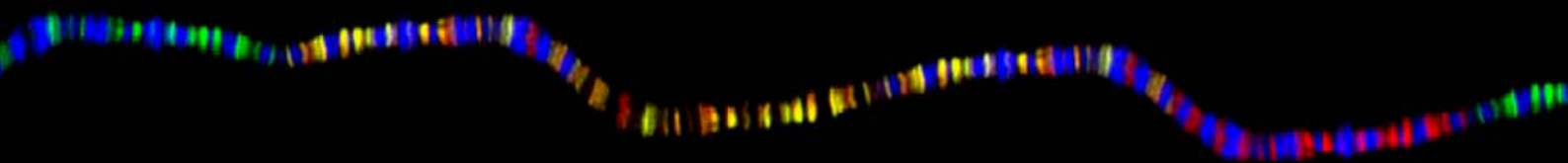


A grayscale micrograph showing a dense field of long, thin, hair-like structures (trichomes) on a light-colored surface, likely a Drosophila wing. The hairs are oriented in various directions, creating a complex, textured pattern.

***Ash2* a *Drosophila*:**
anàlisi funcional i
aproximació al complex



**Mireia Angulo
i Parera**

Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

TESI DOCTORAL

***Ash2 a Drosophila:*
anàlisi funcional i
aproximació al complexe**

Mireia Angulo i Parera
Barcelona, Juny de 2006

Programa de Doctorat del Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Bienni 2001-2003

***Ash2 a Drosophila:* anàlisi funcional i aproximació al complex**

Memòria presentada per
Mireia Angulo i Parera

per optar al grau de
Doctora en Biologia

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

Els directors,

L'autora,

Dra. M. Corominas i
Guiu

Dr. F.Serras i
Rigalt

Mireia Angulo i
Parera

Barcelona, Juny de 2006

ÍNDEX

| | |
|--|----|
| PRÒLEG | 1 |
| INTRODUCCIÓ | 3 |
| 1 - La memòria cel·lular | 3 |
| 1.1 - Les decisions del desenvolupament: com es mantenenen? | 3 |
| 1.2 - PcG, trxG i memòria cel·lular | 4 |
| 1.2.1 - Mecanismes epigenètics: el codi d'histones | 5 |
| 1.2.2 - Els complexos PcG a <i>Drosophila</i> | 5 |
| 1.2.3 - Com els PcG reconeixen els seus gens diana? | 8 |
| 1.2.4 - Mecanismes de repressió dels PcG | 9 |
| 1.2.5 - Els complexos trxG a <i>Drosophila</i> | 10 |
| 1.2.6 - Com els trxG reconeixen els seus gens diana? | 13 |
| 1.2.7 - Mecanismes d'activació dels trxG | 13 |
| 2 – El gen <i>ash2</i> | 16 |
| 2.1 - Estudis genètics d' <i>ash2</i> i <i>ash1</i> | 16 |
| 2.2 – Caracterització molecular del gen <i>ash2</i> | 17 |
| 2.3 - Els complexos ASH2 | 18 |
| 2.3.1 - Complexos ASH2 a mamífers | 20 |
| 3 – L'ala de <i>Drosophila</i> com a model d'estudi | 24 |
| 3.1 - <i>Drosophila melanogaster</i> com a organisme model | 24 |
| 3.2 - L'ala de <i>Drosophila</i> com a model per estudiar la funció d' <i>ash2</i> | 28 |
| 3.2.1 - Posicionament de les venes al llarg de l'eix A/P | 29 |
| 3.2.2 - Formació i diferenciació de les venes | 33 |
| 3.3 - Caracterització dels mutants d' <i>ash2</i> | 37 |
| 3.4 - Funció dels altres gens trxG a l'ala | 38 |
| OBJECTIUS | 41 |
| RESULTATS | 43 |
| ARTICLE 1 | 43 |
| Supplemental Text and Figures | 57 |
| ARTICLE 2 | 63 |
| Supplemental Text and Figures | 83 |

| | |
|--|-----|
| DISCUSSIÓ | 89 |
| 1 - Els mutants d'<i>ash2</i> | 91 |
| 1.1 - Característiques genètiques dels mutants d' <i>ash2</i> | 91 |
| 1.2 - Característiques moleculars dels mutants d' <i>ash2</i> | 92 |
| 2 - <i>ash2</i> regula el patró de venes i intervenes | 95 |
| 2.1 - El gen <i>ash2</i> en la formació del patró de venes i intervenes..... | 95 |
| 2.2 - El gen <i>ash2</i> regula l'expressió del gen organitzador de vena L2 | 97 |
| 2.3 – Els <i>trxG</i> a l'ala de <i>Drosophila</i> | 100 |
| 3 - Aproximació al complex proteic d'ASH2 | 102 |
| 3.1 - Interaccions proteiques d'ASH2..... | 102 |
| 3.2 - HCF, ASH2 i Sin3A colocalitzen en cromosomes politènics..... | 104 |
| 3.2.1 - ASH2 i HCF colocalitzen amb la trimetilació de la H3K4..... | 105 |
| 3.3 - Model de funcionament d'ASH2..... | 105 |
| | |
| CONCLUSIONS | 109 |
| | |
| REFERÈNCIES | 111 |
| | |
| AGRAÏMENTS | 123 |

PRÒLEG

El genoma humà és disset vegades més gran que el de *Drosophila* però tot i així, el nombre de gens codificants que conté no és molt més elevat que el de genomes d'organismes menys complexes. Si els éssers vius comparteixen una extensa quantitat d'informació genètica codificant, que és el que fa tan diferent un home d'una mosca? Les diferències entre els organismes no només sorgeixen del nombre de gens que contenen sinó de com, quan i on aquests gens es regulen.

En els organismes multicel·lulars, malgrat cada cèl·lula hereda el mateix material genètic, hi ha una elevada diversitat funcional que és fruit de la diferenciació cel·lular durant el desenvolupament. Aquesta diversitat sorgeix per una expressió gènica diferencial. El codi genètic presenta una gran quantitat d'instruccions per regular l'expressió gènica, com els *enhancers* o els promotors, però a més, hi ha una font externa de regulació que no depèn de la seqüència primària (ATGC) de l'ADN i que igualment s'hereda. Aquest últim mecanisme de regulació o, herència epigenètica, permet que cada tipus de cèl·lules diferenciades expressin uns gens i no uns altres, tot i tenir el mateix ADN, i que recordin quins són els gens que han de mantenir activats o reprimits després de cada divisió cel·lular per preservar la seva identitat.

Conrad H. Waddington va introduir el terme epigenètica fa més de 60 anys però el significat d'aquesta paraula ha sofert alguns canvis des de llavors. Actualment, l'herència epigenètica es defineix com canvis heretables en la funció del genoma que tenen lloc sense alterar la seqüència nucleotídica de l'ADN, mentre que inicialment, era la branca de la Biologia que estudiava les interaccions entre els gens i els seus productes, les quals donaven lloc al fenotip. Els estudis de Waddington van quedar emmascarats pel descobriment de l'estructura de l'ADN en doble hèlix, però van tornar a ressorgir cap als anys 80 quan la cromatina va ser el centre de moltes investigacions. En aquests darrers anys s'han publicat una gran quantitat de treballs on s'estudia com una cèl·lula, un cop ha pres la decisió d'adquirir una identitat determinada, és capaç de mantenir aquest estat diferenciat al llarg de generacions. A més, l'epigenètica no només s'ha relacionat amb Desenvolupament sinó que s'ha proposat que canvis en les marques epigenètiques poden resultar en alteracions severes de la programació gènica que poden conduir a alguns tipus de càncers, obrint la porta a la creació de noves teràpies antitumorals.

Un problema biològic com el del manteniment d'estats diferenciats s'ha d'enfocar des de diferents punts de vista, de manera que la Genètica, la Bioinformàtica, la Bioquímica o la Biologia Cel·lular interaccionin per trobar una resposta. Les aproximacions interdisciplinàries són fonamentals per entendre qualsevol procés biològic dintre d'un context. Per aquest motiu, en aquesta Tesi s'ha estudiat el gen *absent, small or homeotic disc 2 (ash2)*, un dels gens que es

creu que forma part de la maquinària de remodelació epigenètica de la cromatina necessari per mantenir estats activats d'expressió gènica, mitjançant aproximacions genètiques, cel·lulars i bioquímiques.

A la introducció d'aquesta Tesi Doctoral es revisa el problema biològic de com una cèl·lula manté la memòria cel·lular i quins són els possibles mecanismes epigenètics que s'utilitzen per mantenir-la. Després, es fa una àmplia descripció del gen *ash2* com a regulador positiu de la transcripció i de tot el que se sap sobre la seva funció i complexos en diferents organismes. Posteriorment, s'introdueix l'ala de *Drosophila melanogaster* i la formació del patró de venes i intervenes durant el desenvolupament com a sistema model per poder entendre la funció d'*ash2* i el seu paper en el manteniment d'una identitat cel·lular. A l'apartat de resultats s'estudia la funció i el complex proteic del gen *ash2* a *Drosophila*. Aquest apartat està dividit en dos articles, cadascun d'ells amb la corresponent informació suplementària. En el primer article, s'utilitza el patró de venes i intervenes de l'ala com a sistema model per entendre quin és el paper d'*ash2* en la regulació i/o manteniment de l'expressió dels gens implicats en la formació d'aquest patró. En el segon article, mitjançant l'ús de línies de cultiu cel·lular de *Drosophila*, s'intenta augmentar l'escàs coneixement sobre les interaccions proteiques d'ASH2 en aquest organisme i es descriu que interacciona amb altres proteïnes que han estat prèviament relacionades amb proliferació cel·lular i remodelació de la cromatina. Per acabar, es discuteixen de manera global les dades dels dos articles i es proposen dos models de funcionament pel gen *ash2*.