFR es muy débil. Cámaras ováricas mutantes *cic* sin embargo, no serían capaces de reprimir esta señal anterior, mostrando expansión de *mirr* a niveles altos y las células foliculares más posteriores expresarían niveles de *mirr* bajos ya que son insensibles a la señal positiva de Dpp (Fig. 15).

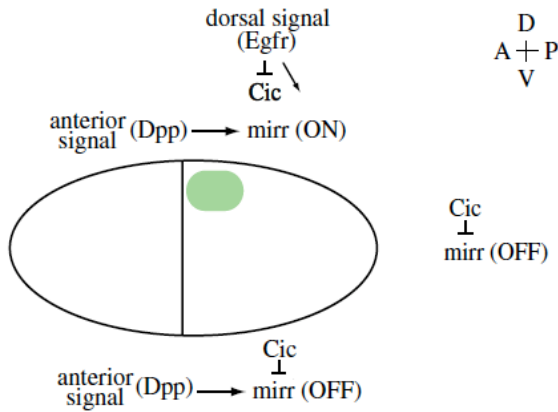


Fig. 15. En la posición dorsoanterior Cic se encuentra desactivada posibilitando que Dpp y EGFR, mediante una regulación independiente de Cic, induzcan la expresión de *mirr*. En el resto de la cámara ovárica Cic previene la expresión de *mirr* sobreponiéndose a las posibles señales activadoras. (Adaptado de Atkey et al., 2006)

La regulación de *mirr* en las células foliculares del ovario integra a nivel del *enhancer*, la información de al menos dos vías de señalización, EGFR y Dpp, y la regulación por el factor de transcripción Cic para su expresión localizada. Esta restricción de Mirr a las células dorsoanteriores permiten la expresión de *pipe* en ventral y así establecer el eje D/V del ovario.

Aún queda por determinar el mecanismo por el que Cic reprime la expresión de *mirr* ya que se desconoce la región reguladora que dirige su expresión en las células foliculares dorsales.

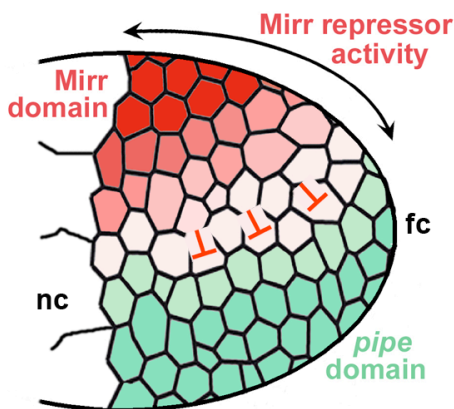


Fig. 16. Esquema mostrando la regulación de *pipe* mediante Mirr. Mirr forma un gradiente con máximos niveles en la región dorsoanterior (rojo). Los niveles bajos en las células foliculares laterales y dorsoposteriores (rosa) son suficientes para restringir la expresión de *pipe* a la zona ventral (verde).

3. CIRCUITOS REPRESORES SIMILARES DEFINEN EL PATRÓN A/P Y D/V DE *DROSOPHILA*

El circuito represor que establece el eje D/V del ovario parece ser análogo al mecanismo por el que Torso-Ras-MAPK coordinan la subdivisión del eje A/P. En este caso, la señalización de Torso en el polo del embrión desactiva Cic para inducir la expresión de los represores *gap* como Tll. Estos represores terminales se

encuentran restringidos al polo por la represión que ejerce sobre ellos el factor Cic y así mantener la expresión de *Kr* y *kni* para la correcta subdivisión del tronco (Fig. 17).

La desactivación de Cic por la fosforilación de la MAPK, parece tener una importancia mayor durante la inducción del gen *tll* en comparación con la expresión de *mirr*. Embriones que contienen el transgén *cic^{ΔC2}*, que escapa a la desactivación por la señalización, reprime *tll* completamente mientras que no afecta los niveles de *mirr* en las células foliculares dorsoanteriores. Futuros experimentos serán necesarios para entender el mecanismo por el que la vía de EGFR activa *mirr* de manera independiente a la desactivación de Cic.

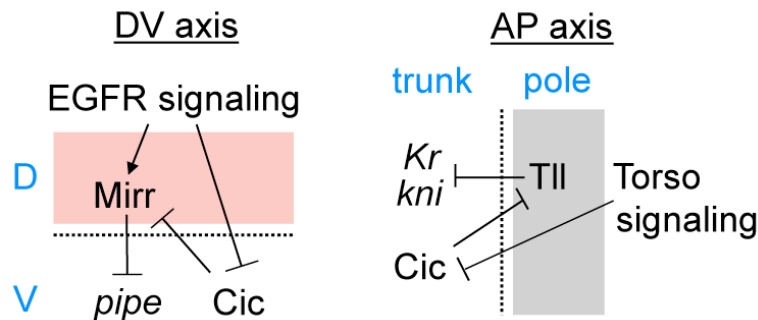


Fig. 17. Modelo de redes reguladoras implicadas en el establecimiento de los ejes D/V y A/P. La señalización por las RTKs, junto con otros efectos activadores inducen la expresión de factores represores, Mirr y Tll. La respuesta de *tll* a la señal de Torso únicamente requiere la desactivación de Cic mientras que la expresión de *mirr* por EGFR depende también de otros factores. En las regiones donde la señalización es débil Cic reprime la expresión de *mirr* y *tll* permitiendo así la de *pipe*, *Kr* y *kni*.

4. INTERACCIONES COMPETITIVAS ENTRE SUBSTRATOS DE LA MAPK REVELAN UN NUEVO MECANISMO DE CONTROL EN RESPUESTA A LA SEÑAL DE TORSO

Las regiones terminales del embrión se especifican a través de la señalización por la vía de Torso. Esta señalización mediante de la cascada Ras-MAPK tiene como objetivo principal desactivar las proteínas Cic y Gro para aliviar la represión que estos factores ejercen sobre *tll* y *hkb*. La distribución de la proteína Cic en el embrión es asimétrica entre el polo anterior y posterior siendo la acumulación más alta en la región anterior (Fig. 3 (Kim et al., 2010)). Curiosamente, la distribución

de la MAPK fosforilada (dpERK) también es asimétrica y como en el caso de Cic también se acumula más en el polo anterior (Fig. 1D (Kim et al., 2010)). Este efecto resulta sorprendente puesto que la MAPK desactiva la proteína Cic y lo que esperaríamos es una concentración más baja de Cic en el polo con más MAPK fosforilada.

La observación de la distribución asimétrica de la concentración de dpERK y Cic entre el polo anterior y posterior nos ha llevado a colaborar con el grupo de Stanislav Shvartsman para estudiar en profundidad este mecanismo de regulación.

Varios trabajos han propuesto que la competición entre sustratos de la MAPK regulan la propia concentración del enzima in vitro, por lo que nos preguntamos si este modelo podría explicar nuestras observaciones en cuanto a la distribución asimétrica de MAPK en experimento llevados a cabo in vivo. Unos de los factores diferencialmente distribuidos en el eje A/P y fosforilados por la MAPK en el polo anterior es Bcd. La alteración de su concentración en cuatro situaciones distintas donde los embriones no contienen ninguna copia de *bcd*, una, dos o cuatro, se aprecia que la concentración de dpERK varía pero únicamente en el polo anterior (Fig. 2 (Kim et al., 2010)). Esta observación sugiere que el modelo de la competición entre sustratos puede explicar la asimetría de la MAPK fosforilada.

En el caso de que los únicos sustratos implicados en la regulación de la concentración de la MAPK en el polo anterior fueran Cic y Bcd, esperaríamos que en una situación mutante para *bcd*, que es el único entre los citados que se expresa exclusivamente en un polo, la asimetría de dpERK y la de Cic se neutralizara. Sin embargo, sigue existiendo una diferencia significativa (Fig. 4A y 4B (Kim et al., 2010)). Estos resultados sugieren la existencia de otro factor fosforilado por la MAPK y diferencialmente expresado a lo largo del eje A/P. Hemos mostrado que Hb también se encuentra fosforilado en el polo anterior y que su expresión materna ubicua aumenta los niveles de dpERK en ambos polos disminuyendo su asimetría (Fig. 4C y 4E (Kim et al., 2010)).

Este modelo de regulación de la señalización en el que los sustratos compiten por la fosforilación de la MAPK ha permitido esclarecer la interacción genética entre los sistemas posterior y terminal. Datos anteriores han mostrado que embriones mutantes para los determinantes posteriores *osk* y *nos* incrementan los niveles de Cic en el polo posterior y disminuyen la expresión de los genes *tll* y *hkb*. Este

modelo nos permite interpretar que en embriones mutantes *osk* o *nos*, la expresión posterior de *hb* se desplaza al polo actuando como substrato de la MAPK. Hb en esta situación compite con Cic por la fosforilación de la MAPK, con el resultado que de desactiva con menor eficiencia y reprime la expresión de *tlr* y *hkb* en el polo posterior.

El modelo de la competición de substratos por la fosforilación arriba discutido, nos permite entender la razón por la que la concentración de la proteína Cic no se ve afectada en situaciones donde hay más concentración de MAPK fosforilada. Sin embargo no explica la causa por la que detectamos más dpERK. Trabajos posteriores al nuestro han logrado aclarar esta cuestión demostrando que los substratos de la MAPK compiten con la fosfatasa MKP3 impidiendo la defosforilación. Los substratos podrían actuar “protegiendo” la MAPK de la acción de fosfatasas citoplasmáticas aumentando la permanencia de la MAPK fosforilada en el núcleo (Kim et al., 2011).

CONCLUSIONES

1. Cic reprime la expresión de genes diana uniéndose a secuencias octaméricas T(G/C)AATGAA presentes en sus regiones reguladoras.
2. El elemento *tor-RE* que regula la expresión de *tll* en respuesta a la vía de Torso es un lugar de unión de Cic.
3. La señal de EGFR en el neuroectodermo induce la expresión de *ind* inhibiendo la actividad represora de Cic.
4. La regulación de Cic sobre *ind* demuestra la existencia de mecanismos represores implicados en limitar dorsalmente la expresión génica en el neuroectodermo.
5. Cic reprime directamente la expresión de *argos* en el disco imaginal de ala a través de un nuevo elemento *enhancer* que contiene octámeros de unión a Cic.
6. Los lugares de unión a Cic son suficientes para mediar represión y establecer patrones de expresión génica localizados en el embrión y en el disco de ala.
7. El octámero reconocido por Cic constituye un elemento general de respuesta a señales Ras-MAPK, regulando la transcripción a través de un mecanismo de desrepresión.
8. Las vías de Torso y EGFR regulan la expresión de *hkb*, *tll* e *ind* en el embrión temprano principalmente a través de la inhibición de Cic; en cambio, la respuesta de *argos* a la señal de EGFR en el disco imaginal de ala no depende únicamente de este mecanismo y también requiere otros procesos independientes de Cic.
9. Gro se encuentra asociado al *enhancer* de *hkb* en el embrión temprano, y esta asociación depende de la presencia de lugares de unión de Cic.
10. Mirr reprime directamente a *pipe* a través de un nuevo *enhancer* de este gen.
11. Cic mantiene la expresión de *pipe* en células ventrales actuando indirectamente como represor de Mirr.

12. La competición molecular entre substratos de MAPK como Cic y Bed modula sus respuestas a la señal Torso-Ras-MAPK in vivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajuria, L., Nieva, C., Winkler, C., Kuo, D., Samper, N., Andreu, M. J., Helman, A., Gonzalez-Crespo, S., Paroush, Z., Courey, A. J. et al. (2011). Capicua DNA-binding sites are general response elements for RTK signaling in *Drosophila*. *Development* **138**, 915-24.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1983). *Molecular Biology of the Cell*.
- Andreu, M. J., Gonzalez-Perez, E., Ajuria, L., Samper, N., Gonzalez-Crespo, S., Campuzano, S. and Jimenez, G. (2012). Mirror represses pipe expression in follicle cells to initiate dorsoventral axis formation in *Drosophila*. *Development* **139**, 1110-4.
- Astigarraga, S., Grossman, R., Diaz-Delfin, J., Caelles, C., Paroush, Z. and Jimenez, G. (2007). A MAPK docking site is critical for downregulation of Capicua by Torso and EGFR RTK signaling. *EMBO J* **26**, 668-77.
- Barolo, S. and Levine, M. (1997). hairy mediates dominant repression in the *Drosophila* embryo. *EMBO J* **16**, 2883-91.
- Barolo, S. and Posakony, J. W. (2002). Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Genes Dev* **16**, 1167-81.
- Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 142-8.
- Bettegowda, C., Agrawal, N., Jiao, Y., Sausen, M., Wood, L. D., Hruban, R. H., Rodriguez, F. J., Cahill, D. P., McLendon, R., Riggins, G. et al. (2010). Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science* **333**, 1453-5.
- Bolger, T. A., Zhao, X., Cohen, T. J., Tsai, C. C. and Yao, T. P. (2007). The neurodegenerative disease protein ataxin-1 antagonizes the neuronal survival function of myocyte enhancer factor-2. *J Biol Chem* **282**, 29186-92.
- Brunner, D., Ducker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H. and Klambt, C. (1994). The ETS domain protein pointed-P2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway. *Nature* **370**, 386-9.
- Bulger, M. and Groudine, M. (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* **13**, 2465-77.
- Cai, H. N., Arnosti, D. N. and Levine, M. (1996). Long-range repression in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9309-14.
- Casali, A. and Casanova, J. (2001). The spatial control of Torso RTK activation: a C-terminal fragment of the Trunk protein acts as a signal for Torso receptor in the *Drosophila* embryo. *Development* **128**, 1709-15.
- Casanova, J., Furriols, M., McCormick, C. A. and Struhl, G. (1995). Similarities between trunk and spatzle, putative extracellular ligands specifying body pattern in *Drosophila*. *Genes Dev* **9**, 2539-44.
- Chen, G. and Courey, A. J. (2000). Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene* **249**, 1-16.
- Chen, G., Nguyen, P. H. and Courey, A. J. (1998). A role for Groucho tetramerization in transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **18**, 7259-68.
- Cinnamon, E., Helman, A., Ben-Haroush Schyr, R., Orian, A., Jimenez, G. and Paroush, Z. (2008). Multiple RTK pathways downregulate Groucho-mediated repression in *Drosophila* embryogenesis. *Development* **135**, 829-37.
- Courey, A. J. and Jia, S. (2001). Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev* **15**, 2786-96.

- De Celis, J. F.** (1998). Positioning and differentiation of veins in the *Drosophila* wing. *Int J Dev Biol* **42**, 335-43.
- de Celis, J. F. and Barrio, R.** (2000). Function of the spalt/spalt-related gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. *Mech Dev* **91**, 31-41.
- Degelmann, A., Hardy, P. A., Perrimon, N. and Mahowald, A. P.** (1986). Developmental analysis of the torso-like phenotype in *Drosophila* produced by a maternal-effect locus. *Dev Biol* **115**, 479-89.
- 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.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Hafen, E.** (1994). The sevenless signalling cassette mediates *Drosophila* EGF receptor function during epidermal development. *Development* **120**, 569-78.
- Driever, W. and Nusslein-Volhard, C.** (1988a). A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* **54**, 83-93.
- Driever, W. and Nusslein-Volhard, C.** (1988b). The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* **54**, 95-104.
- Freeman, M., Klambt, C., Goodman, C. S. and Rubin, G. M.** (1992). The argos gene encodes a diffusible factor that regulates cell fate decisions in the *Drosophila* eye. *Cell* **69**, 963-75.
- Furriols, M. and Casanova, J.** (2003). In and out of Torso RTK signalling. *EMBO J* **22**, 1947-52.
- Gabay, L., Scholz, H., Golembo, M., Klaes, A., Shilo, B. Z. and Klambt, C.** (1996). EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm. *Development* **122**, 3355-62.
- Garcia-Bellido, A. and de Celis, J. F.** (1992). Developmental genetics of the venation pattern of *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **26**, 277-304.
- Gilbert, S. F.** (2003). *Developmental Biology*. Sunderland: Sinauer Associates Inc.
- Goff, D. J., Nilson, L. A. and Morisato, D.** (2001). Establishment of dorsal-ventral polarity of the *Drosophila* egg requires capicua action in ovarian follicle cells. *Development* **128**, 4553-62.
- Golembo, M., Schweitzer, R., Freeman, M. and Shilo, B. Z.** (1996). Argos transcription is induced by the *Drosophila* EGF receptor pathway to form an inhibitory feedback loop. *Development* **122**, 223-30.
- Gonzalez-Reyes, A., Elliott, H. and St Johnston, D.** (1995). Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling. *Nature* **375**, 654-8.
- Gonzalez-Reyes, A. and St Johnston, D.** (1994). Role of oocyte position in establishment of anterior-posterior polarity in *Drosophila*. *Science* **266**, 639-42.
- Hader, T., Wainwright, D., Shandala, T., Saint, R., Taubert, H., Bronner, G. and Jackle, H.** (2000). Receptor tyrosine kinase signaling regulates different modes of Groucho-dependent control of Dorsal. *Curr Biol* **10**, 51-4.
- Helman, A., Cinnamon, E., Mezuman, S., Hayouka, Z., Von Ohlen, T., Orian, A., Jimenez, G. and Paroush, Z.** (2011). Phosphorylation of Groucho mediates RTK feedback inhibition and prolonged pathway target gene expression. *Curr Biol* **21**, 1102-10.
- Hong, J. W., Hendrix, D. A., Papatsenko, D. and Levine, M. S.** (2008). How the Dorsal gradient works: insights from postgenome technologies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20072-6.

- Jennings, B. H., Wainwright, S. M. and Ish-Horowicz, D.** (2008). Differential in vivo requirements for oligomerization during Groucho-mediated repression. *EMBO Rep* **9**, 76-83.
- Jiang, H., Grenley, M. O., Bravo, M. J., Blumhagen, R. Z. and Edgar, B. A.** (2010). EGFR/Ras/MAPK signaling mediates adult midgut epithelial homeostasis and regeneration in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* **8**, 84-95.
- Jimenez, G., Guichet, A., Ephrussi, A. and Casanova, J.** (2000). Relief of gene repression by torso RTK signaling: role of capicua in *Drosophila* terminal and dorsoventral patterning. *Genes Dev* **14**, 224-31.
- Jimenez, G., Shvartsman, S. Y. and Paroush, Z.** (2012). The Capicua repressor—a general sensor of RTK signaling in development and disease. *J Cell Sci* **125**, 1383-91.
- Jordan, K. C., Clegg, N. J., Blasi, J. A., Morimoto, A. M., Sen, J., Stein, D., McNeill, H., Deng, W. M., Tworoger, M. and Ruohola-Baker, H.** (2000). The homeobox gene mirror links EGF signalling to embryonic dorso-ventral axis formation through notch activation. *Nat Genet* **24**, 429-33.
- Kanodia, J. S., Rikhy, R., Kim, Y., Lund, V. K., DeLotto, R., Lippincott-Schwartz, J. and Shvartsman, S. Y.** (2009). Dynamics of the Dorsal morphogen gradient. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21707-12.
- Karim, F. D. and Rubin, G. M.** (1998). Ectopic expression of activated Ras1 induces hyperplastic growth and increased cell death in *Drosophila* imaginal tissues. *Development* **125**, 1-9.
- Kawamura-Saito, M., Yamazaki, Y., Kaneko, K., Kawaguchi, N., Kanda, H., Mukai, H., Gotoh, T., Motoi, T., Fukayama, M., Aburatani, H. et al.** (2006). Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation. *Hum Mol Genet* **15**, 2125-37.
- Kim, Y., Coppey, M., Grossman, R., Ajuria, L., Jimenez, G., Paroush, Z. and Shvartsman, S. Y.** (2010). MAPK substrate competition integrates patterning signals in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol* **20**, 446-51.
- Kim, Y., Paroush, Z., Nairz, K., Hafen, E., Jimenez, G. and Shvartsman, S. Y.** (2011). Substrate-dependent control of MAPK phosphorylation in vivo. *Mol Syst Biol* **7**, 467.
- Lam, Y. C., Bowman, A. B., Jafar-Nejad, P., Lim, J., Richman, R., Fryer, J. D., Hyun, E. D., Duvick, L. A., Orr, H. T., Botas, J. et al.** (2006). ATAXIN-1 interacts with the repressor Capicua in its native complex to cause SCA1 neuropathology. *Cell* **127**, 1335-47.
- Lee, C. J., Chan, W. I., Cheung, M., Cheng, Y. C., Appleby, V. J., Orme, A. T. and Scotting, P. J.** (2002). CIC, a member of a novel subfamily of the HMG-box superfamily, is transiently expressed in developing granule neurons. *Brain Res Mol Brain Res* **106**, 151-6.
- Lehmann, R. and Nusslein-Volhard, C.** (1991). The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development* **112**, 679-91.
- Lemmon, M. A. and Schlessinger, J.** (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117-34.
- Lieberman, L. M., Reeves, G. T. and Stathopoulos, A.** (2009). Quantitative imaging of the Dorsal nuclear gradient reveals limitations to threshold-dependent patterning in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 22317-22.
- Lohr, U., Chung, H. R., Beller, M. and Jackle, H.** (2009). Antagonistic action of Bicoid and the repressor Capicua determines the spatial limits of *Drosophila* head gene expression domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21695-700.

- Manseau, L. J. and Schupbach, T.** (1989). cappuccino and spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **3**, 1437-52.
- Mor, A. and Philips, M. R.** (2006). Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol* **24**, 771-800.
- 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.
- Nibu, Y., Zhang, H. and Levine, M.** (1998). Interaction of short-range repressors with *Drosophila* CtBP in the embryo. *Science* **280**, 101-4.
- Nusslein-Volhard, C., Frohnhof, H. G. and Lehmann, R.** (1987). Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* **238**, 1675-81.
- O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R. and Rubin, G. M.** (1994). The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* **78**, 137-47.
- Paroush, Z., Finley, R. L., Jr., Kidd, T., Wainwright, S. M., Ingham, P. W., Brent, R. and Ish-Horowicz, D.** (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* **79**, 805-15.
- Paroush, Z., Wainwright, S. M. and Ish-Horowicz, D.** (1997). Torso signalling regulates terminal patterning in *Drosophila* by antagonising Groucho-mediated repression. *Development* **124**, 3827-34.
- Peri, F. and Roth, S.** (2000). Combined activities of Gurken and decapentaplegic specify dorsal chorion structures of the *Drosophila* egg. *Development* **127**, 841-50.
- Perrimon, N., Mohler, D., Engstrom, L. and Mahowald, A. P.** (1986). X-linked female-sterile loci in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **113**, 695-712.
- Poortinga, G., Watanabe, M. and Parkhurst, S. M.** (1998). *Drosophila* CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *EMBO J* **17**, 2067-78.
- Pouyssegur, J., Volmat, V. and Lenormand, P.** (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* **64**, 755-63.
- Prober, D. A. and Edgar, B. A.** (2000). Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing. *Cell* **100**, 435-46.
- Rebay, I. and Rubin, G. M.** (1995). Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway. *Cell* **81**, 857-66.
- Roch, F., Jimenez, G. and Casanova, J.** (2002). EGFR signalling inhibits Capicua-dependent repression during specification of *Drosophila* wing veins. *Development* **129**, 993-1002.
- Roth, S., Neuman-Silberberg, F. S., Barcelo, G. and Schupbach, T.** (1995). cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* **81**, 967-78.
- Sanson, B.** (2001). Generating patterns from fields of cells. Examples from *Drosophila* segmentation. *EMBO Rep* **2**, 1083-8.
- Schnepf, B., Grumblin, G., Donaldson, T. and Simcox, A.** (1996). Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev* **10**, 2302-13.
- Schupbach, T. and Wieschaus, E.** (1986). Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev Biol* **113**, 443-8.
- Shaul, Y. D. and Seger, R.** (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1213-26.

- Skeath, J. B.** (1998). The *Drosophila* EGF receptor controls the formation and specification of neuroblasts along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* **125**, 3301-12.
- Small, S., Blair, A. and Levine, M.** (1992). Regulation of even-skipped stripe 2 in the *Drosophila* embryo. *EMBO J* **11**, 4047-57.
- 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.
- Stathopoulos, A. and Levine, M.** (2005). Localized repressors delineate the neurogenic ectoderm in the early *Drosophila* embryo. *Dev Biol* **280**, 482-93.
- Struhl, K.** (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* **12**, 599-606.
- Sturtevant, M. A., Roark, M. and Bier, E.** (1993). The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes Dev* **7**, 961-73.
- Tootle, T. L. and Rebay, I.** (2005). Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily. *Bioessays* **27**, 285-98.
- Traverse, S., Seedorf, K., Paterson, H., Marshall, C. J., Cohen, P. and Ullrich, A.** (1994). EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol* **4**, 694-701.
- Tsai, C. C., Kao, H. Y., Mitzutani, A., Banayo, E., Rajan, H., McKeown, M. and Evans, R. M.** (2004). Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4047-52.
- Tseng, A. S., Tapon, N., Kanda, H., Cigizoglu, S., Edelmann, L., Pellock, B., White, K. and Hariharan, I. K.** (2007). Capicua regulates cell proliferation downstream of the receptor tyrosine kinase/ras signaling pathway. *Curr Biol* **17**, 728-33.
- 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.
- Ventura, G., Furriols, M., Martin, N., Barbosa, V. and Casanova, J.** (2010). *cloaca*, a new gene required for both Torso RTK activation and vitelline membrane integrity. Germline proteins contribute to *Drosophila* eggshell composition. *Dev Biol* **344**, 224-32.
- von Ohlen, T. and Doe, C. Q.** (2000). Convergence of dorsal, *dpp*, and *egfr* signaling pathways subdivides the *drosophila* neuroectoderm into three dorsal-ventral columns. *Dev Biol* **224**, 362-72.
- Wang, C. and Lehmann, R.** (1991). Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell* **66**, 637-47.
- Weiss, J. B., Von Ohlen, T., Mellerick, D. M., Dressler, G., Doe, C. Q. and Scott, M. P.** (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the intermediate neuroblasts defective homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes Dev* **12**, 3591-602.
- Xu, C., Kauffmann, R. C., Zhang, J., Kladny, S. and Carthew, R. W.** (2000). Overlapping activators and repressors delimit transcriptional response to receptor tyrosine kinase signals in the *Drosophila* eye. *Cell* **103**, 87-97.
- Yoon, S. and Seger, R.** (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44.

Yu, W., Fantl, W. J., Harrowe, G. and Williams, L. T. (1998). Regulation of the MAP kinase pathway by mammalian Ksr through direct interaction with MEK and ERK. *Curr Biol* **8**, 56-64.

Zhao, D., Woolner, S. and Bownes, M. (2000). The Mirror transcription factor links signalling pathways in *Drosophila* oogenesis. *Dev Genes Evol* **210**, 449-57.

LAS SECUENCIAS DE UNIÓN A CAPICUA SON ELEMENTOS DE RESPUESTA GENERALES A LA SEÑALIZACIÓN POR RTKS EN *DROSOPHILA*

Las vías de señalización RTK-Ras-MAPK regulan multitud de procesos esenciales durante el desarrollo de los metazoos; sin embargo, aún no conocemos en detalle el modo en que dichas vías regulan la expresión de genes diana en diferentes contextos. En *Drosophila*, se asume que la mayoría de las respuestas transcripcionales inducidas por señales RTK dependen de proteínas de la familia ETS, las cuales reconocen elementos *cis* en sus genes diana. En este artículo mostramos que distintas vías RTK en *Drosophila* inducen respuestas génicas específicas a través de secuencias octáméricas que actúan como lugares de unión de la proteína HMG box Cic, un represor transcripcional inhibido por señales RTK. Nuestros resultados indican que la vía RTK de Torso regula la expresión de genes gap terminales a través de octámeros de unión a Cic, y que la unión de Cic a estas secuencias es esencial para el reclutamiento del correpresor Gro al *enhancer* de *hkb* in vivo. También hemos mostrado que la activación posterior de la vía RTK de EGFR en la región del neuroectodermo del embrión controla la expresión de genes en el eje D/V desactivando la proteína Cic, y que este control también depende de motivos octaméricos de unión a Cic. De esta manera, mecanismos similares de regulación por RTKs operan durante la subdivisión de los ejes A/P y D/V del embrión. Además, hemos observado que secuencias octaméricas idénticas median la regulación dependiente de Cic de otro gen diana de la vía de EGFR, *argos*, en el disco imaginal de ala. Sorprendentemente, una simple combinación de lugares de unión activadores y motivos de unión a Cic resulta suficiente para establecer patrones complejos de expresión génica en respuesta a las señal de Torso y EGFR en distintos tejidos. Estos hallazgos demuestran que los octámeros de unión a Cic son elementos generales de respuesta a la señalización por RTKs en *Drosophila*.

Capicua DNA-binding sites are general response elements for RTK signaling in *Drosophila*

Leiore Ajuria¹, Claudia Nieva^{1,*}, Clint Winkler^{2,*}, Dennis Kuo², Núria Samper¹, María José Andreu¹, Aharon Helman³, Sergio González-Crespo¹, Ze'ev Paroush³, Albert J. Courey² and Gerardo Jiménez^{1,4,†}

SUMMARY

RTK/Ras/MAPK signaling pathways play key functions in metazoan development, but how they control expression of downstream genes is not well understood. In *Drosophila*, it is generally assumed that most transcriptional responses to RTK signal activation depend on binding of Ets-family proteins to specific cis-acting sites in target enhancers. Here, we show that several *Drosophila* RTK pathways control expression of downstream genes through common octameric elements that are binding sites for the HMG-box factor Capicua, a transcriptional repressor that is downregulated by RTK signaling in different contexts. We show that Torso RTK-dependent regulation of terminal gap gene expression in the early embryo critically depends on Capicua octameric sites, and that binding of Capicua to these sites is essential for recruitment of the Groucho co-repressor to the *huckebein* enhancer in vivo. We then show that subsequent activation of the EGFR RTK pathway in the neuroectodermal region of the embryo controls dorsal-ventral gene expression by downregulating the Capicua protein, and that this control also depends on Capicua octameric motifs. Thus, a similar mechanism of RTK regulation operates during subdivision of the anterior-posterior and dorsal-ventral embryonic axes. We also find that identical DNA octamers mediate Capicua-dependent regulation of another EGFR target in the developing wing. Remarkably, a simple combination of activator-binding sites and Capicua motifs is sufficient to establish complex patterns of gene expression in response to both Torso and EGFR activation in different tissues. We conclude that Capicua octamers are general response elements for RTK signaling in *Drosophila*.

KEY WORDS: Capicua, *Drosophila*, RTK signaling

INTRODUCTION

Receptor tyrosine kinase (RTK) signaling pathways control a broad spectrum of developmental decisions, including cell proliferation, differentiation, morphogenesis and survival (Schlessinger, 2000; Simon, 2000). Many RTK pathways signal through the conserved Ras/MAPK cassette, which then leads to phosphorylation of nuclear transcription factors and other cellular proteins. At the transcriptional level, RTK signals induce a wide variety of target gene responses in different contexts, but the molecular mechanisms underlying these responses are not well understood. In *Drosophila*, *in vivo* validated RTK effectors include the Ets factors Pointed and Yan (Simon, 2000; Tootle and Rebay, 2005), the HMG-box repressor Capicua (Cic) (Jiménez et al., 2000; Goff et al., 2001; Roch et al., 2002; Astigarraga et al., 2007; Tseng et al., 2007) and the Groucho (Gro) co-repressor (Hasson et al., 2005; Cinnamon et al., 2008; Cinnamon and Paroush, 2008; Jennings and Ish-Horowitz, 2008). Consequently, the analysis of these effectors can provide general insights into the regulatory mechanisms by which RTK signals control gene expression and development.

The *Drosophila* Torso RTK pathway represents an excellent model of transcriptional regulation in response to RTK activation (Furriols and Casanova, 2003). In this system, localized activation of the Torso receptor at each pole (termini) of the early blastoderm embryo controls the specification of terminal body structures by inducing the expression of two zygotic gap genes: *tailless* (*tll*) and *huckebein* (*hkb*) (Pignoni et al., 1990; Brönner and Jäckle, 1991). This induction involves a mechanism of derepression: both genes are normally repressed in medial regions of the embryo and the Torso signal relieves this repression at the poles (Liaw et al., 1995; Paroush et al., 1997; Jiménez et al., 2000). Repression of *tll* and *hkb* requires several nuclear factors, including Cic and Gro, which are both downregulated by the Torso signal (Paroush et al., 1997; Häder et al., 2000; Jiménez et al., 2000; Goff et al., 2001; Astigarraga et al., 2007; Cinnamon et al., 2008). Thus, loss of Cic or Gro function causes derepression of *tll* and *hkb* in medial regions of the embryo, which then leads to repression of central gap genes such as *knirps* (*kni*) and *Krüppel* (*Kr*) (Paroush et al., 1997; Jiménez et al., 2000; Goff et al., 2001; Löhr et al., 2009) (see Fig. S1 in the supplementary material). Conversely, mutations that render Cic or Gro insensitive to MAPK phosphorylation cause inappropriate repression of *tll* and *hkb* at the poles (Astigarraga et al., 2007; Cinnamon et al., 2008). Additionally, various studies have implicated other factors, such as GAGA/Trx-like, Dorsal, Retained (Retn; also known as Dead-ringer) or Tramtrack, in *tll* and/or *hkb* regulation (Liaw et al., 1995; Häder et al., 2000; Chen et al., 2002).

It is currently assumed that terminal gap genes contain complex enhancer regions that are bound by several, perhaps redundantly acting, transcription factors. However, how these activities converge to regulate Torso-dependent expression of *tll* or *hkb* is not

¹Institut de Biologia Molecular de Barcelona-CSIC, Parc Científic de Barcelona, Barcelona 08028, Spain. ²Department of Chemistry and Biochemistry, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA 90095-1569, USA. ³Department of Developmental Biology and Cancer Research, IMRIC, Faculty of Medicine, The Hebrew University, Jerusalem 91120, Israel. ⁴Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona 08010, Spain.

*These authors contributed equally to this work

†Author for correspondence (gjbmc@ibmb.csic.es)

understood. For example, analysis of a *hkb* enhancer indicated a role of Dorsal, Retn and Gro in Torso-mediated regulation of this enhancer (Häder et al., 2000). Cic is also required for *hkb* repression, but it has not yet been possible to demonstrate direct binding of Cic to *hkb* cis-regulatory regions (Jiménez et al., 2000). Recently, a DNA-binding motif for the Cic protein has been identified in humans (Kawamura-Saito et al., 2006), and it has been noted that this motif resembles a short regulatory element in the *tll* upstream region, the *torso response element* (*tor-RE*), which restricts *tll* expression to the posterior pole of the embryo (Liaw et al., 1995; Löhr et al., 2009). Consequently, it is possible that Cic represses *hkb* expression by binding to *tor-RE*-like elements, thus contributing to Torso-dependent regulation of this target.

Here, we report that *tor-RE*-like octameric sequences present in the *hkb* enhancer region function as binding sites for Cic and play a central role in the response of this target to Torso regulation. We also show that these Cic-binding motifs are essential for recruitment of the Gro co-repressor to *hkb* enhancer sequences in vivo. We then show that similar elements control the restricted expression of the *intermediate neuroblasts defective* (*ind*) gene in the neuroectodermal region of the embryo. This regulation occurs downstream of the EGFR RTK signaling pathway, indicating that Cic-binding sites function downstream of different RTK signals. Identical sites mediate Cic-dependent regulation of another EGFR target, *argos*, in the developing wing. Using synthetic enhancer constructs, we find that Cic octamers are sufficient to provide the regulatory information necessary to translate RTK signaling inputs into precise transcriptional responses in different tissues. We conclude that Cic octameric sites are general response elements for RTK signaling in *Drosophila*.

MATERIALS AND METHODS

DNA constructs

A GST-Cic^{HMG} expression construct was generated by amplifying a fragment encoding the *Drosophila* Cic HMG-box region (corresponding to residues 481-580) with primers *hmg1* (5' AAT GAA TTC CCG CAG CTG GGC AGC 3') and *hmg2* (5' TAT CCC GGG TCC GCT CGC CTT TCC 3'), and subcloning the resulting fragment into *pGEX-6P-2*. This construct (*pGEX-6P-2-Cic^{HMG}*) is structurally equivalent to the *pGEX6P-2-Cic-HMG* construct from human Cic made by Kawamura-Saito et al. (Kawamura-Saito et al., 2006).

To generate *hkb^{0.4}-lacZ*, the *hkb^{0.4}* fragment was amplified using primers *hkb1* (5' AAT GAA TTC ACG TTC GCT GGC CGA G 3') and *hkb2* (5' GAA GGA TCC ATA AAA CGC GGT CCG 3'), digested with *EcoRI* and *BamHI*, and subcloned in *EcoRI/BamHI*-digested *pCaSpeR-hs43-lacZ*. *hkb^{0.4mut}-lacZ* was made similarly but using a *pUC57-hkb^{0.4mut}* plasmid template in which the two TGAATGAA sites had been mutated to CACACGCA by recombinant PCR.

hb-lacZ was generated by amplifying a 270 bp *hb* enhancer with primers *hb1* (5' ATG AAT TCG CTA GCT GCC TAC TCC 3') and *hb2* (5' AAT GCG GCC GCA CGC GTC AAG GGA 3') and digesting the resulting product with *EcoRI* and *NotI* for cloning into *pCaSpeR-hs43-lacZ*. *hbC-lacZ* was made by inserting two TGAATGAA sites as *NotI-Spel* and *SpeI-BamHI* adaptors downstream of the *hb* sequence.

Bcd-lacZ was made by amplifying a synthetic array of four Bcd-binding sites separated by scrambled spacers (Hanes et al., 1994), digesting the PCR product with *EcoRI* and *BamHI*, and subcloning the resulting fragment in *pCaSpeR-hs43-lacZ*. To generate *CBcdC-lacZ*, we first joined a 45 bp module from *hkb^{0.4}* containing two TGAATGAA sites with the above Bcd-binding site fragment using recombinant PCR. This fragment was subcloned upstream of a second copy of the above 45 bp element to create a *CBcdC* module, which was then inserted as an *EcoRI-BamHI* fragment into *pCaSpeR-hs43-lacZ*. *CBcdC^{TRE}-lacZ* and *CBcdC^{mut}-lacZ* were made similarly, using versions of the *hkb* 45 bp module mutated to TCAATGAA or CACACGCA, respectively.

ind^{0.5}-lacZ was created by amplifying the *ind^{0.5}* fragment with primers *ind1* (5' AAT GAA TTC AAA CGT TTT GTT ATA ATC 3') and *ind2* (5' GAA GGA TCC GGA AGA CAC TTC ATG 3'), and subcloning the resulting fragment in *pUC57*. The 0.5 kb *ind^{0.5}* fragment was then recovered by digesting the *pUC57-ind^{0.5}* plasmid with *BamHI* and (partially) with *EcoRI*, and ligated to *EcoRI/BamHI*-digested *pCaSpeR-hs43-lacZ*. *ind^{0.5mut}-lacZ* was made similarly using a *pUC57-ind^{0.5mut}* plasmid template in which the TGAATGAA sites had been mutated to CACACGCA by recombinant PCR.

argos^{1.0}-lacZ was generated using the *argos^{1.0}* enhancer fragment amplified with primers *argos1* (5' ATG AAT TCG AGA TGA AAG TTT ATA G 3') and *argos2* (5' CAT TTT CAC ACC TGA CTG CAG 3'), and subcloning the resulting fragment in T-overhang *pUC57*. *argos^{1.0}* was then recovered as an *EcoRI-BamHI* fragment and subcloned into *pC4PLZ*. *argos^{1.0mut}-lacZ* was made similarly using the corresponding *argos^{1.0mut}* fragment carrying mutated Cic sites (CACACGCA).

CUASC-lacZ was made by first joining five tandem Gal4-binding sites to the 45 bp module from *hkb^{0.4}* containing two Cic sites. This fragment was then inserted upstream of a second copy of the Cic-site module to create a *CUASC* enhancer, which was then subcloned as an *EcoRI-BamHI* fragment in *pC4PLZ*.

Protein expression and EMSA experiments

GST-HMG-box fusion proteins were expressed and purified as described previously (Paroush et al., 1994). In vitro binding assays were carried out as described by Kawamura-Saito et al. (Kawamura-Saito et al., 2006). Briefly, incubations were performed in a 15 µl volume containing 0.1-0.2 µg of GST-HMG-box protein, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 6% glycerol, 0.5% Triton-X100, 10 µg BSA, 1-2.5 µg poly(dI-dC) and 1 µg of single-stranded DNA. After 15 minutes of preincubation at 4°C, ~0.05 pmol of ³²P-labeled DNA probe was added and the incubation was continued for another 45 minutes at the same temperature. Reactions were resolved on 5% nondenaturing polyacrylamide gels at 4°C in 0.5× TBE.

Drosophila stocks

The *cic¹*, *cic²*, *cic^{feE11}* and *tor⁴⁰²¹* alleles have been described before (Jiménez et al., 2000; Goff et al., 2001; Roch et al., 2002; Klinger et al., 1988). *cic^{AC2}* embryos were obtained from transheterozygous females carrying two different *cic^{AC2}* insertions (Astigarraga et al., 2007). Embryos devoid of maternal *gro* activity were obtained using the *gro^{MB36}* allele (Jennings et al., 2008) in combination with the *ovo^D-FLP-FRT* system (Chou et al., 1993). Embryos lacking maternal *Ras* function, alone or in combination with *cic*, were generated similarly using the *Ras^{AC40b}* and *cic^{Q474X}* alleles (Tseng et al., 2007). *dorsal* (*dl*) mutant embryos were derived from *dl¹/dl⁴* mothers (FlyBase). Other transgenic insertions and mutants used were *cic-HA* construct (Astigarraga et al., 2007), *argos^{w11}* (Freeman et al., 1992), the *rho^{ve} vn¹* combination (Diaz-Benjumea and García-Bellido, 1990), *UAS-cic* (Lam et al., 2006) and *UAS-λtop* (Queenan et al., 1997). Transgenic lines were obtained by standard P-element transformation and several independent lines were analyzed for each reporter construct.

Embryo and wing disc analyses

Embryos were fixed in 4% formaldehyde-PBS-heptane for 20 minutes. In situ hybridizations were carried out using digoxigenin-UTP labeled antisense RNA probes, and anti-digoxigenin antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Roche). Immunostainings were performed using the following primary antibodies: anti-dpErk (Cell Signaling; 1:50 dilution), anti-HA (12CA5, Roche; 1:400 dilution) and anti-β-galactosidase (40-1a, Developmental Studies Hybridoma Bank; 1:250 dilution). Signals were detected using secondary fluorochrome-conjugated antibodies (Molecular Probes). Embryos were mounted in Permount (in situ hybridizations) or Fluoromount-G (immunostainings). Wing discs were fixed in 4% paraformaldehyde-PBS for 20 minutes, processed for immunostaining using anti-HA and anti-β-galactosidase (anti-β-Gal) antibodies, and mounted in Fluoromount-G.

Chromatin immunoprecipitation assays

ChIP assays were performed using staged embryo collections from homozygous lines containing the *hkb^{0.4}-lacZ* or *hkb^{0.4mut}-lacZ* transgenes. Embryos were dechorionated in 100% bleach and subsequently fixed for 20 minutes in 10 ml crosslinking buffer (3% formaldehyde, 50 mM HEPES [pH 7.6], 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 100 mM NaCl) and 30 ml heptane. Crosslinking was stopped with 125 mM glycine. Crosslinked chromatin was sheared by sonication to an average size of 500 bp and immunoprecipitated using anti-Gro antibodies (two different rabbit polyclonal antisera raised against the N-terminal region of the protein). Control experiments using pre-immune serum or no antibody resulted in signals below 0.05% of input. Immunoprecipitated complexes were sequentially washed with low salt buffer [50 mM HEPES (pH 7.9), 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 140 mM NaCl, 0.1% deoxycholate], high salt buffer [50 mM HEPES (pH 7.9), 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 500 mM NaCl, 0.1% deoxycholate], LiCl buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5% deoxycholate, 0.5% NP-40] and TE. The chromatin was eluted with TE containing 1% SDS and 0.1 M NaHCO₃, and cross-linking was reversed by incubating at 65°C overnight. The resulting DNA was purified by chloroform extraction and ethanol precipitation, and quantified by qPCR using the FastStart SYBR Green Master Mix (Roche) on an Opticon Monitor 2 system (Bio-Rad). Three to five independent biological replicates (in which independent embryo collections were subjected to separate crosslinking and IP before separate qPCR) were analyzed for each amplicon. As reported in other Gro ChIP studies (Martinez and Arnosti, 2008), these replicates produced some variability reflected in the standard deviation (s.d.) of the data. Nevertheless, the results were highly consistent over multiple experiments using the two anti-Gro antibodies. A *P*-value was calculated by comparing *hkb^{0.4}* with *hkb^{0.4mut}* for all data points from amplicons within *hkb^{0.4}* (amplicons C-F) using a two-tailed *t*-test.

RESULTS

Cic represses *hkb* expression via TGAATGAA octamers

The human Cic protein binds the octameric sequence TGAATG(G/A)A (Kawamura-Saito et al., 2006). This element exhibits a single-nucleotide mismatch when compared with the core sequence of the *tor-RE*, TGCTCAATGAA (Liw et al., 1995; Löhr et al., 2009). We assayed the ability of human and *Drosophila* Cic to bind to TGAATGAA and TCAATGAA sequences in gel-shift assays and observed similar interactions with both sites, indicating that T(G/C)AATGAA motifs are recognized by *Drosophila* Cic in vitro (see Fig. S2 in the supplementary material). We have also analyzed the role of Cic in repression of *tll* via the *tor-RE*. Using transgenes that contain *tll* enhancer sequences (Liw et al., 1995), we provide evidence that Cic represses *tll* by binding to the *tor-RE*, and that this repression is inhibited by Torso signaling at the posterior pole (see Fig. S3 in the supplementary material).

We then searched for T(G/C)AATGAA motifs in the *hkb* upstream region and identified several TGAATGAA elements that are well conserved among *Drosophila* species (Fig. 1A; data not shown). Two such conserved sites are included in the *hkb* enhancer region identified by Häder et al. (Häder et al., 2000). To test whether Cic represses *hkb* through these motifs, we first defined a minimal *hkb* enhancer fragment that accurately reproduces the endogenous *hkb* pattern (Fig. 1A; data not shown). This 0.4 kb enhancer (designated *hkb^{0.4}*) directs highly restricted expression at both poles of the embryo (Fig. 1B). This pattern depends on Cic repression because it expands in *cic¹* embryos lacking maternal *cic* function (Fig. 1C) (Jiménez et al., 2000). Conversely, *cic^{ΔC2}* embryos expressing a Cic derivative insensitive to Torso-mediated downregulation (Astigarraga et al., 2007) show diminished *hkb^{0.4}-lacZ* expression at both poles (Fig. 1D). Mutagenesis of the two

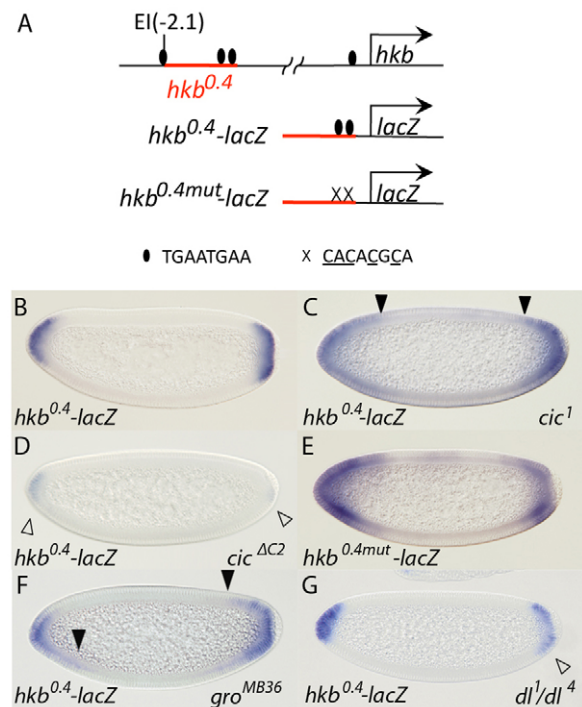


Fig. 1. Torso signaling regulates *hkb* expression via TGAATGAA repressor elements. (A) The *hkb* locus depicting the *hkb^{0.4}* enhancer (red line). EI, EcoRI restriction site located 2.1 kb upstream of the transcription start site. The structure of *lacZ* reporters is shown below. (B-G) mRNA expression patterns of *hkb^{0.4}-lacZ* (B-D,F,G) and *hkb^{0.4mut}-lacZ* (E) in otherwise wild-type (B,E), *cic¹* (C), *cic^{ΔC2}* (D), *gro^{MB36}* (F) and *dl¹/dl⁴* (G) embryos. Closed arrowheads in C and F indicate derepressed *hkb^{0.4}-lacZ* expression in *cic¹* and *gro^{MB36}* embryos. Open arrowheads in D and G indicate reduced *hkb^{0.4}-lacZ* expression in *cic^{ΔC2}* and *dl¹/dl⁴* embryos.

TGAATGAA sites in *hkb^{0.4}-lacZ* causes expanded reporter expression that resembles the pattern of *hkb^{0.4}-lacZ* in *cic¹* embryos (Fig. 1E). We conclude that regulation of *hkb* expression requires direct binding of Cic to conserved TGAATGAA cis-acting octamers.

For comparison, we also analyzed *hkb^{0.4}-lacZ* expression in embryos devoid of maternal Gro function. Gro activity is essential for restricting *tll* and *hkb* expression to the embryonic poles, although the mechanism of Gro action in this context remains uncertain (Paroush et al., 1997; Jiménez et al., 2000; Häder et al., 2000; Cinnamon et al., 2008) (see below). As shown in Fig. 1F, there is significant *hkb^{0.4}-lacZ* derepression in *gro^{MB36}* mutant embryos, similar to the effect seen in *cic¹* embryos. Thus, both Cic and Gro play similar roles in repressing the *hkb^{0.4}* enhancer. By contrast, embryos lacking Dorsal activity, another maternal regulator which functions as both an activator and repressor and is implicated in *hkb* regulation (Häder et al., 2000; Hong et al., 2008), displayed reduced *hkb^{0.4}-lacZ* expression at the posterior pole (Fig. 1G), indicating that Dorsal is required for activating *hkb* expression in posterior regions (see below).

Cic repressor sites are sufficient to mediate Torso-dependent regulation

Although binding of Cic to *hkb^{0.4}* is essential for repressing this enhancer, the response to Torso regulation might involve additional factors bound to the enhancer. To address this issue, we asked

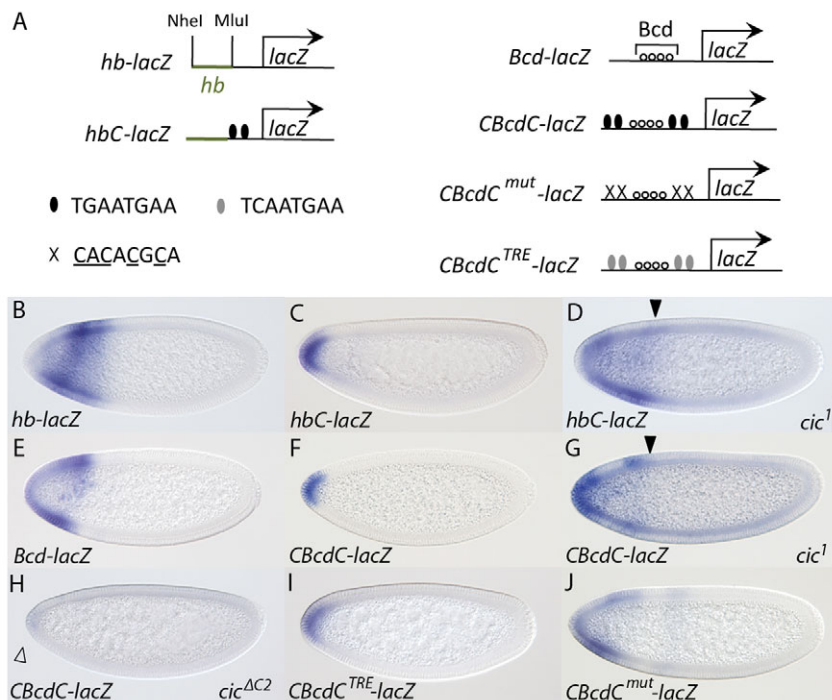


Fig. 2. Cic-binding motifs confer Torso-dependent regulation to synthetic enhancers.

(A) Diagram of *lacZ* reporters containing Bcd-activating sequences and T(G/C)AATGAA sites. The 270 bp *hb* enhancer (delimited by *NheI* and *MluI* restriction sites) is indicated in green. (B–J) mRNA expression patterns of *hb-lacZ* (B), *hbC-lacZ* (C,D), *Bcd-lacZ* (E), *CBcdC-lacZ* (F–H), *CBcdC^{TRE}-lacZ* (I) and *CBcdC^{mut}-lacZ* (J) in otherwise wild-type (B,C,E,F,I,J), *cic*¹ (D,G) and *cic*^{ΔC2} (H) embryos. Closed arrowheads in D and G indicate expanded *hbC-lacZ* and *CBcdC-lacZ* expression in *cic*¹ embryos. The open arrowhead in H indicates residual *CBcdC-lacZ* expression at the anterior pole.

whether Cic octamers are sufficient for Torso-dependent regulation of synthetic enhancers. We first tested whether Cic-binding sites (TGAATGAA) linked to a heterologous enhancer would make it responsive to Torso regulation. We selected a 270 bp promoter fragment from the *hunchback* (*hb*) gene, which normally drives intense staining in the anterior third of the embryo (construct *hb-lacZ*; Fig. 2A,B) (Struhl et al., 1989). Linking the same fragment to a single pair of Cic-binding motifs (construct *hbC-lacZ*) caused restricted expression from ~91 to 100% embryo length (EL; 0% being the posterior tip of the embryo; Fig. 2C). This pattern resembles the anterior domain of *hkb* expression and precisely corresponds to the area of Cic downregulation by the Torso pathway (Jiménez et al., 2000; Kim et al., 2010). Furthermore, this pattern depends on Cic because it expands posteriorly in *cic*¹ embryos (Fig. 2D). Thus, the addition of Cic repressor sites confers Torso-dependent expression to the *hb* enhancer.

The *hb* enhancer is activated by the anteriorly expressed Bicoid (Bcd) factor (Struhl et al., 1989; Driever and Nüsslein-Volhard, 1989). Therefore, we tested whether a simple combination of Bcd and Cic sites would also respond to Torso regulation. A construct containing four multimerized Bcd sites drive anterior expression from ~73 to 100% EL (construct *Bcd-lacZ*; Fig. 2A,E). By contrast, a transgene in which the Bcd sites are flanked by two Cic sites on either side is expressed in a restricted pattern from 92 to 100% EL (construct *CBcdC-lacZ*; Fig. 2A,F). In *cic*¹ embryos, *CBcdC-lacZ* expression expands posteriorly up to ~74% EL (Fig. 2G), whereas it almost disappears in *cic*^{ΔC2} embryos (Fig. 2H). A similar construct containing TCAATGAA sites corresponding to the *torRE* (*CBcdC^{TRE}-lacZ*) also showed highly restricted expression in the Torso signaling domain (Fig. 2I). Finally, mutation of the four Cic sites to CACACGCA caused derepressed reporter expression similar to the *Bcd-lacZ* pattern (construct *CBcdC^{mut}-lacZ*; Fig. 2J). These results indicate that Cic repressor sites combined with Bcd activator sequences are sufficient to provide a direct highly localized readout of Torso signaling activity at the anterior pole.

Cic-binding motifs are required for recruitment of Gro to the *hkb* enhancer

Because the Gro co-repressor does not bind DNA, it is believed to be recruited to terminal enhancers by one or more DNA-bound repressors (Paroush et al., 1997; Häder et al., 2000; Jiménez et al., 2000; Cinnamon et al., 2008; Jennings and Ish-Horowitz, 2008). We and others have proposed different mechanisms by which Gro could interact with terminal repressors such as Dorsal, Retn or Cic to silence *tll* and *hkb* expression (Häder et al., 2000; Jiménez et al., 2000). Given that *hkb*^{0.4}-*lacZ* expression depends on both Gro activity and intact Cic regulatory sites (Fig. 1), we analyzed whether such sites are required for recruitment of Gro to the *hkb*^{0.4} enhancer. To this end, we first monitored association of Gro to the *hkb*^{0.4}-*lacZ* transgene by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using anti-Gro antibodies and qPCR. These experiments were performed using staged embryo collections (90–180 minutes after egg laying) carrying two copies of *hkb*^{0.4}-*lacZ*. We designed a set of amplicons that span the *hkb*^{0.4} enhancer and the flanking sequences present in the reporter construct (Fig. 3A). Some of these amplicons (A, B, G, H and I) are specific for the reporter and do not amplify endogenous genomic sequences, whereas amplicons C–F potentially amplify both the homozygous transgenic and endogenous *hkb*^{0.4} enhancers. As shown in Fig. 3B, we found association of Gro with most of the intact *hkb*^{0.4} enhancer (blue bars for amplicons C–F), but not with regions flanking the enhancer (amplicons A, B, G and I), although a small peak is observed at the transcriptional start site (amplicon H). Interestingly, within the enhancer, Gro levels were somewhat higher upstream of the Cic sites (amplicons D and E). This upstream region includes binding sites for Dorsal and Retn (Fig. 3A), two factors that have been implicated in *hkb* regulation and are known to bind Gro directly (Dubnicoff et al., 1997; Valentine et al., 1998; Häder et al., 2000).

We then used the same approach to assay binding of Gro to the *hkb*^{0.4mut} enhancer containing mutant Cic sites. In this case, Gro was detected at significantly lower levels compared with the wild-

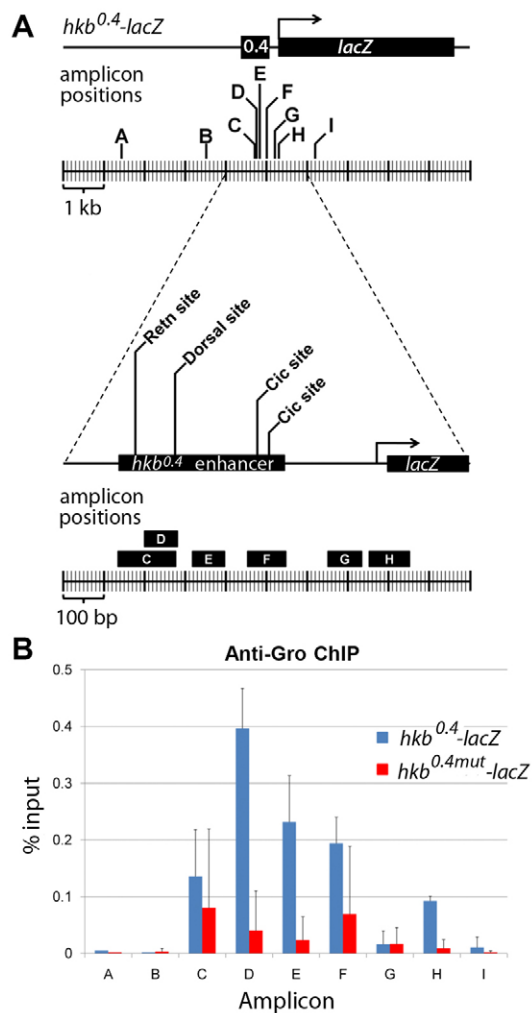


Fig. 3. Association of Gro with the *hkb^{0.4}* enhancer requires intact Cic regulatory sites. (A) The *hkb^{0.4}-lacZ* transgene contains the 0.4 kb *hkb* enhancer, which includes two Cic-binding sites, a Dorsal-binding site and a Retn-binding site upstream of the *lacZ* reporter. The positions of amplicons A-I are shown relative to *hkb^{0.4}-lacZ*. **(B)** Crosslinked chromatin was isolated from embryos carrying the *hkb^{0.4}-lacZ* (blue bars) or the *hkb^{0.4mut}-lacZ* (red bars) transgenes. Anti-Gro ChIP was assayed by qPCR using amplicons A-I. Each bar represents the average (\pm s.d.) of three to five independent biological replicates. Background levels resulting from pre-immune ChIP controls were subtracted out of all signals.

type enhancer (red bars in Fig. 3B). This decrease is observed throughout the enhancer, including the region upstream of the mutant Cic sites. Averaging across the four amplicons within the enhancer, we find that mutagenesis of the Cic sites reduces Gro association with the enhancer by 4.5-fold ($P < 0.01$). As amplicons C-F should detect signals derived from both transgenic and endogenous enhancers, the larger than twofold decrease observed for the mutant sample suggest a higher efficiency of Gro immunoprecipitation from transgenic versus endogenous *hkb^{0.4}* sequences, perhaps owing to a more open conformation of the transgene. Similar data were obtained using two different anti-Gro antibodies (data not shown). Taken together, these results indicate that binding of Cic to specific sites in *hkb^{0.4}* is essential for recruitment of Gro to this enhancer.

Cic represses *ind* expression downstream of EGFR signaling

We searched for potential Cic-binding sites in genes that might be targets of other RTK signaling pathways. One gene identified in these analyses, *ind*, functions as a target of the EGFR RTK pathway in the neuroectodermal region of the embryo (Skeath, 1998; Weiss et al., 1998; von Ohlen and Doe, 2000; Hong et al., 2008). *ind* expression begins at mid stage 5, forming sharp four- or five-cell wide longitudinal stripes on either side of the embryo (Weiss et al., 1998) (Fig. 4C). This pattern requires activator inputs from the Dorsal morphogen, as well as from the EGFR pathway, which is active in lateral domains overlapping the *ind* stripes (Skeath, 1998; von Ohlen and Doe, 2000; Hong et al., 2008) (Fig. 4B,D). The *ind* stripes are limited ventrally by the Ventral neuroblasts defective (*Vnd*) repressor expressed in the ventral neuroectoderm, and dorsally by the dorsal limit of the EGFR signaling domain (Weiss et al., 1998; von Ohlen and Doe, 2000). Previous analyses of *ind* regulation have identified a repressor element (the *A-box* motif) that controls the dorsal limit of *ind* expression through an unknown factor (Stathopoulos and Levine, 2005). We noted that the *A-box* sequence (WTTTCATTCA) matches the complementary sequence of the Cic-binding motif. This, together with the requirement of EGFR signaling for *ind* expression, prompted us to study the role of Cic in *ind* regulation.

We reasoned that activation of *ind* expression by the EGFR pathway could involve downregulation of Cic protein in the lateral ectoderm. Indeed, EGFR activity in the neuroectoderm (as visualized by immunostaining against double-phosphorylated Erk/MAPK) precisely correlates with a sharp decline in Cic protein levels in this region (Fig. 4B). This suggests that EGFR signaling controls the dorsal limit of *ind* expression by defining a corresponding limit of Cic downregulation. We then monitored *ind* expression in *cic¹* embryos and observed altered *ind* stripes that appeared both dorsally expanded at the anterior and retracted from the posterior (Fig. 4E). In embryos derived from *cic¹/cic²* females, which contain even lower Cic activity (Roch et al., 2002), the *ind* stripes are shorter and further expanded towards the dorsal side, resulting in eight- to 10-cell wide staining at late stage 5 (Fig. 4F). Thus, Cic has two effects on *ind* expression: it defines the dorsal limit of the *ind* stripes and maintains their expression in the abdominal region. The latter effect is reminiscent of the indirect positive role of Cic on *kni* and *Kr* expression (see Fig. S1 in the supplementary material), and it could thus reflect repression of *ind* by the terminal gap genes extending from the posterior pole in the absence of Cic. Consistent with this idea, we fail to detect *ind* expression in *torso⁴⁰²¹* gain-of-function mutant embryos where the terminal gap genes are severely derepressed (Fig. 4G) (Klinger et al., 1988; Brönnner and Jäckle, 1991).

To test whether Cic represses *ind* through *A-box* elements, we generated a *lacZ* reporter driven by a 0.5 kb *ind* enhancer fragment encompassing two *A-box* motifs and a Dorsal-binding site (Fig. 4A) (Stathopoulos and Levine, 2005). This reporter (*ind^{0.5}-lacZ*) forms weak, discontinuous lateral stripes of expression in late blastoderm embryos (Fig. 4H). As in the case of endogenous *ind* stripes, the *ind^{0.5}-lacZ* stripes are abolished in embryos lacking EGFR/Ras signaling activity (derived from females carrying *Ras^{ΔC40b}* germ-line clones; Fig. 4D,I). In *cic¹* embryos, the *ind^{0.5}-lacZ* stripes are more uniform and expand by three to five cell diameters dorsally (Fig. 4J), whereas *cic¹/cic²* embryos show ectopic expression almost up to the dorsal midline (Fig. 4K). Additionally, this expanded *ind^{0.5}-lacZ* expression persists in embryos derived from *Ras^{ΔC40b} cic^{Q474X}* double mutant germline

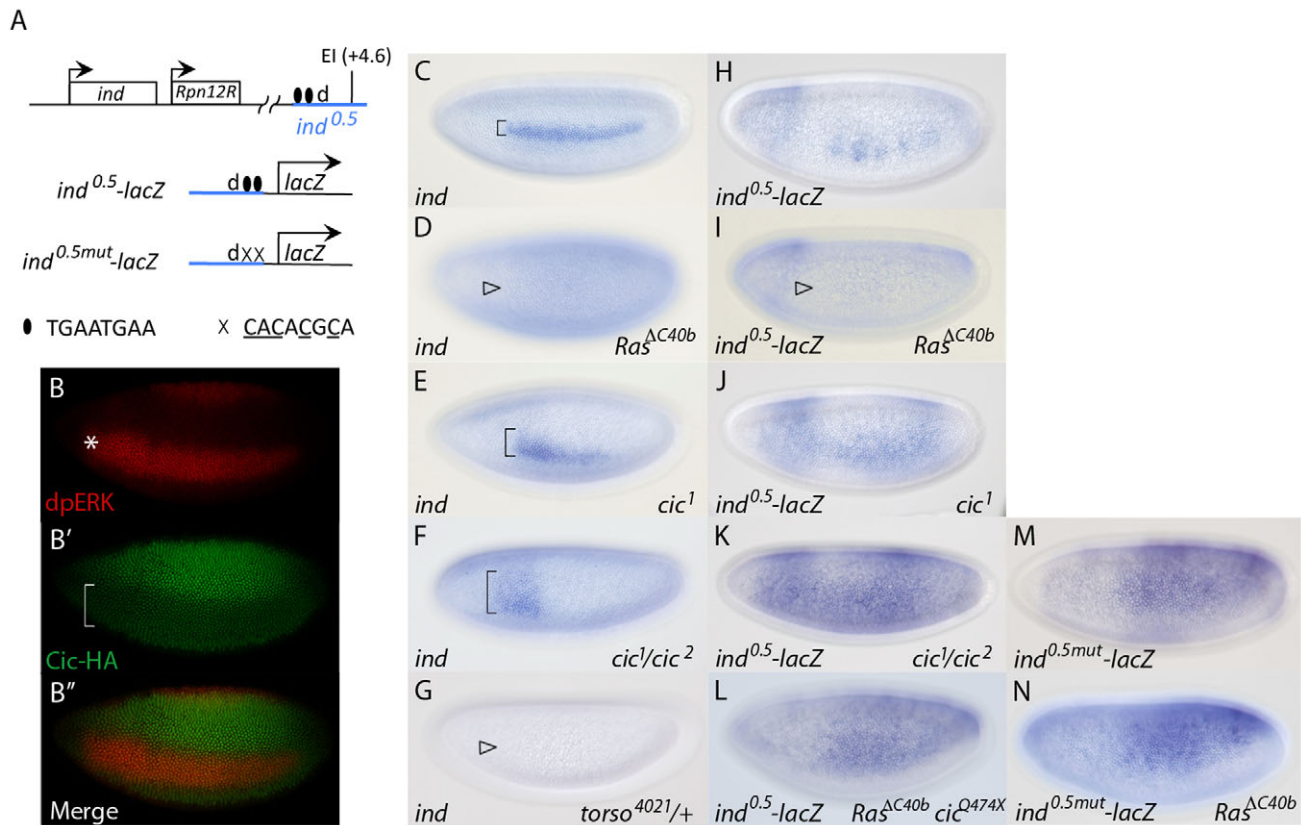


Fig. 4. EGFR induces *ind* expression by relieving Cic repression. (A) The *ind* locus showing the neighboring *Rpn12R* gene (predicted to encode a component of the proteasome) and the *ind^{0.5}* enhancer present in the 3'-flanking region (blue line). EI, EcoRI site present 4.6 kb downstream of the *ind* transcription start site. d, Dorsal-binding site (GGGAAATTC). *lacZ* reporters driven by *ind^{0.5}* enhancer sequences are also shown. (B-B'') Stage 5 *cic-HA*; *cic¹* embryo stained with anti-dpERK (red, B) and anti-HA (green, B') antibodies; the merged image is shown in B''. EGFR activation in the lateral neuroectoderm (asterisk in B) produces a corresponding downregulation of Cic levels in ventrolateral regions (bracket in B'). (C-N) *ind* (C-G), *ind^{0.5}-lacZ* (H-L) and *ind^{0.5mut}-lacZ* (M,N) mRNA expression patterns in wild-type (C,H,M), *Ras^{ΔC40b}* (D,I,N), *cic¹* (E,J), *cic¹/cic²* (F,K), *Ras^{ΔC40b} cic^{Q474X}* (L) and *torso^{4021/+}* (G) embryos. All images are lateral surface views of mid- to late-stage 5 embryos. Brackets in C,E,F indicate the maximal width of *ind* stripes. Open arrowheads in D,G,I indicate loss of *ind* and *ind^{0.5}-lacZ* expression in *Ras^{ΔC40b}* and *torso^{4021/+}* backgrounds.

clones (Fig. 4L), implying that EGFR/Ras signaling normally induces *ind^{0.5}-lacZ* expression by downregulating Cic. Finally, mutation of the two *A-box* motifs in *ind^{0.5}* caused derepression throughout lateral and dorsal regions of the embryo (Fig. 4M), and this pattern was unaffected in embryos lacking EGFR/Ras activity (Fig. 4N), consistent with removal of Cic being sufficient for EGFR-dependent induction of the *ind^{0.5}* enhancer. Together, these results indicate that the *A-box* motifs in *ind* are binding sites for Cic protein that respond to EGFR regulation via Cic derepression.

Cic octamers mediate EGFR-dependent regulation during wing development

Previous analyses showed that Cic behaves as a repressor of *argos* expression in the wing imaginal disc (Roch et al., 2002). *argos* is an EGFR signaling target that encodes a feedback inhibitor of this pathway (Freeman et al., 1992; Golembo et al., 1996). During wing development, EGFR activity defines the position of wing veins and leads to downregulation of Cic in presumptive vein cells, particularly in two rows of cells running along the future wing margin and in prospective veins L3, L4 and L5 (Fig. 5A) (Roch et al., 2002). This pattern of Cic downregulation is markedly complementary to the expression of *argos*, as visualized with the *argos^{w11}* enhancer trap reporter (compare Fig. 5A with 5B) (Gabay

et al., 1997). Reduced Cic function in *cic²/cic¹etE11* discs causes *argos^{w11}* derepression in intervein cells at levels similar to those of endogenous wing margin and L5 stripes (Fig. 5C; see also Fig. S4 in the supplementary material) (Roch et al., 2002). This ectopic expression is weaker than in stripes L3 and L4, suggesting that these stripes are subject, at least in part, to Cic-independent regulation, an idea supported by the relatively normal development of the L3-L4 intervein region in *cic* mutant adults (Fig. S4 in the supplementary material). We also analyzed *argos^{w11}* expression in discs lacking both Cic and EGFR signaling activities, using the *cic²/cic¹etE11* background in combination with *rhomboid* (*rho*) and *vein* (*vn*) alleles that eliminate EGFR signaling in the wing disc (Martín-Blanco et al., 1999). This caused generalized *argos^{w11}* expression throughout the wing pouch without enhancement in stripes L3 and L4 (Fig. 5D), suggesting that EGFR signaling induces *argos^{w11}* expression in prospective veins by relieving Cic repression, and that an additional EGFR-dependent input reinforces this expression in stripes L3 and L4.

To investigate whether Cic represses *argos* directly through Cic octameric sites, we first identified several conserved TGAATG(G/A)A motifs within the first intron of *argos* (Fig. 5E; data not shown). Next, we selected a 1.0 kb intron fragment containing five such sites (four TGAATGAA and one

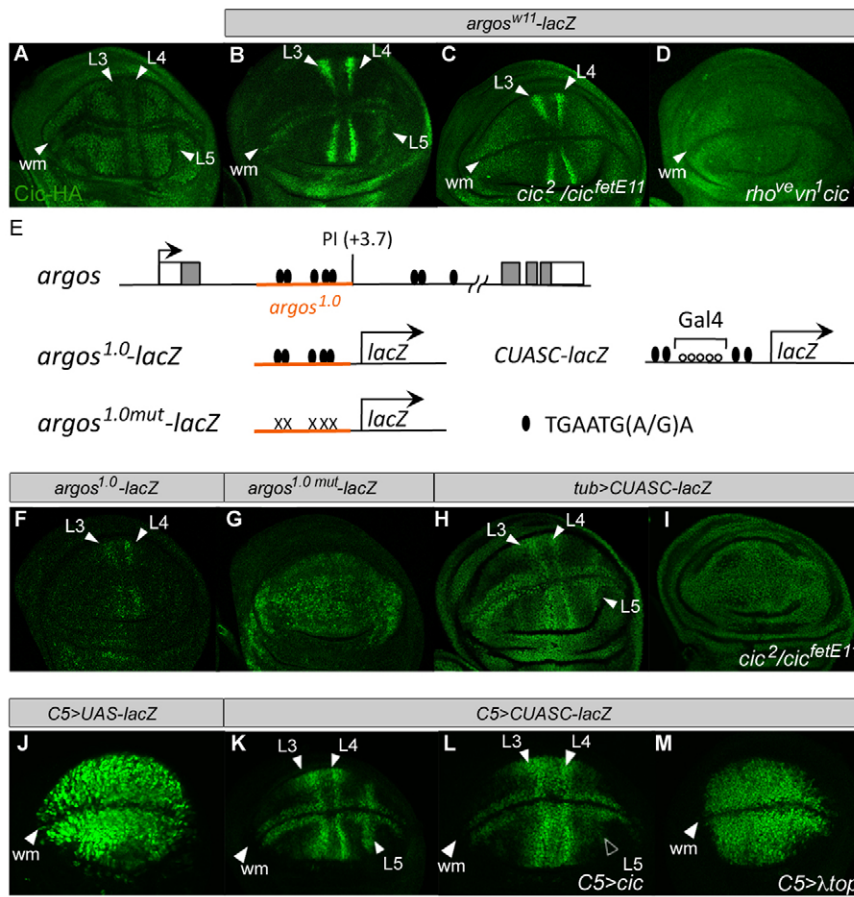


Fig. 5. EGFR signaling regulates *argos* expression through Cic octamers. (A) Staining of *cic-HA* third instar wing disc using anti-HA antibody; arrowheads indicate the stripes of Cic downregulation in response to EGFR signaling. (B-D) Anti- β -Gal staining of *argos*^{w11} expression in otherwise wild-type (B), *cic*²/*cic*^{fetE11} (C) and *rho*^{ve} *vn*¹ *cic*²/*rho*^{ve} *vn*¹ *cic*^{fetE11} (D) wing discs. (E) Diagram of the *argos* locus indicating the *argos*^{1.0} enhancer (orange); exons are depicted by boxes and coding sequences are shown in gray. PI, *Pst*I site present 3.7 kb downstream of the transcription start site. The structure of *lacZ* reporters is shown below. (F,G) β -Gal expression patterns of *argos*^{1.0}-*lacZ* (F) and *argos*^{1.0mut}-*lacZ* (G) reporters in wing discs. (H,I) Anti- β -Gal staining of *tubulin-Gal4/CUASC-lacZ* imaginal discs from otherwise wild-type (H) or *cic*²/*cic*^{fetE11} (I) larvae. (J) β -Gal expression in *UAS-lacZ/+; C5-Gal4/+* imaginal disc. (K-M) β -Gal expression patterns resulting from *C5-Gal4*-directed activation of *CUASC-lacZ* in imaginal discs from otherwise wild-type (K), *UAS-cic* (L) or *UAS- λ top* (M) larvae. β -Gal expression is lost in prospective L5 vein cells after Cic overexpression (open arrowhead in L).

TGAATGGA motifs) and other conserved sequences. When placed upstream of a *lacZ* reporter, this fragment (designated *argos*^{1.0}) directs restricted expression in presumptive veins L3 and L4 (Fig. 5E,F), indicating that it mediates partial aspects of *argos* regulation. By contrast, the same fragment carrying mutated Cic sites drives widespread expression in the wing pouch and peripheral regions of the disc (Fig. 5E,G; data not shown). Thus, conserved Cic-binding sites in *argos* restrict its expression to prospective wing vein cells of the disc.

To test whether Cic-binding sites are sufficient to mediate EGFR-dependent regulation in the wing, we assayed an artificial enhancer containing five GAL4-binding sites flanked on either side by two tandem TGAATGAA motifs (construct *CUASC-lacZ*; Fig. 5E). Indeed, inducing ubiquitous GAL4 expression under the control of the *tubulin* or *hsp-70* promoters leads to localized activation of the *CUASC* enhancer in prospective veins (Fig. 5H and data not shown). This restricted pattern depends on Cic, as it becomes significantly derepressed in *cic* mutant discs (Fig. 5I). We also monitored *CUASC-lacZ* expression driven by the *C5-GAL4* line, which is active in the presumptive wing pouch (Fig. 5J) (Yeh et al., 1995). As shown in Fig. 5K, *C5-GAL4* activates *CUASC-lacZ* expression only in presumptive vein cells of the wing pouch. Co-expression of *CUASC-lacZ* and Cic [using an *UAS-cic* construct (Lam et al., 2006)] with the same driver resulted in loss of *lacZ* expression in presumptive vein L5 (Fig. 5L), which correlated with loss of vein L5 in adult wings (Fig. S4 in the supplementary material). Conversely, co-expressing *CUASC-lacZ* together with *UAS- λ top*, which encodes a constitutively active form of EGFR (Queenan et al., 1997), caused severe *lacZ*

derepression throughout the presumptive wing pouch (Fig. 5M; see also Fig. S4 in the supplementary material). This pattern recapitulates *C5-GAL4*-mediated activation of the standard *UAS* enhancer lacking Cic sites (Fig. 5J), and is therefore consistent with generalized downregulation of Cic in the *C5-GAL4>UAS- λ top* background. Thus, our results indicate that EGFR signaling controls *argos* expression through octameric Cic sites, and that such sites are sufficient to define a complex pattern of EGFR-mediated activation in the developing wing.

DISCUSSION

RTK signaling pathways play key functions in metazoan development, but the molecular mechanisms underlying RTK-initiated responses are not well understood. Until recently, it was generally assumed that Pointed and Yan were the only nuclear effectors of all RTK pathways in the fly [see, for example, Simon (Simon, 2000)]. However, several studies have identified the Cic repressor as an important sensor of some of these pathways (Jiménez et al., 2000; Goff et al., 2001; Astigarraga et al., 2007; Tseng et al., 2007). Here, we have shown that Cic regulatory functions downstream of Torso and EGFR signals depend on common TGAATGAA DNA octamers and that, at least in certain assays, these octamers are sufficient to induce localized RTK responses in vivo.

Our results show that regulation of *hkb* expression in response to Torso signaling crucially depends on conserved TGAATGAA elements recognized by Cic (Fig. 1). We also find that these elements combined with Bcd activator sequences are sufficient to establish localized reporter expression in the anterior pole of the

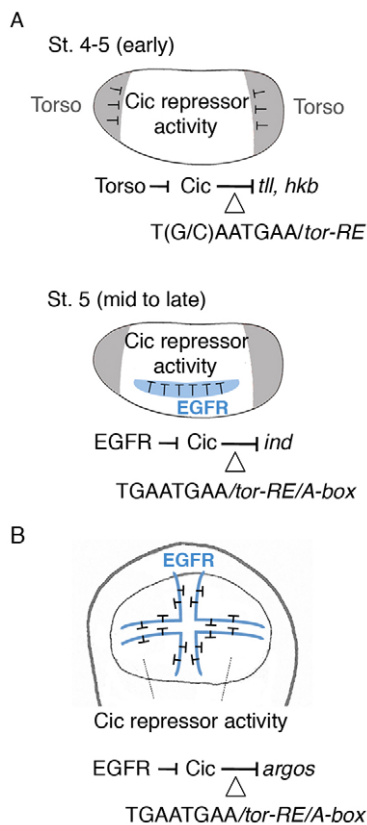


Fig. 6. Cic regulatory elements mediate Torso and EGFR responses.

(A) Sequential activation of the Torso (gray) and EGFR (blue) RTK pathways downregulates Cic along the AP and DV embryonic axes. Both pathways relieve Cic repression mediated by common cis-regulatory elements. Developmental stages (St.) are indicated. **(B)** EGFR signaling (blue) induces *argos* expression via Cic sites; activation of the pathway in vein cells leads to downregulation of Cic repressor activity, thereby derepressing *argos* transcription.

embryo (Fig. 2). It thus appears that binding of Cic to specific sites in *hkb* is the key step for delimiting *hkb* expression in response to Torso activation. Therefore, although we cannot rule out that other (possibly redundant) Torso-dependent factors contribute to *hkb* regulation, we propose that this regulation largely depends on broadly distributed activators such as Bcd, Dorsal and Lilliputian (Reuter and Leptin, 1994; Häder et al., 2000; Tang et al., 2001) (Fig. 1G), and localized Cic repression.

We also find that association of Gro to the *hkb* enhancer requires the presence of intact Cic octamers in the enhancer. How does this association occur? Although Cic and Gro proteins interact in vitro, we have not yet demonstrated a direct correlation between such binding and Cic repressor activity in vivo (Jiménez et al., 2000; Astigarraga et al., 2007) (C.N. and G.J., unpublished). Our finding that Gro associates with sequences containing Dorsal and Retn sites is consistent with a role of these factors in recruiting Gro to the *hkb* enhancer, possibly through cooperative interactions with Cic. However, mutations in *dorsal* or *retn* do not cause clear derepression of *hkb^{0.4-lacZ}* or *hkb* expression (Fig. 1G) (Häder et al., 2000). It is also possible that local recruitment of Gro by Cic results in subsequent spreading of the co-repressor along the entire *hkb^{0.4}* enhancer, a mechanism that may involve oligomerization of Gro and binding to hypoacetylated histones (Courey and Jia, 2001; Song et al., 2004; Martinez and Arnosti, 2008).

Our results indicate that patterning of the dorsal-ventral (DV) embryonic axis requires a mechanism of EGFR-mediated derepression that is similar to the role of Torso signaling in the anterior-posterior (AP) terminal system. In both cases, a local source of RTK activation downregulates the Cic repressor, thus inducing expression of Cic targets in restricted patterns (Fig. 6A). During DV patterning, the Dorsal morphogen activates the expression of several targets in ventral and lateral regions of the embryo, and it is believed that decreasing amounts of Dorsal protein help establish the dorsal limits of those expression domains. However, Dorsal nuclear levels appear rather uniform across the *ind* expression domain (Kanodia et al., 2009; Liberman et al., 2009), indicating that other mechanisms define the dorsal limit of *ind* expression. Indeed, previous studies have shown that EGFR signaling plays a key role in setting this border (Weiss et al., 1998; von Ohlen and Doe, 2000), and suggested the existence of unknown repressors restricting *ind* expression in dorsal regions (Stathopoulos and Levine, 2005). Our results indicate that these two events are linked through a mechanism of EGFR-mediated downregulation of Cic repressor activity.

During wing vein specification, there is a precise correlation between EGFR/MAPK signaling, Cic downregulation and *argos* transcription in prospective wing vein cells (Fig. 5A,B) (Gabay et al., 1997). Furthermore, our data show that Cic represses *argos* directly (Fig. 5E-G), and that Cic octamers alone are sufficient to interpret the EGFR activation signal to produce an *argos*-like response (Fig. 5H-M, Fig. 6B). However, the *CUASC-lacZ* reporter does not recapitulate all aspects of *argos* transcription, because only endogenous *argos* shows elevated expression in presumptive veins L3 and L4. This difference probably depends on localized determinants that regulate gene expression in the L3-L4 region (Blair, 2007), and do not affect *CUASC-lacZ*. Still, *argos* regulation during wing development appears largely dependent on EGFR-mediated downregulation of Cic as well as on positive input(s) by localized or ubiquitous activators, which may include the Osa/Eyelid factor (Terriente-Félix and de Celis, 2009). In addition, both loss- and gain-of-function experiments show strong correlation between Cic-dependent activity through TGAATGAA elements and differentiation of wing veins in the adult (Fig. 5 and see Fig. S4 in the supplementary material) (Goff et al., 2001; Roch et al., 2002), suggesting that Cic is an important sensor of EGFR signaling in this system. Cic probably controls additional EGFR targets involved in wing vein specification and other EGFR-regulated processes such as cell proliferation in imaginal discs (Tseng et al., 2007). Future studies will probably reveal new roles of Cic and its binding sites downstream of RTK signaling cascades.

In summary, Cic regulates multiple RTK signaling responses by binding to conserved octameric sites in target enhancers, indicating that conservation between these RTK pathways extends to specific response elements in cis-regulatory regions. Notably, these octamers are sufficient to translate RTK signaling inputs into localized transcriptional responses in different tissues: RTK signals produce complementary gradients (Torso) or boundaries (EGFR) of Cic downregulation that are then translated into complementary patterns of target gene expression through relief of Cic repression. This mechanism represents a particular case of ‘default repression’, a general strategy of developmental control whereby target genes induced by signaling pathways are maintained repressed in the absence of signaling (Barolo and Posakony, 2002). For example, a similar derepression switch occurs during TGF- β /Dpp-mediated induction of *optomotor-blind* transcription via relief of Brinker repression (Sivasankaran et al., 2000; Barolo and Posakony, 2002).

Finally, the human Cic protein binds octameric sequences related to those characterized here (Kawamura-Saito et al., 2006). The best-characterized targets of Cic in human cells are ETS genes of the *pea3* family (Kawamura-Saito et al., 2006), which are known to respond to FGF RTK activation in different vertebrate systems (e.g. Roehl and Nüsslein-Volhard, 2001; Raible and Brand, 2001). Therefore, it will be interesting to ascertain whether Cic octamers also mediate RTK responses in those systems.

Acknowledgements

We thank A. Olza for assistance with *Drosophila* injections, L. Bardia for support with confocal analyses, I. Becam, J. Bernués, M. Martínez-Balbás, M. Mannervik, M. Milán, F. Roch and S. Shvartsman for scientific advice, and J. Botas, J. Casanova, M. Grillo, I. Hariharan, B. Jennings, T. Nakamura, S. Hanes, T. Schüpbach, F. Serras and the Bloomington *Drosophila* Research Center for reagents and fly stocks. This work was funded by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2005-02673 and BFU2008-01875/BMC to G.J.), the Generalitat de Catalunya (2009SGR-1075 to G.J.), the National Institutes of Health (GM44522 to A.J.C.), the Israel Science Foundation (Center of Excellence 180/09 to Z.P.) and the Król Charitable Foundation (to Z.P.). G.J. is an ICREA Investigator. Deposited in PMC for release after 12 months.

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Supplementary material

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.057729/-/DC1>

References

- Astigarraga, S., Grossman, R., Diaz-Delfin, J., Caelles, C., Paroush, Z. and Jiménez, G. (2007). A MAPK docking site is critical for downregulation of Capicua by Torso and EGFR RTK signaling. *EMBO J.* **26**, 668-677.
- Barolo, S. and Posakony, J. W. (2002). Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Genes Dev.* **16**, 1167-1181.
- Blair, S. S. (2007). Wing vein patterning in *Drosophila* and the analysis of intercellular signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 293-319.
- Brönner, G. and Jäckle, H. (1991). Control and function of terminal gap gene activity in the posterior pole region of the *Drosophila* embryo. *Mech. Dev.* **35**, 205-211.
- Chen, Y. J., Chiang, C. S., Weng, L. C., Lengyel, J. A. and Liaw, G. J. (2002). Tramtrack69 is required for the early repression of *tailless* expression. *Mech. Dev.* **116**, 75-83.
- Chou, T. B., Noll, E. and Perrimon, N. (1993). Autosomal [povoD1] dominant female-sterile insertions in *Drosophila* and their use in generating germ-line chimeras. *Development* **119**, 1359-1369.
- Cinnamon, E. and Paroush, Z. (2008). Context-dependent regulation of Groucho/TLE-mediated repression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 435-440.
- Cinnamon, E., Helman, A., Ben-Haroush Schyr, R., Orian, A., Jiménez, G. and Paroush, Z. (2008). Multiple RTK pathways downregulate Groucho-mediated repression in *Drosophila* embryogenesis. *Development* **135**, 829-837.
- Courey, A. J. and Jia, S. (2001). Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev.* **15**, 2786-2796.
- Diaz-Benjumea, F. J. and García-Bellido, A. (1990). Genetic analysis of the wing vein pattern of *Drosophila*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**, 336-354.
- Driever, W. and Nüsslein-Volhard, C. (1989). The bicoid protein is a positive regulator of *hunchback* transcription in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **337**, 138-143.
- Dubnicoff, T., Valentine, S. A., Chen, G., Shi, T., Lengyel, J. A., Paroush, Z. and Courey, A. J. (1997). Conversion of Dorsal from an activator to a repressor by the global corepressor Groucho. *Genes Dev.* **11**, 2952-2957.
- Freeman, M., Klambt, C., Goodman, C. S. and Rubin, G. M. (1992). The *argos* gene encodes a diffusible factor that regulates cell fate decisions in the *Drosophila* eye. *Cell* **69**, 963-975.
- Furriols, M. and Casanova, J. (2003). In and out of Torso RTK signalling. *EMBO J.* **22**, 1947-1952.
- Gabay, L., Seger, R. and Shilo, B. Z. (1997). In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development. *Science* **277**, 1103-1106.
- Goff, D. J., Nilson, L. A. and Morisato, D. (2001). Establishment of dorsal-ventral polarity of the *Drosophila* egg requires *capicua* action in ovarian follicle cells. *Development* **128**, 4553-4562.
- Golembo, M., Schweitzer, R., Freeman, M. and Shilo, B. Z. (1996). *argos* transcription is induced by the *Drosophila* EGF receptor pathway to form an inhibitory feedback loop. *Development* **122**, 223-230.
- Häder, T., Wainwright, D., Shandala, T., Saint, R., Taubert, H., Brönner, G. and Jäckle, H. (2000). Receptor tyrosine kinase signaling regulates different modes of Groucho-dependent control of Dorsal. *Curr. Biol.* **10**, 51-54.
- Hanes, S. D., Riddihough, G., Ish-Horowitz, D. and Brent, R. (1994). Specific DNA recognition and intersite spacing are critical for action of the Bicoid morphogen. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3364-3375.
- Hasson, P., Egoz, N., Winkler, C., Volohonsky, G., Jia, S., Dinur, T., Volk, T., Courey, A. J. and Paroush, Z. (2005). EGFR signaling attenuates Groucho-dependent repression to antagonize Notch transcriptional output. *Nat. Genet.* **37**, 101-105.
- Hong, J. W., Hendrix, D. A., Papatsenko, D. and Levine, M. S. (2008). How the Dorsal gradient works: insights from postgenome technologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20072-20076.
- Jennings, B. H. and Ish-Horowitz, D. (2008). The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors. *Genome Biol.* **9**, 205.
- Jennings, B. H., Wainwright, S. M. and Ish-Horowitz, D. (2008). Differential in vivo requirements for oligomerization during Groucho-mediated repression. *EMBO Rep.* **9**, 76-83.
- Jiménez, G., Guichet, A., Ephrussi, A. and Casanova, J. (2000). Relief of gene repression by torso RTK signaling: role of *capicua* in *Drosophila* terminal and dorsoventral patterning. *Genes Dev.* **14**, 224-231.
- Kanodia, J. S., Rikhy, R., Kim, Y., Lund, V. K., DeLotto, R., Lippincott-Schwartz, J. and Shvartsman, S. Y. (2009). Dynamics of the Dorsal morphogen gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 21707-21712.
- Kawamura-Saito, M., Yamazaki, Y., Kaneko, K., Kawaguchi, N., Kanda, H., Mukai, H., Gotoh, T., Motoi, T., Fukayama, M., Aburatani, H. et al. (2006). Fusion between *CIC* and *DUX4* up-regulates *PEA3* family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2125-2137.
- Kim, Y., Coppey, M., Grossman, R., Ajuria, L., Jiménez, G., Paroush, Z. and Shvartsman, S. Y. (2010). MAPK substrate competition integrates patterning signals in the *Drosophila* embryo. *Curr. Biol.* **20**, 446-451.
- Klinger, M., Erdelyi, M., Szabad, J. and Nüsslein-Volhard, C. (1988). Function of torso in determining the terminal antigen of the *Drosophila* embryo. *Nature* **335**, 275-277.
- Lam, Y. C., Bowman, A. B., Jafar-Nejad, P., Lim, J., Richman, R., Fryer, J. D., Hyun, E. D., Duvick, L. A., Orr, H. T., Botas, J. et al. (2006). ATAXIN-1 interacts with the repressor Capicua in its native complex to cause SCA1 neuropathology. *Cell* **127**, 1335-1347.
- Liaw, G. J., Rudolph, K. M., Huang, J. D., Dubnicoff, T., Courey, A. J. and Lengyel, J. A. (1995). The torso response element binds GAGA and NTF-1/Elf-1, and regulates *tailless* by relief of repression. *Genes Dev.* **9**, 3163-3176.
- Liberman, L. M., Reeves, G. T. and Stathopoulos, A. (2009). Quantitative imaging of the Dorsal nuclear gradient reveals limitations to threshold-dependent patterning in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 22317-22322.
- Löhr, U., Chung, H. R., Beller, M. and Jäckle, H. (2009). Antagonistic action of Bicoid and the repressor Capicua determines the spatial limits of *Drosophila* head gene expression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 21695-21700.
- Martin-Blanco, E., Roch, F., Noll, E., Baonza, A., Duffy, J. B. and Perrimon, N. (1999). A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **126**, 5739-5747.
- Martinez, C. A. and Arnosti, D. N. (2008). Spreading of a corepressor linked to action of long-range repressor hairy. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2792-2802.
- Paroush, Z., Finley, R. L. J., Kidd, T., Wainwright, S. M., Ingham, P. W., Brent, R. and Ish-Horowitz, D. (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation and sex determination, and interacts directly with Hairy-related bHLH proteins. *Cell* **79**, 805-815.
- Paroush, Z., Wainwright, S. M. and Ish-Horowitz, D. (1997). Torso signalling regulates terminal patterning in *Drosophila* by antagonising Groucho-mediated repression. *Development* **124**, 3827-3834.
- Pignoni, F., Baldarelli, R. M., Steingrimsson, E., Diaz, R. J., Patapoutian, A., Merriam, J. R. and Lengyel, J. A. (1990). The *Drosophila* gene *tailless* is expressed at the embryonic termini and is a member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **62**, 151-163.
- 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**, 3871-3880.
- Raible, F. and Brand, M. (2001). Tight transcriptional control of the ETS domain factors *Erm* and *Pea3* by Fgf signaling during early zebrafish development. *Mech. Dev.* **107**, 105-117.
- Reuter, R. and Leptin, M. (1994). Interacting functions of *snail*, *twist* and *huckebein* during the early development of germ layers in *Drosophila*. *Development* **120**, 1137-1150.
- Roch, F., Jiménez, G. and Casanova, J. (2002). EGFR signalling inhibits Capicua-dependent repression during specification of *Drosophila* wing veins. *Development* **129**, 993-1002.

- Roehl, H. and Nüsslein-Volhard, C. (2001). Zebrafish *pea3* and *erm* are general targets of FGF8 signaling. *Curr. Biol.* **11**, 503-507.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.
- Simon, M. A. (2000). Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell* **103**, 13-15.
- Sivasankaran, R., Vigano, M. A., Müller, B., Affolter, M. and Basler, K. (2000). Direct transcriptional control of the Dpp target *omb* by the DNA binding protein Brinker. *EMBO J.* **19**, 6162-6172.
- Skeath, J. B. (1998). The *Drosophila* EGF receptor controls the formation and specification of neuroblasts along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* **125**, 3301-3312.
- Song, H., Hasson, P., Paroush, Z. and Courey, A. J. (2004). Groucho oligomerization is required for repression in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4341-4350.
- Stathopoulos, A. and Levine, M. (2005). Localized repressors delineate the neurogenic ectoderm in the early *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **280**, 482-493.
- Struhl, G., Struhl, K. and Macdonald, P. M. (1989). The gradient morphogen *bicoid* is a concentration-dependent transcriptional activator. *Cell* **57**, 1259-1273.
- Tang, A. H., Neufeld, T. P., Rubin, G. M. and Muller, H. A. (2001). Transcriptional regulation of cytoskeletal functions and segmentation by a novel maternal pair-rule gene, *lilliputian*. *Development* **128**, 801-813.
- Terriente-Felix, A. and de Celis, J. F. (2009). Osa, a subunit of the BAP chromatin-remodelling complex, participates in the regulation of gene expression in response to EGFR signalling in the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* **329**, 350-361.
- Tootle, T. L. and Rebay, I. (2005). Post-translational modifications influence transcription factor activity: a view from the ETS superfamily. *BioEssays* **27**, 285-298.
- Tseng, A. S., Tapon, N., Kanda, H., Cigizoglu, S., Edelmann, L., Pellock, B., White, K. and Hariharan, I. K. (2007). Capicua regulates cell proliferation downstream of the receptor tyrosine kinase/ras signaling pathway. *Curr. Biol.* **17**, 728-733.
- Valentine, S. A., Chen, G., Shandala, T., Fernandez, J., Mische, S., Saint, R. and Courey, A. J. (1998). Dorsal-mediated repression requires the formation of a multiprotein repression complex at the ventral silencer. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6584-6594.
- von Ohlen, T. and Doe, C. Q. (2000). Convergence of Dorsal, Dpp, and Egfr signaling pathways subdivides the *Drosophila* neuroectoderm into three dorsal-ventral columns. *Dev. Biol.* **224**, 362-372.
- Weiss, J. B., Von Ohlen, T., Mellerick, D. M., Dressler, G., Doe, C. Q. and Scott, M. P. (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the *intermediate neuroblasts defective* homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes Dev.* **12**, 3591-3602.
- Yeh, E., Gustafson, K. and Boulianne, G. L. (1995). Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7036-7040.

MIRROR REPRIME LA EXPRESIÓN DE *PIPE* EN LA CÉLULAS FOLICULARES PARA INICIAR LA FORMACIÓN DEL EJE DORSOVENTRAL EN *DROSOPHILA*

La formación del eje dorsoventral (D/V) en *Drosophila* comienza con la activación selectiva de EGFR, un RTK, en las células dorsoanteriores del epitelio folicular del ovario. Un evento crítico regulado por la señalización de EGFR es la represión del gen *pipe* en las células foliculares dorsales. *pipe* codifica para una proteína sulfotransferasa que juega un papel clave en la transmisión de información posicional D/V desde el ovario hasta el embrión; sin embargo, su mecanismo de regulación por la vía de EGFR permanece desconocido. En este artículo, mostramos que *Mirr*, un factor de transcripción con homeodominio inducido por la vía de EGFR en las células foliculares dorsoanteriores, reprime directamente la expresión de *pipe* uniéndose a un elemento conservado en su región reguladora. Además, hemos encontrado que la proteína HMG box *Cic* mantiene la expresión de *pipe* en las células foliculares ventrales reprimiendo la expresión de *mirr* en esta región. Esta función de *Cic* es similar a su modo de acción durante la regulación del patrón A/P, donde *Cic* mantiene la expresión de genes *gap* centrales reprimiendo a *Tll*, un represor inducido por la señalización RTK de *Torso* en los polos del embrión. De este modo, nuestros resultados muestran que la formación de los ejes D/V y A/P dependen de circuitos reguladores comunes mediados por señales RTK y *Cic*.

Mirror represses *pipe* expression in follicle cells to initiate dorsoventral axis formation in *Drosophila*

María José Andreu¹, Esther González-Pérez², Leïore Ajuria¹, Núria Samper¹, Sergio González-Crespo¹, Sonsoles Campuzano² and Gerardo Jiménez^{1,3,*}

SUMMARY

Dorsoventral (DV) axis formation in *Drosophila* begins with selective activation of EGFR, a receptor tyrosine kinase (RTK), in dorsal-anterior (DA) ovarian follicle cells. A critical event regulated by EGFR signaling is the repression of the sulfotransferase-encoding gene *pipe* in dorsal follicle cells, but how this occurs remains unclear. Here we show that Mirror (Mirr), a homeodomain transcription factor induced by EGFR signaling in DA follicle cells, directly represses *pipe* expression by binding to a conserved element in the *pipe* regulatory region. In addition, we find that the HMG-box protein Capicua (Cic) supports *pipe* expression in ventral follicle cells by repressing Mirr in this region. Interestingly, this role of Cic resembles its function in regulating anteroposterior (AP) body patterning, where Cic supports gap gene expression in central regions of the embryo by repressing Tailless, a repressor induced by RTK signaling at the embryonic poles. Thus, related RTK-Cic repressor circuits regulate the early stages of *Drosophila* DV and AP body axis formation.

KEY WORDS: Dorsoventral patterning, EGFR signaling, *pipe*, Mirror, Capicua, *Drosophila*

INTRODUCTION

Dorsoventral (DV) embryonic patterning in *Drosophila* depends on inductive signals generated during oogenesis that are transmitted to the fertilized embryo (Nilson and Schüpbach, 1999; Moussian and Roth, 2005). During mid-oogenesis, localization of the oocyte nucleus in a dorsal-anterior (DA) position produces a local source of the Gurken (Grk)/TGF α -like secreted factor, which activates EGFR signaling in the overlying DA follicle cells. EGFR then signals via the Ras/Raf/MAPK cassette and represses transcription of the *pipe* gene, thereby restricting its expression to ventral follicle cells (Sen et al., 1998). *pipe* encodes a sulfotransferase that modifies structural components of the eggshell, a process required for subsequent signaling events that activate the Toll receptor on the ventral surface of the embryo (Sen et al., 1998; Moussian and Roth, 2005; Zhang et al., 2009).

The mechanism by which EGFR signaling represses *pipe* expression remains unclear. An important feature is that detectable EGFR signaling activity and *pipe* expression are not precisely complementary: at stage 10A of oogenesis, active phospho-MAPK and known EGFR targets are restricted to the dorsal ~30% of the follicular epithelium, whereas *pipe* expression spans the ventral ~40% region (Sen et al., 1998; Ghiglione et al., 1999; Peri et al., 1999; Reich et al., 1999; Jordan et al., 2000; Zhao et al., 2000). Accordingly, initial analyses suggested that *pipe* repression is not a direct consequence of EGFR signaling, but depends on long-range signals mediated by the homeodomain factor Mirror (Mirr) and the Notch-Fringe pathway (Jordan et al., 2000). However, subsequent studies indicated that Grk/EGFR signaling forms a

gradient that reaches ventral positions to directly control *pipe* expression (Pai et al., 2000; Goentoro et al., 2006). In agreement with this, loss of EGFR/Ras/MAPK activity causes cell-autonomous derepression of *pipe* in all lateral and dorsal positions (James et al., 2002; Peri et al., 2002). Furthermore, both Mirr and Notch-Fringe signals were found to be dispensable for *pipe* repression, arguing that this repression might depend on unknown factors (Peri et al., 2002).

Here, we report that Mirror, which is induced by EGFR signaling in DA cells (Jordan et al., 2000; Zhao et al., 2000), directly represses *pipe* expression by binding to a conserved element in its regulatory region. In addition, we find that the HMG-box protein Capicua (Cic) supports *pipe* expression in ventral follicle cells by repressing *mirr* in this region. Together, our results delineate a repressor circuit downstream of EGFR signaling that is essential for asymmetric *pipe* transcription in the follicle cell layer.

MATERIALS AND METHODS

Drosophila strains and genetic analyses

The following stocks were used: *mirr*¹⁸²⁵ (Collins and Cohen, 2005), *fs(1)K10*^l (Wieschaus et al., 1978), *pipe-lacZ* (Sen et al., 1998), *UAS-mirr* (McNeill et al., 1997), *cic*^{jetE11}, *cic*^{jetU6} (Goff et al., 2001), *FRT82B cic*^{Q474X} (Tseng et al., 2007) and *FRT82B Ras*^{AC40b} (James et al., 2002). *iro*^{EGP} deficiencies were generated using FRT-bearing transposon insertions from Exelixis (Thibault et al., 2004; Parks et al., 2004). Mosaic analyses were performed by FLP-FRT-mediated mitotic recombination (Xu and Rubin, 1993). Ectopic *mirr*-expressing clones were generated using the GAL4/UAS flip-out technique and an *hs-flp*; *UAS-CD8-GFP*; *tub>y*⁺ *Gal80>Gal4* line, resulting in GFP-labeled clones. Transgenic lines were established by standard P-element transformation.

Immunohistochemistry and in situ hybridization

The following primary antibodies were used: mouse anti- β -galactosidase (40-1a, 1:200 dilution) and mouse anti-Grk (1D12, 1:50) (Developmental Studies Hybridoma Bank). Mirr expression was visualized using a rat polyclonal antibody that recognizes all three Iro proteins (our unpublished data). Signals were detected using fluorochrome-conjugated secondary antibodies and DAPI. Whole-mount in situ hybridization was performed using digoxigenin-labeled RNA probes.

¹Institut de Biologia Molecular de Barcelona-CSIC, Parc Científic de Barcelona, Barcelona 08028, Spain. ²Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid 28049, Spain. ³Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona 08010, Spain.

*Author for correspondence (gjcbmc@ibmb.csic.es)

DNA constructs

pipe enhancer fragments were amplified by PCR using the following primers: *m2-f* (5'-AGTACTCACTTCTTGGTAC-3') and *m2-r* (5'-AGCCAAACTTCGGGATCTAAG-3') to amplify module *M2*; and *m3-f* (5'-CTACTAAAAGTATTCCTAG-3') and *m3-r* (5'-ATTTCAGC-ATTTGGTACCAAG-3') for *M3*. *M1* was generated by ligating *M2* and *M3* fragments through their common *KpnI* site. Reporter constructs were assembled in *pC4PLZ* (Wharton and Crews, 1993). *M1^{r1mut}* and *M2^{r1mut}* were made by replacing the 39 bp *r1* sequence with a *pC4PLZ* polylinker fragment (*BamHI-NotI*) of the same size.

In vitro DNA binding assays

Recombinant Mirr protein was synthesized by coupled transcription-translation (TNT, Promega). EMSA experiments were performed by incubating 0.5–2 μ l TNT reactions with \sim 50 ng ³²P-end-labeled probes, 1 μ g BSA and 1 μ g poly(dI-dC) in a final volume of 20 μ l supplemented with binding buffer (60 mM Hepes pH 7.9, 20 mM Tris-HCl pH 7.9, 300 mM KCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 12% glycerol). Complexes were resolved on 5% non-denaturing polyacrylamide gels run in 0.5 \times TBE at 4°C, and visualized by autoradiography. The control (c) probe in Fig. 2I is 5'-GAGTTGGAGAAAAACACGTGTTAAGCT-3' (Mirr binding site is underlined) (Bilioni et al., 2005).

RESULTS AND DISCUSSION

Mirr mediates cell-autonomous repression of *pipe* in dorsal follicle cells

Although previous clonal analyses indicated that Mirr is not involved in *pipe* regulation (Peri et al., 2002), we reasoned that Mirr function in this context could be masked by redundant activities of the two other components of the *iroquois* complex (*Iro-C*), *araucan* (*ara*) and *caupolican* (*caup*), which encode homeodomain proteins highly related to Mirr (Gómez-Skarmeta et al., 1996; McNeill et al., 1997). Therefore, we generated follicle cell clones mutant for a deficiency, *iro^{EGP7}*, that removes the whole of *Iro-C* (Fig. 1A). Strikingly, *iro^{EGP7}* clones showed full, cell-autonomous derepression of *pipe-lacZ* expression at all positions where *pipe* is normally off (Fig. 1B). We then used two additional deficiencies, *iro^{EGP5}* and *iro^{EGP6}*, that specifically abolish *mirr* and *ara/caup* function, respectively (Fig. 1A). These analyses revealed a requirement for Mirr, but not Ara or Caup, in *pipe* repression: only *iro^{EGP5}* caused ectopic *pipe* expression equivalent to that seen with *iro^{EGP7}* (Fig. 1C,D and supplementary material Fig. S1). In addition, we found that *mirr* is the only member of *Iro-C* that is detectably expressed in follicle cells (Fig. 1E–G).

Thus, Mirr is essential for repression of *pipe* in dorsal follicle cells. Based on further analyses (supplementary material Fig. S1), it is possible that previous negative results were caused by residual Mirr activity of the *mirr^{e48}* allele (Peri et al., 2002). In fact, *pipe* is highly sensitive to Mirr repression, as this repression occurs even in cells abutting the normal *pipe* domain where Mirr levels are very low or undetectable (Jordan et al., 2000; Zhao et al., 2000) (Fig. 1B and supplementary material Fig. S1). Furthermore, this is consistent with evidence that low EGFR/Ras/MAPK levels mediate *pipe* repression in lateral and dorsal-posterior cells close to its border of expression (Pai et al., 2000; Peri et al., 2002; James et al., 2002) (Fig. 3B).

Mirr binds to a conserved element in the *pipe* regulatory region

To further study *pipe* regulation, we identified two highly conserved sequence motifs in its 5' flanking region (designated *r1* and *r2*; Fig. 2A). Using different *lacZ* reporters, we defined a minimal *pipe* enhancer module, *M2*, which includes the *r1* element and recapitulates endogenous *pipe* expression (Fig. 2A–D). As

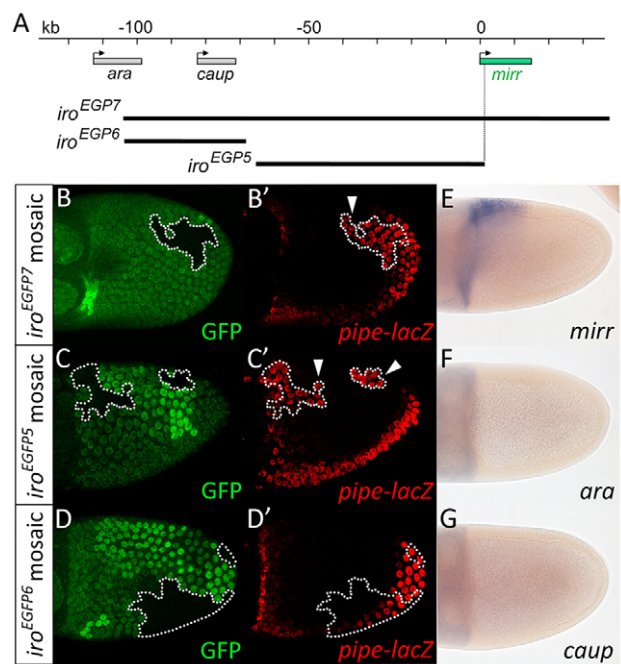


Fig. 1. Mirr represses *pipe* expression in dorsal follicle cells.

(A) The *Iro* complex. Horizontal lines indicate the regions deleted in three *iro^{EGP}* deficiencies. *iro^{EGP5}* removes the first *mirr* exon and adjacent upstream sequences. (B–D') Stage 10 mosaic egg chambers carrying *iro^{EGP7}* (B), *iro^{EGP5}* (C) and *iro^{EGP6}* (D) clones marked by absence of GFP (green, outlined); B'–D' show *pipe-lacZ* expression (red). Dorsolateral (B, D) or lateral (C) views are shown. Arrowheads indicate ectopic *pipe-lacZ* expression. (E–G) Stage 10 egg chambers stained for *mirr* (E), *ara* (F) and *caup* (G) mRNA expression.

expected, *M2-lacZ* responded to EGFR regulation, as indicated by the loss of ventral-anterior expression in *fs(1)K10* mutant ovaries, which display ectopic EGFR activity (Wieschaus et al., 1978; Neuman-Silberberg and Schüpbach, 1993) (Fig. 2E). In addition, we found that clonal ectopic expression of Mirr repressed *M2-lacZ* in a cell-autonomous manner (Fig. 2H), consistent with EGFR signaling mediating *pipe* repression via Mirr.

We then found that *pipe* regulation crucially depends on the *r1* sequence, as mutation of this element resulted in dorsal derepression of reporter constructs (*M1^{r1mut}-lacZ* and *M2^{r1mut}-lacZ*, Fig. 2F,G). These mutant constructs, particularly *M2^{r1mut}-lacZ*, exhibit weaker and more variable expression than *M2-lacZ* throughout the epithelium, raising the possibility that the *r1* element includes sequences required for both repression in DA cells and full activation in ventral cells. Based on these results, we postulated that Mirr might repress *pipe* expression by binding to the *r1* element. EMSA experiments (Fig. 2I) showed that recombinant Mirr protein binds strongly to the *r1* sequence, but not to the mutated *r1mut* sequence that caused dorsal derepression in vivo. Using a set of mutations along the *r1* sequence (*mut A–D*), we then found that Mirr preferentially binds to a site containing the sequence ACACGA (Fig. 2I), which resembles the ACAnnTGT motif defined as a minimal Mirr binding site in vitro (Bilioni et al., 2005).

Cic supports *pipe* expression by repressing Mirr

Previous studies showed that Cic is required for *pipe* expression in ventral follicle cells; accordingly, embryos derived from *cic* mutant females are severely dorsalized (Goff et al., 2001). However, how

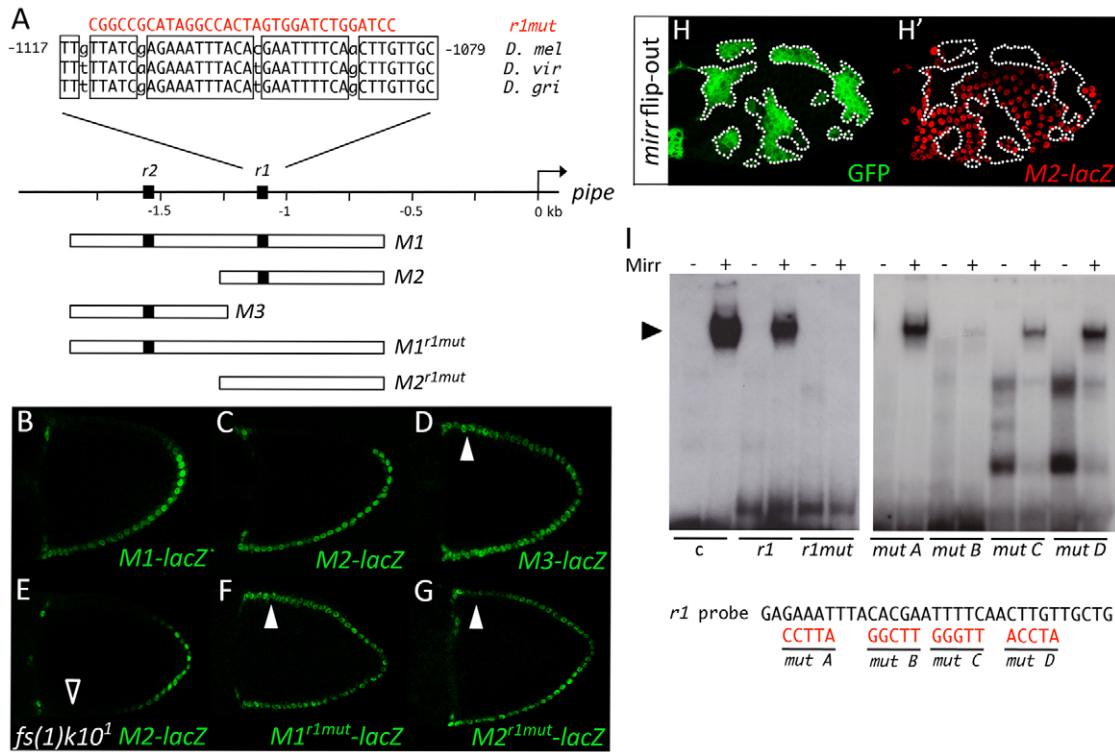


Fig. 2. Mirr binds to a conserved regulatory element in *pipe*. (A) The *pipe* upstream region showing *r1* sequences from *D. melanogaster*, *D. virilis* and *D. grimshawi* above; the *r1mut* sequence is also indicated. DNA fragments analyzed for enhancer activity are depicted beneath. (B-G) Lateral views of transgenic stage 10 egg chambers stained for *lacZ* reporter expression. Solid arrowheads indicate ectopic expression of constructs lacking the *r1* element. The open arrowhead in E indicates loss of ventral expression in the *fs(1)K10¹* background. In all cases, dorsal is up as confirmed by the dorsal position of the oocyte nucleus under Nomarski optics (not shown). (H,H') Ventrolateral views of a stage 10 mosaic egg chamber carrying *mirr* overexpression clones marked by expression of GFP (H, green, outlined); H' shows *M2-lacZ* expression (red). (I) EMSA analysis of in vitro synthesized Mirr protein binding to different oligonucleotide probes. Lanes labeled (-) contain TNT extract without *mirr* plasmid. The control probe (c) contains the ACACgTGT sequence (Bilioni et al., 2005). The *r1mut* sequence is indicated in Fig. 2A; *mut A-D* probes contain the changes indicated in red.

Cic affects *pipe* expression is not understood (Goff et al., 2001; Atkey et al., 2006). Since *Cic* often represses genes induced by RTK signaling pathways (Jiménez et al., 2000; Goff et al., 2001; Roch et al., 2002; Atkey et al., 2006; Löhr et al., 2009; Ajuria et al., 2011), we hypothesized that *Cic* might support *pipe*

transcription indirectly by repressing Mirr in ventral cells. Consistent with this idea, loss of *cic* function causes ectopic *mirr* expression, although only in anterior regions of the egg chamber (Goff et al., 2001; Atkey et al., 2006) (supplementary material Fig. S2).

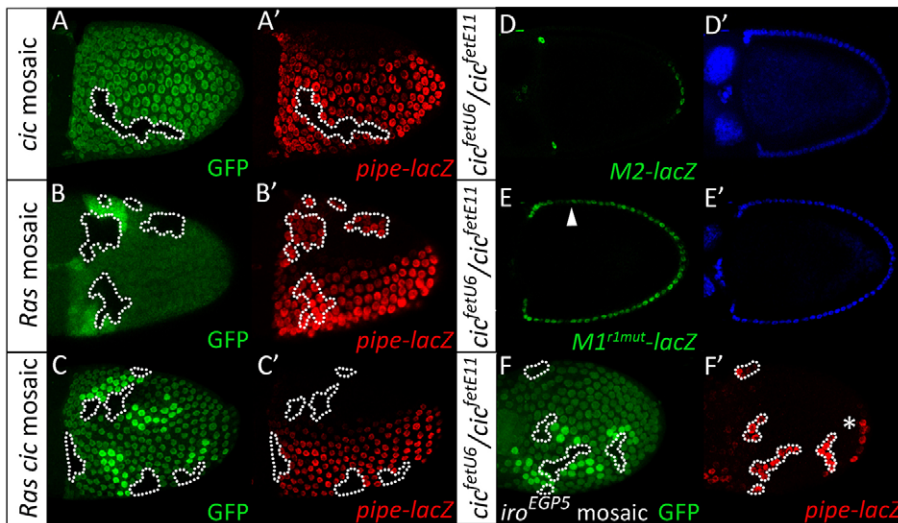


Fig. 3. *Cic* regulates *pipe* indirectly through the *r1* element. (A-C') Stage 10 mosaic egg chambers carrying *cic^{Q474X}* (A), *Ras^{ΔC40b}* (B) and *Ras^{ΔC40b} cic^{Q474X}* (C) mutant clones marked by absence of GFP (green, outlined); A'-C' show *pipe-lacZ* expression (red). Ventrolateral (A) or lateral (B,C) views are shown. (D-E') Lateral views of stage 10 *cic^{fetU6}/cic^{fetE11}* egg chambers stained for *lacZ* reporter expression; D' and E' show DAPI staining (blue). Dorsal is up (see Fig. 2 legend). (F,F') Lateral view of a stage 10 *cic^{fetU6}/cic^{fetE11}* egg chamber carrying *iro^{EGP5}* mutant clones marked by absence of GFP (F, green); F' shows *pipe-lacZ* expression (red). The asterisk indicates residual *pipe-lacZ* expression in the *cic^{fetU6}/cic^{fetE11}* background.

To further investigate *Cic* function, we performed mosaic analyses and found that *Cic* is required cell-autonomously for the expression of *pipe* (Fig. 3A). Since mutations in negative regulators of the EGFR pathway, such as *Cbl*, cause ventral *pipe* repression by upregulating EGFR signaling (Pai et al., 2000), we tested whether *Cic* might act similarly. To this end, we performed epistasis analyses using *cic* and *Ras* mutations. Whereas *Ras* clones cause ectopic *pipe* expression in dorsal cells and do not affect *pipe* expression in ventral cells (Fig. 3B) (James et al., 2002), *Ras cic* clones lacked *pipe* expression in all positions (Fig. 3C). This indicates that loss of *pipe* expression in *cic* mutant cells does not result from increased EGFR signaling in those cells.

We also analyzed the effect of *cic Ras* clones on *Mirr* expression and found that, like *cic* clones, they cause ectopic *Mirr* expression only in anterior regions (supplementary material Fig. S2). This is consistent with the observation that both *grk cic* and *cic* mutant ovaries exhibit expanded *mirr* expression (Atkey et al., 2006) and supports a model in which *mirr* is normally activated by EGFR signaling and by an independent anterior signal that may depend on Decapentaplegic (Twombly et al., 1996; Deng and Bownes, 1997; Peri and Roth, 2000), with *Cic* being required to counteract this latter input and repress *mirr* in ventral-anterior follicle cells (Atkey et al., 2006) (see below).

Although these observations are partly consistent with our hypothesis that *Cic* supports *pipe* expression by repressing *Mirr*, they raise a paradox: although *Cic* is required for *pipe* expression in both anterior and posterior follicle cells, loss of *cic* function derepresses *mirr* only in anterior cells. Since *Mirr* normally represses *pipe* in lateral and dorsal-posterior follicle cells where *Mirr* is undetectable, we reasoned that loss of *Cic* function in ventral-posterior cells might induce similar low-level expression of *Mirr* that is nevertheless sufficient to repress *pipe*. If this is correct, *Cic* should be dispensable for the expression of mutant *pipe* enhancers that lack the *r1* motif and are insensitive to *Mirr*. Indeed, whereas *M1-lacZ* and *M2-lacZ* require *Cic* activity for expression in ventral follicle cells, *M1^{r1mut}-lacZ* and *M2^{r1mut}-lacZ* do not (Fig. 3D,E; data not shown). This indicates that *Cic* regulates *pipe* expression in ventral cells by acting indirectly through the *Mirr*-responsive *r1* element. Furthermore, we have confirmed that *Mirr* represses *pipe* in the absence of *Cic* by generating *iro^{EGP5}* clones in *cic^{fatU6}/cic^{fatE11}* mutant ovaries that normally lack *pipe* expression (Goff et al., 2001) (Fig. 3D). We find that *pipe* expression is derepressed in all such mutant clones, irrespective of their position (Fig. 3F; data not shown), indicating that ectopic, low-level activity of *Mirr* accounts for the loss of *pipe* expression in *cic* ovaries (see also Fig. 4B).

Conclusions

Mirr had previously been implicated in the specification of dorsal cell fates during eggshell patterning (Atkey et al., 2006), but it was assumed to be dispensable for establishing embryonic polarity (Peri et al., 2002; Moussian and Roth, 2005; Atkey et al., 2006). Accordingly, it is well accepted that EGFR signaling in the follicle cell layer bifurcates into one branch that regulates DV axis formation and another that controls eggshell patterning, with *pipe* being required only in the first branch and *Mirr* only in the second. However, our results clearly identify *Mirr* as a common mediator of EGFR signaling responses in both developmental processes (Fig. 4A).

Our data also show that *Cic* affects *pipe* expression by repressing *mirr* throughout the *pipe* domain. It should be noted that, although *Cic* is normally downregulated by EGFR signaling in DA cells (Astigarraga et al., 2007), this downregulation does

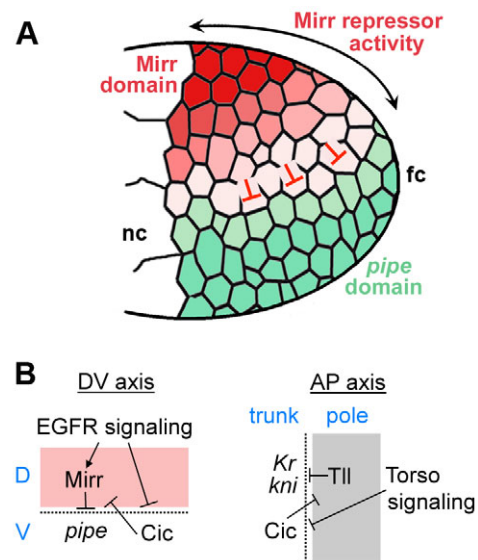


Fig. 4. Roles of *Mirr* and *Cic* in *pipe* regulation. (A) *Mirr*-dependent regulation of *pipe* in follicle cells. The *Mirr* gradient peaks at the dorsal-anterior region (red). Lateral and dorsal-posterior follicle cells (pale red) contain very low levels of *Mirr* protein that are nevertheless sufficient to repress *pipe*, thereby restricting its expression to ventral cells (green). nc, nurse cells; fc, follicle cells. (B) Model of regulatory networks involved in dorsoventral (DV) and anteroposterior (AP) embryonic patterning. Both processes require RTK signals that, together with other inputs, induce expression of repressor factors (*Mirr* and *Tll*). Note that *Torso* signaling induces *tll* expression simply by relieving *Cic* repression (Astigarraga et al., 2007; Cinnamon et al., 2008). In regions where RTK signaling is low or absent, *Cic* represses *mirr* and *tll*, thereby supporting the expression of key patterning genes such as *pipe*, *Kr* and *kni*.

not play a major role in modulating the effect of *Cic* on *Mirr*, nor in inducing *Mirr* expression in response to EGFR signaling. Indeed, *Cic* derivatives that are insensitive to EGFR-mediated downregulation do not repress *Mirr* in DA cells, implying that EGFR signaling induces *Mirr* by mechanisms that do not require downregulation of *Cic* (Atkey et al., 2006; Astigarraga et al., 2007) (see above).

Finally, the role of *Cic* in DV patterning is analogous to its function in the anteroposterior (AP) axis, where it supports the expression of gap genes such as *Kruppel* (*Kr*) and *knirps* (*kni*) in the segmented trunk of the embryo. In this case, *Cic* supports gap gene expression by repressing *Tailless* (*Tll*), a repressor of *Kr* and *kni* induced by *Torso* RTK signaling at the posterior embryonic pole (Fig. 4B) (Paroush et al., 1997; Jiménez et al., 2000; Goff et al., 2001; Morán and Jiménez, 2006; Löhr et al., 2009; Ajuria et al., 2011). Therefore, similar interactions between *Cic* and RTK-induced repressors are essential for the early subdivision of both DV and AP embryonic axes.

Note added in proof

Two related papers on *pipe* regulation have appeared while this article was in revision (Technau et al., 2011; Fuchs et al., 2012).

Acknowledgements

We thank A. Olza for *Drosophila* injections; L. Bardia for support with confocal analyses; Z. Paroush, J. Bernués, G. Pyrowolakis, J. Relat and S. Shvartsman for discussions; and A. Casali, J. Botas, G. Darras, I. Hariharan, Y. Kim, E. Martín-Blanco, J. Martínez, H. McNeill, L. Nilson, G. Pyrowolakis, S. Shvartsman, D. Stein and the Bloomington *Drosophila* Research Center for reagents and strains.

Funding

This work was funded by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) [BFU2008-01875/BMC to G.J. and BFU2008-03762/BMC and CONSOLIDER CDS2007-00008 to S.C.]; an institutional grant from Fundación Ramón Areces to the CBMSO; and the Generalitat de Catalunya (2009SGR-1075). G.J. is an ICREA investigator.

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.076562/-/DC1>

References

- Ajuria, L., Nieva, C., Winkler, C., Kuo, D., Samper, N., Andreu, M. J., Helman, A., González-Crespo, S., Paroush, Z., Courey, A. J. et al. (2011). Capicua DNA-binding sites are general response elements for RTK signaling in *Drosophila*. *Development* **138**, 915-924.
- Astigarraga, S., Grossman, R., Diaz-Delfin, J., Caelles, C., Paroush, Z. and Jiménez, G. (2007). A MAPK docking site is critical for downregulation of Capicua by Torso and EGFR RTK signaling. *EMBO J.* **26**, 668-677.
- Atkey, M. R., Lachance, J. F., Walczak, M., Rebello, T. and Nilson, L. A. (2006). Capicua regulates follicle cell fate in the *Drosophila* ovary through repression of *mirror*. *Development* **133**, 2115-2123.
- Bilioni, A., Craig, G., Hill, C. and McNeill, H. (2005). Iroquois transcription factors recognize a unique motif to mediate transcriptional repression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14671-14676.
- Cinnamon, E., Helman, A., Ben-Haroush Schyr, R., Orian, A., Jiménez, G. and Paroush, Z. (2008). Multiple RTK pathways downregulate Groucho-mediated repression in *Drosophila* embryogenesis. *Development* **135**, 829-837.
- Collins, R. T. and Cohen, S. M. (2005). A genetic screen in *Drosophila* for identifying novel components of the hedgehog signaling pathway. *Genetics* **170**, 173-184.
- 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**, 4639-4647.
- Fuchs, A., Cheung, L. S., Charbonnier, E., Shvartsman, S. Y. and Pyrowolakis, G. (2012). Transcriptional interpretation of the EGF receptor signaling gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* doi: 10.1073/pnas.1115190109.
- Ghiglione, C., Carraway, K. L., 3rd, Amundadottir, L. T., Boswell, R. E., Perrimon, N. and Duffy, J. B. (1999). The transmembrane molecule kerkon 1 acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the *Drosophila* EGF receptor during oogenesis. *Cell* **96**, 847-856.
- Goentoro, L. A., Reeves, G. T., Kowal, C. P., Martinelli, L., Schüpbach, T. and Shvartsman, S. Y. (2006). Quantifying the Gurken morphogen gradient in *Drosophila* oogenesis. *Dev. Cell* **11**, 263-272.
- Goff, D. J., Nilson, L. A. and Morisato, D. (2001). Establishment of dorsal-ventral polarity of the *Drosophila* egg requires *capicua* action in ovarian follicle cells. *Development* **128**, 4553-4562.
- Gómez-Skarmeta, J. L., Díez del Corral, R., de la Calle-Mustienes, E., Ferre-Marco, D. and Modolell, J. (1996). *araucan* and *caupolican*, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* **85**, 95-105.
- James, K. E., Dorman, J. B. and Berg, C. A. (2002). Mosaic analyses reveal the function of *Drosophila Ras* in embryonic dorsoventral patterning and dorsal follicle cell morphogenesis. *Development* **129**, 2209-2222.
- Jiménez, G., Guichet, A., Ephrussi, A. and Casanova, J. (2000). Relief of gene repression by torso RTK signaling: role of *capicua* in *Drosophila* terminal and dorsoventral patterning. *Genes Dev.* **14**, 224-231.
- Jordan, K. C., Clegg, N. J., Blasi, J. A., Morimoto, A. M., Sen, J., Stein, D., McNeill, H., Deng, W. M., Tworoger, M. and Ruohola-Baker, H. (2000). The homeobox gene *mirror* links EGF signalling to embryonic dorso-ventral axis formation through Notch activation. *Nat. Genet.* **24**, 429-433.
- Löhr, U., Chung, H. R., Beller, M. and Jäckle, H. (2009). Antagonistic action of Bicoid and the repressor Capicua determines the spatial limits of *Drosophila* head gene expression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 21695-21700.
- McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J. and Simon, M. A. (1997). *mirror* encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* **11**, 1073-1082.
- Morán, E. and Jiménez, G. (2006). The tailless nuclear receptor acts as a dedicated repressor in the early *Drosophila* embryo. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3446-3454.
- Moussian, B. and Roth, S. (2005). Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo-shaping and transducing a morphogen gradient. *Curr. Biol.* **15**, R887-R899.
- Neuman-Silberberg, F. S. and Schüpbach, T. (1993). The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell* **75**, 165-174.
- Nilson, L. A. and Schüpbach, T. (1999). EGF receptor signaling in *Drosophila* oogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **44**, 203-243.
- Pai, L. M., Barcelo, G. and Schüpbach, T. (2000). *D-cbl*, a negative regulator of the Egr pathway, is required for dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Cell* **103**, 51-61.
- Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E. et al. (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat. Genet.* **36**, 288-292.
- Paroush, Z., Wainwright, S. M. and Ish-Horowitz, D. (1997). Torso signalling regulates terminal patterning in *Drosophila* by antagonising Groucho-mediated repression. *Development* **124**, 3827-3834.
- Peri, F. and Roth, S. (2000). Combined activities of Gurken and Decapentaplegic specify dorsal chorion structures of the *Drosophila* egg. *Development* **127**, 841-850.
- Peri, F., Bokel, C. and Roth, S. (1999). Local Gurken signaling and dynamic MAPK activation during *Drosophila* oogenesis. *Mech. Dev.* **81**, 75-88.
- Peri, F., Technau, M. and Roth, S. (2002). Mechanisms of Gurken-dependent *pipe* regulation and the robustness of dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development* **129**, 2965-2975.
- Reich, A., Sapir, A. and Shilo, B. (1999). Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* **126**, 4139-4147.
- Roch, F., Jiménez, G. and Casanova, J. (2002). EGFR signalling inhibits Capicua-dependent repression during specification of *Drosophila* wing veins. *Development* **129**, 993-1002.
- 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**, 471-481.
- Technau, M., Knispel, M. and Roth S. (2011). Molecular mechanisms of EGF signaling-dependent regulation of *pipe*, a gene crucial for dorsoventral axis formation in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* doi: 10.1007/s00427-011-0384-2.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L. et al. (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat. Genet.* **36**, 283-287.
- Tseng, A. S., Tapon, N., Kanda, H., Cigizoglu, S., Edelmann, L., Pellock, B., White, K. and Hariharan, I. K. (2007). Capicua regulates cell proliferation downstream of the receptor tyrosine kinase/ras signaling pathway. *Curr. Biol.* **17**, 728-733.
- 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**, 1555-1565.
- Wharton, K. A. Jr. and Crews, S. T. (1993). CNS midline enhancers of the *Drosophila slit* and *Toll* genes. *Mech. Dev.* **40**, 141-154.
- Wieschaus, E., Marsh, J. L. and Gehring, W. J. (1978). *fs(1)K10*, a germ-line dependent female-sterile mutation causing abnormal chorion morphology in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **184**, 74-82.
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237.
- Zhang, Z., Stevens, L. M. and Stein, D. (2009). Sulfation of eggshell components by Pipe defines dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Curr. Biol.* **19**, 1200-1205.
- Zhao, D., Woolner, S. and Bownes, M. (2000). The Mirror transcription factor links signalling pathways in *Drosophila* oogenesis. *Dev. Genes Evol.* **210**, 449-457.

LA COMPETICIÓN ENTRE SUBSTRATOS DE LA MAPK, INTEGRA LAS SEÑALES IMPLICADAS EN LA FORMACIÓN DEL PATRÓN DEL EMBRIÓN DE *DROSOPHILA*

Las regiones terminales del embrión de *Drosophila* están formadas por la activación localizada de la cascada de Ras-MAPK, que desactiva la proteína Cic para aliviar la represión que ejerce sobre los genes *gap* terminales. Hemos mostrado que la desactivación de Cic está antagonizada por el morfógeno anterior Bcd y que este efecto no depende de su actividad transcripcional. El factor Bcd, fosforilado por la MAPK, disminuye la disponibilidad del enzima a otros sustratos como por ejemplo, Cic. Basado en el análisis cuantitativo de la vía de MAPK en múltiples mutantes, proponemos que la competición entre sus sustratos coordina las acciones de los sistemas anterior y terminal para un correcto establecimiento del patrón A/P. Además, hemos identificado la proteína Hb como una nueva diana de la fosforilación por la MAPK que puede explicar a través del modelo expuesto, las interacciones previamente descritas entre el sistema posterior y terminal, donde embriones mutantes *osk* o *nos* causan la represión de *tll* y *hkb* en el polo posterior. De esta manera, mecanismos de competición comunes entre enzimas y sustratos integran las acciones de las señales anteriores, posteriores y terminales. La competición entre sustratos puede ser una estrategia general de integración de señales en redes donde enzimas, como MAPK, interactúan con sus múltiples reguladores y dianas.

MAPK Substrate Competition Integrates Patterning Signals in the *Drosophila* Embryo

Yoosik Kim,¹ Mathieu Coppey,¹ Rona Grossman,² Leiore Ajuria,³ Gerardo Jiménez,³ Ze'ev Paroush,² and Stanislav Y. Shvartsman^{1,*}

¹Department of Chemical Engineering and Lewis-Sigler Institute for Integrative Genomics, Princeton University, Princeton, NJ 08544, USA

²Department of Developmental Biology and Cancer Research, Institute for Medical Research Israel-Canada, The Hebrew University-Hadassah Medical School, P.O. Box 12272, Jerusalem 91120, Israel

³Institut de Biologia Molecular de Barcelona-CSIC and Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Parc Científic de Barcelona, Barcelona 08028, Spain

Summary

Terminal regions of the *Drosophila* embryo are patterned by the localized activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [1]. This depends on the MAPK-mediated downregulation of Capicua (Cic), a repressor of the terminal gap genes [2, 3]. We establish that downregulation of Cic is antagonized by the anterior patterning morphogen Bicoid (Bcd). We demonstrate that this effect does not depend on transcriptional activity of Bcd and provide evidence suggesting that Bcd, a direct substrate of MAPK, decreases the availability of MAPK for its other substrates, such as Cic. Based on the quantitative analysis of MAPK signaling in multiple mutants, we propose that MAPK substrate competition coordinates the actions of the anterior and terminal patterning systems. In addition, we identify Hunchback as a novel target of MAPK phosphorylation that can account for the previously described genetic interaction between the posterior and terminal systems [4]. Thus, a common enzyme-substrate competition mechanism can integrate the actions of the anterior, posterior, and terminal patterning signals. Substrate competition can be a general signal integration strategy in networks where enzymes, such as MAPK, interact with their multiple regulators and targets [5–10].

Results and Discussion

Anteroposterior (AP) patterning of the *Drosophila* embryo depends on three inductive signals [11]: the head and thorax are specified by the anterior gradient of Bicoid (Bcd), a homeobox transcription factor; abdomen formation is directed by the reciprocal gradient of Nanos (Nos), a translational repressor; and the nonsegmented termini are patterned by the localized activation of the extracellular signal-regulated/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK) pathway [6, 12]. MAPK signaling is induced by a uniformly expressed receptor tyrosine kinase Torso (Tor), which is activated by its ligand produced at the poles of the embryo [1].

Activated Tor promotes the expression of *tailless* (*tll*) and *huckebein* (*hkb*), zygotic gap genes required for the development of the terminal structures. This depends on MAPK-mediated phosphorylation of the transcriptional repressors Capicua (Cic) and Groucho (Gro), both of which are initially distributed uniformly throughout the embryo [1–3, 13]. Phosphorylation of Cic and Gro relieves their repression of *tll* and *hkb* and enables expression of these genes at both poles of the embryo. At the anterior pole, MAPK also phosphorylates Bcd [14, 15]. Thus, MAPK is activated in a localized pattern and phosphorylates substrates that can be either uniformly (Cic and Gro) or nonuniformly (Bcd) distributed along the AP axis of the embryo (Figures 1A–1C).

The spatial pattern of MAPK activation can be visualized with an antibody that recognizes the double phosphorylated form of ERK (dpERK) [16, 17]. We found that this pattern is strongly asymmetric: the anterior levels of dpERK are significantly higher than the posterior levels (Figure 1; see also Figure S1 available online). Because the early *Drosophila* embryo is highly polarized, multiple factors can potentially contribute to the observed asymmetry. These include the differences in the anterior and posterior levels of the extracellular ligand that activates Tor [18] and/or in the intracellular localization of maternal determinants.

We hypothesized that the higher levels of dpERK at the anterior pole reflect the presence of an anteriorly localized maternal factor. One candidate for such a factor is Bcd, which is localized to the anterior of the embryo and is one of the phosphorylation targets of MAPK [14]. To test whether Bcd can affect the AP asymmetry of the dpERK pattern, we examined this pattern in embryos with different levels of Bcd. We found that the anterior levels of dpERK are significantly decreased in embryos from *bcd* null or heterozygous mothers and increased in embryos with two extra copies of *bcd* (Figures 2A and 2B). Importantly, the posterior levels of dpERK are unaffected in these embryos, reflecting the anterior localization of Bcd. Thus, changing the level of Bcd, a substrate of MAPK, influences the level of MAPK phosphorylation.

Previous studies have shown that overexpressing MAPK substrates in a heterologous cell culture system leads to a higher level of MAPK phosphorylation [19]. Furthermore, experiments with purified components revealed that MAPK substrates can directly compete with the MAPK phosphatases for binding to the common docking domain of MAPK [19–23]. Thus, the level of MAPK substrates can increase the level of MAPK phosphorylation by outcompeting the MAPK phosphatase. Correspondingly, a similar effect can be responsible for the observed dose-dependent control of MAPK phosphorylation levels by Bcd: the total concentration of MAPK substrates at the anterior pole is higher than at the posterior because of the anterior localization of Bcd, resulting in a stronger interference with MAPK dephosphorylation in this region of the embryo. This can account for the higher level of dpERK at the anterior pole.

The fact that the anterior level of dpERK is sensitive to the dose of Bcd is consistent with the proposed competition model. This, however, does not exclude the possibility of a more indirect transcriptional effect, whereby one or more

*Correspondence: stas@princeton.edu

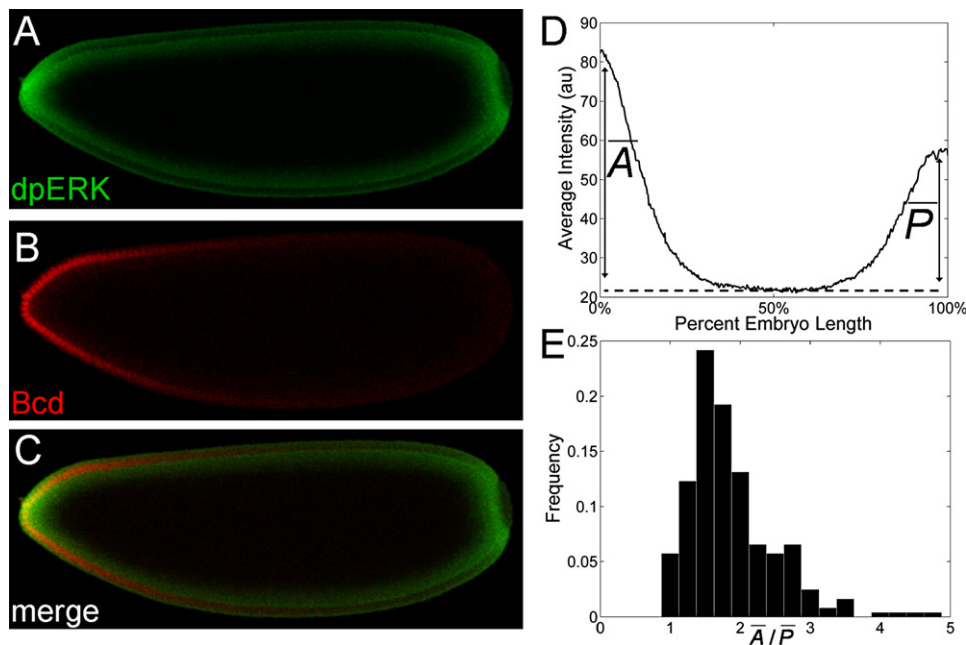


Figure 1. Spatial Asymmetries of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation

(A–C) Coimmunostaining of the anteroposterior (AP) gradient of phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK), double phosphorylated ERK (dpERK) (green), and Bicoid (Bcd) (red). In all figures, embryos are oriented with anterior to the left and dorsal side up.

(D) An averaged AP gradient of dpERK at early cell cycle 14, obtained from 40 embryos. The dashed line indicates the reference level of dpERK. Quantification of the gradients reveals a clear AP asymmetry: the anterior levels are higher than the posterior levels.

(E) Histogram of the ratios of anterior to posterior peak levels of MAPK phosphorylation from 244 wild-type embryos. Individual peak values of dpERK at the termini are determined as described in Figure S1. In wild-type embryos, this ratio has a mean of 1.87 and a standard deviation of 0.64, which indicates that the anterior levels of dpERK are significantly higher than the posterior levels (t test, $p < 10^{-5}$).

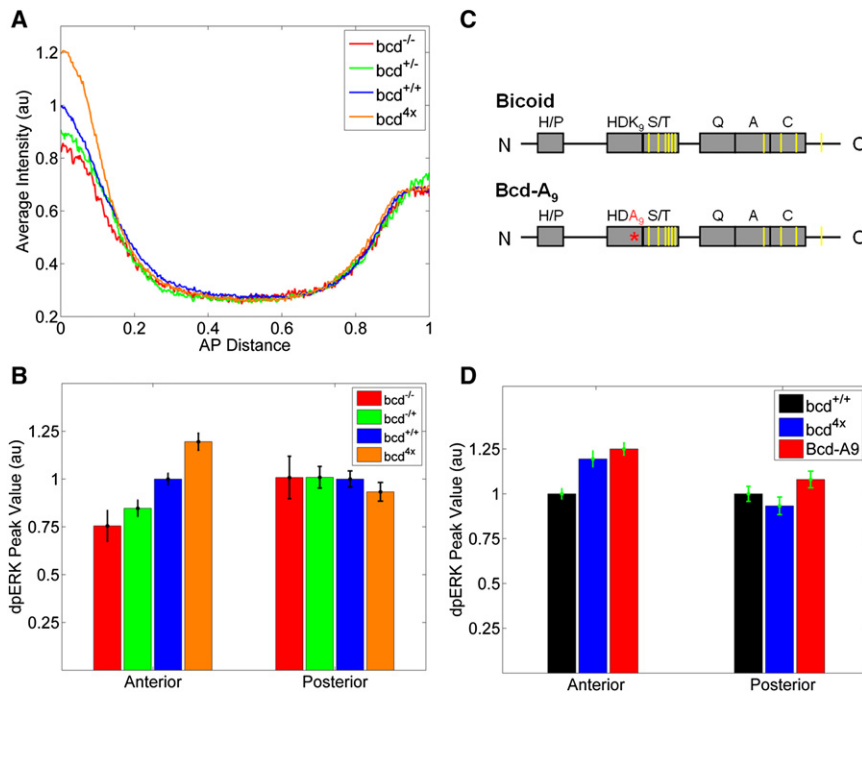
transcriptional targets of Bcd would affect the levels of MAPK phosphorylation. To distinguish between these two alternatives, we used the *bcd* transgene (*Bcd-A₉*), which encodes a Bcd variant that has an impaired ability to bind its DNA recognition sequence [24] but still contains all of the sites required for binding to and phosphorylation by MAPK (Figure 2C). We first confirmed that the expression of *hunchback* (*hb*), a direct target of Bcd, was not affected in embryos with two copies of wild-type *bcd* and two copies of the *Bcd-A₉* transgene (data not shown). Remarkably, the anterior level of dpERK was significantly increased in these embryos (Figure 2D). In fact, the anterior level of dpERK was indistinguishable from the anterior level of dpERK in embryos with two extra copies of wild-type *bcd* (*bcd^{4x}*). Taken together, these results imply that Bcd can affect the level of MAPK phosphorylation independently of its transcriptional activity.

The results presented so far are consistent with the idea that Bcd makes phosphorylated MAPK less available for binding to and dephosphorylation by the MAPK phosphatase. According to the same model, Bcd can make the phosphorylated MAPK less available for its other substrates. To explore this possibility, we examined the distribution of Cic, which is downregulated at the poles as a result of its direct phosphorylation by MAPK (Figures 3A–3C). Statistical analysis revealed that, similar to the wild-type pattern of dpERK, the wild-type pattern of Cic is asymmetrical, with the levels of Cic significantly higher at the anterior pole (Figure 3D). Because the distribution of Cic is uniform in the absence of MAPK signaling, the wild-type pattern of Cic downregulation suggests that, although the level of MAPK phosphorylation is higher at the anterior pole, its activity directed toward Cic is actually lower.

We emphasize that this observation argues against the possibility that the AP asymmetry of the wild-type MAPK phosphorylation pattern is generated only by the asymmetry in the extracellular activation of Tor. If this were true, then higher levels of MAPK phosphorylation at the anterior pole would lead to a higher level of Cic downregulation, which is contrary to what we observed. Based on this, we argue that the AP asymmetry of the wild-type MAPK signaling pattern is generated mainly by the intracellular asymmetries of the early embryo. Upon quantifying the spatial pattern of Cic downregulation in embryos with varying levels of Bcd, we established that this asymmetry is increased in embryos with an extra copy of *bcd* and reduced in embryos with progressively lowered levels of *bcd* (Figure 3E). These effects are consistent with the model, in which anteriorly localized Bcd acts as a competitive inhibitor of MAPK-mediated Cic downregulation.

If Bcd is the only source of the AP asymmetries of MAPK phosphorylation and Cic downregulation, then both of these patterns should become symmetric in *bcd* null embryos. Surprisingly, however, we found that both MAPK phosphorylation and Cic downregulation exhibited a significant amount of AP asymmetry even in the *bcd* mutant embryos (Figures 4A and 4B). It is possible that this residual asymmetry reflects the presence of an additional MAPK substrate that is nonuniformly distributed in *bcd* null embryos and contributes to the AP asymmetry of MAPK signaling in this genetic background.

One candidate for this residual asymmetry is Hunchback (Hb), a transcription factor that plays a key role in the embryonic AP patterning [25, 26]. The distribution of Hb protein depends on both maternal and zygotic inputs [25, 27]. Briefly,



(D) Embryos expressing two wild-type *bcd* and two copies of the *bcd-A₉* transgene show increased phosphorylation of MAPK at the anterior poles, similar to embryos with four copies of wild-type *bcd* (*bcd^{4x}*). Mean \pm SE of 20–30 embryos for each genotype is shown; * denotes a statistically significant difference from the wild-type (t test, $p < 0.01$).

Figure 2. The Anterior Level of dpERK Responds to Changes in the Level of Bcd

(A) The AP gradient of dpERK in progeny of females with different *bcd* copy number. Each line indicates an average gradient of dpERK for 20–25 individual embryos of the same genotype. Note that the anterior level of dpERK changes as the amount of maternal *bcd* present is altered, whereas posterior levels are not affected.

(B) Changes in the anterior and posterior levels of dpERK as a function of maternal *bcd* copy number. Each bar represents an average of MAPK phosphorylation for 20–25 individual embryos of the same genotype, with standard error (SE) indicated. The data are normalized such that the values of wild-type (*bcd^{+/+}*, embryos marked with histone-GFP) are set at 1. Only the anterior level shows an increasing trend as a function of *bcd* copy number (generalized linear model: $p_{\text{anterior}} = 2.9 \times 10^{-8}$, $p_{\text{posterior}} = 0.30$).

(C) Schematics of Bcd and a Bcd variant (*Bcd-A₉*) used in the experiments. Gray boxes show the following domains in the Bcd protein: the proline-histidine repeat (H/P), the DNA-binding domain (homeodomain, HD), the serine-threonine (S/T)-rich domain, a glutamine-rich domain (Q), an alanine-rich domain (A), and an acidic domain (C). Putative MAPK phosphorylation sites (based on [14]) are indicated by yellow bars. *Bcd-A₉* encodes a Bcd variant with a single lysine-to-alanine amino acid substitution at position 50 of the homeodomain (K₅₀ to A₉, shown in red).

maternal *hb* transcript is deposited uniformly, but its translation is repressed in the posterior region of the embryo by Nos, resulting in an anterior gradient of maternal Hb protein. In the anterior half of the embryo, *hb* is also zygotically activated by Bcd, providing an additional gradient of zygotic Hb protein (Figure 4C). As a consequence of its dual control by Bcd and Nos, the pattern of Hb protein is not symmetric in *bcd* null embryos: the levels of Hb are still higher at the anterior pole. This led us to test whether, similar to Bcd and Cic, Hb

acts as a hitherto-unrecognized MAPK substrate that modulates the patterns of MAPK phosphorylation and Cic downregulation along the AP axis.

Indeed, in a proteomics screen aimed at identifying potential MAPK substrates in the early blastoderm embryo, we found that Hb is phosphorylated by MAPK in vitro. Like Bcd and Cic, and unlike Runt and other segmentation gene products, Hb displays a MAPK-dependent electrophoretic mobility shift on SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

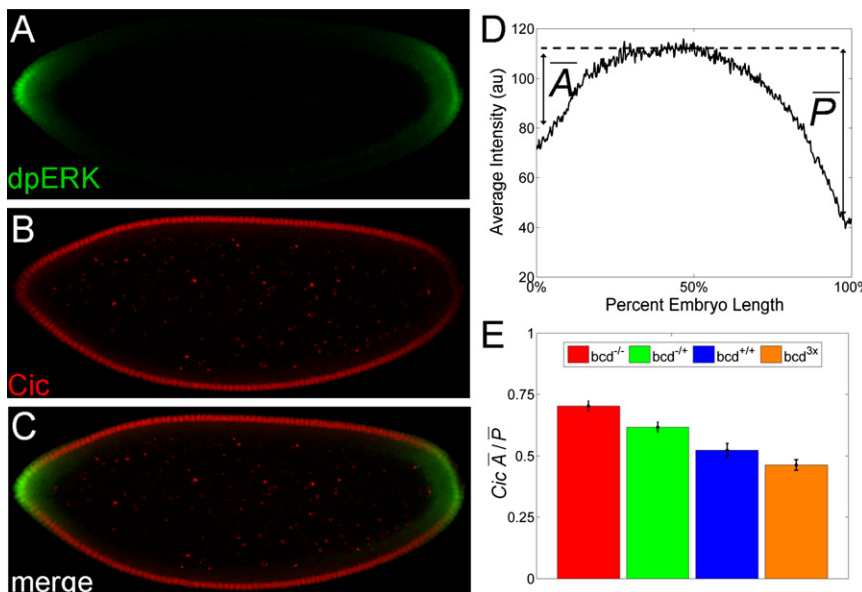


Figure 3. Asymmetry of Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Downregulation of Cic

(A–C) Coimmunostaining reveals the spatial patterns of dpERK (green) and Cic (red).

(D) Averaged AP gradient of nuclear Cic at cell cycle 14 from 40 embryos. The dashed line indicates reference level of Cic repression. Similar to MAPK phosphorylation gradient, Cic pattern also exhibits a clear AP asymmetry.

(E) The dose of *bcd* affects the asymmetry of the spatial pattern of Cic downregulation in the early embryo. Each bar represents an average asymmetry of nuclear Cic gradient for 40–90 embryos of the same genotype. As the amount of maternal *bcd* mRNA is lowered, the anterior and posterior levels of Cic become more symmetric (generalized linear model: $p = 2.5 \times 10^{-12}$).

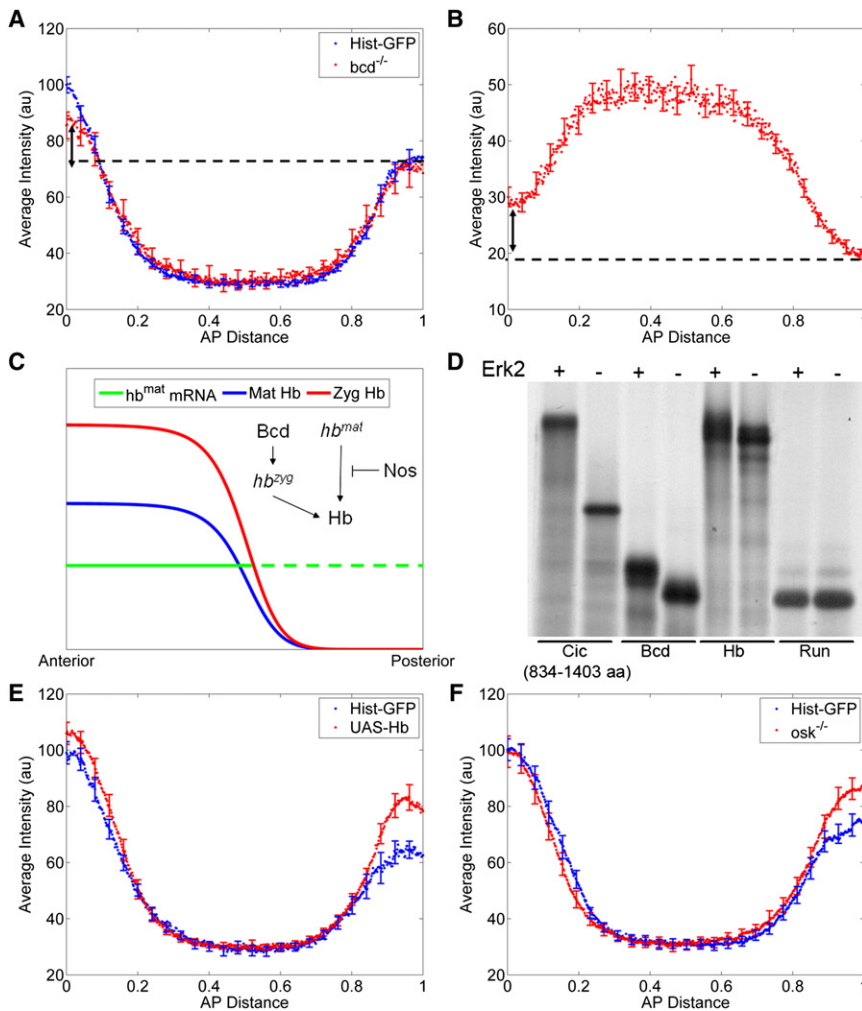


Figure 4. Hb Is a New Substrate of Mitogen-Activated Protein Kinase in the Embryo

(A) Comparison of the dpERK gradients in wild-type (histone-GFP) embryos and embryos from *bcd* null mothers. Average dpERK gradients for each genotype ($n \sim 15$) are plotted with SE indicated. Although the anterior levels of dpERK in *bcd* null embryos are lower than that in wild-type, the gradient is still asymmetric along the AP axis (arrow).

(B) Averaged AP gradient of nuclear Cic at cell cycle 14, obtained from 27 embryos laid by *bcd* null flies. Similar to the dpERK gradient, the Cic pattern is still asymmetric along the AP axis (arrow).

(C) Simplified description of Hunchback (Hb) regulation in a wild-type embryo. Maternal *hb* mRNA is deposited uniformly throughout the embryo (green), but its translation is repressed in the posterior half by Nos (dashed green), resulting in anterior gradient of maternal Hb protein (blue). At the anterior half of the embryo, Bcd activates zygotic *hb* transcription, which further adds to the preexisting Hb gradient (red). Note that even in the absence of Bcd, Hb protein is still present in anterior gradient (blue).

(D) Radiolabeled Hb migrates with slower mobility on SDS polyacrylamide gel electrophoresis following incubation in the presence (+), but not in the absence (-), of activated ERK2, indicating that Hb is phosphorylated by MAPK. Similar mobility shift is observed for known targets of MAPK, such as Cic and Bcd, but not for Runt. Note that Hb contains several consensus MAPK phosphorylation sites.

(E) Ubiquitous expression of *hb* with a maternal GAL4 driver leads to an increase in MAPK phosphorylation at both the anterior and posterior poles of the embryo (t test: $p_{\text{anterior}} = 0.03$, $p_{\text{posterior}} = 0.01$); average dpERK gradients for each genotype ($n \sim 25\text{--}30$) are plotted with SE indicated.

(F) Quantifying the dpERK gradient in embryos mutant for *oskar* (*osk*) shows an increase in MAPK phosphorylation at the posterior region. In *osk* null embryos, maternal *hb* mRNA is translated at the posterior of the embryo. Average dpERK gradients for each genotype ($n \sim 25\text{--}30$) are plotted with SE indicated.

(Figure 4D; data not shown). To test whether Hb can affect the level of MAPK phosphorylation in vivo, we examined MAPK phosphorylation in embryos with uniform maternal expression of Hb. We found that Hb expression leads to a statistically significant increase in the posterior dpERK signal, as would be expected if Hb was acting as a MAPK substrate in the early embryo (Figure 4E). To summarize, the proposed substrate competition model accounts for the experimentally observed AP asymmetry of the wild-type patterns of MAPK phosphorylation and the activity toward its substrates, predicts how this asymmetry responds to multiple genetic perturbations, and identifies Hb as a novel potential target of MAPK phosphorylation.

In addition, the proposed model can account for the previously unexplained genetic interaction between the posterior and terminal systems. It was established that removal of posterior patterning determinants (Nos or Oskar [Osk]) increases the posterior level of Cic and consequently reduces the posterior expression domains of its targets, *tll* and *hkb* [4]. In light of our results, these effects can be interpreted by the fact that, in *nos*⁻ or *osk*⁻ embryos, ectopic Hb acts as a competitive substrate of MAPK, reducing its ability to downregulate Cic. This would be analogous to the effect at the

anterior pole, where downregulation of Cic is antagonized by Bcd. In partial confirmation of this model, we found that removal of either *nos* or *osk* increases the posterior level of dpERK, indicating that increased amounts of Hb, like Bcd, can influence the level of MAPK phosphorylation (Figure 4F). Thus, a common substrate competition mechanism can provide a basis for the modulation of MAPK signaling by the anterior and posterior systems. Going beyond the early fruit fly embryo, we propose that competitive interactions can provide a general control strategy in signaling networks where enzymes, such as MAPK, interact with their multiple regulators and targets [5–9, 19, 28–35].

Experimental Procedures

Drosophila Strains and Whole-Mount Immunostaining

The following stocks were used in this study: histone-GFP (a gift from E. Wieschaus), *bcd*^{E1}, *bcd*^{dx}, *osk*⁶, *nos*^{BN}, *Cic*-HA; *cic*¹ [3], *Cic*-HA; *cic*¹ *bcd*^{E1}, *UAS*-*hb* (a gift from N. Dostatni), and *Bcd*-A₉ [24]. All flies were raised and embryos were collected at 25°C. Antibody stainings were performed as described in [17]. Monoclonal mouse anti-dpERK (1:100, Sigma) and polyclonal rabbit anti-HA (1:500, Roche) were used as primary antibodies. Alexa Fluor and Oregon green (1:500, Invitrogen) were used as secondary antibodies.

Microscopy and Image Processing

Imaging was done on a Zeiss LSM510 confocal microscope, with a Zeiss 20× (NA 0.6) A-plan objective. High-resolution images (512 × 512 pixels, 12 bits depth) were obtained from the focal plane in the midhorizontal cross section of the embryo. Images of individual embryos were automatically extracted from raw confocal images and reoriented for gradient quantification, as described elsewhere [17].

In Vitro MAPK/ERK2 Phosphorylation Assays

Proteins were synthesized and labeled with the Quick TNT-coupled rabbit reticulocyte lysate system (Promega) in the presence of [³⁵S]-methionine. Labeled proteins were then incubated with (or without) 0.2 μg of active ERK2, in a total volume of 50 μl of kinase reaction buffer (20 mM HEPES, 0.1 mM benzamidine, 25 mM beta-glycerophosphate, 0.1 mM DTT, 1 mM Na₂VO₄, 10 mM MgCl₂, and 0.1 mM ATP) for 30 min at 30°C. Reactions were stopped by adding SDS sample buffer ×3 (0.25 M Tris pH 6.8, 6% SDS, 30% glycerol, B-mercapto-ethanol, and a few grains of Bromophenol-blue). The phosphorylation state of the proteins was subsequently analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. To activate ERK2, we expressed a HIS-tagged ERK2 fusion protein in *Escherichia coli*, purified it on nickel beads (QIAGEN), and activated it with active MEK1 (Upstate).

Statistical Analysis

A paired t test was used to compare the mean levels of both anterior and posterior dpERK between wild-type and mutant embryos of interest. For this analysis, dpERK gradients were extracted from 20–30 wild-type and mutant embryos, and the dpERK levels were determined as described in Figure S1. To examine the correlation between the amount of Bcd and the level of MAPK phosphorylation, we employed a generalized linear model (GLM) with copies of *bcd* as the independent variable and either the anterior or posterior dpERK levels as the response variable. Similarly, a GLM was also used to show the correlation between the *bcd* copy number and the Cic asymmetry, where Cic asymmetry is defined as the ratio of anterior to posterior repressions of Cic, as described in Figure S1.

Supplemental Information

Supplemental Information includes one figure and can be found with this article online at doi:10.1016/j.cub.2010.01.019.

Acknowledgments

We thank E. Wieschaus, T. Schüpbach, M. Lemmon, R. Steward, A. Ninfa, S. Merajver, M. Levine, A. Veraksa, M. Tipping, and all members of the Shvartsman laboratory for helpful discussions and comments on the paper. We thank E. Wieschaus, O. Grimm, N. Dostatni, S. Small, S. Hanes, and J. Dubuis for flies and reagents. We are grateful to N. Yakoby and J. Zartman for help with molecular characterization of the Bcd-A₃ flies and to A. Boettiger for his contribution to the development of image processing tools. S.Y.S. is supported by the R01 GM078079 National Institutes of Health grant. Z.P. is supported by grants from the Israel Science Foundation (Center of Excellence; 180/09), Israel Cancer Research Fund, and the Król Charitable Foundation. G.J. is supported by the Spanish Ministry of Science and Education (BFU2005-02673) and by Institutió Catalana de Recerca i Estudis Avançats.

Received: January 15, 2009

Revised: January 4, 2010

Accepted: January 5, 2010

Published online: February 18, 2010

References

1. Furriols, M., and Casanova, J. (2003). In and out of Torso RTK signalling. *EMBO J.* 22, 1947–1952.
2. Jiménez, G., Guichet, A., Ephrussi, A., and Casanova, J. (2000). Relief of gene repression by torso RTK signaling: role of capicua in Drosophila terminal and dorsoventral patterning. *Genes Dev.* 14, 224–231.
3. Astigarraga, S., Grossman, R., Díaz-Delfín, J., Caelles, C., Paroush, Z., and Jiménez, G. (2007). A MAPK docking site is critical for downregulation of Capicua by Torso and EGFR RTK signaling. *EMBO J.* 26, 668–677.
4. Cinnamon, E., Gur-Wahnon, D., Helman, A., St Johnston, D., Jiménez, G., and Paroush, Z. (2004). Capicua integrates input from two maternal systems in Drosophila terminal patterning. *EMBO J.* 23, 4571–4582.
5. Popescu, S.C., Popescu, G.V., Bachan, S., Zhang, Z.M., Gerstein, M., Snyder, M., and Dinesh-Kumar, S.P. (2009). MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.* 23, 80–92.
6. Shaul, Y.D., and Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1213–1226.
7. Goldsmith, E.J., Akella, R., Min, X., Zhou, T., and Humphreys, J.M. (2007). Substrate and docking interactions in serine/threonine protein kinases. *Chem. Rev.* 107, 5065–5081.
8. Zhu, X., Gerstein, M., and Snyder, M. (2007). Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes Dev.* 21, 1010–1024.
9. von Kriegsheim, A., Baiocchi, D., Birtwistle, M., Sumpton, D., Bienvenut, W., Morrice, N., Yamada, K., Lamond, A., Kalna, G., Orton, R., et al. (2009). Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nat. Cell Biol.* 11, 1458–1464.
10. Sheridan, D.L., Kong, Y., Parker, S.A., Dalby, K.N., and Turk, B.E. (2008). Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J. Biol. Chem.* 283, 19511–19520.
11. St Johnston, D., and Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo. *Cell* 68, 201–219.
12. Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B.E., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M.H. (2001). MAP kinases. *Chem. Rev.* 101, 2449–2476.
13. Cinnamon, E., Helman, A., Ben-Haroush Schyr, R., Orian, A., Jiménez, G., and Paroush, Z. (2008). Multiple RTK pathways downregulate Groucho-mediated repression in Drosophila embryogenesis. *Development* 135, 829–837.
14. Janody, F., Sturny, R., Catala, F., Desplan, C., and Dostatni, N. (2000). Phosphorylation of bicoid on MAP-kinase sites: contribution to its interaction with the torso pathway. *Development* 127, 279–289.
15. Ronchi, E., Treisman, J., Dostatni, N., Struhl, G., and Desplan, C. (1993). Down-regulation of the Drosophila morphogen bicoid by the torso receptor-mediated signal transduction cascade. *Cell* 74, 347–355.
16. Gabay, L., Seger, R., and Shilo, B.Z. (1997). MAP kinase in situ activation atlas during Drosophila embryogenesis. *Development* 124, 3535–3541.
17. Coppey, M., Boettiger, A.N., Berezkhovskii, A.M., and Shvartsman, S.Y. (2008). Nuclear trapping shapes the terminal gradient in the Drosophila embryo. *Curr. Biol.* 18, 915–919.
18. Furriols, M., Ventura, G., and Casanova, J. (2007). Two distinct but convergent groups of cells trigger Torso receptor tyrosine kinase activation by independently expressing torso-like. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 11660–11665.
19. Bardwell, A.J., Abdollahi, M., and Bardwell, L. (2003). Docking sites on mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinases, MAPK phosphatases and the Elk-1 transcription factor compete for MAPK binding and are crucial for enzymic activity. *Biochem. J.* 370, 1077–1085.
20. Zhang, J., Zhou, B., Zheng, C.F., and Zhang, Z.Y. (2003). A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *J. Biol. Chem.* 278, 29901–29912.
21. Zhou, B., Wu, L., Shen, K., Zhang, J.L., Lawrence, D.S., and Zhang, Z.Y. (2001). Multiple regions of MAP kinase phosphatase 3 are involved in its recognition and activation by ERK2. *J. Biol. Chem.* 276, 6506–6515.
22. Zhou, B., Zhang, J.L., Liu, S.J., Reddy, S., Wang, F., and Zhang, Z.Y. (2006). Mapping ERK2-MKP3 binding interfaces by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 281, 38834–38844.
23. Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., and Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat. Cell Biol.* 2, 110–116.
24. Hanes, S.D., Riddihough, G., Ish-Horowicz, D., and Brent, R. (1994). Specific DNA recognition and intersite spacing are critical for action of the bicoid morphogen. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3364–3375.
25. Struhl, G. (1989). Differing strategies for organizing anterior and posterior body pattern in Drosophila embryos. *Nature* 338, 741–744.
26. Yu, D., and Small, S. (2008). Precise registration of gene expression boundaries by a repressive morphogen in Drosophila. *Curr. Biol.* 18, 868–876.
27. Tautz, D. (1988). Regulation of the Drosophila segmentation gene hunchback by two maternal morphogenetic centres. *Nature* 332, 281–284.

28. Qiao, L., Nachbar, R.B., Kevrekidis, I.G., and Shvartsman, S.Y. (2007). Bistability and oscillations in the Huang-Ferrell model of MAPK signaling. *PLoS Comput. Biol.* *3*, 1819–1826.
29. Ventura, A.C., Sepulchre, J.A., and Merajver, S.D. (2008). A hidden feedback in signaling cascades is revealed. *PLoS Comput. Biol.* *4*, e1000041.
30. Legewie, S., Schoeberl, B., Blüthgen, N., and Herzog, H. (2007). Competing docking interactions can bring about bistability in the MAPK cascade. *Biophys. J.* *93*, 2279–2288.
31. Markevich, N.I., Hoek, J.B., and Kholodenko, B.N. (2004). Signaling switches and bistability arising from multisite phosphorylation in protein kinase cascades. *J. Cell Biol.* *164*, 353–359.
32. Kusari, A.B., Molina, D.M., Sabbagh, W., Jr., Lau, C.S., and Bardwell, L. (2004). A conserved protein interaction network involving the yeast MAP kinases Fus3 and Kss1. *J. Cell Biol.* *164*, 267–277.
33. Kim, S.Y., and Ferrell, J.E., Jr. (2007). Substrate competition as a source of ultrasensitivity in the inactivation of Wee1. *Cell* *128*, 1133–1145.
34. Kholodenko, B.N., Demin, O.V., Moehren, G., and Hoek, J.B. (1999). Quantification of short term signaling by the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* *274*, 30169–30181.
35. Blackwell, E., Kim, H.J., and Stone, D.E. (2007). The pheromone-induced nuclear accumulation of the Fus3 MAPK in yeast depends on its phosphorylation state and on Dig1 and Dig2. *BMC Cell Biol.* *8*, 44.

INFORME DEL DIRECTOR

Participación de Leiore Ajuria Astobiza en los artículos presentados en su Tesis Doctoral

1. Ajuria *et al.* (2011) Capicua DNA binding sites are general response elements for RTK signaling in *Drosophila*. *Development* **138**, 915-924.

Este artículo presenta un extenso trabajo experimental que ha sido realizado en su mayor parte por Leiore Ajuria. El artículo describe las actividades reguladoras directas de la proteína Capicua (Cic), un sensor de señales Ras-MAPK, en tres contextos distintos del desarrollo de *Drosophila*: el sistema terminal del embrión, la subdivisión del neuroectodermo embrionario y la formación del patrón de venas en el ala. El trabajo es importante porque proporciona un modelo unificado del modo en que distintas señales Ras-MAPK generan respuestas específicas durante el desarrollo. Para ello, Leiore ha caracterizado la expresión de cuatro genes distintos (*huckebein*, *tailless*, *intermediate neuroblasts defective* y *argos*) y ha definido las secuencias reguladoras en sus regiones *enhancer* que responden a la actividad represora de Cic. Además, Leiore ha analizado tres elementos *enhancer* artificiales que contienen diversas combinaciones de secuencias reguladoras endógenas junto a lugares de unión sintéticos para los factores Cic, Bicoid (Bcd) y GAL4. En conjunto, Leiore ha generado y analizado líneas transgénicas portadoras de 15 construcciones *reporter* distintas que aparecen en el artículo, además de otros cuatro transgenes adicionales que han servido de soporte al trabajo pero que no se muestran en los resultados. Es oportuno destacar que algunas de estas construcciones han resultado especialmente laboriosas, ya que su generación consta de múltiples pasos que emplean técnicas sofisticadas de biología molecular.

Por otra parte, el trabajo de Leiore ha supuesto un extenso conjunto de experimentos genéticos en distintos fondos mutantes, tanto en el embrión como en el ala. Estos experimentos han requerido una planificación y dedicación notables, especialmente durante la generación de clones en la línea germinal para el análisis de embriones desprovistos de la funciones maternas de *groucho*, *cic* y/o *Ras*. Además, Leiore ha generado nuevas cepas con cromosomas recombinantes que han resultado imprescindibles para sus análisis en el disco de ala.

Finalmente, Leiore ha realizado la mayoría de los análisis embriológicos e histoquímicos presentados en el artículo, así como sus correspondientes análisis de microscopía y procesamiento de imágenes. En conjunto, Leiore ha procesado más de 1000 imágenes que forman parte de los resultados presentados en el artículo.

En resumen, Leiore ha llevado a cabo la gran mayoría de los experimentos presentados en las Figuras 1, 2, 4, 5, S1, S3 y S4 del artículo. Otros autores han contribuido en diferentes aspectos del trabajo. Así, C. Winkler, D. Kuo y A. J. Courey llevaron a cabo los experimentos mostrados en la Figura 3; C. Nieva realizó los experimentos presentados en la Figura S2 y colaboró en los experimentos de la Figura 5; N. Samper, proporcionó soporte técnico al trabajo; M. J. Andreu generó líneas transgénicas que expresan la construcción *CUASC-lacZ*, A. Helman y Z. Paroush han proporcionado información esencial para desarrollar los análisis presentados en la Figura 4; y S. González-Crespo ha participado en la concepción e interpretación de los experimentos del trabajo.

Los experimentos presentados en la Figura 3 del artículo han servido como material complementario y de discusión en la tesis doctoral de C. Winkler (“*A functional analysis of the corepressor Groucho in the development of Drosophila melanogaster*”; University of California, Los Angeles).

2. Andreu *et al.* (2012) Mirror represses *pipe* expression in follicle cells to initiate dorsoventral axis formation in *Drosophila*. *Development* **138**, 915-924.

Este artículo define el mecanismo de regulación transcripcional de *pipe*, un gen clave en el establecimiento de la polaridad dorsoventral en *Drosophila*. En este artículo, Leiore llevó a cabo los experimentos que sirvieron como punto de partida para la realización del trabajo. Concretamente, la contribución de Leiore ha consistido en definir las secuencias reguladoras del gen *pipe* responsables de su expresión ventral en el epitelio folicular. Mediante el análisis de construcciones *reporter* en ovarios transgénicos, Leiore identificó un *enhancer* de 0.6 kb que responde a la actividad represora de la señal de Gurken/EGFR en células dorsales. Leiore también mostró que esta respuesta depende de un elemento conservado de 39 bp presente en el *enhancer* (elemento *r1*; véase la Fig. 2 del trabajo). Estos resultados permitieron a continuación mostrar que Cic regula de manera indirecta la expresión del *enhancer*, así como caracterizar la interacción directa de Mirror con el elemento *r1*.

Estos resultados no han sido presentados en ninguna otra tesis doctoral.

3. Kim *et al.* (2010) MAPK substrate competition integrates patterning signals in the *Drosophila* embryo. *Curr. Biol.* **20**, 446-451.

Este trabajo caracteriza un nuevo mecanismo de control materno en *Drosophila* mediado por competición enzimática entre sustratos de MAPK (Cic, Bcd y Hunchback). Dicho mecanismo produce cambios en la respuesta de los distintos sustratos a la regulación de MAPK, modulando en el caso de Cic su nivel de acumulación en el núcleo. Para obtener estas conclusiones, ha sido necesario llevar a cabo un análisis cuantitativo de la distribución de Cic en los polos anterior y posterior de embriones silvestres y mutantes. Estos experimentos se han llevado a cabo utilizando una serie de stocks generados por Leiore donde la proteína Cic endógena se encuentra reemplazada por una forma marcada con el epitopo HA (Cic-HA), la cual permite una detección altamente específica de la proteína. Estos stocks incluyen además cepas que permitieron cuantificar la proteína Cic-HA en embriones mutantes para Bcd. Las combinaciones genéticas generadas por Leiore requirieron una dedicación y un esfuerzo considerables a lo largo de varios meses.

Este trabajo constituye parte de la tesis doctoral de Y. Kim ("*Quantitative analysis of signaling pathways: Imaging and modeling of the terminal patterning system of the Drosophila embryo*"; Princeton University).

En conclusión, el trabajo de Leiore ha contribuido a caracterizar molecularmente las respuestas de cinco genes distintos a la vía Ras-MAPK en *Drosophila*. Estos análisis se han llevado a cabo en el embrión, el disco imaginal de ala y el ovario, haciendo uso de un gran número de líneas transgénicas y fondos mutantes. En conjunto, los resultados obtenidos por Leiore suponen un avance notable para comprender el modo en que la vía Ras-MAPK induce respuestas génicas específicas en diferentes contextos del desarrollo.

Fdo. Gerardo Jiménez

