



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Caracterización del locus *aca1* y su relación con la vía de señalización de la cinasa de Jun (JNK) en *Drosophila melanogaster*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA:
LIBB. LUIS DANIEL RÍOS BARRERA

TUTOR:
DR. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. CARMEN CLAPP JIMÉNEZ LABORA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DR. JESÚS CHIMAL MONROY
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

JURIQUILLA, QUERÉTARO, 28 DE FEBRERO DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Queda prohibido llorar sin aprender,
levantarme un día sin saber qué hacer,
tener miedo a mis recuerdos,
sentirme sólo alguna vez.

Queda prohibido no sonreír a los problemas,
no luchar por lo que quiero,
abandonarlo todo por tener miedo,
no convertir en realidad mis sueños.

Queda prohibido dejar a mis amigos,
no intentar comprender lo que vivimos,
llamarles sólo cuando les necesito,
no ver que también nosotros somos distintos.

Queda prohibido no ser yo ante la gente,
fingir ante las personas que no me importan,
hacerme el gracioso con tal de que me recuerden,
olvidar a toda la gente que me quiere.

Queda prohibido no hacer las cosas por mí mismo,
no creer en mi y no hacer mi destino,
tener miedo a la vida y a sus castigos,
no vivir cada día como si fuera un último suspiro.

Queda prohibido no intentar comprender a las personas,
pensar que sus vidas valen más o menos que la mía,
no saber que cada uno tiene su camino y su dicha,
pensar que con su falta el mundo se termina.

Queda prohibido no crear mi historia,
dejar de dar las gracias a mi familia por mi vida,
no tener un momento para la gente que me necesita,
no comprender que lo que la vida nos da, también nos lo quita.

Alfredo Cuervo Barrero (Modificado).

Dedico esta tesis a Silvia Barrera, mi madre. Con el ejemplo, me enseñaste a luchar y a soñar, y gracias a eso, el día de hoy soy quien soy. Jamás dejaré de agradecer y admirar tu amor y tus sacrificios.

A Adriana, mi hermana, mi confidente y mi protectora.

A mis tíos: Chela, Luisa, Angel y Alfonso, mis segundos padres.

A mis primos: Margarita, Luis, Sergio, Ramón, Iritna y Lili, mis hermanos mayores.

A mis sobrinos Kamila y Juan Pablo, que espero lean esto algún día :)

A mi familia en Querétaro: Eduardo Rojas (Lalingui), Karla Vega y Azalea Reyes, no sé quién sería hoy sin haberlos conocido.

A mi tutor y amigo Juan Riesgo, por tus enseñanzas y tu apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A mi papá, José Luis Ríos, por estos años que nos reencontramos en Querétaro.

A María Eugenia Torres, por enseñarme, aconsejarme y motivarme a seguir avanzando.

A mis tutores, Jesús Chimal y Carmen Clapp, por su apoyo a lo largo de mi formación.

A todas las personas que han estado cerca de mi, de una u otra manera, en uno u otro momento. En el DF, mis hermanitas: Jimena Olguín, Patricia Garay, Brenda Paredes y Natalia Martagón. En Querétaro: Karyna Yc, Ximena Castillo, Mario Nava, Silvia Angulo, Amanda Raggi, Alejandro Martínez, Raúl Hernández, Laura Cuaya, Yutsil Leyva, Leticia Robles, Penélope Martínez, Juan Carlos Méndez, Laura Pinedo, Benjamín Velarde, Juan Manuel Murillo, Aldo Tellez y Miguel Angel Mendoza.

ÍNDICE

I. AGRADECIMIENTOS.....	6
II. LISTA DE FIGURAS.....	7
III. RESUMEN.....	9
IV. ABSTRACT.....	10
V. INTRODUCCIÓN.....	11
VI. ANTECEDENTES.....	14
1. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	14
2. Desarrollo embrionario de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
3. Vías de señalización de tipo MAPK.....	18
4. La vía de señalización de JNK.....	20
5. El cerrado dorsal como modelo de estudio de la vía de JNK.....	21
VII. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	26
VIII. HIPÓTESIS.....	27
IX. OBJETIVO GENERAL.....	27
X. OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
XI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	28
1. Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>	28
2. Mapeo genético y molecular.....	29
3. Construcciones de rescate.....	29
4. Preparaciones de cutículas embrionarias.....	30
5. Hibridación <i>in situ</i>	30
6. Tinción con X-gal.....	31

7. Northern blots.	32
8. Northern blots para RNAs pequeños.	32
9. Enriquecimiento de RNA nuclear.	33
10. Retrotranscripción, PCR semi-cuantitativa, y PCR en tiempo real.	33
11. Microscopía de fluorescencia (transgenes fluorescentes).	34
12. Inmunofluorescencia de montaje completo de embriones y cerebros larvarios.	34
13. Microscopía electrónica de barrido.	35
14. Cálculo de índice de hendidura torácica.	35
15. Cálculo del índice de curvatura del ala.	35
16. Cuantificación de peines sexuales ectópicos.	36
17. Análisis transcriptómico.	36
18. Bioinformática.	37
19. Análisis estadístico.	37
XII. RESULTADOS.	39
1. Cuantificación de los fenotipos cuticulares de embriones mutantes de <i>acal</i>	39
2. Las mutaciones de <i>acal</i> mapean genética y molecularmente a un gen no anotado.	40
3. <i>acal</i> es un RNA no codificante.	48
4. Expresión de <i>acal</i> durante el desarrollo embrionario.	54
5. <i>acal</i> regula negativamente la vía de JNK durante el cerrado dorsal.	57
6. <i>acal</i> actúa debajo de <i>raw</i> , un regulador negativo de la vía de JNK.	62
7. <i>acal</i> y <i>raw</i> regulan la expresión de <i>Cka</i> , una proteína de andamiaje de la vía de JNK. ...	67
8. <i>acal</i> y <i>raw</i> regulan la expresión de <i>aop</i> , un factor de transcripción regulador de la vía de JNK.	70
9. <i>acal</i> y <i>raw</i> interactúan genéticamente con <i>Polycomb</i>	72
10. Análisis del transcriptoma de los embriones mutantes de <i>acal</i>	77
11. Participación de <i>acal</i> en otros procesos del desarrollo: Defectos en la formación del sistema nervioso de los embriones mutantes de <i>acal</i>	80

12. Defectos en el sistema nervioso de las larvas mutantes de <i>acaI</i>	83
13. Identificación de genes involucrados en la hiperplasia del sistema nervioso en embriones y larvas mutantes para <i>acaI</i>	85
XIII. DISCUSIÓN.	92
XIV. REFERENCIAS.....	100
XV. ANEXOS.....	112
1. Portada de revista.....	112
2. Artículo de revisión.	112
3. Artículo de investigación original.	112

I. AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Genética de transducción de señales, del departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, de Agosto de 2009 a Mayo de 2014.

El comité tutor que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo conformado por el Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar y la Dra. Carmen Clapp Jiménez Labora, del Instituto de Neurobiología, UNAM, y por el Dr. Jesús Chimal Monroy, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo técnico de las siguientes unidades y personal académico:

Unidad de Enseñanza:

Dra. Aurea Orozco Rivas

M. en C. Leonor Casanova Rico

Ma. Del Carmen Vázquez Rodríguez

Unidad de Proteogenómica:

Dra. Anaid Antaramian Salas

M. en C. Adriana González Gallardo

Dr. Micheal Jeziorski

Unidad de Microscopía:

Ing. Nydia Hernández Ríos

Unidad de Videoconferencia:

Lic. Lourdes Lara Ayala

Unidad de Cómputo:

Ing. Ramón Martínez Olvera

Ing. Alberto Lara R

Ing. Sandra Hernández García

Biblioteca del Campus Juriquilla:

Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela y personal de la biblioteca.

II. LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
Figura 2. El cerrado dorsal en <i>Drosophila melanogaster</i>	17
Figura 3. Mutantes para componentes de la vía de JNK muestran defectos en el cerrado dorsal.	22
Figura 4. La vía de JNK en <i>Drosophila melanogaster</i>	23
Figura 5. Cuantificación de los fenotipos cuticulares de los mutantes de <i>acal</i>	40
Figura 6. Representación esquemática de las deficiencias empleadas en el mapeo genético de <i>acal</i>	41
Figura 7. La heterocigosis para <i>acal</i> suprime el fenotipo mutante de <i>peb</i> ¹	43
Figura 8. Representación esquemática y detección del cDNA SD08925.	45
Figura 9. Rescate genómico de los alelos mutantes de <i>acal</i>	46
Figura 10. Expresión y sobre-expresión de <i>SD08925</i> en embriones mutantes de <i>acal</i>	47
Figura 11. Análisis de la conservación de <i>acal</i> y de su potencial codificante.	50
Figura 12. Detección de fragmentos de <i>acal</i> por Northern blot para RNAs pequeños.	53
Figura 13. Patrón de expresión de <i>acal</i> durante el desarrollo embrionario de embriones silvestres.	55
Figura 14. Patrón de expresión de <i>acal</i> durante el desarrollo embrionario de embriones mutantes.....	56
Figura 15. Activación del reportero TRE-DsRed durante el cerrado dorsal de embriones mutantes para <i>acal</i> y silvestres.	58
Figura 16. Expresión del reportero <i>puc</i> ^{lacZ} en embriones silvestres y mutantes para <i>acal</i> , e interacciones genéticas con componentes de la vía de JNK.	60
Figura 17. Efecto de sobre-activar la vía de JNK en embriones heterocigotos para <i>acal</i>	62
Figura 18. <i>acal</i> y <i>raw</i> actúan juntos para inhibir la vía de JNK durante el cerrado dorsal.....	64
Figura 19. Sobre-expresión de <i>acal</i> y de <i>raw</i> en el tórax.	66
Figura 20. <i>acal</i> y <i>raw</i> regulan la expresión de <i>Cka</i>	69
Figura 21. <i>aop</i> actúa río abajo de <i>acal</i>	71

Figura 22. La sobre-expresión de <i>acal</i> inhibe la expresión de <i>Cka</i> y <i>aop</i>	72
Figura 23. <i>Polycomb</i> interactúa genéticamente con <i>acal</i> y con <i>raw</i>	74
Figura 24. Los animales doble heterocigotos para <i>Pc</i> y <i>acal</i> o <i>raw</i> presentan defectos en las alas.....	75
Figura 25. Sobre-expresión de <i>lola</i> y <i>psq</i> en embriones silvestres.	76
Figura 26. Análisis del transcriptoma de los embriones mutantes de <i>acal</i>	79
Figura 27. Categorías sobre-representadas en los genes de expresión diferencial.	81
Figura 28. Defectos en el sistema nervioso en los embriones mutantes de <i>acal</i>	82
Figura 29. Fenotipos mutantes de <i>acal</i> en estadios post-embrionarios.	83
Figura 30. Diferenciación de precursores neurales en cerebros larvarios silvestres y mutantes.	85
Figura 31. Determinación por qPCR de la expresión de <i>Dl</i> y <i>l(2)gl</i> en animales silvestres y mutantes.....	87
Figura 32. Expresión de las isoformas de <i>lola</i> en embriones silvestres y mutantes para <i>acal</i> . .	88
Figura 33. Resumen de las funciones de <i>acal</i> durante el desarrollo embrionario.....	90

III. RESUMEN.

La cinasa amino-terminal de Jun (*Jun N-terminal Kinase*, JNK) y su vía de señalización se encuentran altamente conservadas en eucariontes. *Drosophila melanogaster* ha sido un organismo muy útil para identificar genes involucrados en esta vía de señalización, y para estudiar sus funciones. El primer requerimiento de la vía de JNK en *Drosophila* ocurre en el cerrado dorsal embrionario, donde dos láminas de epidermis lateral se estiran hasta fusionarse en la línea media dorsal del embrión. La vía de JNK se activa únicamente en las células más dorsales de la epidermis, donde induce cambios en la forma celular y propaga la señalización a células aledañas. A pesar de que se han descrito varios componentes de la vía de señalización de JNK y varios de sus efectores, aún no se entiende cómo se regula su activación. En este trabajo caracterizamos al gen *acaI*, un nuevo regulador de la vía de JNK durante el cerrado dorsal. Las mutaciones en *acaI* resultan en defectos en el cerrado dorsal. Nuestros resultados demuestran que estos defectos se deben a la activación ectópica de la vía de JNK en células más laterales de la epidermis, resultando en un estiramiento aberrante de la epidermis. *acaI* es un RNA no codificante largo nuclear, que se procesa a fragmentos de 40 a 120 nucleótidos de longitud, y que se expresa en la epidermis lateral. Su expresión es regulada al menos indirectamente por Raw, una proteína pionera. Nuestros resultados muestran que *acaI* y *raw* regulan la expresión de dos componentes de la vía de JNK: *Connector of kinase to AP1 (Cka)* y *Anterior open (Aop)*. *Cka* es una proteína de andamiaje entre JNK y Jun, su sustrato, y *Aop* es un factor de transcripción que favorece la diferenciación de la epidermis previo al cerrado dorsal. *acaI* interactúa genéticamente con *Polycomb (Pc)*, un componente de complejos remodeladores de la cromatina que reprime la expresión génica. Esto sugiere que *acaI* podría formar parte de complejos remodeladores de la cromatina como lo hacen otros RNAs no codificantes largos. Finalmente, mostramos que *acaI* también se expresa en el sistema nervioso y que los mutantes de *acaI* presentan hiperplasia del sistema nervioso durante la embriogénesis y el desarrollo larvario. La función de *acaI* en este tejido es independiente de su función en el cerrado dorsal, posiblemente regulando la expresión de genes aledaños con funciones neurogénicas ampliamente estudiadas.

IV. ABSTRACT.

The Jun N-terminal Kinase (JNK) and its signaling pathway are highly conserved in eukaryotes. *Drosophila melanogaster* has been a very useful model organism for the identification of genes involved in this signaling pathway, and to study its functions. The first requirement of the JNK pathway in *Drosophila* occurs during embryonic dorsal closure, where two lateral sheets of epidermis stretch until they fuse at the dorsal midline of the embryo. JNK is activated only at the most dorsal row of epidermal cells, where it induces cell shape changes and propagates the morphogenetic signal to adjacent cells. In spite of previous detailed characterizations of some JNK signaling components and effectors, how pathway activation is brought about and regulated is not well understood. In this work, we characterize the *acaI* gene, a novel regulator of JNK signaling during dorsal closure. Mutations in *acaI* give rise to dorsal closure defects. Our results show that these defects are due to ectopic JNK signaling in lateral epidermal cells, producing aberrant epidermis stretching. *acaI* is a nuclear, long non-coding RNA that is processed into fragments 40 to 120 nucleotides long, expressed in the lateral epidermis. This expression is regulated at least indirectly by Raw, a pioneer protein. Our results point that *acaI* and *raw* regulate the expression of two JNK signaling components: *Connector of kinase to AP1 (Cka)* and *anterior open (aop)*. *Cka* is a scaffold protein between JNK and Jun, its substrate. *Aop* is a transcription factor that favours lateral epidermis differentiation previous to dorsal closure. *acaI* genetically interacts with *Polycomb (Pc)*, a component of chromatin remodelling complexes that represses gene expression. This suggests that *acaI* could be a member of chromatin remodelling complexes, as other long non-coding RNAs do. Finally, we show that *acaI* is also expressed in the developing nervous system, and that *acaI* mutants show neurogenic phenotypes during embryogenesis and larval development. *acaI* function in this tissue is independent from its role in JNK signaling, possibly regulating the expression of adjacent genes that have well-known neurogenic functions.

V. INTRODUCCIÓN.

La comunicación celular es indispensable para el adecuado funcionamiento de un organismo. Las células están expuestas a una gran variedad de señales tanto endógenas como exógenas, por lo que la percepción de estímulos y la comunicación intercelular deben ser constantes para mantener la homeostasis. Para detectar el estado de su entorno, las células emplean receptores y vías de señalización que regulan el comportamiento celular en respuesta a estos estímulos. Uno de los ejemplos más dramáticos de la importancia de esta comunicación es el desarrollo embrionario. En este proceso, a partir de una célula indiferenciada se debe coordinar la proliferación y la diferenciación, y éstas a su vez, regular la morfogénesis de un organismo. Durante el desarrollo embrionario, las células interpretan su medio exterior para a partir de él, modificar su expresión génica y detonar distintas respuestas; desde cambios de forma y de posición, muerte o proliferación, hasta inducir respuestas en otras células. Por estas razones, entender cómo se genera un organismo a partir de un huevo es un campo de estudio de gran interés en sí, pero además, es un excelente “experimento natural” para entender cómo las células responden y coordinan a diferentes estímulos de su ambiente.

Uno de los modelos que ha permitido hacer este tipo de estudios es la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Este organismo muestra varias ventajas como modelo experimental, empezando con un ciclo de vida corto, una alta fecundidad, y fácil mantenimiento en el laboratorio. Al inicio del siglo XX, Thomas Hunt Morgan utilizó a *Drosophila* en estudios de genética y esto le permitió sentar las bases de la genética moderna: entre otros aportes, la teoría cromosómica de la herencia (Weiner, 1999). De esta manera, desde hace más de cien años, se han aislado y caracterizado centenas de fenotipos mutantes (Lindsley y Zimm, 1992). Subsecuentemente, en la década de los ochentas del siglo pasado, Christianne Nüsslein-Volhard y Eric Wieschaus aislaron un gran número de líneas mutantes con fenotipos embrionarios, creando así el campo de la genética del desarrollo (Jürgens et al., 1984). En consecuencia, y con el avance de la biología molecular, *Drosophila* se ha convertido en los últimos treinta años en uno de los modelos más recurridos para estudiar el desarrollo embrionario.

Las tecnologías actuales de alto rendimiento (denominadas en inglés “high throughput”) han permitido un conocimiento más profundo de la biología de *Drosophila*. No sólo su genoma es de los mejor anotados, sino que también se sabe mucho de sus genes y la expresión espacio-temporal de los mismos, de la función de sus productos, de la participación en diversos procesos, y de las homologías de estos con otras especies (McQuilton et al., 2012).

Drosophila melanogaster ha sido un modelo experimental muy útil para estudiar y caracterizar vías de señalización y su participación en el desarrollo. En primer lugar, gracias a las técnicas existentes, se pueden hacer estudios de ganancia y pérdida de función en un contexto fisiológico y del organismo completo (Venken y Bellen, 2005). En segundo lugar, por su alta fecundidad y rápido desarrollo, es posible realizar tamizajes genéticos a gran escala de manera sencilla e identificar y caracterizar genes que participen en un proceso en particular (St Johnston, 2002). En tercer lugar, este organismo posee una alta conservación génica con una baja redundancia, lo que significa que muchos de sus genes están presentes en otros organismos como los vertebrados, pero con un bajo número de copias o parálogos (Adams et al., 2000). Finalmente, las características de su ciclo de vida permiten realizar estudios comparativos entre diferentes etapas del mismo: Durante el desarrollo embrionario se genera un organismo completo a partir de un huevo fecundado, y nuevamente, durante la metamorfosis, ocurre una reformación cuando la mayoría de los tejidos larvarios se histolizan y se genera un nuevo organismo a partir de primordios presentes en la larva (Demerec, 1994).

En este trabajo, utilizamos como modelo a *Drosophila melanogaster* para estudiar cómo la comunicación celular coordina la morfogénesis de un organismo. En particular, nos centramos en el estudio del cerrado dorsal, un proceso de remodelación de la epidermis regulado por la vía de señalización de la cinasa N-terminal de Jun (Jun N-terminal kinase, JNK). En este proceso, intervienen diferentes tejidos y tipos celulares, y de la interacción entre estos resultan cambios drásticos en la forma celular y tisular, en los cuales la vía de JNK juega un papel muy importante. Por estas razones, este proceso es un excelente modelo para entender la relación entre comunicación celular,

expresión génica y comportamiento celular en el contexto del desarrollo embrionario. Además, permite ahondar en el conocimiento de una vía de señalización de gran importancia filogenética y ontogenética; la vía de JNK está conservada desde levaduras hasta vertebrados, por lo que *Drosophila* resulta un modelo muy útil para entender mejor las funciones de esta vía de señalización. Se sabe que los efectos de esta vía pueden ir desde inducir cambios en la forma celular, hasta respuestas a estrés.

VI. ANTECEDENTES.

1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster es un insecto del orden de los dípteros (insectos con un par de alas). Los dípteros, así como otros insectos, presentan una metamorfosis completa de la forma larvaria a la adulta, fenómeno conocido como holometabolismo (Demerec, 1994). En el caso de *Drosophila melanogaster*, el ciclo de vida, desde el embrión hasta el adulto, tiene una duración de diez días a 25 °C [Figura 1, (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997)]. El desarrollo embrionario se completa en sólo 24 horas. Esta gran velocidad se debe en parte a que desde la ovogénesis se definen los ejes anterior-posterior y dorsal-ventral del embrión. La hembra posee una espermateca donde puede almacenar un gran número de espermatozoides, haciendo muy eficiente la ovoposición de huevos fecundados (Greenspan, 2004).

Al desarrollo embrionario le siguen tres estadios larvarios; los primeros dos con 24 horas de duración, y el tercero con 48 horas. Durante el desarrollo larvario, el organismo aumenta constantemente de tamaño, pasando de un embrión de 0.45 por 0.15 milímetros, a 200 veces esas dimensiones (Grewal, 2012). Los dos primeros estadios larvarios están separados por la ecdisis o muda del exoesqueleto, lo cual le permite al individuo aumentar de volumen. A diferencia de la epidermis, que debe reemplazarse en puntos discretos mediante la ecdisis, otras estructuras se encuentran en constante crecimiento y remodelación, como son el intestino y los discos imagales (Demerec, 1994).

Posteriormente, el tercer estadio finaliza con la formación de una pupa. En la etapa de pupa se da la metamorfosis a la forma adulta. Durante la metamorfosis, la mayor parte de los tejidos larvarios sufren muerte celular programada y son sustituidos por nuevos tejidos. Los discos imagales, mencionados anteriormente, juegan un papel muy importante en este momento del desarrollo. Presentes desde la larva, los discos imagales son sacos de epitelio que durante la metamorfosis completan su

diferenciación y crecimiento para formar varios órganos del adulto, como genitales, ojos, antenas, patas, alas y extremidades. Además, por la fusión de algunos de estos discos se forman gran parte de la cabeza, tórax y abdomen del adulto (Demerec, 1994). Al concluir la metamorfosis, eclosiona un adulto que es fértil en menos de 10 horas (Greenspan, 2004).

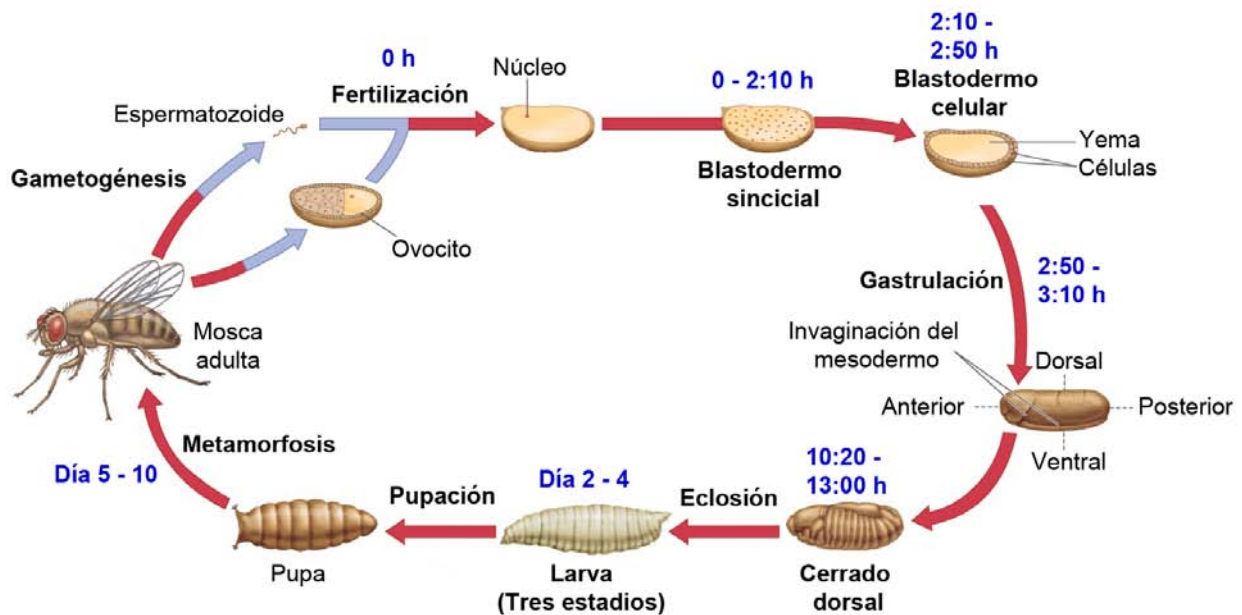


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Se resaltan algunos procesos del desarrollo embrionario de *Drosophila*. En azul, se muestra la duración del proceso o etapa correspondiente.

2. Desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

Los dípteros como *Drosophila melanogaster* son organismos de banda germinal larga. Esto significa que durante el desarrollo embrionario las capas germinales del ectodermo y mesodermo en conjunto (banda germinal), se extienden a todo lo largo del huevo, y también, que todos los segmentos del organismo se determinan simultáneamente. En contraste con insectos de banda germinal corta, cuyos segmentos deben especificarse secuencialmente, el desarrollo embrionario de los

insectos de banda germinal larga es muy rápido (Gilbert, 2006). Como se menciona arriba, en el caso de *Drosophila melanogaster*, el desarrollo embrionario se completa en sólo 24 horas, a una temperatura de 25 °C.

Para su estudio, el desarrollo embrionario de *Drosophila* se ha dividido en 17 estadios, de acuerdo a Campos-Ortega y Hartenstein (1997), como se detalla a continuación. Durante los estadios 1 a 4 (0 a 2:10 horas post-fecundación, hpf) se forma un blastodermo sincicial, para lo cual el núcleo cigótico se divide 13 veces (Figura 1). Las primeras diez divisiones ocurren de manera dispersa a lo largo del huevo, mientras que las últimas tres se dan junto con la migración de los mismos hacia la periferia del huevo. En esta etapa se forman dominios mitóticos, que prefiguran futuros tejidos y capas embrionarias (Foe y Alberts, 1983). Posteriormente, durante el estadio 5 (2:10 a 2:50 hpf) se forma el blastodermo celular, como consecuencia de la celularización de la mayoría de los núcleos cigóticos (Figura 1). En este momento, la aportación de RNAs mensajeros (mRNAs) maternos comienza a degradarse, y el genoma cigótico comienza a expresarse (Tadros y Lipshitz, 2009). Una vez celularizado el embrión, se lleva a cabo la gastrulación. Este proceso comprende las etapas 6 y 7 (2:50 a 3:10 hpf) y consiste en la invaginación de las células ventrales para formar el mesodermo, y la invaginación de células de los extremos posterior y antero-ventral para formar el endodermo (Figura 1). En consecuencia, el ectodermo permanece en la superficie exterior del embrión junto con la amnioserosa, un epitelio extraembrionario que se diferencia en la superficie dorsal del embrión, y que sufre muerte celular programada antes de completarse la embriogénesis (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

Luego de la gastrulación inicia la elongación de la banda germinal, de la etapa 8 a la 11 (3:10 a 7:20 hpf). En este proceso, el conjunto del ectodermo y el mesodermo –la banda germinal– se distribuyen hacia la parte posterior del embrión por proliferación, y por un proceso de rearreglo de células conocido como convergencia y extensión. Al alcanzar el extremo terminal, la elongación de la banda germinal continúa hacia la región dorso-medial. Durante este proceso comienza la diferenciación del sistema nervioso por la delaminación de los neuroblastos del ectodermo ventral o neuroectodermo (etapa 9). Paralelamente inicia la morfogénesis de los intestinos

anterior y posterior (etapa 10). Una vez que la banda germinal alcanza su longitud máxima (etapa 11), la segmentación metamérica del embrión comienza a ser morfológicamente visible por la condensación en segmentos de células mesodérmicas y por la presencia de pliegues en la epidermis.

Justo después de la extensión de la banda germinal, ésta se retrae durante las etapas 12 y 13 (7:20 a 10:20 hpf, Figura 2). Al mismo tiempo, el intestino anterior inicia su fusión con el posterior, y el sistema nervioso central se separa completamente de la epidermis. Al momento de concluir la retracción de la banda germinal (etapa 13), la epidermis se posiciona en las regiones laterales y ventrales del embrión, mientras que la amnioserosa está presente en la región dorsal. En este momento inicia el cerrado dorsal, que consiste en el estiramiento de la epidermis hacia la región dorsal, sobre la amnioserosa, hasta su fusión en la línea media dorsal (Figura 2). Simultáneamente, los segmentos que darán lugar a la cabeza se internalizan y permanecen así durante el desarrollo larvario.

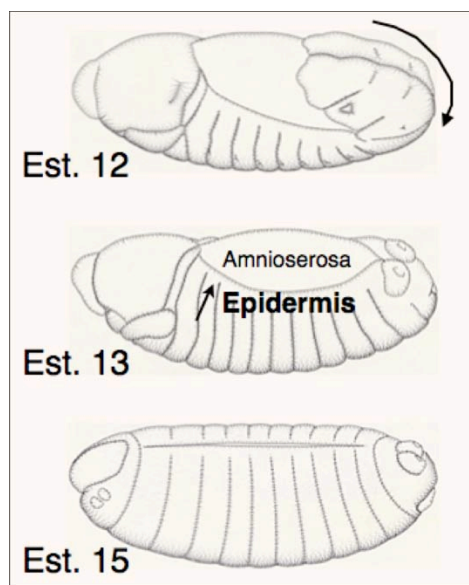


Figura 2. El cerrado dorsal en *Drosophila melanogaster*.

Luego de la retracción de la banda germinal en el estadio 12, la epidermis se localiza en la región ventral y lateral del embrión, quedando en la región dorsal la amnioserosa. Durante el cerrado dorsal, la epidermis se estira hacia la línea media dorsal hasta fusionarse completamente.

El cerrado dorsal continúa durante los estadios 14 y 15. Hacia el final del estadio 14 (10:20 a 11:20 hpf), la epidermis recubre el 80% del perímetro dorsoventral del embrión. En el estadio 15 (11:20 a 13:00 hpf), las dos láminas laterales de la epidermis se fusionan en la línea media dorsal, internalizando a la amnioserosa. La yema, sobre la cual se encontraba la amnioserosa, termina encapsulada completamente por la fusión del intestino anterior con el posterior. Como consecuencia de estos dos fenómenos, las restantes células de la amnioserosa mueren. Simultáneamente, los segmentos que darán lugar a la cabeza se internalizan y permanecen así durante el desarrollo larvario.

Una vez culminado el cerrado dorsal, en la etapa 16 (13:00 a 16:00) termina la invaginación de la cabeza. En esta etapa, la diferenciación y maduración de todos los tejidos del embrión es evidente: se definen los músculos y el corazón, el sistema digestivo completa su morfogénesis, y termina la condensación del sistema nervioso central. De manera importante, la epidermis se diferencia completamente y secreta el exoesqueleto o cutícula de la futura larva. Dado que la cutícula refleja el metamerismo y la diferenciación de la epidermis del organismo, el estudio de la morfología y de las alteraciones de la cutícula en embriones mutantes facilita de manera importante el estudio de defectos en el desarrollo (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980).

Finalmente, durante el estadio 17 (16:00 hpf a la eclosión, 22-24:00 hpf) continúan procesos de organogénesis y de maduración de estructuras; el sistema nervioso se desarrolla completamente, termina la formación de las vías respiratorias y algunas especializaciones de la cutícula se refinan. Igualmente, inicia la contracción muscular, y el desarrollo culmina con la eclosión de la larva de primer estadio (Weigmann et al., 2003).

3. Vías de señalización de tipo MAPK.

Dentro de las moléculas que conectan señales extracelulares con una respuesta intracelular se encuentran las proteínas cinasas activadas por mitógenos (Mitogen-

Activated Protein Kinases, MAPKs). Este tipo de cinasas comprenden una superfamilia presente en todos los eucariontes donde se han estudiado y regulan una amplia gama de procesos además del desarrollo embrionario. Las MAPKs se describieron inicialmente en *Saccharomyces cerevisiae* (Courchesne et al., 1989). Esta levadura posee cinco vías de señalización de tipo MAPK: la vía de apareamiento (Courchesne et al., 1989), de esporulación (Elion et al., 1990), de formación de filamentos (Torres et al., 1991), de remodelación de la pared celular (Krisak et al., 1994) y de respuesta a estrés osmótico (Brewster et al., 1993). La característica distintiva de las MAPKs, que las distingue de la mayor parte de las cinasas, es que forman parte de cascadas de fosforilación secuencial, también conservadas estructural y funcionalmente. Las MAPKs son fosforiladas en la llamada asa de activación. Las MAPKs son las únicas proteínas conocidas que requieren una fosforilación tanto en un residuo de serina/treonina como en un residuo de tirosina para su activación, el motivo S/TXY. Esta doble fosforilación, tanto en residuos de tirosina como en residuos de serina o treonina, únicamente pueden llevarla a cabo cinasas de especificidad dual, llamadas MAP2Ks. A su vez, las MAP2Ks deben ser activadas por fosforilación en residuos de serina o treonina, reacción catalizada por las MAP3Ks. En algunos casos, hay MAP4K por encima de las MAP3K. Una vez activadas, las MAPKs tienen como sustratos principales a factores de transcripción, aunque se han descrito como blancos a modificadores del citoesqueleto e incluso a otras proteínas cinasas. Como reguladores directos, existen fosfatasa de actividad dual que desfosforilan el motivo S/TXY de las MAPKs (Qi y Elion, 2005).

La organización del módulo MAP3K-MAP2K-MAPK le confiere una regulación de alta especificidad y rapidez, al tiempo que puede ser inducido bajo diversos contextos. El éxito evolutivo de este tipo de vías de señalización es tal, que no sólo están presentes en todos los eucariontes, sino que también controlan una gran variedad de procesos. Para su estudio, en metazoarios se han dividido en tres principales grupos. La familia de ERK (Extracellular-regulated kinase) regula proliferación y diferenciación (Boulton et al., 1990); la familia de p38 controla la respuesta al estrés (Lee et al., 1994), y la familia de JNK (Jun N-terminal kinase) regula tanto condiciones de estrés, como cambios en la forma celular (Galcheva-Gargova et al., 1994). Organismos como *Drosophila* poseen al

menos un miembro de cada clase de cinasas, mientras que en los vertebrados existen varias cinasas de cada familia (Manning et al., 2002).

4. La vía de señalización de JNK.

Estudios sobre respuesta a estrés en *Saccharomyces cerevisiae* identificaron a una proteína cinasa de la familia de las MAPKs, activada por alta osmolaridad e indispensable para la resistencia a dicho estrés (Brewster et al., 1993). Posteriormente, se identificó al homólogo de esta proteína en líneas celulares de humano y ratón, y se le denominó JNK, ya que era capaz de fosforilar al factor de transcripción Jun en el extremo amino terminal (Galcheva-Gargova et al., 1994). Se observó que JNK no sólo se activaba en respuesta a estrés osmótico, sino en respuesta a otros tipos de estrés y que además puede rescatar la falta de función de su homólogo en levadura. Análisis posteriores demostraron que en vertebrados existen tres genes con esta actividad y con alta homología: JNK 1, 2 y 3 (Kuan et al., 1999).

JNK1 y JNK2 se expresan de manera ubicua, mientras que JNK3 se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso (Yang et al., 1997). JNK1 y JNK2 son parcialmente redundantes en función. Ratones con pérdida de función para ambos genes mueren durante el desarrollo, con defectos en el cerrado del tubo neural y en el cerrado de los párpados (Xia y Karin, 2004). Como cabría esperarse, pérdida de función del factor de transcripción c-Jun, sustrato de las JNKs, también resulta en defectos en el cerrado del tubo neural y de los párpados (Xia y Karin, 2004).

Además de los fenotipos embrionarios, se han reportado numerosos escenarios que llevan a la activación de la vía de JNK, aunque en muchos casos, se requiere de evidencia fisiológica para poder corroborar dichas funciones. Se ha propuesto que JNK puede mediar la inducción de apoptosis de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (Tumor necrosis factor alpha, TNF α), y que es capaz de desensibilizar a la vía de la insulina mediante la fosforilación en residuos de serina y

treonina de los sustratos del receptor a insulina (Insulin receptor substrates, IRSs), entre otras funciones (Raman et al., 2007).

El alto número de parálogos para cada componente de la vía de JNK ha dificultado su estudio en vertebrados. Se sabe que las cinasas que son capaces de fosforilar y activar a JNK son MKK4 (Map kinase kinase 4) y MKK7 (Map kinase kinase 7), aunque se ha observado que estas cinasas también pueden fosforilar a miembros del grupo de p38. Actuando como MAP3Ks, se han descrito las MEKK1-4 (Mek kinase 1-4), bona fide activadoras de la vía de ERK; la cinasa regulada por apoptosis 1 (Apoptosis-signal regulated kinase, ASK1); la cinasa activada por TGF β 1 (TGF β -activated kinase 1, TAK1), y las cinasas de linaje mixto 1 a 4 (Mixed lineage kinase 1-4, MLK1-4). Además, como MAP4K (cinasa cuatro de la vía de JNK, JNK4K), se encuentran homólogos de Ste-20 de levadura (Cuevas et al., 2007). La variedad de puntos de entrada para la activación de JNK explicaría por qué esta vía de señalización puede inducir respuestas tan diferentes, como inducción de apoptosis y cambio de la forma celular. Sin embargo, es importante refrendar fisiológicamente la contribución de cada uno de estos elementos propuestos en la activación de JNK.

5. El cerrado dorsal como modelo de estudio de la vía de JNK.

Drosophila melanogaster ha sido un modelo muy útil para estudiar la vía de JNK. Esto se debe a que en contraste con vertebrados, *Drosophila* posee sólo un homólogo para la mayoría de los componentes de la vía. Además, el análisis de los fenotipos mutantes para estos genes es muy fácil de estudiar. Diferentes tamizajes genéticos diseñados para obtener mutaciones letales embrionarias, en los ochentas y noventas, identificaron un grupo de mutantes que presentaban un fenotipo letal embrionario consistente en agujeros en la región dorsal del embrión (Jürgens et al., 1984). A este fenotipo se le conoce como “fenotipo de apertura dorsal”, y se relaciona con fallas en el cerrado dorsal embrionario (Figura 3). La subsecuente clonación y caracterización de los genes alterados, demostró que muchos de ellos correspondían a los homólogos de la vía de

JNK en *Drosophila* (Hou et al., 1997). Esto significa que los genes de la vía de JNK, además de estar conservados estructuralmente en *Drosophila*, también conservan la función de remodelación de epitelios.

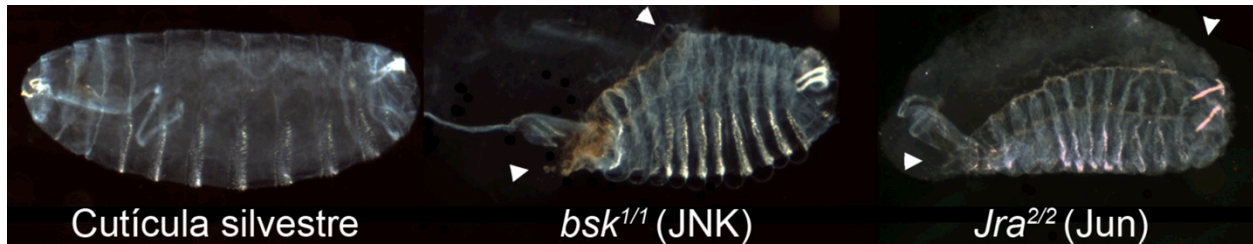


Figura 3. Mutantes para componentes de la vía de JNK muestran defectos en el cerrado dorsal.

Se muestran imágenes de microscopía de campo oscuro, de cutículas sin defectos y mutantes para *bsk* (JNK) y para *Jra* (Jun). Los embriones están orientados con la porción anterior a la izquierda, y la porción dorsal hacia arriba. Las cabezas de flecha muestran la extensión de la apertura dorsal en los embriones mutantes.

La vía de JNK también es necesaria durante la metamorfosis en los tejidos precursores del tórax. El tórax se forma por la fusión de los discos imagales de ala en la región dorsal del animal, y la activación de la vía de JNK permite que las láminas laterales se estiren y se adhieran entre sí. Animales mutantes hipomorfos para algunos componentes de la vía son capaces de sobrevivir la embriogénesis, pero presentan defectos en el cerrado torácico (Martin-Blanco et al., 2000).

El cerrado dorsal es el modelo de activación de la vía de JNK mejor caracterizado en *Drosophila*. Este proceso sucede durante los estadios embrionarios 13 al 15 (9:20 - 13:00 hpf), y en él, como se ha mencionado, la epidermis se estira hacia la línea media dorsal del embrión para recubrirlo completamente (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997). El proceso del cerrado se ha dividido en tres fases: iniciación, propagación y sutura (Harden, 2002).

En la fase de iniciación, se da la activación de la vía de JNK. Esto sucede únicamente en la hilera más dorsal de células de la epidermis, o células de la hilera líder, que serán el centro de señalización que coordina el cerrado (Riesgo-Escovar et al., 1996). El estímulo que lleva a la activación de la vía se desconoce; sin embargo, se han

caracterizado buena parte de los componentes intracelulares de la vía, como se esquematizan en la Figura 4. Dentro de los elementos río arriba de JNK se encuentran las cinasas citosólicas de tirosina de la familia de Src: Src42A, Src64B y Btk29A (Tateno et al., 2000). Estas cinasas fosforilan a la proteína adaptadora, Dok, que recluta y activa a otra cinasa citosólica de tirosina, Shark (Fernandez et al., 2000). La activación de Shark lleva, a su vez, a la activación de las proteínas G monoméricas: Rac1, Rac2 y Mtl (Hakeda-Suzuki et al., 2002; Riesgo-Escovar et al., 1996). Las Rac activadas forman un complejo con Misshapen (Msn), una JN4K de la familia de Ste-20 y con Slipper (Slpr), único miembro de la familia de MLK (o mixed lineage kinase, por sus siglas en inglés) en *Drosophila* y que actúa como JN3K (Garlena et al., 2010). Msn fosforila y activa a Slpr, que a su vez fosforila y activa a Hemipterous (Hep), la única JN2K, homóloga a MKK7 de vertebrados (Glise et al., 1995). Hep activa directamente a JNK, fosforilándola. A su vez, JNK fosforila al factor de transcripción Jra [único homólogo de c-Jun de vertebrados (Bogoyevitch y Kobe, 2006)].

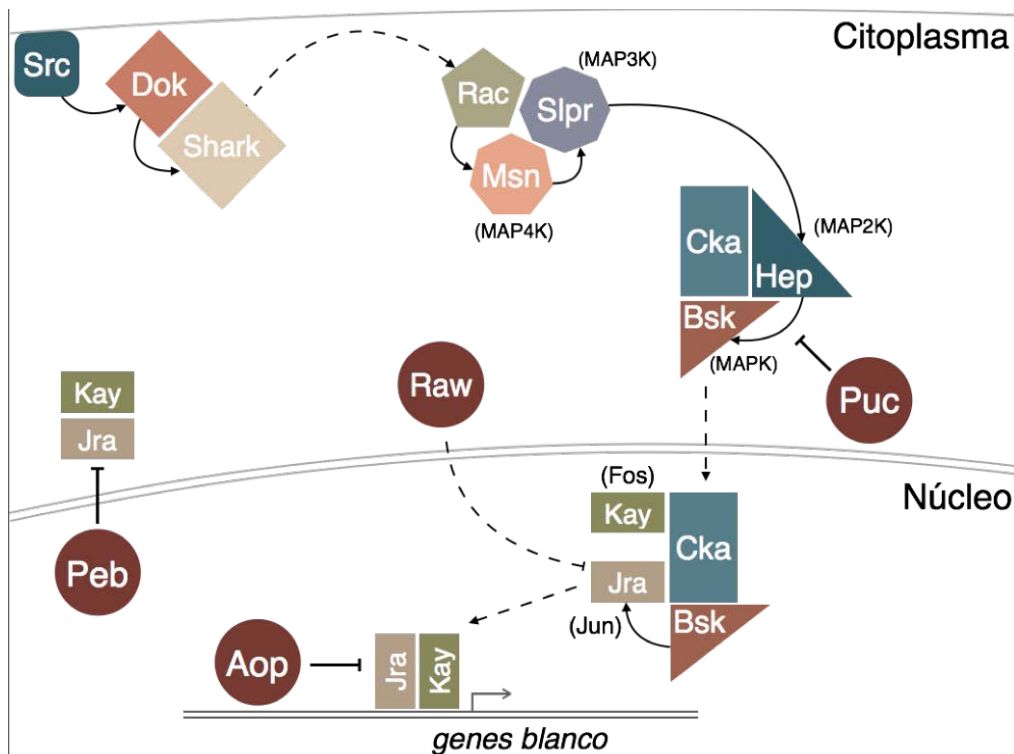


Figura 4. La vía de JNK en *Drosophila melanogaster*.

Se muestran los componentes que participan en la vía de JNK durante el cerrado dorsal. Los círculos rojos representan reguladores negativos.

Una vez fosforilado, Jra dimeriza con Kay (único homólogo de c-Fos de vertebrados) para formar el complejo AP-1 e inducir la expresión de genes blanco (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997a). Para que se lleve a cabo la reacción de fosforilación de Hep, y a su vez de JNK, es necesaria la presencia de Cka (Connector of Kinase to AP-1), una proteína de andamiaje que favorece la interacción de Hep, JNK, Jra y Kay (Chen et al., 2002). Se ha propuesto que Cka recluta a Hep y a JNK en el citoplasma, y después se trasloca al núcleo con JNK para reclutar a Jra y Kay y facilitar así su activación. Entre los blancos transcripcionales de la vía se encuentra el gen de la profilina, que favorece la polimerización del citoesqueleto de actina (Jasper et al., 2001). Como resultado de esta fase, las células de la hilera líder se estiran hacia la región dorsal del embrión (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b).

La segunda fase del cerrado dorsal, la fase de propagación, sucede en respuesta a la activación de la vía de JNK en las células de la hilera líder. En esta fase, células de la epidermis más lateral también cambian de forma, estirándose hacia la porción dorsal del embrión. Esto sucede porque otro gen inducido transcripcionalmente por la vía de JNK es *decapentaplegic (dpp)*, homólogo de las proteínas morfogenéticas de hueso 2 y 4 (Bone morphogenetic protein 2/4, Bmp2/4) de vertebrados. Dpp es captado por las células laterales de la epidermis, ventrales a la hilera líder, e induce en ellas la expresión de genes como la miosina no muscular, para favorecer el cambio de forma (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b). El resultado neto de estos rearrreglos celulares es el estiramiento de la epidermis lateral hacia la porción dorsal.

Finalmente, en la fase de sutura, las dos láminas laterales de la epidermis se encuentran en la línea media dorsal y se sellan formando un continuo perfecto. En esta fase también participa la vía de JNK, al inducir la expresión de las integrinas α PS3 y la única integrina de tipo β , β PS, en las células de la hilera líder. Esto favorece la formación de uniones entre las láminas de la epidermis (Homsy et al., 2006).

Cabe señalar que así como mutaciones en componentes de la vía resultan en defectos en el cerrado dorsal, mutaciones en reguladores negativos, en los que la vía se activa de manera ectópica, también se traducen en defectos en el cerrado. Gracias a esto,

igualmente se han identificado varios elementos que inhiben la activación de la vía de JNK durante el cerrado dorsal. El primer inhibidor de la vía en identificarse fue una fosfatasa de especificidad dual llamada Puckered (Puc) que defosforila el asa de activación de JNK. Puc es inducida transcripcionalmente por la misma vía de señalización, por lo que se ha propuesto que su función es regular de manera fina la activación de la vía (Martín-Blanco et al., 1998). Otro regulador de la vía es Anterior open (Aop). Aop juega un papel dual, ya que primero evita que las células de la epidermis lateral se dividan, manteniéndolas en un estado post-mitótico durante el cerrado dorsal. Además, en las células de la hilera líder Aop mantiene reprimidos los blancos transcripcionales de la vía. Esta última función es inhibida por JNK directamente (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b).

La vía de JNK se mantiene inactiva en las células de la amnioserosa por la expresión del factor de transcripción Pebbled (Peb, también conocido como Hnt). Se ha demostrado que Peb impide la acumulación de Jra en el núcleo de las células de la amnioserosa. En los mutantes de Peb, la vía de JNK se activa en la amnioserosa y el cerrado dorsal no se puede llevar a cabo, aunque se desconoce cómo es que Peb regula la activación de la vía en ese tejido. Finalmente, la activación de la vía de JNK también debe inhibirse en la epidermis lateral, y en este proceso participa un gen conservado, pero de función desconocida, llamado Raw. Raw se expresa en la epidermis lateral y se localiza en el citoplasma. Por interacciones genéticas, se ha propuesto que Raw actúa a nivel de Jra y de JNK, de manera independiente a Puc y a Aop; sin embargo, tampoco se conoce cómo es que lleva a cabo su función (Byars et al., 1999).

VII. ANTECEDENTES DIRECTOS.

Con la finalidad de encontrar genes no caracterizados que participen en la vía de señalización de JNK, en nuestro grupo de trabajo se han aislado mutantes que presentan defectos en el cerrado dorsal (Peña-Rangel et al., 2002). Una manera de generar mutaciones al azar es mediante el uso de elementos P. Los elementos P son transposones de *Drosophila* introducidos como herramienta experimental en la década de los ochentas (Sullivan et al., 2000). La sola inserción de un elemento P en una posición del genoma puede generar mutaciones. Sin embargo, en algunos casos, los elementos P se insertan en regiones putativamente intergénicas y no afectan la viabilidad del organismo. Estas inserciones aún pueden ser útiles para generar mutaciones, ya que al escindirse, los elementos P generan una ruptura de doble cadena en el sitio original de inserción. El sistema de reparación de la célula detecta esta ruptura y la restaura; sin embargo, en un porcentaje de los casos, el sistema altera la secuencia y genera así nuevas mutaciones (Sullivan et al., 2000).

En nuestro laboratorio, al inducir la escisión imprecisa del elemento P *KG09113*, se obtuvieron dos mutantes incapaces de completar el cerrado dorsal, fácilmente identificables en preparaciones de cutículas embrionarias. Para facilitar la caracterización del locus, adicionalmente generamos tres alelos por mutagénesis química. Estas mutaciones son letales entre sí; por consiguiente alteran el mismo gen. Debido a que las mutaciones en este locus resultan en un fenotipo de apertura dorsal, se le ha denominado *acaI*, palabra que en náhuatl significa “balsa”, por la similitud de las cutículas mutantes a estas embarcaciones.

VIII. HIPÓTESIS.

El locus *acal* codifica para un gen que participa en la vía de JNK de *Drosophila melanogaster*.

IX. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar genética y molecularmente el locus *acal* y definir cómo es su participación en la vía de señalización de JNK de *Drosophila melanogaster*.

X. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Mapear molecularmente el locus de *acal* e identificar la naturaleza de la lesión en los alelos mutantes.
2. Identificar la(s) función(es) molecular(es) del gen.
3. Describir el patrón de expresión de *acal* durante la embriogénesis.
4. Definir la relación de *acal* con genes con los que interactúa, por medio de pruebas genéticas o moleculares (en particular, con genes que participan en la vía de JNK).
5. Explorar la participación de *acal* en otros procesos del desarrollo.

XI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1. Cepas de *Drosophila melanogaster*

Las líneas mutantes *aop*¹, *bsk*¹, *raw*¹ y *raw*² fueron obtenidas de la colección de cepas de *Drosophila* de Tübingen (Tübingen *Drosophila* Stock Collection). *puc*^{E69} fue donada por Alfonso Martínez-Arias (Universidad de Cambridge, Reino Unido), *peb*³⁰⁸ por Howard Lipshitz (Universidad de Toronto, Canada), *Cka*¹, *peb*¹, *lola*⁰⁰⁶⁴², *psq*^{KG09291}, *Df(2R)BSC595*, *Df(2R)ED2098*, *Df(2R)ED2076*, *Pc*³, y *P[SUPorP]KG0911*, son del Centro de cepas de *Drosophila* de Bloomington (Bloomington *Drosophila* Stock Center, BDSC, #11451, #80, #10946, #14784, #25428, #9277, #8909, #1730, y #14782 respectivamente); *Δ18*, *lola*^{rev6}, y *psq*^{rev12} fueron obsequiadas por María Domínguez (Universidad Miguel Hernández, España), *pnr*^{MD237} por Ginés Morata (Universidad Autónoma de Madrid, España), *69B* por Andrea Brand (Universidad de Cambridge, Reino Unido), *TRE-DsRed* por Dirk Bohmann (Centro Médico de la Universidad de Rochester, EUA), *sGMCA* por Dan Kiehart (Universidad de Duke, EUA), *UAS-aop*^{ACT} por Ilaria Rebay (Universidad de Chicago, EUA), *UAS-rawRA* y *UAS-rawRB* por Mark Van Doren (Universidad Johns Hopkins, EUA), y *hs-Cka* por Steven Hou (NIH, EUA). *Cka-IR* proviene del proyecto de líneas transgénicas de RNAi (Transgenic RNAi Project, *TRiP*, #JF01432). Las cepas mutantes se mantuvieron en heterocigosis sobre cromosomas balanceadores, los cuales poseen marcadores dominantes visibles que permiten identificar a la progenie con el genotipo de interés. Dichas líneas son *CyO,twi>GFP*, *CyO-TM3,hs>GFP*, y *SMB6B,eve>lacZ* (BDSC #6662, #5703, y #335, respectivamente). Estos cromosomas poseen construcciones que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) o el gen de la β-galactosidasa, *lacZ*, para así identificar visualmente a los individuos heterocigotos y homocigotos de estos cromosomas (y separar a los homocigotos mutantes, que son los que carecen de estos marcadores). Todas las cruzas, así como la colección de embriones, se realizaron a 25 °C y 50 % de humedad relativa. Para la inducción de choque térmico, las cruzas se realizaron a 29 °C.

2. Mapeo genético y molecular

El mapeo genético se realizó por pruebas de complementación, cruzando moscas mutantes de *acal*, con moscas mutantes para genes aledaños (*lola* y *psq*) y moscas con deleciones del locus de interés. Se cruzaron hembras vírgenes con machos, y se cuantificó la progenie que eclosionó como adultos. Se cuantificaron al menos 100 individuos para determinar si dos mutaciones dadas complementan o no. En los casos donde eclosionaron moscas trans-heterocigotas, se tomaron hembras vírgenes y machos, y se cruzaron con moscas silvestres, para determinar la fertilidad de dichas moscas.

Para el mapeo molecular, se obtuvo DNA genómico a partir de embriones homocigotos mutantes, los cuales fueron homogenizados en una solución de TRIS-HCl, pH 8.2, 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 25 mM y Tritón X-100 0.2%. A partir de esta preparación, se amplificaron por PCR convencional 4.7 kb del locus de *acal*. Los oligonucleótidos usados se describen en la Tabla 1. Los fragmentos de PCR obtenidos se purificaron y clonaron en el plásmido pGEM-T Easy (Promega, EUA). El inserto se secuenció usando los oligonucleótidos estándar M13 forward y M13 reverse. Las mutaciones identificadas se corroboraron secuenciando muestras independientes.

3. Construcciones de rescate.

El fragmento de rescate genómico se obtuvo del proyecto P[acman] (#CH322-178D09), el cual ha generado cromosomas artificiales bacterianos conteniendo fragmentos del genoma de *Drosophila*. Esta construcción se amplificó y purificó para generar moscas transgénicas. La construcción se inyectó en embriones de la línea *PBac[y⁺-attP-9A]VK00013*, para permitir la recombinación sitio específica en la posición 76A2 del genoma de *Drosophila*.

Para la generación de la línea *UAS-acal*, el cDNA SD08925 obtenido del Centro de recursos genómicos de *Drosophila* (*Drosophila* Genomics Resource Center, EUA) se subclonó en el plásmido pUAST. La construcción se secuenció para corroborar la

integridad del cDNA, y se inyectó en embriones con una fuente de transposasa, para permitir la integración de la construcción en el genoma de las moscas. Inserciones independientes se mapearon a nivel de cromosoma por cruza convencionales.

4. Preparaciones de cutículas embrionarias.

Se colectaron embriones de las cruza de interés en placas de agar por 24 horas, y la progenie del balanceador se descartó (identificada por la presencia de GFP). Las placas se mantuvieron a 25°C por al menos tres días para permitir la eclosión de larvas y cuantificar la letalidad embrionaria. Los embriones muertos se decorionaron en hipoclorito de sodio al 50%, y posteriormente se lavaron en PBS. Posteriormente, los embriones se montaron en medio PVA comercial, y se mantuvieron a 45°C por al menos 24 horas para digerir los tejidos blandos y permitir la visualización de la cutícula. Posteriormente, las cutículas se analizaron y contabilizaron en un microscopio de campo oscuro. Para mostrar imágenes representativas de las cutículas con defectos, los embriones se colectaron de la misma manera, y adicionalmente se les removió el vitelo agitándolos vigorosamente en PBS/Metanol 1:1. Después, se montaron en PVA como se describe antes, y se fotografiaron en un microscopio de campo oscuro.

5. Hibridación *in situ*.

Para detectar la expresión de *acal*, un fragmento correspondiente a 955 pares de bases (pb) del transcrito de *acal* se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de embriones silvestres (los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 1). El producto se clonó en el vector pGEM-T Easy para usarlo como templado para la síntesis de una ribosonda, marcada con digoxigenina. Para detectar la expresión de *dpp*, la clona de cDNA RE20611 (Drosophila Genomics Resource Center, EUA), se digirió con Dral para generar extremos romos, y al fragmento obtenido se le adicionaron adeninas en los extremos 3' utilizando Taq polimerasa, siguiendo las

recomendaciones del fabricante. Posteriormente, el fragmento se clonó en pGEM-T Easy para generar la sonda, como se describe arriba. Tanto para *acal* como para *dpp*, además de la sonda anti-sentido, se generaron sondas sentido que fueron empleadas como control negativo.

La hibridación *in situ* se realizó colectando embriones en placas de agar, a los cuales se les removi6 el corion usando hipoclorito de sodio al 50%, y se fijaron en una soluci6n de heptano 50%, formaldeh6do 7.4% en PBS por 25 minutos. Posteriormente, los embriones se devitelinizaron en heptano/metanol 1:1, y se aclararon en una soluci6n de xileno-etanol. A continuaci6n, los embriones se trataron con proteinasa K para favorecer la internalizaci6n de la sonda y se hibridaron toda la noche con la sonda correspondiente a 55°C. Al d6a siguiente, los embriones se lavaron en PBS-Tween 0.3% a 60°C, y se incubaron con un anticuerpo contra digoxigenina, acoplado a fosfatasa alcalina, en una diluci6n 1:2000. Luego de lavar con PBS-Tween 0.3%, se agreg6 el sustrato colorim6trico NBT/BCIP. La reacci6n se detuvo con PBS, y los embriones se montaron en Polymount. Finalmente, las laminillas se analizaron en un microscopio de campo claro.

6. Tinci6n con X-gal.

Se colectaron embriones que expresan el gen de la β -galactosidasa, *lacZ*, en placas de agar, y se les removi6 el corion en hipoclorito de sodio al 50%. Posteriormente, los embriones se fijaron con glutaraldeh6do al 1%, y se preincubaron en una soluci6n conteniendo NaPO_4 pH 7.2 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 1 mM, Trit6n X-100 0.3%, $\text{K}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ 3.1 mM y $\text{K}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ 3.1 mM. La reacci6n se revel6 a 37°C en esta misma soluci6n a6nadiendo X-gal a una concentraci6n final de 0.2%. La reacci6n se detuvo con PBS, y los embriones se montaron con Polymount y se fotografiaron en un microscopio de campo claro.

7. Northern blots.

Se aisló RNA de embriones, larvas, pupas y adultos de la línea silvestre *yw*. Los animales se colectaron en tubos de 1.5 mL, se homogenizaron con TRIzol, y se congelaron a -70°C. Posteriormente, se utilizó el kit Direct-Zol RNA mini-prep kit para purificar el RNA. Se separaron 20 µg de RNA por muestra en geles de agarosa al 0.8%, MOPS 1x, y se transfirieron a membranas de nylon por capilaridad empleando TBE como acarreador. El RNA se fijó a la membrana usando un entrecruzador de luz UV a 70,000 µJ/cm². Inmediatamente, las membranas se lavaron y pre-hibridaron en solución de hibridación (formamida 50%, SSC 5x, 0.1% SDS, Solución de Denhardt 0.05x y 100 µg/mL de DNA de esperma de salmón). Las membranas se hibridaron toda la noche a 42°C con sondas radioactivas, y al día siguiente, se lavaron dos veces con SDS 0.1%, SSC 0.1x. Finalmente, las membranas se expusieron a pantallas de fósforo por al menos 7 días, y se visualizaron usando el sistema Storm 860.

Las sondas radioactivas se sintetizaron usando dCTP [α -³²P], y oligonucleótidos aleatorios, con el kit Prime-it RmT. Como DNA molde, se usaron 50 ng del cDNA SD08925, digerido y liberado del plásmido pOT2, y como control de carga se usó Rp49, a partir de un producto amplificado por PCR (los oligos empleados se muestran en la Tabla 1).

8. Northern blots para RNAs pequeños.

Se aisló RNA como se describe arriba, y se separaron 25 µg de RNA por muestra en geles de acrilamida al 15%, urea 8 M, TBE 1x. Posteriormente, el RNA se transfirió a membranas de nylon usando un sistema semi-seco, con 3 mA/cm² por 40 minutos. El RNA se fijó con dos pulsos de luz UV a 70,000 µJ/cm². Después, las membranas se pre-hibridaron por 30 minutos en una solución conteniendo formamida al 50%, SSPE 5x, solución Denhardt 5x, SDS 0.5%, de acuerdo al protocolo de Pall y Hamilton (2008). A continuación se añadió la sonda radioactiva, que consistió en 10 pmoles de oligonucleótidos marcados con ATP [γ -³²P] usando T4 polinucleótido cinasa. Se dejó

hibridar toda la noche a 40°C y posteriormente, se hicieron dos lavados con SSC 2x, SDS 0.2%, a 40°C. Las membranas se expusieron como se describe arriba. Como control positivo, se utilizó una sonda contra miR-8. Los experimentos se realizaron 4 veces de manera independiente. Los oligonucleótidos empleados como sondas se describen en la Tabla 1.

9. Enriquecimiento de RNA nuclear.

Para enriquecer la fracción nuclear, modificamos el protocolo descrito por Sullivan et al. (2000). Brevemente, se colectó 1 mg de embriones silvestres de la línea *yw* en placas de agar, los cuales se decorionaron con hipoclorito de cloro al 50%. Los embriones se homogenizaron en una solución de HEPES 15 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.5 mM, sacarosa 350 mM, DTT 1 mM y metabisulfito de sodio 1 mM. El homogenado se filtró a través de gasa estéril y se centrifugó. El sobrenadante (fracción citoplásmica) y el botón (fracción nuclear) se procesaron de manera independiente para extraer el RNA, para lo cual se utilizó TRIzol y el kit Direct-Zol RNA mini prep.

10. Retrotranscripción, PCR semi-cuantitativa, y PCR en tiempo real.

Se purificó el RNA de la muestra de interés usando TRIzol y el kit Direct-Zol RNA mini prep, que incluye un tratamiento con DNase I para remover el DNA genómico. Partimos de 2 µg de RNA para sintetizar cDNA, usando la transcriptasa reversa M-MLV. Como control, realizamos la misma preparación en ausencia de enzima, para asegurar que los reactivos no estuvieran contaminados con DNA genómico. Para la PCR semi-cuantitativa, realizamos PCR estándar, y las muestras se corrieron en geles de agarosa al 1%. La densidad de las bandas se cuantificó usando ImageJ, y los experimentos se realizaron 5 veces a partir de muestras independientes. Para cuantificar la expresión de *Cka* y *aop*, utilizamos PCR en tiempo real, generando cDNA de mRNAs poliadenilados, usando un oligonucleótido de deoxi-timidina x 15 (oligo-dT), y como control de carga, utilizamos oligonucleótidos contra el gen de expresión constitutiva, *Rp49*. Para *acaI*,

sintetizamos cDNA con oligonucleótidos específicos para *acal*, para facilitar su detección. En este último caso, generamos cDNA específico para *Rp49* a partir del mismo RNA, para usarse como control de abundancia relativa. En todos los casos, utilizamos el kit Maxima SYBR Green qPCR o FastStart DNA Master SYBR Green I en el equipo LightCycler 1.0. Los oligonucleótidos empleados se enlistan en la Tabla 1.

11. Microscopía de fluorescencia (transgenes fluorescentes).

Se colectaron embriones de interés en placas de agar, y se les removiño el corion con hipoclorito de sodio al 50%. Los embriones se montaron en aceite de halógeno 700 (Halocarbon oil 700), y se analizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 780. Los empalmes en el eje Z se procesaron usando el programa ImageJ. La intensidad de fluorescencia se analizó con el mismo programa.

12. Inmunofluorescencia de montaje completo de embriones y cerebros larvarios.

Se colectaron embriones en placas de agar, se les removió el corion con hipoclorito de sodio al 50%, y se se les removió el vitelo por agitación en una solución 1:1 de heptano-metanol. Después, los embriones se fijaron con PBS 1x, Tritón X-100 0.1%, formaldehído 20% por 5 minutos. A continuación, los embriones se incubaron con una solución de PBS 1x, Tritón X-100 0.1%, suero fetal de bovino al 5%, para bloquear sitios inespecíficos, y después se incubó en la misma solución con los anticuerpos primarios (22C10 o BP102) a una dilución de 1:100 toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó el anticuerpo primario y se incubó con un anticuerpo acoplado a Alexa-568 por 1 hora a temperatura ambiente. Después, los embriones se montaron en VectaShield, y se analizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 510. En el caso de los cerebros larvarios, se colectaron larvas de tercer estadio y se disecaron en PBS, usando fórceps. Los cerebros se fijaron por 20 minutos en paraformaldehído 4%-PBS 1x a 4°C, y se lavaron con PBS-Tritón X-100 0.3%. Posteriormente, se incubaron en

una solución de PBS-Tritón X-100 0.3%, suero fetal de bovino al 5%, y en la misma solución se incubaron con los anticuerpos primarios (anti-Prospero y anti-DE-Cad).

13. Microscopía electrónica de barrido.

Para tomar imágenes del ojo o del tórax de moscas adultas, los animales de interés se anestesiaron por frío (colocándolos en hielo), y se colocaron en soportes metálicos, usando pintura conductora de carbón para evitar que se concentraran los electrones en la muestra. Las imágenes se tomaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6060.

14. Cálculo de índice de hendidura torácica.

Sacrificamos hembras adultas con etil acetato, y después, éstas se colocaron con la parte dorsal hacia arriba empleando alfileres entomológicos. Se tomaron fotos del tórax en un estereoscopio equipado con cámara a un aumento de 63x. Por medio del programa iVision, medimos la distancia sin microquetas localizada en la región central del tórax, a la altura de las macroquetas dorsocentrales anteriores. Este valor se normalizó con respecto a la distancia entre las macroquetas dorsocentrales anteriores y posteriores. A este cociente, se le denominó “Índice de hendidura torácica”. Para ilustrar el fenotipo torácico, las moscas se visualizaron por microscopía electrónica de barrido, como se describe arriba.

15. Cálculo del índice de curvatura del ala.

Hembras del genotipo de interés se inmovilizaron y se fotografiaron en una vista lateral, como se describe arriba. Empleamos el programa iVision para medir el ángulo formado entre tres intersecciones: De la intersección de la vena L1 al borde del ala hacia la

intersección de la vena L2 al borde del ala, y de esta última intersección, hacia la intersección de la vena L3 con el borde del ala.

16. Cuantificación de peines sexuales ectópicos.

Fijamos machos del genotipo de interés en una solución de etanol-glicerol 1:1, y posteriormente, disecamos las extremidades. Éstas se trataron en una solución de KOH al 10%, por 10 minutos a 100°C, para remover lípidos y aclarar los tejidos. Después, las extremidades se deshidrataron en etanol, y se montaron en una solución de etanol-ácido láctico. Los peines se analizaron en un microscopio de campo claro.

17. Análisis transcriptómico.

Para cada experimento, se colectaron 1000 embriones homocigotos de *aca²*, y 1000 embriones de la línea silvestre *yw*, de 2 a 24 horas de desarrollo. Los embriones se les envío el corion en una solución de hipoclorito de sodio al 50% y posteriormente, se lavaron con PBS y se homogenizaron en TRIzol. El RNA total se extrajo utilizando el kit Direct-Zol RNA mini prep, incluyendo tratamiento con DNasa I para eliminar el DNA genómico. A continuación, se removieron los RNAs ribosomales utilizando el kit RiboMinus (Invitrogen). El RNA obtenido se envió a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA (UUSMD) donde se utilizó para preparar una biblioteca de fragmentos cDNAs con adaptómeros para la identificación de las lecturas. La secuenciación masiva se realizó en un equipo Illumina , con 37 ciclos de secuenciación (es decir, las lecturas poseen una longitud de 37 nucleótidos), y con el protocolo de lecturas sencillas, donde sólo se secuencia un extremo de cada fragmento. Las lecturas obtenidas se analizaron utilizando el paquete bioinformático de Tuxedo (Trapnell et al., 2012), utilizando como genoma de referencia de *Drosophila* la liberación 3 (Dm3) generada por la Universidad de California en Santa Cruz (Karolchik et al., 2014).

18. Bioinformática.

Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron con el programa CLC, con configuraciones de espaciamento (“gap cost”) estándar, y la opción de alineamiento lento. El árbol de similitud se creó con el mismo programa, realizando 10000 réplicas de remuestreo (bootstrapping), y el resto de los parámetros estándar. La búsqueda de marcos abiertos de lectura se realizó con CLC, fijando una longitud mínima de 30 nucleótidos. La presencia de secuencias Kozak se analizó usando el programa de Salamov et al. (1998). El análisis de conservación de secuencias se realizó en CLC, o a partir del navegador del genoma de la Universidad de California en Santa Cruz (Karolchik et al., 2013). Los marcos abiertos de lectura propuestos se analizaron por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Herramienta de búsqueda local básica de alineamientos), usando la base de datos de UniProtKB (UniProt, 2013). Algunas secuencias arrojaron similitudes con valores p mayores a 5, y no se consideraron significativos. Para el cálculo del potencial codificante, las secuencias de referencia se tomaron de Flybase, usando los transcritos más largos disponibles, y para *acal*, usamos la secuencia del cDNA SD08925.

19. Análisis estadístico.

Se emplearon pruebas de χ^2 para determinar la significancia de los cambios en la proporción de fenotipos embrionarios. El cambio en el índice de hendidura torácica se comparó mediante ANOVA con corrección de Bonferroni, para múltiples comparaciones. En el caso de PCR semi-cuantitativa y en tiempo real, se utilizaron pruebas t de Student. Para comparar la distribución de la intensidad de fluorescencia entre embriones silvestres y mutantes que expresan TRE-Ds.Red, utilizamos la prueba Kolmogorov-Smirnov. Todas las pruebas se realizaron como se implementan en el programa GraphPad, o de acuerdo a Kirkman, T. W. (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/>).

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos usados en este estudio.

Par de oligonucleótidos	Secuencia	Aplicación	Tamaño del amplicón
acal1 acal2	5'-ACACGGGCAACTGAAATGATCTCACC-3' 5'-TGCCAAACGAGTTTTGGAAGCTCTGG-3'	Secuenciación	932
acal3 acal4	5'-GAGGGAAAGAAGAAGCAGAGG-3' 5'-GGGAACAAATTCGAGAGGCATG-3'	Secuenciación PCR semi-cuantitativa	831
acal5 (acalB) acal6	5'-TCCCAGTGACGAGTGATGGATGG-3' 5'-GCAGCAGGAGTTGGAAAAAGTTGGGG-3'	Secuenciación Sonda de hibridación <i>in situ</i>	955
acal7 (acalD) acal8	5'-CCCCAACTTTTTCCAACCTCCTGCTG-3' 5'-TCCCGAGCATTAGACGAAGTAGTAGC-3'	Secuenciación	906
acal9 acal10	5'-CCAACCCCTAAAACCCCGAAAACGG-3' 5'-ATGCCAGCGGGGCAACATGG-3'	Secuenciación	1602
banF banR	5'-ACCGTTCCTTCGCACGCTT-3' 5'-CCGACTGGGATCGGTCGGCAT-3'	PCR semi-cuantitativa	837
Rp49a Rp49b	5'-TCAAGATGACCATCCGCCCA-3' 5'-GTTCTCTTGAGAACGCAGGC-3'	PCR semi-cuantitativa Sonda de Northern blot	404
Rp49b	5'-GTTCTCTTGAGAACGCAGGC-3'	Síntesis de cDNA	-
acal1	5'-GAGGGAAAGAAGAAGCAGAGG-3'	Síntesis de cDNA	-
acalQ1 acalQ2	5'-CGCTGTGAAGAGTGTGAGGA-3' 5'-CATTATGATTTTCGCGCCGCT-3'	PCR cuantitativa	150
ckaQ1 ckaQ2	5'-TTCATCCAGCACGAGTGGTC-3' 5'-CAGTGCGTACTCCAGCATCT-3'	PCR cuantitativa	162
Rp49Q1 Rp49Q2	5'-AGATCGTGAAGAAGCGCACC-3' 5'-ATCCGTAACCGATGTTGGGC-3'	PCR cuantitativa	151
acal-A	5'-TTTGTGTGTGCGTGTGTGTGTGT-3'	small RNA Northern blot probe	-
acal-B (acal3)	5'-TCCCAGTGACGAGTGATGGATGG-3'	Sonda de Northern blots	-
acal-C	5'-CCAACATCATCATCATCATCAC-3'	Sonda de Northern blots	-
acal-D (acal7)	5'-CCCCAACTTTTTCCAACCTCCTGCTG-3'	Sonda de Northern blots	-
mir8	5'-GACATCTTTACCTGACAGTATTA-3'	Sonda de Northern blots	-

XII. RESULTADOS.

1. Cuantificación de los fenotipos cuticulares de embriones mutantes de *acaI*.

Las mutaciones aisladas en *acaI* son letales, ya que nunca se observan adultos homocigotos. Muchos de estos organismos mueren durante el desarrollo embrionario; sin embargo, algunos animales sobreviven a la embriogénesis y mueren en etapas posteriores, ya sea durante el desarrollo larvario o al inicio de la metamorfosis. Esta variabilidad implica penetrancia incompleta o parcial de una mutación. Una mutación, entre más altere la función de un gen, suele tener mayor homogeneidad y fenotipos más acusados, tendiendo a una penetrancia del 100%, es decir, mayor será el número de individuos que presenten los fenotipos mutantes a nivel poblacional. Como primer paso para la caracterización del locus *acaI* y su papel en el desarrollo embrionario, cuantificamos la letalidad embrionaria de los mutantes de *acaI*, así como la proporción de embriones que mueren con defectos en el cerrado dorsal, por medio de preparaciones de cutículas embrionarias. Observamos que los alelos mutantes de *acaI* con mayor penetrancia tienen también los fenotipos más acusados (Figura 5).

Observamos que los cinco alelos mutantes de *acaI* presentan defectos en el cerrado dorsal, que van desde pequeños agujeros en la región dorsal de la cutícula, aperturas completas de la región dorsal, hasta agujeros en la región anterior, un defecto tardío del cerrado dorsal (Figura 5A-H). Algunos embriones mueren sin defectos en la cutícula. Esto significa que estos animales completaron el cerrado dorsal, pero murieron por un requerimiento del gen *acaI* durante otro proceso posterior al cerrado dorsal. De acuerdo a la letalidad embrionaria, el alelo mutante más fuerte es *acaI*⁵, ya que cerca del 85% de los animales mutantes mueren durante la embriogénesis, y el alelo más débil es *acaI*¹, ya que sólo el 10% de los animales mutantes mueren como embriones (Figura 5I). Esta caracterización nos permitió analizar también si la letalidad embrionaria observada por una mutación en *acaI* se modifica al inhibir la función o al sobre-expresar otros genes de interés.

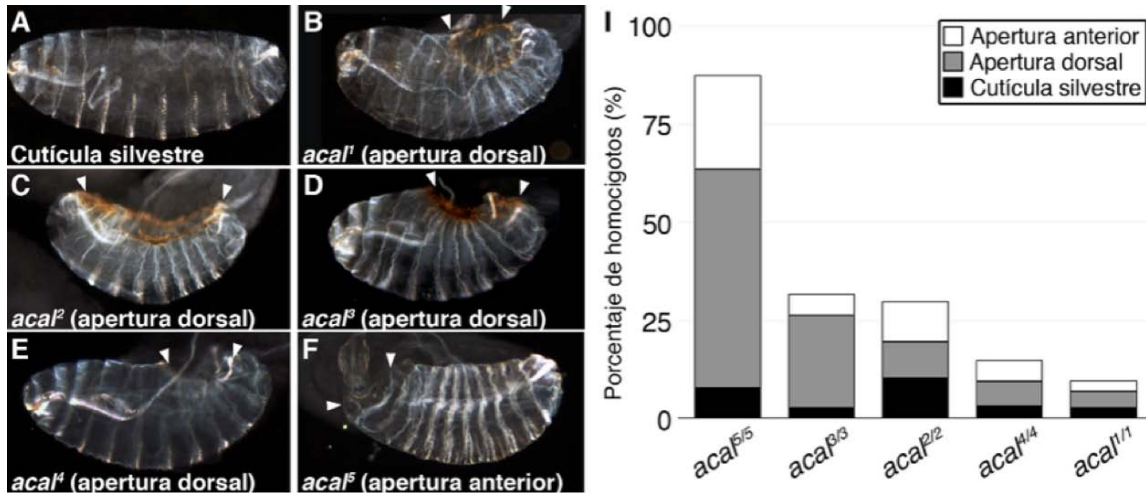


Figura 5. Cuantificación de los fenotipos cuticulares de los mutantes de *acal*.

(A-F) Imágenes de campo oscuro de cutículas embrionarias, la región dorsal se observa arriba y la anterior a la derecha. Las cabezas de flecha muestran el grado de apertura dorsal o anterior. (I) Cuantificación de los fenotipos observados en cada condición. Número de animales analizados: *acal^{1/1}* = 217, *acal^{2/2}* = 192, *acal^{3/3}* = 110, *acal^{4/4}* = 329, *acal^{5/5}* = 391.

2. Las mutaciones de *acal* mapean genética y molecularmente a un gen no anotado.

Las mutaciones *acal¹* y *acal²* se generaron a partir de la escisión de un elemento P. Como la escisión altera regiones cercanas al sitio original de la inserción, no necesariamente en el punto de inserción mismo, mapeamos las mutaciones por medio de pruebas de complementación con deficiencias (deleciones genómicas) que abarcan esta región genómica. En estas pruebas, y dado que las mutantes de *acal* son homocigotas letales, si nacen individuos con la deleción y con la mutación en *acal*, significa que la región deletada no incluye al gen *acal*. En contraste, si sólo nacen individuos heterocigotos para la mutación o para la deficiencia, significa que la región deletada sí incluye al gen *acal*, ya que los individuos que heredaron una copia mutante de *acal* y otra de la deficiencia, murieron. La condición heterocigota para la mutación o para la deficiencia se determina empleando cromosomas balanceadores; estos cromosomas aportan una copia silvestre del gen y marcadores visibles en el adulto.

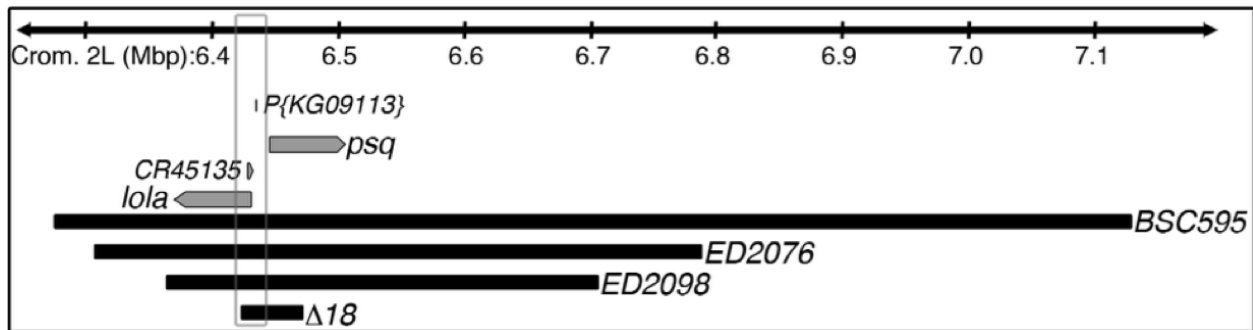


Figura 6. Representación esquemática de las deficiencias empleadas en el mapeo genético de *acal*.

La línea superior representa un fragmento del brazo izquierdo del cromosoma dos (2L), donde se localiza *KG09113*, la inserción original de donde se generaron los alelos *acal*¹ y *acal*². Se muestran los genes aledaños a dicha inserción, *lola*, *CR45135* y *psq* (por simplicidad, no se muestran otros genes). Abajo se muestran las deficiencias usadas para mapear el locus.

Se realizaron pruebas de complementación con las deficiencias *BSC595*, *ED2076*, *ED2098* y $\Delta 18$. La longitud de estas deficiencias va desde aproximadamente 900,000 pares de bases (900 kb) hasta 30 kb (Figura 6). A partir de estas pruebas, se acotó el locus de interés a una región de 30 kb. Esta región incluye parcialmente los genes *lola*, un RNA no codificante, *CR45135*, y *psq*. *CR45135* abarca un exón de *lola*, y muchas mutaciones de *lola* caen en esta región. Para verificar si las mutaciones de *acal* caen en estos genes ya caracterizados (es decir, son alélicas a *lola/CR45135* o *psq*), se realizaron pruebas de complementación entre alelos mutantes de *acal* con alelos mutantes de *lola* y de *psq*. Las mutantes de *acal* complementan alelos mutantes de ambos genes (Tabla 2). Por lo tanto, acotamos aún más la región de interés a la zona entre *lola/CR45135* y *psq*, a un espacio de 14kb. En esta región no hay genes anotados en las bases de datos, por lo que estas mutaciones afectan un gen no anotado en bases de datos, presente entre *lola* y *psq*. En primer lugar buscamos evidencia en la literatura de la expresión de un gen para este locus que acotamos genéticamente.

Tabla 2. Pruebas de complementación entre mutantes de *acal* y genes aledaños.

	<i>lola</i> ⁰⁰⁶⁴²	<i>lola</i> ^{rev6}	<i>acal</i> ¹	<i>acal</i> ²	<i>acal</i> ³	<i>acal</i> ⁴	<i>acal</i> ⁵	<i>psq</i> ^{KG09291}	<i>psq</i> ^{rev7}	<i>psq</i> ^{rev12}
<i>lola</i> ⁰⁰⁶⁴²	X		VF	VF	VF	VF	VF	VF	VF	VF
<i>lola</i> ^{rev6}		X	VF	VF	VF	VF	VF	VF		
<i>acal</i> ¹			X	X	X	X	X	VF	VF	VF
<i>acal</i> ²				X	X	X	X	VF	VF	VF
<i>acal</i> ³					X	X	X	VF	VF	VF
<i>acal</i> ⁴						X	X	VF	VF	VF
<i>acal</i> ⁵							X	VF	VF	VF
<i>psq</i> ^{KG09291}								X	VF	HE
<i>psq</i> ^{rev7}									X	
<i>psq</i> ^{rev12}										X

Se realizaron cruces entre moscas heterocigotas para *acal* y *lola* o *psq*, y se analizó la progenie. Con una X, se indica los alelos que no complementan entre sí (que son alélicos). VF indica que la progenie además de ser viable, es fértil. HE indica que las moscas que poseen dos alelos determinados son viables, pero las hembras no son fértiles.

En un reporte previo, se mostró que en esta misma región existe al menos una mutación que complementa a *lola* y *psq* (Wilk et al., 2004). En ese trabajo se demostró que dicha mutación, *l(2)00297*, suprime el fenotipo mutante de *peb*¹ en el ojo. *peb*¹ es una mutación viable, que afecta la formación del ojo de la mosca, y como consecuencia, los omatidios y quetas mecano-receptoras del ojo tienen un tamaño variable; algunas de estas quetas se encuentran duplicadas en los mutantes (Wilk et al., 2004). *l(2)00297* suprime este fenotipo, aunque se desconoce la naturaleza del gen alterado en *l(2)00297*. Al observar que *l(2)00297* se encuentra en la misma región en donde mapean las mutantes de *acal*, decidimos observar si nuestras mutantes también son capaces de suprimir el fenotipo mutante de *peb*¹, lo que sugeriría que *l(2)00297* y *acal* pudieran ser alélicos, porque el alelo mutante de *l(2)00297* ya no existe para realizar pruebas de complementación. Observamos que, en efecto, todos los alelos mutantes de *acal* suprimen dicho fenotipo (Figura 7). Estos resultados sugieren que

l(2)00297 y nuestras mutantes afectan al mismo gen. Además, aportan evidencia independiente de un locus letal localizado entre *lola* y *psq*.

Muchos genes de *Drosophila melanogaster*, así como los de otros organismos, se han anotado gracias a herramientas bioinformáticas que permiten identificar marcos abiertos de lectura y otras secuencias consenso. Sin embargo, para genes no convencionales se debe recurrir a otras estrategias, principalmente experimentales, para su identificación.

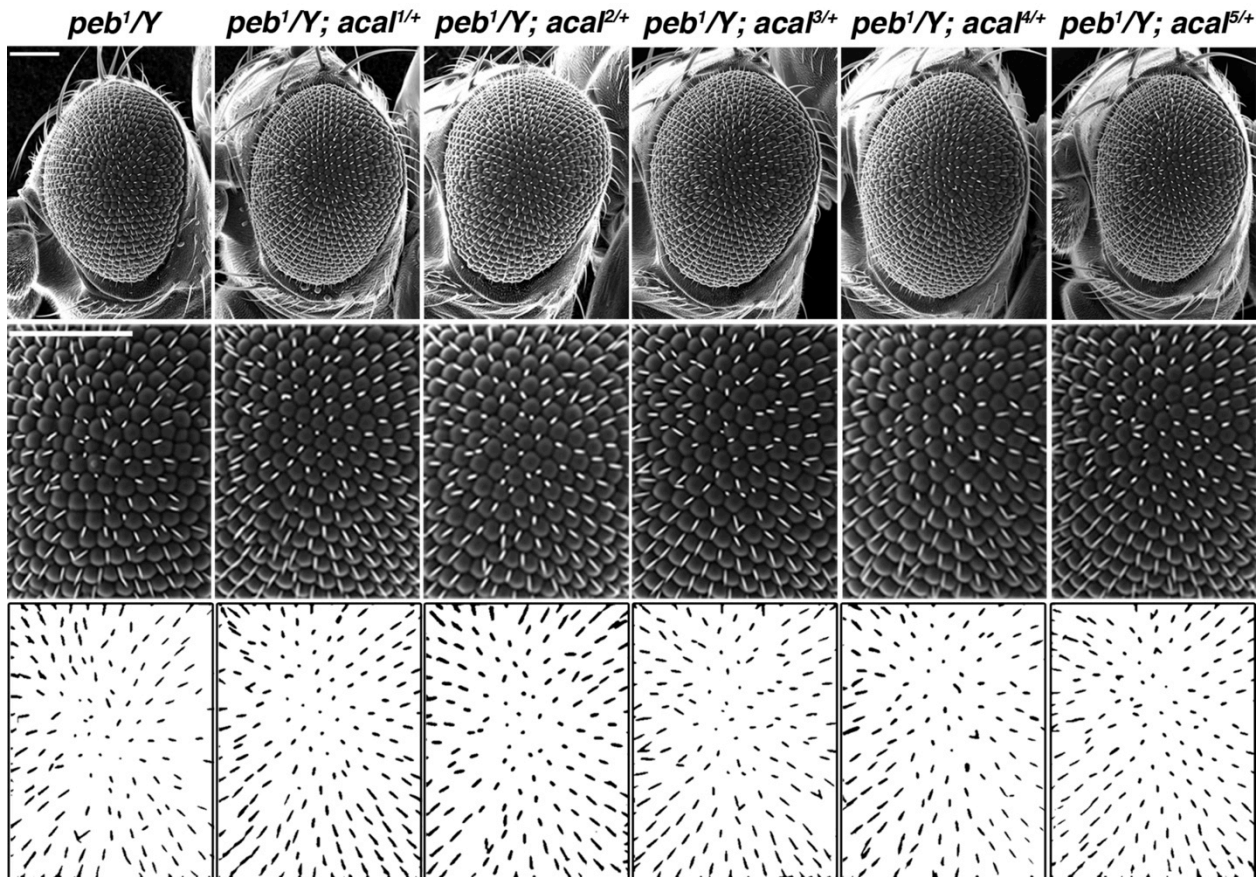


Figura 7. La heterocigosis para *acal* suprime el fenotipo mutante de *peb¹*.

Imágenes de microscopía electrónica de barrido del fenotipo de ojo rugoso de *peb¹* (omatidios de tamaños variables y desorganizados, y quetas desalineadas), y su supresión parcial por la heterocigosis de *acal*. La barra equivale a 100 μ m. Vistas laterales, la región anterior se observa a la izquierda, y la dorsal hacia arriba. Los paneles de abajo muestran las posiciones de las quetas de la ampliación de los paneles centrales.

En una biblioteca de DNAs complementarios (cDNAs) de *Drosophila* publicada en una base de datos, identificamos un cDNA parcialmente secuenciado que mapea a 3.7 kb de *lola*. Obtuvimos este cDNA, llamado *SD08925*, y lo secuenciamos completamente (registrado en Pubmed con el número #KJ598082). *SD08925* posee una longitud de 2.3 kb, no posee intrones, y además de estar poli-adenilado, presenta un potencial sitio de poli-adenilación en el extremo 3' (Figura 8A). Por medio de Northern blots, confirmamos que *SD08925* es un cDNA completo, ya que pudimos detectar una banda del tamaño esperado. *SD08925* se expresa muy débilmente en todos los estadios del ciclo de vida de *Drosophila* (Figura 8B). Adicionalmente, en un trabajo en donde se caracteriza y clona al gen *lola*, aledaño al locus de *acaI*, se aísla un transcrito cercano a *lola*, cuyo mapeo coincide con la posición de *SD08925* (Giniger et al 1994). Estas tres evidencias independientes muestran que este locus se transcribe in vivo.

Para determinar si *SD08925* corresponde al gen de *acaI*, secuenciamos 4.7 kb del locus, a partir de DNA genómico de embriones homocigotos mutantes y de líneas control (línea silvestre *yw* y la línea parental, Figura 8A). Dentro de la secuencia correspondiente a *SD08925* encontramos una inserción de 20 pares de bases en *acaI*¹, localizada a 1031 pares de bases del sitio original de inserción del elemento P, en la posición +931 del cDNA. Similarmente, en el alelo *acaI*² encontramos una deleción de 2 pb a 1630 pb del sitio de inserción original del elemento P, en la posición +299 del cDNA (Figura 8). A partir de estos resultados, supusimos que dichos cambios en la secuencia son debidos a la escisión imprecisa del elemento P, y probablemente responsables de los fenotipos mutantes de *acaI*¹ y de *acaI*², respectivamente, ya que estas alteraciones no se encuentran en ninguno de los controles ni en los otros alelos mutantes de *acaI*.

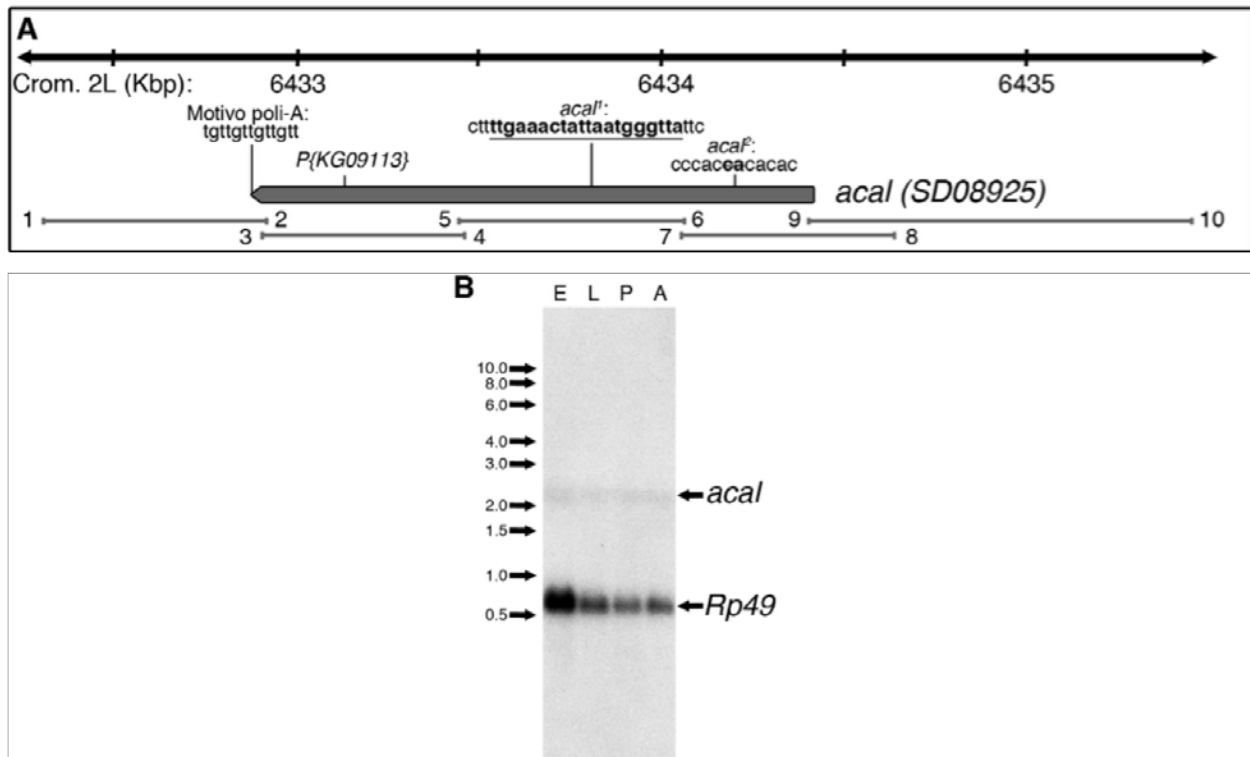


Figura 8. Representación esquemática y detección del cDNA SD08925.

(A) La línea superior representa un fragmento del brazo izquierdo del cromosoma dos (2L). Se detallan el sitio de inserción original del elemento P *KG09113*, el probable sitio de poliadenilación de *SD08925*, y las lesiones moleculares de los alelos *acal¹* y *acal²*. Además, se muestran los amplicones secuenciados en las líneas mutantes (líneas inferiores marcadas con los números de los oligonucleótidos utilizados para amplificarlos; ver Tabla 1 para la secuencia de los oligonucleótidos). (B) Detección por Northern blot de *SD08925 (acal)* y de *Rp49* como control de carga. Para detectar ambos transcritos, la membrana se incubó con una sonda radiactiva contra *SD08925*, y posteriormente, se hibridó con una sonda para *Rp49*.

Para corroborar que este locus es el responsable del fenotipo mutante de *acal*, realizamos un experimento de rescate genómico, en el cual insertamos una construcción de aproximadamente 20 kb comprendiendo la secuencia silvestre de *SD08925*, en moscas heterocitogas para *acal*, de tal forma que la progenie homocigota mutante poseerá también dicha construcción. Esta construcción, llamada *178D09*, deberá de proveer la función del gen de *acal* y por tanto, rescatar la viabilidad de dichos organismos. *178D09* abarca un extremo del gen *lola*, *CR45135*, la región de *SD08925*, y aproximadamente 7 kb río arriba de *SD08925* (Figura 9A). *178D09* rescata significativamente la letalidad embrionaria de *acal¹* y de *acal²*, sugiriendo que las

mutaciones afectan el locus acotado (Figura 9B). La expresión de *SD08925* no cambia significativamente en presencia de esta construcción, presumiblemente debido a secuencias regulatorias endógenas que mantienen niveles de expresión bajos, aunque el rescate contribuya con transcritos funcionales (Figura 9C).

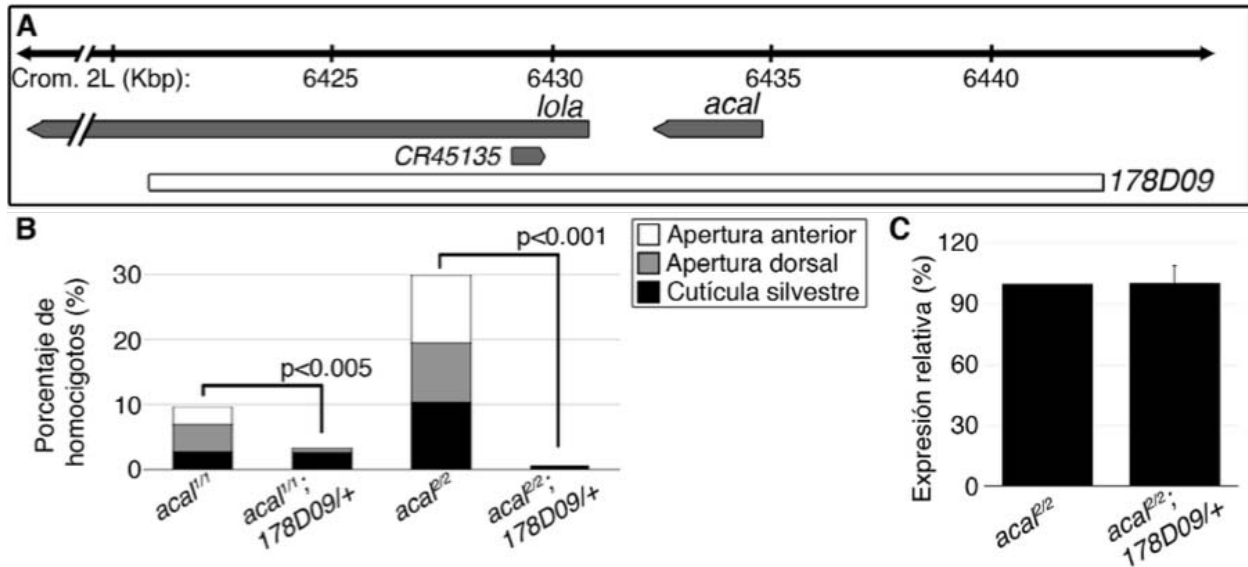


Figura 9. Rescate genómico de los alelos mutantes de *acal*.

(A) Representación esquemática de la construcción de rescate, *178D09*, que abarca el extremo 5' del gen *lola*, *CR45135*, *SD08925*, y 7 kb río arriba del mismo. (B) Cuantificación de cutículas embrionarias y su modificación por la construcción de rescate. Número de animales analizados: *acal*^{1/1}=217, *acal*^{1/1}; *178D09/+*=314, *acal*^{2/2}=192, *acal*^{2/2}; *178D09/+*=159, prueba de χ^2 . (C) Expresión relativa de *acal* (*SD08925*) en embriones mutantes de *acal*² en presencia o ausencia de la construcción de rescate. Se grafica el promedio de tres experimentos independientes, realizados por duplicado.

En los alelos *acal*³, *acal*⁴ y *acal*⁵ no encontramos ningún cambio en la secuencia en la región analizada. Dado que secuenciamos toda la región correspondiente a *SD08925*, decidimos explorar si algunas de estas mutaciones afectan la región regulatoria (ya que la región codificante no tenía cambios). Para determinar esto, cuantificamos la expresión de *SD08925* en embriones mutantes. Analizamos los alelos *acal*² y *acal*⁵, en etapas del cerrado dorsal. Encontramos que en mutantes de *acal*² no hay cambios en la expresión con respecto a embriones silvestres. En contraste, la expresión de

SD08925 se encuentra disminuida significativamente en embriones homocigotos para *aca^{f5}*, sugiriendo que esta mutación cae en una región regulatoria, lo cual afecta la expresión de *SD08925* (Figura 10A), y es consistente con que el locus donde se localiza *SD08925* corresponde al gen *aca^f*.

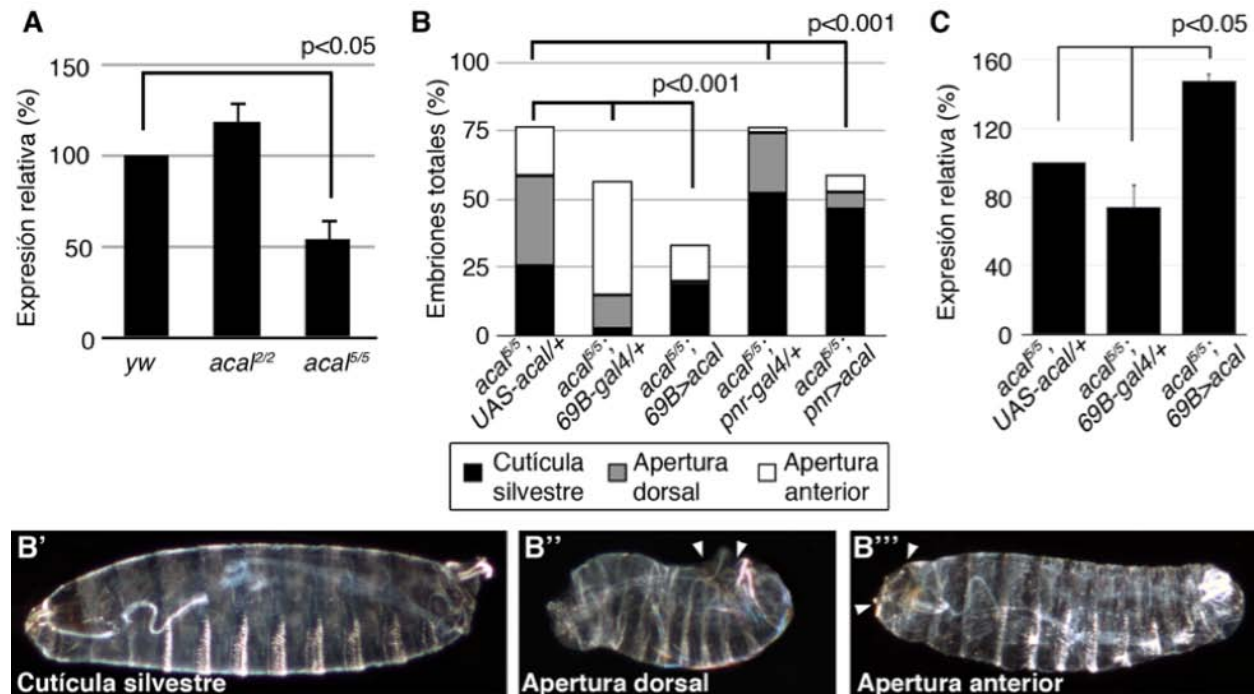


Figura 10. Expresión y sobre-expresión de *SD08925* en embriones mutantes de *aca^f*.

(A) Cuantificación por qPCR de la expresión de *SD08925* en embriones silvestres y mutantes, durante la etapa del cerrado dorsal. (B) Cuantificación de fenotipos en cutículas de embriones mutantes para *aca^{f5}*. Embriones que sólo poseen el transgen *UAS-acal*, o que sólo poseen la línea *gal4* presentan más defectos en el cerrado dorsal que aquellos que poseen ambas construcciones (que sobre-expresan el transgen *UAS-acal*). *69B* expresa *gal4* en todo el ectodermo, y *pnr* en la epidermis lateral. Número de animales analizados: *aca^{f5}; UAS-acal/+*=240, *aca^{f5}; 69B-gal4/+*=441, *aca^{f5}; 69B>acal*= 237, *aca^{f5}; pnr-gal4/+*=435, *aca^{f5}; pnr>acal*=130. (B'-B''') Imágenes representativas de embriones mutantes para *aca^{f5}*, sobre-expresando el transgén *UAS-acal*. Los defectos en cutícula son indistinguibles al de los embriones mutantes para *aca^{f5}* sin rescate, pero su abundancia disminuye significativamente. (C) Cuantificación por qPCR de la expresión de *SD08925* en embriones control (*aca^{f5}; UAS-acal/+*, *aca^{f5}; 69B-gal4/+*) y en embriones que sobre-expresan *SD08925* en el ectodermo (*aca^{f5}; 69B>acal*). En A y C, se grafica el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. La significancia se determinó usando t de Student (A, C) y χ^2 (B).

Finalmente, para corroborar que *SD08925* es el gen responsable de las mutaciones de *acal*, recurrimos al sistema binario de expresión UAS/Gal4. UAS y Gal4 son elementos endógenos de levadura, y se han adaptado como herramienta experimental para expresión de genes en *Drosophila* (Brand y Dormand, 1995). UAS es una secuencia de DNA que constituye un elemento de respuesta a Gal4, un factor de transcripción.

Se han generado muchas líneas transgénicas de moscas que expresan Gal4 en diferentes tejidos y etapas del desarrollo de la mosca, por lo que es sencillo hacer experimentos de expresión ectópica, generando transgenes unidos a la secuencia UAS y cruzando a estas moscas con líneas que expresan Gal4 en un patrón de interés. En este caso, fusionamos la secuencia UAS al cDNA *SD08925*, y generamos líneas de moscas transgénicas que poseen esta construcción (referida como *UAS-acal*). Esto nos permitió sobre-expresar a *SD08925* en todo el ectodermo de embriones mutantes para *acal*^Δ (usando la línea *69B-gal4*), o sobre-expresarlo sólo en la epidermis lateral de estos embriones (usando la línea *pnr-gal4*).

La sobre-expresión de *SD08925* en el ectodermo de embriones mutantes para *acal*^Δ resultó en una disminución significativa en la proporción de embriones con defectos en el cerrado dorsal, y en la letalidad embrionaria. Por otro lado, la sobre-expresión de *SD08925* en la epidermis lateral resultó en una disminución significativa de embriones con defectos en el cerrado dorsal (Figura 10B). Además, corroboramos que el transgén realmente se sobre-expresa al usar el sistema Gal4/UAS (Figura 10C). En conjunto, todos estos resultados muestran que *SD08925* corresponde al gen *acal*.

3. *acal* es un RNA no codificante.

Nuestros experimentos de mapeo y de rescate de los alelos mutantes de *acal* demuestran que el gen alterado en los mutantes corresponde a un gen no anotado en bases de datos, de una longitud de 2.3 kb, sin intrones, y poli-adenilado. El locus de *acal* está conservado en otras especies de *Drosophila* y en otros dípteros como *Anopheles gambiae* (Figura 11A–B). Las mutaciones de *acal*¹ y *acal*² caen alrededor de

sitios conservados en el transcrito. Para determinar cuál podría ser el producto funcional del gen, realizamos una búsqueda de marcos abiertos de lectura, que podrían traducirse a proteínas. Sin embargo, encontramos que *acal* posee sólo marcos abiertos de lectura pequeños (menores a 243 nucleótidos, equivalentes a 81 residuos, Figura 11C). Estos marcos abiertos de lectura no están conservados en las especies en la que sí está *acal* (Figura 11C), por lo que es poco probable que se traduzcan a péptidos o proteínas.

Recientemente se han identificado genes policistrónicos, que codifican para péptidos de hasta 11 aminoácidos [por ejemplo, *polished rice (pri)* y *pncr003* (Kondo et al., 2010; Savard et al., 2006)]. Sin embargo, en estos genes se observan varios marcos abiertos de lectura en tándem que presentan homología entre sí. Estos péptidos tienen homólogos en especies cercanas. En el caso de *acal*, los marcos abiertos de lectura presentes en el gen no presentan homología entre sí, y no están conservados. Los péptidos putativos no arrojan secuencias homólogas en bases de datos de secuencias de proteínas, ya sea anotadas por predicción u obtenidas experimentalmente (Loevenich et al., 2009; St Pierre et al., 2014). Para obtener un parámetro cuantitativo de qué tan probable es que *acal* codifique a proteínas o no, utilizamos un algoritmo que calcula el potencial codificante de un RNA (Kong et al., 2007).

Este algoritmo considera seis criterios para determinar si un gen codifica o no: 1) presencia de marcos abiertos de lectura, 2) cobertura de los marcos abiertos con respecto a la longitud del RNA, 3) presencia de codones de inicio y de paro, 4) número de resultados en un análisis de BLASTX, 5) alta calidad en los resultados de BLASTX, y 6) que los resultados de BLASTX correspondan con algún marco abierto de lectura. Como referencia, determinamos el potencial codificante de otros genes conocidos (Figura 11D). Encontramos que, como se esperaba, los transcritos de genes que codifican para proteínas tienen un alto potencial codificante, incluso aquellos que codifican para péptidos pequeños como *pri*. Por otra parte, *acal* arrojó un potencial codificante extremadamente bajo, similar a otros RNAs no codificantes conocidos (Figura 11D).

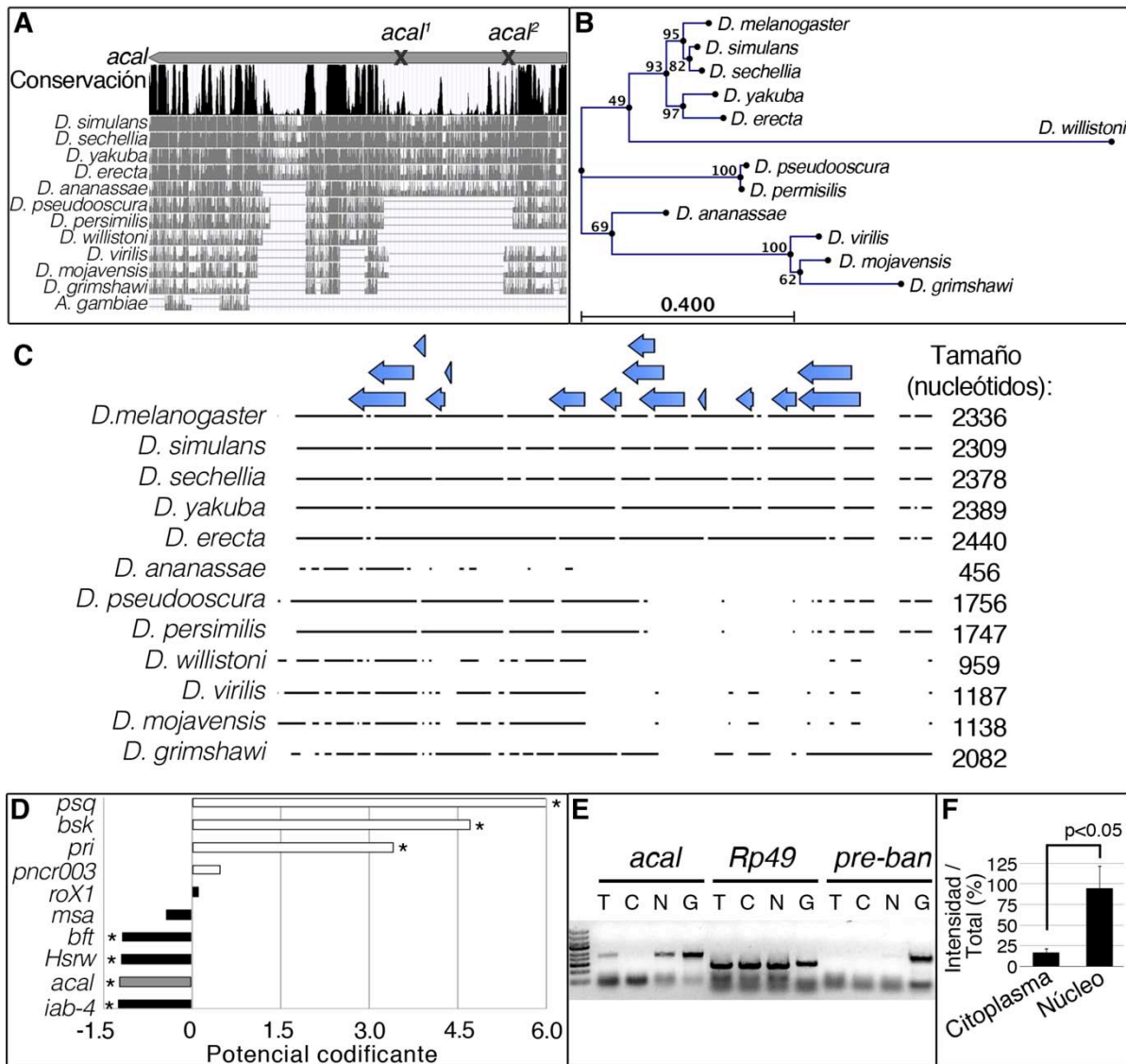


Figura 11. Análisis de la conservación de *acal* y de su potencial codificante.

(A) Se muestra la conservación de *acal* en dípteros con respecto a la secuencia de *D. melanogaster*. También se esquematizan las mutaciones *acal¹* y *acal²*. (B) Filograma de *acal* en Drosofilidos. Se muestran los valores de confianza del cálculo de las relaciones entre especies. (C) Alineamiento de secuencias múltiples de *acal* en diferentes Drosofilidos. Los marcos abiertos de lectura de la secuencia de *D. melanogaster* se muestran en azul. (D) Potencial codificante de *acal* y otros genes. *pipsqueak* (*psq*) es un factor de transcripción, *basket* (*bsk*) es una cinasa, *polished rice* (*pri*) y *pncr003* codifican para péptidos pequeños. *roX1* (*RNA on the X 1*), *msa* (*male-specific abdominal*), *bereft* (*bft*), *Hsrw* (*Heat shot response omega*) y *iab-4* (*infra-abdominal 4*) son RNAs no codificantes. Los asteriscos denotan significancia en el resultado. (E) RT-PCRs semi-cuantitativas para detectar *acal* en RNA total [T], citoplásmico [C], o nuclear [N]. Como control, se amplificó DNA genómico [G]. Como control de carga, se empleó *Rp49*, y como control de un RNA nuclear, el precursor de *bantam* (*pre-ban*). (F) La amplificación de *acal* se cuantificó por densitometría a partir de 5 experimentos independientes, y su significancia se determinó con t de Student.

De manera general, los RNAs no codificantes pueden dividirse en RNAs no codificantes cortos, de hasta 200 nucleótidos de longitud, y RNAs no codificantes largos, de hasta varios kilobases de longitud (Rinn y Chang, 2012). Hasta ahora, los RNAs no codificantes cortos han sido mejor caracterizados ya que comparten la misma maquinaria para su biogénesis y generalmente funcionan silenciando a otros mensajeros (Berezikov et al., 2011; Okamura et al., 2004). Por ejemplo, los microRNAs se generan a partir de precursores largos (incluso de más de 5 kilobases) que luego son procesados a sus formas maduras, de 24 nucleótidos en promedio (Krol et al., 2010). Estos precursores no salen del núcleo, ya que rápidamente son procesados. De manera similar, la gran mayoría de los RNAs no codificantes largos (lncRNAs) tienen funciones nucleares, por lo que son retenidos en el núcleo luego de ser sintetizados (Fatica y Bozzoni, 2014). En contraste, los RNAs codificantes son exportados al citoplasma para ser traducidos.

Decidimos explorar la localización intracelular de *acal*. Para esto, purificamos RNA a partir de una fracción nuclear, citoplásmica, y de un extracto total. Posteriormente, detectamos el transcrito por PCR semi-cuantitativa. Como control de un RNA que se localiza en el núcleo, amplificamos el precursor del microRNA *bantam* (*ban*), y como control de carga, analizamos a *Rp49*, un RNA codificante que es transportado al citoplasma (Figura 11E). Detectamos amplificación del precursor de *ban* (*pre-ban*) únicamente en la fracción nuclear. *pre-ban* no es detectable en el RNA total, posiblemente porque es procesado rápidamente hacia la forma madura de *ban*. *Rp49* es detectable en ambas fracciones, mientras que *acal* se encuentra significativamente enriquecido en la fracción nuclear (Figura 11E-F). La localización nuclear de *acal*, su bajo potencial codificante, y la ausencia de marcos abiertos de lectura conservados, apoyan fuertemente que *acal* es un RNA no codificante.

Recientemente, se han empleado técnicas de secuenciación masiva de RNA en la identificación y anotación de RNAs pequeños existentes en el genoma de *Drosophila* (Berezikov et al., 2011). Estos proyectos han sido liberados en bases de datos públicas (McQuilton et al., 2012; St Pierre et al., 2014). Dado que *acal* es un RNA no codificante, buscamos en estas bases de datos si es que existen lecturas de RNAs pequeños

mapeando dentro del transcrito de *acal*, que pudieran ser los productos maduros del gen. Encontramos que existen dos grupos de lecturas en el rango de los 20 nucleótidos, detectadas bajo diferentes condiciones de cultivo y durante diferentes estadios del desarrollo. Planteamos la hipótesis que estos RNAs pequeños podrían ser los productos funcionales de *acal*, posiblemente microRNAs, y que el transcrito de 2.3 kb podría ser su precursor.

Estas especies de RNA no han sido anotadas en el genoma ya que no cumplieron los criterios de inclusión para su anotación. Denominamos a estas regiones “*acal-A*” y “*acal-C*”, y decidimos validar experimentalmente su procesamiento (Figura 12). Para esto, purificamos RNA de embriones, larvas, pupas y adultos silvestres y lo analizamos por Northern blot en geles de acrilamida, donde sólo se separan RNAs de hasta 200 nucleótidos de longitud.

Utilizando una sonda complementaria a *acal-A*, encontramos al menos 7 fragmentos que van de ~50 a ~115 nucleótidos de longitud. Estos fragmentos son más abundantes durante el estadio de pupa (Figura 12C, por simplicidad, sólo se muestran los estadios de embrión y pupa). Este tipo de fragmentación apoya que *acal* es un RNA no codificante, y descarta que *acal* sea un precursor de microRNAs, ya que no encontramos ninguna banda del tamaño de los microRNAs (22-27 nucleótidos). A la fecha, no existen reportes de otros RNAs procesados a estos tamaños, por lo que su función es difícil de determinar.

Utilizando una sonda complementaria a *acal-C*, no detectamos fragmentos en ningún estadio (Figura 12C). Sin embargo, decidimos explorar si se generan fragmentos de otras regiones del transcrito, usando dos sondas más: *acal-B* y *acal-D* (Figura 12A). *acal-B* cae en una porción altamente conservada del transcrito. Interesantemente, detectamos un fragmento de 56 nucleótidos, un tamaño coincidente con el de la región conservada (Figura 12B). Utilizando la sonda *acal-D*, no detectamos fragmentos en ningún estadio (Figura 12C).

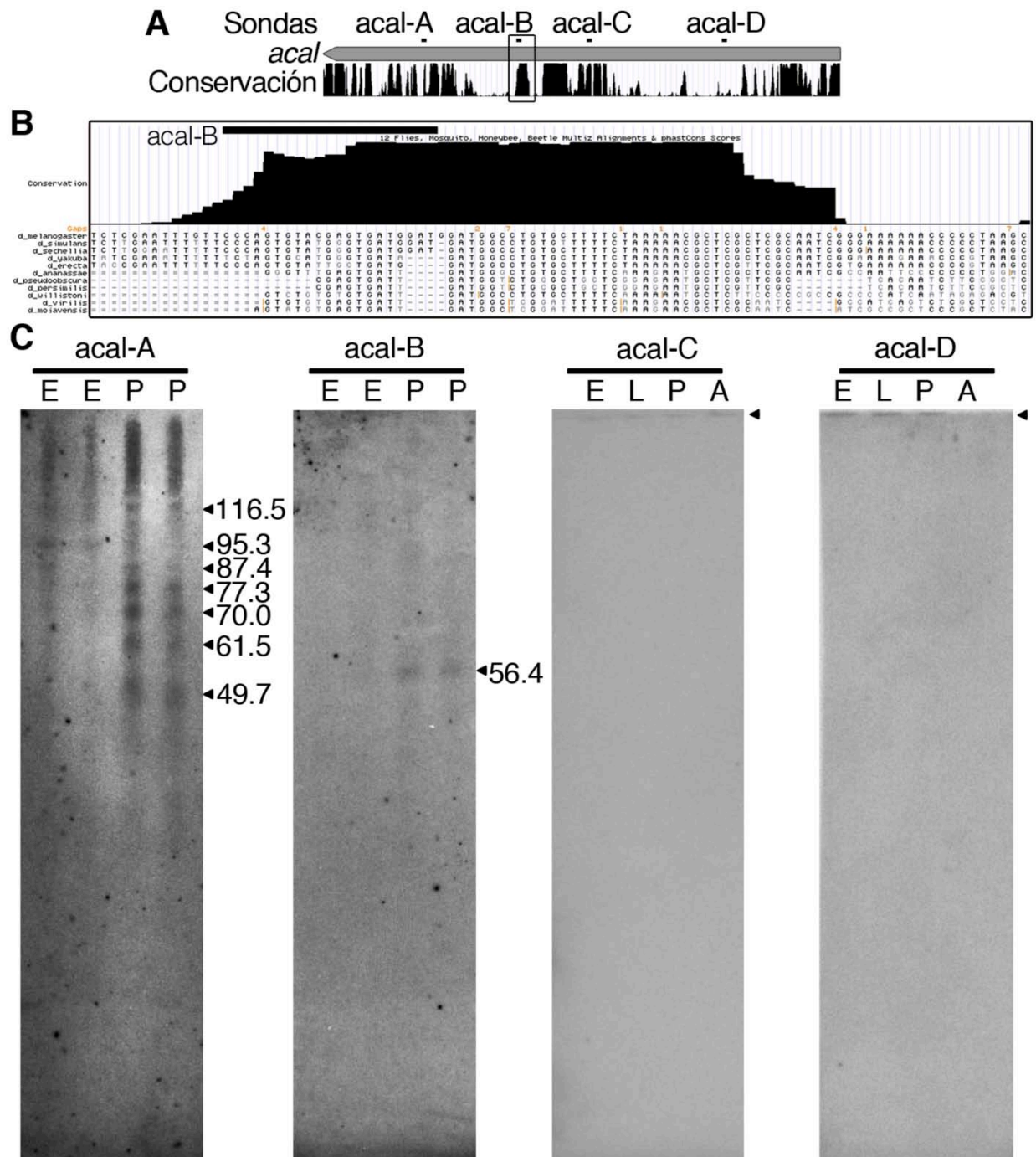


Figura 12. Detección de fragmentos de *acal* por Northern blot para RNAs pequeños. (A) Esquema de *acal* y de las sondas empleadas en ensayos de Northern blot. El recuadro en *acal*-B se muestra en detalle en (B). (C) Northern blots a partir de RNA total de embriones [E], larvas [L], pupas [P] y adultos [A]. Se muestran los tamaños estimados, a partir de 5 ensayos independientes

Desafortunadamente, no pudimos explorar si los fragmentos provenientes de *acal*-A y *acal*-B se modifican en los mutantes de *acal*, ya que su producción es más evidente durante el estadio de pupa, y los mutantes de *acal* mueren como embriones o como larvas. Aún así, a partir de estos resultados proponemos que *acal* es un RNA no codificante largo (lncRNA), que es procesado de manera no convencional.

Los lncRNAs son una clase emergente de reguladores de la expresión génica. La gran mayoría tienen una localización nuclear, y tienen diversos mecanismos de acción (Fatica y Bozzoni, 2014). A pesar de ser muy abundantes en el genoma, sus funciones no son del todo claras, ya que no necesariamente operan de la misma manera. Por su longitud, nuestros resultados clasifican a *acal* como un lncRNA que es procesado a varios fragmentos en su extremo 3'. La relevancia fisiológica de este procesamiento aún debe determinarse.

4. Expresión de *acal* durante el desarrollo embrionario.

Muchos embriones mutantes para *acal* mueren con defectos en el cerrado dorsal. Para definir el papel de *acal* durante la embriogénesis, y en particular, durante el cerrado dorsal, decidimos estudiar en qué etapas y en qué tejidos se expresa el gen. Entonces, generamos una sonda de 1 kb, complementaria a *acal*, acoplada a digoxigenina, y la empleamos en ensayos de hibridación *in situ* en embriones silvestres. Como control negativo de la tinción, utilizamos una sonda no complementaria, o sentido.

Observamos que *acal* se encuentra presente y de manera homogénea, desde etapas muy tempranas del desarrollo (Figura 13, estadio 5), sugiriendo que es depositado en el ovocito durante la ovogénesis (contribución materna). Sin embargo, a partir de la gastrulación, su localización comienza a restringirse a los pliegues cefálicos, dorsales y ventrales (Figura 13, estadio 7). A partir de la extensión y retracción de la banda germinal, su expresión comienza a restringirse a la epidermis lateral y al sistema nervioso (Figura 13, estadios 9-11).

Consistente con los fenotipos mutantes, en etapas del cerrado dorsal se observa expresión importante en la epidermis lateral. También existe expresión en el sistema nervioso en formación (Figura 13, estadios 13-15). Una vez completado el cerrado dorsal, la expresión en la epidermis disminuye significativamente, y sólo se observa expresión en el sistema nervioso (Figura 13, estadio 17).

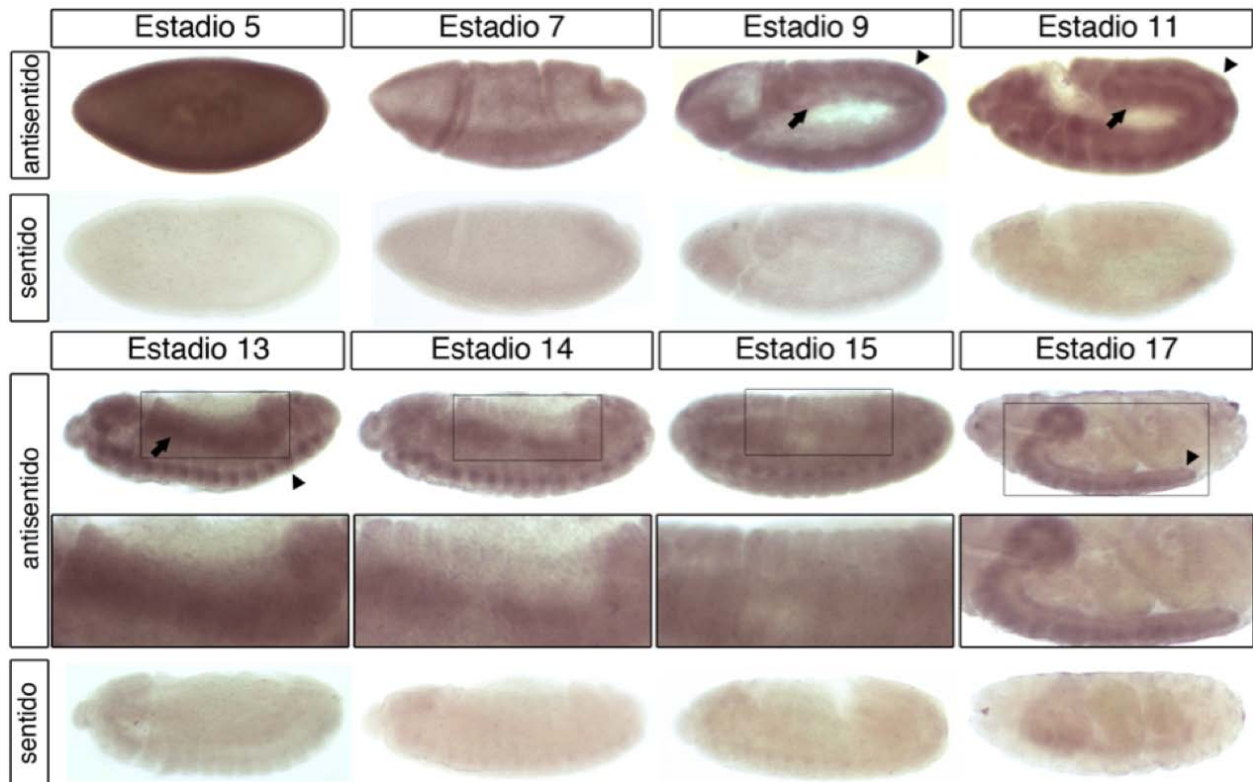


Figura 13. Patrón de expresión de *acal* durante el desarrollo embrionario de embriones silvestres.

Hibridación *in situ* de *acal* en embriones de la línea *yw*. Vistas laterales de embriones. La porción anterior se muestra a la izquierda, y la dorsal hacia arriba. Para cada estadio, se muestra el control negativo o sentido. Las flechas muestran expresión en la epidermis lateral, y las cabezas de flecha muestran expresión en el sistema nervioso. Los recuadros en los estadios 13-17 se amplifican en los paneles inferiores.

El patrón de expresión de *acal* es consistente con el experimento de rescate usando el sistema UAS-*gal4*. Con este sistema, pudimos rescatar los fenotipos mutantes de *acal*, sobre-expresando el transgén silvestre en todo el ectodermo, o sólo en la epidermis

lateral (Figura 10B). Cabe destacar que la sobre-expresión en el ectodermo es más efectiva que la sobre-expresión únicamente en la epidermis lateral, presumiblemente porque en embriones silvestres, *acaI* se expresa tanto en la epidermis lateral como en el sistema nervioso, sugiriendo tener función(es) en los dos tejidos.

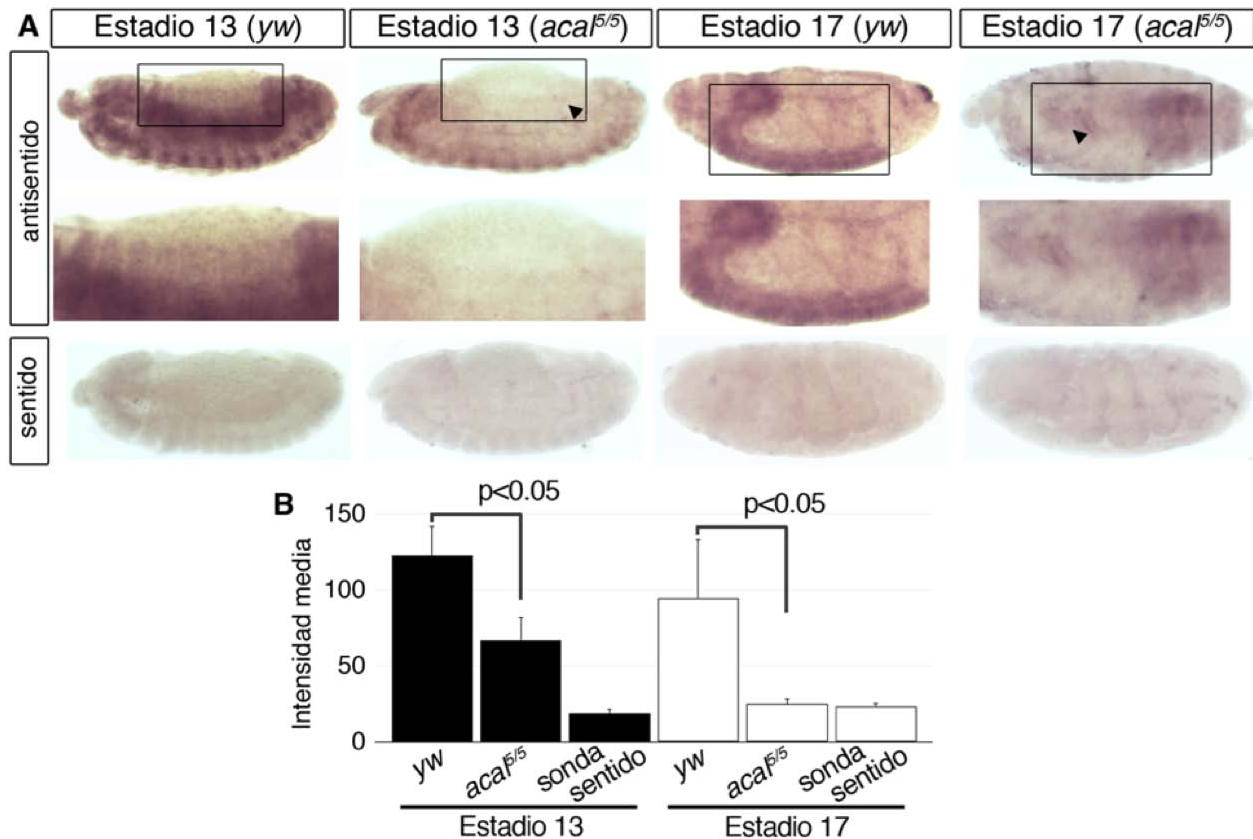


Figura 14. Patrón de expresión de *acaI* durante el desarrollo embrionario de embriones mutantes.

(A) Hibridación *in situ* contra *acaI* en embriones silvestres de la línea *yw*, y en embriones mutantes *acaI*⁵. Vistas laterales de embriones. La porción anterior se muestra a la izquierda, y la dorsal hacia arriba. Para cada estadio, se muestra el control negativo o sentido. Las cabezas de flecha muestran la disminución en la expresión de *acaI* en los embriones mutantes. Los recuadros se amplifican en los paneles inferiores. (B) Cuantificación de la tinción por densitometría. Se muestra el promedio de 5 embriones +/- error estándar. La significancia se determinó con pruebas de t de Student.

Nuestros experimentos de PCR en tiempo real sugieren que *aca*^Δ es una mutación regulatoria, ya que en estos embriones se observa una menor expresión de *aca* (ver Figura 10A). Confirmamos este cambio en la expresión por medio de hibridación *in situ*. Encontramos que a partir del estadio 13, cuando inicia el cerrado dorsal, los embriones mutantes para *aca*^Δ muestran una reducción en la expresión de *aca* en la epidermis lateral, mientras que la expresión en el sistema nervioso no se ve afectada (Figura 14).

En estadios posteriores, la expresión en el sistema nervioso también disminuye significativamente. Estos resultados refuerzan nuestra hipótesis de que *aca*^Δ es una mutación regulatoria que afecta la expresión de *aca*. Aunado a los experimentos de sobre-expresión en la epidermis, los resultados de hibridación *in situ* muestran que *aca* se expresa en la epidermis, y que esta expresión es requerida para completar el cerrado dorsal.

5. *aca* regula negativamente la vía de JNK durante el cerrado dorsal.

Hasta ahora, en este trabajo hemos demostrado que *aca* es un RNA no codificante y que su expresión en la epidermis lateral es necesaria para completar el cerrado dorsal. El cerrado dorsal es regulado por la vía de JNK, y actualmente, existen diferentes reporteros disponibles para monitorear la activación de la vía. Analizamos la expresión de la proteína roja fluorescente DsRed bajo el promotor TRE (*Tetradecanoylphorbol acetate Response Element*), al cual se une el complejo AP-1 al ser activado por JNK (Chatterjee y Bohmann, 2012), y al mismo tiempo, expresamos un marcador del citoesqueleto cortical fusionado a GFP [sGMCA, también conocido como Moesina-GFP (Kiehart et al., 2000)]. Esto nos permitió analizar la activación de la vía de JNK y los cambios en la forma celular en los mutantes de *aca*.

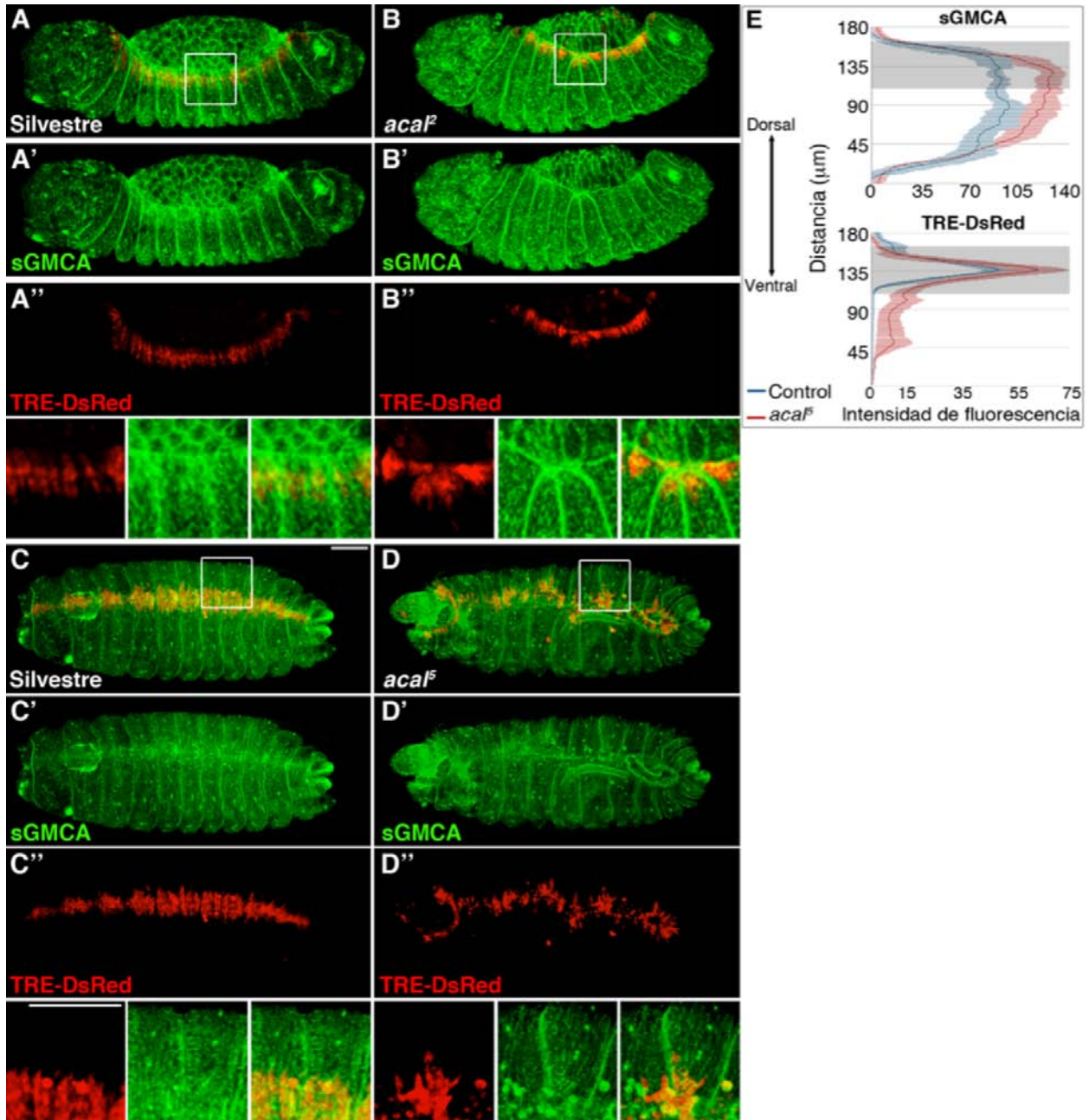


Figura 15. Activación del reportero TRE-DsRed durante el cerrado dorsal de embriones mutantes para *aca1* y silvestres.

(A-B) Embriones en estadio 13. (C-D) Embriones en estadio 17. Los recuadros blancos se amplifican debajo de cada embrión. sGMCA marca el citoesqueleto cortical, y TRE-DsRed marca las células donde se activa la vía de JNK. (E) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia a lo largo del eje dorsal-ventral, de embriones en estadio 13 silvestres y mutantes. Se grafica el promedio de 5 embriones para cada condición. Las distribuciones son significativamente diferentes ($p < 0.001$, prueba Kolmogorov-Smirnoff).

En embriones silvestres en estadio 13, las células de la epidermis lateral comienzan a estirarse hacia la región dorsal. Además, se observa la expresión de TRE-DsRed en las células de la hilera líder, y una baja expresión en algunas células de la amnioserosa (Figura 15A). En los mutantes de *acal*, las células de la epidermis también se estiran, pero lo hacen de una manera desorganizada. Esta desorganización coincide con una expresión ectópica de TRE-DsRed (Figura 15B). En embriones silvestres en etapa 17, las láminas laterales de la epidermis lateral se han fusionado completamente, y aún se observa expresión de TRE-DsRed en la línea media dorsal (Figura 15C).

En embriones mutantes de *acal* se observan fallas en la fusión de las láminas de la epidermis lateral, y nuevamente, estiramiento aberrante que coincide con la activación ectópica de TRE-DsRed (Figura 15D). Estos resultados sugieren que en los mutantes de *acal*, la vía de JNK se activa de manera aberrante, no sólo en las células de la hilera líder, sino también en algunas células de la epidermis lateral. Esta activación ectópica resulta en un estiramiento desorganizado de la epidermis y en consecuencia, en fallas en el cerrado dorsal. Esto implica que durante el cerrado dorsal, tanto la falta como el exceso de activación de la vía de JNK impiden el adecuado estiramiento de la epidermis.

Confirmamos también que la vía de JNK se sobre-activa en los mutantes de *acal* siguiendo la expresión de un gen blanco de la vía, la fosfatasa *puckered* (*puc*). La expresión de *puc* es inducida por la vía de JNK. El gen *puc* codifica para una fosfatasa de especificidad dual de JNK, y el hecho de que la misma vía de JNK induzca su expresión es una manera de auto-regular la activación de la vía. Para seguir la expresión de *puc*, usamos una inserción de *lacZ* en el locus de *puc* (*puc^{lacZ}*), de tal forma que usando un ensayo de β -galactosidasa podemos revelar el patrón de expresión del gen (Martín-Blanco et al., 1998). Al igual que TRE-DsRed, *puc^{lacZ}* marca las células de la hilera líder en embriones silvestres (Figura 16A,C). En embriones mutantes de *acal* se observa expresión ectópica de *puc^{lacZ}* en la epidermis lateral, corroborando los resultados obtenidos con TRE-DsRed (Figura 16B,C). Además, dado que *puc* es un inhibidor de la vía, podemos estudiar qué pasa cuando se mutan tanto *acal* como *puc*. Si *acal* es un regulador negativo de la vía, embriones dobles mutantes

para *acal* y *puc* deben tener fenotipos más severos. En efecto, encontramos que los fenotipos mutantes de *acal* se exacerban cuando además hay reducción de la dosis de la fosfatasa Puc (Figura 16D).

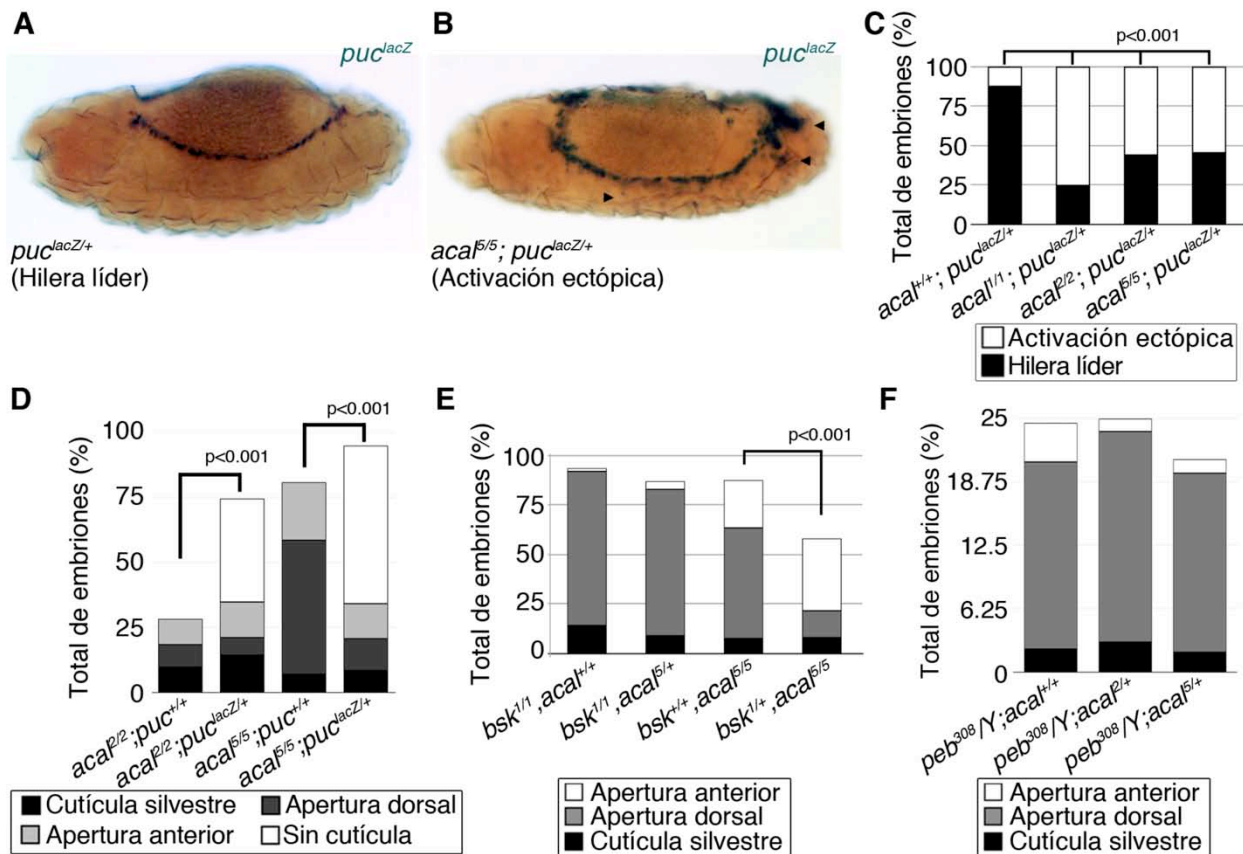


Figura 16. Expresión del reportero *puc^{lacZ}* en embriones silvestres y mutantes para *acal*, e interacciones genéticas con componentes de la vía de JNK.

(A) Expresión de *puc^{lacZ}* en embriones silvestres. Vista dorso-lateral de los embriones, con anterior hacia la izquierda, igual que en (B). (B) Expresión de *puc^{lacZ}* en embriones mutantes para *acal*. Las cabezas de flecha muestran expresión ectópica. (C) Cuantificación de embriones con patrón de expresión silvestre y mutante. Número de animales analizados: *acal^{+/+}; puc^{lacZ/+}*=108, *acal^{1/1}; puc^{lacZ/+}*=229, *acal^{2/2}; puc^{lacZ/+}*=48, *acal^{β/5}; puc^{lacZ/+}*=62. (D) Fenotipos en cutículas de mutantes para *acal* y *puc*. Número de animales analizados: *acal^{2/2}*=192, *acal^{2/2}; puc^{lacZ/+}*=204, *acal^{β/5}*=391, *acal^{β/5}; puc^{lacZ/+}*=178. (E) Fenotipos en cutículas de mutantes para *acal* y *bsk*. Número de animales analizados: *bsk^{1/1}; acal^{+/+}*=154, *bsk^{1/1}; acal^{β/+}*=210, *bsk^{+/+}; acal^{β/5}*=391, *bsk^{1/+}; acal^{β/5}*=166. (F) Fenotipos en cutículas de mutantes para *acal* y *peb*. Número de animales analizados: *peb³⁰⁸/Y; +*= 665, *peb³⁰⁸/Y; acal^{β/+}*=247. La significancia se determinó con pruebas de χ^2 .

Otra manera de confirmar que la vía de JNK se encuentra sobre-activada en los mutantes de *acal* es reduciendo la dosis de *bsk*, que codifica para JNK. Para esto, estudiamos cómo se modifica la letalidad de los embriones mutantes de *acal*, en presencia de una copia mutante de *bsk*. De acuerdo a lo esperado, una copia mutante de *bsk* reduce los defectos del cerrado dorsal y la letalidad de los embriones mutantes de *acal*, confirmando que en estos embriones, hay un exceso de actividad de la vía (Figura 16E).

La activación ectópica de la vía de JNK en la epidermis lateral de los embriones mutantes de *acal* es consistente con el patrón de expresión silvestre de *acal* en la epidermis lateral. También va de acuerdo con el rescate de los fenotipos mutantes al sobre-expresar *acal* en la epidermis de los embriones mutantes. Para descartar un papel de *acal* en la amnioserosa, otro tejido requerido para completar el cerrado dorsal, analizamos interacciones genéticas con *pebbled* (*peb*), un gen que se expresa en la amnioserosa y que inhibe a la vía de JNK en ese tejido. Observamos que *acal* no modifica el fenotipo mutante de *peb*, sugiriendo funciones independientes entre los dos genes, y que *acal* no se requiere en la amnioserosa durante el cerrado dorsal (Figura 16F).

Adicionalmente, decidimos estudiar el efecto de sobre-activar la vía de JNK en embriones heterocigotos para *acal*. Sobre-expresamos el gen *hemipterous* (*hep*), que codifica para la cinasa de JNK. La sobre-expresión de una forma constitutivamente activada de este gen (*hep^{ACT}*) resulta en defectos en el cerrado dorsal (Figura 17A). En embriones heterocigotos para *acal*, los defectos son más fuertes (mayor número de embriones con defectos en el cerrado dorsal). La sobre-expresión de la forma silvestre de *hep* resulta en letalidad parcial embrionaria, aunque con fenotipos menos severos que al sobre-expresar la forma activa de *hep* (Figura 17B). Aún así, en embriones heterocigotos, dicha letalidad aumenta. En conjunto, nuestros resultados demuestran que *acal* regula negativamente la vía de JNK en la epidermis lateral durante el cerrado dorsal.

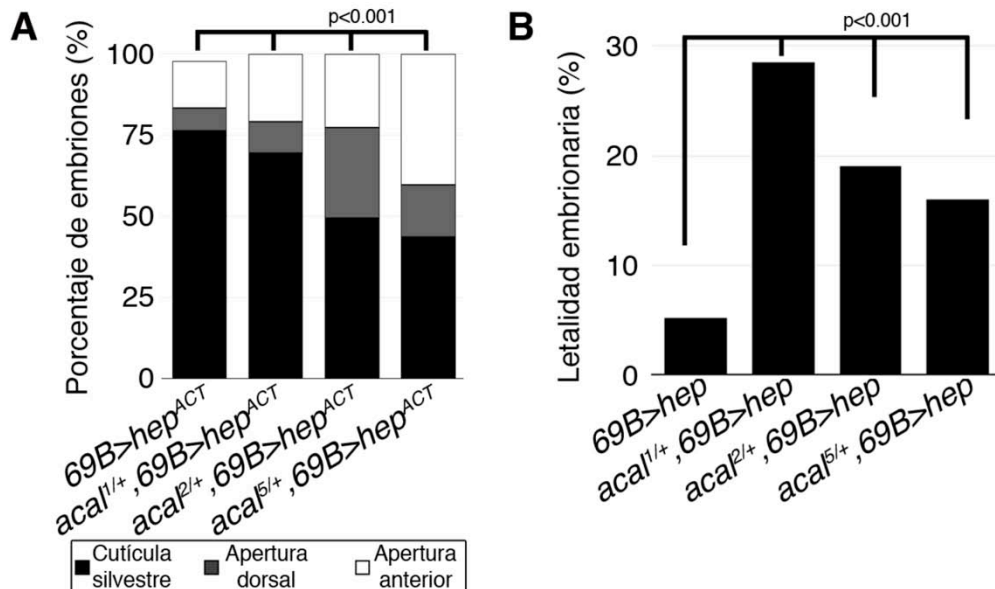


Figura 17. Efecto de sobre-activar la vía de JNK en embriones heterocigotos para *acal*.

(A) Sobre-expresión de una forma activa de la cinasa de JNK, *hep* (*hep^{ACT}*) en todo el ectodermo de embriones silvestres y heterocigotos para *acal*. (B) Sobre-expresión de la forma silvestre de *hep* en embriones silvestres y heterocigotos para *acal*. Número de animales analizados: *69B>hep^{ACT}*=1208, *acal^{1/+}, 69B>hep^{ACT}*=563, *acal^{2/+}, 69B>hep^{ACT}*=363, *acal^{5/+}, 69B>hep^{ACT}*= 923, *69B>hep*=107, *acal^{1/+}, 69B>hep^{ACT}*=141, *acal^{2/+}, 69B>hep^{ACT}*=107, *acal^{5/+}, 69B>hep^{ACT}*= 51. La significancia se determinó usando pruebas de χ^2 .

6. *acal* actúa debajo de *raw*, un regulador negativo de la vía de JNK.

A la fecha, se han caracterizado diferentes genes y mecanismos por los que se restringe la actividad de la vía de JNK durante el cerrado dorsal (Rios-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013). Ya que nuestros resultados colocan a *acal* como un regulador negativo de la vía de JNK en la epidermis lateral (y no en la amnioserosa), exploramos otros reguladores que podrían colaborar con *acal* para ejercer su función. En particular, nos interesamos en estudiar a *raw*, un gen cuyo patrón de expresión es muy parecido al de *acal* durante el cerrado dorsal (Bates et al., 2008).

Raw antagoniza la activación de la vía de JNK en la epidermis lateral. En los mutantes de *raw*, la vía se activa en toda la epidermis, lo que resulta en expresión de *dpp* en todo el tejido. Como *dpp* es un morfógeno que define la región dorsal del embrión, los

mutantes de *raw* pierden características ventrales, como los dentículos de la cutícula, además de que no completan el cerrado dorsal (Figura 18A-B).

Como primer acercamiento para estudiar la relación entre *acal* y *raw*, analizamos interacciones genéticas entre mutantes de ambos genes. Encontramos que todos los embriones mutantes para *acal*, con una sola copia mutante de *raw*, mueren durante el desarrollo. De manera interesante, algunos embriones incluso mueren con el fenotipo dorsalizado de *raw* (Figura 18C). Una copia mutante de *acal* no afecta a los embriones mutantes de *raw*, sugiriendo que *acal* actúa debajo de *raw* (Figura 18C). Interpretamos estos resultados como que *acal* y *raw* actúan de manera similar para regular la vía de JNK, y que *raw* podría regular la función de *acal*.

Después, analizamos cómo se modifica el patrón de expresión de *acal* en los embriones mutantes de *raw*. Encontramos que en estos embriones, la expresión de *acal* en la epidermis lateral disminuye significativamente (Figura 18D-E), mientras que la expresión en el sistema nervioso no cambia. Esto nos llevó a pensar que *acal* podría actuar río abajo de *raw* para regular la vía de JNK. Para apoyar esto, determinamos si la pérdida de función de *raw* se puede rescatar sobre-expresando a *acal*. Usando el sistema Gal4-UAS, sobre-expresamos *acal* en todo el ectodermo de los mutantes de *raw*, y encontramos que *acal* rescata parcialmente el fenotipo mutante de *raw*, ya que en una parte de los mutantes que sobre-expresan *acal*, se recupera la presencia de dentículos ventrales en la cutícula (en otras palabras, son embriones menos dorsalizados, presumiblemente porque activan menos la vía de JNK, Figura 18F-H).

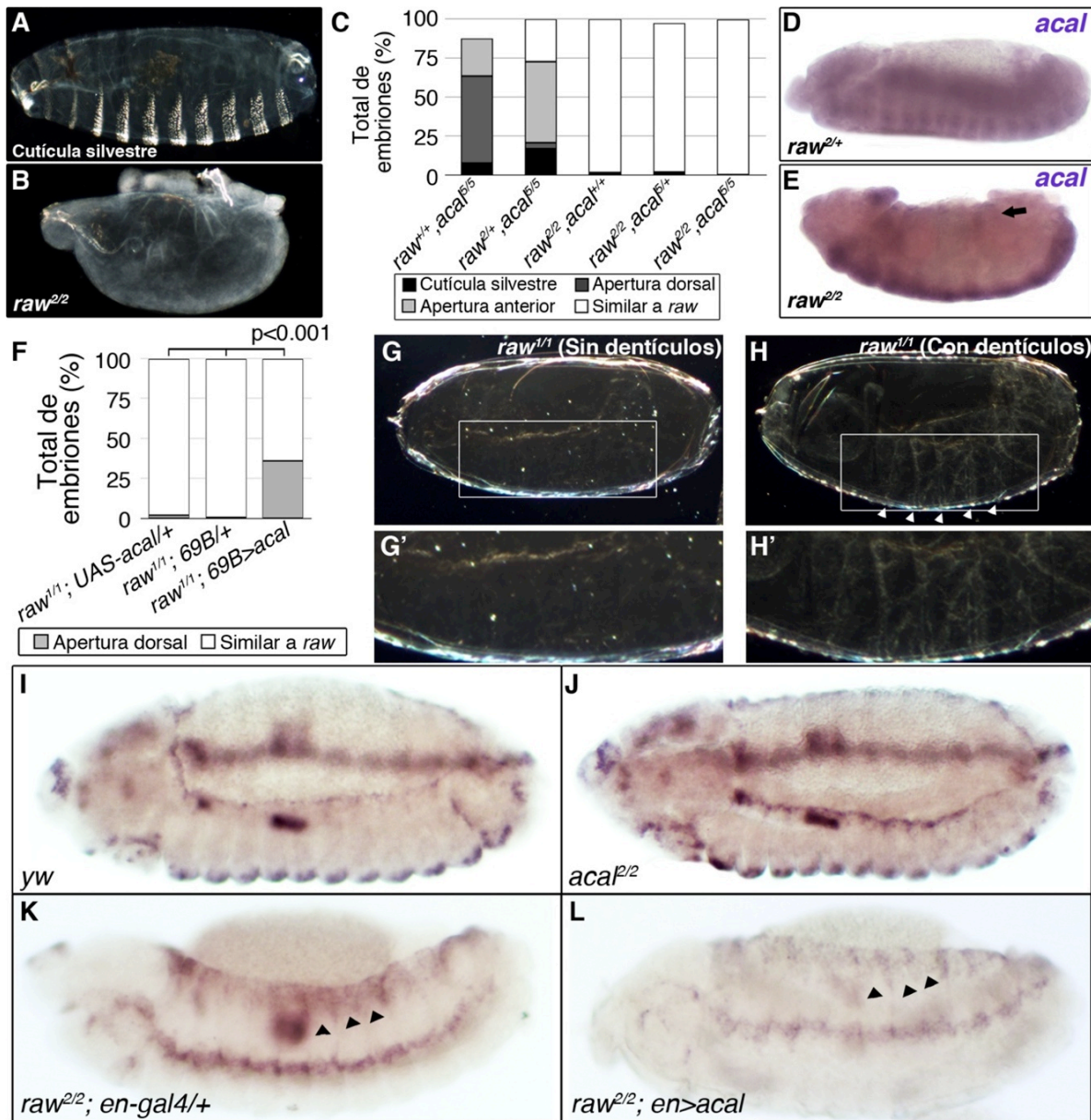


Figura 18. *acal* y *raw* actúan juntos para inhibir la vía de JNK durante el cerrado dorsal.

Cutícula embrionaria silvestre (A) y mutante para *raw²* (B). (C) Interacción genética de *raw* y *acal*. La heterocigosis de *raw* aumenta la letalidad de los embriones mutantes de *acal*. El fenotipo mutante de *raw* no aumenta con la heterocigosis de *acal*, sugiriendo que *acal* actúa río abajo de *raw*. Número de animales analizados: *raw^{+/+}; acal^{5/5}*=391, *raw^{2/+}; acal^{5/5}*=139, *raw^{2/2}; acal^{+/+}*=366, *raw^{2/2}; acal^{5/+}*=152, *raw^{2/2}; acal^{5/5}*=208. (D-E) Hibridación *in situ* de *acal* en embriones heterocigotos y mutantes de *raw*. En embriones homocigotos para *raw²*, la expresión de *acal* en la epidermis disminuye (flecha). (F) La sobre-expresión de *acal* en el ectodermo de embriones mutantes de *raw* rescata parcialmente la presencia de dentículos ventrales. Número de animales analizados: *raw^{1/1}; UAS-acal/+*=53, *raw^{1/1}; 69B-gal4/+*=283, *raw^{1/1}; 69B>acal*=28. (G-H) Cutículas sin y con dentículos ventrales, con apertura dorsal. La

significancia se determinó usando χ^2 (C, F). (I-J) Hibridación *in situ* de *dpp* en embriones silvestres (I), mutantes de *acal* (J), mutantes para *raw* (K), y mutantes para *raw* expresando *acal* en un patrón segmentado, bajo el patrón de *en-gal4*. Las cabezas de flecha en (L) apuntan a una disminución en la expresión de *dpp*, en comparación con (K). En todas las imágenes, la porción anterior se observa a la izquierda, y la dorsal hacia arriba.

En los mutantes de *acal*, la expresión de *dpp* no se expande a toda la epidermis lateral, como sucede en los mutantes de *raw* (Figura 18I-J), por lo que *raw* podría tener otros mediadores además de *acal*. Sin embargo, inducir la expresión de *acal* en un patrón segmentado en embriones mutantes de *raw*, reduce la expresión de *dpp* en la epidermis en el mismo patrón segmentado (Figura 18K-L). Estos datos sugieren fuertemente que *acal* y *raw* colaboran para inhibir la vía de JNK, *raw* actuando río arriba de *acal*. Además, nuestros resultados sugieren que *raw* regula otros genes además de *acal*.

Con el fin de confirmar que *raw* y *acal* actúan en la misma cascada para inhibir a la vía de JNK, recurrimos a un modelo de sobre-expresión en el cual fácilmente podemos estudiar la vía de JNK: la formación del tórax. El tórax se forma durante la metamorfosis (Figura 1), mediante la fusión de los discos imagales de las alas. Este proceso es análogo al cerrado dorsal, y su formación también depende de la activación de la vía de JNK. De hecho, existen mutaciones hipomorfas en genes de la vía de JNK que permiten completar el cerrado dorsal y la embriogénesis; sin embargo, los adultos homocigotos para estas mutaciones presentan defectos en el cerrado torácico (Demerec, 1994; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997a; Zeitlinger y Bohmann, 1999).

Para estudiar la relación de *raw* y *acal*, empleamos la línea *pnr-gal4*, que sobre-expresa Gal4 en la región dorsal de todo el organismo, incluyendo el anlagen del tórax. Usando esta línea, sobre-expresamos sólo *acal*, sólo *raw* o ambos (Figura 19). Al ser inhibidores de JNK, la sobre-expresión de *acal* o *raw* en el tórax debería de generar defectos en el cerrado torácico. Además, de actuar en la misma cascada, la sobre-expresión simultánea de ambos transgenes debería producir fenotipos más extremos. Para hacer un análisis cuantitativo del grado de apertura torácica, medimos el tamaño de la 'hendidura torácica' (o región desprovista de microquetas entre las macroquetas

dorsocentrales). Esta medición se realizó a la altura de las quetas dorsocentrales anteriores y se normalizó al tamaño del tórax, usando como referencia la distancia entre las quetas dorsocentrales anteriores y posteriores. A este valor lo denominamos “Índice de apertura torácica” (Figura 19C).

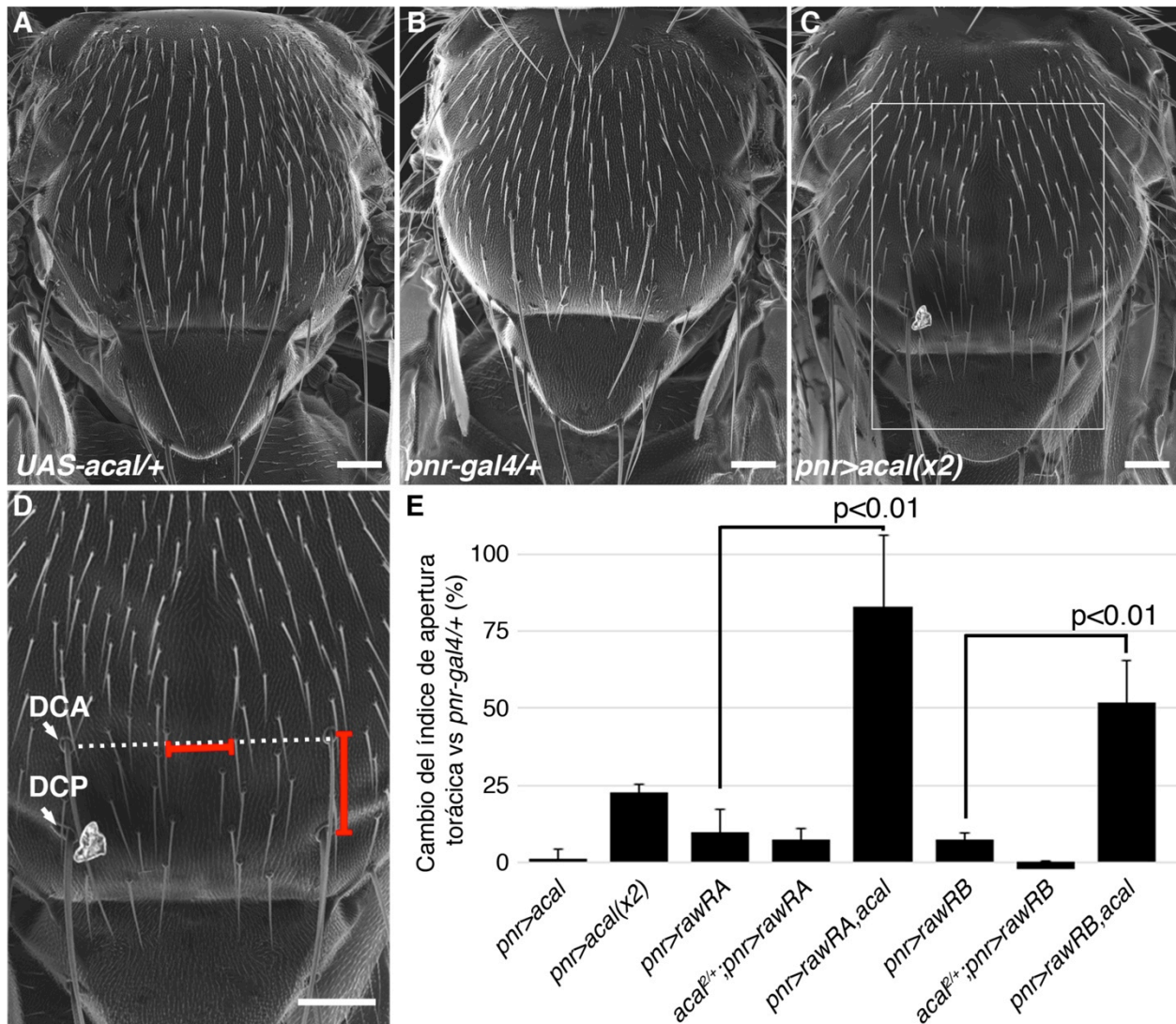


Figura 19. Sobre-expresión de *acal* y de *raw* en el tórax.

Se empleó el sistema Gal4/UAS para analizar la relación de *acal* y *raw*. (A) Control *UAS-acal/+*. (B) Control *pnr-gal4/+*. (C) Sobre-expresión de dos copias de *UAS-acal* usando *pnr-gal4*. El recuadro se amplifica en (D). (D) Se muestran los parámetros usados para calcular el índice de apertura torácica: El tamaño de la hendidura (línea horizontal roja) se normalizó con respecto a la distancia entre las quetas dorsocentrales anteriores y posteriores (DCA y DCP, respectivamente; línea vertical roja). La medición se tomó a la altura de las quetas DCA. (E) Cambio en el índice de apertura torácica en diferentes condiciones experimentales, con

respecto al control *pnr-gal4/+*. Se muestra el promedio de 10 moscas en cada caso +/- error estándar. La significancia se determinó con ANOVA y ajuste de Bonferroni.

Encontramos que sobre-expresar una copia del transgén *UAS-acal* no altera el índice de apertura torácica. Sin embargo, sobre-expresar dos copias del transgen resulta en un aumento del 20% del índice, con respecto a los controles (Figura 19). De igual forma, sobre-expresar una copia de *raw* (*UAS-rawRA*), no altera el cerrado torácico (Figura 19E), pero la sobre-expresión simultánea de una copia de *UAS-acal* y de una copia de *UAS-rawRA* tiene un efecto sinérgico, con un aumento significativo del 75% en el índice de apertura torácica. *raw* produce dos isoformas, *rawRA* y *rawRB*, y en ambos casos se observa el efecto sinérgico (Figura 19E). Adicionalmente, sobre-expresamos *raw* en un fondo heterocigoto para *acal*, esperando suprimir el efecto de sobre-expresar únicamente *raw*, pero dado que la sobre-expresión de *raw* per se produce un efecto muy sutil, no encontramos diferencias significativas.

Estos resultados validan de manera independiente que *acal* y *raw* actúan juntos, ya que la doble sobre-expresión de estos genes afectan el cerrado torácico. Además, sugieren que *acal* y *raw* podrían actuar normalmente en el cerrado torácico, pero es necesario realizar experimentos de falta de función para comprobar este papel.

7. *acal* y *raw* regulan la expresión de *Cka*, una proteína de andamiaje de la vía de JNK.

Nuestro análisis de la interacción genética entre *acal* y *bsk* (JNK) sugieren que *acal* actúa a nivel de JNK, ya que al disminuir la dosis génica de esta cinasa se rescata el fenotipo mutante de *acal* (Figura 16E). Esto mismo se ha demostrado para *raw*, durante la formación de la gónada de los machos (Jemc et al., 2012). También se ha sugerido que *raw* actúa al nivel de Jun, por debajo de JNK en el cerrado dorsal (Bates et al., 2008).

Con base en estos antecedentes, planteamos la hipótesis que *raw*, y por lo tanto *acal*,

podrían actuar sobre algún mediador de JNK y de Jun. JNK activa directamente a Jun, facilitado por la proteína de andamiaje Cka (Chen et al., 2002). Si *acal* y *raw* regularan la expresión de *Cka*, esto explicaría por qué se ha visto que *raw* actúa al nivel de JNK y también al nivel de Jun.

Para probar esto, cuantificamos la expresión de *Cka* en embriones silvestres, y en embriones mutantes de *acal* y de *raw*. Consistente con nuestra hipótesis, la expresión de *Cka* se incrementa aproximadamente 50% en los embriones mutantes con respecto a los silvestres (Figura 20A). Esto se reafirma al analizar interacciones genéticas con mutantes de *acal*, ya que la heterocigosis de *Cka* rescata fuertemente los defectos en el cerrado dorsal de los mutantes de *acal* (Figura 20B). En conjunto, estos datos indican que la sobre-expresión de *Cka* en los mutantes de *acal* (y de *raw*) son causales de los defectos en el cerrado dorsal de estos embriones.

Utilizando un transgén que sobre-expresa *Cka* bajo un promotor de choque térmico (*HS-Cka*), encontramos que la sobre-expresión de *Cka* es suficiente para inducir defectos en el cerrado dorsal (Figura 20C-D). Con esto, proponemos que *raw* y *acal* regulan la expresión de *Cka*, y que en los mutantes, la sobre-expresión de *Cka* resulta en un cerrado dorsal defectuoso.

Para corroborar la cascada de regulación *raw-acal-Cka*, analizamos si el silenciamiento de *Cka* con RNA de interferencia (*Cka-IR*) es capaz de rescatar el fenotipo mutante de *raw*. Con este fin, seguimos la expresión de *dpp*, gen blanco de la vía de JNK. En embriones silvestres, *dpp* se expresa en las células de la hilera líder durante el cerrado dorsal (Figura 20E). En los mutantes de *raw*, como la vía de JNK se activa de manera ectópica, la expresión de *dpp* se extiende a toda la epidermis lateral (Figura 20F). Sin embargo, al silenciar la expresión de *Cka* (utilizando *en-gal4*, que se expresa en la epidermis en un patrón segmentado), observamos que la expresión de *dpp* se restringe a la hilera líder en las regiones en que se expresa *gal4*, al igual que cuando expresamos una forma silvestre de *raw* en ese mismo patrón (Figura 20G-H). Estos experimentos confirman que en los mutantes de *raw* (y de *acal*) *Cka* se sobre-expresa, resultando en la activación ectópica de la vía de JNK.

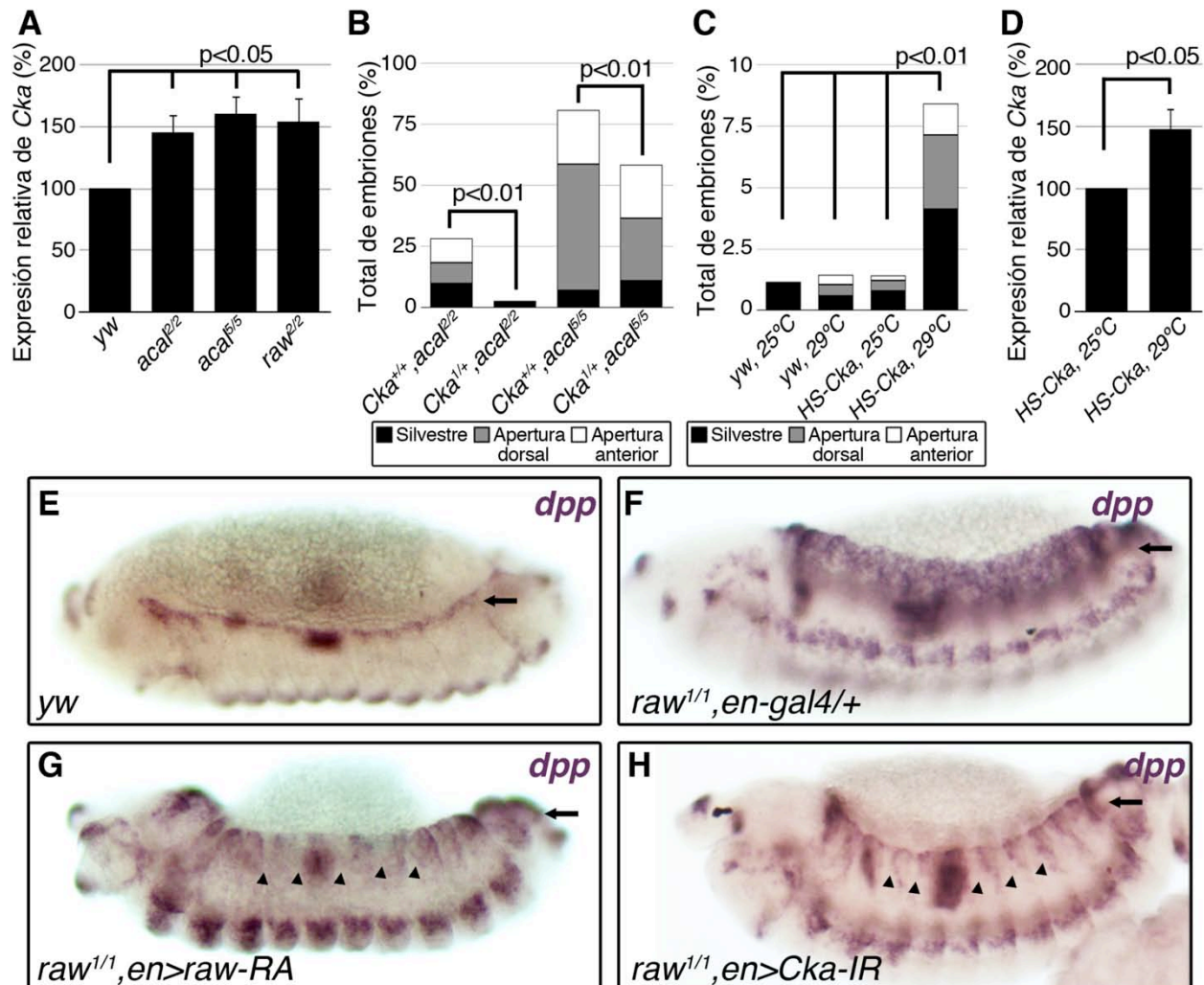


Figura 20. *acal* y *raw* regulan la expresión de *Cka*.

(A) Expresión relativa de *Cka*, determinada por PCR en tiempo real. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, corridos en duplicado. (B) Interacción genética entre *Cka* y *acal*. Número de animales analizados: *Cka^{+/+}, acal^{2/2}*=192, *Cka^{1/+}, acal^{2/2}*=219, *Cka^{+/+}, acal^{5/5}*=391, *Cka^{1/+}, acal^{5/5}*=171. (C) La sobre-expresión de *Cka* por choque térmico induce defectos en el cerrado dorsal. Número de animales analizados: *yw, 25°C*=526, *yw, 29°C*=591, *HS-Cka, 25°C*=2006, *HS-Cka, 29°C*=3227. (D) Confirmación de la sobre-expresión de *Cka* por PCR en tiempo real. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, analizados por duplicado. La significancia se calculó usando t de Student (A, D) y χ^2 (B, C). (E–H) Todos los embriones son vistas laterales, con anterior a la izquierda. En embriones silvestres, *dpp* se expresa en las células de la hilera líder (flecha, E). En embriones mutantes para *raw*, la expresión de *dpp* se extiende a células más laterales de la epidermis (flecha, F). La línea *en-gal4* se expresa en la región posterior de cada segmento, sin embargo no afecta el fenotipo mutante de *raw* por sí misma. La expresión de una copia silvestre de *raw-RA* con la línea *en-gal4* (*en>raw-RA*) abate la expresión de *dpp* en los embriones mutantes de *raw*, en la región donde se expresa *en-gal4* (cabezas de flecha, G). Similarmente, la expresión de un RNAi contra *Cka* (*Cka-IR*) con la línea *en-gal4* impide la expresión ectópica de *dpp* en el patrón de *en-gal4* (cabezas de flecha, H).

8. *acal* y *raw* regulan la expresión de *aop*, un factor de transcripción regulador de la vía de JNK.

De acuerdo con nuestros resultados y con trabajos previos, *acal* y *raw* se expresan en la epidermis lateral, e impiden la activación de la vía de JNK en ese tejido. En la epidermis, también se expresa *anterior open (aop)*, un factor de transcripción que regula ampliamente el cerrado dorsal. Su expresión en la epidermis lateral mantiene el tejido en un estado post-mitótico (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b). Además, en las células de la hilera líder, Aop impide la expresión prematura de genes blanco de la vía de JNK. Luego de la activación de JNK, ésta fosforila a Aop e induce su degradación, permitiendo la expresión de genes blanco (Rebay y Rubin, 1995). Sin embargo, la expresión de Aop en el resto de la epidermis debe mantenerse para impedir la proliferación. En los mutantes de *aop*, se observan mitosis persistentes en la epidermis, además de expresión ectópica de los blancos de la vía de JNK, por lo que es un punto nodal en la regulación del cerrado dorsal. Por estas razones, decidimos analizar la relación entre *acal* y *aop*, por medio de interacciones genéticas.

La heterocigosis de *aop* no altera el fenotipo mutante de *acal*, pero la heterocigosis de *acal* suprime fuertemente el fenotipo mutante de *aop*, sugiriendo que *acal* actúa antes que *aop* (Figura 21A). Decidimos explorar si la expresión de *aop* está alterada en los mutantes de *acal*, como sucede con *Cka*. Por medio de PCR en tiempo real, encontramos que en los mutantes de *acal* y de *raw*, *aop* se encuentra 2 veces sobre-expresado (Figura 21B). Estos resultados muestran que *acal* actúa por arriba de *aop*, regulando su expresión. También, estos resultados muestran que *acal* regula tanto componentes positivos (*Cka*) como positivos/negativos (*aop*) de la vía de JNK, implicando una regulación muy fina de la activación de la vía.

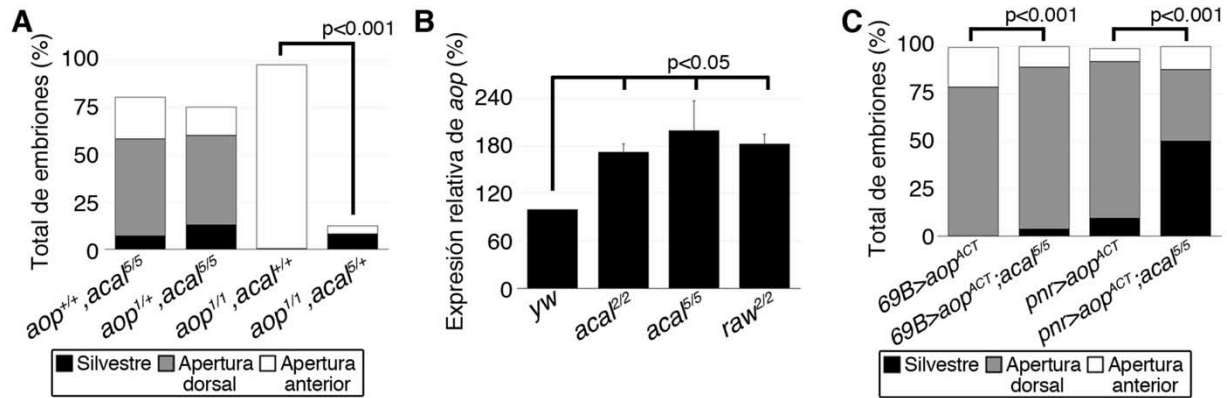


Figura 21. *aop* actúa río abajo de *acal*.

(A) Interacción genética entre *acal* y *aop*. Número de animales analizados: *aop*^{+/+}, *acal*^{5/5}=391, *aop*^{1/+}, *acal*^{5/5}=253, *aop*^{1/1}, *acal*^{+/+}=269, *aop*^{1/1}, *acal*^{5/+}=185. (B) Expresión relativa de *aop* en embriones silvestres y mutantes para *acal* y *raw*. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, corridos por duplicado. (C) Expresión de *aop*^{ACT} en embriones silvestres y mutantes para *acal*. Para dirigir la expresión de *aop*^{ACT} se usó *69B-gal4* (expresión en todo el ectodermo) o *pnr-gal4* (expresión en la epidermis lateral). La significancia se determinó usando χ^2 (A, C) y t de Student (B).

En un trabajo previo, se describió que la expresión de una forma constitutivamente activa de *aop* (*aop*^{ACT}) resulta en defectos en el cerrado dorsal, debido a que *aop*^{ACT} no permite la expresión de los blancos de JNK en las células de la hilera líder, a pesar de que la vía está activada (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b). Como nuestros resultados muestran que *acal* es parcialmente un inhibidor de la vía de JNK, predecimos que expresar *aop*^{ACT} en un fondo mutante para *acal*, podría resultar en defectos en el cerrado dorsal menos pronunciados, ya que la sobre-expresión de la vía de JNK en los mutantes de *acal* contrarrestaría la presencia de *aop*^{ACT}. Efectivamente, la expresión de *aop*^{ACT} en todo el ectodermo de embriones homocigotos mutantes para *acal* produce fenotipos menos pronunciados que cuando expresamos *aop*^{ACT} en embriones silvestres (Figura 21). Este rescate es más fuerte si la expresión de *aop*^{ACT} es más restringida, expresándolo sólo en la epidermis lateral (Figura 21C). Con este experimento, demostramos que como balance general, *acal* impide la activación de la vía de JNK. Además, para confirmar que *acal* regula la expresión de *Cka* y de *aop*, analizamos la expresión de estos genes tras sobre-expresar *acal* en embriones silvestres, utilizando *69B-gal4* para dirigir la expresión en todo el ectodermo. Encontramos que

efectivamente, la sobre-expresión de *acal* inhibe la expresión de *Cka* y *aop* (Figura 22). La sobre-expresión de *acal* en embriones silvestres es viable, lo cual significa que a pesar de que la expresión de *Cka* y de *aop* se encuentre reducida, aún es suficiente para cubrir los requerimientos de estos genes.

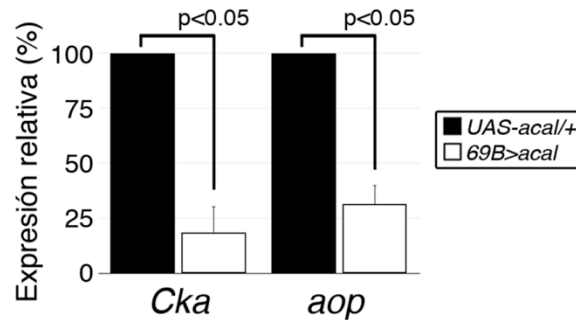


Figura 22. La sobre-expresión de *acal* inhibe la expresión de *Cka* y *aop*.

Se determinó por qPCR la expresión de *Cka* y de *aop* en embriones control (*UAS-acal/+*) y embriones que sobre-expresan *acal* en todo el ectodermo (*69B>acal*). Se grafica el promedio de 3 experimentos (*Cka*) y 4 experimentos (*aop*) independientes, +/- error estándar.

9. *acal* y *raw* interactúan genéticamente con *Polycomb*.

Como hemos demostrado en este trabajo, en los mutantes de *acal* se sobre-expresan dos componentes de la vía de señalización de JNK: *Cka* y *aop*. Muchos RNAs no codificantes largos regulan la expresión génica, aunque generalmente actúan como moduladores o reguladores “finos” de la expresión (Batista y Chang, 2013; Gummalla et al., 2012). Los lncRNAs pueden regular la expresión de genes aledaños (función en cis) o pueden actuar en sitios lejanos al propio (función en trans), interactuando con complejos remodeladores de la cromatina para activar o inhibir la expresión.

Con base en nuestros resultados, planteamos la hipótesis de que *acal* actúa en *trans*, ya que nuestras construcciones de rescate genómico y de sobre-expresión (*UAS-acal*) no están insertadas en el sitio endógeno donde se encuentra *acal*, y aún así son capaces de rescatar los defectos en el cerrado dorsal. Similarmente, el locus de *acal* se

encuentra muy lejano al de *Cka* o al de *aop* (asumiendo que *acal* regulara su expresión de manera directa), obligando una función en *trans*.

Uno de los complejos remodeladores de la cromatina capaces de interactuar con lncRNAs es el complejo represivo de Polycomb 1 (PRC1). Este complejo inhibe la expresión génica al inducir la tri-metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3), una marca de compactación de la cromatina (Rinn y Chang, 2012). Este complejo se describió inicialmente en *Drosophila*, y está altamente conservado en metazoarios (Schwartz y Pirrotta, 2013). El primer componente de este complejo en ser identificado fue *Polycomb* (*Pc*). En contraste a los machos silvestres, que poseen un peine sexual en el par de patas más anterior, un porcentaje de los machos heterocigotos mutantes de *Pc* también tienen peines sexuales en el segundo y tercer par de patas [(Lewis, 1978) Figura 23A-B]. Esta transformación homeótica se debe a que normalmente PRC1 reprime ciertos genes en el segundo y tercer par de patas, inhibiendo la identidad de “pata anterior”, y en los mutantes de *Pc*, esta represión se pierde (Castelli-Gair y Garcia-Bellido, 1990). El fenotipo mutante de *Pc* es muy sensible a una adicional pérdida de función: Si otros componentes de PRC1 no están presentes, la transformación homeótica es más fuerte. Al ser un fenotipo dominante y fácilmente visible, *Pc* ha sido una herramienta muy útil para identificar elementos que interactúan con PRC1 (Ferres-Marco et al., 2006).

Para explorar si *acal* podría regular a sus genes blanco en conjunto con PRC1, estudiamos la frecuencia del fenotipo de peines ectópicos de *Pc*. Para confirmar la cascada de regulación, analizamos también si *raw* modifica el fenotipo de *Pc*. Encontramos que *raw*¹, una mutación fuerte de *raw*, exacerba significativamente el fenotipo mutante de *Pc*. Similarmente, *acal*^δ, que es el alelo mutante más fuerte de *acal*, también exacerba significativamente el fenotipo mutante de *Pc* en las patas (Figura 23C). Resultados similares se observan en el segundo y tercer par de patas.

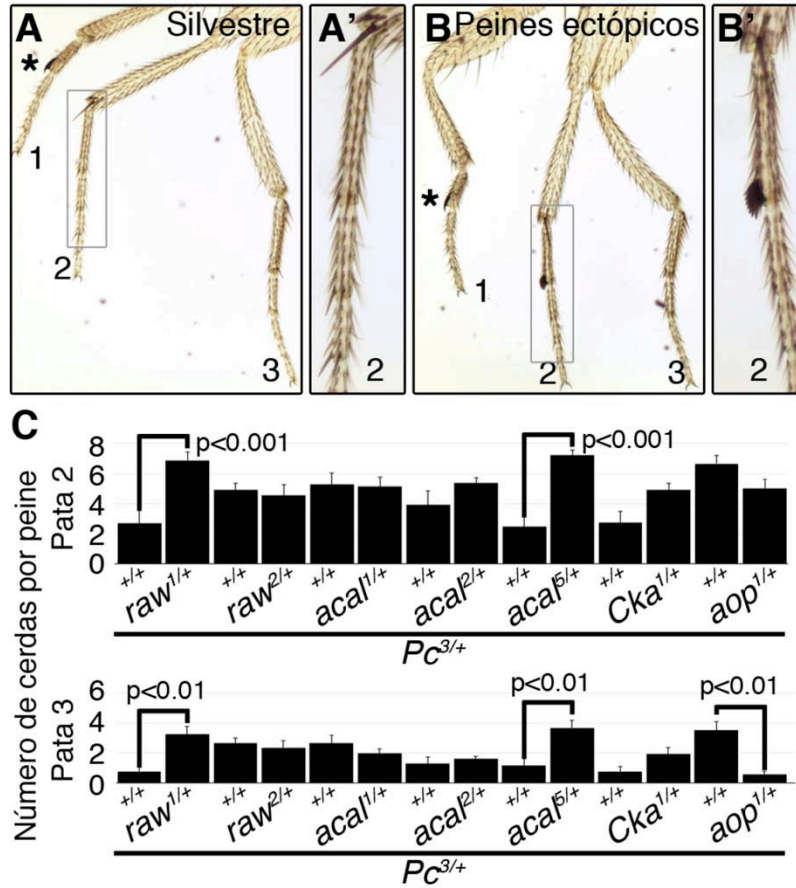


Figura 23. *Polycomb* interactúa genéticamente con *acal* y con *raw*.

(A) Patas de un macho silvestre. Los números indican el número de pata de anterior a posterior, y el asterisco marca el peine sexual en la pata 1. El recuadro en la pata 2 se amplifica en (A'). (B) Patas de un macho heterocigoto para *Pc³*. Los números indican el número de pata de anterior a posterior, y el asterisco marca el peine sexual en la pata 1. El recuadro en la pata 2, con peines sexuales ectópicos, se amplifica en (B'). (C) Cuantificación del número de cerdas por peine en la pata 2 y en la pata 3. Se grafica el promedio de 10 moscas por condición, +/- error estándar. La significancia se determinó usando t de Student.

Adicionalmente, analizamos si ese fenotipo se observa en los mutantes de *Cka* y *aop*, genes río abajo de *acal*. Observamos que mutaciones en *Cka* no alteran significativamente el fenotipo mutante de *Pc*, y la heterocigosis de *aop* no modifica significativamente el fenotipo mutante de *Pc* en el segundo par de patas, aunque lo suprime significativamente en el tercer par. Esto podría deberse a que *aop*, al ser un gen con muchas funciones, actuando como represor transcripcional, podría también interactuar con PRC1, independiente de *acal/raw*. En este caso, la interacción genética

ocurre en sentido contrario a la interacción entre *Pc* y *acal/raw*.

Además de estos resultados, al obtener los individuos doble heterocigotos para *acal* o *raw* y para *Pc*, encontramos un nuevo fenotipo altamente penetrante: El compartimento posterior de las alas de estos animales se observa atrofiado, haciendo que las alas se curven en dirección posterior (Figura 24A'-B'). Para cuantificar esta curvatura, medimos el ángulo formado en las intersecciones de la vena 1 con la vena 2, y de la vena 1 con la vena 3 (Figura 24E-F). Este fenotipo se observa en mutantes de *Pc* heterocigotos para *acal* o para *raw*, pero no en heterocigotos para *Cka* o para *aop* (Figura 24C'-D').

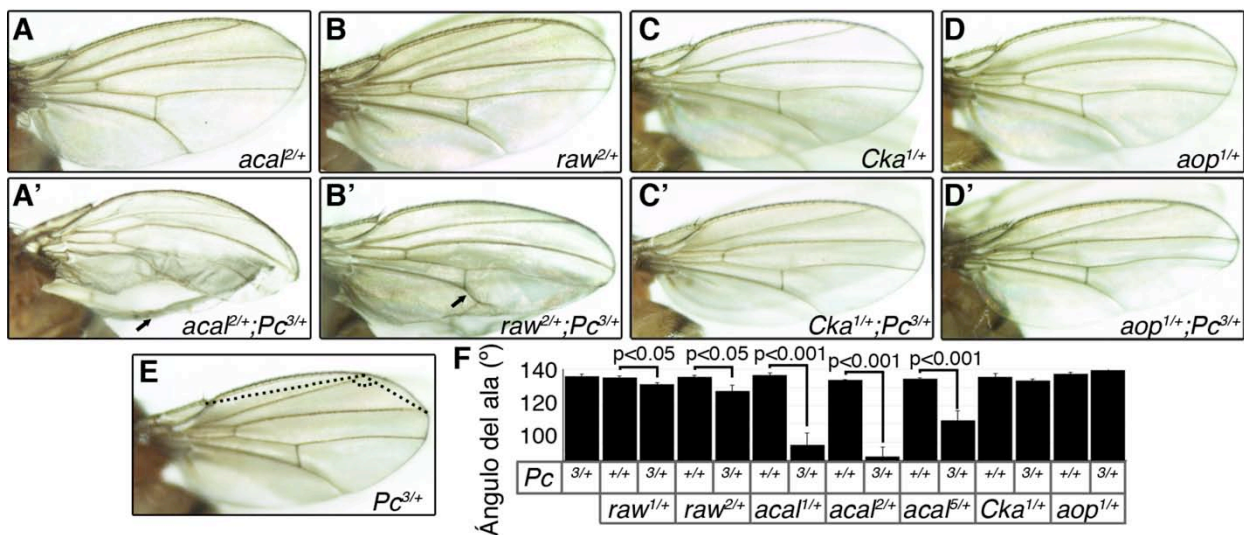


Figura 24. Los animales doble heterocigotos para *Pc* y *acal* o *raw* presentan defectos en las alas.

(A-D) Alas de moscas hembras heterocigotas para *acal* (A), *raw* (B), *Cka* (C) y *aop* (D). (A'-D') Alas de moscas hembras doble heterocigotas para *Pc* y para *acal* (A'), *raw* (B'), *Cka* (C') y *aop* (D'). En (A') y (B'), las flechas muestran la reducción en el compartimento posterior del ala. (E) Ala de mosca heterocigota para *Pc*. Para medir la curvatura de las alas con fenotipo mutante se midió el ángulo entre las venas 1 y 3, como se esquematiza con líneas punteadas ("ángulo del ala"). (F) Cuantificación del "ángulo del ala". Se grafica el promedio de 10 moscas hembras por condición. La significancia se determinó usando t de Student.

Estos resultados sugirieron que la cascada de *raw-acal* participa con PRC1 para regular la expresión génica durante el desarrollo de las alas, como posiblemente lo

hacen en otros procesos como el cerrado dorsal. Como se menciona anteriormente, los RNA no codificantes largos también pueden regular la expresión de genes aledaños (en cis). *acal* se localiza entre dos silenciadores epigenéticos, *lola* y *psq*, y los defectos en el cerrado dorsal en los embriones mutantes de *acal* podrían deberse a fallas en la regulación de estos genes. Tanto *lola* como *psq* han sido ampliamente estudiados, y los embriones mutantes para cualquiera de estos genes no presentan defectos en el cerrado dorsal. Sin embargo, es posible que la sobre-expresión de estos genes resulte en defectos en el cerrado dorsal, como los que observamos en *acal*. Bajo esta hipótesis, *Cka* y *aop* estarían río abajo de *lola* o *psq*. Para explorar esta posibilidad, decidimos sobre-expresar *lola* y *psq* en embriones silvestres. Utilizamos una inserción localizada en el primer intrón de *lola*, que posee dos secuencias UAS, una apuntando hacia *lola*, y la otra apuntando hacia *psq*. Se ha demostrado que esta línea, llamada GS88A8, es capaz de sobre-expresar simultáneamente a *lola* y a *psq* usando diferentes líneas *gal4* (Ferres-Marco et al., 2006).

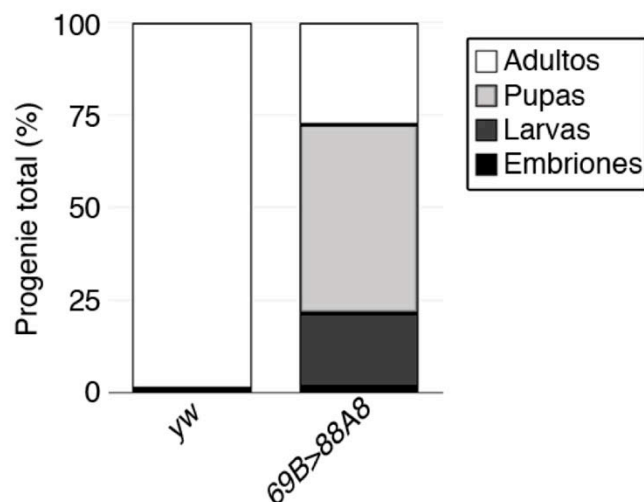


Figura 25. Sobre-expresión de *lola* y *psq* en embriones silvestres.

Se usó la línea GS88A8 (88A8) que posee una secuencia UAS apuntando a *lola* y una secuencia UAS apuntando a *psq*, y la línea 69B, que expresa *gal4* en todo el ectodermo. Número de animales analizados: *yw* = 526, 69B>88A8 = 544.

Al sobre-expresar a *lola* y a *psq* en todo el ectodermo de embriones silvestres, no encontramos defectos en el cerrado dorsal (Figura 25). La sobre-expresión de ambos genes resulta en una letalidad parcial en etapas de larva y de pupa, aunque algunos organismos logran eclosionar como adultos. Aún así, no se observan defectos relacionados con el cerrado dorsal, o incluso con el cerrado torácico. Estos resultados indican que la participación de *acal* en el cerrado dorsal es independiente de *lola* y *psq*, aún si *acal* regula la expresión de estos dos genes en otros contextos.

10. Análisis del transcriptoma de los embriones mutantes de *acal*.

Hasta ahora, hemos mostrado que *acal* podría regular la vía de JNK inhibiendo la expresión de dos genes: *Cka* y *aop*. Los RNAs no codificantes largos pueden regular ampliamente la expresión génica al interactuar con complejos remodeladores de la cromatina. De hecho, nuestras interacciones génicas con *Polycomb* apoyan que *acal* regula la expresión génica junto con el complejo PRC1. Para conocer que otros genes podrían ser regulados por *acal*, aislamos RNA total de embriones silvestres y mutantes, removimos los RNAs ribosomales, y generamos una biblioteca de fragmentos de cDNAs para secuenciarlos con el sistema de Illumina, de secuenciación masiva de ácidos nucleicos. Para este análisis, elegimos el alelo *acal*², ya que tiene una penetrancia relativamente alta y es de los mejor caracterizados molecular y genéticamente. Además, decidimos analizar embriones de todas las etapas del desarrollo, para explorar otros procesos en los que *acal* pudiera participar. Los embriones silvestres y mutantes se colectaron al mismo tiempo y en las mismas condiciones, y realizamos triplicados biológicos.

De cada experimento, obtuvimos alrededor de 50 millones de lecturas, de las cuales, alrededor del 40% fueron mapeadas exitosamente al genoma. Dada la alta sensibilidad de este tipo de secuenciación, siempre se obtienen lecturas no mapeables, ya que corresponden a más de una posición en el genoma, o no poseen suficiente calidad para ser mapeadas exitosamente. Las lecturas mapeadas al genoma cubren en su

totalidad los genes anotados en la referencia genómica (13,889 genes), lo cual muestra la alta sensibilidad del ensayo. Del total de los genes, encontramos 147 que muestran expresión significativamente diferente en los embriones mutantes contra los silvestres (aproximadamente el 1% de los genes, Figura 26A). De los genes con expresión significativamente diferente, 75 tienen una menor expresión en los mutantes, mientras que 72 tienen una mayor expresión.

En primer lugar, analizamos la expresión de los genes que se ha reportado que participan en la vía de JNK (Figura 26B). De acuerdo a nuestros experimentos anteriores, *Cka* y *aop* se encuentran sobre-expresados en los embriones mutantes de *acaI*. A pesar de que ambos genes muestran un incremento en la expresión similar a lo que observamos en nuestros resultados de qPCR, únicamente *aop* mostró una diferencia significativa (Figura 26E). *Cka* muestra una tendencia al aumento en la expresión, pero esta diferencia no es significativa. Posiblemente se requiere un mayor número de repeticiones para disminuir la dispersión de los datos. Destaca que *aop* es el único gen de la vía de JNK que muestra una expresión significativamente diferente, corroborando nuestros experimentos anteriores.

Se sabe que además de la vía de JNK, durante el cerrado dorsal se requiere la activación de la vía de Dpp. De hecho, *dpp* es un gen blanco de la vía de JNK. De acuerdo a nuestros resultados, ningún gen de la vía de señalización de Dpp se expresa de manera significativamente diferente en los embriones mutantes de *acaI* (Figura 26C). Además, el cerrado dorsal depende mecánicamente de proteínas del citoesqueleto que actúan como efectores, modificando la forma celular. El análisis transcriptómico muestra que ningún gen del citoesqueleto cambia significativamente su expresión en los embriones mutantes de *acaI* (Figura 26D). Estos resultados confirman que *acaI* regula específicamente la vía de JNK, y que los defectos en el cerrado dorsal se deben a esta función y no a un papel en la vía de Dpp o a la regulación de componentes del citoesqueleto.

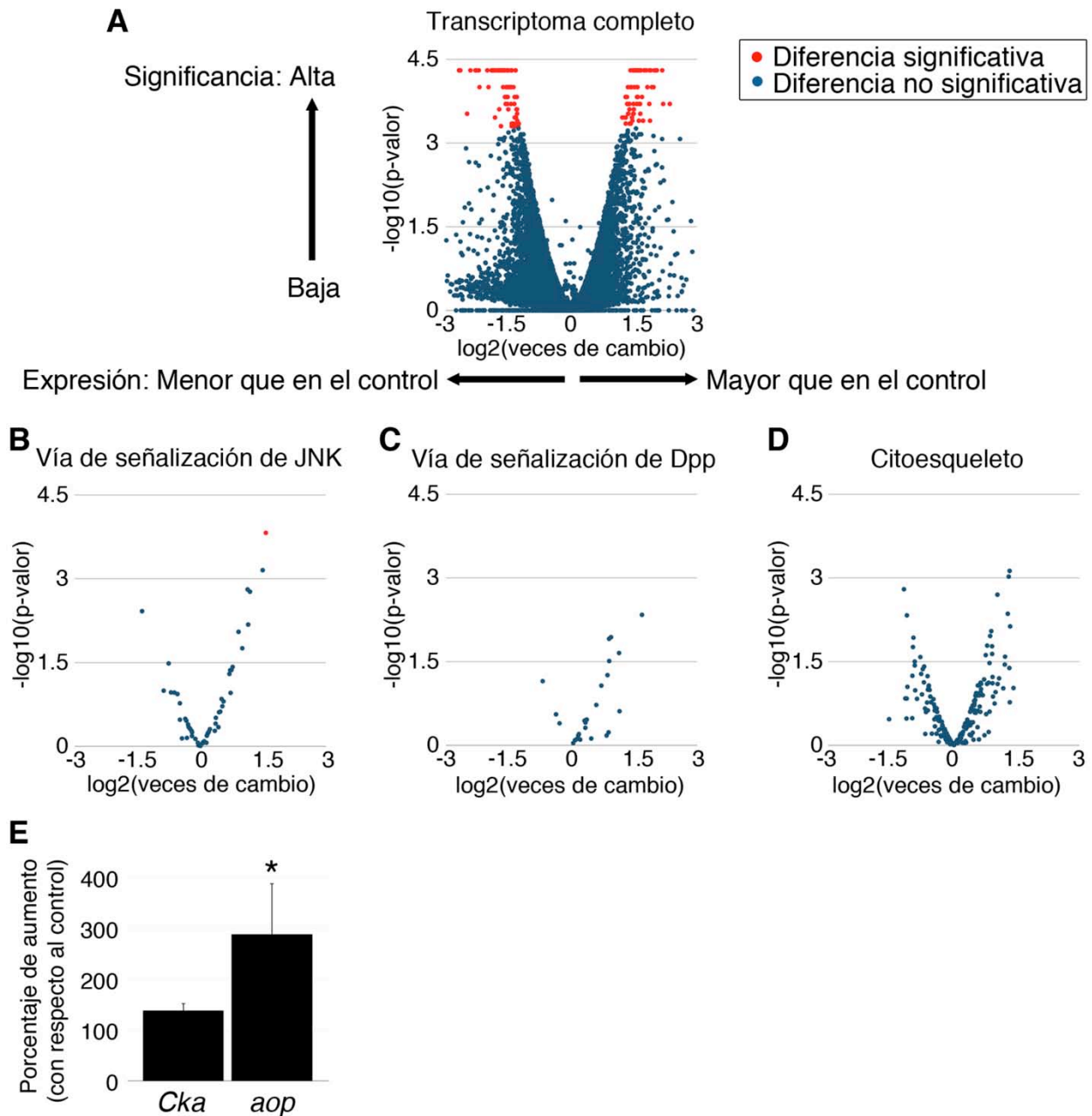


Figura 26. Análisis del transcriptoma de los embriones mutantes de *acal*.

(A) Gráfica de volcán del transcriptoma completo, comparando la expresión en embriones silvestres y mutantes para *acal*. Se muestra la interpretación de los ejes X y Y en ésta y en otras gráficas de volcán. (B) Gráfica de volcán de la expresión de los genes de la vía de JNK. (C) Gráfica de volcán de la expresión de los genes de la vía de Dpp. (D) Gráfica de volcán de la expresión de genes de componentes del citoesqueleto. (E) Expresión de *Cka* y *aop* en embriones mutantes para *acal* con respecto a la expresión en embriones silvestres, como se determinó por medio de secuenciación masiva de RNA.

11. Participación de *acaI* en otros procesos del desarrollo: Defectos en la formación del sistema nervioso de los embriones mutantes de *acaI*.

Además de analizar los genes involucrados en el cerrado dorsal en los embriones mutantes de *acaI*, estudiamos las funciones de los genes que mostraron una expresión significativamente diferente en los experimentos de secuenciación masiva de RNA. Este es un análisis no sesgado de qué genes están alterados en los embriones mutantes, y su clasificación nos permite esclarecer otras funciones de *acaI* durante el desarrollo. Para este análisis, analizamos el vocabulario controlado del proyecto de "Gene Ontology". El proyecto de "Gene Ontology" tiene como finalidad facilitar el estudio de miles de genes de manera simultánea, ya que a cada gen se le asignan categorías relacionadas con su función biológica. Con este vocabulario controlado, podemos determinar si en un grupo de genes de interés (en este caso, los genes de expresión diferencial), está sobre-representada alguna categoría de vocabulario controlado, y por lo tanto descubrir si alguna función biológica en particular se encuentra alterada en los embriones mutantes de *acaI* (Ashburner et al., 2000; St Pierre et al., 2014).

Tomamos los 147 genes con una expresión significativamente diferente, y analizamos el enriquecimiento de categorías de vocabulario controlado. Encontramos varios términos sobre-representados en nuestra lista de genes de expresión diferencial, y de manera general, estos términos se pueden clasificar en tres categorías: Desarrollo neural (26 genes), ciclo celular y división celular (24 genes), y desarrollo de la cutícula (18 genes, Figura 25). La mayoría de los genes de expresión diferencial que caen en las categorías de desarrollo neural y de ciclo celular y división celular, se encuentran sobre-expresados. En contraste, los genes de expresión diferencial involucrados con el desarrollo de la cutícula, están reprimidos con respecto al transcriptoma control.

La sobre-representación de genes involucrados en el desarrollo neural va en línea con los experimentos de expresión y de rescate de *acaI*. Estos resultados muestran que *acaI* se requiere en todo el ectodermo durante la embriogénesis (Figura 10), y que se expresa en el sistema nervioso desde las etapas de elongación y retracción de la

banda germinal, e incluso una vez concluido el cerrado dorsal (Figura 13). El análisis transcriptómico apoya que *aca/* también está involucrado en el desarrollo del sistema nervioso, ya que en los embriones mutantes se desregula la expresión de genes involucrados requeridos durante el desarrollo neural.

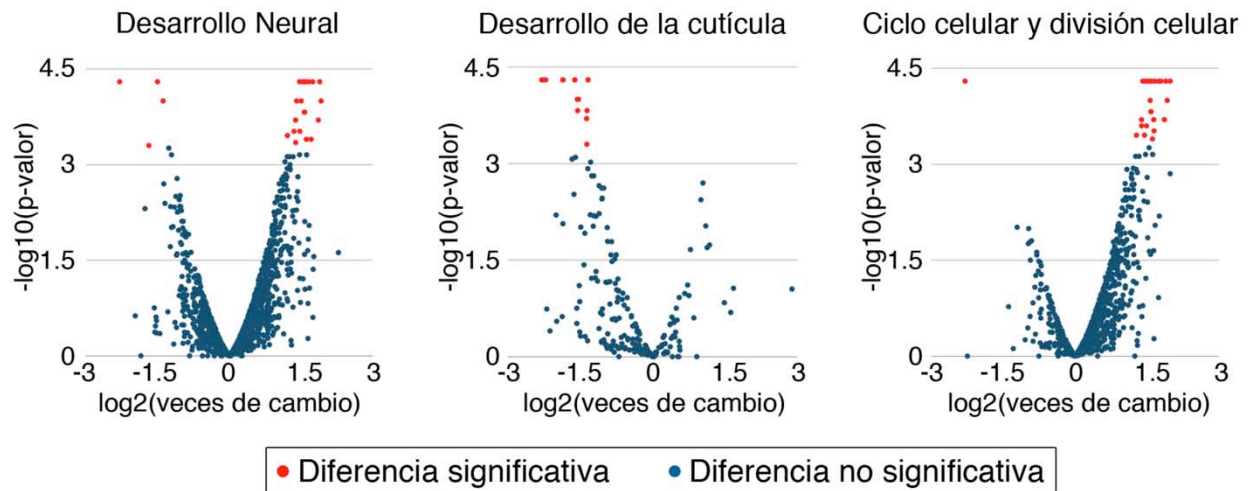


Figura 27. Categorías sobre-representadas en los genes de expresión diferencial.

Gráficas de volcán mostrando la expresión de genes involucrados en desarrollo neural, desarrollo de la cutícula, y ciclo celular y división celular.

También encontramos que muchos genes involucrados con el desarrollo de la cutícula tienen una menor expresión en los embriones mutantes que en los silvestres. La cutícula es secretada por la epidermis; su secreción comienza en el estadio 16, una vez que la epidermis se encuentra completamente diferenciada y que se completó el cerrado dorsal (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997). De hecho, la secreción de la cutícula es un marcador de diferenciación de la epidermis. Nuestro análisis indica que en los mutantes de *aca/*, la diferenciación de la epidermis se encuentra al menos retrasada. En embriones mutantes para *aop* se observa un fenómeno similar, ya que en la epidermis lateral de estos embriones hay divisiones celulares persistentes en las etapas del cerrado dorsal (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b). Al igual que la secreción de cutícula, el arresto del ciclo celular es un indicador de la diferenciación de la epidermis.

Finalmente, encontramos que muchos genes involucrados en el ciclo celular y en la división celular se encuentran sobre-expresados en los mutantes de *acaI* (Figura 27). La diferenciación incompleta de la epidermis (y la inhibición de genes cuticulares) podría deberse a que este tejido continúa proliferando en etapas tardías. También contemplamos la posibilidad de que *acaI* regule la proliferación en el desarrollo neural, ya que la formación del sistema nervioso depende en gran medida de la división controlada de neuroblastos que dan lugar a diversos linajes neurales (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

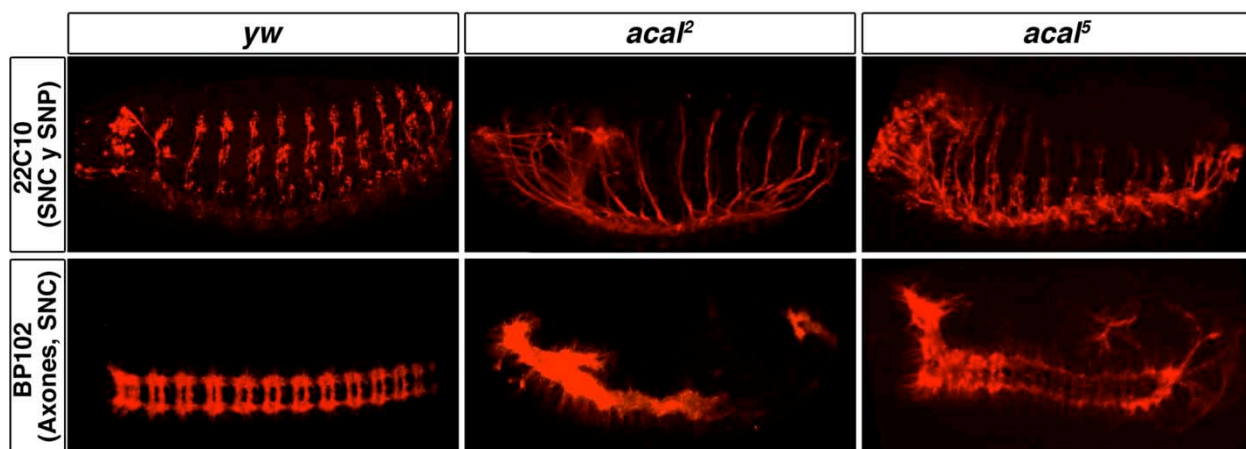


Figura 28. Defectos en el sistema nervioso en los embriones mutantes de *acaI*.

Se hicieron tinciones por inmunofluorescencia con 22C10, que marca el sistema nervioso central y el periférico (SNC y SNP), y con BP102, que marca los axones del SNC. La línea *yw* se usó como control silvestre.

Analizamos el sistema nervioso de los embriones mutantes de *acaI*, para observar si nuestros datos de secuenciación masiva de RNA eran consistentes con los fenotipos en este tejido. Para esto, hicimos inmuno-tinciones usando dos anticuerpos: 22C10, cuyo epítipo se expresa en las neuronas del sistema nervioso central y del periférico, y BP102, que marca los axones del sistema nervioso central. Encontramos que de acuerdo a lo esperado, los mutantes de *acaI* tienen importantes defectos en la formación del sistema nervioso. Algunos de estos defectos son la formación de proyecciones aberrantes, sobre-proliferación o ausencia de tejido neural en algunas regiones del embrión (Figura 28). Estos fenotipos van de acuerdo con el análisis

transcriptómico, donde encontramos muchos genes neurales y del ciclo celular sobre-expresados en los embriones mutantes. También, explica por qué hay embriones que mueren sin defectos en la cutícula.

12. Defectos en el sistema nervioso de las larvas mutantes de *acal*.

Las mutaciones en *acal* resultan en defectos en el cerrado dorsal y en el desarrollo del sistema nervioso, consistente con la expresión de *acal*, analizada por hibridación *in situ*. Sin embargo, existen animales homocigotos que eclosionan, y que mueren durante estadios larvarios. Ya que sabemos que *acal* continua expresándose en el sistema nervioso durante estadios embrionarios tardíos, decidimos explorar si en las larvas existen defectos en este tejido.

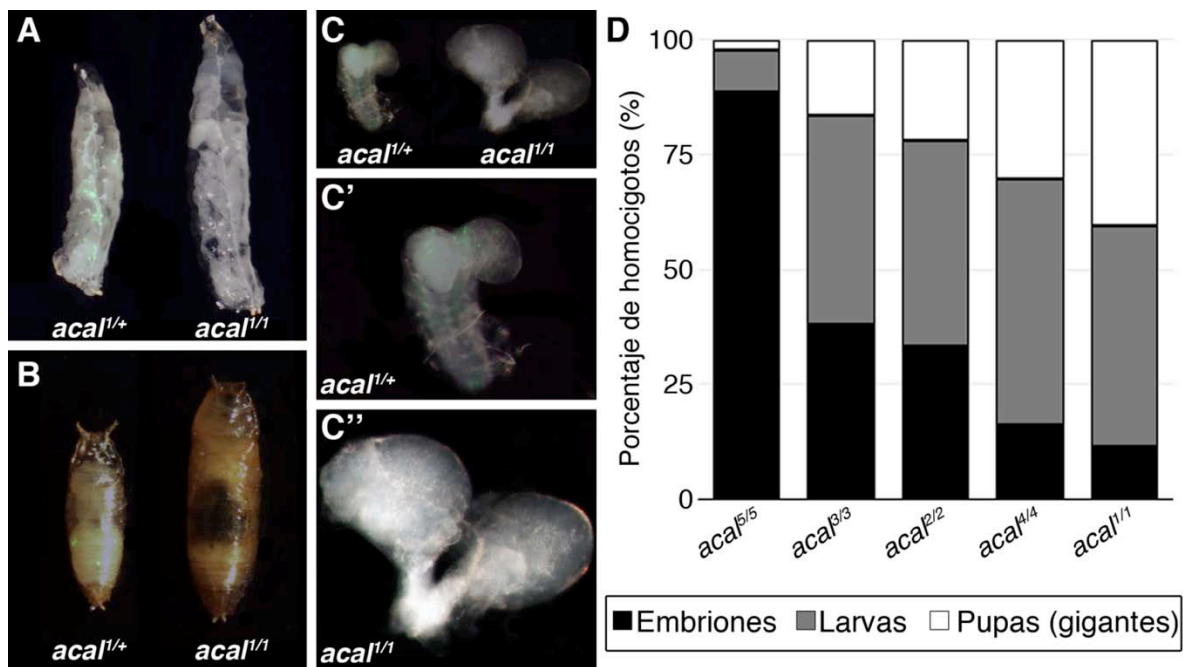


Figura 29. Fenotipos mutantes de *acal* en estadios post-embryonarios.

(A) Larvas control *acal*^{1/+} y homocigotas para *acal*¹. (B) Pupas control *acal*^{1/+} y homocigotas para *acal*¹. (C) Cerebros larvarios control *acal*^{1/+} y homocigotas para *acal*¹. (C') y (C'') son magnificaciones de (C). (A-C) Se tomó en una sola fotografía el control y el mutante, para ilustrar las diferencias en tamaño. (D) Cuantificación de la letalidad embrionaria, larvaria, y de pupa de los organismos homocigotos mutantes para *acal*. Número de animales analizados: *acal*^{β/1} = 217, *acal*^{β/2} = 192, *acal*^{β/3} = 110, *acal*^{β/4} = 329, *acal*^{β/5} = 391.

Observamos que algunas larvas sobreviven hasta el tercer estadio larvario, y que además, este estadio se extiende más allá del periodo normal de dos días. Por la misma razón, estas larvas continúan creciendo (Figura 29A). Eventualmente, dichas larvas inician la formación de la pupa, pero una vez que comienzan a formar el pupario, mueren con evidencia de necrosis en el interior (Figura 29B).

Al disecar el cerebro de las larvas mutantes, observamos una hiperplasia del sistema nervioso, particularmente de los ganglios supraesofágicos en comparación a sus hermanos heterocigotos (Figura 29C-C’). En los alelos donde hay una mayor sobrevivencia embrionaria, este fenotipo es más penetrante. Esto tiene sentido, ya que los alelos con alta letalidad embrionaria son más fuertes y la mayoría de los animales muere antes de llegar a estadios larvarios tardíos (Figura 29D).

Durante el desarrollo larvario, las células del cerebro continúan proliferando. En la parte más externa de los lóbulos supra-esofágicos se localiza un epitelio conocido como neuro-epitelio, del cual se delaminan algunas células para formar neuroblastos. Esta proliferación es evidente sobre todo hacia el final de la etapa larvaria, y durante la metamorfosis. Estos neuroblastos atraviesan al menos una ronda de división celular para formar células madre ganglionares; estas se dividen entonces para formar células diferenciadas: neuronas y glía (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997; Li et al., 2013).

Como los cerebros de las larvas mutantes para *acaI* son más grandes que los cerebros silvestres, quisimos explorar si este fenotipo se debe a una sobre-proliferación de los precursores neurales. Para esto, realizamos inmuno-tinciones contra Miranda, un marcador de neuroblastos involucrado en la división asimétrica de los mismos. Al mismo tiempo, analizamos la distribución de DE-Cadherina (DE-Cad), un marcador de neuroepitelio. Observamos que en los cerebros mutantes de *acaI*, se observa una disminución de neuroepitelio, con un aumento concomitante en el número de neuroblastos (Figura 30).

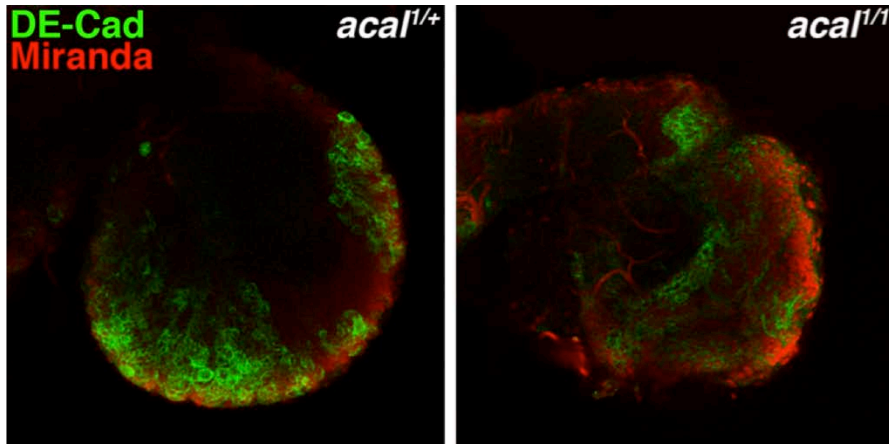


Figura 30. Diferenciación de precursores neurales en cerebros larvarios silvestres y mutantes.

En cada panel, se muestra un lóbulo supra-esofágico de larvas de tercer estadio. Comparado con el control (*acal*^{1/+}), los cerebros de larvas homocigotas mutantes muestran un incremento en el número de neuroblastos (Miranda), y menos neuroepitelio (DE-Cad).

Resultados similares se encontraron en los diferentes alelos mutantes de *acal*, y en cruza trans-heterocigotas. Del aumento en el número de neuroblastos podemos inferir que existe una sobre-proliferación de tejido neural que lleva a la hiperplasia de los lóbulos supra-esofágicos. Cabe señalar que esta sobre-proliferación se observa incluso antes de que el cerebro sea visiblemente hiperplásico (Figura 30). Además, estos resultados sugieren que *acal* se requiere para regular la transición de neuroepitelio a la formación de neuroblastos.

13. Identificación de genes involucrados en la hiperplasia del sistema nervioso en embriones y larvas mutantes para *acal*.

El análisis del transcriptoma de los embriones mutantes de *acal* reveló que muchos de los genes sobre-expresados en los mutantes participan en el desarrollo neural. Dentro de estos genes, encontramos dos con funciones cruciales durante la neurogénesis: *Delta (Dl)* y *lethal (2) giant larvae (l(2)gl)*. *Dl* es una proteína de membrana que activa la vía de señalización de Notch en células vecinas. Los neuroblastos expresan *Dl*, que

activa la vía de Notch en células aledañas, inhibiendo su diferenciación hacia el linaje neural, y promoviendo la diferenciación hacia otros tipos celulares (Fiuza and Martinez-Arias, 2007). *DI* y la vía de Notch se requieren después en repetidas ocasiones para la diferenciación de diferentes componentes del sistema nervioso central y periférico. Por su parte, *l(2)gl* es también una proteína de membrana involucrada en el establecimiento de la polaridad celular y en la arquitectura epitelial. Las mutaciones en *l(2)gl* impiden la segregación de determinantes celulares, importantes para la diferenciación neuronal, y promueven una transición epitelio-mesénquima (Bilder et al., 2000).

Como en los cerebros de larvas mutantes de *acaI* observamos un aumento en el número de neuroblastos, y una menor cantidad de neuroepitelio, pensamos que esto podría deberse a la sobre-expresión de *DI*, o a la inhibición de *l(2)gl*. Para determinar esto, analizamos la expresión de ambos genes por PCR en tiempo real, tanto en embriones –en parte para corroborar los resultados de la secuenciación masiva– como en cerebros larvarios, para determinar si su expresión es también relevante en estas etapas del desarrollo (Figura 31). Por medio de qPCR, pudimos confirmar que los niveles de RNA mensajero de *DI* son mayores en embriones mutantes que en los silvestres, no sólo en embriones mutantes de *acaI²*, empleados en el análisis transcriptómico, sino también en embriones *acaI¹* y *acaI⁵*. Similarmente, los niveles de mRNA de *l(2)gl* en los embriones mutantes para *acaI¹*, *acaI²* y *acaI⁵* son menores que en los embriones silvestres (Figura 31A).

En contraste, al analizar la expresión de estos mismos genes en los cerebros larvarios, encontramos que la expresión de *DI* no cambia significativamente entre la condición silvestre y mutante. La expresión de *l(2)gl* sí se encuentra fuertemente disminuida en los cerebros mutantes (Figura 31B). Este resultado sugiere que *l(2)gl* juega un papel importante en los defectos del sistema nervioso, ya que sus niveles disminuyen tanto en etapas embrionarias como larvarias.

Como *DI* se requiere para la diferenciación del sistema nervioso durante la embriogénesis, su des-regulación en las etapas embrionarias podría formar parte del origen de las alteraciones subsecuentes en el desarrollo larvario, en donde los

neuroblastos proliferan aberrantemente. De este modo, aunque no hayamos encontrado diferencias en la expresión de *Dl* en cerebros larvarios, los defectos que ocurrieron en el desarrollo embrionario, donde la expresión de *Dl* si está alterada, se reflejan en una mayor proliferación de neuroblastos. *Dl* se requiere para diferenciar neuroblastos del epitelio neural precursor, los que una vez ya ‘diferenciados’ en neuroblastos aberrantemente, generarán fenotipos más extremos en la vida larvaria, aunque la expresión de *Dl* no varíe significativamente entonces. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para determinar si efectivamente los cambios en la expresión de *Dl* en etapas embrionarias, influye en el fenotipo larvario

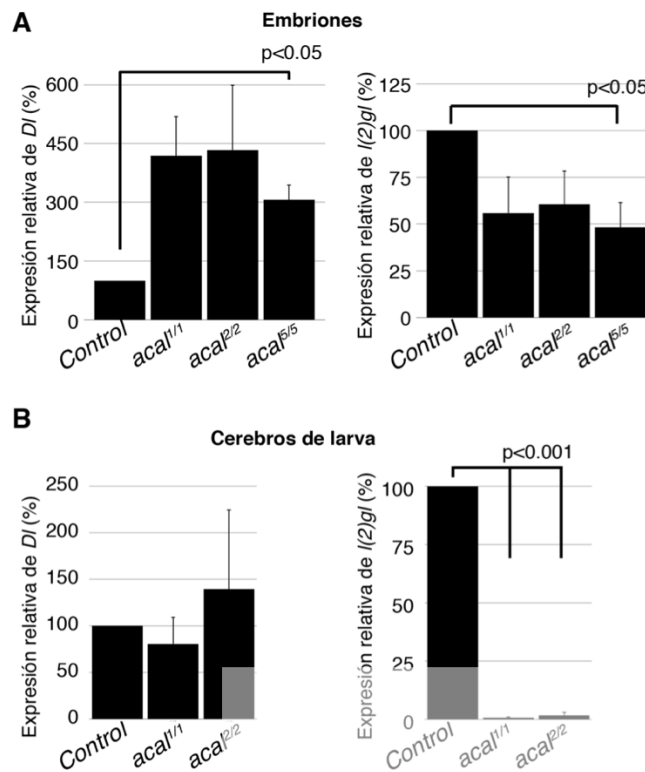


Figura 31. Determinación por qPCR de la expresión de *Dl* y *I(2)gl* en animales silvestres y mutantes.

(A) Expresión relativa de *Dl* (izquierda) y de *I(2)gl* (derecha) en embriones control (*yw*) y mutantes para *acal*. (B) Expresión relativa de *Dl* (izquierda) y de *I(2)gl* (derecha) en cerebros larvarios control (*yw*) y mutantes para *acal*. Debido a que *acal5* es letal embrionario, sólo se determinó la expresión embrionaria para dicho alelo. La expresión urales disminuyen tanto en etapas embrionarias como larvarias. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, realizados por duplicado. La significancia se determinó con pruebas de t de Student.

Los embriones mutantes para *lola*, el gen más cercano a *acal* en su extremo 3', tienen defectos en la formación del sistema nervioso, y la sobre-expresión de *lola* resulta en hiperplasia del sistema nervioso en diferentes etapas del ciclo de vida de la mosca.

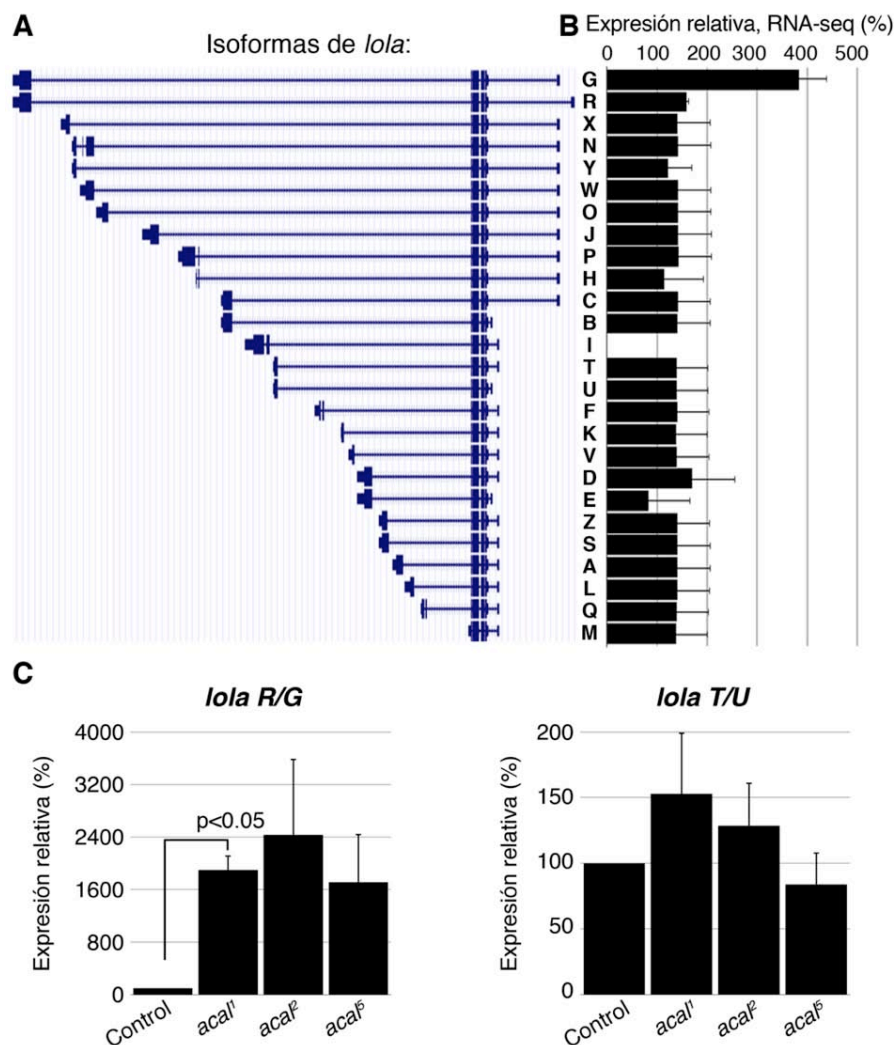


Figura 32. Expresión de las isoformas de *lola* en embriones silvestres y mutantes para *acal*.

(A) Representación esquemática del locus de *lola* y de sus 26 isoformas. Cada isoforma corresponde a la letra graficada en (B). (B) Expresión de las isoformas de *lola* en embriones mutantes para *acal*², con respecto a la expresión en embriones silvestres. Se grafica el promedio de los tres experimentos independientes de secuenciación masiva, +/- error estándar. (C) Validación de la expresión de las isoformas R/G y T/U por qPCR. Se grafica el promedio de tres experimentos independientes, corridos por duplicado. La significancia se determinó con pruebas de t de Student.

A pesar de que nuestros resultados muestran que durante el cerrado dorsal *acal* actúa de manera independiente a *lola* y *psq*, decidimos analizar si la expresión de estos genes está alterada en los mutantes de *acal*. De existir estas alteraciones, esto sugeriría que *acal* tiene funciones tanto en *cis* como en *trans*, como ya se ha demostrado para otros lncRNAs, y podría ser parte de la explicación del fenotipo tumoral que observamos en el sistema nervioso (junto con los efectos en *DI* y en *l(2)gl*).

Para analizar la expresión de *lola* en los embriones mutantes de *acal*, como primer abordaje recurrimos a nuestros resultados de secuenciación masiva de RNA. *lola* es un gen de una gran complejidad, ya que el locus tiene una longitud de 60 kilobases, y codifica para 22 factores de transcripción diferentes (cada uno con un dominio de unión al DNA diferente), a partir de 26 isoformas generadas por “splicing” alternativo (Figura 32A). Además, se ha demostrado que algunas isoformas de *lola* tienen funciones antagónicas entre sí, por lo que decidimos analizar la expresión de cada una de ellas.

Desafortunadamente, los modelos estadísticos empleados en el análisis de datos de secuenciación masiva tienen una baja sensibilidad para encontrar diferencias significativas en loci complejos como el de *lola*. Esto se debe a que es difícil cuantificar una lectura determinada si ésta cae en un exón compartido por varias isoformas, lo cual, en el caso de *lola*, es extremadamente común. Sin embargo, encontramos dos isoformas cuya expresión cambia en los embriones mutantes: *lola-G* y *lola-I*. *lola-G* es 400% más abundante en embriones mutantes que en silvestres, mientras que la expresión de *lola-I* se encuentra completamente abatida (Figura 32).

Por medio de PCR cuantitativa, analizamos la expresión de *lola-G*. Debido a que esta isoforma comparte casi todos sus exones con *lola-R*, es imposible amplificar únicamente una de las dos. Sin embargo, ambas isoformas comparten la misma secuencia codificante (Figura 32A). La expresión de *lola-R/G* es significativamente diferente en embriones mutantes para *acal*¹ (Figura 32C). En los alelos *acal*² y *acal*⁵, no encontramos una diferencia significativa, aunque la tendencia es similar a la de *acal*¹.

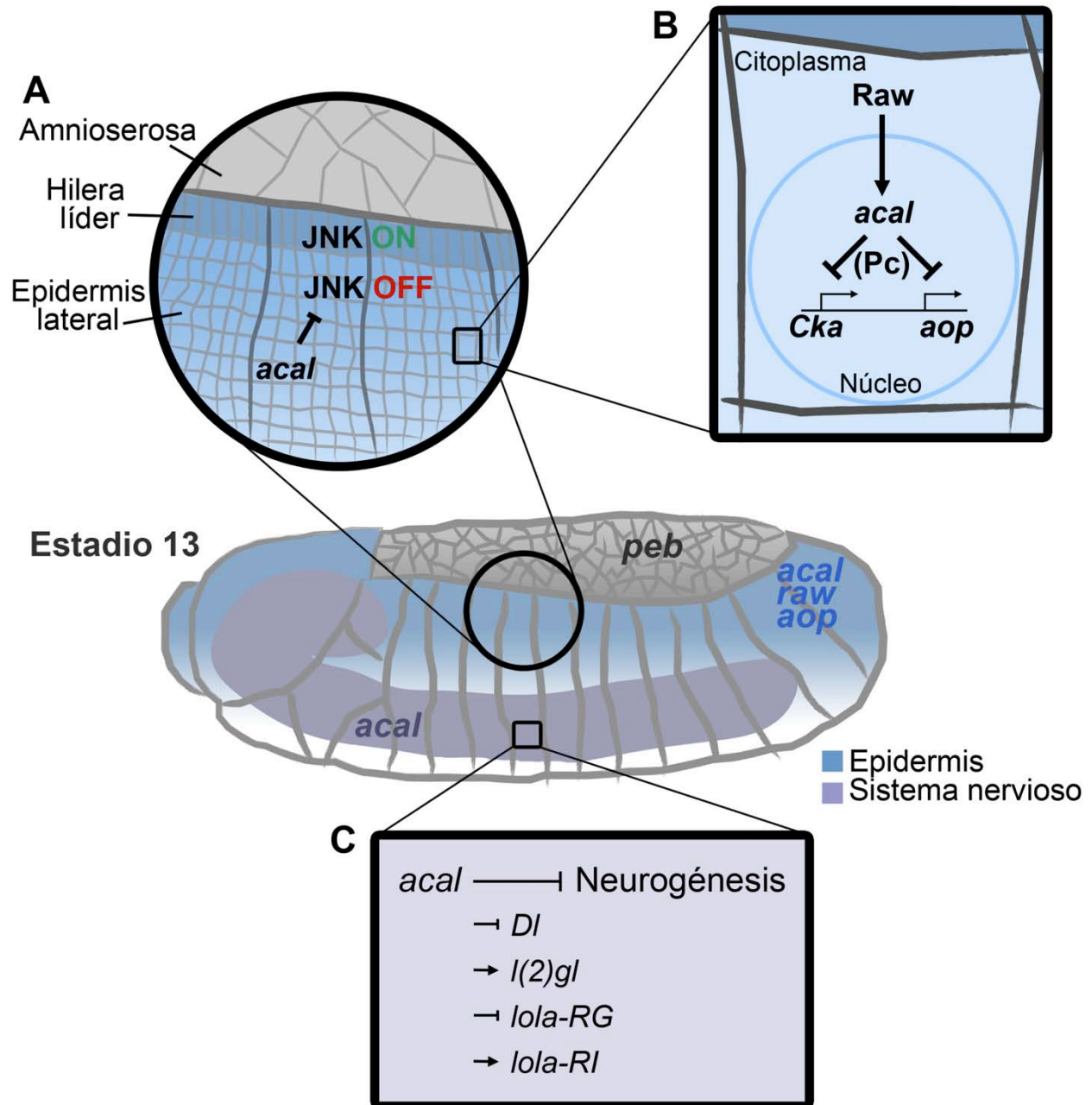


Figura 33. Resumen de las funciones de *acal* durante el desarrollo embrionario.

En la parte central, se muestra un embrión en estadio 13. En azul, se esquematiza la epidermis y en morado, el sistema nervioso. (A) Se muestran los tres tejidos involucrados en el cerrado dorsal, con *acal* actuando en la epidermis lateral. (B) Modelo del mecanismo de acción de *acal* en el cerrado dorsal. Raw induce la expresión de *acal*, que en conjunto con Pc, regula la expresión de *Cka* y de *aop* en un mecanismo en *trans*. (C) Esquema de la función de *acal* en el sistema nervioso. *acal* regula al menos indirectamente la expresión de *Dl*, *l(2)gl*, y de dos isoformas de *lola*, para regular la diferenciación neuronal.

Sorprendentemente, los niveles aumentan alrededor de 1500% con respecto al control, en los tres alelos. Para corroborar que este aumento tan dramático es real, y no algún artefacto en la preparación del cDNA o en la qPCR, analizamos la expresión de una isoforma que por RNA-seq no muestra cambios significativos: *lola-T/U* (al igual que las isoformas G y R, las isoformas T y U comparten la misma secuencia codificante). En el caso de estas isoformas, encontramos una abundancia similar en embriones silvestres y mutantes (Figura 32C). Este resultado sugiere que *acal* regula la expresión de al menos algunas isoformas de *lola*, y que en los embriones mutantes, la desregulación de *lola* podría ocasionar los defectos en la formación del sistema nervioso observado en dichos animales. Bajo esta premisa, *acal* tendría una función en *trans*, regulando genes que participan en el cerrado dorsal, y una función en *cis*, regulando la expresión de al menos *lola* durante la formación del sistema nervioso (resumido en la Figura 33).

XIII. DISCUSIÓN.

En este trabajo caracterizamos un RNA no codificante largo (lncRNA), *acal*, con requerimientos durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*. Las mutaciones en *acal* son letales en estadios embrionarios y larvarios. Salvo algunos ejemplos de microRNAs, como *bantam* y *bereft* (Brennecke et al., 2003; Hardiman et al., 2002), la identificación por mutagénesis al azar de un RNA no codificante vital, no ha sido común en ningún modelo experimental. En el caso de los lncRNAs, esto se debe a que suelen tener una expresión muy baja, no poseen secuencias consenso o predecibles que faciliten su identificación, y su contribución fenotípica suele ser mucho menor que la de otro tipo de genes. Estas características han dificultado su estudio, por lo que se conoce muy poco de sus funciones e importancia biológica. Por lo tanto, el estudio de *acal* no sólo es útil en el campo del desarrollo embrionario, sino también en la profundización de la biología de esta gran familia génica.

En contraste con otros tipos de RNAs, como los RNAs no codificantes pequeños, los lncRNAs no poseen secuencias evidentes (secuencias consenso, palindrómicas o altamente conservadas) que faciliten su identificación (Derrien et al., 2012). La conservación a nivel de nucleótidos de los lncRNAs es baja, aunque tengan homólogos funcionales en diferentes organismos (Haerty y Ponting, 2013). Sin embargo, en los últimos años, gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación masiva de ácidos nucleicos, se han identificado un gran número de lncRNAs en diferentes organismos, comprendiendo hasta un 15% del transcriptoma de *Drosophila*, y un 90% del transcriptoma humano (Ilott y Ponting, 2013; Young et al., 2012). De hecho, alrededor del 30% de las lecturas obtenidas en proyectos de secuenciación masiva del transcriptoma de *Drosophila* mapean en regiones sin genes anotados (Celniker et al., 2009).

La función de la gran mayoría de los lncRNAs aún se desconoce. Se propone que los lncRNAs son reguladores finos de la expresión génica, y en muchos casos, su

contribución fenotípica suele ser limitada (Haerty y Ponting, 2013; Rinn y Chang, 2012). Esto ha llevado a pensar que algunos lncRNAs son producto de “transcripción de fondo”, y que su relevancia biológica es nula. En este trabajo, contrario a esta idea, identificamos un lncRNA cuyas mutaciones son letales. Fuera de la letalidad y las alteraciones larvarias al sistema nervioso, que son del 100%, los fenotipos embrionarios que encontramos en los alelos mutantes de *acaI* no tienen una alta penetrancia como la observada para otros genes, apoyando la noción de que este tipo de moléculas pueden regular a sus blancos, en principio, de manera sutil (Batista y Chang, 2013). Se ha propuesto que los lncRNAs actúan reafirmando estados de regulación pre-establecidos por otros mecanismos [por ejemplo, la presencia o ausencia de factores de transcripción o el estado de compactación de la cromatina (Agostini et al., 2013)]. Es decir, se puede regular de manera razonablemente sutil a algunos genes efectores, y la sumatoria de esta regulación fina es evidenciada en embriones mutantes, donde se observan defectos claros y letales.

Debido a que las mutaciones en *acaI* se identificaron por un abordaje clásico de genética directa, identificamos un lncRNA con clara relevancia fenotípica, en contraste con otros estudios de genética reversa, donde se ha visto que eliminar un lncRNA de manera dirigida puede llevar a identificar moléculas con fenotipos mutantes indetectables (Guttman et al., 2011; Ponjavic et al., 2007). Esto implica que al menos algunos lncRNAs sí tienen consecuencias fenotípicas claras, y fenotipos sustantivos.

El gen *acaI*, en muchos sentidos, es poco convencional. Además de producir un lncRNA, no posee intrones. Cerca del 20% de los genes de *Drosophila* carecen de intrones, y se ha propuesto que éste es un mecanismo para acelerar la expresión génica y por lo tanto, el desarrollo embrionario. De los genes con un solo exón, la gran mayoría tienen funciones durante la embriogénesis (De Renzis et al., 2007). Encontramos que *acaI* es procesado a fragmentos de entre 40 y hasta al menos 120 nucleótidos de longitud. Cabe señalar que a pesar de que no pudimos detectar microRNAs maduros producidos en el locus de *acaI*, es posible que esto se deba a limitaciones técnicas. Desafortunadamente, debido a que *acaI* presenta niveles de expresión muy bajos, detectar y estudiar su procesamiento es difícil. Más aún, dado

que el procesamiento de *acaI* es más evidente durante estadios de pupa, y debido a la letalidad embrionaria/larvaria de nuestros alelos mutantes, es imposible, con las herramientas actuales, analizar cómo se modifica este procesamiento en los organismos homocigotos mutantes. Dado que los fragmentos generados corresponden a regiones altamente conservadas de *acaI*, es posible que estos fragmentos sean los productos funcionales del gen, e incluso podrían tratarse de precursores intermediarios de microRNAs. A la fecha, no existen reportes de RNAs procesados de una manera similar en eucariontes; sin embargo, se ha demostrado que algunos lncRNAs interactúan con la cromatina con regiones de sólo 40 nucleótidos (Grote et al., 2013). Análisis bioinformáticos detallados podrían revelar si las regiones donde *acaI* se procesa son capaces de interactuar con posiciones específicas en el genoma, o si regiones del transcrito poseen la estructura secundaria necesaria para formar microRNAs. De manera importante, logramos identificar que *acaI* tiene una localización nuclear, similar a otros lncRNAs, apoyando la premisa de que *acaI* ejerce su función a nivel transcripcional.

El gen *acaI* se expresa principalmente en dos tejidos: la epidermis y el sistema nervioso, ambos de origen ectodérmico. De acuerdo con nuestros resultados, la expresión en la epidermis es importante para completar el cerrado dorsal, mientras que la expresión en el sistema nervioso regula la proliferación de los precursores neurales. Nuestras construcciones de rescate (*UAS-acaI*, y el rescate genómico), que están insertadas en posiciones diferentes a la endógena (e incluso en otro cromosoma), rescatan los defectos del cerrado dorsal de los embriones mutantes de *acaI*, implicando que *acaI* actúa en *trans* para regular el cerrado dorsal. Más aún, la sobre-expresión de los genes aledaños a *acaI* y mutaciones de estos mismos genes no afecta el cerrado dorsal. Por otra parte, nuestras construcciones de rescate no son suficientes para obtener organismos adultos, sugiriendo que otras funciones de *acaI* no se restablecen por completo, por ejemplo, su función en el sistema nervioso. Esto podría deberse a que *acaI* tiene una función en *cis*, que no se rescata al re-introducir una copia silvestre del gen en otra posición del genoma, aunque otras explicaciones también son posibles, como que la expresión endógena no se recapitula por completo.

Se ha demostrado que muchos lncRNAs ejercen su función en *cis*, regulando la expresión de genes aledaños al impedir estéricamente el reclutamiento de factores de transcripción, de la RNA polimerasa, o reclutando maquinaria epigenética durante la transcripción del propio lncRNA (Fatica y Bozzoni, 2014). Aquí mostramos evidencia de que en los mutantes de *acal*, la expresión de una isoforma del gen más cercano al locus de *acal* se sobre-expresa de manera muy extrema, mientras que otra isoforma se inhibe. Este gen, *lola*, se expresa en el sistema nervioso del embrión y en general, su sobre-expresión resulta en proliferación excesiva de precursores neurales (Neumuller et al., 2011; Ohsako et al., 2003). Este mismo fenotipo se observa en los embriones mutantes de *acal*, abriendo la posibilidad de que la des-regulación de *acal* resulte en cambios en la expresión de las isoformas de *lola* y consecuentemente, en defectos en la formación del sistema nervioso. Será importante encontrar una manera de rescatar la función de *acal* en *cis*, para determinar si esto restablece la expresión silvestre de *lola* e inhibe la proliferación de los precursores neurales.

Aunado a esto, la sobre-expresión de *DI* y la inhibición de la expresión de *l(2)gl*, ya sea directa o indirectamente (tal vez a través de la alteración de la expresión de *lola*) por *acal*, se conjuntan con la desregulación de *lola* para generar fenotipos mutantes en el desarrollo y formación del sistema nervioso. Este efecto recapitula, al menos parcialmente, lo reportado por Ferres-Marco et al. (2006). En este trabajo, se reportó que la sobre-expresión simultánea de *DI*, *lola* y *psq* (localizado río abajo de *lola* y de *acal*) durante la formación del ojo, resulta en hiperplasia de dicho órgano. Dado que en ese reporte se desconocía la existencia de *acal* entre *lola* y *psq*, es posible que *acal* también contribuya a dicho fenotipo, ya que la construcción empleada para sobre-expresar *lola* y *psq* se encuentra insertada muy cerca del locus de *acal*.

Muchos lncRNAs forman complejos con otras moléculas para efectuar su función (Fatica y Bozzoni, 2014). Nuestros resultados apuntan que *acal* podría formar parte de complejos remodeladores de la cromatina, ya que observamos una fuerte interacción genética entre mutantes para *acal* y para *Pc*, un componente del complejo PRC1, represor de la cromatina (Margueron y Reinberg, 2011). El fenotipo mutante de *Pc* se ha usado frecuentemente para identificar genes que regulan el estado de la cromatina,

y muchos genes que forman parte del complejo de PRC1 se han identificado por interacciones genéticas con *Pc* (Blastyak et al., 2006; Castelli-Gair y Garcia-Bellido, 1990; Ferres-Marco et al., 2006; Schwartz y Pirrotta, 2013). Por lo tanto, la interacción genética entre *acal* y *Pc* es altamente sugerente de una asociación física entre los productos de estos dos genes. Esta propuesta podría indicar que *acal* ejerce su función al inducir remodelación de la cromatina, teniendo algunos blancos en *cis* (por ejemplo, en la formación del sistema nervioso), y otros blancos en *trans* (en el cerrado dorsal). Sin embargo, será importante demostrar si *acal* se asocia físicamente con *Pc* u otro componente del complejo PRC1, o si ejerce su función con otros complejos proteicos. En este sentido, se sabe que algunos ncRNAs actúan a un nivel post-transcripcional, promoviendo o inhibiendo la traducción de RNAs mensajeros. En este trabajo identificamos transcritos cuya expresión cambia como consecuencia de mutaciones en *acal*, sin embargo, no podemos descartar que *acal* regule los niveles de algunos componentes a nivel traduccional.

Nuestros resultados demuestran que la expresión de *acal* en la epidermis es importante para el cerrado dorsal. En los embriones mutantes para *acal*, se observa una sobre-activación de la vía de JNK, el principal regulador del cerrado dorsal (Rios-Barrera y Riesgo-Escovar, 2013). Esta sobre-activación de la vía de JNK es de severidad variable y en general no es tan extrema como se observa en mutantes para otros reguladores negativos (Byars et al., 1999; Rousset et al., 2010). Sin embargo, nuestros resultados muestran que un cambio menor en la expresión de genes de la vía, como *Cka*, puede afectar el cerrado dorsal de manera similar a lo que se observa en los embriones mutantes de *acal*. Al igual que en embriones mutantes para otros reguladores negativos de la vía de JNK (Blake et al., 1998; Byars et al., 1999; Reed et al., 2001; Sorrosal et al., 2010), en los mutantes de *acal* se observa una correlación entre la activación ectópica de JNK y cambios de forma celular aberrante. A partir de estas observaciones, proponemos que la activación de la vía de JNK debe regularse muy estrechamente, ya que tanto la pérdida como la ganancia de actividad de esta vía afecta el cerrado dorsal.

La expresión de *acal* en la epidermis lateral es regulada por Raw, una proteína pionera

conservada en artrópodos y en el nemátodo *C. elegans* (Bauer Huang et al., 2007; Jemc et al., 2012). Raw tiene una localización citoplásmica, y su homólogo en *C. elegans* incluso posee un dominio transmembranal (Bauer Huang et al., 2007). Por estas razones, es muy probable que Raw regule la expresión de *acaI* de manera indirecta. Se ha demostrado que los defectos en el cerrado dorsal de los mutantes de *raw* se rescatan expresando un transgén silvestre durante la etapa de la retracción de la banda germinal, y si este transgen se expresa durante el cerrado dorsal, el cerrado dorsal ya no se puede rescatar. En otras palabras, Raw se requiere desde antes del cerrado dorsal, durante la retracción de la banda germinal (Bates et al., 2008). Esto sugiere que, en efecto, Raw actúa de manera temprana y que desata una cascada génica que incluye a *acaI*, para regular el cerrado dorsal en estadios posteriores.

El fenotipo mutante de *raw* es muy fuerte, incluso en pérdidas de función parciales. Dado que el fenotipo mutante de *acaI* es mucho más débil, proponemos que Raw tiene otros mediadores además de *acaI*. Será importante estudiar en detalle si Raw regula a *acaI* en otros procesos o estadios del desarrollo, como durante la formación del tórax adulto, en donde nuestros resultados apuntan a que pudiera existir regulación de *raw* mediada, al menos en parte, por *acaI*. *raw* también se expresa en el sistema nervioso, como *acaI*, aunque en los embriones mutantes de *raw*, la expresión de *acaI* en este tejido se conserva. Esto significa que la expresión de *acaI* en el sistema nervioso no depende de *raw*. Por otro lado, esta expresión podría provenir de la contribución materna de *acaI* depositada durante la ovogénesis.

Río abajo de *raw* y *acaI* identificamos como blancos a *Cka* y a *aop*. La función de *raw* ya se había definido genéticamente al nivel de Jun (Bates et al., 2008), y posteriormente se propuso al nivel de JNK (Jemc et al., 2012). Estos resultados aparentemente contradictorios podrían converger en *Cka*, que precisamente une físicamente a Jun y a JNK (Chen et al., 2002). Nuestros resultados muestran que la sobre-expresión de *acaI* resulta en menor abundancia de *Cka*. *Cka* es depositado en el ovocito de manera muy abundante durante la ovogénesis (Chou y Perrimon, 1996). Es posible que por esta razón, los embriones que sobre-expresan a *acaI* logren sobrevivir hasta adultos a pesar de que los niveles de *Cka* estén disminuidos. Además es posible

que la proteína Cka pueda aún traducirse a partir del mRNA disminuido, y contrarrestar el efecto de sobre-expresar *acaI*.

Con estos datos, nuestros resultados desenmascararon un nuevo punto de regulación de la vía de JNK, al nivel de Cka. A pesar de que se conocen varias proteínas de andamiaje en la vía de JNK en vertebrados, y en las vías de otras MAPKs en general (Brown y Sacks, 2008; Turjanski et al., 2007), su participación como reguladoras de la activación de JNK no se ha explorado detalladamente. Nuestros resultados muestran que aumentar los niveles de expresión de Cka alteran de manera importante la activación de la vía de JNK. Esto mismo se ha demostrado bioquímicamente en sistemas de expresión heterólogos (Chen et al., 2002). De manera similar, se ha demostrado que en condiciones de estrés, donde aumenta la actividad de la vía de JNK, también se observa sobre-expresión de JIP-3, un homólogo funcional de Cka en vertebrados. Además, disminuir o aumentar los niveles de JIP-3 afecta directamente la activación de la vía de JNK (Xu et al., 2010). En conjunto, estos resultados muestran que además del mecanismo clásico de regulación de JNK por el módulo de MAP4K-MAP3K-MAP2K, la abundancia de proteínas de andamiaje controla el grado de activación de la vía de señalización.

Además de Cka, encontramos que *acaI* regula la expresión de *aop*. Aop es un factor de transcripción con homólogos en vertebrados, y se encuentra involucrado en muchos procesos durante el desarrollo. Aop actúa en la vía de ERK durante la embriogénesis, y su función es importante para la diferenciación de la epidermis (Rebay y Rubin, 1995; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b; Rogge et al., 1995). Cuando una célula se diferencia, deja de dividirse. En los mutantes de *aop*, la epidermis continúa proliferando y se estira de manera aberrante (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b). Aop también tiene un papel antagónico a la vía de JNK, ya que impide la expresión de los genes blanco de la vía. Sin embargo, esta función es inhibida directamente por JNK, que lo fosforila y lleva a degradación (Riesgo-Escovar et al., 1996; Rogge et al., 1995). Por lo tanto, *aop* juega un papel dual durante el cerrado dorsal.

Nuestros resultados muestran que en los embriones mutantes para *acaI*, muchos

genes relacionados con la síntesis de la cutícula tienen una expresión disminuida. Como la secreción de cutícula es un resultado de la diferenciación de la epidermis (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997), es sugerente que en los mutantes de *acaI* este proceso no se lleva a cabo de manera adecuada.

En resumen, se conocen varios reguladores negativos de la vía de JNK durante el cerrado dorsal: *aop* (con la función dual ya mencionada), *puckered* (*puc*), *peb* y *raw*. *aop* actúa previo al cerrado dorsal, preparando la epidermis para el cerrado dorsal (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b). La expresión de *puc* se induce por la misma vía de JNK, por lo que actúa como un modulador fino de la vía (Martín-Blanco et al., 1998). *peb* impide la activación de la vía de JNK en la amnioserosa, y lleva a cabo esta función desde la retracción de la banda germinal (Reed et al., 2001). Finalmente, *raw* actúa sólo en la epidermis lateral, impidiendo la activación de la vía de JNK fuera de las células de la hilera líder (Bates et al., 2008).

Hasta ahora, no se conocía ninguna conexión entre estos componentes, ya que todos actúan de manera diferente y en diferentes tipos celulares. Sin embargo, nuestros resultados muestran una interacción entre *raw* y *aop* que no se había descrito anteriormente. Esta interacción es mediada por *acaI*, que ejerce su función río abajo de *raw*, regulando la expresión de *aop*. Los tres genes se requieren en la epidermis lateral para regular la activación de JNK en este tejido, y de manera independiente de *puc* y de *peb*, como ya se había sugerido para *raw* (Byars et al., 1999). A la fecha, se desconoce qué mecanismo induce la activación de la vía de JNK sólo en estas células, pero el presente trabajo, además de introducir un nuevo mecanismo de regulación para la vía de JNK por un lncRNA, ayuda a entender cómo se restringe la activación de la vía de JNK a las células del borde de la epidermis durante el cerrado dorsal.

XIV. REFERENCIAS.

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.

Agostini, F., Cirillo, D., Bolognesi, B. y Tartaglia, G.G. (2013). X-inactivation: quantitative predictions of protein interactions in the Xist network. *Nucleic Acids Res* 41, e31.

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., *et al.* (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25, 25-29.

Bates, K.L., Higley, M. y Letsou, A. (2008). Raw mediates antagonism of AP-1 activity in *Drosophila*. *Genetics* 178, 1989-2002.

Batista, P.J. y Chang, H.Y. (2013). Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* 152, 1298-1307.

Bauer Huang, S.L., Saheki, Y., VanHoven, M.K., Torayama, I., Ishihara, T., Katsura, I., van der Linden, A., Sengupta, P. y Bargmann, C.I. (2007). Left-right olfactory asymmetry results from antagonistic functions of voltage-activated calcium channels and the Raw repeat protein OLRN-1 in *C. elegans*. *Neural Dev* 2, 24.

Berezikov, E., Robine, N., Samsonova, A., Westholm, J.O., Naqvi, A., Hung, J.H., Okamura, K., Dai, Q., Bortolamiol-Becet, D., Martin, R., *et al.* (2011). Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence. *Genome Res* 21, 203-215.

Bilder, D., Li, M. y Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289, 113-116.

Blake, K., Myette, G. y Jack, J. (1998). The products of ribbon and raw are necessary for proper cell shape and cellular localization of nonmuscle myosin in *Drosophila*. *Developmental biology* 203, 177-188.

Blastyak, A., Mishra, R.K., Karch, F. y Gyurkovics, H. (2006). Efficient and specific targeting of Polycomb group proteins requires cooperative interaction between Grainyhead and Pleiohomeotic. *Mol Cell Biol* 26, 1434-1444.

Bogoyevitch, M. y Kobe, B. (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 70, 1061-1095.

Boulton, T., Yancopoulos, G., Gregory, J., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J. y Cobb, M. (1990). An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science (New York, N.Y.)* 249, 64-67.

Brand, A.H. y Dormand, E.L. (1995). The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the *Drosophila* nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5, 572-578.

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

Brewster, J., de Valoir, T., Dwyer, N., Winter, E. y Gustin, M. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science (New York, N.Y.)* 259, 1760-1763.

Brown, M. y Sacks, D. (2008). Compartmentalised MAPK pathways. *Handbook of experimental pharmacology*, 205-235.

Byars, C., Bates, K. y Letsou, A. (1999). The dorsal-open group gene raw is required for restricted DJNK signaling during closure. *Development* 126, 4913-4923.

Campos-Ortega, J.A. y Hartenstein, V. (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*, 2nd edn (Berlin ; New York: Springer).

Castelli-Gair, J.E. y Garcia-Bellido, A. (1990). Interactions of Polycomb and trithorax with cis regulatory regions of Ultrabithorax during the development of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 9, 4267-4275.

Celniker, S.E., Dillon, L.A., Gerstein, M.B., Gunsalus, K.C., Henikoff, S., Karpen, G.H., Kellis, M., Lai, E.C., Lieb, J.D., MacAlpine, D.M., *et al.* (2009). Unlocking the secrets of the genome. *Nature* 459, 927-930.

Chatterjee, N. y Bohmann, D. (2012). A versatile PhiC31 based reporter system for measuring AP-1 and Nrf2 signaling in *Drosophila* and in tissue culture. *PloS one* 7, e34063.

Chen, H.W., Marinissen, M.J., Oh, S.W., Chen, X., Melnick, M., Perrimon, N., Gutkind, J.S. y Hou, S.X. (2002). CKA, a novel multidomain protein, regulates the JUN N-terminal kinase signal transduction pathway in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 22, 1792-1803.

Chou, T. y Perrimon, N. (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144, 1673-1679.

Courchesne, W., Kunisawa, R. y Thorner, J. (1989). A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S. cerevisiae*. *Cell* 58, 1107-1119.

Cuevas, B.D., Abell, A.N. y Johnson, G.L. (2007). Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene* 26, 3159-3171.

De Renzis, S., Elemento, O., Tavazoie, S. y Wieschaus, E.F. (2007). Unmasking activation of the zygotic genome using chromosomal deletions in the *Drosophila* embryo. *PLoS Biol* 5, e117.

Demerec, M. (1994). *The biology of Drosophila*, Facsim. edn (Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D., *et al.* (2012). The GENCODE v7 catalog of human

long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research* 22, 1775-1789.

Elion, E., Grisafi, P. y Fink, G. (1990). FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* 60, 649-664.

Fatica, A. y Bozzoni, I. (2014). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet* 15, 7-21.

Fernandez, R., Takahashi, F., Liu, Z., Steward, R., Stein, D. y Stanley, E. (2000). The *Drosophila* shark tyrosine kinase is required for embryonic dorsal closure. *Genes & development* 14, 604-614.

Ferres-Marco, D., Gutierrez-Garcia, I., Vallejo, D., Bolivar, J., Gutierrez-Aviño, F. y Dominguez, M. (2006). Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* 439, 430-436.

Foe, V.E. y Alberts, B.M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci* 61, 31-70.

Galcheva-Gargova, Z., Dérijard, B., Wu, I. y Davis, R. (1994). An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)* 265, 806-808.

Garlena, R., Gonda, R., Green, A., Pileggi, R. y Stronach, B. (2010). Regulation of mixed-lineage kinase activation in JNK-dependent morphogenesis. *Journal of cell science* 123, 3177-3188.

Gilbert, S.F. (2006). *Developmental biology*, 8th edn (Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc. Publishers).

Glise, B., Bourbon, H. y Noselli, S. (1995). hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* 83, 451-461.

Greenspan, R.J. (2004). Fly pushing : the theory and practice of Drosophila genetics, 2nd edn (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Grewal, S.S. (2012). Controlling animal growth and body size - does fruit fly physiology point the way? *F1000 Biol Rep* 4, 12.

Grote, P., Wittler, L., Hendrix, D., Koch, F., Wahrisch, S., Beisaw, A., Macura, K., Blass, G., Kellis, M., Werber, M., *et al.* (2013). The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev Cell* 24, 206-214.

Gummalla, M., Maeda, R.K., Castro Alvarez, J.J., Gyurkovics, H., Singari, S., Edwards, K.A., Karch, F. y Bender, W. (2012). abd-A regulation by the iab-8 noncoding RNA. *PLoS Genet* 8, e1002720.

Guttman, M., Donaghey, J., Carey, B., Garber, M., Grenier, J., Munson, G., Young, G., Lucas, A., Ach, R., Bruhn, L., *et al.* (2011). lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477, 295-300.

Haerty, W. y Ponting, C.P. (2013). Mutations within lncRNAs are effectively selected against in fruitfly but not in human. *Genome Biol* 14, R49.

Hakeda-Suzuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L. y Dickson, B. (2002). Rac function and regulation during Drosophila development. *Nature* 416, 438-442.

Harden, N. (2002). Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in Drosophila. *Differentiation; research in biological diversity* 70, 181-203.

Hardiman, K.E., Brewster, R., Khan, S.M., Deo, M. y Bodmer, R. (2002). The bereft gene, a potential target of the neural selector gene cut, contributes to bristle morphogenesis. *Genetics* 161, 231-247.

Homsy, J., Jasper, H., Peralta, X., Wu, H., Kiehart, D. y Bohmann, D. (2006). JNK signaling coordinates integrin and actin functions during *Drosophila* embryogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235, 427-434.

Hou, X., Goldstein, E. y Perrimon, N. (1997). *Drosophila* Jun relays the Jun amino-terminal kinase signal transduction pathway to the Decapentaplegic signal transduction pathway in regulating epithelial cell sheet movement. *Genes & development* 11, 1728-1737.

Ilott, N.E. y Ponting, C.P. (2013). Predicting long non-coding RNAs using RNA sequencing. *Methods* 63, 50-59.

Jasper, H., Benes, V., Schwager, C., Sauer, S., Clauder-Münster, S., Ansorge, W. y Bohmann, D. (2001). The genomic response of the *Drosophila* embryo to JNK signaling. *Developmental cell* 1, 579-586.

Jemc, J.C., Milutinovich, A.B., Weyers, J.J., Takeda, Y. y Van Doren, M. (2012). *raw* functions through JNK signaling and cadherin-based adhesion to regulate *Drosophila* gonad morphogenesis. *Dev Biol* 367, 114-125.

Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. y Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome. *Roux's Arch Dev Biol* 193, 283-295.

Karolchik, D., Barber, G.P., Casper, J., Clawson, H., Cline, M.S., Diekhans, M., Dreszer, T.R., Fujita, P.A., Guruvadoo, L., Haeussler, M., *et al.* (2013). The UCSC Genome Browser database: 2014 update. *Nucleic Acids Res.*

Karolchik, D., Barber, G.P., Casper, J., Clawson, H., Cline, M.S., Diekhans, M., Dreszer, T.R., Fujita, P.A., Guruvadoo, L., Haeussler, M., *et al.* (2014). The UCSC Genome Browser database: 2014 update. *Nucleic Acids Res* 42, D764-770.

Kiehart, D.P., Galbraith, C.G., Edwards, K.A., Rickoll, W.L. y Montague, R.A. (2000). Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*. *J Cell Biol* 149, 471-490.

Kondo, T., Plaza, S., Zanet, J., Benrabah, E., Valenti, P., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Payre, F. y Kageyama, Y. (2010). Small peptides switch the transcriptional activity of *Shavenbaby* during *Drosophila* embryogenesis. *Science* 329, 336-339.

Kong, L., Zhang, Y., Ye, Z.Q., Liu, X.Q., Zhao, S.Q., Wei, L. y Gao, G. (2007). CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic Acids Res* 35, W345-349.

Krisak, L., Strich, R., Winters, R., Hall, J., Mallory, M., Kreitzer, D., Tuan, R. y Winter, E. (1994). *SMK1*, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* 8, 2151-2161.

Krol, J., Loedige, I. y Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.

Kuan, C., Yang, D., Samanta Roy, D., Davis, R., Rakic, P. y Flavell, R. (1999). The *Jnk1* and *Jnk2* protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22, 667-676.

Lee, J., Laydon, J., McDonnell, P., Gallagher, T., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M., Heys, J. y Landvatter, S. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-746.

Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.

Li, X., Erclik, T., Bertet, C., Chen, Z., Voutev, R., Venkatesh, S., Morante, J., Celik, A. y Desplan, C. (2013). Temporal patterning of *Drosophila* medulla neuroblasts controls neural fates. *Nature* 498, 456-462.

- Lindsley, D.L. y Zimm, G.G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster* (San Diego: Academic Press).
- Manning, G., Plowman, G., Hunter, T. y Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in biochemical sciences* 27, 514-520.
- Margueron, R. y Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343-349.
- Martín-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. y Martínez-Arias, A. (1998). puckerred encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* 12, 557-570.
- Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. y Garcia-Bellido, A. (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7888-7893.
- McQuilton, P., St Pierre, S., Thurmond, J. y FlyBase, C. (2012). FlyBase 101--the basics of navigating FlyBase. *Nucleic acids research* 40, 14.
- Neumuller, R.A., Richter, C., Fischer, A., Novatchkova, M., Neumuller, K.G. y Knoblich, J.A. (2011). Genome-wide analysis of self-renewal in *Drosophila* neural stem cells by transgenic RNAi. *Cell Stem Cell* 8, 580-593.
- Nüsslein-Volhard, C. y Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Ohsako, T., Horiuchi, T., Matsuo, T., Komaya, S. y Aigaki, T. (2003). *Drosophila* lola encodes a family of BTB-transcription regulators with highly variable C-terminal domains containing zinc finger motifs. *Gene* 311, 59-69.
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. y Siomi, M.C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev* 18, 1655-1666.

- Pall, G.S. y Hamilton, A.J. (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc* 3, 1077-1084.
- Peña-Rangel, M., Rodriguez, I. y Riesgo-Escovar, J. (2002). A misexpression study examining dorsal thorax formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 160, 1035-1050.
- Ponjavic, J., Ponting, C.P. y Lunter, G. (2007). Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs. *Genome Res* 17, 556-565.
- Qi, M. y Elion, E. (2005). MAP kinase pathways. *Journal of cell science* 118, 3569-3572.
- Raman, M., Chen, W. y Cobb, M. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100-3112.
- Rebay, I. y Rubin, G. (1995). Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway. *Cell* 81, 857-866.
- Reed, B.H., Wilk, R. y Lipshitz, H.D. (2001). Downregulation of Jun kinase signaling in the amnioserosa is essential for dorsal closure of the *Drosophila* embryo. *Curr Biol* 11, 1098-1108.
- Riesgo-Escovar, J. y Hafen, E. (1997a). Common and distinct roles of DFos and DJun during *Drosophila* development. *Science (New York, N.Y.)* 278, 669-672.
- Riesgo-Escovar, J. y Hafen, E. (1997b). *Drosophila* Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor DJun during dorsal closure. *Genes & development* 11, 1717-1727.
- Riesgo-Escovar, J., Jenni, M., Fritz, A. y Hafen, E. (1996). The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes & development* 10, 2759-2768.
- Rinn, J.L. y Chang, H.Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* 81, 145-166.

- Rios-Barrera, L.D. y Riesgo-Escovar, J.R. (2013). Regulating cell morphogenesis: the *Drosophila* Jun N-terminal kinase pathway. *Genesis* 51, 147-162.
- Rogge, R., Green, P., Urano, J., Horn-Saban, S., Mlodzik, M., Shilo, B., Hartenstein, V. y Banerjee, U. (1995). The role of yan in mediating the choice between cell division and differentiation. *Development (Cambridge, England)* 121, 3947-3958.
- Rousset, R., Bono-Lauriol, S., Gettings, M., Suzanne, M., Spéder, P. y Noselli, S. (2010). The *Drosophila* serine protease homologue Scarface regulates JNK signalling in a negative-feedback loop during epithelial morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* 137, 2177-2186.
- Salamov, A.A., Nishikawa, T. y Swindells, M.B. (1998). Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. *Bioinformatics* 14, 384-390.
- Savard, J., Marques-Souza, H., Aranda, M. y Tautz, D. (2006). A segmentation gene in *tribolium* produces a polycistronic mRNA that codes for multiple conserved peptides. *Cell* 126, 559-569.
- Schwartz, Y.B. y Pirrotta, V. (2013). A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. *Nat Rev Genet* 14, 853-864.
- Sorrosal, G., Pérez, L., Herranz, H. y Milán, M. (2010). Scarface, a secreted serine protease-like protein, regulates polarized localization of laminin A at the basement membrane of the *Drosophila* embryo. *EMBO reports* 11, 373-379.
- St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 3, 176-188.
- St Pierre, S.E., Ponting, L., Stefancsik, R., McQuilton, P. y FlyBase, C. (2014). FlyBase 102--advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Res* 42, D780-788.
- Sullivan, W., Ashburner, M. y Hawley, R.S. (2000). *Drosophila protocols* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Tadros, W. y Lipshitz, H.D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136, 3033-3042.
- Tateno, M., Nishida, Y. y Adachi-Yamada, T. (2000). Regulation of JNK by Src during *Drosophila* development. *Science (New York, N.Y.)* 287, 324-327.
- Torres, L., Martín, H., García-Saez, M., Arroyo, J., Molina, M., Sánchez, M. y Nombela, C. (1991). A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Molecular microbiology* 5, 2845-2854.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D., Pimentel, H., Salzberg, S., Rinn, J. y Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* 7, 562-578.
- Turjanski, A., Vaqué, J. y Gutkind, J. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26, 3240-3253.
- UniProt, C. (2013). Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res* 41, D43-47.
- Venken, K.J. y Bellen, H.J. (2005). Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 6, 167-178.
- Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G., Jackle, H., Janning, W. y Klambt, C. (2003). FlyMove--a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet* 19, 310-311.
- Weiner, J. (1999). *Time, love, memory : a great biologist and his quest for the origins of behavior*, 1st edn (New York: Knopf).
- Wilk, R., Pickup, A.T., Hamilton, J.K., Reed, B.H. y Lipshitz, H.D. (2004). Dose-sensitive autosomal modifiers identify candidate genes for tissue autonomous and tissue nonautonomous regulation by the *Drosophila* nuclear zinc-finger protein, *hindsight*. *Genetics* 168, 281-300.

Xia, Y. y Karin, M. (2004). The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases. *Trends Cell Biol* 14, 94-101.

Xu, B., Zhou, Y., O, K., Choy, P.C., Pierce, G.N. y Siow, Y.L. (2010). Regulation of stress-associated scaffold proteins JIP1 and JIP3 on the c-Jun NH2-terminal kinase in ischemia-reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 88, 1084-1092.

Yang, D., Kuan, C., Whitmarsh, A., Rincón, M., Zheng, T., Davis, R., Rakic, P. y Flavell, R. (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389, 865-870.

Young, R.S., Marques, A.C., Tibbit, C., Haerty, W., Bassett, A.R., Liu, J.L. y Ponting, C.P. (2012). Identification and properties of 1,119 candidate lincRNA loci in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Biol Evol* 4, 427-442.

Zeitlinger, J. y Bohmann, D. (1999). Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development* 126, 3947-3956.

XV. ANEXOS.

1. Portada de revista.

Rios-Barrera, L.D. y Riesgo-Escovar, J.R. (2013), Issue Information. *Genesis*, 51.
doi: 10.1002/dvg.22113.

2. Artículo de revisión.

Rios-Barrera, L.D. y Riesgo-Escovar, J.R. (2013). Regulating cell morphogenesis: the *Drosophila* Jun N-terminal kinase pathway. *Genesis* 51, 147-162.

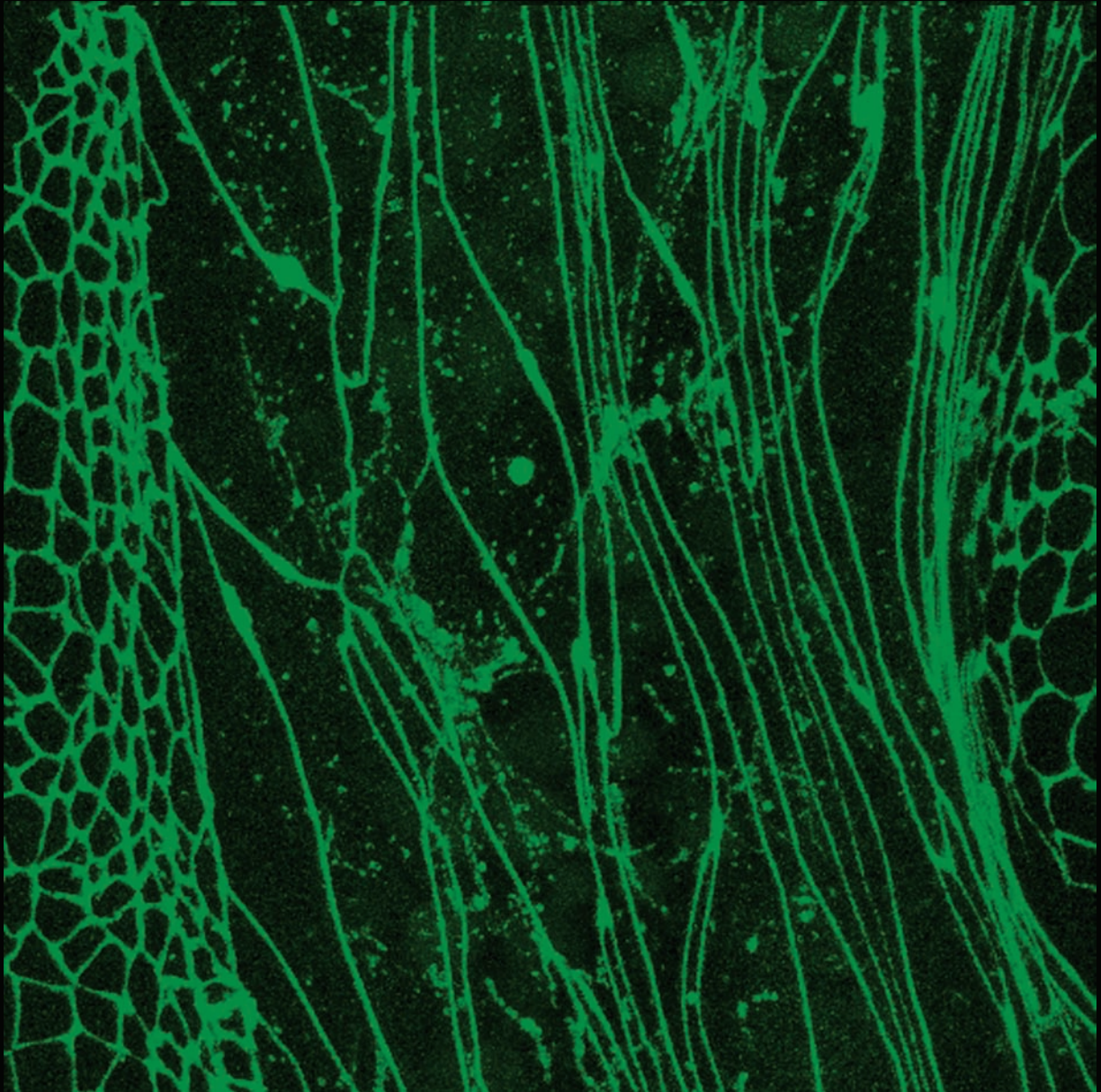
3. Artículo de investigación original.

Rios-Barrera, L.D., Gutiérrez-Pérez, I., Domínguez, M., y Riesgo-Escovar, J.R. (2015). *acaI* is a long non-coding RNA in JNK signaling in epithelial shape changes during *Drosophila* dorsal closure. *PLoS Genetics* (accepted).

march 2013

genesis

The Journal of Genetics and Development



editor sally a. moody

ISSN 1526-968X

WILEY Blackwell

Volume 51 no. 3

genesis

The Journal of Genetics and Development

Editor-in-Chief

Sally A. Moody
George Washington University
207 Ross Hall, 2300 I Street, NW
Washington
DC 20037
Tel: 202-994-2878
E-mail: samoody@gwu.edu

Associate Editors

Deborah L. Chapman
Department of Biological
Sciences
University of Pittsburgh
Room 141 Life Sciences Annex
4249 Fifth Avenue
Pittsburgh, PA 15260
Tel: 412-624-0774
Lab: 412-624-0580
Fax: 412-624-4759
E-mail: dlc7@pitt.edu

Kathryn Cheah
Department of Biochemistry
University of Hong Kong
Sassoon Rd
Hong Kong SAR
China
Tel: 852-2819-9240
Fax: 852-2855-1254
E-mail: hrmbdkc@hkusua.hku.hk

Justin Kumar
Department of Biology
Indiana University
Jordan Hall A318
1001 East Third Street
Bloomington, IN 47405
Tel: 812-856-2621
Fax: 812-856-1566
E-mail: jkumar@indiana.edu
Website: www.bio.indiana.edu/~kumarlab

José Xavier-Neto
LNBio
Campus do LNLS: Rua Giuseppe
Máximo Scolfaro, 10000
Pólo II de Alta Tecnologia
de Campinas
Campinas, SP CEP 13083-970
Brasil
Tel: +55 19 3512-1249
Fax: +55 19 3512-1004
E-mail: xavier.neto@lnbio.org.br

Valerie Reinke
Department of Genetics
Yale University School of
Medicine
PO Box 208005
233 Cedar Street
New Haven
CT 06520-8005
Tel: 203-785-5228
Fax: 203-785-6350
E-mail: valerie.reinke@yale.edu

Editorial Board

Enrique Amaya
Manchester, United Kingdom

Chris T. Amemiya
Seattle, Washington

Helena Araujo
Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Kavita Arora
Irvine, California

Thomas Becker
Camperdown, Australia

Richard Behringer
Houston, Texas

Rolf Bodmer
La Jolla, California

Véronique Borday-Birraux
Gif-sur-Yvette, France

Maja Bucan
Philadelphia, Pennsylvania

Kwang-Wook Choi
Daejeon, Korea

Bon-chu Chung
Taipei, Taiwan

Sophie Creuzet
Gif-sur-Yvette, France

Liam Dolan
Norwich, United Kingdom

Charles A. Etensohn
Pittsburgh, Pennsylvania

Peter Farlie
Parkville Victoria, Australia

Bernd Fritsch
Iowa City, Iowa

Xiang Gao
Nanjing, China

Tom Gridley
Bar Harbor, Maine

Anna-Katerina Hadjantonakis
New York, New York

Marnie E. Halpern
Baltimore, Maryland

Ian Hope
Leeds, United Kingdom

Andrew Hudson
Edinburgh, United Kingdom

Randy Johnson
Houston, Texas

Susan Kidson
Cape Town, South Africa

James Kramer
Chicago, Illinois

Tsutomu Kume
Chicago, Illinois

Michel Labouesse
Illkirch, France

Patrick Lemaire
Marseille, France

Susan Mackem
Bethesda, Maryland

Terry Magnuson
Chapel Hill, North Carolina

William Mattox
Houston, Texas

David R. McClay
Durham, North Carolina

David M. Miller, III
Nashville, Tennessee

Yuji Mishina
Ann Arbor, Michigan

Mary Mullins
Philadelphia, Pennsylvania

Andras Nagy
Toronto, Canada

Petra Pandur
Ulm, Germany

Helen Salz
Cleveland, Ohio

Yoshiki Sasai
Kobe, Japan

Nori Satoh
Uruma, Japan

Michael Scanlon
Ithaca, New York

John Schimenti
Ithaca, New York

Guojun Sheng
Kobe, Japan

Patrick Tam
Wentworthville, Australia

Gerald Thomsen
Stony Brook, New York

Christopher Wright
Nashville, Tennessee

Lyle Zimmerman
London, United Kingdom

Mario Zurita
Cuernavaca Morelos, México

Disclaimer. The Publisher and Editors cannot be held responsible for errors or any consequences arising from the use of information contained in this journal; the views and opinions expressed do not necessarily reflect those of the Publisher and Editors, neither does the publication of advertisements constitute any endorsement by the Publisher and Editors of the products advertised.

Copyright and Photocopying. Copyright © 2013 Wiley Periodicals, Inc. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored or transmitted in any form or by any means without the prior permission in writing from the copyright holder. Authorization to photocopy items for internal and personal use is granted by the copyright holder for libraries and other users registered with their local Reproduction Rights Organisation (RRO), e.g. Copyright Clearance Center (CCC), 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA (www.copyright.com), provided the appropriate fee is paid directly to the RRO. This consent does not extend to other kinds of copying such as copying for general distribution, for advertising or promotional purposes, for creating new collective works or for resale. Special requests should be addressed to: permissionsuk@wiley.com

Information for subscribers. *genesis* is published in 12 issues per year. Institutional subscription prices for 2013 are: Online: US\$3,349 (US), US\$3,349 (Rest of World), €2,163 (Europe), £1,710 (UK). Prices are exclusive of tax. Asia-Pacific GST, Canadian GST and European VAT will be applied at the appropriate rates. For more information on current tax rates, please go to www.wileyonlinelibrary.com/tax-vat. The price includes online access to the current and all online back files to January 1st 2008, where available. For other pricing options, including access information and terms and conditions, please visit www.wileyonlinelibrary.com/access.

Back issues. Single issues from current and recent volumes are available at the current single issue price from cs-journals@wiley.com. Earlier issues may be obtained from Periodicals Service Company, 11 Main Street, Germantown, NY 12526, USA. Tel: +1 518 537 4700, Fax: +1 518 537 5899, Email: psc@periodicals.com

Journal Customer Services. For ordering information, claims and any enquiry concerning your journal subscription please go to www.wileycustomerhelp.com/ask or contact your nearest office.

Americas: Email: cs-journals@wiley.com; Tel: +1 781 388 8598 or +1 800 835 6770 (toll free in the USA & Canada).

Europe, Middle East and Africa: Email: cs-journals@wiley.com; Tel: +44 (0) 1865 778315.

Asia Pacific: Email: cs-journals@wiley.com; Tel: +65 6511 8000.

Japan: For Japanese speaking support, Email: cs-japan@wiley.com; Tel: +65 6511 8010 or Tel (toll-free): 005 316 50 480.

Visit our Online Customer Get-Help available in 6 languages at www.wileycustomerhelp.com

Access to this journal is available free online within institutions in the developing world through the AGORA initiative with the FAO, the HINARI initiative with the WHO and the OARE initiative with UNEP. For information, visit www.aginternetwork.org, www.healthinternetwork.org, www.oaresciences.org

Wiley's Corporate Citizenship initiative seeks to address the environmental, social, economic, and ethical challenges faced in our business and which are important to our diverse stakeholder groups. Since launching the initiative, we have focused on sharing our content with those in need, enhancing community philanthropy, reducing our carbon impact, creating global guidelines and best practices for paper use, establishing a vendor code of ethics, and engaging our colleagues and other stakeholders in our efforts.

Follow our progress at www.wiley.com/go/citizenship

Aims and Scope. As of January 2000, *Developmental Genetics* was renamed and relaunched as *genesis: The Journal of Genetics and Development*, with a new scope and Editorial Board. The journal focuses on work that addresses the genetics of development and the fundamental mechanisms of embryological processes in animals and plants. With increased awareness of the interplay between genetics and evolutionary change, particularly during developmental processes, we encourage submission of manuscripts from all ecological niches. The expanded numbers of genomes for which sequencing is being completed will facilitate genetic and genomic examination of developmental issues, even if the model system does not fit the "classical genetic" mold. Therefore, we encourage submission of manuscripts from all species. Other areas of particular interest include: 1) the roles of epigenetics, microRNAs and environment on developmental processes; 2) genome-wide studies; 3) novel imaging techniques for the study of gene expression and cellular function; 4) comparative genetics and genomics and 5) animal models of human genetic and developmental disorders.

genesis presents reviews, full research articles, short research letters, and state-of-the-art technology reports that promote an understanding of the function of genes and the roles they play in complex developmental processes.

genesis accepts articles for Open Access publication. Please visit <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html> for further information about OnlineOpen.

Cover illustration: The figure illustrates the extreme changes in cell shape that amnioserosal cells undergo during germ band extension in the developing *Drosophila melanogaster* embryo. Amnioserosal cells (middle) are stretched in an anterior-posterior direction, whilst lateral epidermal cells (left and right sides) are cuboidal prior to the dorsal closure process. The image is a projection of confocal planes of a living embryo expressing cadherin::GFP.

ISSN 1526-968X (Online)

REVIEW

Regulating Cell Morphogenesis: The *Drosophila* Jun N-Terminal Kinase Pathway

Luis Daniel Ríos-Barrera and Juan Rafael Riesgo-Escovar*

Developmental Neurobiology and Neurophysiology Department, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla #3001, Querétaro, Querétaro, México, c.p. 76230

Received 2 September 2012; Revised 14 October 2012; Accepted 19 October 2012

Summary: The Jun-N-terminal Kinase pathway (JNK), known also as stress activated protein kinase pathway (SAPK), is an eukaryotic evolutionarily conserved signaling pathway. From a purported evolutionarily “ancient” function as stress mediator, it evolved in multicellular eukaryotes to permanent roles in development, without leaving its original function. In *Drosophila melanogaster*, it is required for follicle cell morphogenesis, embryonic dorsal closure, pupal thoracic closure and genital disc rotation closure, all processes with requisite cell shape changes. Besides, it is activated during wound healing and in response to stress (UV irradiation, oxidative stress) where it may signal cell death or proliferation. Despite these varied roles, it has a conserved core of molecules that follow the MAPKKK/MAPKK/MAPK logic of mitogen activated protein kinases pathways. Regulation of the JNK pathway appears majorly negative, with phosphatases, transcription factors and proteins of novel structure “holding back” on JNK activation in different tissues. This particular mode of regulation may hark back to the pathway’s origin as stress detector and responder, implying readiness to respond, from which the developmental roles may have evolved as conditions demanding obligate and predicted stress responses (i.e., embryonic dorsal closure viewed as a “wound of development”). *genesis* 51:147–162, 2013. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: dorsal closure; wound healing; cell shape change; signal regulation

occurs during embryonic development. Embryonic development depends on gene expression, local environment, and cell and tissue behavior. For this task, cells rely on signaling pathways that coordinate extracellular with intracellular events, and allow communication between cells. Throughout the life cycle of an organism, and irrespective of whether change is effected in response to endogenous or exogenous stimuli, cells must react properly to maintain homeostasis and acquire final morphology and function. Among key molecules that link extracellular signals to modified gene expression and intracellular changes are members of the mitogen activated protein kinases (MAPKs) signaling pathways. These pathways use protein phosphorylation to convey signals intracellularly. MAPK pathways also have important roles in adult metazoan physiology, besides development [reviewed in Qi and Elion (2005), Raman *et al.* (2007), and Turjanski *et al.* (2007)].

Early experiments in the 70s in the last century helped establish protein phosphorylation as one of the major signaling currencies of cells. Since then, the search has been on to identify, isolate and characterize protein kinases and their flip-sides, protein phosphatases. Properties like membrane attachment, kinase domain, and substrate specificity were used to subdivide kinases into different classes and families (Hanks and

INTRODUCTION

MAPK Signaling

Cell-cell interactions are critical for multicellularity. They have also shaped its evolution. Perhaps the best example of unrestricted cell-cell communication

* Correspondence to: Juan Rafael Riesgo-Escovar, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla #3001, Querétaro, Querétaro, México, c.p. 76230.

E-mail: juanriesgo@prodigy.net.mx

Contract grant sponsor: CONACYT, Contract grant number: #81864; Contract grant sponsor: PAPIIT, Contract grant number: #IN203110; Contract grant sponsor: UNAM.

Published online 29 October 2012 in

Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/dvg.22354

Hunter, 1995; Manning *et al.*, 2002). Protein phosphatase groups were separated in a similar vein. With the advent of complete genomes, the kinome, or the complete set of protein kinases and phosphatases present in a genome were compiled and annotated. MAPKs and their corresponding phosphatases were found to constitute a large group of related, evolutionarily conserved enzymes (Hunter, 1995; Alonso *et al.*, 2004; Johnson and Hunter, 2005).

MAPKs have been found in all eukaryotic cells studied. In the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), for example, there are five main MAPK pathways: the pheromone, cell-wall integrity, spore-wall assembly, filamentous/invasive behavior, and high osmolarity and stress pathways (Courchesne *et al.*, 1989; Elion *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 1991; Brewster *et al.*, 1993; Krisak *et al.*, 1994). However, classically, the MAPK superfamily has been subdivided into three principal groups: the extracellular regulated kinase (ERK) group, named after the first MAPK cloned (Rossomando *et al.*, 1989; Boulton *et al.*, 1990), the p38 group, and the Jun-N-terminal Kinase (JNK) group (Galcheva-Gargova *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994). Eukaryotes ranging from unicellular organisms to mammals variously possess members of these groups. Besides having all different types of MAPKs, vertebrates usually have multiple members of any one pathway: for example, they have two partially redundant ERKs, p42 and p44, and also three partially redundant JNK genes (Kallunki *et al.*, 1994; Kuan *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1997).

These pathways, centered upon a tiered-stage of three sequential phosphorylations, are conserved both structurally and functionally. The core MAPK module encompasses three kinases: a MAPKKK (or MAPK kinase kinase), a ser/thr kinase that phosphorylates and activates a MAPKK (or MAPK kinase), which is a dual-specificity kinase, phosphorylating a TXY motif in the target requisite MAPK, and the MAPK proper, a ser/thr kinase whose nuclear and cytoplasmic targets are normally transcription factors, but include cytoskeleton-associated proteins and other kinases as well. Each of these module kinases and the cascades they take part in, have specific spatial and temporal regulators that are usually conserved. Once activated, MAPKs command a pivotal role in signaling, leading to cellular change and modification of gene expression. The evolutionary success of this type of pathways is borne out by the wide number of processes they coordinate, like cellular differentiation, proliferation, apoptosis, stress responses, and morphogenesis (Widmann *et al.*, 1999; Bogoyevitch and Kobe, 2006; Raman *et al.*, 2007; Brown and Sacks, 2008). This kind of regulation allows for specific and immediate changes in the activity of the module.

In the fruit fly *Drosophila melanogaster*, the three main MAPK pathways are well represented, with little or no redundancy. The wide variety of genetic tools available to perform forward and reverse genetics, and

“whole organism” approaches, allow for detailed and sophisticated studies. In this model organism, the JNK pathway has been the focus of studies in the past 15 years, after JNKK, coded by the *hemipterous* (*hep*) locus and JNK, coded by *basket* (*bsk*), were isolated and characterized within a short time-span (Glise *et al.*, 1995; Riesgo-Escovar *et al.*, 1996; Sluss *et al.*, 1996; Kockel *et al.*, 1997). Part of the success of the field can be ascribed to the relative ease with which mutations in genes of the pathway can be recovered. The Nüsslein-Volhard/Wieschaus screens identified a class of embryonic lethal lines with cuticles bearing dorsal holes, the “dorsal open” phenotype (Jürgens *et al.*, 1984; Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984). Subsequent cloning and characterization by several groups of some of these dorsal open lines yielded mutations in JNK pathway genes (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996; Sluss *et al.*, 1996; Glise and Noselli, 1997; Hou *et al.*, 1997; Riesgo-Escovar and Hafen, 1997a, b; Byars *et al.*, 1999). Thus, a paradigm was established for JNK signaling elements: mutations in them have dorsal holes in the embryonic cuticle, a lethal or semi-lethal condition, delineated as the “canonical” JNK signaling pathway (Lesch *et al.*, 2010). This review is focused on the regulation of the JNK signaling pathway in *Drosophila* development, and in the forthcoming, “Bsk” will refer to the *Drosophila* JNK homolog, whereas “JNK” will refer to the JNK pathway as a whole. Besides JNK pathway genes, mutants for the Dpp and Rho/Rock kinase signaling pathways, together with cytoskeleton components, are unable to complete closure and also die during embryogenesis with the dorsal open characteristic defect (Fig. 1; Affolter *et al.*, 1994; Simin *et al.*, 1998; Harden *et al.*, 1999; Halsell *et al.*, 2000; Mizuno *et al.*, 2002).

JNK IN DEVELOPMENT

Cell Elongation Requires Basket Signaling

Development recurrently relies on changes in cell shape, and some, like cell elongation, are regulated by Bsk signaling, a JNK evolutionarily conserved function. In flies embryonic dorsal closure, follicle cell morphogenesis, thorax closure and male genitalia disc rotation/closure during metamorphosis require Bsk activation (Agnès *et al.*, 1999; Martín-Blanco *et al.*, 2000; Dobens *et al.*, 2001; Macías *et al.*, 2004; Rousset *et al.*, 2010). Wound healing recapitulates these developmental processes in a regenerative environment (Wood *et al.*, 2002). Ventral closure, in *Caenorhabditis elegans*, and hindbrain closure in vertebrates, together with vertebrate wound healing, use the JNK pathway [for reviews see, Martin and Parkhurst (2004), Belacortu and Paricio (2011), Gorfinkiel *et al.* (2011)]. Hypomorphic alleles and partial disruption of Bsk signaling may survive embryogenesis but bear defects in thorax or male genitalia closure: non-sutured thoraces are known as split-

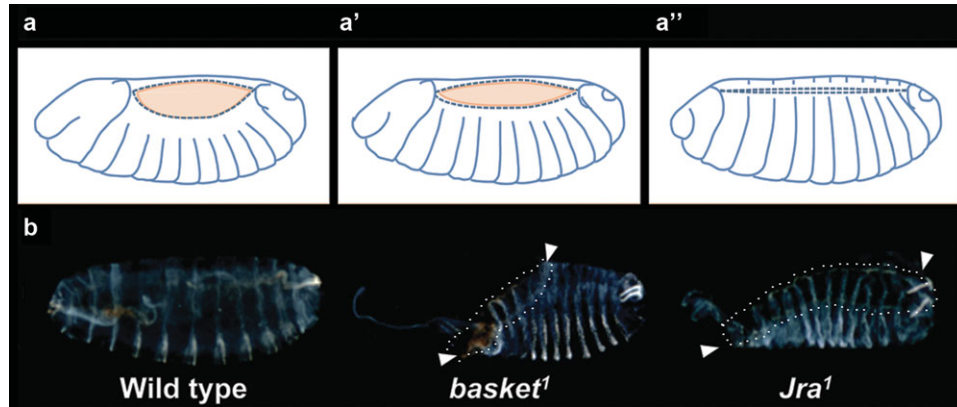


FIG. 1. Embryonic dorsal closure in *D. melanogaster*, and embryonic phenotypes of Basket signaling mutants. (a–a'') During dorsal closure, the lateral epithelium (white) stretches over the amnioserosal cells (pink), guided by the LE cells, the top most row of lateral epithelial cells (dotted lines). (a) Initiation phase. (a') Propagation phase. (a''). Suturing phase. In all panels, lateral views are shown, with anterior to the left and dorsal up. (b) A wild type first instar larva at the end of embryonic development is completely surrounded by cuticle (left). In *basket* partial loss of function mutants, dorsal closure does not occur fully and an antero-dorsal hole is seen in the cuticle (middle panel; extent of dorsal hole in this and *Jra* mutant, right, marked by arrowheads and dotted white lines). This phenotype is also seen in mutants for other members of the pathway, such as *Jra*¹ (right panel). In this last, the mutant phenotype is more extreme, as the dorsal hole occupies the complete dorsal aspect of the cuticle, whereas the *basket* mutant cuticle showcases a hypomorphic condition, where some degree of closure (in the dorsal posterior aspect) is accrued.

thorax phenotypes (Glise *et al.*, 1995; Zeitlinger and Bohmann, 1999; Rousset *et al.*, 2010). Genetic screens for modifiers of these and other phenotypes have identified genes participating in Basket signaling (Wilk *et al.*, 2004). Finally, gain-of-function and over-expression in dorsal thoracic cells may result in split-thorax phenotypes. Screens designed for these conditions have also been successfully conducted and extrapolated to embryonic dorsal closure (Peña-Rangel *et al.*, 2002). Overall, these screens have contributed to a better understanding of the pathway.

Embryonic Dorsal Closure

The process of dorsal closure has been richly described in the literature due to its experimental amenability and ease identifying participating genes. Occurring first, but mechanistically similar to thoracic and genitalia closure and wound healing, dorsal closure is the most studied process, being the last major morphogenetic rearrangement of embryogenesis, at stages 12–15. Dorsal closure is the dorsal enveloping of the embryo by the stretching cells of the lateral epithelium. Prior to that, germ band retraction posits the epidermis in the ventral and lateral regions of the embryo, leaving the amnioserosa as the sole, but transient, dorsal ectodermal cover (Fig. 1; Campos-Ortega and Hartenstein, 1997).

In embryos, both the amnioserosa and the lateral epidermis are ectodermal derivatives induced and specified by an anti-neural signal: the Decapentaplegic (Dpp, *Drosophila* BMP2/4 homolog) morphogen earlier in development. The amnioserosa, marked by expression of *zerknüllt* (*zen*), and related to angiotensin converting

enzyme (*race*), forms at the highest level of Dpp activity, whereas the lateral epidermis requires lower levels of Dpp function. Neural precursors and ventral epidermis are specified in the absence of this morphogen (Rushlow *et al.*, 1987; Tatei *et al.*, 1995; Stronach and Perrimon, 2001).

The amnioserosa is an extraembryonic tissue, and suffers histolysis in several forms: anoikis, autophagy, and apoptosis (Reed *et al.*, 2004; Toyama *et al.*, 2008; Teng and Toyama, 2011; Cormier *et al.*, 2012). For the lateral epidermis to completely surround the embryo, the two sets of lateral epidermal sheets must change shape and stretch over the amnioserosa toward the dorsal midline, and finally form a scarless continuum. This process has been divided in three phases. During the initiation phase, only the dorsal-most row of cells, the leading edge (LE) cells, elongate dorso-ventrally and project filipodia towards the dorsal side of the embryo. These cells also act as a signaling center for the epithelium as a whole, releasing the Dpp morphogen to instruct ventral epithelial cells. Later on, in the propagation phase, the remainder lateral epithelial cells elongate and a supracellular actin cable is formed apically in LE cells. Finally, in the suture phase, filopodia from opposing lateral epithelial cells reach across and contact each other, and adhesion molecules bridge both epidermal sheets together to seal the embryo (Harden, 2002).

Originally, it was proposed that stretching lateral epithelial cells contributed the majority of the force for closure, in what was termed a “purse-string” model (Kiehart *et al.*, 2000); however, laser ablation studies in LE cells showed that closure would still happen in the absence of contiguity of the actin supracellular cable,

and also of LE cells (Jacinto *et al.*, 2002). Data from in vivo microscopy analyses, laser ablation experiments and biophysical modeling led to the formulation of alternative hypotheses where amnioserosa cells, pulsing rhythmically and periodically, generated also part of the force needed for closure (Solon *et al.*, 2009; Blanchard *et al.*, 2010). However, recent results show that interfering with amnioserosa contraction by inhibiting endosomal trafficking only delays dorsal closure, but certainly does not abrogate it (Mateus *et al.*, 2011). Finally, the small percentage of amnioserosal cell delamination and death from the epithelium was also thought to generate forces for closure (Reed *et al.*, 2004; Toyama *et al.*, 2008). Subsequent quantitation of the phenomenon and, again, laser ablation studies showed that closure indeed would still happen in perturbed amnioserosal cell delamination and autophagy (Muliyl *et al.*, 2011; Cormier *et al.*, 2012). Several reviews and papers have been written proposing alternative models to account for closure. Currently, a mix of LE cells apical supracellular actin cable contraction, reduced amnioserosal cells' apical surface, and occasional amnioserosal cell loss are thought to cooperate to achieve closure. These forces are also helped in later stages by LE cells' filipodia and adhesion molecules contributing to alignment and zippering of the epidermis (Peralta *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2011; Gorfinkiel *et al.*, 2011; Guevorkian *et al.*, 2011; Sokolow *et al.*, 2012). In the abdomen, "mixer cells," anterior compartment LE cells that switch to posterior compartment identity, and LE intercalating cells moving from the row of cells immediately ventral to the LE, are thought to contribute tension relaxation during dorsal closure, allowing proper LE alignment and suture (Gettings *et al.*, 2010).

However, despite this multitude of forces acting during closure, the signaling center responsible for coordinating these events are the LE cells. Bsk is only activated in this row of cells, and from there orchestrates behavior in amnioserosa and epidermis. The instructions sent forth by Bsk are mainly conducted through Dpp secretion from LE cells. Dpp acts ventral to the LE cells and in the amnioserosa (Glise and Noselli, 1997; Hou *et al.*, 1997; Riesgo-Escovar and Hafen, 1997b; García-Fernández *et al.*, 2007). Integrins, profilin, and Puckered (Puc), a phosphatase, among other Bsk responsive genes, are expressed and mediate closure (Glise *et al.*, 1995; Martín-Blanco *et al.*, 1998; Jasper *et al.*, 2001; Homsey *et al.*, 2006). The most extensive study of Bsk immediate early and responsive genes was a SAGE experiment, where not only some of the aforementioned were identified but also genes required for stress responses (Jasper *et al.*, 2001); however, other approaches for identifying target genes have further contributed to delineate JNK signaling effectors (Thomas *et al.*, 2009; Rousset *et al.*, 2010).

The JNK pathway roles in development may have come about from earlier roles in stress signaling. In fruit

flies, though, the JNK role in development has been studied most thoroughly and is better known; hence, following earlier use in fly literature (Lesch *et al.*, 2010), the term "canonical" here is used to describe pathway components activated during development, especially embryonic dorsal closure. This distinction is clearly not absolute, as many "canonical" pathway components are also activated in JNK responses to stress; nevertheless, the division provides a useful, albeit somewhat artificial, separation. This division allows separate discussion and characterization of pathway components required during development from those involved in stress responses, highlighting shared and non-shared genes. The JNK developmental roles have been the focus of new series of studies, aimed at understanding at greater depth the pathway itself, and how signaling is regulated.

The JNK "Canonical" Signaling Pathway

Neither extracellular molecules nor membrane receptors leading to Bsk activation during dorsal closure have been identified. The most upstream acting molecules identified for Bsk signaling during dorsal closure are non-receptor tyrosine kinases of the Src family: Src42A, Src64B, and Btk29A (also known as Tec29; Fig. 2 and Table 1). Single loss of function mutations in these genes do not show a dorsal open phenotype, but combinations of double mutants have dorsal closure defects, suggesting redundancy between them. Overexpression of Src42A in the wing disc results in ectopic Basket activation monitored with *puc-lacZ* expression (Tateno *et al.*, 2000).

Another nonreceptor tyrosine kinase involved in Bsk signaling activation is Shark. Removing the maternal contribution of *shark* ends up in defective closure (Fernandez *et al.*, 2000). Shark possesses SH2 domains, and in modified yeast two-hybrid assays, where tyrosine phosphorylation is favored by Src expression, Shark interacts with the Dok adapter protein. *Dok* mutants have dorsal closure defects; however, expression of constitutively active Src42A does not rescue *Dok* loss of function. Shark overexpression does rescue *Dok* mutants. Thus, a model has been proposed, where Src42A phosphorylates Dok; then, Dok recruits Shark and activates it (Biswas *et al.*, 2006). How these kinases relay the signal to downstream components is still not well understood.

Rho family G proteins, Rac (Rac1, Rac2, and Mtl) and Cdc42, are required to complete dorsal closure because triple *Rac* or single *Cdc42* mutants or dominant negative *Cdc42* expression have dorsal open phenotypes (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996; Harden *et al.*, 1999; Hakeda-Suzuki *et al.*, 2002). However, participation of Cdc42 is downstream of Bsk, since *Cdc42* mutants express Basket targets at the LE cells, whereas Rac proteins mediate the activation of the MAPK module (Ricos *et al.*, 1999; Genova *et al.*, 2000). Since *Rac2*, *mtl* dou-

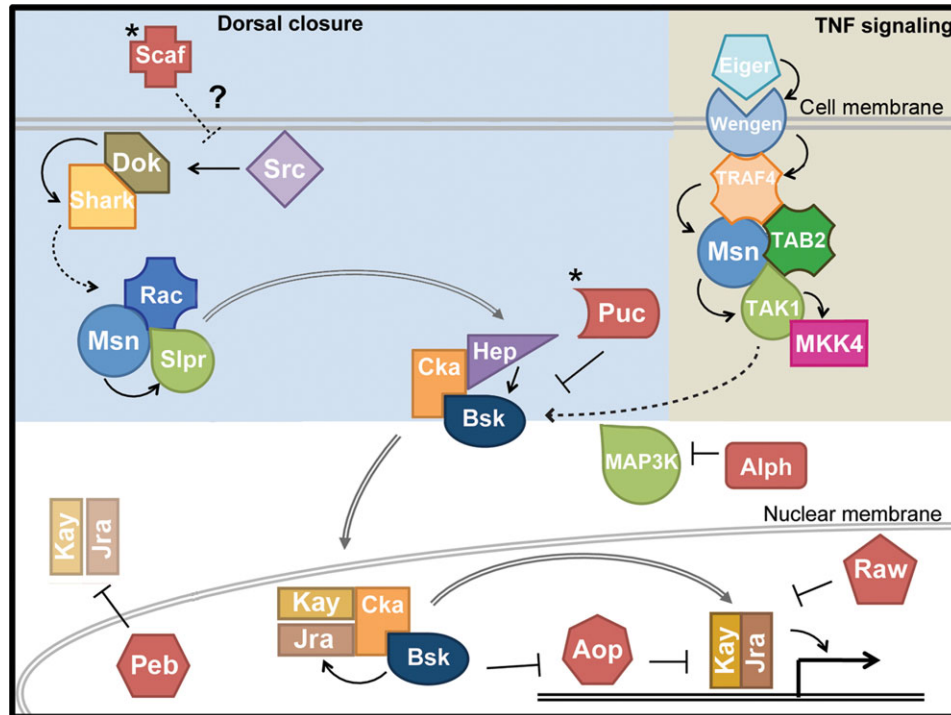


FIG. 2. The *Drosophila* JNK signaling pathway and its negative regulators. Shaded in different colors are pathways proposed to lead to Basket activation. Left, the molecules involved in Basket signaling during dorsal closure. Right, signaling induced by Eiger/TNF. Asterisks mark elements transcriptionally induced by Basket signaling. Negative regulators are presented in red. Abbreviations used: Alph, Alphabet; Aop, Anterior open; Bsk, Basket; Cka, Connector of kinase to AP-1; Dok, Downstream of kinase; Hep, Hemipterous; Jra, Jun related antigen; Kay, Kayak; MAP3K collectively refers to both Slipper and Tak1; MKK4, Mitogen-activated protein kinase kinase 4; Msn, Misshapen; Peb, Pebbled; Puc, Puckered; Rac refers collectively to Rac1, Rac2, and Mtl; Scaf, Scarface; Shark, SH2 domain ankyrin repeat kinase; Slpr, Slipper; Src collectively refers to Src42A, Btk29A, and Src64B; TAB2, TAK1-binding protein 2; TAK1, Transforming growth factor β -activated kinase 1; TRAF4, TNF-associated factor 4.

ble mutants are viable and fertile, it would seem that Rac1 is the main activator of Basket signaling.

Slipper (Slpr), a MAP3K of the MLK (Mixed Lineage Kinase) family, interacts physically with Rac1 and with Misshapen (Msn), a MAP4K of the Ste20 (Sterile-20) family, in GST pull down assays *in vitro*. Slpr interacts with the C-terminus of Msn via a central region encompassing the leucine zipper, linker, and CRIB domains of Slpr, and with Rac via the CRIB domain (Garlena *et al.*, 2010). Mutations in both kinases, Slpr and Msn, have a “dorsal open” phenotype (Su *et al.*, 2000; Stronach and Perrimon, 2002). Originally, *msn* mutations were isolated in a screen for suppressors of eye malformations due to the *Glass* mutation. *msn* flies show defects in photoreceptor cells shape in the compound eye. It was subsequently found that null alleles are embryonic lethal with dorsal closure defects (Su *et al.*, 1998). *slpr* mutants were isolated from a screen for maternal effect genes (Perrimon *et al.*, 1989; Chou and Perrimon, 1996). Apart from defective dorsal closure, *slpr* mutants have also thorax closure and male genitalia rotation defects (Stronach and Perrimon, 2002; Polaski *et al.*, 2006). Slpr appears to require both Rac1 and Msn for

activation; because Rac1, Rac2, and Mtl are genetically redundant, the interaction with Slpr may be similar for all three (Garlena *et al.*, 2010). It is thought that Msn phosphorylates Slpr, thus activating it. Hep, a dual specificity kinase, is then the phosphorylation target of activated Slpr, a serine threonine kinase.

Hep is well established as the mediator between MAP3Ks and Bsk activation, and it was the first element of the pathway shown to participate in dorsal closure (Glise *et al.*, 1995). Hep is a MAP2K homologous to mammalian MKK7. Epistasis experiments have placed *hep* downstream of *Rac1* during dorsal closure; not surprisingly, *hep* mutant embryos do not express Bsk responsive genes. Hep phosphorylates Basket in a TPY motif, activating it. *hep*¹ mutants are hypomorphic, and thus, viable, presenting, with low penetrance, a lack of one wing eversion. This has been used extensively to address genetic interaction experiments (Zeitlinger and Bohmann, 1999; Martín-Blanco *et al.*, 2000).

bsk, the fly JNK homolog, is an embryonic lethal locus, like *hep*, with the requisite failure of embryonic dorsal closure (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996; Sluss *et al.*, 1996). The first mutant alleles were isolated by Wie-

Table 1
Genes in the *Drosophila* JNK Signaling Pathway

Gene name/symbol	Molecular function	DC	MC	SR
<i>alphabet/alph</i>	Protein phosphatase 2C	X	X	X
<i>anterior open/aop (yan)</i>	Transcriptional repressor	X		
<i>basket/bsk</i>	Jun N-terminal kinase (JNK) homolog	X	X	X
<i>Btk family kinase at 29A/Btk29A (Tec29)</i>	Cytoplasmic protein tyrosine kinase	X		
<i>Cdc42</i>	Rho family G protein	X	X	X
<i>Connector of kinase to AP-1/Cka</i>	Scaffold protein	X	X	
<i>decapentaplegic/dpp</i>	Transforming growth factor- β (TGF β) family ligand	X	X	X
<i>Protein kinase at 92B/Pk92B (DASK1)</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K)			X
<i>cylindromatosis/CYLD</i>	Deubiquitinating enzyme			X
<i>Downstream of kinase / Dok</i>	Adaptor protein	X	X	
<i>eiger/egr</i>	Tumor necrosis factor (TNF) family ligand			X
<i>hemipterous/hep</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K)	X	X	X
<i>pebbled/peb (hnt)</i>	Transcription factor	X		
<i>Jun-related antigen/Jra (DJun)</i>	Transcription factor	X	X	X
<i>kayak/kay (DFos)</i>	Transcription factor	X	X	X
<i>MAP kinase kinase 4/Mkk4</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K)			X
<i>Mig-2-like/Mtl</i>	Rho family G protein	X		
<i>misshapen/msn</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP4K)	X	X	X
<i>puckered/puc</i>	Dual specificity JNK phosphatase	X	X	X
<i>Rac1</i>	Rho family G protein	X	X	X
<i>Rac2</i>	Rho family G protein	X		
<i>raw</i>	Novel gene product	X		
<i>ribbon/rib</i>	Transcription factor	X		
<i>scarface/scaf</i>	Serine-protease homolog	X	X	
<i>SH2 ankyrin repeat kinase/shark</i>	Cytoplasmic protein tyrosine kinase	X	X	
<i>slipper/slpr</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K)	X	X	X
<i>Src oncogene at 42A / Src42A</i>	Cytoplasmic protein tyrosine kinase	X	X	
<i>Src oncogene at 64B/Src64B</i>	Cytoplasmic protein tyrosine kinase	X		
<i>TAK1-associated binding protein 2/Tab2</i>	Adaptor protein			X
<i>TGFβ-activated kinase 1/Tak1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K)			X
<i>TNF-receptor-associated factor 4/Traf4 (DTRAF1)</i>	TNF receptor adaptor			X
<i>wengen/wgn</i>	TNF receptor family member			X

Genes with synonyms in common use are added in parenthesis after the abbreviations. DC signifies involvement in dorsal closure; MC signifies involvement in developmental closures during metamorphosis (i.e., thoracic closure and genital disc rotation and closure); SR signifies involvement in stress responses including wound healing.

schau, Nüsslein-Volhard, and coworkers in the famous genetic screens for embryonic lethals (Jürgens *et al.*, 1984; Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984). Activated Bsk participates in embryonic dorsal closure, thoracic closure, and genital disc rotation and closure during development, but is dispensable for eye and wing development during metamorphosis [(Riesgo-Escovar *et al.* 1996), Riesgo-Escovar *et al.*, unpublished data].

Activated Bsk phosphorylates the Jra (DJun) transcription factor, the sole fly mammalian c-Jun homolog, in serine and threonine residues at its N-termini. This phosphorylation triggers Jra association with Kayak (Kay, DFos) to form the AP-1 complex. Both Jra and Kay are leucine zipper containing transcription factors (Bogoyevitch and Kobe, 2006). Unlike their vertebrate homologues, fly Jra and Kay can form homodimers in vitro besides the well-characterized AP-1 complex, and may form other types of complexes [(Perkins *et al.*, 1988) Riesgo-Escovar *et al.*, unpublished observations].

As mentioned above, both Jra and Kay mutants were originally isolated in the Nüsslein-Volhard *et al.* screens, and both are embryonic lethal with a dorsal open phenotype; *kay* has a maternal contribution and is also required for other embryonic processes, like oogenesis and endoderm specification (Riesgo-Escovar and Hafen, 1997a; Souid and Yanicostas, 2003).

An important regulator at this level of the pathway is Cka (Connector of Kinase to AP-1). Mutations in the *Cka* gene were identified in a screen for maternal effect mutations (Perrimon *et al.*, 1996). Zygotic mutants for *Cka* die as pupae, but lack of maternal transcripts results in embryonic lethality with a “dorsal open” phenotype (Chen *et al.*, 2002). Cka is a scaffold molecule thought to form a complex with Hep, Bsk, and Jra/Kay. How this occurs is not clear, since Hep resides in the cytoplasm whereas normally Jra resides in the nucleus, and Kay shuttles back and forth between the cytoplasm and the nucleus (Kockel *et al.*, 1997; Zeitlinger and Boh-

mann, 1999) as is postulated to occur with Bsk as well. Cka does seem to act as a scaffold from Hep to AP-1, though, as no physical interaction has been shown with other pathway molecules.

Transcriptional targets of AP-1 have been identified during dorsal closure using SAGE, microarrays, and genetic interactions and screens (Jürgens *et al.*, 1984; Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984; Perrimon *et al.*, 1989; Su *et al.*, 1998; Jasper *et al.*, 2001; Peña-Rangel *et al.*, 2002; Wilk *et al.*, 2004; Rousset *et al.*, 2010). Chief among the targets is Dpp, that signals to the amnioserosa and the lateral epidermis to induce cell shape changes (García-Fernández *et al.*, 2007; Wada *et al.*, 2007). Secreted Dpp from the LE is thought to generate a morphogen gradient ventral to the LE, inducing cell shape change, and thus, conveying the elongation message to the whole lateral epithelium (Glise and Noselli, 1997; Hou *et al.*, 1997; Riesgo-Escovar and Hafen, 1997b). Members of the Dpp signaling pathway also have dorsal open phenotypes, like the Dpp receptors Thick Veins (Tkv) and Punt (Affolter *et al.*, 1994; Simin *et al.*, 1998).

The Puckered (Puc) protein, a dual specificity phosphatase, is an immediate early gene that turns off the activity of the pathway by dephosphorylating Bsk (Martín-Blanco *et al.*, 1998). The expression of Dpp and Puc, whether by *in situ* hybridization or by enhancer trap *lacZ* alleles, has been widely used as readouts of Bsk activity in different genetic backgrounds. Bsk signaling also activates expression of Chickadee, the fly homolog of vertebrate profilins (Jasper *et al.*, 2001). As profilin is a well-known regulator of the actin cytoskeleton, its expression points to the immediacy of Bsk control of cell shape changes. Other Bsk targets include cytoskeletal genes, like integrins, matrix metalloproteinases, and stress-related proteins (Wang *et al.*, 2003; Homsy *et al.*, 2006; Stevens and Page-McCaw, 2012).

REGULATING THE JNK PATHWAY

Positive and Negative Regulators

Control of JNK signaling during development is a multilevel process, requiring spatial, temporal, and linear restrictions. Dorsal closure is a process where multiple cell types and tissues participate, facilitating study of spatial restrictions for Bsk activity. Contrary to some of the “positive” elements of the pathway, that show JNK-regulated processes “exclusivity,” like Jra or Hep, many JNK negative regulators also function in other processes and/or are shared with other signaling pathways. This may account for relative difficulties in establishing rigorous proof of JNK-associated function.

From a mis-expression screen centered on thoracic closure, several components of chromatin remodeling complexes were found to alter it (Peña-Rangel *et al.*, 2002). Recently, three chromatin regulatory genes were

characterized that might affect JNK pathway transcriptional regulation, the Nf-Y complex (A, B, and C) (Yoshioka *et al.*, 2008), Dref (Yoshioka *et al.*, 2012), and the XNP helicase (known as ATRX) (Valadez-Graham *et al.*, 2012).

The best characterized elements are straightforward inhibitors that directly antagonize the pathway. This is the case for Puc, a dual-specificity phosphatase of the VH1 group induced by Bsk, that catalyzes dephosphorylation of Bsk itself (Martín-Blanco *et al.*, 1998). Puc acts once the pathway is activated, modulating its strength, by removing both phosphates from the Bsk TPY activation motif, and as such Puc expression and participation in Bsk signaling is generally thought to depend on the level of activation of the pathway. Mutations in *puc* lead to a puckering of the epidermis toward the dorsal midline, implying that both loss of function and ectopic activation of the JNK pathway coalesce to a more or less common phenotype of abnormal dorsal closure. Examples of over activation of the pathway leading to abnormal closures akin to loss of function phenotypes include gain of function screens where *dpp* over-expression leads to a thoracic cleft phenotype (Peña-Rangel *et al.*, 2002), and loss of function of negative regulators, like *puc* and *raw*, that give rise to dorsal holes in the cuticle (Martín-Blanco *et al.*, 1998; Byars *et al.*, 1999). The Puc negative feedback loop is not only employed during follicle cell morphogenesis, dorsal and thoracic closures; *puc* is also expressed in stress responses and other models (Karkali and Panayotou, 2012). Besides Puc, Alphabet (Alph), a non vital protein phosphatase 2C homolog in flies, negatively regulates dorsal closure at the level of JNKKKK. Alph regulates the p38 and ERK pathways in flies (Baril and Therrien, 2006; Baril *et al.*, 2009).

Anterior open (Aop, also known as Yan), an ETS transcriptional repressor acting in the Rolled (ERK homologue) signaling pathway, is a transcriptional repressor that opposes Jra/Kay function (Rebay and Rubin, 1995; Riesgo-Escovar and Hafen, 1997b). Aop is a nuclear constitutive repressor that has to be inactivated, to release inhibition. This is borne out by Bsk phosphorylation of Aop, which then instructs Aop to disengage from DNA binding and exit the nucleus, and redirects it to degradation via the proteasome.

Aop was one of the first identified inhibitors of the JNK pathway. Mutants for *aop* show delayed differentiation of the epidermis and ectopic proliferation of its precursors (Rogge *et al.*, 1995; Riesgo-Escovar and Hafen, 1997b). In contrast with other members of the pathway, *aop* null alleles do not result in a “dorsal open” phenotype; instead, a hole is found on the anterior portion of the embryo, accompanied with other head defects. As Aop is required early in development in the Rolled signaling pathway, there might be a maternal contribution that partially fulfills dorsal closure

requirements. A consensus sequence for Aop binding was found in the *dpp* promoter region, suggesting that binding of Aop blocks this JNK immediate early gene transcription. Consistently, mutants for *aop* have ectopic *dpp* and *puc* expression (Riesgo-Escovar and Hafen, 1997b). It is thought that activated Bsk phosphorylates Aop and induces its cytoplasmic translocation, as stated, as Rolled does. In parallel, Bsk phosphorylates Jra to activate it.

The Scarface (Scaf) protein creates another regulatory negative feedback loop. Scaf is a serine-protease homologue family member identified by two groups as a JNK signaling transcriptional target (Rousset *et al.*, 2010; Sorrosal *et al.*, 2010). *scaf* mutants show dorsal closure and male genitalia rotation/closure defects, besides ectopic *puc* expression. Scaf is a secreted protein, yet how it antagonizes dorsal closure is not known. The existence of an extracellular regulator of the pathway gives credence to the notion of an as yet unknown membrane-associated and/or extracellular component(s) of the pathway.

Ribbon (Rib) is a BTB/POZ domain containing protein. This BTB/POZ domain has a Zn-finger, known to bind DNA, conserved between metazoa. Rib also has a dual nuclear localization signal, so it could conceivably translocate to the nucleus and counteract Bsk at the transcriptional level. *rib* mutants show a dorsal-open phenotype but also other defects related to EGFR and FGF signaling pathways (Blake *et al.*, 1998; Bradley and Andrew, 2001). Both EGFR and FGF pathways are dependent on Rolled signaling, so Rib could be a promiscuous regulator of MAPK pathways, as is Aop or Alph. Other genes, like Raw and Pebbled (Peb, also known as Hindsight), are known regulators of the pathway, but their molecular mechanisms are not well understood (Byars *et al.*, 1999; Reed *et al.*, 2001).

Raw is a pioneer protein that counteracts Bsk function. There is no good sequence-based clue about the function(s) of Raw. Structurally, Raw consists of a 191 aminoacid residue domain present two times in the protein and conserved within species (Byars *et al.*, 1999). Besides these domains, Raw possesses a C-terminal gln-rich region. This gln-rich region is not present in the *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) homologue, OLRN-1. Interestingly, OLRN-1 has a putative transmembrane region absent in *Drosophila* Raw. Nevertheless, the gene is involved also in JNK signaling in this nematode during differentiation of an olfactory neuron. Null *olrn-1* alleles are not available, so whether it acts earlier in development, specifically in ventral closure, has not been determined (Bauer Huang *et al.*, 2007).

The mechanism of action of Raw and Rib has been difficult to resolve. By epistasis analysis, Raw acts downstream of Bsk and upstream of Jra. As it is well established that Jra is a direct target of Bsk, Raw could be acting in parallel to Bsk, ending Jra activation (Bates *et al.*,

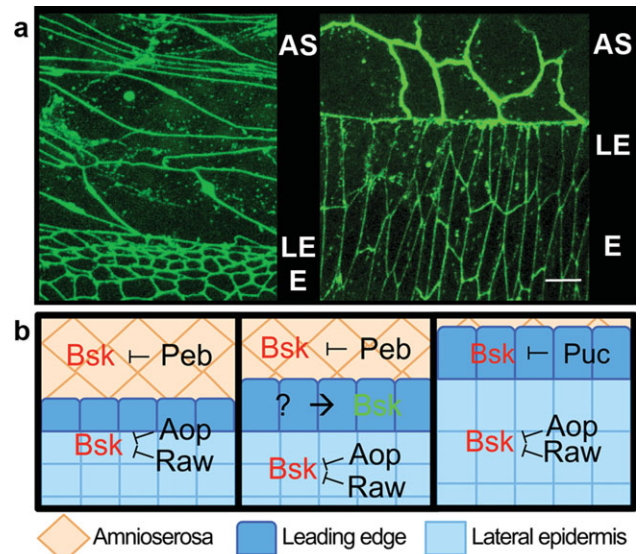


FIG. 3. Spatial regulation of Basket signaling during dorsal closure. **(a)** During germband retraction, amnioserosal cells are stretched in an antero-posterior axis, and lateral epithelial cells have not changed shape from a cuboidal arrangement. During dorsal closure, amnioserosal cells are polygonal in shape, and lateral epithelial cells stretch dorso-ventrally. AS, amnioserosa; LE, LE cells of the lateral epithelium; E, lateral epithelium. Images are projections from confocal stacks of living embryos expressing DE-Cadherin::GFP. Scale bar is 5 μ m. **(b)** Before the onset of dorsal closure, Basket signaling is downregulated in several tissues (left box). An unknown signal activates the Basket pathway only at the lateral epithelial LE cells. Basket signaling continues repressed in adjacent tissues (middle box). As closure ends, the pathway is turned off by an autoregulatory feedback loop in the LE (right box). Dorsal is up. Abbreviations used: Aop, Anterior open; Bsk, Basket; Peb, Pebbled; Puc, Puckered.

2008). As expected, Raw mutants also show ectopic expression of *puc-lacZ* (Byars *et al.*, 1999). *raw* and *rib* mutants do not synergize, in opposition with *puc* and *raw* double mutants that have more severe dorsal closure defects. Mutants for other negative regulators of the pathway, such as Aop, also show ectopic activation of JNK signaling (Byars *et al.*, 1999; Bates *et al.*, 2008). One way to rationalize the genetic interactions results between *puc*, *raw*, and *rib* is that Puc functions in a branch of the pathway parallel to Raw/Rib downregulating Jra/Kay signaling. It remains to be determined in detail where these genes and others cooperate (Fig. 3).

One particularly interesting feature of *puc*, *raw*, and *rib* loss of function mutants, one that mimics ectopic expression of *Jra*, *dpp*, or *tkv*, is that all of them are partially dorsalized (Stronach and Perrimon, 2001; Bates *et al.*, 2008). This is explained by the fact that in all of them the dorsal-defining *dpp* gene is ectopically expressed in the lateral epidermis of mutant embryos, and this late ectopic Dpp then reinforces dorsal cell fates. Variations in the level of *dpp* expression in the lateral epithelium during dorsal closure has come to be a hallmark of JNK activity, just as variations of Puc-lacZ

expression also are. Deviations from wild type levels of expression in these markers are regarded as a sensitive way to assess net effects and types of mutations, especially relevant since both loss and gain of function alleles concur on a reasonably common dorsal open phenotype.

Another level of regulation for JNK signaling takes place in the amnioserosa. An important contribution for Bsk/dorsal closure studies was the characterization of *Peb*, a Zn-finger transcription factor expressed in the amnioserosa (Fig. 3; Lamka and Lipshitz, 1999). *Peb* localizes to the nucleus and impedes nuclear *Jra/Kay* accumulation (Reed *et al.*, 2001). *Peb* is required for amnioserosa survival at germ band extension/retraction stages; *peb* mutants are unable to complete these processes properly. The defect is caused by premature apoptosis of amnioserosa cells (Frank and Rushlow, 1996; Lamka and Lipshitz, 1999). *Peb* has been shown to turn off JNK signaling. A *peb* hypomorph that partially rescued germ band retraction, died with a dorsal-open phenotype (Reed *et al.*, 2001). This failure is accounted not only by amnioserosa loss; actually, what is seen in this and other *peb* hypomorphs is active JNK signaling in the amnioserosa and subsequent cell death. Detailed analyses of dorsal closure revealed that JNK signaling in the amnioserosa is actively turned off by *Peb*. Both JNK activation and subsequent inhibition in the amnioserosa are required for accurate closure.

Peb might create a boundary of high/low JNK signaling activity, and act as a trigger for Bsk activation in the LE cells. This is an intriguing possibility; especially since currently there are no good ligand and/or receptor candidates for JNK signaling during dorsal closure. Besides, amnioserosa/epidermis fields can be experimentally genetically expanded or reduced, with the LE always specified in the lateral epithelia at the border between these tissues (evidenced by *puc* expression) (Stronach and Perimon, 2001). Another relevant finding is that *peb* expression in the amnioserosa is directly controlled by factors inducing the differentiation of this tissue: the Dpp early expression gradient. This could conceivably mean that early in development, Dpp controls Bsk induction at the LE by specifying the amnioserosa through factors such as *Peb*, which along with other repressors in the epidermis, such as *Raw* and *Rib*, and *Aop*, determines the actual place and time for Bsk activation (Fig. 3).

Mutations in *peb* decrease expression of non-JNK genes in LE cells (Wilk *et al.*, 2004), arguing in favor of communication between these tissues, and of Bsk activation at the boundary of *Peb* and *Raw* expression domains. Consistently, amnioserosa cells physical or genetic ablation during dorsal closure stages, by itself, does not alter Bsk activation in LE cells (Kiehart *et al.*, 2000; Scuderi and Letsou, 2005), suggesting *Peb* as a key amnioserosal inhibitor of JNK signaling, and not just acting to ensure cell viability in this tissue.

This alternative hypothesis to Bsk activity, different from Bsk being switched on by an extracellular ligand and a membrane receptor, implies that there are no such elements in the pathway. This may be in taking with the “ancestral” stress function of JNK signaling, dorsal closure constituting a predictable “developmental stress” response resulting from germband retraction and amnioserosa and lateral epithelium cellular deformation. The default state of JNK signaling in dorsal closure would then be “on,” and adequate activation in space and time would be achieved by the action of several negative regulators, as represented in Figure 3. Bates *et al.* (2008) have proposed that the *Jra/Kay* AP-1 transcription factor is “noisy,” and thus, the presence of negative regulators restrains this basal activity. This also means that *Jra/Kay* could have Bsk-independent activities, something that has clearly been shown for *Kay* (Riesgo-Escovar and Hafen, 1997a; Ciapponi *et al.*, 2001; Souid and Yanicostas, 2003). The products of *raw*, *rib*, and *puc* would then execute this basal quenching; however, this last, *puc*, being an immediate early JNK gene, is expressed only in the LE at appreciable levels, and would in principle only act late to control Bsk activation there.

Raw regulates JNK signaling in contexts other than dorsal closure (Jemc *et al.*, 2012). The *C. elegans* *Raw* homolog, OLRN-1, seems to interact with JNK signaling in the nervous system (Bauer Huang *et al.*, 2007). Together, this might imply that *Drosophila* *Raw* regulates JNK signaling in many cell types. Mutations for members of JNK signaling are capable of modifying a dominant eye phenotype of a viable *peb* allele, but the effects of this mutation in the eye might constitute a “stress” signal, for *Jra* and *bsk* mutations, in clones, have no discernible eye phenotypes, and thus, in principle, no function in this tissue (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996; Wilk *et al.*, 2004). Taking all the evidence together, nevertheless, it is reasonable to assume that both *Raw* and *Peb* are involved in other Bsk dependent processes. In this regard, it would be interesting to find if in *peb* mutants, the observed amnioserosa cells premature death is a consequence of JNK signaling deregulation, or due to a different function of *Peb* in these cells.

Puc is crucial for adequate tuning of the pathway not only during dorsal closure, but also may be involved in other Bsk-independent functions. Bsk and *Jra* are not required for eye formation, as stated; in contrast, loss of *Puc* function in this tissue leads to cell death and subsequent eye field reduction. The same is true for other tissues like the wing imaginal disc (McEwen and Peifer, 2005).

Finally, *Puc* might also act at low levels to repress JNK signaling in other tissues, independent of Bsk induction. During embryogenesis, besides the defects on dorsal closure seen on *puc* mutants, a fraction of mutant embryos die with generalized Bsk activity (Ríos-Bar-

rera and Riesgo-Escovar, unpublished observations). This Bsk high level of activity is also the main phenotype of zygotic *puc* mutants whose maternal *puc* contribution is reduced or absent (McEwen and Peifer, 2005). Interestingly, JNK signaling also has been associated with tissue overgrowth. When apoptosis is experimentally blocked in cells lacking Puc function, there is an increase in tissue size; moreover, an inhibitor of Src42A, Csk, has been shown to produce tissue overgrowth in a Bsk-dependent manner (Read *et al.*, 2004). Can overgrowth be a late stress response, especially if apoptosis is blocked? Future studies should address this issue.

REGULATING STRESS, HEALING, AND DEATH

Basket Signaling

Programmed cell death allows organisms to eliminate sick or endangered cells, or developmentally redundant cells, to keep tissue/organism homeostasis. To trigger the response specifically in cells destined to die, quality control and survival signals are constantly being transduced and different cell death/survival signaling thresholds compared. In fact, even when programmed cell death seems to have taken a sure hold on the cell's future, for instance, by activation of caspases, DNA fragmentation, or vigorous expression of reactive oxygen species (ROS), these cell death fates can be countered, allowing cells to survive [a process termed anastasis (Tang *et al.*, 2012)]. Most cells are poised and ready to undergo programmed cell death, yet not destined to, necessarily. This means that there is normally expression of pro- and anti-apoptotic genes at low levels, and programmed cell death, when effected, is then the net result of an active and ongoing process, whose sum tips the balance toward death (Steller, 2008).

The first JNK reports in yeast and in mammalian tissue culture cells showed that this kinase was involved in stress responses, where programmed cell death may well be one of the consequences [hence the reason for the other name of JNK: Stress Activated Protein Kinase (Galcheva-Gargova *et al.*, 1994; Stronach and Perrimon, 1999)]. It appears that JNK-dependent programmed cell death is only partially, if at all, dependent on caspase activation; rather, it appears to promote an outcome more akin to necroptosis, a form of programmed cell death different from apoptosis, which is caspase mediated. Necroptosis courses with generation of ROS to effect death (Kanda *et al.*, 2011).

Drosophila Basket is activated in response to several classes of stresses, like UV exposure and irradiation, wound healing, oxidative stress, or immune challenges (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996; Stronach and Perrimon, 1999; Rämetsch *et al.*, 2002; Bosch *et al.*, 2005; Bidla *et al.*, 2007; Karkali and Panayotou, 2012). In mammals, activation of JNK occurs at the open edges of wounds,

these cells acting as surrogate LE cells in stretching and covering the exposed wound surface during healing. In Drosophila, JNK signaling is likewise activated at the wound site, and seems to mediate epithelial cells' shape changes and reestablishment of a continuous epithelium, mimicking closely cellular events that occur during dorsal closure (Galco and Krasnow, 2004; Lesch *et al.*, 2010; Brock *et al.*, 2012). This activation courses with well-characterized elements of the JNK pathway, like Rho family G proteins, Kay, and Puc, showcasing involvement of JNK signaling in wound healing (Wood *et al.*, 2002; Martin and Parkhurst, 2004; Baek *et al.*, 2010; Razzell *et al.*, 2011).

Paraquat treatment has been classically used in tissue culture cells and organisms to induce excessive oxidative stress (Arking *et al.*, 1991; Chatterjee and Bohmann, 2012). In Drosophila, paraquat treatment results in reduced lifespan and an increase in oxidized proteins. Heterozygosity for Puc counteracted these effects, increasing lifespan and decreasing protein oxidation. A hypomorphic condition for Hep in this background generally abrogated these effects, implicating JNK pathway activation as a countermeasure to oxidative stress (Wang *et al.*, 2003).

A model has been developed where eye-specific, ectopic expression of the Drosophila tumor necrosis factor (TNF) family member homolog, Eiger (Egr), a pro-inflammatory cytokine, or TAK1, a MAPKKK, leads to massive death in the prospective eye territory (Mihaly *et al.*, 2001; Igaki *et al.*, 2002). Activation of JNK by Egr over-expression in tissue culture cells has also been studied (Geuking *et al.*, 2005). In these cases, JNK activation leads to expression of stress responsive genes, some pro-apoptotic genes, cytoskeletal and signaling components (Jasper *et al.*, 2001). Other cell-death models in imaginal tissues, like cell-cell competition (Moreno and Basler, 2004), morphogen gradient discontinuities (Adachi-Yamada *et al.*, 1999; Adachi-Yamada and O'Connor, 2002; Shen and Dahmann, 2005), and cytoskeletal alterations based on ectopic expression of Myc or Rho1, countered by ectopic expression of the phosphatase Puc or Thread (also known as DIAP1), or the baculovirus anti-apoptotic gene p35 have also been employed to study JNK involvement in promotion of apoptosis (Kuranaga *et al.*, 2002; Neisch *et al.*, 2010).

Using these mainly ectopic expression experiments a tentative signaling pathway has been assembled with Egr/Wengen (Wgn) as a ligand/membrane receptor pair, signaling through TAB2 (Geuking *et al.*, 2005), CYLD (Xue *et al.*, 2007), and TRAF4 (Also known as DTRAF1) to TAK1 (JNKKK), MKK4 and/or Hep (JNKKs), to Bsk (Cha *et al.*, 2003; Geuking *et al.*, 2009). This "non-canonical" pathway is certainly not required for development, and seems to be employed solely in the aforementioned instances, as the other examples where the JNK pathway is activated due to stress do require the JNK

“canonical” pathway (see Fig. 2 and Table 1). Besides TAK1, another MAP3K mediating cell death induction, Pk92B (also known as DASK1) has been described. It is thought that Pk92B is recruited by TRAF4 and that both of them may mediate Bsk activation (Kuranaga *et al.*, 2002). No loss of function mutations for Pk92B are available.

egr, *CYLD*, and *Mkk4* mutants are viable and fertile, including null alleles (Xue *et al.*, 2007; Geuking *et al.*, 2009; McQuilton *et al.*, 2012). The sole *wgn* mutant allele described is also viable and fertile. *Tak1* mutants are viable and fertile as well, but very susceptible to Gram-negative infections. TAK1 is also known to signal through the Imd and p38 pathways, at least when expressed ectopically (Vidal *et al.*, 2001; Geuking *et al.*, 2009). Death signaling in response to Egr seems, in summary, not to entail vital genes, except Bsk (and Hep), but care should be taken with conclusions gleaned from gain-of-function analyses where physiological relevance *in vivo* has not been asserted.

Conversely, demonstrating concurrence of Bsk and JNK pathway vital genes' activation during stress leading to cell death is difficult to assess, since loss of a vital gene may trigger programmed cell death *per se*. It could even be argued, from its role in development and in stress responses, that the JNK pathway seems to be dichotomously used in flies: as an obligate element of development, ensuring appropriate changes in cell morphogenesis at multiple points (follicle cells development, embryonic dorsal closure, dorsal thoracic closure, and genital disc rotation and closure during metamorphosis), and as a conveyor belt for stress stimuli. The latter could be the evolutionarily more ancient function, from which the “new” developmental roles accrued. Because of these JNK pathway varied roles, ideally evidence should be carefully weighted to fully support direct participation of a certain putative regulator. Still, it should be interesting to determine the whole spectrum of cellular death signals, and in that context, the relationship(s) to Basket signaling.

CONCLUDING REMARKS

JNK signaling regulates and executes several critical developmental processes in flies. It is also an excellent model in which to study how cellular signaling circuitry may be used and redirected during evolution to regulate different processes and effect varied responses such as cytoskeleton modifications in dorsal closure and wound healing, springing from stress response mechanisms to even direct tissue growth. It may be that, very much like the apoptosis signaling pathway, there is a need to constantly silence Basket to achieve an accurate level of activity. This “ready-state” might relate to JNK signaling in response to stress, a stimulus type that is neither predictable nor generally reproducible in the lives of organ-

isms. In this view, JNK obligate activity during development is a late acquisition.

This buffering of signaling potential may also condition how cells variously “read” a signal in order to execute a response, besides the presence or absence of particular molecules to imbue specificity in a pathway. For Basket signaling, a basal “on” repressed state, in contrast to the more classical signal-induced activation, may imply a need to rapidly activate (un-inhibit) the pathway. Such a mechanism might give a time advantage during injury responses, and may have been applied as well for developmental processes such as dorsal closure. An interesting point to highlight is that most of the JNK negative regulators act at the level of Bsk/Jra (Puc, Raw, Peb, and Aop), which might argue in favor to Jra/Kay leaky activity, yet Kay needs to be translocated to the nucleus during pathway activation, which might negate some of this time advantage.

For assessing the physiological relevance of gene interactions, establishment of more physiological models are still needed. For example, the eye as a model tissue for gene interactions is useful as a first-glance gene discovery tool, but confirmatory scenarios for JNK signaling are mandatory. In this way, suppression in gain-of-function screens in the eye or other tissues can be confirmed. In the same sense, if an otherwise viable mutation is challenged under conceivably relevant stimuli, as pathogen infection or stressor exposure, a reflected reduced fitness would strongly imply relevant functions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Martha Vázquez-Laslop and Rosa Navarro-González for helpful comments and discussions.

LITERATURE CITED

- Adachi-Yamada T, Fujimura-Kamada K, Nishida Y, Matsumoto K. 1999. Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature* 400:166–169.
- Adachi-Yamada T, O'Connor M. 2002. Morphogenetic apoptosis: a mechanism for correcting discontinuities in morphogen gradients. *Dev Biol* 251:74–90.
- Affolter M, Nellen D, Nussbaumer U, Basler K. 1994. Multiple requirements for the receptor serine/threonine kinase thick veins reveal novel functions of TGF beta homologs during *Drosophila* embryogenesis. *Development (Cambridge, England)* 120:3105–3117.
- Agnès F, Suzanne M, Noselli S. 1999. The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development (Cambridge, England)* 126:5453–5462.
- Almeida L, Bagnerini P, Habbal A, Noselli S, Serman F. 2011. A mathematical model for dorsal closure. *J Theor Biol* 268:105–119.

- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117:699-711.
- Arking R, Buck S, Berrios A, Dwyer S, Baker G. 1991. Elevated paraquat resistance can be used as a bioassay for longevity in a genetically based long-lived strain of *Drosophila*. *Dev Genet* 12:362-370.
- Baek S, Kwon Y-C, Lee H, Choe K-M. 2010. Rho-family small GTPases are required for cell polarization and directional sensing in *Drosophila* wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* 394:488-492.
- Baril C, Sahmi M, Ashton-Beaucage D, Stronach B, Therrien M. 2009. The PP2C Alphabet is a negative regulator of stress-activated protein kinase signaling in *Drosophila*. *Genetics* 181:567-579.
- Baril C, Therrien M. 2006. Alphabet, a Ser/Thr phosphatase of the protein phosphatase 2C family, negatively regulates RAS/MAPK signaling in *Drosophila*. *Dev Biol* 294:232-245.
- Bates K, Higley M, Letsou A. 2008. Raw mediates antagonism of AP-1 activity in *Drosophila*. *Genetics* 178:1989-2002.
- Bauer Huang S, Saheki Y, VanHoven M, Torayama I, Ishihara T, Katsura I, van der Linden A, Sengupta P, Bargmann C. 2007. Left-right olfactory asymmetry results from antagonistic functions of voltage-activated calcium channels and the Raw repeat protein OLRN-1 in *C. elegans*. *Neural Dev* 2:24, <http://www.neuraldevelopment.com/about>.
- Belacortu Y, Paricio N. 2011. *Drosophila* as a model of wound healing and tissue regeneration in vertebrates. *Dev Dyn* 240:2379-2404.
- Bidla G, Dushay M, Theopold U. 2007. Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *J Cell Sci* 120:1209-1215.
- Biswas R, Stein D, Stanley E. 2006. *Drosophila* Dok is required for embryonic dorsal closure. *Development* 133:217-227.
- Blake K, Myette G, Jack J. 1998. The products of ribbon and raw are necessary for proper cell shape and cellular localization of nonmuscle myosin in *Drosophila*. *Dev Biol* 203:177-188.
- Blanchard G, Murugesu S, Adams R, Martinez-Arias A, Gorfinkiel N. 2010. Cytoskeletal dynamics and supracellular organisation of cell shape fluctuations during dorsal closure. *Development (Cambridge, England)* 137:2743-2752.
- Bogoyevitch M, Kobe B. 2006. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:1061-1095.
- Bosch M, Serras F, Martín-Blanco E, Bagaña J. 2005. JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* 280:73-86.
- Boulton T, Yancopoulos G, Gregory J, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb M. 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science (New York, NY)* 249:64-67.
- Bradley P, Andrew D. 2001. Ribbon encodes a novel BTB/POZ protein required for directed cell migration in *Drosophila melanogaster*. *Development (Cambridge, England)* 128:3001-3015.
- Brewster J, de Valoir T, Dwyer N, Winter E, Gustin M. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science (New York, NY)* 259:1760-1763.
- Brock A, Wang Y, Berger S, Renkawitz-Pohl R, Han V, Wu Y, Galiko M. 2012. Transcriptional regulation of Profilin during wound closure in *Drosophila* larvae. *J Cell Sci*, in press.
- Brown M, Sacks D. 2008. Compartmentalised MAPK pathways. *Handb Exp Pharmacol* 186:205-235.
- Byars C, Bates K, Letsou A. 1999. The dorsal-open group gene raw is required for restricted DJNK signaling during closure. *Development (Cambridge, England)* 126:4913-4923.
- Campos-Ortega JA, Hartenstein V. 1997. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*, 2nd ed. Berlin; New York: Springer. p. xvii, 405 p.
- Cha G-H, Cho K, Lee J, Kim M, Kim E, Park J, Lee S, Chung J. 2003. Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in *Drosophila melanogaster* mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways. *Mol Cell Biol* 23:7982-7991.
- Chatterjee N, Bohmann D. 2012. A versatile phiC31 based reporter system for measuring AP-1 and Nrf2 signaling in *Drosophila* and in tissue culture. *PLoS One* 7:e34063.
- Chen H-W, Marinissen M, Oh S-W, Chen X, Melnick M, Perrimon N, Gutkind J, Hou S. 2002. CKA, a novel multidomain protein, regulates the JUN N-terminal kinase signal transduction pathway in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 22:1792-1803.
- Chou T, Perrimon N. 1996. The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144:1673-1679.
- Ciapponi L, Jackson D, Mlodzik M, Bohmann D. 2001. *Drosophila* Fos mediates ERK and JNK signals via distinct phosphorylation sites. *Genes Dev* 15:1540-1553.
- Cormier O, Mohseni N, Voytyuk I, Reed B. 2012. Autophagy can promote but is not required for epithelial cell extrusion in the amnioserosa of the *Drosophila* embryo. *Autophagy* 8:252-264.
- Courchesne W, Kunisawa R, Thorner J. 1989. A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S. cerevisiae*. *Cell* 58:1107-1119.
- Dobens L, Martín-Blanco E, Martínez-Arias A, Kafatos F, Raftery L. 2001. *Drosophila* puckered regulates Fos/

- Jun levels during follicle cell morphogenesis. *Development* (Cambridge, England) 128:1845–1856.
- Elion E, Grisafi P, Fink G. 1990. FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* 60:649–664.
- Fernandez R, Takahashi F, Liu Z, Steward R, Stein D, Stanley E. 2000. The *Drosophila* shark tyrosine kinase is required for embryonic dorsal closure. *Genes Dev* 14:604–614.
- Frank L, Rushlow C. 1996. A group of genes required for maintenance of the amnioserosa tissue in *Drosophila*. *Development* (Cambridge, England) 122:1343–1352.
- Galcheva-Gargova Z, Dérijard B, Wu I, Davis R. 1994. An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* (New York, NY) 265:806–808.
- Galko M, Krasnow M. 2004. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol* 2:E239.
- García-Fernández B, Martínez-Arias A, Jacinto A. 2007. Dpp signalling orchestrates dorsal closure by regulating cell shape changes both in the amnioserosa and in the epidermis. *Mech Dev* 124:884–897.
- Garlena R, Gonda R, Green A, Pileggi R, Stronach B. 2010. Regulation of mixed-lineage kinase activation in JNK-dependent morphogenesis. *J Cell Sci* 123:3177–3188.
- Genova J, Jong S, Camp J, Fehon R. 2000. Functional analysis of Cdc42 in actin filament assembly, epithelial morphogenesis, and cell signaling during *Drosophila* development. *Dev Biol* 221:181–194.
- Gettings M, Serman F, Roussel R, Bagnerini P, Almeida L, Noselli S. 2010. JNK signalling controls remodelling of the segment boundary through cell reprogramming during *Drosophila* morphogenesis. *PLoS Biol* 8:e1000390.
- Geuking P, Narasimamurthy R, Basler K. 2005. A genetic screen targeting the tumor necrosis factor/Eiger signaling pathway: Identification of *Drosophila* TAB2 as a functionally conserved component. *Genetics* 171:1683–1694.
- Geuking P, Narasimamurthy R, Lemaitre B, Basler K, Leulier F. 2009. A non-redundant role for *Drosophila* Mkk4 and hemipterous/Mkk7 in TAK1-mediated activation of JNK. *PLoS One* 4:e7709.
- Glise B, Bourbon H, Noselli S. 1995. Hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* 83:451–461.
- Glise B, Noselli S. 1997. Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *Genes Dev* 11:1738–1747.
- Gorfinkiel N, Schamberg S, Blanchard G. 2011. Integrative approaches to morphogenesis: lessons from dorsal closure. *Genesis* 49:522–533.
- Guevorkian K, Gonzalez-Rodriguez D, Carlier C, Dufour S, Brochard-Wyart F. 2011. Mechanosensitive shivering of model tissues under controlled aspiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:13387–13392.
- Hakeda-Suzuki S, Ng J, Tzu J, Dietzl G, Sun Y, Harms M, Nardine T, Luo L, Dickson B. 2002. Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* 416:438–442.
- Halsell S, Chu B, Kiehart D. 2000. Genetic analysis demonstrates a direct link between rho signaling and nonmuscle myosin function during *Drosophila* morphogenesis. *Genetics* 155:1253–1265.
- Hanks S, Hunter T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9:576–596.
- Harden N. 2002. Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: Lessons from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation* 70:181–203.
- Harden N, Ricos M, Ong Y, Chia W, Lim L. 1999. Participation of small GTPases in dorsal closure of the *Drosophila* embryo: Distinct roles for Rho subfamily proteins in epithelial morphogenesis. *J Cell Sci* 112 (Pt 3):273–284.
- Homsy J, Jasper H, Peralta X, Wu H, Kiehart D, Bohmann D. 2006. JNK signaling coordinates integrin and actin functions during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Dyn* 235:427–434.
- Hou X, Goldstein E, Perrimon N. 1997. *Drosophila* Jun relays the Jun amino-terminal kinase signal transduction pathway to the Decapentaplegic signal transduction pathway in regulating epithelial cell sheet movement. *Genes Dev* 11:1728–1737.
- Hunter T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225–236.
- Igaki T, Kanda H, Yamamoto-Goto Y, Kanuka H, Kurana E, Aigaki T, Miura M. 2002. Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J* 21:3009–3018.
- Jacinto A, Wood W, Woolner S, Hiley C, Turner L, Wilson C, Martinez-Arias A, Martin P. 2002. Dynamic analysis of actin cable function during *Drosophila* dorsal closure. *Curr Biol* 12:1245–1250.
- Jasper H, Benes V, Schwager C, Sauer S, Clauder-Münster S, Ansorge W, Bohmann D. 2001. The genomic response of the *Drosophila* embryo to JNK signaling. *Dev Cell* 1:579–586.
- Jemc J, Milutinovich A, Weyers J, Takeda Y, Van Doren M. 2012. raw Functions through JNK signaling and cadherin-based adhesion to regulate *Drosophila* gonad morphogenesis. *Dev Biol* 367:114–125.
- Johnson S, Hunter T. 2005. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods* 2:17–25.
- Jürgens G, Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, Kluding H. 1984. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci

- on the third chromosome. Roux's Arch Dev Biol 193:283-295.
- Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss H, Dérjard B, Moore G, Davis R, Karin M. 1994. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev* 8:2996-3007.
- Kanda H, Igaki T, Okano H, Miura M. 2011. Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced nonapoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:18977-18982.
- Karkali K, Panayotou G. 2012. The Drosophila DUSP puckered is phosphorylated by JNK and p38 in response to arsenite-induced oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 418:301-306.
- Kiehart D, Galbraith C, Edwards K, Rickoll W, Montague R. 2000. Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in Drosophila. *J Cell Biol* 149:471-490.
- Kockel L, Zeitlinger J, Staszewski L, Mlodzik M, Bohmann D. 1997. Jun in Drosophila development: redundant and nonredundant functions and regulation by two MAPK signal transduction pathways. *Genes Dev* 11:1748-1758.
- Krisak L, Strich R, Winters R, Hall J, Mallory M, Kreitzer D, Tuan R, Winter E. 1994. SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 8:151-2161.
- Kuan C, Yang D, Samanta Roy D, Davis R, Rakic P, Flavell R. 1999. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22:667-676.
- Kuranaga E, Kanuka H, Igaki T, Sawamoto K, Ichijo H, Okano H, Miura M. 2002. Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in Drosophila. *Nat Cell Biol* 4:705-710.
- Lamka M, Lipshitz H. 1999. Role of the amnioserosa in germ band retraction of the Drosophila melanogaster embryo. *Dev Biol* 214:102-112.
- Lee J, Laydon J, McDonnell P, Gallagher T, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal M, Heys J, Landvater S. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739-746.
- Lesch C, Jo J, Wu Y, Fish G, Galko M. 2010. A targeted UAS-RNAi screen in Drosophila larvae identifies wound closure genes regulating distinct cellular processes. *Genetics* 186:943-957.
- Macías A, Romero N, Martín F, Suárez L, Rosa A, Morata G. 2004. PVF1/PVR signaling and apoptosis promotes the rotation and dorsal closure of the Drosophila male terminalia. *Int J Dev Biol* 48:1087-1094.
- Manning G, Plowman G, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* 27:514-520.
- Martin P, Parkhurst S. 2004. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* (Cambridge, England) 131:3021-3034.
- Martín-Blanco E, Gampel A, Ring J, Virdee K, Kirov N, Tolkovsky A, Martínez-Arias A. 1998. puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in Drosophila. *Genes Dev* 12:557-570.
- Martín-Blanco E, Pastor-Pareja J, García-Bellido A. 2000. JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7888-7893.
- Mateus A, Gorfinkiel N, Schamberg S, Martínez Arias A. 2011. Endocytic and recycling endosomes modulate cell shape changes and tissue behaviour during morphogenesis in Drosophila. *PLoS One* 6:e18729.
- McEwen D, Peifer M. 2005. Puckered, a Drosophila MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. *Development* 132:3935-3946.
- McQuilton P, St Pierre S, Thurmond J, FlyBase C. 2012. FlyBase 101—the basics of navigating FlyBase. *Nucleic Acids Res* 40:D706-D714.
- Mihaly J, Kockel L, Gaengel K, Weber U, Bohmann D, Mlodzik M. 2001. The role of the Drosophila TAK homologue dTAK during development. *Mech Dev* 102:67-79.
- Mizuno T, Tsutsui K, Nishida Y. 2002. Drosophila myosin phosphatase and its role in dorsal closure. *Development* 129:1215-1223.
- Moreno E, Basler K. 2004. dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* 117:17-129.
- Muliyil S, Krishnakumar P, Narasimha M. 2011. Spatial, temporal and molecular hierarchies in the link between death, delamination and dorsal closure. *Development* 138:3043-3054.
- Neisch A, Speck O, Stronach B, Fehon R. 2010. Rho1 regulates apoptosis via activation of the JNK signaling pathway at the plasma membrane. *J Cell Biol* 189:311-323.
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H. 1984. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in Drosophila melanogaster. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch Dev Biol* 193:267-282.
- Peña-Rangel M, Rodríguez I, Riesgo-Escovar J. 2002. A misexpression study examining dorsal thorax formation in Drosophila melanogaster. *Genetics* 160:1035-1050.
- Peralta X, Toyama Y, Kiehart D, Edwards G. 2008. Emergent properties during dorsal closure in Drosophila morphogenesis. *Phys Biol* 5:15004.
- Perkins K, Dailey G, Tjian R. 1988. Novel Jun- and Fos-related proteins in Drosophila are functionally homologous to enhancer factor AP-1. *EMBO J* 7:4265-4273.

- Perrimon N, Engstrom L, Mahowald A. 1989. Zygotic lethals with specific maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. I. Loci on the X chromosome. *Genetics* 121:333-352.
- Perrimon N, Lanjuin A, Arnold C, Noll E. 1996. Zygotic lethal mutations with maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. II. Loci on the second and third chromosomes identified by P-element-induced mutations. *Genetics* 144:1681-1692.
- Polaski S, Whitney L, Barker B, Stronach B. 2006. Genetic analysis of slipper/mixed lineage kinase reveals requirements in multiple Jun-N-terminal kinase-dependent morphogenetic events during *Drosophila* development. *Genetics* 174:719-733.
- Qi M, Elion E. 2005. MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 118:3569-3572.
- Raman M, Chen W, Cobb M. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26:3100-3112.
- Rämet M, Lanot R, Zachary D, Manfruelli P. 2002. JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol* 241:145-156.
- Razzell W, Wood W, Martin P. 2011. Swatting flies: Modelling wound healing and inflammation in *Drosophila*. *Dis Model Mech* 4:569-574.
- Read R, Bach E, Cagan R. 2004. *Drosophila* C-terminal Src kinase negatively regulates organ growth and cell proliferation through inhibition of the Src, Jun N-terminal kinase, and STAT pathways. *Mol Cell Biol* 24:6676-6689.
- Rebay I, Rubin G. 1995. Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway. *Cell* 81:857-866.
- Reed B, Wilk R, Lipshitz H. 2001. Downregulation of Jun kinase signaling in the amnioserosa is essential for dorsal closure of the *Drosophila* embryo. *Curr Biol* 11:1098-1108.
- Reed B, Wilk R, Schöck F, Lipshitz H. 2004. Integrin-dependent apposition of *Drosophila* extraembryonic membranes promotes morphogenesis and prevents anoikis. *Curr Biol* 14:372-380.
- Ricos M, Harden N, Sem K, Lim L, Chia W. 1999. Dcdc42 acts in TGF-beta signaling during *Drosophila* morphogenesis: distinct roles for the Drac1/JNK and Dcdc42/TGF-beta cascades in cytoskeletal regulation. *J Cell Sci* 112(Pt 8):1225-1235.
- Riesgo-Escovar J, Hafen E. 1997a. Common and distinct roles of DFos and DJun during *Drosophila* development. *Science* 278:669-672.
- Riesgo-Escovar J, Hafen E. 1997b. *Drosophila* Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor DJun during dorsal closure. *Genes Dev* 11:1717-1727.
- Riesgo-Escovar J, Jenni M, Fritz A, Hafen E. 1996. The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* 10:2759-2768.
- Rogge R, Green P, Urano J, Horn-Saban S, Mlodzik M, Shilo B, Hartenstein V, Banerjee U. 1995. The role of yan in mediating the choice between cell division and differentiation. *Development* 121:3947-3958.
- Rossomando A, Payne D, Weber M, Sturgill T. 1989. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6940-6943.
- Rousset R, Bono-Lauriol S, Gettings M, Suzanne M, Spéder P, Noselli S. 2010. The *Drosophila* serine protease homologue Scarface regulates JNK signalling in a negative-feedback loop during epithelial morphogenesis. *Development* 137:2177-2186.
- Rushlow C, Frasch M, Doyle H, Levine M. 1987. Maternal regulation of zerknüllt: A homoeobox gene controlling differentiation of dorsal tissues in *Drosophila*. *Nature* 330:583-586.
- Scuderi A, Letsou A. 2005. Amnioserosa is required for dorsal closure in *Drosophila*. *Dev Dyn* 232:791-800.
- Shen J, Dahmann C. 2005. Extrusion of cells with inappropriate Dpp signaling from *Drosophila* wing disc epithelia. *Science* 307:1789-1790.
- Simin K, Bates E, Horner M, Letsou A. 1998. Genetic analysis of punt, a type II Dpp receptor that functions throughout the *Drosophila melanogaster* life cycle. *Genetics* 148:801-813.
- Sluss H, Han Z, Barrett T, Goberdhan D, Wilson C, Davis R, Ip Y. 1996. A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* 10:2745-2758.
- Sokolow A, Toyama Y, Kiehart D, Edwards G. 2012. Cell ingress and apical shape oscillations during dorsal closure in *Drosophila*. *Biophys J* 102:969-979.
- Solon J, Kaya-Copur A, Colombelli J, Brunner D. 2009. Pulsed forces timed by a ratchet-like mechanism drive directed tissue movement during dorsal closure. *Cell* 137:1331-1342.
- Sorrosal G, Pérez L, Herranz H, Milán M. 2010. Scarface, a secreted serine protease-like protein, regulates polarized localization of laminin A at the basement membrane of the *Drosophila* embryo. *EMBO Rep* 11:373-379.
- Soud S, Yanicostas C. 2003. Differential expression of the two *Drosophila* fos/kayak transcripts during oogenesis and embryogenesis. *Dev Dyn* 227:150-154.
- Steller H. 2008. Regulation of apoptosis in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 15:132-1138.
- Stevens L, Page-McCaw A. 2012. A secreted MMP is required for reepithelialization during wound healing. *Mol Biol Cell* 23:1068-1079.
- Stronach B, Perrimon N. 1999. Stress signaling in *Drosophila*. *Oncogene* 18:6172-6182.
- Stronach B, Perrimon N. 2001. Investigation of leading edge formation at the interface of amnioserosa and

- dorsal ectoderm in the *Drosophila* embryo. *Development* 128:2905-2913.
- Stronach B, Perrimon N. 2002. Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, slipper. *Genes Dev* 16:377-387.
- Su Y, Maurel-Zaffran C, Treisman J, Skolnik E. 2000. The Ste20 kinase misshapen regulates both photoreceptor axon targeting and dorsal closure, acting downstream of distinct signals. *Mol Cell Biol* 20:4736-4744.
- Su Y, Treisman J, Skolnik E. 1998. The *Drosophila* Ste20-related kinase misshapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes Dev* 12:2371-2380.
- Tang H, Mak K, Hu S, Wang S, Wong K, Wong C, Wu H, Law H, Liu K, Talbot C, Lau W, Montell D, Fung M. 2012. Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Mol Biol Cell* 23:2240-2252.
- Tatei K, Cai H, Ip Y, Levine M. 1995. Race: A *Drosophila* homologue of the angiotensin converting enzyme. *Mech Dev* 51:157-168.
- Tateno M, Nishida Y, Adachi-Yamada T. 2000. Regulation of JNK by Src during *Drosophila* development. *Science* 287:324-327.
- Teng X, Toyama Y. 2011. Apoptotic force: active mechanical function of cell death during morphogenesis. *Dev Growth Differ* 53:69-276.
- Thomas C, Rousset R, Noselli S. 2009. JNK signalling influences intracellular trafficking during *Drosophila* morphogenesis through regulation of the novel target gene Rab30. *Dev Biol* 331:250-260.
- Torres L, Martín H, García-Saez M, Arroyo J, Molina M, Sánchez M, Nombela C. 1991. A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol Microbiol* 5:2845-2854.
- Toyama Y, Peralta X, Wells A, Kiehart D, Edwards G. 2008. Apoptotic force and tissue dynamics during *Drosophila* embryogenesis. *Science* 321:1683-1686.
- Turjanski A, Vaqué J, Gutkind J. 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26:3240-3253.
- Valadez-Graham V, Yoshioka Y, Velazquez O, Kawamori A, Vázquez M, Neumann A, Yamaguchi M, Zurita M. 2012. XNP/dATRX interacts with DREF in the chromatin to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res* 40:1460-1474.
- Vidal S, Khush R, Leulier F, Tzou P, Nakamura M, Lemaitre B. 2001. Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev* 15:1900-1912.
- Wada A, Kato K, Uwo M, Yonemura S, Hayashi S. 2007. Specialized extraembryonic cells connect embryonic and extraembryonic epidermis in response to Dpp during dorsal closure in *Drosophila*. *Dev Biol* 301:340-349.
- Wang M, Bohmann D, Jasper H. 2003. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* 5:811-816.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe M, Johnson G. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Phys Rev* 79:143-180.
- Wilk R, Pickup A, Hamilton J, Reed B, Lipshitz H. 2004. Dose-sensitive autosomal modifiers identify candidate genes for tissue autonomous and tissue nonautonomous regulation by the *Drosophila* nuclear zinc-finger protein, hindsight. *Genetics* 168:281-300.
- Wood W, Jacinto A, Grose R, Woolner S, Gale J, Wilson C, Martin P. 2002. Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* 4:907-912.
- Xue L, Igaki T, Kuranaga E, Kanda H, Miura M, Xu T. 2007. Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in *Drosophila*. *Dev Cell* 13:446-454.
- Yang D, Kuan C, Whitmarsh A, Rincón M, Zheng T, Davis R, Rakic P, Flavell R. 1997. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature* 389:865-870.
- Yoshioka Y, Suyari O, Yamaguchi M. 2008. Transcription factor NF- κ B is involved in regulation of the JNK pathway during *Drosophila* thorax development. *Genes Cells* 13:117-130.
- Yoshioka Y, Tue N, Fujiwara S, Matsuda R, Valadez-Graham V, Zurita M, Yamaguchi M. 2012. *Drosophila* DREF acting via the JNK pathway is required for thorax development. *Genesis* 50:599-611.
- Zeitlinger J, Bohmann D. 1999. Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development* 126:3947-3956.

aca/ is a Long Non-coding RNA in JNK Signaling in Epithelial Shape Changes During
Drosophila Dorsal Closure

Luis Daniel Ríos-Barrera¹, Irene Gutiérrez-Pérez², María Domínguez-Castellano² & Juan
Rafael Riesgo-Escovar¹

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, campus UNAM
Juriquilla, Boulevard Juriquilla #3001, Querétaro 76230, Querétaro, México.

²Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Campus de San Juan,
Sant Joan d'Alacant, Alicante, España.

*corresponding author. email: juanriesgo@prodigy.net.mx

Short Title: Drosophila *aca/* is a long non-coding RNA

Abstract

Dorsal closure is an epithelial remodeling process taking place during *Drosophila* embryogenesis. JNK signaling coordinates dorsal closure. We identify and characterize *acaI* as a novel negative dorsal closure regulator. *acaI* represents a new level of JNK regulation. The *acaI* locus codes for a conserved, long, non-coding, nuclear RNA. Long non-coding RNAs are an abundant and diverse class of gene regulators. Mutations in *acaI* are lethal. *acaI* mRNA expression is dynamic and is processed into a collection of 50 to 120 bp fragments. We show that *acaI* lies downstream of *raw*, a pioneer protein, helping explain part of *raw* functions, and interacts genetically with *Polycomb*. *acaI* functions in trans regulating mRNA expression of two genes involved in JNK signaling and dorsal closure: *Connector of kinase to AP1 (Cka)* and *anterior open (aop)*. *Cka* is a conserved scaffold protein that brings together JNK and Jun, and *aop* is a transcription factor. Misregulation of *Cka* and *aop* can account for dorsal closure phenotypes in *acaI* mutants.

Author Summary

Changes in cell shape affect many critical cellular and bodily processes, like wound healing and developmental events, and when gone awry, metastatic processes in cancer [1]. Evolutionarily conserved signaling pathways govern regulation of these cellular changes. The Jun-N-terminal kinase pathway regulates cell stretching during wound healing and normal development [2]. An extensively studied developmental process is embryonic dorsal closure in fruit flies, a well established model for the regulation and manner of this cell shape changes [3]. Here we describe and characterize a processed, long non-coding RNA locus, *acaI*, that adds a new layer of complexity to the Jun-N-terminal kinase signaling, acting as a negative regulator of the pathway. *acaI* modulates

the expression of two key genes in the pathway: the scaffold protein Cka, and the transcription factor Aop. Together, they enable the proper level of Jun-N-terminal kinase pathway activation to occur to allow cell stretching and closure.

Introduction

A large fraction of the eukaryotic genome codes for non-coding RNAs (ncRNAs), which are very abundant and diverse, yet mostly uncharacterized and of unknown functions [4,5].

Nevertheless, some are critical players in gene expression regulation. Non-coding RNAs encompass different classes of molecules. The best-characterized ncRNAs are small RNAs. Broadly, small RNAs recruit silencing machinery to mRNAs to inhibit translation and/or target them for degradation [6]. Small crass characterization was facilitated because they base-pair with cognate mRNA targets, and interact with common protein complexes to regulate gene expression [7].

In contrast, long non coding RNAs (lncRNAs) encode a diverse group of ncRNAs, which may be part of different molecular complexes, and can stimulate or inhibit gene expression [8]. Recognized lncRNAs range from 200 nucleotides to several kilobases [9]. Since they do not have evident sequence motifs for annotation, their identification and relevance has remained elusive. In addition, many have low expression levels, hindering isolation and characterization. Next-generation RNA sequencing uncovered many lncRNAs (over 50% of transcribed species [5,10]), increasing dramatically their number and repertoire [11]. Despite this, in most cases contribution of lncRNAs to gene expression regulation or other still awaits genetic and functional validation.

In *Drosophila melanogaster* some lncRNAs have been annotated [12], and play important roles in gene expression, as in vertebrates [13]. In spite of extensive genetic screens,

forward genetics identification of lncRNAs has been very limited, as they are found to fine-tune gene expression with mild phenotypical contributions.

Here we characterize a *Drosophila* lncRNA with strong embryonic phenotypes and lethality. Mutations in this locus, *acaI*, result in partially penetrant dorsal closure (DC) defects due to Jun N-terminal kinase (JNK) signaling over-activation. This results in failure of DC, leading to a lethal dorsal open phenotype.

During DC, lateral epidermal sheets stretch over a dorsal extra-embryonic cell layer, the amnioserosa, and fuse at the dorsal midline [14]. The JNK signaling pathway regulates DC, and is activated at the dorsalmost row of epidermal cells, the leading edge cells (LE), which act as a signaling center for DC ([15], reviewed in [3]).

In these epidermal cells, JNK activation induces expression of cytoskeleton and adhesion regulators for cell stretching [16]. JNK activation at the LE spreads the morphogenetic rearrangement by inducing the signaling ligand *decapentaplegic (dpp)*, a fly homolog of vertebrate BMPs. Dpp signals to lateral epidermal cells and amnioserosa to promote cell shape changes [17,18]. This response induces stretching of lateral epithelia in absence of cell proliferation, and final zippering.

It is not known how JNK activation is triggered at the LE, nor completely known how LE restriction occurs. The JNK signaling pathway is an evolutionarily conserved, MAPK-type signaling pathway. It consists, at its core, of a cascade of kinases, from JN4K (the gene *misshapen* in flies), to JN3K (*slipper*), JN2K (*hemipterous*), and finally JNK proper (*basket*). Activated JNK—bound to a scaffold protein called Connector of kinase to AP1 (Cka)—, phosphorylates the transcription factor Jra (*Drosophila Jun*). Jra, together with Kayak (*Drosophila Fos*), constitute the AP-1 transcription complex activating JNK target genes. Besides Jra, JNK also phosphorylates Anterior open (Aop), leading to Aop nuclear export, de-repressing JNK target genes. The JNK pathway is required for orchestration of

embryonic dorsal closure, but also for wound healing and in response to certain stressful conditions [3].

During DC JNK activity is restrained from the lateral epidermis partly by *aop*, although this transcription factor also functions earlier in the tissue in a positive way by promoting epidermis differentiation, preventing ectopic mitoses [17]. The ‘*raw*-group genes’: *raw*, a pioneer protein, and *ribbon*, a transcription factor (*rib*, [19,20]) also restrict JNK activation in the lateral epithelia. Another member, *puckered* (*puc*), coding for a JNK phosphatase, acts in a feedback loop in the LE, dephosphorylating active JNK, and stopping signaling. JNK activation is also antagonized in the amnioserosa by *pebbled* (*peb*), which codes for a transcription factor [21].

We show here that *aca*/lncRNA partly mediates Raw JNK signaling antagonism in the lateral epidermis. *aca* partakes in regulating expression of the scaffold protein Cka [22]. This explains partly *raw* function (*raw* as an *aca* regulator), and provides a framework for JNK activity down-regulation at the lateral epidermis during DC. We find that mutations in *aca* also alter the expression of *aop*, balancing JNK activation. *Aca* also shows a genetic interaction with *Polycomb*, suggesting a relationship between *aca* and the Polycomb repressive complex. Overall, this provides a rationale for *aca* DC phenotypes.

Results

***aca* is a novel ‘dorsal open’ gene**

Mutations in fly JNK signaling genes — like *bsk*, the fly JNK gene [15], *Cka* [22], and *aop* [17]— lead to an embryonic lethal condition with a dorsal hole in the cuticle (Figure 1B–D).

This ‘dorsal open’ phenotype has been used to identify JNK and other DC genes [3].

We identified a lethal locus where a fraction of mutant embryos die with dorsal closure defects. We called it *aca*, or ‘boat’ in Náhuatl, due to the cuticular appearance of mutants.

Two alleles, *aca*¹ and *aca*² (Figure 1E–F), are lethal excisions of *P*{*KG09113*}, a viable and fertile P-element transposon insertion at 47A13 (Figure 1M''). Three more EMS alleles were isolated over *aca*¹ and *aca*² by lack of complementation (*aca*³, *aca*⁴, and *aca*⁵, Figure 1G–J). A sixth lethal mutant allele is a mapped P element insertion in the locus, *P*{*GS325ND3*} (Figure 1K–L and M''). All mutations are lethal, with embryonic, larval, and pupal phenocritical periods. No adults are ever observed. A fraction of mutant embryos have DC defects, with holes in either the dorsal or anterior ends of embryos (Figure 1E–L and S1A). Dorsal or anterior holes are the only cuticular defects seen in these mutants. *aca* mutants have an extended phenocritical period, since a fraction of mutant embryos die without cuticular defects, and finally another fraction of mutant embryos survive embryogenesis and die later during larval stages up to the beginning of pupariation. This means that *aca* is required at various times during development. Larval lethality varies from 10 to 50% depending on the allele studied, and pupal death from 3 to 40%. As stated, no adult homozygous mutant flies are ever recovered, except 1–2% adult *aca*⁵ escapers. In this work, we focus on the embryonic mutant phenotypes. Using these embryonic phenotypes, mutant alleles conform to an allelic series with *aca*⁵ as the strongest, and *aca*¹ as the weakest (Figure S1A).

***aca* maps to an intergenic unannotated region and to SD08925**

We used deficiencies uncovering *P*{*KG09113*} to map *aca* in complementation tests, and established a 100 kb interval where *aca* maps. This interval includes three annotated genes: *longitudinals lacking* (*lola*), *pipsqueak* (*psq*), and *CR45135* (Figure 1M). *aca* mutations complement *lola* and *psq* alleles (Table S1). Besides, *lola* and *psq* have different embryonic mutant phenotypes from *aca*, with no cuticular phenotypes, like dorsal or anterior holes ([23,24] and Figure S7A). *CR45135* is not characterized, but

partially overlaps a *lola* exon, so *CR45135* mutations should affect *lola*. Moreover, many *lola* lethal insertions overlap this gene [25].

A previous report showed that there is at least another locus whose mutation complements *lola* and *psq*, despite being unannotated [26]. This mutation, *I(2)00297*, suppresses the *peb*¹ heat-shock sensitive rough eye phenotype. *acal* mutant alleles also suppress, in our experimental conditions, this subtle but clear phenotype (Figure S1B). This suggests that *acal* and *I(2)00297* are allelic, and is independent evidence of a lethal locus between *lola* and *psq*.

Another paper independently reports the existence of a long non-coding transcript approximately 4 kb from the start of *lola* [23]. The size of this transcript is stated as 4 kb, but this was an approximation, as the evidence supports a maximum size of 3.4 Kb, since this cDNA hybridized to a 2.8 and a 0.6 Kb neighboring restriction fragments in Southern blots ([23], and Edward Giniger, personal communication).

An EST in Flybase, SD08925, sequenced partially at the 5' end, maps 3.8 kb away from *lola*, precisely where Giniger et al. report the location of their 'alpha' long non-coding transcript [23]. We believe this transcript is the same as SD08925. We sequenced fully this EST (Genbank accession number # KJ598082). SD08925 is 2.3 kb long, poly-adenylated, and a single exon. Its genomic 3' end bears an A-rich stretch (Figure 1M''), characteristic of poly-adenylation sites [27]. We also obtained a 2.3 kb weak Northern blot signal (compared to control *Rp49*), demonstrating SD08925 expression, and confirming that SD08925 is a full-length cDNA. This band was detected throughout the life cycle and was nearly absent in the $\Delta 18$ deficiency strain uncovering the locus by semi-quantitative RT-PCR (Figure S1C-D). Consistent with the weak Northern signal, RNA-seq and microarray data show low SD08925 expression levels [28,29].

We sequenced 4.7 kb of the SD08925 genomic region in *acaI* mutant and control lines. In these and following experiments, we selected and separated mutant embryos from heterozygous controls by lack of embryonic GFP-expression due to a balancer chromosome (see Materials and Methods). Within this region, we found a 20 base pair insertion in *acaI*¹. The *acaI*¹ lesion is 1031 bp away from *P{KG09113}*, at +931 of the cDNA, a position conserved in closely related species. Similarly, we found a 2 bp deletion 1630 bp away from *P{KG09113}* within the 5' end of SD08925 in *acaI*², in a conserved region (Figure 1M'' and 3A). In both cases, no trace of the original P element was found. We reasoned that both, found 1-2 Kb away from the original insertion site (which is in itself viable and fertile), are likely consequences of P-element imprecise excisions and repair, due to nicking and repair of the DNA break, leading to lethality, and responsible for the *acaI*¹ and *acaI*² mutant phenotypes, respectively. In both cases, the changes are not present in any of the other strains (genome reference assembly, *yw* wild type control, parental strain, or other *acaI* mutants). *acaI*⁶ is a P-element insertion mapping to the locus, 3 Kb 5' from the transcription start site. We found no differences in the sequence in the 4.7 kb genomic region sequenced centered around the SD08925 transcribed region for *acaI*³, *acaI*⁴, and *acaI*⁵. The sequenced genomic region includes the whole transcript, plus some neighboring 5' and 3' sequences (Figure 1M''), suggesting that mutations in *acaI*³, *acaI*⁴, and *acaI*⁵ lie outside the transcript. This is consistent with a regulatory nature for these alleles, rather than molecular lesions within the transcribed region, like *acaI*⁶.

We performed a genomic rescue experiment (Figure 1M'–N), rescuing fully the embryonic lethality of *acaI*¹ and *acaI*² mutants with a ~20 kb genomic construct called *178D09*. *178D09* spans a small portion of the 5' region of *lola*, wholly the SD08925 transcript region, plus ~7 kb upstream of SD08925 in the intergenic region between SD08925 and *psq* (Figure 1M'). Besides the 5'-most exon of *lola*, which is part of the untranslated 5'

leader sequence of some *lola* splice variants and *CR45135*, no other transcript is included, except SD08925. SD08925 expression levels are not changed in rescued embryos versus controls, presumably due to endogenous regulatory sequences maintaining overall low expression levels (Figure S1E). SD08925 is conserved in eleven *Drosophila* species surveyed, and recognizable in *A. gambiae* (Figure 1O; 3A). Together, these data are consistent with a low-expression locus involved in DC.

We quantified SD08925 expression during DC in *aca^{f2}* and *aca^{f5}* mutant embryos by qRT-PCR. *aca^{f2}* expression is similar to wild type, but *aca^{f5}* expression is significantly reduced (Figure 2A). This is consistent with *aca^{f5}* being a regulatory mutant, although other interpretations are possible. To ensure consistency, whenever possible we performed experiments with multiple *aca/* mutant alleles, with similar results. These data are also consistent with SD08925 coding for *aca/*. In contrast, using primers that detect all *lola* isoforms, or all *psq* isoforms (both loci have alternative splicing) no significant differences in expression levels are seen in *aca^{f1}*, *aca^{f2}*, *aca^{f5}*, and *aca^{f6}* (Figure S7C).

In order to more rigorously test whether SD08925 is *aca/*, we generated a UAS transgene containing only the complete SD08925 cDNA (2.3 kb). We expressed this construct in *aca^{f5}* mutants, using the *69B* ectodermal driver. This resulted in significant rescue of *aca^{f5}* DC defects and reduction of embryonic lethality (Figure 2B–B’’). *69B* over-expression of *UAS-aca/* in *aca^{f5}* mutants significantly increased SD08925 expression (40%, Figure S2A). We also show that *pnr^{MD237} gal4 (pnr-gal4)* driven expression of SD08925 rescues DC defects in *aca^{f5}* (Figure 2B). Regardless of the nature of *aca^{f5}*, augmenting SD08925 expression in the mutant significantly rescues the embryonic phenotypes, arguing that reduction of *aca/* expression is responsible for the *aca^{f5}* DC and embryonic lethality phenotypes. Taken together, (1) the complete lack of complementation and similar mutant phenotypes of all six *aca/* alleles to each other (but complementation to and dissimilar to

mutant phenotypes of the neighboring *lola* and *psq* loci), (2) the molecular mapping of *aca1*¹, *aca2*², and *aca5*⁵ to the SD08925 locus, (3) the significant genomic and UAS-*aca* rescues for *aca1*¹, *aca2*², and *aca5*⁵, and (4) the significantly reduced SD08925 expression in *aca5*⁵ both by qRT-PCR and *in situ* hybridization (see below), compared to no differences in *lola* and *psq* expression levels in *aca1*¹, *aca2*², *aca5*⁵, and *aca6*⁶ establish the SD08925 locus as the *aca* locus.

***aca* embryonic expression**

In situ hybridization with SD08925 in wild type embryos revealed a dynamic expression pattern, mainly in two tissues: the lateral epidermis and the central nervous system. At early stages, the transcript is detectable throughout the embryo but falls at gastrulation (Figure 2D). From germband retraction to DC, expression is seen in germband derivatives, mainly the lateral epidermis and nervous system (Figure 2D). This is consistent with a role in DC and the UAS-*aca* rescue in the ectoderm and/or lateral epidermis (Figure 2B). Later, expression appears in the mesoderm, but the bulk of expression is in the condensing nervous system and closing lateral epithelia. At the end of embryogenesis, expression occurs in the nervous system (Figure 2D).

In *aca5*⁵ mutant embryos, expression is significantly reduced in the lateral epithelium during DC, consistent with *aca5*⁵ being a regulatory mutant and with the UAS rescue (Figure 2B–D). Nervous system expression is not altered in *aca5*⁵ during DC stages, but decreases significantly later (Figure S2B–C).

***aca* is a processed, long non-coding RNA**

Is SD08925, from now on referred to as the *aca/* transcript, translated? The *aca/* transcript is 2.3 kb long and could potentially code for protein(s). The locus is also evolutionarily conserved in other dipteran species (Figure 3A), but not outside Diptera.

We find that in the dipteran species examined, the locus is devoid of conserved open reading frames (ORFs), sporting only variable, non-conserved ORFs ranging from 33 up to 243 nucleotides in size (Figure S3A), even though other regions of the transcript are conserved (Figure 3A; S3B). Unlike short ORF-bearing transcripts like *polished rice* (*pri*, [30]), the putative short ORFs in SD08925 and homologues have no common motifs. The deduced protein sequences of these ORFs in *D. melanogaster* show no homology with annotated proteins, and are not present in Drosophila proteomics databases (see Materials and Methods). Using an algorithm that measures coding potential [31], based on six different criteria [(1) feasibility of ORFs, (2) coverage of ORFs within transcript, (3) presence of in-frame initiation and stop codons, (4) number of hits in BLASTX, (5) high quality in any given BLASTX hit, and (6) whether any given hit is in frame with the predicted ORFs], we determined that *aca/* has an extremely low coding potential, similar to other characterized long non-coding RNAs (Figure 3B).

Genes harboring short ORFs have been erroneously classified as long non-coding RNAs, and later found to code for small peptides [30,32,33]. Does *aca/* code for short, translated ORFs? Genes coding for short ORFs still have a protein coding score, unlike *aca/* (Figure 3B), and are exported to the cytoplasm for translation. In contrast, many non-coding RNAs reside in the nucleus. We detected *aca/* transcripts enrichment in a nuclear fraction, different from *Rp49*, a protein-coding mRNA (Figure 3C–D). As control, we also detected a small enrichment in the nuclear fraction of *pre-bantam* (*ban*), a well-known miRNA precursor. The enrichment is small, likely because it is quickly processed to mature *ban*. *aca/* nuclear enrichment also suggests a non-coding nature.

High-throughput RNA sequencing projects have deeply annotated small RNAs in the *Drosophila* genome [34]. Within *acal*, we found two groups of sequence reads reported to appear under various experimental conditions that did not qualify as functional small RNAs. We designated these groups of reads as *acal*-A and *acal*-C (Figure 3A), and performed small RNA Northern blotting, reasoning these could be the mature products of the *acal* transcript. With this Northern protocol, larger RNA fragments are not detected, but small RNA species are well separated. Using the *acal*-A probe, we found evidence of *acal* fragmentation throughout the life cycle of the fly, particularly during pupal stages (Figure 3E; S3C). Instead of a roughly 22-nucleotide fragment, we found a group of small bands from about 50 to 118 nucleotides (Figure 3E). These bands are not detectable in regular agarose gels due to their size. In contrast, *acal*-C did not reveal evidence of processing (Figure S3C). We used two additional probes, *acal*-B and *acal*-D, to look for evidence of further processing. *acal*-D revealed no processing (Figure S3C), but *acal*-B revealed at least a 59 nucleotides-long fragment (Figure 3E). Both *acal*-A and *acal*-B fall within conserved positions of the gene at the 3' end (Figure 3A); *acal*-B lies within a 60 nucleotide-long conserved region, a size coincidental with the band we found in small RNA Northern blots (for detail, see Figure S3B). In conclusion, we have evidence that the 3' half of the *acal* transcript undergoes processing, whereas the 5' half does not. Unfortunately, as the signal we detected was mostly from pupae, we could not test mutants, because mutants die as embryos and larvae, and never reach pupation proper. Taken together, we propose *acal* is an unconventional long non-coding RNA partially processed into small fragments.

***acal* down-regulates JNK signaling during DC**

We next studied JNK signaling, the DC trigger, to characterize DC defects in *aca/*. We tracked and quantitated expression of a DsRed reporter under control of an AP-1 response element, TRE (Tetradecanoylphorbol acetate Response Element, see Figure 4A and [35]). In parallel, we tagged cellular membranes using sGMCA, a fusion protein of the actin-binding domain of Moesin and GFP [36]. These constructs were expressed in an *aca/* mutant and wild type backgrounds. In stage 13 wild type embryos, TRE-DsRed marks only the LE [a very faint amnioserosa DsRed positive staining is also present (Figure 4B, 4B'')]. At this stage, lateral epidermal cells are stretching towards the dorsal side (Figure 4B, B'). In *aca/* mutants, the TRE-DsRed is ectopically expressed in the lateral epidermis and in some amnioserosa cells (Figure 4C–E). Quantitation of the signal uncovers significantly higher JNK activation levels in the lateral epidermis of *aca/* mutants, and a significantly higher sGMCA signal, consistent with the observed mis-stretching and local accumulation of lateral epithelial cells at the border of the epithelium during DC (Figure 4E). Ectopic JNK activation coincides with mis-stretching of the lateral epidermis, seen as a contraction of the epithelium where JNK ectopic activation occurs (Figure 4C–D). Similar results are seen at later DC stages (Figure S4A–D). JNK ectopic activation in the amnioserosa of *aca/* mutants is likely a consequence of lateral epithelium defects, as *aca/* rescue solely in the lateral epithelium rescues DC defects. Significant ectopic JNK reporter activity in the lateral epidermis underneath the leading edge cells and in the amnioserosa was also observed using another weaker *aca/* allele (*aca^f*) (Figure S4E–G), with a GFP-based TRE JNK activity reporter [35]. Results for *aca^f* are normalized for nuclear density. This strongly suggests that *aca/* DC defects are due to JNK gain-of-function signaling in more lateral epidermal cells, resulting in disorganized stretching.

As a second and independent means to study the consequences of *aca/* mutations in JNK activity, we over-activated JNK signaling in *aca/* mutant and control embryos by expressing

both a constitutively active form of the JNK kinase, Hep (Hep^{ACT}), and a wild type version of the same gene (Hep) in the ectoderm (using *69B-gal4*). We found that expressing hep^{ACT} in *aca1* heterozygotes results in significantly stronger and more penetrant closure defects compared to wild type embryos expressing hep^{ACT} (Figure S4I), exacerbating the hep^{ACT} over-expression phenotypes and supporting the notion that *aca1* mutants promote increased JNK activity. We also see the appearance of a new phenotype, ‘early’ embryonic death, where embryos die without forming a cuticle. Over-expression of *hep* in *aca1* heterozygotes has milder effects, but significantly leads to an increase in death of fully formed embryos in *aca1* heterozygotes, compared to wild type embryos over-expressing Hep (Figure S4H). Homozygosity for *aca1⁵* together with hep^{ACT} over-expression, or for *aca1²* together with *hep* over-expression, lead to significant further increases of the respective mutant phenotypes (Figure S4H-I). These *hep* gain-of-function experiments together with *aca1* loss-of-functions are all consistent with a role for *aca1* in negative regulation of JNK activity during dorsal closure in the lateral epithelium.

We then corroborated this in two other independent ways: using a second JNK signaling reporter, and performing genetic interactions with JNK mutants. If *aca1* acts to negatively regulate JNK activity, then in *aca1* mutants we should see enhanced JNK reporter line expression (similar to the TRE results, above), or suppression of *aca1* phenotypes in partial JNK loss-of-function.

puc is a transcriptional target of JNK signaling coding for a JNK phosphatase, a negative feedback loop that halts JNK. *puc^{E69}* is a *lacZ* enhancer trap allele (from now on referred to as *puc^{lacZ}*). Heterozygosity for *puc^{lacZ}* provides a JNK sensitive signaling reporter, and a sensitized background disrupting the feedback loop [20]. Despite decreased *puc* dosage in *puc^{lacZ}* heterozygotes, in approximately 90% of embryos, JNK signaling is restricted to LE (Figure 4F–H). In *aca1* homozygotes (*aca1¹*, *aca1²*, or *aca1⁵*), heterozygous for *puc^{lacZ}*, the

proportion of embryos with ectopic *puc*^{lacZ} expression in amnioserosa and lateral epidermis significantly grows to around 50% or more, similar to JNK ectopic activation with TRE-constructs (Figure 4G–H and S4A–G).

acal mutants heterozygous for *puc*^{lacZ} also show more extreme cuticle phenotypes. This is consistent with a potentiation of the *puc* effect on *acal* phenotypes, both genes acting to counteract JNK signaling (Figure S5A).

Finally, we reduced JNK dosage to see whether it would ameliorate *acal* mutant phenotypes. Heterozygosity for *bsk*¹, a JNK loss-of-function mutation, significantly suppresses *acal*⁵ phenotypes (Figure 4I), meaning that JNK signaling over-activation of *acal* mutants depends on JNK itself. Conversely, *acal*⁵ heterozygosity does not alter the *bsk*¹ mutant phenotype (Figure 4I), consistent with *acal* mutant phenotypes dependent on JNK. We confirmed this genetic interaction in a different genetic background and found similar results (Figure S5B). Taken all data together, the (1) two types of JNK reporters (TRE-based and *puc*^{lacZ}) tested with several *acal* alleles, and (2) genetic interactions for several *acal* alleles with *bsk* and *puc* (loss-of-function), and *hep* (ectopic expression), all establish *acal* as a negative regulator of JNK signaling.

We next tested if *acal* mutations interact with dorsal open group mutations known to act in the amnioserosa, in order to determine if *acal* could have a function in this tissue. We used *peb*³⁰⁸, a hypomorphic mutation that affects *peb* expression in the amnioserosa, and, consequently, DC [21]. The *peb*³⁰⁸ DC defects were not modified in an *acal* sensitized background, consistent with *acal* required only in the lateral epidermis (Figure S5C).

The pioneer protein Raw and *acal* act together to counteract JNK signaling

acal might interact with other negative regulators of JNK signaling. *raw*, a conserved gene of unknown molecular function, counters JNK signaling in the lateral epithelium, like *acal*.

raw and *acaI* have very similar expression patterns during DC (Figure 2D for *acaI*; for *raw* see [19]). *Raw* function is genetically positioned at the level of JNK [37], like *acaI*, and *Jra* [19]. *raw* mutant cuticular phenotypes are stronger than *acaI*, with dorsalized embryos consequence of *dpp* ectopic expression at the lateral epidermis (see Figure 5A–B and Figure 6E–F, [19]).

raw mutants have *dpp* ectopic expression during DC in rows of cells ventral to the leading edge ([19] and Figure S6C). *acaI* ectopic expression in the posterior part of each segment of these embryos (*en-gal4* driver) reduces cell-autonomously *dpp* over expression (Figure S6D). This is consistent with *acaI* acting to inhibit JNK pathway on the lateral epithelium during DC. On their own, *acaI* mutant embryos are not dorsalized (Figure 1E–L), and show no clear ectopic *dpp* over-expression (Figure S6A–B), yet at least under conditions of *dpp* over-expression, *acaI* can repress *dpp*. Altogether, this argues that *acaI* is a negative regulator of JNK activity, and that it has a subtler effect to that of *raw*.

We analysed genetic interactions between *acaI* and *raw*. Heterozygosity for *raw*² increases the embryonic lethality of *acaI*⁵ embryos, with a quarter phenocopying the *raw*² dorsalized phenotype ('*raw*-like phenotype', Figure 5C). *acaI*⁵ heterozygosity does not enhance the already strong *raw*² homozygous condition, and double homozygotes do not show a stronger phenotype. Similar results are observed between *acaI*² and *raw*¹ (Figure S6E).

These genetic interactions are consistent with *acaI* acting downstream of *raw*.

We looked for *acaI* expression in *raw* mutants, and found that *acaI* lateral epidermis expression is significantly decreased in these embryos (Figure 5D–E). This suggests that *raw* regulates *acaI* lateral epidermis expression. Nervous system *acaI* expression is unchanged in these *raw* mutant embryos, acting as an internal control. This also ties in with *acaI*⁵ being a regulatory mutant with reduced lateral epithelium expression (Figure 2D), and suggests a *raw* dependent *acaI* control module for the lateral epidermis.

Consistent with *acal* acting downstream of *raw*, as a *raw* effector, *69B-gal4 UAS-acal* expression partially rescues the *raw* dorsalized cuticle phenotypes (Figure S6F–H), as expected from the *dpp* in situ hybridization in *raw* mutants over-expressing *acal* (Figure S6D). Altogether, these results indicate that *acal* mediates part of Raw function during DC. *raw* over-expression in the lateral epidermis of wild type embryos has no effect in DC, in spite of the strong *raw* loss-of-function phenotype [19]. Likewise, *acal* over-expression in wild type embryos has no DC effects (embryonic lethality of *69B>acal* embryos is around 1%, n=791; also *pnr^{MD237}>acal* shows no lethality or overt phenotypes, with equal numbers of control and over-expression siblings, n=104). These lack of gain-of-function phenotypes for both genes indicate that *raw/acal* JNK negative regulation has a limit beyond which it cannot be exercised further during dorsal closure, suggesting other regulatory mechanisms might act in concert.

Thoracic closure during metamorphosis also depends on JNK signaling, much like DC does [38,39] Altering JNK signaling at the notum anlagen results in an antero-posterior cleft spanning the adult thorax (Figure 5G–H). Some JNK signaling loss-of-function conditions have cleft thoraces [40,41]. This process has been used also in miss-expression screens for JNK signaling, where gain-of-function phenotypes are repeatedly encountered [42]. We thus used thorax closure as a model where we might be able to study *acal* and *raw* gain-of-function conditions. For this, we hypothesized that *acal* and/or *raw* over-expression at the notum anlagen could result in a cleft phenotype, using *pnr-gal4* (expressed at the dorsal heminota, equivalent to the lateral epidermis, Figure 5F–H). *pnr-gal4* also provides a sensitized genetic background, as heterozygosity for this allele generates a mild thoracic phenotype, increasing the sensitivity of the assay [41]. Thoracic cleft was not enhanced by *raw* notum over-expression, as quantified by a ‘Thoracic cleft’ index (Figure 5I–J; Materials and Methods). Similar results were observed

for RawRA or RawRB isoforms, generated by alternative splicing (Figure 5J). In contrast, two copies of the *UAS-acal* transgene had a significant effect (one copy was ineffective; Figure 5H–J). If *raw* over-expression induces *acal*, adding more *acal* would then lead to a more extreme phenotype, as adding two transgene copies of *acal* do in the dorsal thorax. Simultaneous over-expression of *acal* and *raw* single copy transgenes had a significant synergistic effect, inducing stronger cleft formation (Figure 5J). Both *raw* isoforms show synergism with *acal*. This is consistent with *raw* positively regulating *acal*, and both counteracting JNK signaling. Taken together, these results show that *acal* and Raw act together to counteract JNK signaling, *acal* downstream of *raw*. This is consistent with Raw acting at the level of JNK and/or Jra, as our experiments with *acal* point.

Expression of *Cka*, a JNK scaffold, is regulated by Raw and *acal*

Both *raw* and *acal* act genetically at the level of JNK (Figure 4I; [37]). Yet *raw* has been shown to act also at the level of Jra [19]. Could *raw* do both? Could *raw* via *acal* modulate a mediator of both JNK and Jra, for example? *Cka* is a scaffold protein that interacts with JNK and Jra [22]. We tested whether *acal* and *Cka* interact genetically. *acal* DC defects are dependent on *Cka*, since heterozygosity for *Cka*¹ rescues the *acal* mutant phenotype (Figure 6A). This is in fact a stronger genetic interaction than that seen with *bsk* (JNK) mutants. Moreover, *Cka* expression is similarly significantly increased (to 50% above control values) in both *acal* and *raw* mutants (Figure 6B). Conversely, *acal* embryonic over-expression (gain-of-function) leads to a significant reduction in *Cka* expression in otherwise wild type embryos, although this condition bears no observable phenotypic consequences (Figure 7D).

To test the *raw-acal-Cka* genetic pathway, we silenced *Cka* to see if it suffices to rescue the *raw* mutant phenotype, using again the strong *raw* mutation-dependent *dpp* over-

expression phenotype as readout (Figure 6E–F). If this pathway is true, expressing *Cka* RNAi in the *en-gal4* expression pattern in *raw* mutants would silence *dpp* expression only at posterior compartments of each segment, the anterior compartments serving as internal controls. We found that *Cka* knockdown suppresses cell-autonomously *raw* ectopic *dpp* expression (Figure 6F versus 6H), similar to rescuing *raw* function with *UAS-rawRA* (Figure 6F–G). Taken together, both the loss-of-function as well as the ectopic expression results argue in favor of *raw* acting through *acal* down-regulating JNK signaling by regulating *Cka* expression, and accommodates the apparently conflicting results that *raw* acts at the JNK and/or Jun levels. Genetic interactions do not imply direct interactions, and so, *acal*, as a *raw* mediator, could act indirectly on *Cka* and regulate in this way JNK and Jra.

Cka sole over-expression should alter DC. Using a heat-shock inducible *Cka*, *hs-Cka* [22], we found that 29°C treatment of embryos throughout development significantly induces DC defects (Figure 6C). Heat-shock induction indeed increases *Cka* expression (Figure 6D). Taken together, these results define a novel regulatory path for JNK signaling, *raw* counteracting *Cka* expression through *acal*.

***acal* fine-tunes DC by regulating *aop* expression**

Does *acal* interact with other DC regulators? *Aop* serves at least two functions during DC. In the lateral epidermal cells, *Aop* promotes tissue differentiation by preventing ectopic mitoses. As an extension, in the LE, it has a second function preventing ectopic and precocious expression of JNK activity and of AP-1 target genes, and thus, acting against dorsal closure, an activity countered by JNK via phosphorylation. Hence, over-expression of a constitutively active *Aop* (*aop^{ACT}*) that cannot be inactivated by JNK in the LE, results in DC defects due to lack of JNK targets expression. On the other hand, *aop* loss-of-

function leads to anterior holes in the cuticle and faulty DC resulting from both ectopic mitoses in the tissue, and JNK over-activation. The wild type stretching lateral epithelium is a post-mitotic, competent tissue for DC in part due to *aop* dual roles (i.e., mitosis and precocious DC repression [17]). So, *aop* regulation can be a nodal, sensitive point for DC regulation. Genetic analyses show that *acaI* and *aop* interact. *acaI* mutations powerfully rescue *aop* loss-of-function, but *aop* loss-of-function does not alter *acaI* mutants, showing that *acaI* acts above or at the level of *aop* (Figure 7A). Indeed, we found that *aop* expression is significantly increased in *acaI* and *raw* mutants (Figure 7B). Conversely, *acaI* over-expression in wild type embryos leads to a significant reduction of *aop* expression (Figure 7D), without phenotypic consequences (similar to *Cka*), consistent with a modulatory role for *acaI*.

In accordance with an *acaI* role as JNK negative regulator, *aop*^{ACT} that presumably locks in the post-mitotic nature of the lateral epithelia, while preventing JNK target gene expression, is countered by *acaI* mutants, more so if *aop*^{ACT} expression is less widespread (Figure 7C). A possible explanation for the puzzling interactions between *acaI* and *aop*, resides in the dual nature of *aop* function in the LE and the lateral epidermis. In wild type embryos, *aop* is only phosphorylated and inactivated at the LE by JNK. Expressing *aop*^{ACT} conceivably affects only the JNK-regulated function of *aop* (i.e., its role in the LE). Thus, the JNK over-activation seen in *acaI* mutants might compensate partially for LE *aop*^{ACT}. In contrast, in *aop* mutants, low *aop* levels throughout the epidermis might be partially restored to more wild type levels by *acaI* loss-of-function conditions, as *acaI* mutants over-express *aop*. Taken together, by regulating *aop* expression, *acaI* can powerfully influence DC. In summary, we show that *acaI* critically regulates both positive (*Cka*) and positive/negative (*aop*) components of JNK signaling.

***acaI* acts in trans during DC**

How does *acaI* regulate expression of other genes? One possibility is that *acaI* acts in *cis*, exerting an effect on neighboring genes, something reported for other lncRNAs [13,43]. To study this possibility, we made use of a Gene Search insertion line, a transposon that can lead to ectopic expression outwards in both directions from the insertion site. *GS88A8* maps in the same interval as *acaI*. Using *gal4* lines, *GS88A8* generates ectopic expression of neighboring genes, namely *lola* and *psq* [44]. We used the *69B-gal4* line to drive ectopic expression from *GS88A8* in the embryonic ectoderm. If *acaI* negatively regulates neighboring genes (*lola* and *psq*) and they are relevant for DC, then ectopic expression from *GS88A8* should phenocopy *acaI* mutant phenotypes. Instead, this condition mainly leads to larval and pupal lethality plus some adult escapers (Figure S7B), with hardly any embryonic phenotypes, consistent with unaltered *lola* and *psq* expression profiles in *acaI* mutants (Figure S8C). Moreover, *acaI* mutations complement *lola* and *psq* mutations (Table S1), and mutations in these genes lead to different embryonic phenotypes (Figure S7A). Altogether, we conclude that it is not very likely that *acaI* acts in *cis* during DC.

Some long non-coding RNAs work in trans. One possibility is as part of chromatin remodeling complexes, for instance, although other mechanisms are possible [45,46]. In order to explore whether *acaI* might function through remodeling complexes, we performed genetic interactions with *Polycomb*³ (*Pc*³) mutants. *Pc* is a critical member of the *Pc* chromatin repressive complex 1 (PRC1, [47]). *acaI* and *Pc*³ double heterozygotes show novel strong wing defects [significantly twisted wings, with reduced posterior territory (Figure S8A and F)]. Consistently, this interaction is seen with *raw* mutant alleles, albeit to a lesser degree (Figure S8B). *Cka* and *aop* do not show this interaction (Figure S8C–D). *acaI*⁵ also significantly enhances the *Pc*³ extra sex combs phenotype, as does *raw*¹ (*aop*¹ reduces extra sex combs, presumably due to a repressive function in sex combs

formation, Figure S8G–I). These non-allelic non-complementation results are reminiscent of the ‘extended-wing’ phenotype used to detect direct interactors / components of other chromatin remodeling complexes, like the *brahma* or *kismet* complexes [48], suggesting a common regulatory pathway for *acal*, downstream of *raw*, with PRC1. The fact that *raw* and *acal* show the same genetic interactions with *Pc*, but not *Cka* and *aop*, underscores the fact that *Cka* and *aop* are downstream from the former two (*raw* and *acal*), as regulatory targets in the same signaling cascade.

Discussion

Several lines of evidence show that *acal* is a putative nuclear, processed, lncRNA, whose mutations are homozygous lethal, with requirements in DC. We show that *acal* mutants (three of which map molecularly to the SD08925, or *acal*, locus) fail to complement each other, but complement neighboring genes (*lola* and *psq*), regulate the same downstream genes (*Cka* and *aop*), have the same JNK negative regulation function [evidenced by two different reporter gene systems and genetic interactions with several JNK pathway component (*bsk*, *hep*, and *Cka*) and regulator genes (*puc*, *raw*, and *aop*)], are rescued by the SD08925 locus, with one allele having significantly reduced SD08925 expression, and all having similar mutant phenotypes and phenocritical periods. The locus produces a nuclear 2.3 Kb transcript with low coding potential that is processed into smaller pieces. Altogether, these data establish *acal* as a lncRNA locus in DC.

lncRNAs are ubiquitous species, probably tied to most biological processes. Yet, few have been characterized [49]. They fine-tune target abundance in multiple ways [4]. lncRNA species probably form diverse complexes with multiple mechanisms of action, and are not a rigorously defined class of molecules. Identifying lncRNA mutants with clear phenotypes in genetic models is a clear way forward. *acal* has an extremely low coding potential and

no evolutionarily conserved ORFs. The putative *acal* ORFs show no homology to known peptides / proteins. Unlike short-ORF bearing transcripts [50], these putative ORFs have no sequence redundancy among them, reliable Kozak sequences, or high coding potential. This places *acal* as a non-translated transcript.

acal is a Dipteran-conserved locus. As many lncRNAs, it is not broadly conserved across species. *acal* RNA is processed into smaller fragments. These fragments have probably been missed in high-throughput sequencing projects due to RNA cut-off sizes [34]. *acal* functions in *trans* to regulate DC, as DC defects can be rescued in *trans* with a wild type full-length cDNA targeted to the epidermis.

acal foci for DC is the lateral epidermis. JNK loss-of-function result in lack or reduction of lateral epidermal cells stretching. In contrast, negative regulators, such as *peb*, *puc*, and *raw* also cause DC defects, due to disorganized and / or precocious cell stretching [3]. In *acal* mutants, cells also stretch in a disorganized manner. Predictably, reducing *bsk* gene dosage significantly reduces *acal* defects in DC, and JNK activity monitors show enhanced JNK function in *acal* mutants. This prompted study of *acal* and other negative regulators. *raw* male gonad morphogenesis defects are ameliorated by *bsk* gene dosage reduction [37]. *acal* and *raw* collaborate to down-regulate JNK signaling at the lateral epidermis. In situ hybridization experiments, embryonic genetic interactions, and *raw* and *acal* over-expression studies in the thorax, put *raw* upstream of *acal*, yet they do not strictly phenocopy. This means that *raw* has other effectors. *raw* mutant embryos are dorsalized due to strong ectopic *dpp* expression in the lateral epidermis [19]. *acal* mutants do not dorsalize or show overt *dpp* misregulation. Furthermore, since Raw is localized in the cytoplasm, and *acal* is present in the nucleus, it is reasonable to assume that Raw regulates *acal* expression indirectly. Over-expression of either *raw* or *acal* in wild type embryos has no discernible effect on DC ([19] and this work), yet simultaneous over-

expression in the thorax disrupts thorax closure, and *acaI* over-expression reduces both *Cka* and *aop* transcript levels.

Cka expression is elevated in *raw* and *acaI* mutants. Genetically decreasing *Cka* levels rescues DC defects in *raw* and *acaI* mutants. Consistently, *Cka* over-expression itself causes DC defects. Work in the mammalian *Cka* functional homologue JIP-3 has shown this scaffold protein up-regulated under stress conditions. JIP-3 depletion and over-expression directly influence JNK activity [51]. Together with our results, these findings show that JNK scaffolds are an important point for JNK regulation, since augmenting scaffold availability augments JNK activity. In fact, this has been demonstrated biochemically for *Cka* [22].

Another critical JNK regulatory point by *acaI* is *aop*. *aop* is also over-expressed in *acaI* mutants, and down-regulated in *acaI* over-expression. *aop* plays a complex role in DC making the tissue ready early, before DC, by preventing mitosis and early activation of JNK targets. For this, *Aop* function is required in the LE and lateral epidermal cells ventral to the LE [17]. Later, *aop* is inhibited by the JNK pathway only in the LE, allowing target gene expression there. In cells ventral to the LE, *acaI* (together with *raw*) prevents JNK activation. In these cells there is no JNK activity to inhibit *aop*, yet *aop* expression regulation must be effected. This may be accomplished by *acaI* (and *raw*). Thus, controlling *aop* levels, like *Cka* levels, may be a critical point for DC. For both genes, *acaI* acts genetically as a repressor, with the net result of allowing JNK activity only in the LE in wild type.

In *acaI* mutants, *Cka* over-expression leads to JNK ectopic activation in more lateral epithelium cells. However, the fact that *aop* is also over-expressed in *acaI* mutants may mask a stronger JNK over-activation, as JNK signaling may inhibit at least in part *Aop*

function, Aop being a JNK direct target. Future work will focus on how *acaI* fine-tunes these signaling genes (Figure 8).

We show here that *acaI* function modifies gene expression. Whether this is direct, as has been proposed for other lncRNAs [47,52], or is done in some other fashion, is not yet clear. *acaI* interacts genetically with *Pc* (*raw*, that regulates *acaI*, also interacts with *Pc*).

This opens the interesting possibility that *acaI* acts directly with chromatin remodeling complexes, as has been demonstrated for other *Pc* interactors [44,53-55]. Yet other possibilities and/or indirect modes are clearly plausible.

In conclusion, we show that a lncRNA locus is required for DC regulation and JNK signaling. lncRNAs have not been implicated before in JNK signaling, and hence, this adds a new layer of control in JNK regulation.

Materials and Methods

For detailed protocols, please refer to Protocol S1.

Fly husbandry

Detailed description of stocks is available in Protocol S1 Information. Crosses were done at 25°C under standard conditions. For heat-shock treatments (*hs-Cka* and *peb*¹ experiments), animals were maintained at 29°C throughout development.

Cuticle preparations

Mutant embryos were processed as in [56]. Cuticles were examined under a dark field microscope.

Molecular mapping and rescue

4.7 kb of genomic DNA encompassing the *aca* locus of homozygous embryos was PCR amplified, cloned, and sequenced. The SD08925 clone was sequenced fully. A genomic (*178D09*) and a UAS-cDNA (*UAS-aca*) rescue constructs were synthesized and employed.

In situ hybridization and LacZ staining

For in situ hybridization, embryos were fixed, hybridized with digoxigenin-labeled RNA probes, and developed with alkaline phosphatase-NBT/BCIP. Pixel intensity was quantified using ImageJ. For LacZ staining, embryos were fixed and developed with X-Gal.

Northern blots

Northern blots were done according to standard procedures [57]. Small RNA Northern blots were resolved by PAGE, and hybridized with labeled DNA oligonucleotides.

Nuclear fraction preparation

Embryos were dechorionated and processed for nuclei low-salt extraction by centrifugation. Supernatant was recovered as the cytoplasmic fraction. Both fractions were homogenized in TRIzol.

cDNA synthesis, semi-quantitative PCR, and real time PCR

RNA was purified and retro-transcribed with M-MLV reverse transcriptase. Semi-quantitative PCR and real time PCR were done by standard methods. Densitometry analysis was done using ImageJ. Primers used are listed in Table S2.

Fluorescence microscopy

Z-stacks of embryos undergoing DC were obtained using a Zeiss LSM 780 microscope and processed using ImageJ. Fluorescence intensity was calculated using ImageJ.

Scanning Electron Microscopy

For imaging eyes and thoraces, animals were cold anesthetized, attached to SEM stubs with carbon paint and glue, and imaged under high vacuum in a JEOL JSM-6060.

Thoracic cleft index and wing angle quantification.

Measurements were done with iVision software.

Adult Leg Preparation

Adult male thoraces were digested with potassium hydroxide and mounted for viewing and quantification of sex combs.

Bioinformatics

acal homologous sequences were extracted from the Flybase Genome Browser [58]. Multiple sequence alignments were done with the CLC sequence viewer software (<http://www.clcbio.com>). Putative translated ORFs were analyzed with BLAST and compared in the Drosophila PeptideAtlas server [59]. Protein coding capacity was calculated according to [31].

Statistics

All tests were done as implemented in GraphPad software or according to Kirkman, T. W. (<http://www.physics.csbsju.edu/stats/>).

Acknowledgements

We acknowledge assistance of Dolors Ferrés-Marco and María Teresa Peña-Rangel.

References

1. Gilbert SF (2013) *Developmental biology*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 719 p.
2. Harden N (2002) Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation* 70: 181-203.
3. Rios-Barrera LD, Riesgo-Escovar JR (2013) Regulating cell morphogenesis: the *Drosophila* Jun N-terminal kinase pathway. *Genesis* 51: 147-162.
4. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS (2009) Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 10: 155-159.
5. Fatica A, Bozzoni I (2014) Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet* 15: 7-21.
6. Huntzinger E, Izaurralde E (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12: 99-110.
7. Okamura K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC (2004) Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev* 18: 1655-1666.
8. Batista PJ, Chang HY (2013) Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* 152: 1298-1307.
9. Rinn JL, Chang HY (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* 81: 145-166.
10. Li Z, Liu M, Zhang L, Zhang W, Gao G, et al. (2009) Detection of intergenic non-coding RNAs expressed in the main developmental stages in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 37: 4308-4314.
11. Iltis NE, Ponting CP (2013) Predicting long non-coding RNAs using RNA sequencing. *Methods* 63: 50-59.
12. Young RS, Marques AC, Tibbit C, Haerty W, Bassett AR, et al. (2012) Identification and properties of 1,119 candidate lincRNA loci in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Biol Evol* 4: 427-442.
13. Gummalla M, Maeda RK, Castro Alvarez JJ, Gyurkovics H, Singari S, et al. (2012) *abd-A* regulation by the *iab-8* noncoding RNA. *PLoS Genet* 8: e1002720.
14. Campos-Ortega JA, Hartenstein V (1997) *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. Berlin ; New York: Springer. xvii, 405 p. p.
15. Riesgo-Escovar JR, Jenni M, Fritz A, Hafen E (1996) The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* 10: 2759-2768.
16. Homsy JG, Jasper H, Peralta XG, Wu H, Kiehart DP, et al. (2006) JNK signaling coordinates integrin and actin functions during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Dyn* 235: 427-434.
17. Riesgo-Escovar JR, Hafen E (1997) *Drosophila* Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor DJun during dorsal closure. *Genes Dev* 11: 1717-1727.
18. Wada A, Kato K, Uwo MF, Yonemura S, Hayashi S (2007) Specialized extraembryonic cells connect embryonic and extraembryonic epidermis in response to Dpp during dorsal closure in *Drosophila*. *Dev Biol* 301: 340-349.
19. Bates KL, Higley M, Letsou A (2008) Raw mediates antagonism of AP-1 activity in *Drosophila*. *Genetics* 178: 1989-2002.

20. Martín-Blanco E, Gampel A, Ring J, Virdee K, Kirov N, et al. (1998) puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* 12: 557-570.
21. Reed BH, Wilk R, Lipshitz HD (2001) Downregulation of Jun kinase signaling in the amnioserosa is essential for dorsal closure of the *Drosophila* embryo. *Curr Biol* 11: 1098-1108.
22. Chen HW, Marinissen MJ, Oh SW, Chen X, Melnick M, et al. (2002) CKA, a novel multidomain protein, regulates the JUN N-terminal kinase signal transduction pathway in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 22: 1792-1803.
23. Giniger E, Tietje K, Jan LY, Jan YN (1994) lola encodes a putative transcription factor required for axon growth and guidance in *Drosophila*. *Development* 120: 1385-1398.
24. Grillo M, Furriols M, Casanova J, Luschnig S (2011) Control of germline torso expression by the BTB/POZ domain protein pipsqueak is required for embryonic terminal patterning in *Drosophila*. *Genetics* 187: 513-521.
25. St Pierre SE, Ponting L, Stefancsik R, McQuilton P, FlyBase C (2014) FlyBase 102--advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Res* 42: D780-788.
26. Wilk R, Pickup AT, Hamilton JK, Reed BH, Lipshitz HD (2004) Dose-sensitive autosomal modifiers identify candidate genes for tissue autonomous and tissue nonautonomous regulation by the *Drosophila* nuclear zinc-finger protein, hindsight. *Genetics* 168: 281-300.
27. Retelska D, Iseli C, Bucher P, Jongeneel CV, Naef F (2006) Similarities and differences of polyadenylation signals in human and fly. *BMC Genomics* 7: 176.
28. Arbeitman MN, Furlong EE, Imam F, Johnson E, Null BH, et al. (2002) Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* 297: 2270-2275.
29. Celniker SE, Dillon LA, Gerstein MB, Gunsalus KC, Henikoff S, et al. (2009) Unlocking the secrets of the genome. *Nature* 459: 927-930.
30. Kondo T, Hashimoto Y, Kato K, Inagaki S, Hayashi S, et al. (2007) Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA. *Nat Cell Biol* 9: 660-665.
31. Kong L, Zhang Y, Ye ZQ, Liu XQ, Zhao SQ, et al. (2007) CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic Acids Res* 35: W345-349.
32. Galindo MI, Pueyo JI, Fouix S, Bishop SA, Couso JP (2007) Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family. *PLoS Biol* 5: e106.
33. Tupy JL, Bailey AM, Dailey G, Evans-Holm M, Siebel CW, et al. (2005) Identification of putative noncoding polyadenylated transcripts in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5495-5500.
34. Berezikov E, Robine N, Samsonova A, Westholm JO, Naqvi A, et al. (2011) Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence. *Genome Res* 21: 203-215.
35. Chatterjee N, Bohmann D (2012) A versatile PhiC31 based reporter system for measuring AP-1 and Nrf2 signaling in *Drosophila* and in tissue culture. *PLoS One* 7: e34063.
36. Kiehart DP, Galbraith CG, Edwards KA, Rickoll WL, Montague RA (2000) Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*. *J Cell Biol* 149: 471-490.

37. Jemc JC, Milutinovich AB, Weyers JJ, Takeda Y, Van Doren M (2012) raw functions through JNK signaling and cadherin-based adhesion to regulate *Drosophila* gonad morphogenesis. *Dev Biol* 367: 114-125.
38. Zeitlinger J, Bohmann D (1999) Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development* 126: 3947-3956.
39. Riesgo-Escovar JR, Hafen E (1997) Common and distinct roles of DFos and DJun during *Drosophila* development. *Science* 278: 669-672.
40. Glise B, Bourbon H, Noselli S (1995) hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* 83: 451-461.
41. Biswas R, Stein D, Stanley ER (2006) *Drosophila* Dok is required for embryonic dorsal closure. *Development* 133: 217-227.
42. Pena-Rangel MT, Rodriguez I, Riesgo-Escovar JR (2002) A misexpression study examining dorsal thorax formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 160: 1035-1050.
43. Li M, Wen S, Guo X, Bai B, Gong Z, et al. (2012) The novel long non-coding RNA CRG regulates *Drosophila* locomotor behavior. *Nucleic Acids Res* 40: 11714-11727.
44. Ferres-Marco D, Gutierrez-Garcia I, Vallejo D, Bolivar J, Gutierrez-Aviño F, et al. (2006) Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* 439: 430-436.
45. Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP (2011) A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell* 146: 353-358.
46. Tay Y, Karreth FA, Pandolfi PP (2014) Aberrant ceRNA activity drives lung cancer. *Cell Res* 24: 259-260.
47. Schwartz YB, Pirrotta V (2013) A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. *Nat Rev Genet* 14: 853-864.
48. Gutierrez L, Zurita M, Kennison JA, Vazquez M (2003) The *Drosophila* trithorax group gene tonalli (tna) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. *Development* 130: 343-354.
49. Grote P, Wittler L, Hendrix D, Koch F, Wahrisch S, et al. (2013) The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev Cell* 24: 206-214.
50. Ladoukakis E, Pereira V, Magny EG, Eyre-Walker A, Couso JP (2011) Hundreds of putatively functional small open reading frames in *Drosophila*. *Genome Biol* 12: R118.
51. Xu B, Zhou Y, O K, Choy PC, Pierce GN, et al. (2010) Regulation of stress-associated scaffold proteins JIP1 and JIP3 on the c-Jun NH2-terminal kinase in ischemia-reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 88: 1084-1092.
52. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammamaparast N, Wang JK, et al. (2010) Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329: 689-693.
53. Jones RS, Gelbart WM (1990) Genetic analysis of the enhancer of zeste locus and its role in gene regulation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 126: 185-199.
54. Lagarou A, Mohd-Sarip A, Moshkin YM, Chalkley GE, Bezstarosti K, et al. (2008) dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. *Genes Dev* 22: 2799-2810.
55. Herz HM, Madden LD, Chen Z, Bolduc C, Buff E, et al. (2010) The H3K27me3 demethylase dUTX is a suppressor of Notch- and Rb-dependent tumors in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 30: 2485-2497.
56. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801.

57. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 545 p.
58. Marygold SJ, Leyland PC, Seal RL, Goodman JL, Thurmond J, et al. (2013) FlyBase: improvements to the bibliography. *Nucleic Acids Res* 41: D751-757.
59. Loevenich SN, Brunner E, King NL, Deutsch EW, Stein SE, et al. (2009) The *Drosophila melanogaster* PeptideAtlas facilitates the use of peptide data for improved fly proteomics and genome annotation. *BMC Bioinformatics* 10: 59.
60. Casas-Tinto S, Marr MT, 2nd, Andreu P, Puig O (2007) Characterization of the *Drosophila* insulin receptor promoter. *Biochim Biophys Acta* 1769: 236-243.

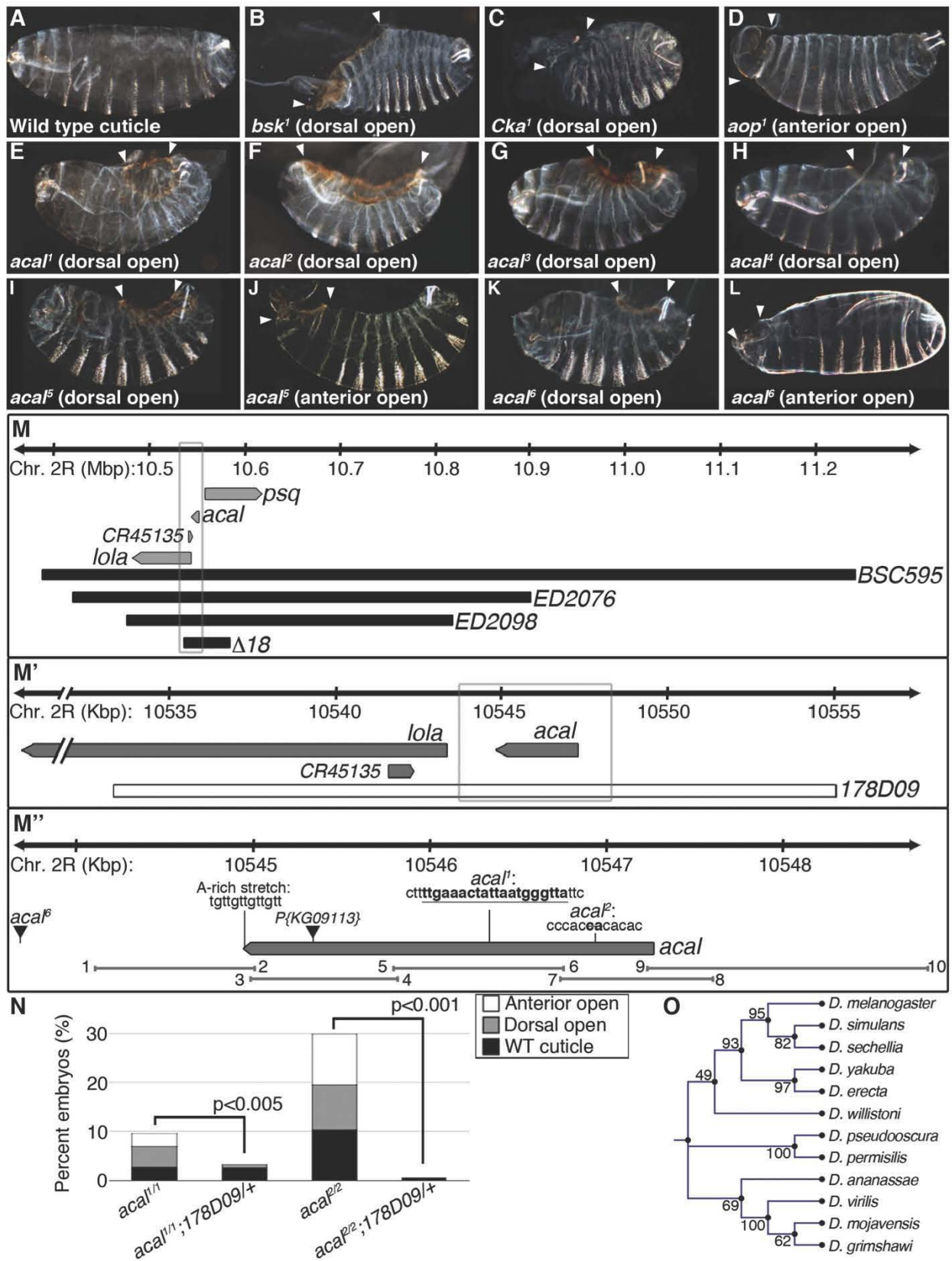


Figure 1. Molecular and genetic characterization of *acal* mutants.

(A-L) Cuticular analysis of DC defects. In all figures, embryos are shown in a lateral view, with dorsal up and anterior left. Arrowheads show extent of cuticular holes. (A) Wild type cuticle. (B-D) *bsk*¹ (JNK), *Cka*¹, and *aop*¹ mutant phenotypes. (E-L) *acal* mutants. (M-M'') Schematic representation of the *acal* locus. (M) Deficiencies used to map *acal* mutants to the intergenic region between *lola* and *psq* (for simplicity, other genes are not depicted). Boxed area in (M) is amplified in (M'). (M') The genomic rescue construct, *178D09*, spans the full *acal* genomic region, *CR45135*, and a small part of *lola* 5'. Boxed area in (M') is amplified in (M''). (M'') Parental insertion *P{KG09113}* for *acal*¹ and *acal*² and insertion site of *acal*⁶ are shown. Molecular lesions of *acal*¹ and *acal*² are highlighted in bold. A putative poly-adenylation site is also depicted. Primer pairs numbers and amplicons used to sequence mutant alleles are also depicted. (N) A genomic rescue transgene significantly suppresses *acal* DC mutant phenotypes. Only mutant embryos with cuticle defects are shown, mutants surviving embryogenesis are not depicted (and constitute the open space above bars to amount to a hundred percent). In this and all figures, unless noted, mutant embryos were selected by lack of GFP expression, present in control embryos (possessing balancer chromosomes that express GFP). Number of animals analyzed: *acal*^{1/1}=217, *acal*^{1/1};178D09=314, *acal*^{2/2}=192, *acal*^{2/2};178D09=159. Chi square tests were used to assess significance. (O) Similarity tree of *acal* homologs among some sequenced Drosophilids. Bootstrap values are shown. Further genetic characterization is shown in Figure S1.

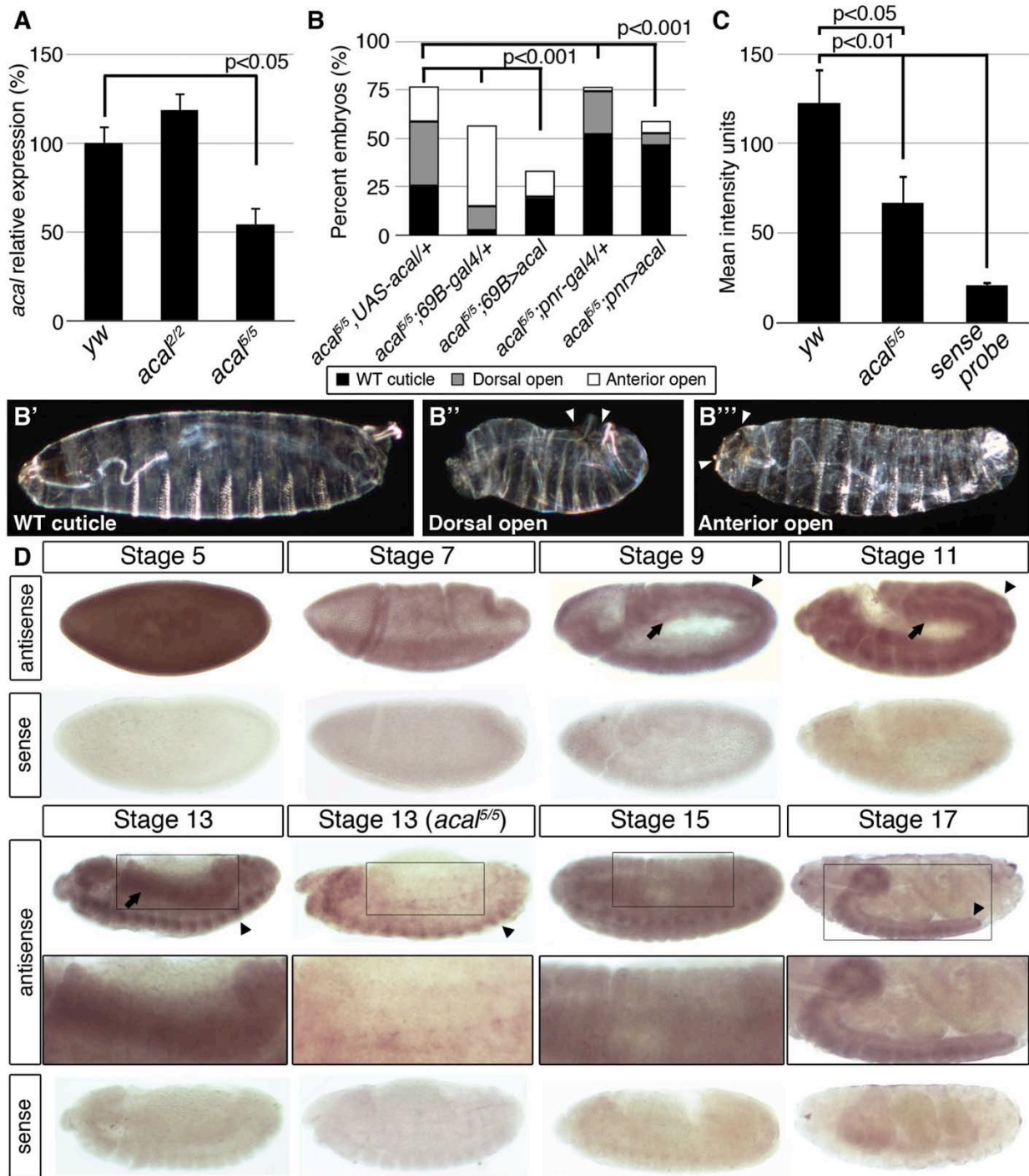


Figure 2. *acaI* expression is required in the lateral epidermis during DC.

(A) *acaI* expression in wild type and mutant embryos during DC stages, as determined by qPCR. Means of three independent experiments run twice, +/- SEM. Student's t test was used to assess significance. (B) Targeted ectodermal (*69B-gal4* driver) and lateral epidermis (*pnr-gal4* driver) expression of wild type *acaI* in *acaI* mutants. Only dead

embryos are classified, mutants surviving embryogenesis constitute the remaining percentage to amount to a hundred percent (open space above bars). (B'-B''') are examples of *aca1^{f5/5}; 69B>aca1* embryos with no cuticular phenotype, wild type in appearance (B'), with a dorsal open phenotype (B''), or with an anterior open phenotype (B'''). Compared with *aca1^{f5/5}* mutants, the cuticular phenotypes are the same, but they differ significantly in the abundance (expression of *aca1* significantly reduces the number of mutant embryos that die and that have cuticular phenotypes). In these and following experiments, cuticular phenotypes do not change, unless otherwise stated. No new cuticular phenotypes are found; thus, examples are not depicted in all figures. Numbers analyzed: *aca1^{f5/5}; UAS-aca1/+*=240, *aca1^{f5/5}; 69B-gal4/+*=441, *aca1^{f5/5}; 69B>aca1*=237, *aca1^{f5/5}; pnr-gal4/+*=435, *aca1^{f5/5}; pnr>aca1*=130. Statistical significance was calculated using chi square tests. (C) Quantification of in situ hybridization shown in (D) in stage 13 embryos (*aca1^{f5/5}*, n=10; *yw*, n=6). *aca1* mutants have significantly lower expression levels in lateral epithelia; chi square test. (D) *aca1* in situ hybridization in embryos throughout embryonic development. Wild type embryos are *yw*, and mutant is *aca1^{f5/5}*. Arrows indicate expression in the lateral epidermis and arrowheads point to expression in the central nervous system. Sense (negative) controls are also shown. Insets show boxed areas in stages 13, 15, and 17 embryos. See also Figure S2.

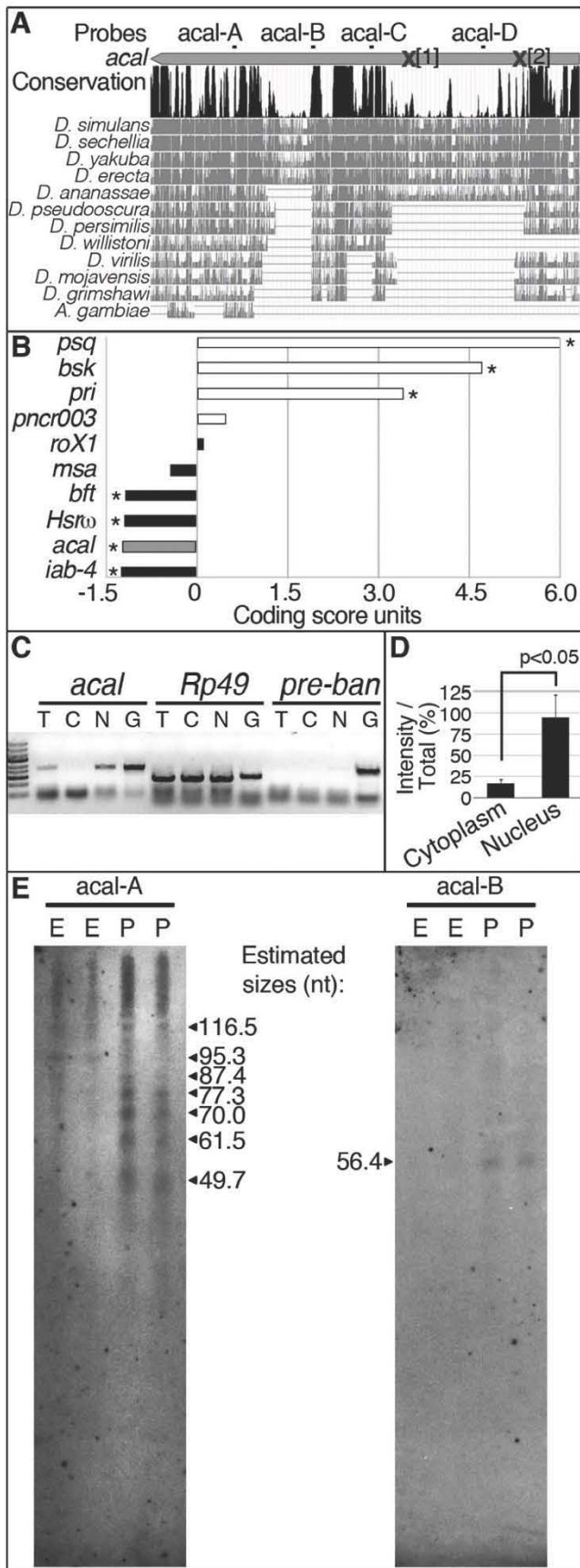


Figure 3. *acal* is a processed long non-coding RNA.

(A) *acal* full-length transcript sequence conservation plot compared to other dipterans, and pairwise alignments between *acal* in *D. melanogaster* and its homologs (adapted from the UCSC genome browser). Location of molecular lesions in *acal*¹ [1] and *acal*² [60] are shown in the transcript (gray arrow). Above the plot are the location of the probes used for small RNA Northern blots in (E) and in Figure S3. (B) Protein coding potential of *acal* and other well known coding (white) and non-coding (black) RNAs. *pipsqueak* (*psq*) is a transcription factor and *basket* (*bsk*) codes for JNK. *polished rice* (*pri*) and *pncr003* are polycistronic and code for small peptides. *roX1* (*RNA on the X1*), *iab-4* (*infra-abdominal 4*), and *Heat shock RNA ω* (*Hsrω*) are long non-coding RNAs. *bereft* (*bft*) is a microRNA precursor. Negative values correspond to non-coding scores, and positive values are for protein coding RNAs. Asterisks denote significantly coding or non-coding scores. (C) Semi-quantitative RT-PCR of total [T], cytoplasmic [C], and nuclear [N] RNA against *acal*, *Rp49* (protein coding gene), and *bantam* microRNA precursor (*pre-ban*). [G] is the genomic control. (D) Band intensity of *acal* cytoplasmic and nuclear amplification, compared to total RNA amplification. Means of 5 independent experiments +/- SEM. Significance was assessed using Student's t test. (E) Small RNA Northern blots for *acal* A and B probes, using wild type embryos [E] and pupae [P] RNA. Sizes were estimated from 4 independent experiments.

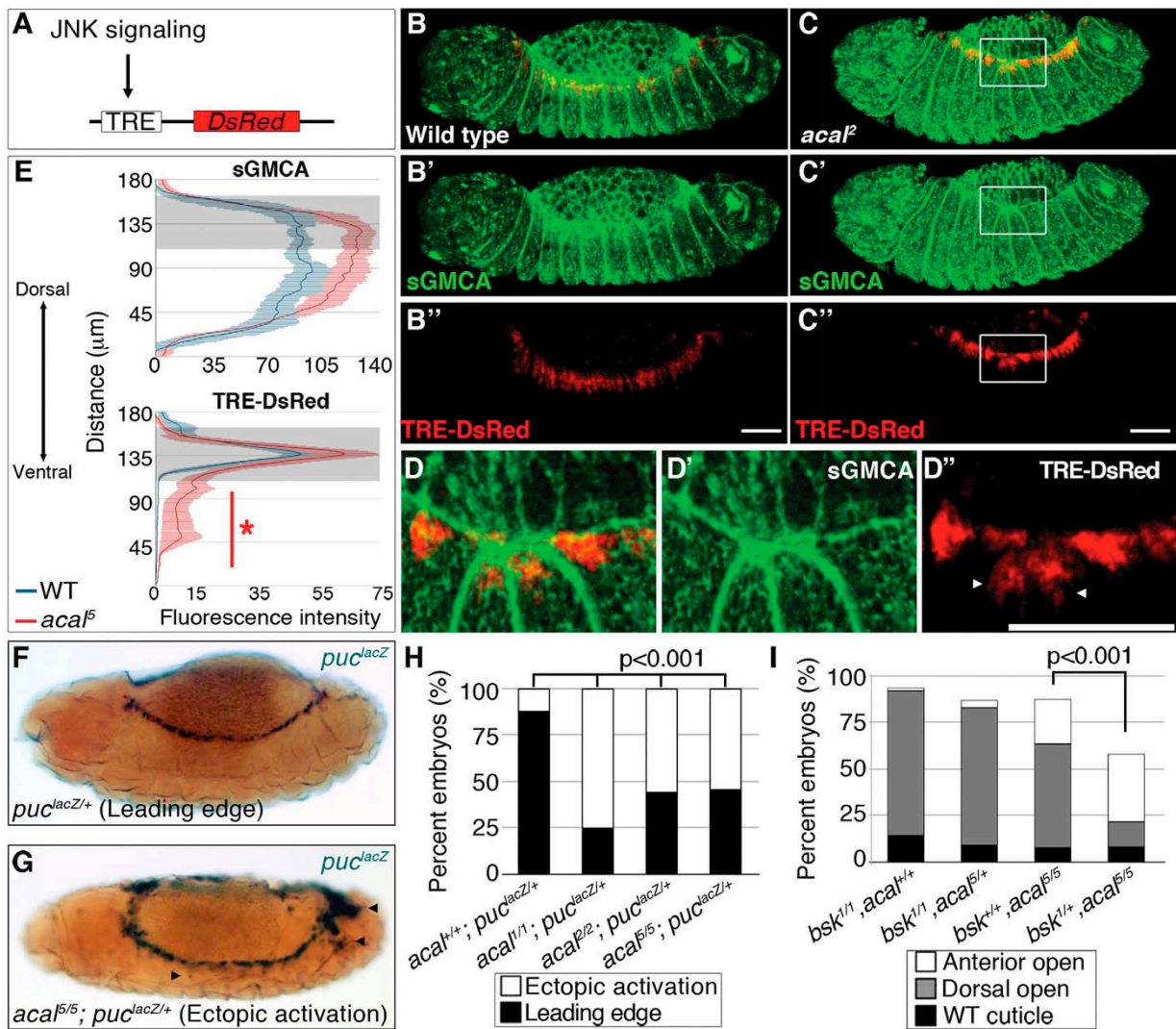


Figure 4. Ectopic JNK signaling activation in *acal* mutants.

(A) TRE-DsRed works as an AP-1 responsive element driving expression of DsRed. (B–B'') Wild type embryos, (C–D'') *acal*² mutants. sGMCA is a marker for cortical cytoskeleton (green in B, C, and D). (B–D) Images are representative of five embryos per condition. (D–D'') Boxed area in C. Ectopic TRE-DsRed activity is shown (arrowheads). Scale bars in (B, C, and D) are 50 μm. (E) Mean fluorescence intensity +/- SEM of sGMCA and TRE-DsRed in *acal*⁵ mutants and in control embryos. Leading edge region is highlighted in gray. n=5 for each condition. For both channels, distributions are significantly different (Kolmogorov-Smirnov test, asterisk and bar depicting significant ectopic JNK activation in lateral epithelia ventral to the LE, p<0.001). (F–H) *puc*^{lacZ} staining of control (F) and mutant (G)

embryos. Arrowheads in (G) mark ectopic *puc^{lacZ}* activation. (H) Quantification of *acaI* mutant phenotypes using *puc^{lacZ}* heterozygosity as JNK signaling reporter and genetic sensitized background. Mutant embryos were selected by lack of *eve-lacZ* staining, present in balancer chromosomes. Number of embryos analyzed: *acaI^{+/+};puc^{lacZ/+}*=108, *acaI^{1/1};puc^{lacZ/+}*=229, *acaI^{2/2};puc^{lacZ/+}*=48, *acaI^{5/5};puc^{lacZ/+}*=62. See also Figure S4. (I) Genetic interaction between *bsk¹* and *acaI⁵* mutants. Only the dead embryos are classified, the mutants surviving embryogenesis are the remaining percentage to amount to a hundred percent (open space above bars). Number of animals analyzed: *bsk^{1/1};acaI^{+/+}*=154, *bsk^{1/1};acaI^{5/+}*=210, *bsk^{+/+};acaI^{5/5}*=391, *bsk^{1/+};acaI^{5/5}*=166. Significance in (H-I) was calculated using chi square tests.

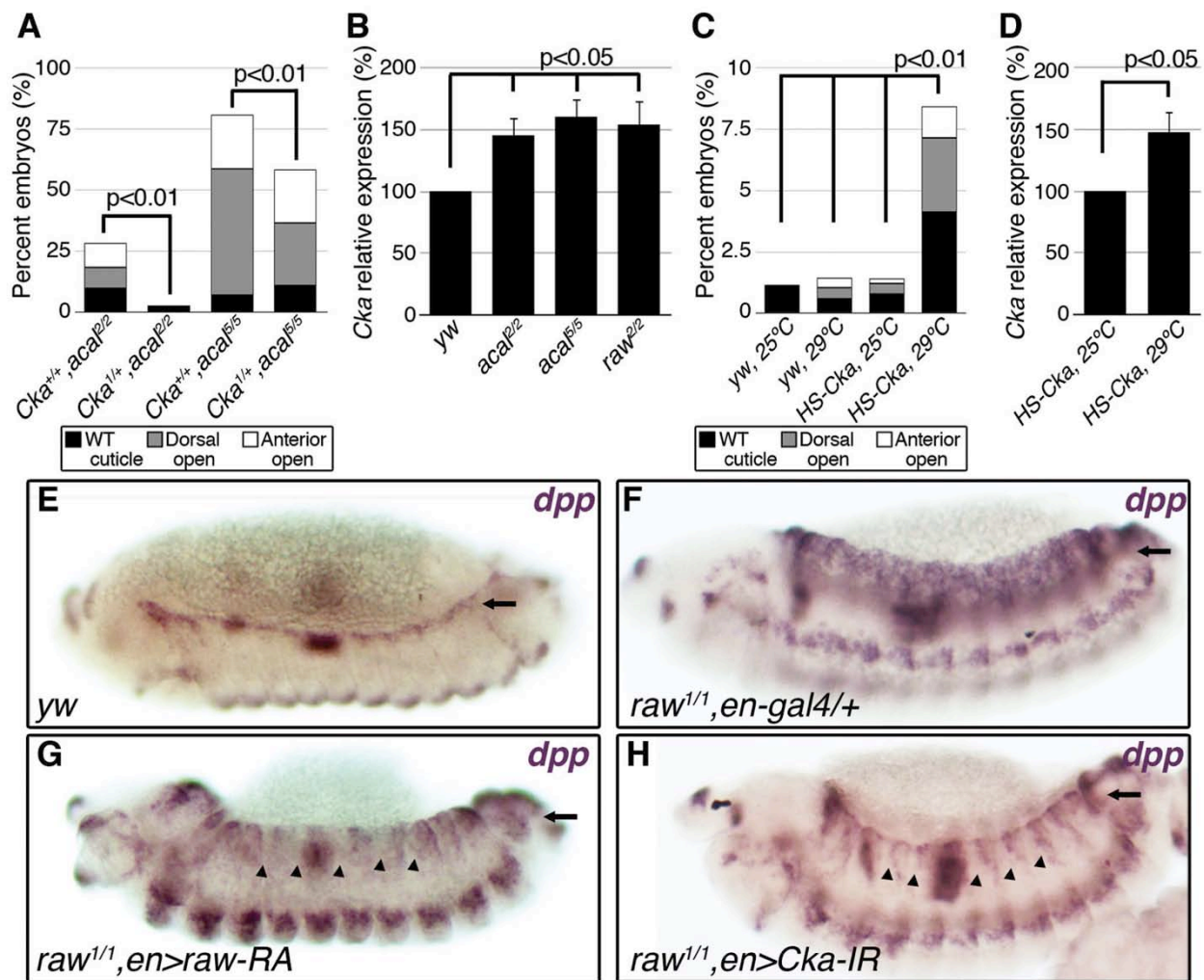


Figure 5. *raw* and *acal* act together to counteract JNK signaling.

(A) Wild type cuticle. (B) Cuticle phenotype of *raw* mutant embryo. (C) Genetic interaction between *raw*² and *acal*⁵ mutants. *raw*-like phenotype is depicted in (B). In *raw*^{+/+}; *acal*^{5/5} mutants a small percentage survives embryogenesis, and constitute the open space above the bar to amount to a hundred percent total. Number of animals analyzed: *raw*^{+/+}, *acal*^{5/5}=391, *raw*^{2/+}, *acal*^{5/5}=139, *raw*^{2/2}, *acal*^{+/+}=366, *raw*^{2/2}, *acal*^{5/+}=152, *raw*^{2/2}, *acal*^{5/5}=208. Significance was assessed with chi square tests. (D-E) *acal* in situ hybridization in *raw*² mutants (n=45; D) and heterozygous siblings (n=106; E). Arrow in (E) points to decreased *acal* expression in the lateral epidermis. See also Figure S5. (F-I) Scanning electron micrographs of dorsal views of adult thoraces, anterior is up. Scale bars are 100 μm. (F) *UAS-acal/+* control, (G) *pnr-gal4/+* control, and (H) over-expression of two

UAS-acal copies. The white box in (H) is amplified in (I), depicting distances (red lines) measured to determine the thoracic cleft index, using anterior dorso-central (ADC) and posterior dorso-central (PDC) bristles as references (see Materials and Methods). (J) Percentage change of thoracic cleft index for different experimental conditions. Mean of 15 flies +/- SEM. Significance was calculated using ANOVA and Bonferroni correction.

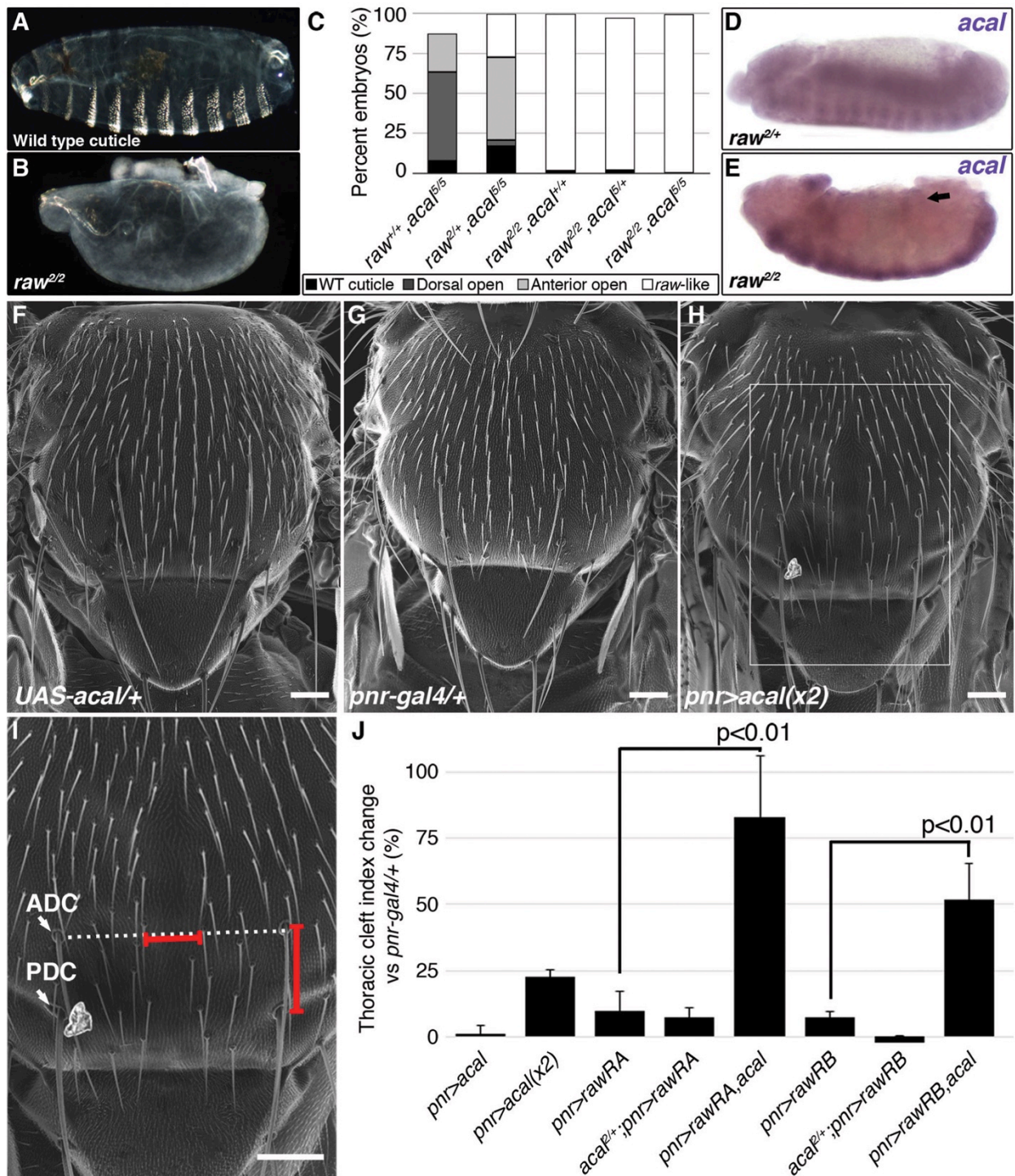


Figure 6. *Cka* is downstream of *raw* and *acal*.

(A) Genetic interaction between *Cka* and *acal* mutants. Number of animals analyzed: *Cka^{+/+}, acal^{2/2}*=192, *Cka^{1/+}, acal^{2/2}*=219, *Cka^{+/+}, acal^{5/5}*=391, *Cka^{1/+}, acal^{5/5}*=171. (B) *Cka* relative expression in wild type and mutant embryos, as determined by qPCR. (C) Expression of a heat-shock inducible *Cka* transgene results in DC defects. Number of

animals analyzed: *yw*, 25°C=526, *yw*, 29°C=591, *HS-Cka*, 25°C=2006, *HS-Cka*, 29°C=3227. (D) *Cka* expression increase due to heat shock in *hs-Cka* flies was confirmed by qPCR. For (A,C) embryos surviving embryogenesis represent the open space above the bar to amount to one hundred percent total of embryos analyzed. Chi square tests were used to calculate significance. For (B,D) represents the means of three independent experiments run twice +/- SEM. Significance was assessed using Student's t test. (E-H) *dpp* in situ hybridization experiments, showing JNK-induced *dpp* expression (arrows). (E) Wild type embryo. (F) *raw^{1/1}*, *en-gal4/+* control, showing *dpp* ectopic activation (arrow). (G) Expression of *UAS-rawRA* with *en-gal 4*, which expresses *gal 4* at posterior compartments of each segment. Arrowheads show cell-autonomous suppression of *dpp* ectopic expression. (H) Silencing of *Cka* with an RNAi construct (*UAS-Cka-IR*) under *en-gal 4* also suppresses *dpp* ectopic expression in posterior compartments of *raw¹* mutants (arrowheads).

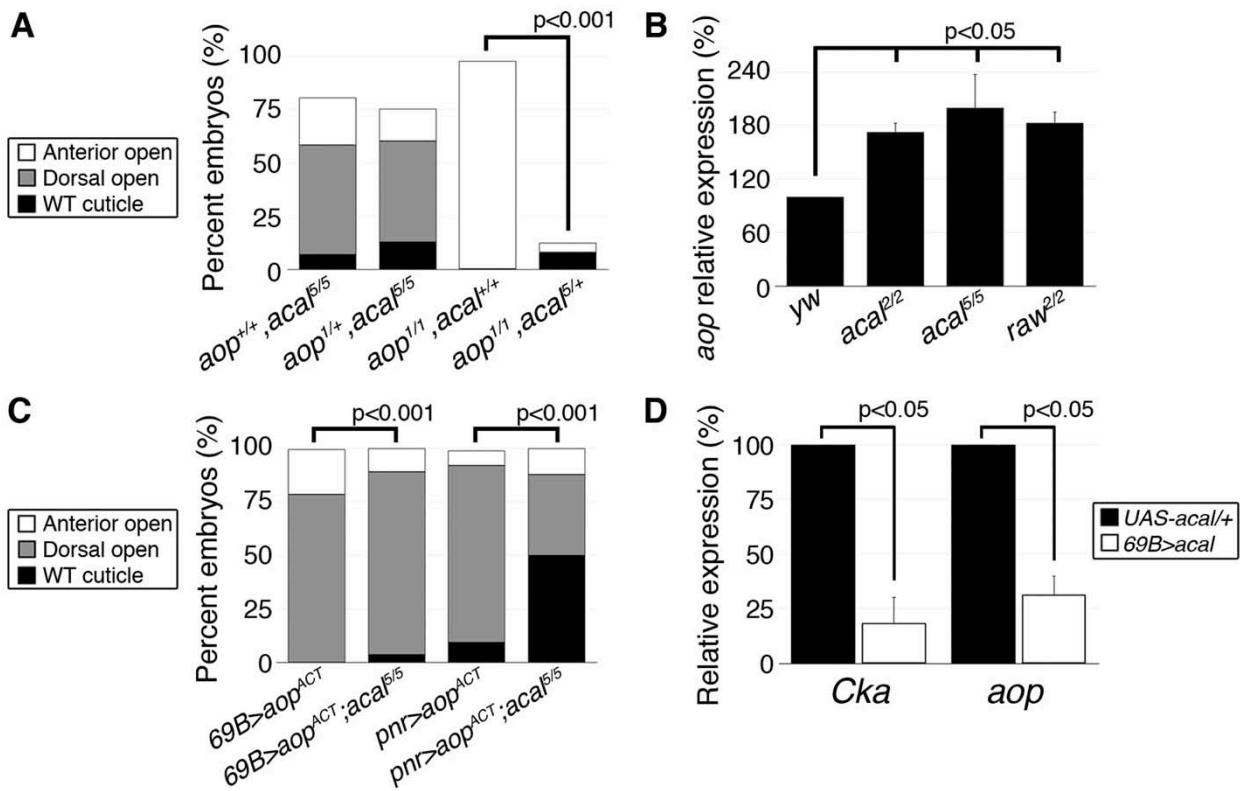


Figure 7. *acal* regulates *aop* expression.

(A) Genetic interaction between *aop* and *acal* mutants. Embryos surviving embryogenesis represent the open space above bars to amount to a hundred percent total embryos analyzed. Number of animals analyzed: *aop*^{+/+}, *acal*^{5/5}=391, *aop*^{1/+}, *acal*^{5/5}=253, *aop*^{1/1}, *acal*^{+/+}=269, *aop*^{1/1}, *acal*^{5/+}=185. (B) Relative expression of *aop* in wild type and mutant embryos, as determined by qPCR. (C) Expression of a constitutive active *aop* transgene (*UAS-aop*^{ACT}) in the ectoderm (*69B-gal 4*) or in the lateral epidermis (*pnr-gal 4*), of wild type or *acal* mutant embryos. Number of animals analyzed: *69B>aop*^{ACT}=642, *69B>aop*^{ACT}; *acal*^{5/5}=210, *pnr>aop*^{ACT}=310, *pnr>aop*^{ACT}; *acal*^{5/5}=180. (D) *acal* over-expression under the *69B-gal4* driver results in significantly decreased *Cka* and *aop* expression. In (B) and (D), graphs show mean values +/- SEM of at least three independent experiments run twice.

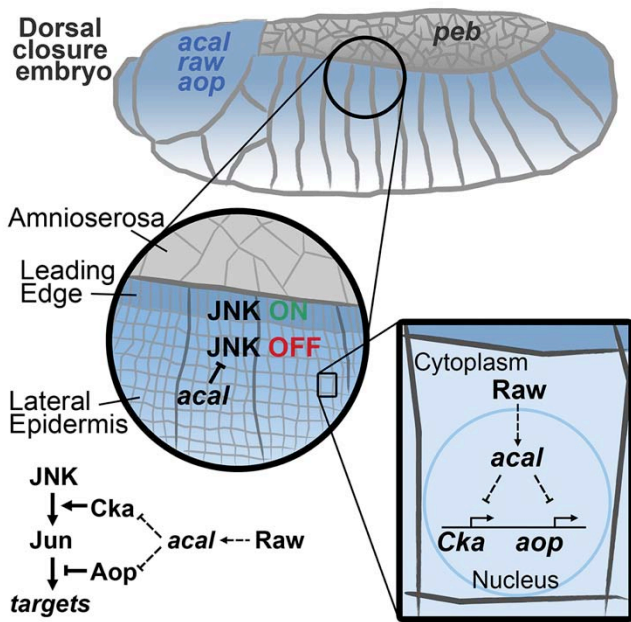


Figure 8. Model for *acal* function during DC. *acal*, expressed in the lateral epidermis (blue), restrains JNK activation to the leading edge cells. Raw, also expressed in the lateral epidermis, regulates *acal* expression. In turn, *acal* regulates the expression of *Cka* and *aop* to fine-tune JNK signaling. Not depicted is *aop* positive role during DC.

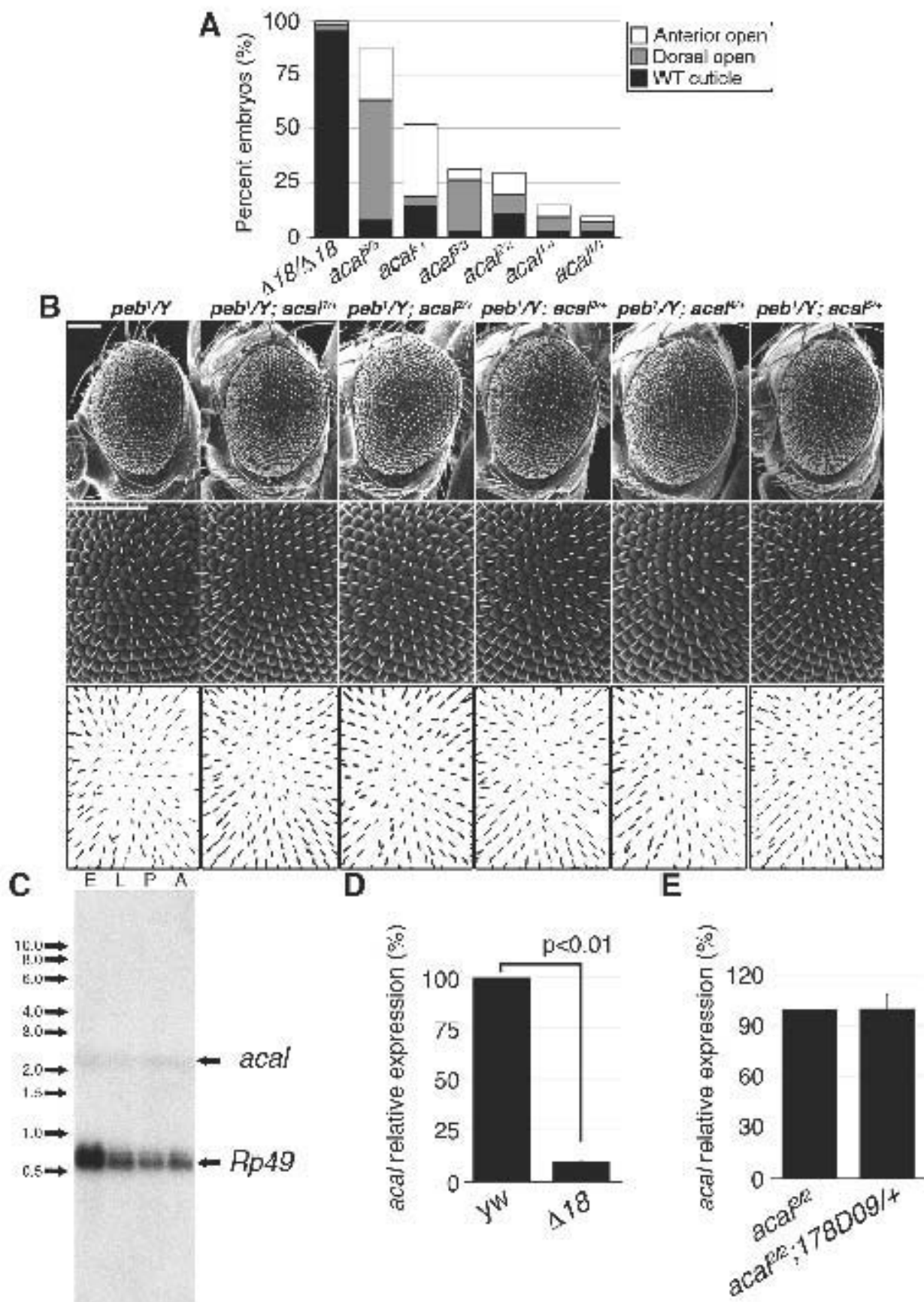


Figure S1. Phenotypic analysis of *acaI* mutants and characterization of SD08925.

(A) An allelic series of embryonic cuticle defects for $\Delta 18$ (a deficiency removing a segment of *lola* and of *psq*, plus fully *acal* and *CR45135*, and expected to bear multiple defects), and *acal* mutants. Alleles are organized by decreasing embryonic lethality and frequency of phenotypes. Mutant embryos surviving embryogenesis are represented by the open spaces above the bars up to 100% in the graph, and were not studied. The *acal* allelic series deduced is: $acal^5 > acal^6 > acal^3 > acal^2 > acal^4 > acal^1$. Embryos surviving embryogenesis are the open spaces above the bars to amount to a hundred percent. (B) Scanning electron microscope images of the *peb*¹ rough eye phenotype (smaller, disorganized ommatidia, duplicated and mis-aligned bristles) observed at the restrictive temperature (29°C), and partial suppression by heterozygosity for *acal* mutants. Scale bar is 100 μ m. Anterior is left, dorsal is up. Lower panels show the positions of bristles seen in middle panels highlighting the suppression of the *peb*¹ bristle disorganization phenotype. (C) RNA from wild type embryos [E], larvae [L], pupae [P], and adults [A] analyzed by Northern blot, using a probe derived from *SD08925*, and then re-hybridized for *Rp49* without stripping. Molecular weight marker sizes are shown, and the corresponding bands for *acal* and *Rp49*. (D) *acal* semi-quantitative RT-PCR in control (*yw*) and homozygous embryos for $\Delta 18$, a deficiency that removes *acal*. (E) *SD08925* relative expression in *acal*² mutants with or without the genomic rescue construct, *178D09*. n=3 with duplicates.

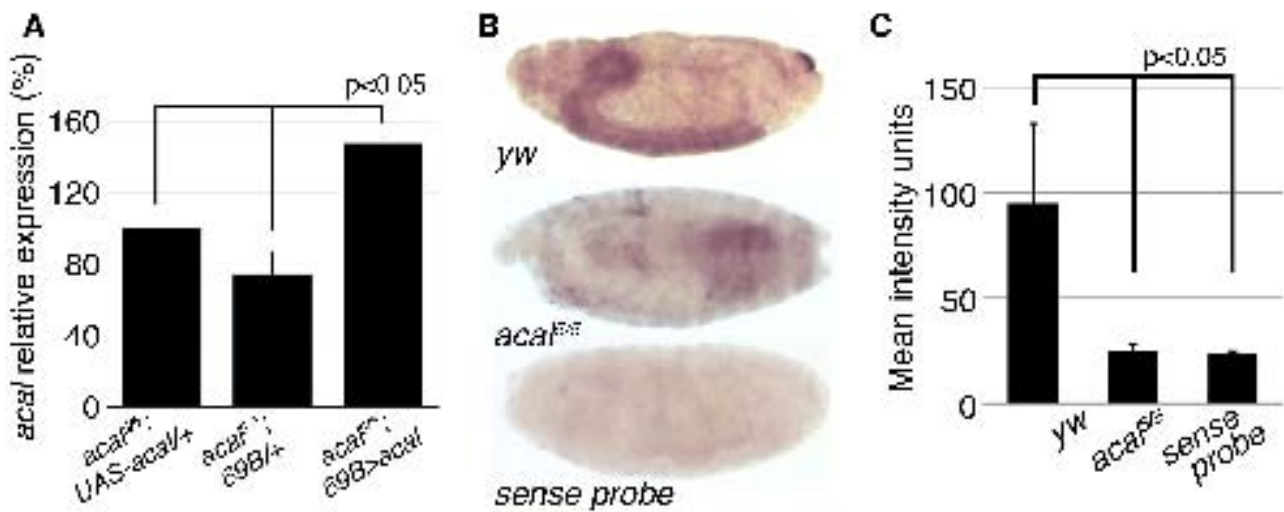


Figure S2. *UAS-acal* expression and *acal* in situ hybridization. (A) *acal* relative expression in *acal^{fl}* mutant controls and in *UAS-acal* over-expressing mutant embryos, as determined by qPCR. Experiments were done three independent times, and run twice each time. Significance was determined using Student's t-tests. (B) In situ hybridization against *acal*, in wild type (*yw*) and mutant (*acal^{fl}*) embryos, stage 17. Sense probes were used as negative controls. *acal^{fl}* homozygous embryos were selected by lack of GFP expression, present in balancer chromosomes, prior to embryo fixation and hybridization. (C) Pixel intensity quantification of the same experiment as (B). Number of animals analyzed: *yw*=5, *acal^{fl}*=6, *sense*=9. Significance was assessed using Student's t tests.

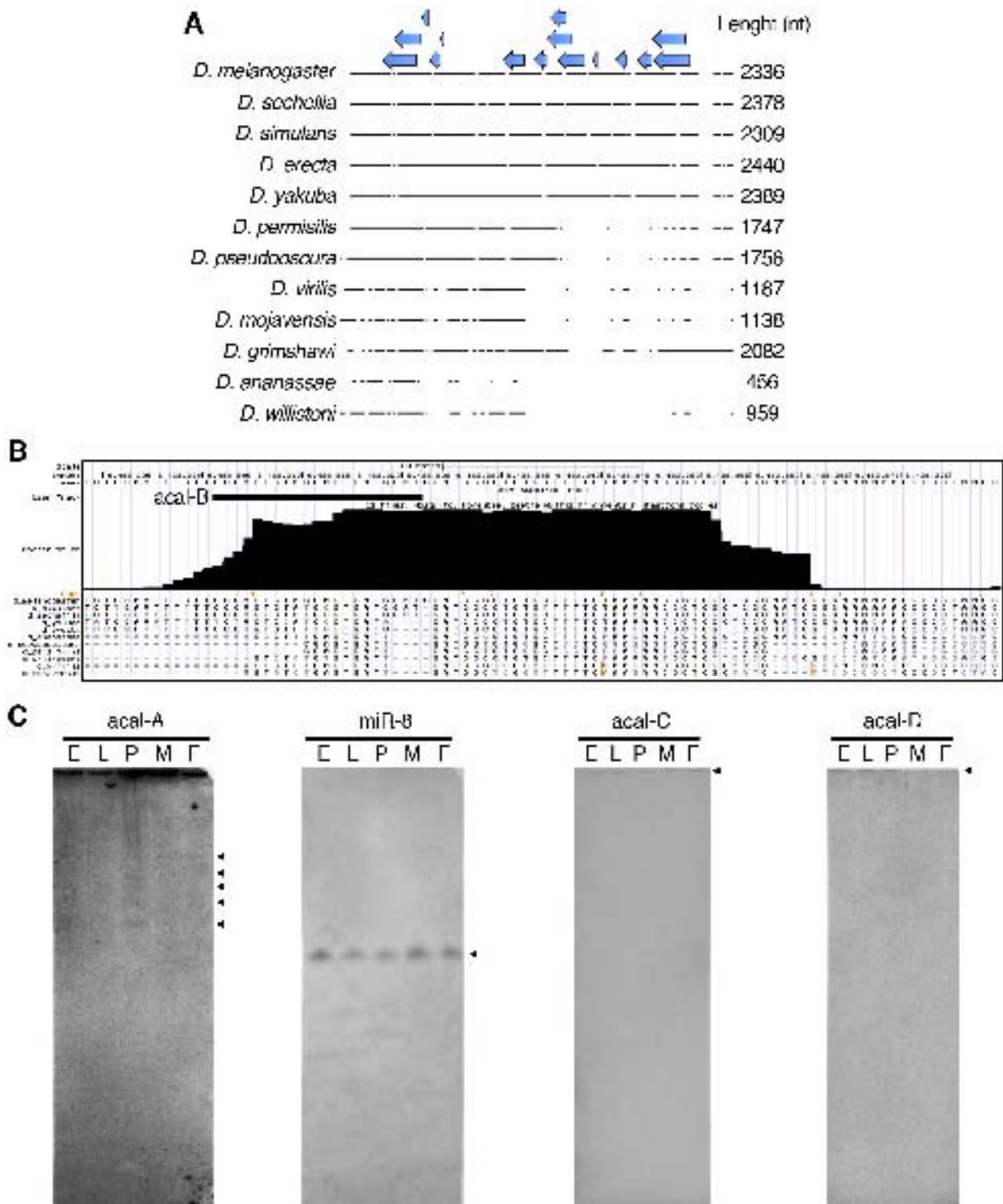


Figure S3. *acal* is a conserved non-coding RNA. (A) Multiple sequences alignment of the *acal* genomic locus of 12 *Drosophila* species. Black lines represent aligned sequences, and white spaces are gaps. On top, putative ORFs present in the *Drosophila melanogaster* locus are shown. To keep co-linearity with the genome, 5' ends are shown to the left. Note that most ORFs present in *D. melanogaster* correspond to gaps in other species. (B)

Conservation of the *acal-B* probe in other *Drosophila* species. The most conserved region corresponds in length with the band detected in small RNA Northern blots (Fig. 3E). (C) RNA was purified from wild type embryos (E), larvae (L), pupae (P), adult males (M), and adult females (F). Fragments detected with *acal-A* and miR-8 (control) are marked with arrowheads. Northern blots under equivalent hybridization and exposure conditions show no signal for *acal-C* and *acal-D*, except for very faint marks in the wells at the top of the lanes (arrowheads).

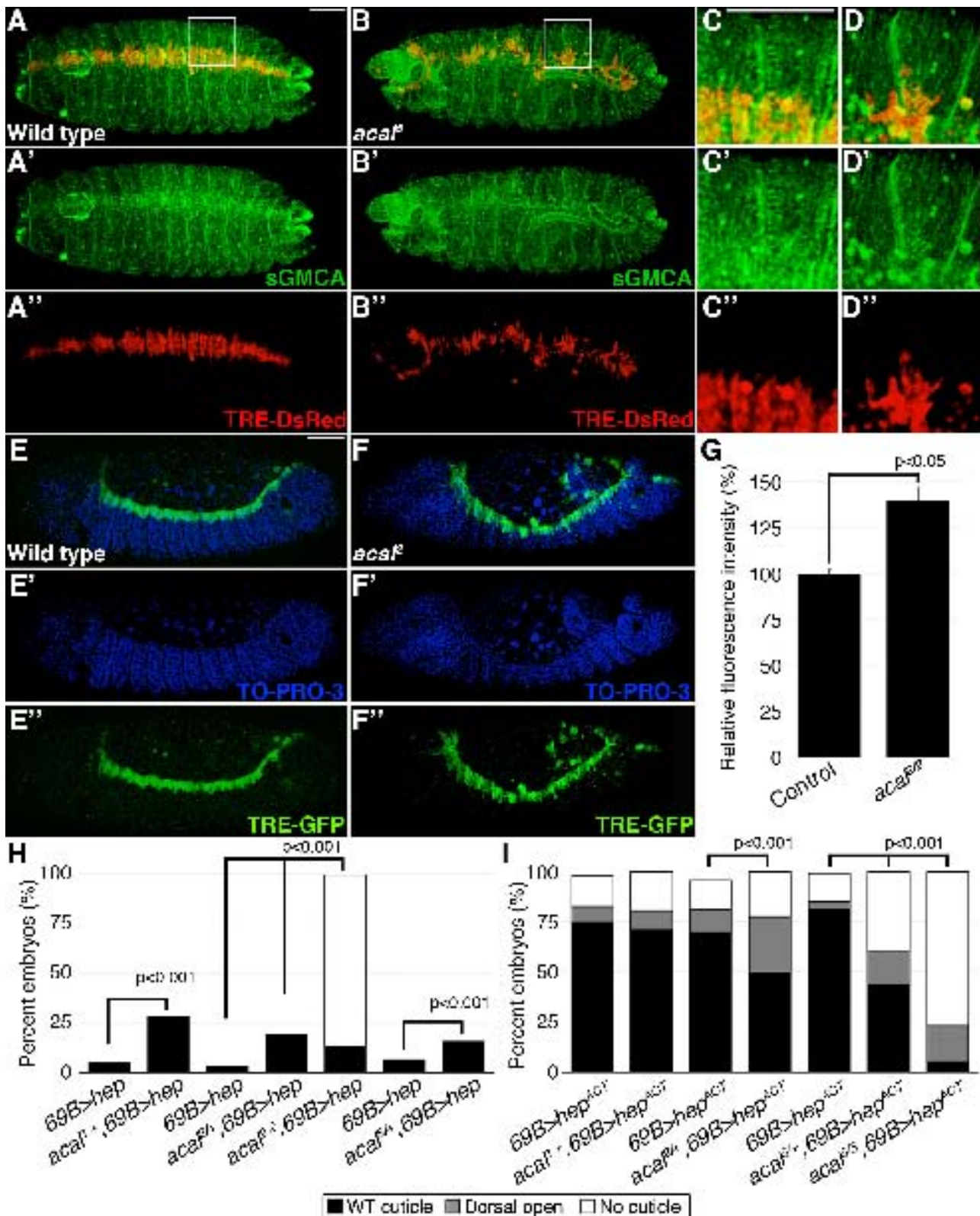


Figure S4. *acal* negatively regulates JNK signaling in the epidermis. (A–A'', C–C'')

Wild type embryos, (B–B'', D–D'') *acal*⁵ mutant embryos. sGMCA is a marker for cortical cytoskeleton, TRE-DsRed is a JNK activity reporter. Images are representative of five embryos per condition. Boxed areas in A and B are magnified in C and D. Note

disorganized and ectopic expression of DsRed in the mutant embryo. (E) Wild type embryos, (F) *aca²* mutant embryos, TO-PRO-3 labels nuclei, TRE-GFP is a JNK activity reporter. Images are representative of four embryos per condition. (E') and (F') show the TO-PRO-3 (blue) channels of wild type and *aca²* embryos, respectively. (E'') and (F'') show the GFP (green) channels in wild type and *aca²* embryos, respectively. Merged images for the doubly stained embryos are shown in (E) and (F) for the same wild type and *aca²* embryos. Scale bars in (A, C, and E) are 50 μ m. (G) Signal intensity quantification of TRE-GFP in lateral epithelia ventral to the LE, normalized against TO-PRO-3 signal intensity. Significance was assessed using Student's t test. (H) Embryonic lethality caused by over-expression of wild type *hep* (*69B>hep*) is enhanced by *aca* heterozygosity. Number of animals analyzed: *69B>hep* control for *aca^{1/+}*; *69B>hep*=95; *aca^{1/+}*; *69B>hep*=98; *69B>hep* control for *aca²*; *69B>hep*=166; *aca^{2/+}*; *69B>hep*=141; *aca^{2/2}*; *69B>hep*=93; *69B>hep* control for *aca^{5/+}*; *69B>hep*=354; *aca^{5/+}*; *69B>hep*=443. (I) Dorsal closure and embryonic lethality and defects seen by over-expression of a constitutively active form of hemipterous in the ectoderm (*69B>hep^{ACT}*), are enhanced by *aca* heterozygosity. Number of animals analysed: *69B>hep^{ACT}* control for *aca^{1/+}*; *69B>hep^{ACT}*=263; *aca^{1/+}*; *69B>hep^{ACT}*=563; *69B>hep^{ACT}* control for *aca^{2/+}*; *69B>hep^{ACT}*=321; *aca^{2/+}*; *69B>hep^{ACT}*=363; *69B>hep^{ACT}* control for *aca⁵*; *69B>hep^{ACT}*=624; *aca^{5/+}*; *69B>hep^{ACT}*=923; *aca^{5/5}*; *69B>hep^{ACT}*=153. (H-I) Significance was assessed using chi square tests, and open spaces above bars up to a hundred percent represent embryos surviving embryogenesis.

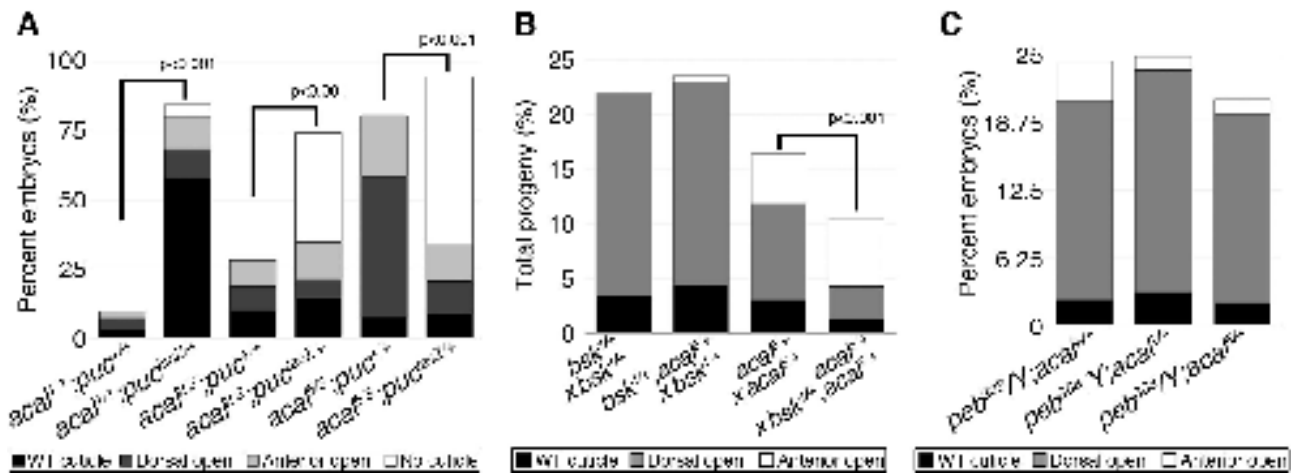


Figure S5. Genetic interactions between *acal* and JNK signaling components. (A)

puc^{lacZ} heterozygosity enhances the *acal* mutant phenotypes. Number of animals

analyzed: *acal^{1/1}*=217, *acal^{1/1}; puc^{lacZ/+}*=296, *acal^{2/2}*=192, *acal^{2/2}; puc^{lacZ/+}*=204, *acal^{5/5}*=391,

acal^{5/5}; puc^{lacZ/+}=178. (B) *bsk* heterozygosity significantly suppresses *acal* homozygous

mutant embryos in a different genetic background (in the absence of balancer

chromosomes, back-crossed to a *yw* strain). Mutant stocks were first crossed to a *yw*

control strain, and then to each other. Dead embryos were analyzed. Number of animals:

bsk^{1/+} x bsk^{1/+}=652; *bsk^{1/+}, acal^{5/+} x bsk^{1/+}*=452; *acal^{5/+} x acal^{5/+}*=633; *acal^{5/+} x*

acal^{5/+}, bsk^{1/+}=643. (C) An *acal* sensitized background does not alter the embryonic *peb³⁰⁸*

mutant phenotype. Number of animals analyzed: *peb³⁰⁸/Y; +/+*= 665, *peb³⁰⁸/Y; acal^{5/+}*=247.

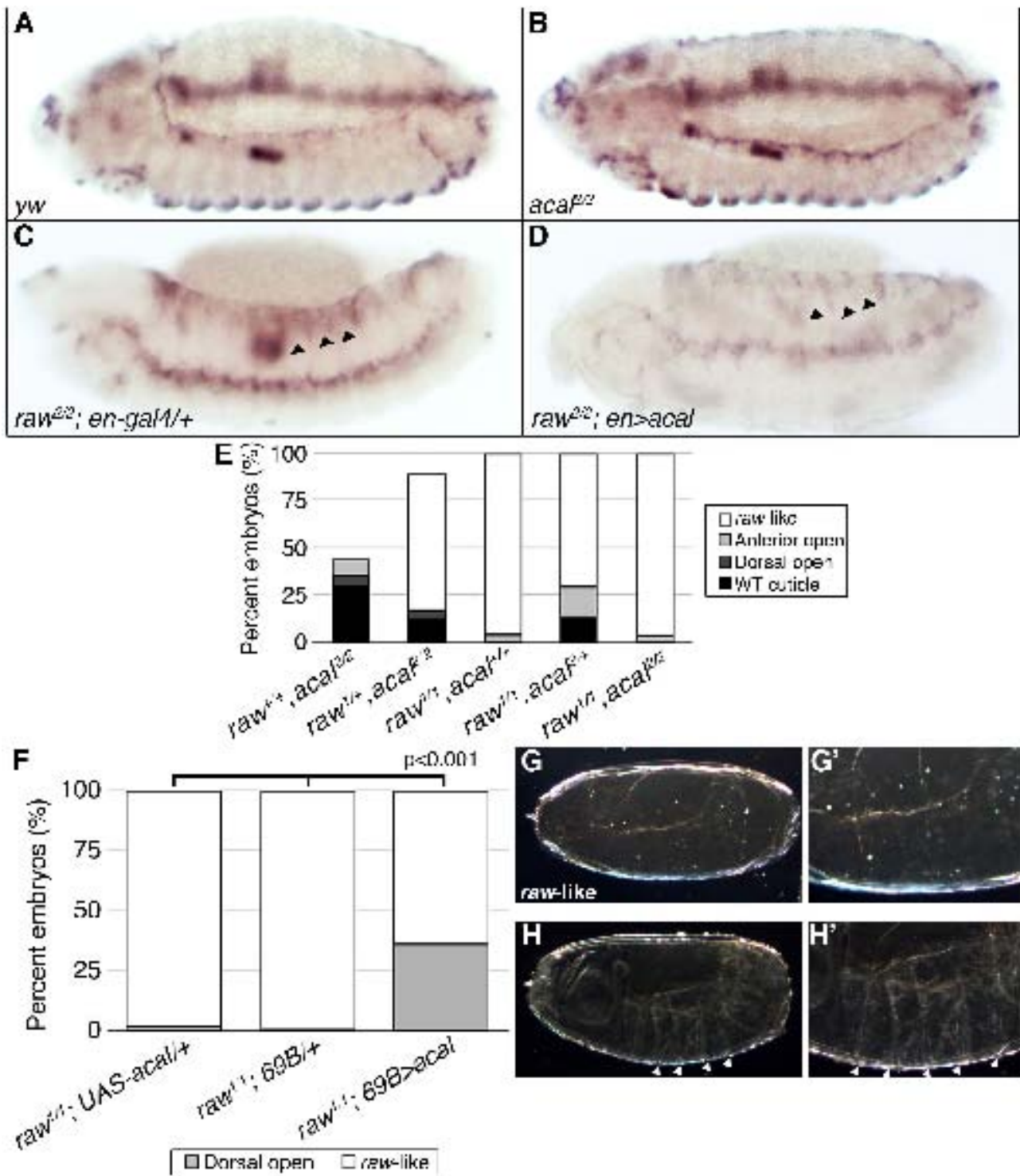


Figure S6. *acal* over-expression partially rescues *raw* mutant phenotypes. (A)

Control expression of *dpp* in a *yw* embryo. Expression in the leading edge is seen as a thin line surrounding the amnioserosa. (B) In an *aca^{f2}* mutant background, the *dpp* expression domain in the leading edge is not strongly over-expressed. (C) *dpp* in situ hybridization in *raw* mutants show robust ectopic expression of *dpp* in the lateral epithelium during dorsal closure (arrowheads; see also [19]). (D) *acal* over expression

driven by the *en-gal4* driver in posterior compartments of segments rescues cell autonomously in these posterior compartments the *raw* induced *dpp* over expression (arrowheads). Number of animals analyzed: *raw*^{2/2}; *en-gal4*= 5, *raw*^{2/2}; *en>acal*=5. (E) *raw*¹ heterozygosity enhances the *aca*² embryonic mutant phenotype. Number of animals analyzed: *aca*^{2/2}=416, *raw*^{1/+}, *aca*^{2/2}=258, *raw*^{1/1}=278, *aca*^{2/+}, *raw*^{1/1}=487, *aca*^{2/2}, *raw*^{1/1}=253. (F) UAS-*acal* over-expression in the ectoderm of *raw*¹ mutant embryos, using the *69B-gal4* driver partially rescues the *raw* mutant phenotypes. Number of animals analyzed: *raw*^{1/1}; UAS-*acal*/+=53, *raw*^{1/1}; *69B-gal4*/+=283, *raw*^{1/1}; *69B>acal*=28. Significance was calculated using chi square tests. (G-G') *raw*¹ mutants show dorsal closure defects and absence of denticles. (G') is an enlargement of (G). (H-H') *acal* over-expression in the ectoderm of *raw*¹ mutants rescues the presence of denticles (some examples are marked by arrowheads in H-H'). (H') is an enlargement of (H).

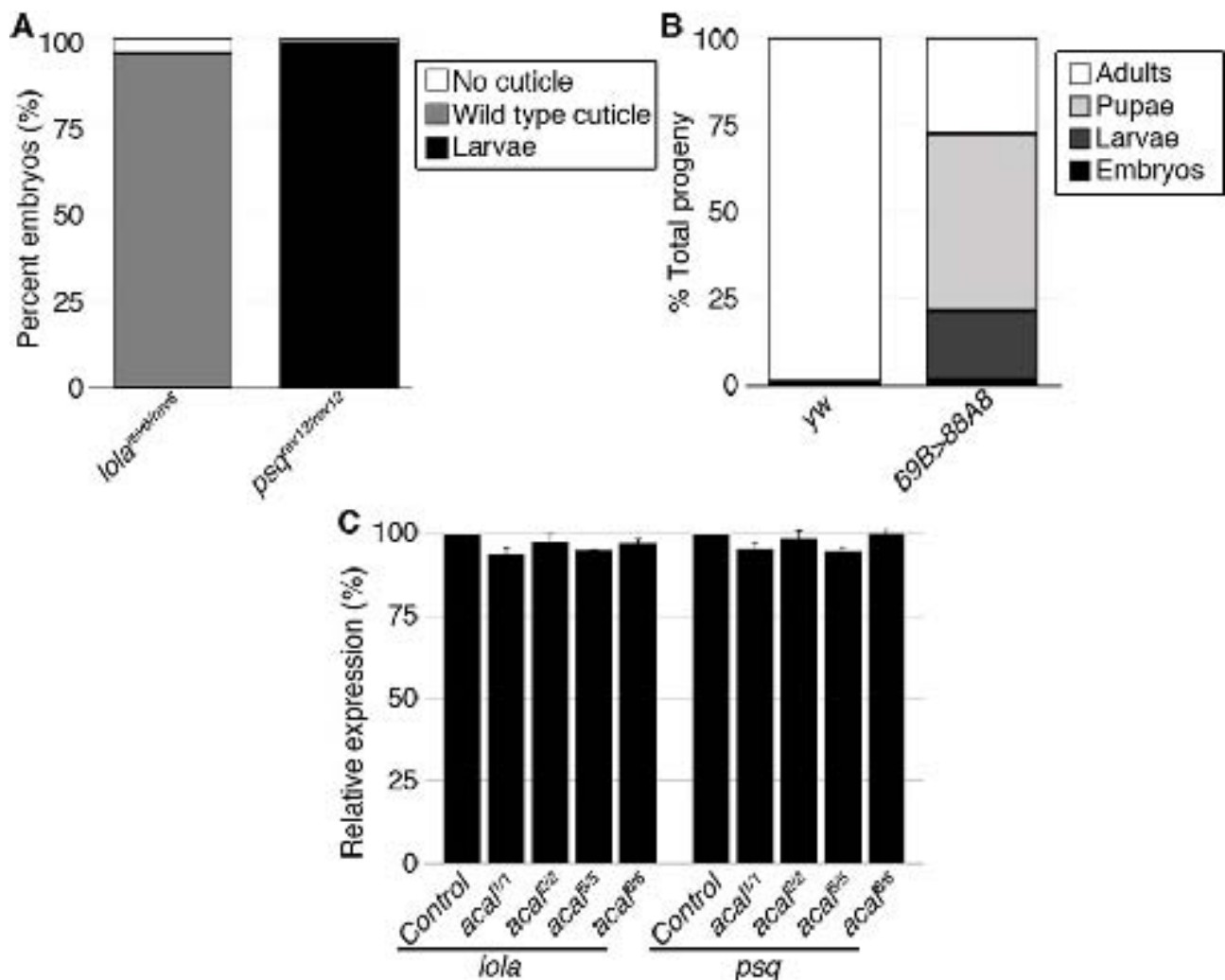


Figure S7. *lola* and *psq* over expression leads to partial larval and pupal death. (A) Cuticular analysis and quantification of larvae of *lola* and *psq* mutant embryos. Both *lola^{rev6}* and *psq^{rev12}* are null alleles. Number of animals analyzed: *lola^{rev6/rev6}*=366, *psq^{rev12/rev12}*=311. (B) shows survival of embryos in a control stock, *yw*, where only a very small fraction (1%) die during embryogenesis. All other embryos reach the adult stage. Over expression of *lola* and *psq* via the 88A8 gene search transposon (*GS88A8*) using *69B-gal4* leads to partial larval and pupal death, but no significant changes in embryonic lethality compared to the *yw* control strain. Numbers of animals analyzed: *yw*=526, and *69B>GS88A8*=554. (C) qPCR of *lola* and *psq* in *acal* mutant embryos, normalized against control heterozygous siblings. Primers used detect all *lola* or all *psq* isoforms. Experiments were done three times and run in duplicate.

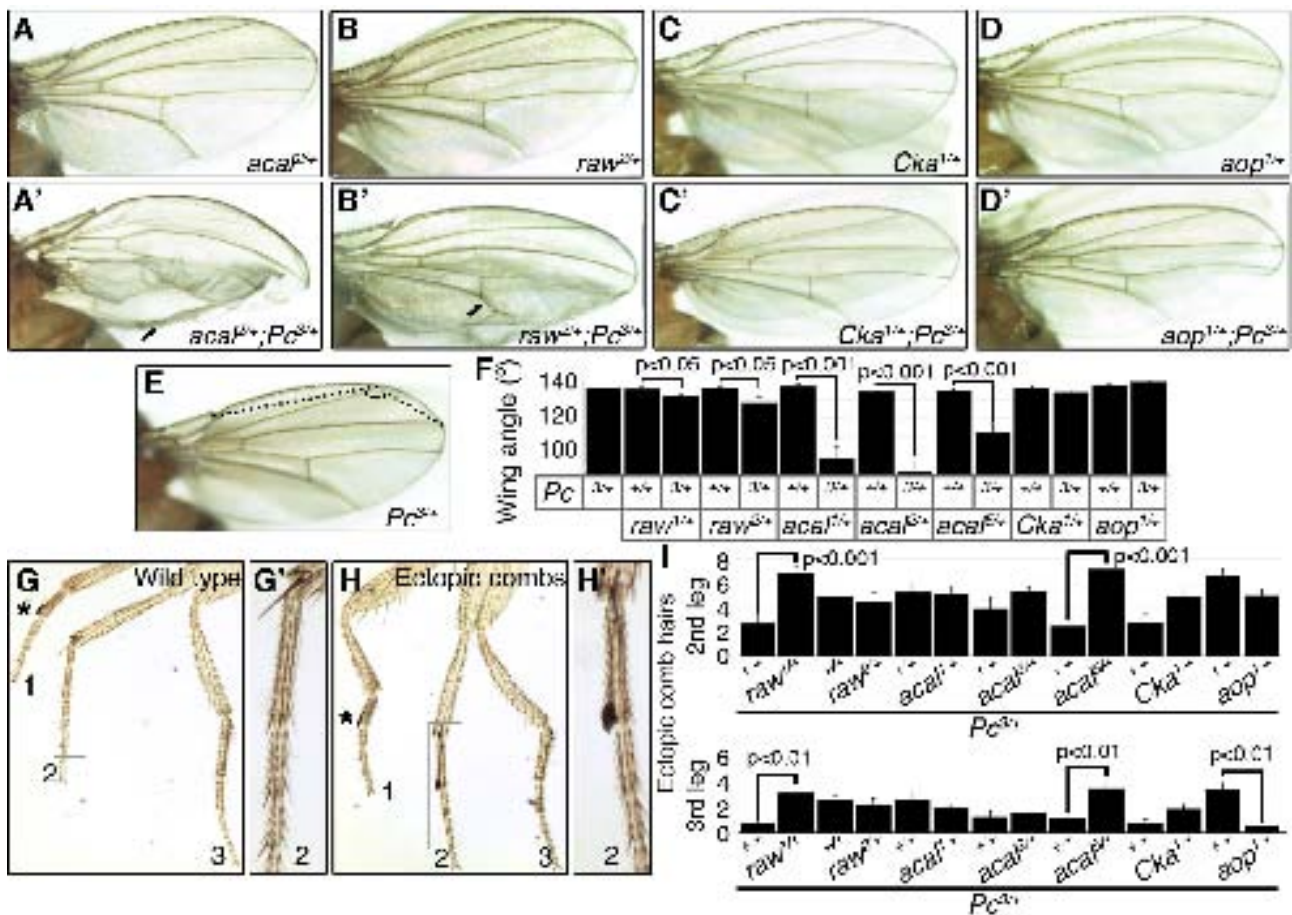


Figure S8. *acal* and *Polycomb* genetically interact.

(A-B) Wing defects of *acal* or *raw* and *Polycomb* (*Pc*) double heterozygotes and control siblings. Arrows in (A') and (B') point to posterior wing compartment reduction. (C-D) *Cka* and *aop* heterozygotes do not have wing defects. (C') *Cka* and (D') *aop* heterozygotes also do not interact with *Pc*³ heterozygotes in the wing. (E) *Pc*³ control wing. (F) 'Wing angle' quantification in *raw*, *acal*, *Cka*, and *aop* heterozygotes with or without a mutant *Pc*³ copy. 'Wing angle' was measured as in (E). (G-G') Wild type male legs and (H-H') extra sex combs phenotype. Numbers indicate leg identity from anterior to posterior. Asterisks mark sex combs in the first pair of male legs. (I) Quantification of the extra sex combs phenotype of *Pc*^{3/+} with *raw*, *acal*, *Cka*, or *aop* heterozygosity, compared to *Pc*^{3/+} siblings. Student's t test (F, I) were used to assess significance. n=10 for each condition.

Table S1. Complementation tests of *acal*, *lola*, and *psq* mutants. Progeny was analyzed for the presence of balancer chromosomes (CyO, i. e., heterozygotes), and flies without balancer chromosomes, i.e., heteroallelic combinations, if present. At least 100 animals were counted for each condition. When heteroallelic flies hatched, males and virgin females were crossed to *yw* adults (virgin females or males, respectively). If no progeny was observed after 4 days, heteroallelic flies were considered sterile. VF means viable and fertile, FS means female sterile, and X means non-complementing.

Protocol S1. Additional materials and methods as well as additional references are provided in the Protocol S1 archive.

Table S2. List of primers used in this study. Primer pairs are shown, along with the expected product size. For other applications, single primers with no product size are shown.