

El transcriptoma d'*ash2*: dianes i funció



Sergi Beltran i Agulló

**Departament de Genètica
Universitat de Barcelona**

Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

TESI DOCTORAL

El transcriptoma d'*ash2*: dianes i funció

Sergi Beltran i Agulló
Barcelona, Maig de 2006

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

El transcriptoma d'*ash2*: dianes i funció

Memòria presentada per
Sergi Beltran i Agulló

per optar al grau de
Doctor en Biologia

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció de la Dra. Montserrat Corominas Guiu i el Dr. Florenci Serras Rigalt al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

Els directors,

L'autor,

Dra. M. Corominas i
Guiu

Dr. F.Serras i
Rigalt

Sergi Beltran i
Agulló

Barcelona, Maig de 2006

ÍNDEX

PRÒLEG	1
INTRODUCCIÓ	3
1 - <i>Drosophila melanogaster</i>	3
1.1 - <i>Drosophila</i> com a organisme model	3
1.1 - L'ala de <i>Drosophila melanogaster</i>	8
2 - La memòria cel·lular	10
2.1 - Manteniment dels gens homeòtics durant l'establiment del patró inicial	10
2.2 - Els gens dels grups <i>Polycomb</i> (PcG) i <i>trithorax</i> (trxG)	11
2.2.1 - Els gens PcG	12
2.2.2 - Els gens trxG	15
2.2.3 - Mecanismes de funcionament de les proteïnes PcG i trxG	18
3 - El gen <i>ash2</i>	24
3.1 - Anàlisi genètica dels gens <i>ash2</i> i <i>ash1</i>	24
3.3 - <i>ash2</i> és necessari pel desenvolupament de l'ala: els al·lels <i>ash2</i> ¹¹²⁴¹¹ i <i>ash2</i> ¹	26
3.3 - Caracterització molecular del gen <i>ash2</i>	27
3.4 - Els complexos d'ASH2 a <i>Drosophila</i>	29
3.5 - ASH2 a llevats i mamífers	29
4 - La tecnologia dels microarrays	32
4.1 - Tipus de microarrays	33
4.2 - La variabilitat dels microarrays	35
4.3 - Processament de dades	36
4.3.1 - Anàlisi de la imatge	36
4.3.2 - Filtratge de dades	37
4.3.3 - Transformació de dades	37
4.3.4 - Anàlisi de dades	40
OBJECTIUS	43
RESULTATS	45
ARTICLE 1	47
Supporting Materials and Methods	55
Additional Results and Discussion	59

ARTICLE 2.....	63
Supplemental Figures and Tables.....	85
Additional Information.....	89

DISCUSSIÓ.....

1 - Els microarrays d'ADN: aspectes metodològics i validació de la tècnica.....

1.1 - Consideracions generals sobre els microarrays.....	103
1.2 - Diferències entre les plataformes de microarrays utilitzades.....	103
1.3 - Els <i>spike-in</i> són un bon control de qualitat.....	104
1.4 - L'elecció del mètode de normalització determina la qualitat de les dades.....	105
1.5 - La comparació de dades obtingudes amb diferents microarrays demostra que els resultats obtinguts són consistents.....	105
1.6 - Les tècniques de RT-PCR semi-quantitativa i immunohistoquímica validen els resultats obtinguts amb els microarrays.....	107

2 - Caracterització funcional del gen *ash2* a través dels transcriptomes dels seus mutants.....

2.1 - Estudi dels al·lels <i>ash2</i> ¹¹²⁴¹¹ , <i>ash2</i> ¹ i <i>ash2</i> ¹¹	108
2.1.1 - Classificació genètica dels al·lels.....	108
2.1.2 - Classificació molecular dels al·lels.....	108
2.2 - Anàlisi dels transcriptomes de mutants <i>ash2</i>	111
2.2.1 - ASH2 està involucrada en la regulació d'un gran ventall de processos.....	111
2.2.2 - El gen <i>ash2</i> és essencial pel correcte desenvolupament de l'ala: el fenotip és un reflex del transcriptoma.....	111
2.2.3 - ASH2 és necessari per la correcta expressió de gens involucrats en la formació dels eixos antero-posterior i dorso-ventral.....	112
2.2.4 - L'apoptosi i la reducció de la proliferació degudes a la falta d'ASH2 permeten explicar el fenotip d'ala petita.....	112
2.2.5 - Alguns dels gens diana d'ASH2 podrien venir definits per PREs.....	114
2.3 - Els transcriptomes dels al·lels <i>ash2</i> ¹¹²⁴¹¹ i <i>ash2</i> ¹¹ són similars entre ells i amb el d' <i>ash1</i> ²² però no amb els de <i>trx</i> ^{E3} / <i>trx</i> ^{B11} : implicacions funcionals.....	115
2.4 - ASH2 podria formar part d'un supercomplexe amb activitat metiltransferasa i desacetilasa.....	116
2.5 - Model d'actuació seqüencial de les proteïnes ASH1 i ASH2.....	117

CONCLUSIONS	121
EPÍLEG	123
REFERÈNCIES	125

PRÒLEG

Què sóc? D'on vinc? Per què existeixo? Aquestes són qüestions que els humans ens hem formulat des de temps immemorials al prendre consciència de la pròpia existència i de la del nostre entorn. Probablement, la nostra característica diferencial respecte els altres éssers vius amb els quals compartim el planeta, sigui la nostra capacitat de raonament complex i d'abstracció. Tant és així, que un ratolí, una granota o una mosca segurament no es deuen preguntar el mateix que nosaltres, ja que les seves "preocupacions" bàsiques són sobreviure i reproduir-se, objectius d'altra banda també intrínsecs a la condició humana. Així doncs, donat que les grans diferències entre els humans i els altres animals són més aviat de nivell intel·lectual que no pas biològic, les respostes que obtinguem a partir de l'estudi d'altres organismes seran, a grans trets, aplicables a les preguntes que ens formulem sobre nosaltres. Filòsofs i científics han proposat des de sempre hipòtesis i han dut a terme experiments clau per donar resposta poc a poc a aquestes qüestions. Tot i així, queden encara molts aspectes per resoldre per tal de poder entendre totes les dimensions de les grans preguntes de la humanitat. El com arribem a ser el que som a partir d'una sola cèl·lula, és un d'aquests grans misteris que tot just comencem a entendre gràcies a la Genètica del Desenvolupament, nascuda de la unió entre l'Embriologia i la Genètica. Mentre que l'Embriologia era bàsicament descriptiva i explicava les diferents etapes del desenvolupament dels organismes a partir de l'observació directa de les mateixes, la Genètica tractava de l'herència dels caràcters de generació en generació. El descobriment de que l'expressió dels gens es traduïa en proteïnes i que això causava diferències entre les cèl·lules durant el desenvolupament, va obrir nous horitzons als científics perquè intentessin resoldre el complicat trencaclosques de la formació dels organismes.

En aquest treball s'ha utilitzat la tècnica dels microarrays d'ADN per fer "fotografies" del transcriptoma de mutants de gens involucrats en el manteniment de la identitat cel·lular, una funció necessària per tal que les cèl·lules no perdin les seves particularitats. Un grup de gens implicat en aquest procés és el dels *trithorax* (*trxG*), i aquesta Tesi s'ha centrat bàsicament en l'estudi a *Drosophila melanogaster* d'un dels seus membres: l'*absent*, *small or homeotic discs 2* (*ash2*). Per tal de poder entendre el problema biològic i l'aproximació experimental que s'ha utilitzat, la Introducció de la Tesi presenta una organització inversa a la descripció del treball realitzat. És a dir, en primer lloc s'introdueix l'organisme model per tal de poder entendre el problema biològic que es planteja i la idoneïtat del sistema per analitzar-lo. A continuació es presenten extensament alguns dels elements involucrats en el problema biològic, tot dedicant-li al gen *ash2* una atenció especial. Per acabar, s'indica una aproximació experimental adequada per analitzar les funcions del gen *ash2* i s'introdueix la tècnica utilitzada ja que

aquesta presenta força variants, algunes de les quals s'han de conèixer per tal de poder avaluar els resultats obtinguts.

Tot seguit, es presenten dos articles que contenen els resultats d'aquesta Tesi i una discussió particular dels mateixos. La majoria dels resultats es troben impresos, o en els propis articles o com a informació addicional dels mateixos. Tanmateix, degut al gran volum de dades que generen els experiments de microarrays, alguns dels resultats es troben només en format electrònic en el Disc Compacte que acompanya la Tesi.

Per acabar, es discuteixen de manera integrada els resultats dels dos articles tenint en compte les dades publicades per altres autors tot indicant possibles noves línies d'investigació i es proposa un model de funcionament pel gen *ash2*.