

El transcriptoma d'*ash2*: dianes i funció



Sergi Beltran i Agulló

**Departament de Genètica
Universitat de Barcelona**

DISCUSSIÓ

El gen *ash2* ha estat classificat com a membre del grup trithorax (*trxG*) de mantenidors de l'estat activat ja que compleix tots els requisits genètics que els caracteritzen: a) mutacions lleus en homozigosi per aquests gens provoquen transformacions semblants a les de pèrdua de funció dels gens homeòtics, b) heterozigots dobles per mutacions severes de diferents *trxG* provoquen alteracions similars, i c) al·lels forts en heterozigosi poden suprimir el fenotip dominant provocat per l'eliminació del gen *Pc* (LaJeunesse and Shearn, 1995; Shearn, 1989; Shearn et al., 1987). Tanmateix, a excepció d'*ash2*, *ash1* i *trx*, els altres membres del grup no compleixen les tres condicions, ja que les seves mutacions no provoquen transformacions homeòtiques per elles mateixes tot i suprimir els fenotips *PcG*. Això ha portat a descriure *ash2*, *ash1* i *trx* com un conjunt de gens relacionats funcionalment diferenciat dels altres membres, que tindrien una funció més general com a activadors o co-activadors transcripcionals (Dejardin and Cavalli, 2004; Shearn, 1989). Clons mutants pels gens *ash2*, *ash1* i *trx* mostren defectes en la formació del patró de l'ala, però els fenotips observats tendeixen a indicar que existeixen diferències entre els tres gens. Per exemple, els fenotips més evidents en clons mutants per *ash2* són la disminució del teixit d'intervena i l'augment del teixit de vena (Amoros et al., 2002; Angulo et al., 2004). D'altra banda, clons mutants per *trx* mostren disrupció en el patró de venació, però en aquest cas sovint associat a la desaparició, en comptes d'extensió, de la vena L5 (Ingham, 1985). En els clons d'*ash1* els efectes observats amb més freqüència són l'aparició de pigmentació ectòpica i la disrupció de la triple fila de quetes (*triple row*; Angulo, En preparació). Aquestes diferències impliquen que *ash2* presenta singularitats en el manteniment de la identitat cel·lular, una afirmació que també ha estat proposada per altres autors (Adamson and Shearn, 1996). Tenint en compte aquestes observacions, els objectius principals d'aquesta Tesi eren, en primer lloc, conèixer els processos moleculars en els quals està involucrat el gen *ash2* per tal d'obtenir una visió general de la seva funció i poder explicar alguns dels fenotips descrits i, en segon lloc, estudiar les possibles relacions entre *ash2*, *ash1* i *trx* a través de la comparació dels patrons d'expressió gènica dels seus mutants.

Per tal d'assolir aquests objectius, i donat que aquestes proteïnes actuen com a reguladors transcripcionals, la tecnologia dels microarrays d'ADN sobresurt d'entre les possibles aproximacions experimentals ja que permet obtenir una imatge global del transcriptoma. Aquesta imatge possibilita la identificació dels gens i processos sobre els quals actua ASH2 i l'establiment d'associacions funcionals amb altres proteïnes *trxG*. A més a més, la integració de dades generades per microarrays i d'altres estudis a nivell genòmic podria contribuir a clarificar alguns aspectes rellevants sobre aquests gens o revelar-ne de nous.

L'estudi de la funció *in vivo* d'una proteïna es pot fer principalment a través de dues aproximacions antagòniques però a voltes complementàries. Una opció és observar els efectes produïts per la sobre-expressió o expressió ectòpica de la proteïna. Alternativament, es poden analitzar les alteracions provocades per la manca o reducció dels nivells de la proteïna. En el cas d'ASH2, la seva distribució és uniforme en els discs imaginals i les glàndules salivals (Adamson and Shearn, 1996) i la seva sobre-expressió no produeix fenotips remarcables (Angulo, En preparació), indicant que una quantitat extra d'ASH2 no produeix un augment de la transcripció. Aquest resultat suggereix que la proteïna s'uneix a llocs específics en els moments precisos per regular la transcripció, i concorda amb el seu paper de mantenidor dels estats activats de la transcripció. Dit d'una altra manera, si un gen es troba reprimat, aquest no s'activarà per més ASH2 que hi hagi ja que primer necessitarà del seu factor de transcripció particular, i si un gen es troba activat, els seus nivells no augmentaran encara que hi hagi més ASH2 ja que aquest es limita a mantenir una conformació oberta de la cromatina. Per tant, la millor manera d'estudiar els processos en els quals està involucrat ASH2 és a través de l'anàlisi de les alteracions produïdes per la reducció o falta de la proteïna. En aquest sentit, l'existència de mutacions de pèrdua de funció pel gen *ash2* a *Drosophila*, permet analitzar-ne la funció *in vivo* tot establint relacions entre les desregulacions transcripcionals produïdes per la seva manca i els fenotips observats.

Així doncs, abans de llençar-nos a estudiar el problema biològic calia, d'una banda analitzar diferents mutants del gen *ash2* per poder escollir els més adequats per dur a terme els experiments i, d'una altra, optimitzar la tècnica dels microarrays per tal d'obtenir resultats fiables i reproduïbles. Tenint en compte aquestes consideracions, la Discussió de la Tesi s'estructura en dos grans blocs, un de naturalesa metodològica i una altre de tipus biològic. En el primer es discuteix la idoneïtat i la reproducibilitat de la tècnica dels microarrays a partir dels resultats particulars de cada article i de la comparació entre ells. En el segon bloc, s'exposen els arguments que han conduït a realitzar els experiments de microarrays amb larves en estadi 3 i discs imaginals d'ala dels al·lels *ash2^{l1}* i *ash2¹¹²⁴¹¹*, per discutir a continuació de manera integrada els efectes produïts per aquestes mutacions i les d'altres gens de la família *trxG* i les possibles implicacions que se'n deriven. Finalment, es proposa un possible model d'actuació de la proteïna ASH2 tenint en compte dades ja conegudes i les aportades per aquesta Tesi.

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

1.1 - Consideracions generals sobre els microarrays

La seqüenciació de diversos genomes i el desenvolupament de la Bioinformàtica han marcat un punt d'inflexió en el camp de la Biologia ja que conformen un substrat de valor inestimable que ha propiciat l'acceleració de la recerca. La seqüència del genoma de *Drosophila*, per exemple, no ens seria de gaire utilitat sense l'aparició paral·lela d'eines bioinformàtiques que ens permetin analitzar-la. Així doncs, cada cop es desenvolupen algoritmes més complexos destinats a predir els gens, els transcrits i la conformació de les proteïnes o els seus dominis, entre d'altres. Tanmateix, la recerca *in silico* ha d'anar lligada a la investigació de laboratori clàssica donat que es fonamenta en les dades que aquesta aporta i la necessita per comprovar les seves prediccions. Totes aquestes eines han permès avançar amb més rapidesa i han propiciat l'aparició de tecnologies com els microarrays, que permeten estudiar genomes sencers cada cop amb més detall ja que, per exemple, es poden dissenyar de manera que cada oligonucleòtid reconegui només un exó determinat. Malgrat tot, els microarrays només aporten llistats de canvis d'expressió gènica que, tot i ser vàlids i útils per si mateixos, difícilment ens duren a conclusions rellevants sense un anàlisi exhaustiu dels mateixos. En aquest sentit, la proliferació d'estudis a escala genòmica i de bases de dades de tot tipus, incloent les de microarrays, obre una porta a l'anotació exhaustiva dels gens i a la comparació de resultats de diferents experiments. Tot i que les aproximacions d'aquest tipus ens poden ajudar enormement a entendre millor els problemes biològics, l'existència de diferents plataformes de microarrays i la falta d'estàndards més rígids en l'anotació dels gens, suposen un gran obstacle a l'hora de comparar dades que provenen de fonts heterogènies.

1.2 - Diferències entre les plataformes de microarrays utilitzades

En aquesta Tesi s'han utilitzat tres tipus diferents de microarrays de *Drosophila*: de cADN, d'oligonucleòtids i d'Affymetrix. Els de cADN estaven fabricats a partir de la primera versió de la col·lecció d'ESTs complets (*Drosophila* Gene Collection Release 1.0) del Berkeley *Drosophila* Genome Project, que només contenia 5.849 clons no redundants. Aquesta dada és clarament inferior als 14.816 gens anotats

a *Drosophila* segons la última distribució de la seqüència del genoma, i per tant aquests microarrays mostraven una visió parcial del transcriptoma. Malgrat tot, els microarrays fabricats a partir d'aquesta col·lecció van ser els primers a ser utilitzats a *Drosophila* i van permetre estudiar per primera vegada processos com la metamorfosi o el desenvolupament del mesoderm a gran escala (Furlong et al., 2001; White et al., 1999). Més endavant, gràcies a la seqüenciació i anotació del genoma, s'han pogut dissenyar sondes específiques per pràcticament tots els gens coneguts i predits per tal de produir microarrays que, com els altres dos tipus que hem utilitzat, donin una informació completa dels transcriptomes que s'estan estudiant.

Donat que els microarrays pateixen de moltes fonts de variabilitat, i que la reproducibilitat de resultats entre laboratoris i/o plataformes no ha estat gaire elevada en alguns casos, la fiabilitat i la credibilitat de les dades obtingues amb aquesta tecnologia ha estat a voltes qüestionada (Kuo et al., 2002; Tan et al., 2003). Per aquesta raó, un dels grans objectius d'aquesta Tesi ha estat optimitzar la tecnologia, de manera que les dades generades fossin de bona qualitat. Per tal d'assolir aquest propòsit hem: produït una col·lecció de controls externs o *spike-in* a partir de 10 clons d'*Arabidopsis thaliana*, comparat resultats entre diferents plataformes, comprovat l'expressió d'alguns gens mitjançant RT-PCR semi-quantitativa i analitzat si els canvis d'expressió de l'ARN es mantenien també a nivell de proteïna.

1.3 - Els *spike-in* són un bon control de qualitat

Els controls *spike-in* han demostrat ser de gran utilitat en els microarrays d'oligonucleòtids ja que, al conèixer les quantitats dipositades en les mostres d'ARN total inicials, sabíem d'avançat quins quocients ens havien de donar els punts corresponents dels microarrays. Addicionalment, la impressió d'un punt per cada control en cadascun dels blocs del microarray ens permet estudiar la reproducibilitat de la hibridació al llarg de tot el portaobjectes. Tal i com es pot visualitzar en els MA-, Box- i MXY-plots, els controls *spike-in* indiquen que els protocols d'amplificació, marcatge i hibridació de mostres són idonis, ja que els quocients de canvi d'expressió estimats a través dels microarrays són un reflex fidedigne de les quantitats d'ARN existents a la mostra. A més, permeten estimar la quantitat mínima d'ARN d'un gen que es necessita per tal que sigui detectat favorablement.

1.4 - L'elecció del mètode de normalització determina la qualitat de les dades

Els *spike-in* ens han servit també per estudiar diferents mètodes de normalització i escollir el que fes una transformació més adequada de les dades. El mètode Global Median ha demostrat ser una transformació clarament insuficient per obtenir unes dades de bona qualitat, ja que només centra les dades i no permet corregir defectes com l'esbiaix de fluorocroms o els defectes espacials produïts per les diferents agulles d'impressió o per la falta d'homogeneïtat en la hibridació o la superfície dels portaobjectes. La Global Loess, una normalització més elaborada, tot i resultar força eficient a l'hora de contrarestar l'esbiaix de fluorocroms, no pot resoldre satisfactòriament els problemes espacials. Aquests últims només han estat corregits de manera adequada per algoritmes que fan normalitzacions separades per cada agulla d'impressió com la Print Tip Loess o que, com la OLIN, al calcular el factor de correcció per cada gen, tenen un pes més gran els punts que es troben més pròxims a ell. Tot i que tots dos mètodes donen resultats similars, OLIN fa una correcció més ajustada ja que no es basa en unitats fixes com els blocs, impresos cadascun d'ells per una mateixa agulla, permetent contrarestar també la variabilitat dins dels mateixos blocs i no només entre ells. A més, a diferència de la Loess, estima els paràmetres més adequats per cada cas i transforma les dades fins que aquestes no són millorables. Finalment, la normalització OSLIN, que és igual que la OLIN però introdueix canvis en l'escala dels quocients, no ha donat bons resultats en el nostre cas ja que sembla introduir variabilitat extra. Així doncs, la normalització és un pas d'important rellevància ja que diferents mètodes proporcionen dades diferents i la qualitat dels resultats obtinguts dependrà, en gran part, de l'elecció d'un mètode de normalització adequat. En general, els algoritmes més elaborats produeixen millors resultats, però una transformació excessiva de les dades també és perjudicial. Així doncs, concloem que els controls *spike-in* són una eina idònia per estimar la qualitat dels protocols i per escollir un bon mètode de normalització, que en el cas dels microarrays d'oligonucleòtids que hem utilitzat és l'OLIN.

1.5 - La comparació de dades obtingudes amb diferents microarrays demostra que els resultats obtinguts són consistents

Malgrat que els controls *spike-in* són de gran ajuda, la seva introducció en els microarrays es força recent, i encara avui és habitual trobar plataformes que no els utilitzin. Els primers microarrays que vàrem utilitzar, per exemple, no tenien controls d'aquest tipus implementats i a més a més, el desenvolupament de

tècniques de transformació de dades encara es trobava en els seus inicis. En aquest sentit, tot i que els mètodes de normalització van millorant cada vegada més, els més antics i els actuals segueixen sent vàlids sempre i quan es facin rèpliques dels microarrays que permetin utilitzar l'estadística per escollir només aquells punts que mostrin un canvi d'expressió robust. Per exemple, si fem rèpliques en les quals les mateixes mostres estudiades estan marcades amb els fluorocroms a l'inrevés (*dye-swap*), podrem contrarestar l'esbiaix de fluorocroms i la variabilitat espacial ja que no esperem que exactament els mateixos problemes d'hibridació es repeteixin en les diferents rèpliques. Tanmateix, això resultarà en un nombre més reduït de quocients vàlids. A través de la comparació de resultats obtinguts amb tres plataformes radicalment diferents, hem constatat que això és cert i que les nostres dades són reproduïbles. Hem hibridat ARN de larves *ash2¹* i larves *wt* en els microarrays de cADN i en els d'oligonucleòtids. A banda de les diferències en el suport, en el primer cas es va comparar ARN polyA+ de la línia *ash2¹* original amb el de larves Canton S, mentre que en el segon es va comparar l'ARN total amplificat de la línia *ash2¹* isogenitzada amb el de la soca a partir de la qual es va dur a terme aquesta isogenització per minimitzar la variabilitat genètica. A més, en la transformació de les dades i en l'anàlisi estadística de les mateixes es van utilitzar mètodes diferents ja que en el segon cas es va optar per algoritmes desenvolupats més recentment. Tot i l'existència d'aquestes grans diferències, els coeficients de correlació i l'elevat solapament de resultats entre els diferents experiments indiquen que la tècnica és fiable més enllà de les plataformes i protocols de laboratori i d'anàlisi utilitzats. Cal destacar que el solapament de dades observat és clarament superior al d'altres autors que han estudiat un mateix procés amb dues versions diferents del GeneChip de *Drosophila* d'Affymetrix (Michaut et al., 2003).

La segona validació del experiments realitzats prové de comparar els microarrays d'oligonucleòtids amb els de la casa comercial Affymetrix. En els dos casos les mostres eren de discs imaginals d'ala de la soca *ash2¹* isogenitzada i de la línia *wt* isogènica, però els protocols d'amplificació, marcatge i hibridació eren diferents i mentre que sobre els microarrays d'oligonucleòtids es van hibridar les dues mostres a la vegada en una hibridació competitiva o de dos colors, en els d'Affymetrix es va hibridar un microarray diferent amb cada mostra i es van obtenir els quocients de la comparació entre els dos. Els coeficients de correlació entre les dues plataformes van ser excepcionalment alts, inclús per sobre dels publicats anteriorment per altres autors (Bammler et al., 2005; Irizarry et al., 2005; Larkin et al., 2005; Yauk et al., 2004), posant de manifest que els resultats obtinguts amb aquestes dues plataformes són equiparables.

1.6 - Les tècniques de RT-PCR semi-quantitativa i immunohistoquímica validen els resultats obtinguts amb els microarrays

Per tal de demostrar que alguns d'aquests gens es troben efectivament sub-expressats o sobre-expressats en els mutants estudiats i que, per tant, els resultats dels microarrays són un reflex de les poblacions de transcrits de les mostres, hem utilitzat tècniques de RT-PCR. Mentre que la RT-PCR semi-quantitativa utilitzada a l'Article 1 només ens permetia establir si hi havia més o menys quantitat d'un transcrit determinat, la tècnica utilitzada a l'Article 2 anava una mica més enllà ja que permetia quantificar aquests canvis d'expressió d'una manera senzilla i ràpida, alternativa a la *Quantitative Real Time RT-PCR*. Els valors obtinguts amb aquesta segona metodologia corroboren el sentit dels canvis d'expressió obtinguts amb els microarrays però revelen que aquests últims tendeixen a subestimar-los. Altres investigadors han fet aquesta mateixa observació sobre els microarrays de cADN, d'oligonucleòtids i d'Affymetrix i alguns inclús han proposat fórmules per tal de corregir aquest esbiaix (Park et al., 2004; Soukas et al., 2000; Yuen et al., 2002). Aquesta subestimació convida a utilitzar un llindar baix per seleccionar els gens diferencialment expressats, ja que molts dels gens que s'hi trobin pròxims segurament presentaran en realitat uns canvis d'expressió majors als calculats.

Finalment, hem aprofitat les possibilitats d'un organisme tant estudiat com *Drosophila* per comprovar si els canvis d'expressió detectats a nivell de transcripció es mantenen a nivell de traducció. En altres paraules, ens hem servit de la tècnica de l'anàlisi clonal per tal d'observar en un mateix disc imaginal d'ala, si cèl·lules *wt* i homozigotes o heterozigotes per l'al·lel *ash2¹* presenten les mateixes quantitats de certes proteïnes. Aquests estudis ens han permès demostrar que la disminució o augment de la transcripció d'un gen acostuma a provocar que la quantitat de la proteïna codificada variï en el mateix sentit. La rellevància d'aquesta observació radica en que són les proteïnes i no pas els transcrits les que al capdavant realitzen la funció biològica, i que per tant els microarrays ens poden donar una idea força real de quines són les alteracions transcripcionals que provoquen un fenotip determinat.

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

2.1 - Estudi dels al·lels *ash2*¹¹²⁴¹¹, *ash2*¹, i *ash2*^{l1}

Per tal d'escollir les mutacions més adequades per dur a terme els experiments de microarrays, es van comparar genèticament i molecularment els al·lels *ash2*¹¹²⁴¹¹, *ash2*^{l1} i *ash2*¹.

2.1.1 - Classificació genètica dels al·lels

L'al·lel *ash2*¹¹²⁴¹¹ presenta la inserció d'un element *P-lacW* en el quart intró com a responsable de la baixa viabilitat, les transformacions homeòtiques i els patrons anòmals observats a l'ala adulta, on és de destacar la transformació de territoris d'intervena a vena (Amoros et al., 2002; Angulo et al., 2004). L'al·lel *ash2*^{l1} és letal en estadi de larva 3 / pupa primerenca però gràcies a la tècnica de l'anàlisi clonal s'ha constatat que també provoca defectes similars però més severos en la formació de l'ala (Angulo et al., 2004). La seqüenciació de l'al·lel *ash2*^{l1} no ha evidenciat cap modificació rellevant excepte una petita deleció i una inserció que podria generar un lloc acceptor de *splicing* alternatiu. Si fos utilitzat, l'ARN resultant veuria afectada la seva pauta de lectura (*open reading frame*) i al cap de 14 codons hi hauria una aturada de la traducció. Per la seva banda, l'al·lel *ash2*¹ conté una inserció de 3 kb a la regió 5', presenta una gran varietat de transformacions homeòtiques, és letal en estadi de pupa i no complementa amb *ash2*^{l1} (Adamson and Shearn, 1996; Amoros et al., 2002; Shearn, 1989; Shearn et al., 1987). Segons aquestes dades, *ash2*¹¹²⁴¹¹ seria l'al·lel més feble mentre que l'*ash2*^{l1} seria el més fort. Per confirmar aquesta classificació i que l'al·lel *ash2*¹ provoca també defectes en el patró de l'ala, es va utilitzar en una combinació heteroal·lèlica amb *ash2*¹¹²⁴¹¹. El fet que aquesta combinació sigui viable i que les ales dels individus adults presentin defectes més acusats que no pas les dels homozigots per *ash2*¹¹²⁴¹¹, indica que *ash2*¹ és un al·lel de severitat mitjana i que també provoca reducció de la mida de les ales i una transformació dels territoris d'intervena a vena. Així doncs la classificació genètica dels al·lels segons la severitat dels fenotips de més feble a més fort és: *ash2*¹¹²⁴¹¹, *ash2*¹ i *ash2*^{l1}.

2.1.2 - Classificació molecular dels al·lels

Per tal de conèixer quines alteracions provoquen les diferents mutacions del gen *ash2* a nivell transcripcional, vam realitzar un *Northern blot* que va revelar l'existència a la larva d'un segon transcrit de 1.4 kb (*ash2.2* o *ash2-RB*) a banda del de 2 kb (*ash2.1*), que ja havia estat prèviament descrit (Adamson and Shearn, 1996). Mentre que *ash2.2* es detecta tant en la línia *ash2*¹¹²⁴¹¹ com en la *ash2*^{l1},

ash2.1 només es troba present en la primera. Experiments de RT-PCR confirmen aquesta observació, revelen que la inserció de l'element *P-lacW* de l'al·lel *ash2*¹¹²⁴¹¹ afecta de manera negativa la transcripció i mostren que els homozigots *ash2*¹ disposen d'ash2.2 i de quantitats pràcticament indetectables d'ash2.1. Aquests resultats correlacionen perfectament amb la classificació dels al·lells proposada anteriorment i amb la naturalesa de les mutacions dels al·lells *ash2*¹¹²⁴¹¹ i *ash2*¹. L'absència del transcrit ash2.1 en els homozigots *ash2*¹ no té un lligam tant directe amb la mutació detectada però es podria explicar per un mecanisme com el de *nonsense mediated decay*, que identifica pautes de lectura obertes defectuoses i elimina ARN missatgers que contenen un codó d'aturada de la traducció i que per tant codifiquen per proteïnes sense sentit o defectuoses (Hentze and Kulozik, 1999). Alternativament, la falta d'ash2.1 podria ser deguda a una mutació situada més enllà de la zona seqüenciada. Pel que fa a la traducció d'aquests transcrits, ash2.1 donaria lloc a una proteïna de 65 kDa i ash2.2 de 39.7 kDa. En relació a això, s'ha indicat que un anticòs contra ASH2 detecta la presència d'una proteïna de 65 kDa a partir dels estadis larvals, encaixant a la perfecció amb la predicció pel transcrit ash2.1, a banda d'una de 94 kDa en estadis embrionaris i una de 48 kDa al llarg de tot el desenvolupament (Cheng and Shearn, 2004). Els autors del treball postulen que mentre que la forma més gran seria codificada per ash2.1, la més petita ho seria per ash2.2, i que les diferències entre el pes molecular predit i l'observat serien degudes en ambdós casos a modificacions post-traduccionals.

El *Northern blot* de diferents estadis de desenvolupament mostra que les quantitats dels transcrits d'*ash2* varien al llarg del temps, essent més reduïdes en els últims estadis embrionaris i els primers larvals, cosa que suggereix un efecte matern. Dit d'una altra manera, com que les cèl·lules maternes (heterozigotes en un al·lel balancejat) serien les responsables de dipositar el transcrit ash2.1 a l'embrió, el homozigots per mutacions d'*ash2* poden arribar fins a estadis larvals ja que els nivells necessaris d'ASH2 necessaris durant l'embriogènesi estarien garantits. La generació de mosaics genètics a la línia germinal podria demostrar aquesta hipòtesi de manera concloent. Nogensmenys, el fet que els transcrits d'*ash2* es trobin en més quantitat a partir del tercer estadi larval implica que aquest és un bon moment per estudiar-ne la seva funció ja que indica que, a banda dels estadis embrionaris, és a partir d'aquest moment que la seva funció serà més necessària. A més, a jutjar pel *Northern blot* del desenvolupament, el producte matern en aquest estadi seria pràcticament inexistent.

L'estudi del transcrit ash2.2 indica que la proteïna resultant tindria el domini SPRY i el de localització nuclear (NLS) però no el PHD ni la seqüència PEST. Precisament, el domini PHD s'intueix que podria ser essencial per la funció d'ASH2 com a membre dels trxG per diverses raons: a) es troba conservat, des de llevats a humans, en els homòlegs d'ASH2 que formen part de complexes amb activitat histona metiltransferasa (Roguev et al., 2001; Wang et al., 2001; Wysocka

et al., 2003), b) és característic d'altres proteïnes dels trxG i PcG com ASH1, Trx i PcL (Aasland et al., 1995; LaJeunesse and Shearn, 1995; Tripoulas et al., 1996) i c) podria jugar un paper clau en les interaccions proteïna-proteïna o en el reconeixement de les modificacions de les cues d'histones com suggereix el fet que s'uneixi a nucleosomes (Bienz, 2006; Ragvin et al., 2004). En conjunt, aquestes dades assenyalen que la funció reguladora d'ASH2 la portaria a terme la proteïna sencera, i que l'al·lel *ash2¹* és idoni per estudiar-la ja que és un al·lel de pèrdua de funció per aquesta activitat. Aquest argument es veu reforçat per l'observació de que *ash2¹* manca la funció canònica descrita pels trxG de manteniment de l'activació dels gens homeòtics donat que les cèl·lules homozigotes per aquest al·lel tenen nivells reduïts d'Ubx. Malgrat tot, no podem descartar que la forma de 48 kDa d'ASH2, que podria venir codificada per *ash2.2*, tingui alguna funció donat que té capacitat d'interaccionar amb altres proteïnes amb les que també interacciona la forma de 65 kDa (Cheng and Shearn, 2004).

En resum, el conjunt de dades genètiques i moleculars indiquen que l'al·lel *ash2¹* és el més adequat per estudiar quins efectes produeix la manca de la funció trxG de la proteïna ASH2. A més, el tercer estadi larval és un bon moment per estudiar-ho ja que, en condicions *wt*, és a partir d'aquest instant quan més augmenta l'expressió del gen *ash2*, suggerint que la seva funció seria més necessària, i els transcrits materns ja s'haurien degradat. Així doncs, mentre en els primers experiments de microarrays (Article 1) es van comparar larves en estadi 3 homozigotes per l'al·lel *ash2¹* per analitzar les alteracions transcripcionals globals produïdes per la manca de la proteïna sencera d'ASH2, en els segons (Article 2) es van comparar discs imaginals d'ala per obtenir una visió particular d'un teixit que presenta compartiments molt definits i que es veuen afectats en els mutants d'*ash2* tal i com s'observa en els fenotips adults (Amoros et al., 2002; Angulo et al., 2004). Es va utilitzar una mutació feble (*ash2¹¹²⁴¹¹*) i una forta (*ash2¹*) per comprovar que els defectes no eren específics d'al·lel i es van comparar totes dues mutacions amb *ash1²²* per esbrinar si la relació funcional que s'havia proposat entre *ash2* i *ash1* a partir d'anàlisis genètiques (Shearn, 1989; Shearn et al., 1987) també es detectava a nivell de transcriptomes. Finalment, es van utilitzar novament larves *ash2¹* homozigotes però amb microarrays que cobreixen pràcticament tot el genoma, per comparar-les amb larves mutants pel tercer gen (*trx*) del conjunt funcional *ash2*, *ash1* i *trx* (Shearn, 1989), amb la finalitat de descriure una hipotètica relació entre els patrons d'expressió gènica.

2.2 - Anàlisi dels transcriptomes de mutants *ash2*

2.2.1 - ASH2 està involucrada en la regulació d'un gran ventall de processos

Tot i que els llistats de gens des-regulats són una gran font d'informació per sí mateixos, en ambdós articles els gens van ser anotats funcionalment a partir dels descriptors del Gene Ontology (GO; Ashburner et al., 2000) per tal de conèixer quines classes de gens o processos estaven predominantment afectats. Mentre que a l'Article 1 es van utilitzar només descriptors de nivell 1 o 2 de les tres classes més importants (*Molecular Function*, *Biological Process* i *Cellular Component*) a l'Article 2 es van obtenir tots els descriptors i es va utilitzar una distribució hipergeomètrica per classificar-los, dotant l'anàlisi d'una major robustesa. A més, a l'Article 1 es va proposar una manera d'agrupar els gens més semblants basada en l'agrupació (*clustering*) d'aquests en funció dels seus descriptors de GO. Totes les diferents classificacions apunten en el mateix sentit i indiquen que ASH2 és necessari per la regulació de múltiples processos tant en el disc imaginal d'ala com en la larva sencera. En tot cas, la regulació de processos de naturalesa variada seria un fet comú entre els trxG i PcG, ja que la classificació dels gens sota control de putatius Elements de Resposta a PcG (PREs) revela que pertanyen a moltes classes diferents (Ringrose et al., 2003).

2.2.2 - El gen *ash2* és essencial pel correcte desenvolupament de l'ala: el fenotip és un reflex del transcriptoma

Els resultats de microarrays de disc imaginal mostren que la majoria de gens classificats com a "*wing disc development*" (desenvolupament del disc de l'ala) estan sub-expressats o tendeixen a estar-ho en els mutants *ash2*^{l1} i *ash2*¹¹²⁴¹¹, correlacionant bé amb la classificació d'*ash2* com a membre dels trxG, involucrats en el manteniment de l'estat activat de la transcripció (LaJeunesse and Shearn, 1995; Shearn, 1989). Aquests resultats indiquen també que la funció d'ASH2 és essencial perquè l'ala es desenvolupi correctament, tal i com ja s'havia descrit a partir del fenotip dels adults i per anàlisi clonal (Amoros et al., 2002; Angulo et al., 2004). La comparació dels gens des-regulats en aquests mutants amb la de treballs que tenien per objectiu esbrinar quins eren els gens predominantment expressats en el disc imaginal d'ala sencer (Klebes et al., 2005) o en dues regions del mateix (Butler et al., 2003), permet arribar a una conclusió semblant i valida la classificació de resultats fonamentada en el GO, tot i només disposar d'una anotació parcial dels gens. A més, el fet que més gens de la zona de la fulla (*blade*) i de l'articulació (*hinge*) de l'ala que no pas de la paret del cos (*body wall*) es trobin des-regulats en els mutants d'*ash2*, indica que aquest seria més necessari pel desenvolupament de les regions pròpiament de l'ala en sí que no pas del tòrax. Aquesta afirmació es veu corroborada pels fenotips, que són més evidents a la fulla de l'ala que en el mesotòrax, on la única anomalia descrita és la reducció del nombre de quetes (*bristles*; Amoros et al., 2001).

2.2.3 - ASH2 és necessari per la correcta expressió de gens involucrats en la formació dels eixos antero-posterior i dorso-ventral

Entre els gens que tendeixen a estar sub-expressats degut a la manca d'ASH2, hi trobem els involucrats en la formació dels patrons antero-posterior i dorso-ventral. El primer es troba clarament afectat en els individus d'*ash2*¹¹²⁴¹¹/*ash2*¹¹²⁴¹¹ i *ash2*¹¹²⁴¹¹/*ash2*¹, ja que tot i que les ales són globalment més reduïdes, el compartiment posterior ho està més que no pas l'anterior. Dues de les proteïnes clau per la formació d'aquest patró, En i Inv, presenten nivells disminuïts en clons de cèl·lules *ash2*¹/*ash2*¹ i una alteració del patró en discs imaginals d'ala d'individus homozigots pel mateix al·lel, indicant que aquesta reducció podria ser la causant del fenotip observat. Pel que fa al patró dorso-ventral, tot i que la corrugació de les venes en els mutants d'*ash2* no sembla estar afectada, els homozigots per *ash2*¹¹²⁴¹¹ presenten una ventralització parcial de les quetes dorsals del marge de l'ala (*wing margin*). Aquesta alteració és semblant a la observada en mutants pel gen *Dr* (Milan et al., 2001), un dels identificats com a sub-expressats tant en els mutants *ash2*¹ com en els *ash2*¹¹²⁴¹¹. Tot i que no és concloent, la similitud entre els dos fenotips suggereix que la reducció de la transcripció de *Dr* en els mutants d'*ash2* seria la causant d'aquesta transformació de les quetes del marge.

Amb l'objectiu de demostrar que els gens *Dr*, *en* i *inv* són els causants directes dels fenotips observats en els eixos antero-posterior i dorso-ventral, es podria provocar la sobre-expressió d'aquests gens en ales homozigotes per *ash2*¹¹²⁴¹¹ per tal d'observar si es produeix un rescat del fenotip. D'altra banda, el fet que la sobre-expressió d'*ash2* en individus homozigots *ash2*¹¹²⁴¹¹ rescati tant la major reducció del compartiment posterior com la ventralització de les quetes del marge, demostra que la mancança d'ASH2 està directament relacionada amb l'aparició d'aquests fenotips.

2.2.4 - L'apoptosi i la reducció de la proliferació degudes a la falta d'ASH2 permeten explicar el fenotip d'ala petita

És de destacar que el transcriptoma dels discs imaginals d'ala dels mutants d'*ash2* també reflexa el fenotip de reducció de la mida de les ales i dels discs imaginals. En aquest sentit, hem observat un nombre significatiu de gens reprimits involucrats en la regulació del creixement (classe GO: "*regulation of growth*") i una activació i repressió de gens relacionats amb la mort (classe GO: "*death*"). Vg és una de les proteïnes essencials per la formació d'una ala, ja que mutacions en el gen que la codifica tenen com a conseqüència mosques sense ales ni halteres (Agrawal et al., 1995; Williams et al., 1991). Vg, que necessita de Sd per exercir la seva funció, és un promotor de la proliferació en el disc imaginal d'ala, i tot i que en mutants nuls no s'observa apoptosi, en mutacions que produeixen una proteïna truncada si que se n'observa, acompanyada de la sobre-expressió del

gen pro-apoptòtic *rpr* (Halder et al., 1998; Paumard-Rigal et al., 1998; Van de Bor et al., 1999). En els mutants d'*ash2*, mentre que tant *vg* com *sd* estan sub-expressats, *rpr* està sobre-expressat. A més, hem demostrat que: els nivells de proteïna de Vg estan reduïts en clons de cèl·lules homozigotes per *ash2^{l1}*, que algunes d'aquestes cèl·lules es troben en apoptosi, que *rpr* es troba realment sobre-expressat, i que els discs imaginals d'ala d'individus *ash2^{l1}/ash2^{l1}* presenten un alta quantitat de mort cel·lular en la zona central del disc (*wing pouch*) principalment localitzada en les presumptives regions d'intervena, recordant el patró de mort produït mitjançant irradiació (Moon et al., 2005). En relació a la mort cel·lular, és important destacar que en els discs imaginals d'homozigots *ash2¹¹²⁴¹¹* no se n'observa un augment significatiu a pesar de que les seves ales són de dimensions reduïdes, cosa que indicaria defectes en la proliferació. Aquest punt requerirà un anàlisi en profunditat mitjançant, per exemple, marcadors com BrdU. Finalment, hem provat que la reducció de mida de les ales i la reducció dels territoris d'intervena són degudes a ASH2, ja que quan és sobre-expressada en discs imaginals d'homozigots *ash2¹¹²⁴¹¹* (que al contrari que els *ash2^{l1}* no presenten gaire mort cel·lular) la grandària de les ales és similar a la *wt* i es restableixen els territoris d'intervena. En conjunt, aquestes dades suggereixen que, en condicions normals, ASH2 funcionaria mantenint activats gens promotors de la proliferació i inhibidors de la mort cel·lular. El fet que la mort cel·lular es localitzi preferencialment en les presumptives zones d'intervena del disc imaginal i que aquestes es trobin reduïdes en les ales mutants per *ash2*, reforça el paper d'aquest gen com a mantenidor de la identitat cel·lular d'intervena proposada anteriorment (Angulo et al., 2004), i implica que els gens que manté activats en aquestes regions són anti-apoptòtics per ells mateixos o mantenen reprimits gens pro-apoptòtics. La sobre-expressió de *vg* en el *wing pouch* de mutants d'*ash2* per una banda, i la d'*ash2* en zones d'intervena mitjançant un promotor (*driver*) característic d'aquestes com *bs* per una altra, podria ajudar a definir millor la implicació d'ASH2 en aquests processos.

A banda de gens reguladors del creixement també es troben alterats, en els mutants d'*ash2*, gens involucrats en el cicle cel·lular. L'expressió de gens d'aquestes dues classes també es troba alterada en mutants de Set1 de llevat (Nislow et al., 1997), una proteïna que s'ha trobat en complexos que inclouen homòlegs d'ASH2 tant en llevats com en humans (Lee and Skalnik, 2005; Miller et al., 2001; Nagy et al., 2002; Roguev et al., 2003; Roguev et al., 2001; Wysocka et al., 2003). Hem demostrat que la CycA, una de les proteïnes involucrades en el cicle cel·lular i que es troba sota el control directe dels PcG (Martinez et al., 2006), presenta nivells reduïts en clons de cèl·lules *ash2^{l1}/ash2^{l1}*, cosa que suggereix una alteració del cicle cel·lular i una implicació directa d'ASH2 en la regulació d'aquesta proteïna. El fet que hi hagi un retard en el desenvolupament dels mutants d'*ash2¹¹²⁴¹¹*, que les seves ales siguin de dimensions reduïdes i que les cèl·lules d'aquestes siguin més grans, dóna suport a aquesta hipòtesi. Tot i així,

un estudi més exhaustiu serà necessari per tal d'establir exactament quines alteracions pateix el cicle cel·lular en aquests mutants. En aquest sentit, experiments de FACS amb cèl·lules disgregades de discs imaginals mutants o cèl·lules en cultiu amb ARNi (ARN d'interferència) contra *ash2*, podrien clarificar quines són les alteracions del cicle que provoca la falta d'ASH2.

Finalment, hem demostrat també que cèl·lules mutants d'*ash2* tenen els nivells d'una proteïna d'adhesió cel·lular, Fas2, augmentats. Tot i que no disposem de dades per confirmar-ho, aquest fet podria tenir alguna relació amb el fenotip de teixit extra de vena que mostren els mutants d'*ash2*, ja que hi ha indicis que en les fases finals de la diferenciació de venes es dona una acumulació preferencial de molècules d'adhesió (De Celis, 1998). A més, aquesta relació obre les portes a una possible implicació d'ASH2 en la neurogènesi a través de Fas2, ja que aquesta juga un paper central en la fasciculació dels axons (Lin et al., 1994; Lin and Goodman, 1994; Yu et al., 2000) i en la regulació del creixement sinàptic (Baines et al., 2002). El fet que tant *ash2* com *Fas2* fossin aïllats en un cribratge per gens involucrats en el guiament dels axons (*axon guidance*) i en la sinaptogènesi (Kraut et al., 2001) i que els cervells de larves mutants d'*ash2* siguin més petits, presentin un patró d'expressió alterat de Fas2 en els lòbuls òptics i mostrin defectes de fasciculació, reforcen aquesta possible relació.

2.2.5 - Alguns dels gens diana d'ASH2 podrien venir definits per PREs

S'ha demostrat que alguns complexos trxG i PcG són reclutats per unes seqüències de la cromatina encara poc conegudes: els Elements de Resposta a Polycomb o trithorax (PREs o TREs) per tal de mantenir l'estat activat o reprimint dels gens (Beisel et al., 2002; Huang et al., 2002; Mohd-Sarip et al., 2005; Mohd-Sarip et al., 2002; Mulholland et al., 2003; Petruk et al., 2001). Aquests elements, que sovint s'anomenen PREs o TREs indistintament, permeten com a mínim en alguns casos, el reconeixement per part dels PcG i trxG dels seus gens diana. Els PREs, actuarien per defecte com a silenciadors a través de l'acció dels PcG, ja que si fem un transgènic amb un PRE a 5' d'un gen marcador, la transcripció d'aquest es troba reprimida sempre i quan no escindim el PRE o utilitzem un fons mutant per PcG (Sengupta et al., 2004). Per tal d'identificar els possibles gens diana dels PcG i trxG es va dissenyar un algoritme, basat en el coneixement que es tenia dels PREs, que va detectar 167 seqüències candidates, aproximadament una meitat de les que s'estima que hi ha en el genoma (Ringrose et al., 2003).

Amb la intenció d'obtenir informació que ens pogués indicar si ASH2 actua preferencialment sobre gens amb PRE, vam anotar els gens des-regulats en els mutants d'*ash2* que tenien un PRE predit. Tot i que vam identificar un nombre reduït de gens alterats amb una putativa seqüència PRE, n'hi havia el doble de sub-expressats que de sobre-expressats, cosa esperada ja que en condicions normals ASH2 mantindria estats activats de transcripció. A més, malgrat que el nombre de gens sub-expressats amb PRE sigui baix, és altament improbable que

aquest es doni per atzar, cosa que indicaria que ASH2 podria tenir una certa preferència per mantenir activats els gens amb PRE. El fet que els gens *Dr*, *en*, *vg*, i *CycA* comentats anteriorment, disposin de PREs a prop (Martinez et al., 2006; Ringrose et al., 2003), els converteix en òptims candidats per ser regulats directament per l'acció d'ASH2 ja que es troben sub-expressats en les cèl·lules que els hi manca la seva funció. Per tal d'augmentar el coneixement en aquest punt, l'utilització de línies transgèniques amb gens marcadors sota el control de múltiples PREs/TREs seria de gran ajuda, ja que permetria establir si en els mutants d'*ash2* es perd l'expressió del gen marcador i, en el cas de conèixer el punt d'inserció de la construcció, es podria observar si ASH2 s'acumula en grans quantitats a la banda corresponent de cromosomes politènics.

2.3 - Els transcriptomes dels al·lels *ash2*¹¹²⁴¹¹ i *ash2*¹ són similars entre ells i amb el d'*ash1*²² però no amb els de *trx*^{E3}/*trx*^{B11}: implicacions funcionals

Malgrat les diferències existents entre els al·lels *ash2*¹ i *ash2*¹¹²⁴¹¹ a nivell molecular i fenotípic tant dels discs imaginals d'ala com de la fase de letalitat, els transcriptomes d'aquests dos al·lels són extremadament similars a jutjar per l'alta correlació positiva observada entre ells i per la classificació basada en el GO. Aquest fet suggereix que les alteracions en el patró d'expressió gènica detectades en ambdós mutants són específiques del gen *ash2* i, en el cas d'*ash2*¹, no es veuen greument afectades per la severitat de l'al·lel, la qual cosa podria ser deguda a que l'estadi en el qual s'han dut a terme els experiments és, segons vist amb el *Northern blot* del desenvolupament, el moment a partir del qual la funció d'ASH2 serà més necessària després d'haver-se eliminat els transcrits materns. A més, el fet que els transcriptomes de larves i discs imaginals d'*ash2*¹ mostrin també una bona correlació, indica que la majoria de gens sobre els quals actua ASH2 necessiten estar activats tant en el conjunt de la larva com en el disc imaginal d'ala en concret. Aquest fet encaixa bé amb la funció d'ASH2 com a regulador d'un gran nombre de processos biològics.

Amb la intenció d'estudiar si la relació funcional proposada entre els gens *ash2*, *ash1* i *trx* (Shearn, 1989) es mantenia també entre els seus patrons d'expressió gènica, vam comparar els transcriptomes de discs imaginals i larves dels mutants d'*ash2* amb els transcriptomes de discs imaginals del mutant *ash1*²²/*ash1*²² i larves de la combinació *trx*^{E3}/*trx*^{B11}. Pel que respecta al transcriptoma d'*ash1*²², s'ha observat que aquest presenta menys alteracions que no pas els de mutants d'*ash2*, la qual cosa era d'esperar ja que presenta uns discs imaginals d'ala força normals i una fase de letalitat més tardana. Tanmateix, els transcriptomes de mutants d'*ash2* i *ash1* presenten una correlació positiva i la

gran majoria dels gens alterats en el mutant d'*ash1* també ho estan en els d'*ash2*. Si es té en consideració també la semblança entre les classes de GO afectades pels tres al·lels, es pot concloure que els transcriptomes d'*ash1* i *ash2* mimetitzen la relació funcional descrita a través d'interaccions gèniques (Shearn, 1989). Dit d'una altra manera, les similituds observades a nivell fenotípic es deuen a que els dos gens regulen en comú alguns processos, els quals es veurien alterats de manera similar quan un dels dos gens es troba mutat.

Sorprenentment, el transcriptoma de les larves mutants de *trx* no presenta correlació amb el de les *ash2*¹, suggerint que en general ASH2 i Trx no estarien regulant ni els mateixos gens ni els mateixos processos biològics. Tanmateix, per tal d'avaluar si Trx i ASH1 sí que comparteixen la regulació dels mateixos gens i processos, seria necessària una comparació directa dels seus transcriptomes. El fet que Trx pugui interaccionar físicament amb ASH1 i que tots dos co-localitzin en cromosomes politènics i interaccionin amb la histona acetilasa dCBP (Bantignies et al., 2000; Chinwalla et al., 1995; Petruk et al., 2001; Rozovskaia et al., 1999; Tripoulas et al., 1996), indica que en alguns casos ASH1 i Trx actuarien sobre els mateixos loci i que per tant la correlació entre els seus transcriptomes seria positiva. Per tal d'establir relacions més concretes entre les proteïnes ASH2, ASH1 i Trx seria de gran ajuda conèixer quins són exactament els seus llocs d'unió a la cromatina. Aquestes dades permetrien inferir quins són els gens diana particulars de cadascuna de les proteïnes ASH2, ASH1 i Trx i quins són comuns en dues de les proteïnes o les tres. En aquest sentit, projectes com el d'INDAC (International *Drosophila* Consortium; <http://www.indac.net>) per generar microarrays d'ADN que cobreixin tota la eucromatina del genoma, o com el de Berkeley *Drosophila* Transcription Network Project (<http://bdtnp.lbl.gov/index.htm>) per desxifrar la informació transcripcional present a les seqüències d'ADN, podrien aportar en un futur pròxim eines més adequades i informació valuosa que permetés estudiar i entendre millor el mecanisme d'acció dels *trxG* i PcG.

2.4 - ASH2 podria formar part d'un supercomplexe amb activitat metiltransferasa i desacetilasa

D'entre les comparacions realitzades entre els patrons d'expressió gènica dels mutants d'*ash2* amb dades provinents d'estudis de gens reguladors de la cromatina, és de destacar la similitud observada amb cèl·lules deficientes per Sin3A (Pile et al., 2003), tant a nivell global dels processos alterats com a nivell concret dels gens regulats. Sorprenentment, els efectes produïts per la deleció d'una proteïna, ASH2, relacionada en humans i llevats amb activitats activadores com la metilació de la H3K4 (Goo et al., 2003; Hughes et al., 2004; Lee and Skalnik, 2005; Milne et al., 2005; Nagy et al., 2002; Roguev et al., 2003; Roguev

et al., 2001; Sierra et al., 2006; Wysocka et al., 2003; Yokoyama et al., 2004), són similars als provocats per la disminució d'una proteïna, Sin3A, associada amb activitats repressores com la desacetilació d'histones (Wysocka et al., 2003). L'anàlisi en profunditat d'aquesta qüestió, ens ha portat a demostrar, que tal i com passa en humans (Wysocka et al., 2003), ASH2 i Sin3A interaccionen tots dos amb HCF, un factor associat a cromatina que juga un paper important en la regulació de la proliferació (Goto et al., 1997; Wilson et al., 1997). En humans, aquestes tres proteïnes formen part d'un supercomplexe que conté activitat desacetilasa a través del complexe Sin3/HDAC i metiltransferasa mitjançant el complexe Set1/ASH2 (Wysocka et al., 2003), que ha estat àmpliament descrit tant en humans com en llevats per diversos grups (Hughes et al., 2004; Lee and Skalnik, 2005; Nagy et al., 2002; Roguev et al., 2003; Roguev et al., 2001; Yokoyama et al., 2004). Aquestes dades, conjuntament amb el fet que ASH2, Sin3A i HCF co-localitzin en molts loci de cromosomes politènics, fa pensar que *Drosophila* també contindria un complexe Set1/ASH2 i que aquest podria agrupar-se en supercomplexes amb diverses activitats modificadores de la cromatina. Nos experiments hauran de demostrar si aquesta hipòtesi és certa, i tot i que Trx presenta certa homologia amb Set1 de llevats i humans, CG17396 seria la proteïna homòloga a *Drosophila* candidata a interaccionar amb ASH2 (Roguev et al., 2001). El fet que els transcriptomes de mutants d'*ash2* i *trx* no mostrin correlació, dóna força a aquesta suposició.

2.5 - Model d'actuació seqüencial de les proteïnes ASH1 i ASH2

Tenint en compte les dades disponibles a la bibliografia i les aportades per aquesta Tesi, proposem un possible model per explicar l'activitat de la proteïna ASH2 (veure Figura D1) basat en les observacions següents:

- ASH2 i ASH1 són subunitats de dos complexos diferents, i en cap dels dos s'hi ha detectat la presència de Trx (Papoulas et al., 1998).
- ASH2 i ASH1 deuen compartir un mecanisme d'acció, ja que els patrons d'expressió gènica provocats per la falta d'una o altra són similars i interaccionen a nivell genètic (Shearn, 1989).
- ASH1 és reclutada a regions reguladores d'*Ubx* per transcrits no codificants d'Elements de Resposta a *trxG* (TREs; Sanchez-Elsner et al., 2006), cosa que implica que el gen ha de ser prèviament activat. En aquest sentit, l'expressió anòmla d'*Ubx* en dobles mutants *scm/ash1* també indica que ASH1 no és necessari per provocar l'activació gènica en sí (Klymenko and Muller, 2004). El fet que ASH2 tingui un domini SPRY i que s'hagi proposat que aquest podria

estar involucrat en relacions ARN-proteïna (Ponting et al., 1997), fa pensar que ASH2 també podria ser reclutat als seus loci mitjançant ARNs no codificants. Altres possibilitats serien que ASH2 s'unís a la cromatina mitjançant altres proteïnes o a través del seu domini PHD, que en altres proteïnes pot unir-se a nucleosomes (Ragvin et al., 2004).

- La funció o la presència d'ASH1 seria necessària per tal que ASH2 pogués unir-se a la cromatina, ja que l'acumulació d'aquesta última es troba reduïda en cromosomes politènics de mutants d'*ash1* (Cheng and Shearn, 2004).

- El manteniment de l'estat activat es donaria a través de modificacions de la cromatina, ja que ASH1 és una histona metiltransferasa (Beisel et al., 2002; Byrd and Shearn, 2003) i ASH2 forma part de complexos que contenen aquesta activitat, tant en llevats com en humans (Goo et al., 2003; Hughes et al., 2004; Lee and Skalnik, 2005; Milne et al., 2005; Nagy et al., 2002; Roguev et al., 2003; Roguev et al., 2001; Sierra et al., 2006; Wysocka et al., 2003; Yokoyama et al., 2004). Els resultats de l'Article 2 suggereixen que tals complexos també es trobarien a *Drosophila*.

- ASH1 interacciona físicament i funcional amb la histona acetilasa dCBP (Bantignies et al., 2000).

- ASH1 seria essencial per la mono- i/o la di-metilació de la H3K4 dels loci on s'uneix, ja que cromosomes politènics de mutants per *ash1* mostren una severa reducció d'aquesta segona activitat. Per contra, els mutants d'*ash2* només mostren una petita reducció de la di-metilació (Byrd and Shearn, 2003).

- Els complexos Set1 de *S. cerevisiae* poden mono-, di- i tri-metilar (Schneider et al., 2005).

- Els homòlegs d'ASH2 a llevat, Bre2/Cps60 i Spp1/Cps40, són essencials per la tri-metilació de la H3K4 (Schlichter and Cairns, 2005; Schneider et al., 2005), una propietat que presenten els gens transcripcionalment actius (Santos-Rosa et al., 2002).

- ASH2 s'uneix a Sktl i els cromosomes politènics dels seus mutants mostren un augment de la hiperfosforilació de la histona H1, una modificació relacionada amb l'alta condensació de la cromatina. En condicions normals, la funció d'ASH2-Sktl podria ser la de desplaçar la histona H1 per tal que no s'hiperfosforilés, permetent la descondensació de la cromatina (Cheng and Shearn, 2004).

- L'Article 2 mostra que tant ASH2 com Sin3A s'uneixen a HCF. La funció desacetiladora del complexe Sin3A/Rpd3 és necessària per activar gens de resposta a l'estrès osmòtic (De Nadal et al., 2004).

- Tot i que no s'ha demostrat que Trx i ASH1 formin part d'un mateix complexe, ambdues co-immunoprecipiten i co-localitzen en alguns loci de cromosomes politènics (Chinwalla et al., 1995; Rozovskaia et al., 1999; Tripoulas et al., 1996). Tanmateix, la unió de Trx a aquests cromosomes és dependent d'ASH1 (Kuzin et al., 1994).

- ASH2 i Trx no estarien actuant conjuntament en la regulació gènica, ja que, com mostra l'Article 2, els seus transcriptomes no presenten cap tipus de correlació. Això indicaria que ASH1 actuaria en alguns casos amb ASH2 i en altres amb Trx.

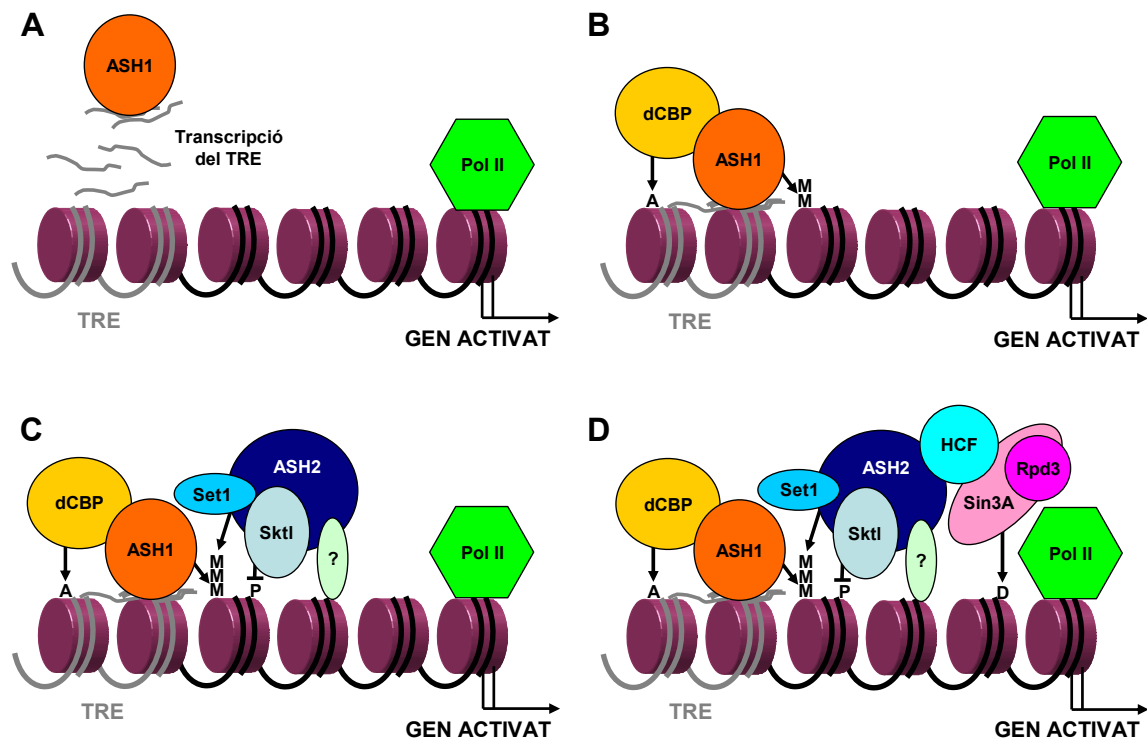


Figura D1| Model d'actuació seqüencial de les proteïnes ASH1 i ASH2. M, A, D i P signifiquen metilació, acetilació, desacetilació i fosforilació, respectivament. Veure text per una descripció del model.

Així doncs, ASH1 seria reclutat en primer lloc als loci actius, detectables gràcies a la transcripció dels seus PREs (Figura D1-A). La unió d'ASH1 conduiria a formar un complexe que modificaria les cues d'histones, mono- i/o di-metilant-les i/o acetilant-les gràcies a la seva unió amb dCBP (Figura D1-B). Aquestes activitats conferirien un substrat adequat per la unió o bé d'un complexe Set1/ASH2 o d'un altre que inclogués Trx (no mostrat a la figura). No està clar com s'uniria el complexe a la cromatina, però no es pot descartar que fos a través dels dominis PHD de les diferents proteïnes. Aquest complexe seria l'encarregat de subsequents mono- i di-metilacions i, mitjançant ASH2, de tri-metilacions. D'altra banda, la incorporació al complexe de proteïnes com Skt1 podria provocar o evitar altres modificacions de les histones (Figura D1-C). Finalment, a través

d'HCF es podrien reclutar altres complexes amb diverses activitats, com per exemple desacetiladores, que podrien ser necessàries per regular directament els factors de transcripció o per mantenir un equilibri dinàmic de les modificacions (Figura D1-D). Alternativament, les diferents activitats modificadores podrien ser útils per tal que el gen pogués canviar ràpidament d'un estat actiu a un de reprimat si fos necessari (no mostrat), cosa que no té per què ser contradictòria amb el paper dels trxG com a mantenidors de l'estat activat.