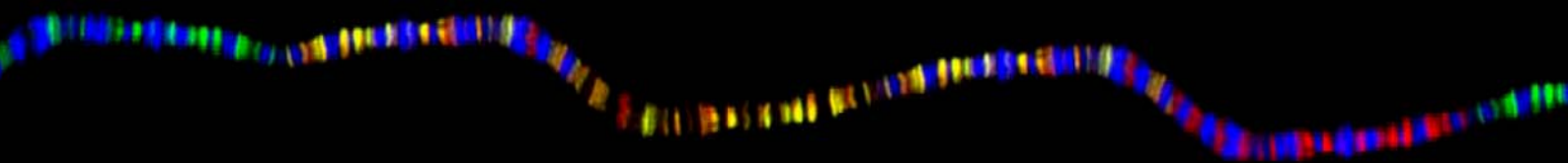


A grayscale micrograph showing a dense field of fine, hair-like structures (trichomes) on a light-colored surface, likely a Drosophila wing. The hairs are oriented in various directions, creating a complex, textured pattern.

***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

INTRODUCCIÓ

Bloc1

La memòria cel·lular

1.1 - Les decisions del desenvolupament: com es mantenen?

A l'inici del desenvolupament, les cèl·lules d'un organisme comencen a diferenciar-se en resposta a estímuls intrínsecs i del seu entorn cel·lular. Aquests estímuls provoquen l'expressió de factors reguladors de la transcripció que estableixen uns patrons d'expressió gènica específics per a cada tipus cel·lular. Malgrat l'expressió d'aquests factors és transitòria, els patrons d'expressió gènica establerts inicialment es mantenen al llarg del desenvolupament, transmetent-se de generació en generació a les cèl·lules filles. El fet que una cèl·lula expressi uns gens i no uns altres durant molts cicles de divisió cel·lular, li confereix una **identitat** pròpia i fa sobreentendre que hi ha d'haver un mecanisme que reconegui i preservi el patró de gens que s'ha d'activar o silenciar. La capacitat d'una cèl·lula per "recordar" quins gens ha de mantenir activats o reprimits al llarg del desenvolupament s'ha anomenat **memòria cel·lular**.

Tot i que encara resta molt per entendre la maquinària molecular que condueix aquest sistema de memòria, sembla que l'existència d'uns **senyals epigenètics** que no depenen de la seqüència nucleotídica de l'ADN, serviren per identificar si un gen s'ha de mantenir expressat o silenciado (Brock and Fisher, 2005; Brock and van Lohuizen, 2001; Cavalli, 2002; Francis and Kingston, 2001). Aquests senyals serien reconeguts i interpretats per complexes de proteïnes remodeladores de la cromatina que activarien o reprimirien la transcripció dels gens segons la informació dipositada en l'ADN. Si es produeixen errors en el manteniment de la identitat cel·lular, aquests poden causar letalitat embrionària si tenen lloc en estadis primerencs del desenvolupament, o bé, si els defectes tenen lloc en estadis més avançats, poden desembocar en greus anomalies o en càncer (Jacobs and van Lohuizen, 2002; van Lohuizen, 1999).

Com es reconeix que un mateix gen ha d'estar reprimat en un tipus de cèl·lula i activat en un altre? Aquesta és una de les preguntes claus en Biologia. *Drosophila melanogaster* és un organisme model ideal per estudiar aquesta qüestió degut a què s'han caracteritzat molts dels gens involucrats en l'establiment i formació de diferents patrons al llarg del desenvolupament. Un dels exemples més ben estudiats és el manteniment del patró d'expressió dels **gens homeòtics** o **Hox**, encarregats de determinar la identitat dels segments corporals. A *Drosophila*, hi ha una cascada transitòria de factors de transcripció d'origen matern, o produïda al zigot pels gens *gap*, *pair-rule* o *segment polarity*, que estableix uns patrons d'expressió dels gens Hox en regions específiques al llarg de l'eix antero-posterior de l'embrió (Ingham and Martinez Arias, 1992). Els factors

de transcripció desapareixen a l'inici de la gastrulació però els patrons d'expressió dels gens Hox són estables durant el desenvolupament i a l'organisme adult (Simon, 1995). Mutacions en els gens Hox provoquen transformacions homeòtiques, és a dir, que un segment corporal adquireixi la identitat d'un altre. Per exemple, l'any 1915 Calvin Bridges va trobar una mutació en el gen homeòtic *bithorax* (*bx*) que transformava part de l'halter cap a ala (revisat a Lewis, 1998). Altres estudis van mostrar que l'expressió del gen *Antennapedia* (*Antp*) en el segment del cap provocava la transformació parcial del disc imaginal d'antena en un de pota, de manera que l'adult presentava en el cap potes enlloc d'antenes (Turner and Mahowald, 1979).

Cribratges genètics per transformacions homeòtiques van portar al descobriment de dos tipus de gens reguladors dels gens Hox amb accions antagòniques: els gens del grup **Polycomb (PcG)**, responsables de mantenir els gens silenciats, i els gens del grup **trithorax (trxG)**, responsables de contrarestar l'acció dels PcG mantenint estats transcripcionalment actius (Kennison, 1995). En termes generals, mutacions en els gens PcG presenten fenotips similars a mutacions de guany de funció dels gens homeòtics, mentre que mutacions en els gens *trxG* se semblen a mutacions de pèrdua de funció dels homeòtics. A més, les proteïnes *trxG* són capaces de suprimir transformacions homeòtiques causades per mutacions en proteïnes PcG (Kennison and Tamkun, 1988; Shearn, 1989). És important destacar que la classificació que defineix els *trxG* com només activadors i els PcG com només repressors és una simplificació (Brock and van Lohuizen, 2001; Gildea et al., 2000) ja que hi ha membres d'aquests grups que tenen un comportament difícil de classificar. A més, a part de regular els gens homeòtics, els PcG i els *trxG* són gens clau per a la regulació de moltes altres dianes, indicant que el manteniment epigenètic dels estats activats o reprimits és un mecanisme fonamental en desenvolupament.

1.2 - PcG, *trxG* i memòria cel·lular

Si els PcG i els *trxG* són els encarregats de mantenir els gens reprimits o activats, respectivament, cal conèixer quins són els membres d'aquestes famílies i quines són les seves funcions.

Els PcG i *trxG* codifiquen per factors nuclears que formen part de diferents complexos multiproteics reguladors de la cromatina necessaris pel manteniment de la memòria cel·lular (Francis and Kingston, 2001; Otte and Kwaks, 2003; Satijn and Otte, 1999). Són gens altament conservats des de *Drosophila* a mamífers, i molts dels seus membres presenten cromodominis, bromodominis, dits de zinc (PHD o RING) i repeticions WD40 entre d'altres, per dur a terme interaccions moleculars (veure Taula 1 i Taula 2). L'acció d'aquests complexos a l'hora de mantenir estats de la cromatina silenciats o activats implica dipositar i interpretar els senyals epigenètics que confereixen la memòria cel·lular. De fet, la memòria

transcripcional sorgeix d'una combinació de mecanismes epigenètics com la metilació de l'ADN, la modificació de les histones, el remodelament dels nucleosomes i la conformació de la cromatina (Vermaak et al., 2003). Tot i que es considera que hi ha un “*cross-talk*” entre aquests senyals la modificació de les histones ha despertat molt interès en els últims anys com a mecanisme de regulació.

1.2.1 - Mecanismes epigenètics: el codi d'histones

L'expressió dels gens depèn en part de l'accessibilitat de les proteïnes d'unió a l'ADN. Quan la cromatina està condensada és inaccessible a la maquinària transcripcional i els gens estan silenciats. Per tal que es doni la transcripció, la cromatina ha de perdre l'estructura compacta i s'ha d'obrir. Els mecanismes que comporten aquest canvi de conformació no són del tot coneguts però sembla que la modificació de les histones hi juga un paper molt important. Entre les modificacions descrites s'inclouen acetilacions, metilacions, fosforilacions, ADP-ribosilacions, ubiquitinitzacions i sumoïlacions. El dipòsit d'aquestes modificacions determina un codi epigenètic, anomenat **codi d'histones**, que dictarà la regulació transcripcional (Strahl and Allis, 2000). Per tant, sembla que hi ha d'haver unes proteïnes que “escriguin” el codi i unes altres que el “llegeixin”, traduint-lo en un estat activat (conformació oberta) o reprimat (conformació tancada) de la cromatina. A tall d'exemple, l'acetilació és un senyal activador perquè provoca l'obertura de la cromatina fent-la accessible a altres proteïnes. Per contra, la desacetilació de les histones provoca un tancament de la cromatina i per tant un estat de repressió gènica. La metilació de les histones és un cas més complex, ja que depèn de quina és la lisina que es metila i si aquesta està mono-, di-, o trimetilada. Una de les marques principals necessària per promoure la transcripció és la trimetilació de la lisina 4 (K4) de la histona 3 (H3) (H3K4) (Santos-Rosa et al., 2002). El mecanisme que implica la regulació per la modificació d'histones es tan precís que les proteïnes que llegeixen el codi són capaces de diferenciar entre diferents estats metilats i entre metilacions en diferents lisines, indicant que el manteniment epigenètic dels estats de la cromatina és molt específic. El fet que els PcG i els trxG interaccionin amb proteïnes o incloguin membres amb activitat enzimàtica capaç de modificar les histones els hi confereix un paper preferent com a reguladors epigenètics.

1.2.2 - Els complexos PcG a *Drosophila*

Prediccions basades en cribratges genètics estimaven que el grup PcG podia incloure uns 40 membres (Jurgens, 1985) però a dia d'avui ni la meitat d'aquests membres s'han pogut caracteritzar molecularment. A la Taula 1 es mostra un llistat dels PcG i algunes de les seves característiques i homòlegs. A nivell bioquímic, els PcG s'han separat en dos complexos principals: Polycomb Repressive Complex 1 (**PRC1**) i Extra Sex Combs/Enhancer of Zeste [ESC/E(Z)]

o Polycomb Repressive Complex 2 (**PRC2**). La composició proteica dels complexos PcG pot variar segons el teixit o gen diana que regulin. A més, poden interaccionar amb proteïnes que no tenen res a veure amb la regulació de l'expressió gènica i per tant, els complexos PcG, a part de tenir una composició dinàmica, també poden participar en diferents tipus de funcions cel·lulars (Otte and Kwaks, 2003).

ESC i E(Z) formen el nucli de diferents variants del complexe PRC2 (Czermin et al., 2002; Furuyama et al., 2003; Muller et al., 2002; Ng et al., 2000; Tie et al., 2001; Tie et al., 2003). Altres proteïnes com Suppressor of Zeste 12 (SU(Z)12), la histona desacetilasa Rpd3, la proteïna d'unió a les histones p55 o la proteïna Polycomb-like (PcL) també s'hi han trobat associades (Czermin et al., 2002; Furuyama et al., 2003; Tie et al., 2001; Tie et al., 2003). El complexe PRC2 actua durant els primers estadis de l'embriogènesi (Ingham, 1983; Struhl and Akam, 1985) establint un estat de repressió dels gens que servirà per reclutar després de l'estadi de blastoderm el complexe PRC1 o sistema de memòria a llarg termini (revisat a Orlando, 2003).

El complexe PRC1 va ser aïllat per primera vegada a partir d'embrions de *Drosophila*, amb una mida aproximada de 2MDa (Shao et al., 1999). Conté les proteïnes Polycomb (Pc), Polyhomeotic (Ph), Posterior Sex Combs (PSC), Sex Comb on Midleg (SCM) i dRing, més altres proteïnes addicionals com Zeste i diferents factors associats a TBP (TAFs) (Saurin et al., 2001). Mitjançant estudis de coimmunoprecipitació i colocalització en cromosomes politènics s'ha detectat interacció entre les proteïnes Pc, Ph i PSC, confirmant que són membres del mateix complexe. El complexe PRC1, a part de ser un sistema de memòria a llarg termini, un cop ESC s'ha dissociat del complexe PRC2, també s'encarrega d'inhibir el remodelament dels nucleosomes per preservar conformacions de la cromatina incompatibles amb l'expressió dels gens (Francis and Kingston, 2001; Shao et al., 1999).

Sembla que el complexe PRC1 no està format per cap component que pugui tenir la capacitat enzimàtica de modificar les histones, tot i que alguna variant del complexe s'ha relacionat amb la ubiquitinització de la histona 2 (H2) (Wang et al., 2004a). Per contra, el complexe PRC2 conté la histona desacetilasa Rpd3, la qual podria desacetilar les histones dels gens diana per afavorir l'establiment del complexe PcG. A més, la proteïna E(Z) conté un domini de 150 aminoàcids (aa) anomenat **SET** (per Su(Var)3-9, E(Z) i Trx), que li atribueix la capacitat d'actuar com una histona metiltransferasa (HMT). De fet, s'ha demostrat que el complexe PRC2 metila les lisines 9 i 27 de la histona 3 (H3K9 i H3K27, respectivament) (Czermin et al., 2002). La transició del complexe PRC2 al complexe PRC1 a *Drosophila* es podria explicar per la unió de les proteïnes Pleiohomeotic (Pho) i Pleiohomeotic-like (PhoL) a unes seqüències anomenades Elements de Resposta als PcG (PcG Response Element o PRE) del gen diana, reclutant primer al complexe PRC2, el qual metil·laria les H3K9 i H3K27.

Taula 1. Proteïnes PcG, el seu símbol, dominis conservats i homòlegs en humans.

PcG <i>Drosophila</i>			PcG humans
Proteïnes PcG	Símbol	Característiques	Símbol
Complexe PRC1			
Polycomb	Pc	Cromodomini; uneix H3K27 i H3K9 trimetilades	HPC1, HPC2
Polyhomeotic	Ph	Dits de Zinc, domini SPM/SAM; s'uneix a SCM	HPH1, HPH2
Posterior Sex Combs	PSC	Dits de Zinc, domini HTH; interacciona amb Pc and Ph	BMI1, MEL18
dRing/Sex Combs Extra	SCE	Dits de Zinc RING	RING1
Sex Comb on Midleg	SCM	Domini SPM/SAM que permet la interacció amb Ph	SCMH1, SCML2
Complexe PRC2			
Extra Sex Combs	ESC	Repeticions WD40	EED
Enhancer of Zeste	E(Z)	HMT(H3K9 i H3K27); domini SET	EZH1, EZH2
Suppressor of Zeste 12	Su(Z)12	Dit de Zinc, caixa VEFS	SU(Z)12
Altres proteïnes PcG			
Polycomb-Like	PcL	PHD i domini RING	PcL1
Suppressor of Zeste 2	Su(Z)2	Domini RING	
Pleiohomeotic	Pho	Dit de Zinc que s'uneix a ADN (GCCATHWY); interacciona amb Pc	YY1
Pleiohomeotic-Like	PhoL	Dit de Zinc que s'uneix a ADN (GCCATHWY)	YY1
Additional Sex Combs	ASX	PHD; domini ric en Q	ASXL1, ASXL2, ASXL3
Enhancer of Polycomb	E(Pc)	Domini ric en Q i domini ric en A	EPC1, EPC2
Corto	Corto	Cromodomini; interacciona amb E(Z), ESC, GAF	
Pipsqueak	Psq	Domini BTB-POZ; domini Psq; uneix (GA) _n	
Proteïnes associades a PcG			
Heat-shock protein cognate 4	HSCF70-4	Xaperona	
Rpd3	RPD3	Histona desacetilasa	HDAC-1
Cramped	CRM	Domini ric en A; interacciona genèticament amb PCNA	
Dorsal Switch Protein	DSP1	Domini HMG box	
dMi-2 autoantigen	Mi-2	Dits PHD; cromodominis; dominis ATPasa; motiu HMG-like; motiu myb-like	

Concretament, la metilació de la H3K27 interaccionaria amb el cromodomini de la proteïna Pc, fent que PRC1 s'estabilitzi a la cromatina (Cao et al., 2002; Wang et al., 2004b) per inhibir la remodelació dels nucleosomes (Fig.11). Per tant, el complexe PRC2 es considera l'encarregat d'inhibir l'expressió dels gens directament, mentre que el complexe PRC1 es requereix per mantenir la repressió. S'ha descrit que durant estadis molt primerencs del desenvolupament membres dels dos complexos PcG poden coexistir formant un gran complexe PcG transitori que inclou Pc, Ph, ESC, E(Z), Pho, Rpd3 i inclús un gen classificat com a membre del *trxG*, GAGA Factor (GAF, proteïna codificada pel gen *trithorax-like* (*Trl*)) (Poux et al., 2001b). Aquest model és un exemple clar de com es pot regular l'estructura de la cromatina, i per tant, el manteniment epigenètic de la memòria cel·lular mitjançant seqüències específiques en l'ADN i modificacions de les histones pels complexos PcG.

En un estudi més recent on s'estudien components dels complexos PRC1 i PRC2 s'ha demostrat que Pc s'associa a regions genòmiques molt llargues, d'aproximadament 150kb, acompanyat per ESC. Aquestes regions d'unió estan silenciades i presenten la H3K27 trimetilada (Tolhuis et al., 2006). A més, confirmen que les proteïnes PcG s'uneixen a gens implicats en desenvolupament i identifiquen noves funcions putatives per aquestes proteïnes, com la biosíntesi d'hormones esteroides.

1.2.3 - Com els PcG reconeixen els seus gens diana?

El fet que moltes proteïnes PcG s'expressin de manera ubíqua i els seus gens diana presentin patrons d'expressió específics indica que el reclutament d'aquestes proteïnes ha de ser un procés altament regulat. Per una banda, el reclutament de les proteïnes PcG requereix seqüències en l'ADN conegudes com **Polycomb Response Elements (PREs)**. Els PREs són regions reguladores en

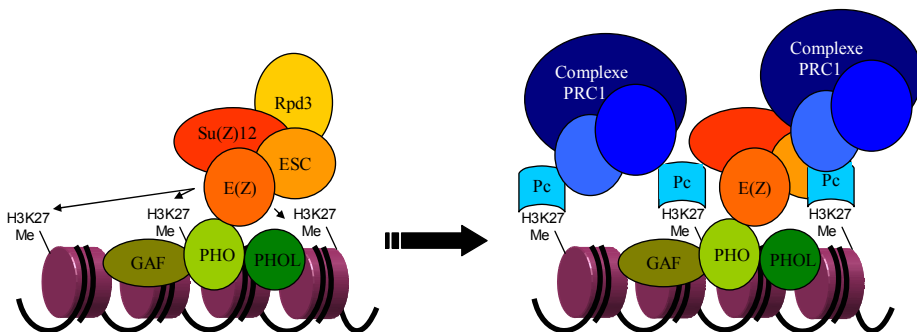


Fig. 11 - Model de funcionament dels PcG. En estadis molt primerencs del desenvolupament el complexe PRC2 (colors taronjes) es recluta per Pho als seus gens diana i metila les lisines 9 i 27 de la histona 3. Aquesta última metilació (H3K27Me) es reconeguda per la proteïna Pc, que alhora recluta els altres membres del complexe PRC1 (blau). En verd apareixen les proteïnes d'unió a l'ADN.

cis i poden estar situats a prop o lluny de la regió promotora d'un gen (revisat a Ringrose and Paro, 2004). Mentre que a mamífers encara no s'ha pogut identificar cap element PRE, a *Drosophila* s'han trobat seqüències PRE tant en gens homeòtics com no homeòtics. Moltes proteïnes PcG no tenen motius d'unió a l'ADN, per tant, és més fàcil pensar en l'existència de factors que s'uneixen als PREs i recluten les proteïnes PcG. GAF, Zeste i Pho poden unir-se als PREs, cadascun d'ells a través de la seva seqüència *consensus*. PhoL també és capaç d'unir-se a l'ADN, i ho fa a través de la mateixa seqüència d'unió que Pho (revisat a Dejardin and Cavalli, 2005). Estudis en cromosomes politènics indiquen l'existència de més de 100 loci on els PcG es poden unir (Franke et al., 1992; Rastelli et al., 1993) però la baixa resolució d'aquesta tècnica no exclou que cada punt d'unió presenti més d'una seqüència PRE. Per exemple, hi ha com a mínim 6 PREs en el complex homeòtic Bithorax (BX-C) que queden representats per només un senyal d'unió pels PcG en els cromosomes politènics. Mitjançant anàlisis computacionals s'ha identificat 167 putatives seqüències PREs en tot el genoma de *Drosophila* (Ringrose et al., 2003) però és probable que hi hagi altres motius en l'ADN encara per identificar, que reclutin proteïnes d'unió a PcG.

A part de les seqüències PRE, la repressió donada pels PcG requereix que el gen hagi estat prèviament silenciats, ja que si els promotors dels gens estan activats, la presència dels PREs no és suficient per silenciar-los (Poux et al., 2001a). Un dels models per explicar com les proteïnes PcG poden reconèixer estats transcripcionalment silenciats es basa en que les característiques moleculars de la cromatina o les modificacions de les histones presents en els gens reprimits facilitarien l'assemblatge dels complexos PcG (Dejardin and Cavalli, 2005; Francis and Kingston, 2001).

1.2.4 - Mecanismes de repressió dels PcG

Hi ha diverses hipòtesis per explicar com els PcG estableixen el silenciament de la cromatina. En general no són excloents i podria ser que actuessin de forma cooperativa. Degut a què els elements PREs es poden situar molt lluny del promotor del gen que regulen, una de les preguntes més recurrents és conèixer com els elements PREs poden actuar des de tanta distància. Una de les maneres per les quals els PcG crearien una estructura de la cromatina inaccessible seria unint-se a les seqüències PREs i estenent-se fins al promotor embolicant la cromatina (Fig.12A). A dia d'avui no hi ha cap evidència que doni suport a aquest model; és més, estudis de coimmunoprecipitació de la cromatina indiquen que els PcG no es troben distribuïts de manera uniforme sinó que tenen preferència pel promotor i els elements PRE (Orlando et al., 1998). El segon model proposat implica la formació d'un *loop* o baga que faria interaccionar l'element PRE amb el promotor (Bulger and Groudine, 1999) de manera similar al model clàssic d'interacció *enhancer*-promotor (Fig.12B). Aquest model es basaria en un

complexe que contindria PcG i factors generals de transcripció i que s'uniria a PREs i al promotor a la vegada.

A part de crear una estructura inaccessible de la cromatina, ja sigui per extensió de les proteïnes PcG cap al promotor o per mecanismes de *looping*, hi ha altres models proposats pel quals els PcG podrien dur a terme el silenciament dels gens diana. Per exemple, ja que els PREs podrien contactar amb la regió promotora, els PcG podrien inhibir directament, per bloqueig, l'assemblatge de la maquinària de transcripció (Fig.12C) o bé podria ser que la repressió regulés el reclutament dels gens diana a un compartiment nuclear on els PcG es trobarien a elevades concentracions (Fig.12D).

1.2.5 - Els complexos *trxG* a *Drosophila*

Els *trxG* van ser descrits com el grup de proteïnes que s'encarrega de contrarestar l'acció dels PcG. Si la repressió és l'estat dels gens per defecte, els *trxG* funcionen antagonitzant les proteïnes PcG. Els *trxG* també s'organitzen formant complexos multiproteics, tot i que hi ha proteïnes classificades dintre dels *trxG* que no pertanyen a cap complexe descrit fins ara. A la Taula 2 s'indiquen els membres de la família *trxG* i algunes de les seves característiques i homòlegs.

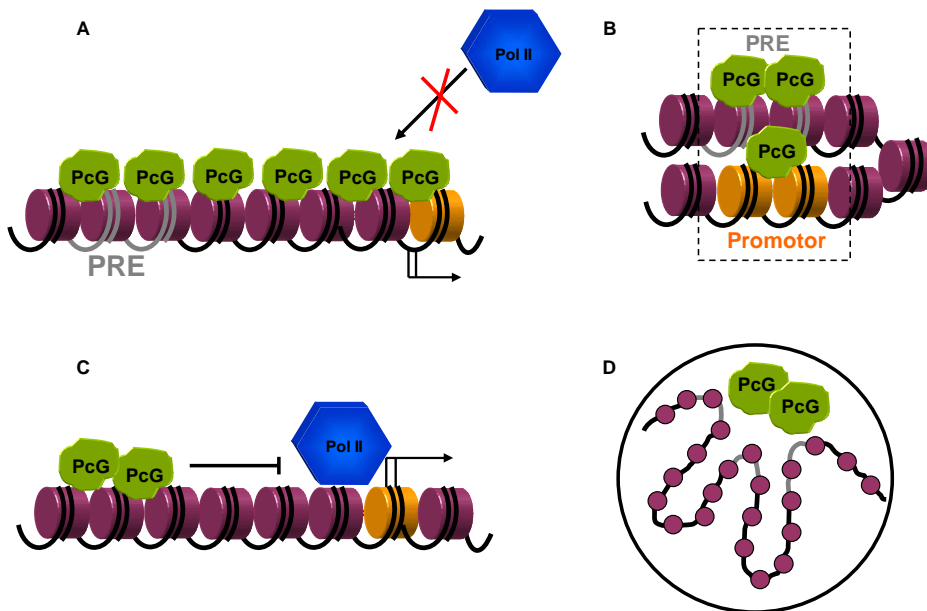


Fig. 12 - Mecanismes de repressió dels PcG. (A) Els PcG s'uneixen als PREs i s'estenen cap al promotor creant una estructura inaccessible de la cromatina. (B) Unió dels complexos PcG als PREs i promotor a la mateixa vegada degut a la formació d'un *loop* o baga a la cromatina. (C) Els PcG inhibeixen directament la maquinària de transcripció. (D) Les proteïnes PcG recluten els PREs a una regió del nucli, creant clusters mitjançant *loops* a la cromatina. Els nucleosomes representats a les figures A, B i C en color taronja corresponen als promotors i l'ADN representat en gris correspon als PREs. Adaptació de Francis and Kingston, 2001.

Molts dels membres trxG contenen dominis proteics amb activitat enzimàtica coneguda, suggerint que aquest és un mecanisme per mantenir estats d'activació dels gens. Malgrat que tots els gens trxG suprimeixen els fenotips generats per mutacions en els PcG, només al·lels de *trithorax (trx)*, *absent*, *small or homeotic disc 1 i 2 (ash1 i ash2)* provoquen transformacions homeòtiques per si mateixos (Ingham, 1983; Shearn, 1989; Shearn et al., 1987). Per aquesta raó, s'ha proposat que aquests tres gens tindrien un paper directament relacionat amb l'antagonització específica dels PcG, mentre que les altres proteïnes trxG actuarien com a activadors generals de la transcripció o coactivadors (Dejardin and Cavalli, 2005).

A partir d'embrions de *Drosophila* es va purificar un complexe d'1MDa (**complexe TAC1**) que contenia la proteïna Trx, la histona acetiltransferasa (HAT) que uneix la proteïna CREB (CBP) i l'anti-fosfatasa Sbf1 (Petruk et al., 2001). Trx col·localitza amb CBP i Sbf1 en molts llocs dels cromosomes politènics, incloent seqüències anomenades Elements de resposta a trxG (trxG Response Elements o TRE) en els gens Hox. A més, mutacions en la proteïna CBP disminueixen la transcripció de gens Hox, així com la transcripció de gens reporters sota el control d'elements TRE (Petruk et al., 2001). Això suggereix que la proteïna CBP pot actuar des dels TREs acetilant les histones dels nucleosomes i per tant facilitant l'accés als factors necessaris per la transcripció. A més, la proteïna Trx de *Drosophila* té un domini SET amb activitat HMT preferent sobre la H3K4 (Smith et al., 2004).

El **complexe Brahma (Brm)** és un complexe de 2MDa molt conservat des de llevats a humans, ja que presenta moltes similituds amb els complexos homòlegs remodeladors de la cromatina ATP-dependent de la família SWI/SNF de llevat i BAF-SWI/SNF d'humans. El complexe Brm estaria format per un nucli amb les proteïnes Brm, Osa, Moira (Mor) i Snr1, més altres Proteïnes Associades a Brm (BAP) (Collins et al., 1999; Crosby et al., 1999; Dingwall et al., 1995; Mohrmann et al., 2004; Papoulas et al., 1998). Estudis de marcatge en cromosomes politènics indiquen que el complexe Brm es troba pràcticament a tota la cromatina activada i que els llocs d'unió de Brm no són solapants amb els de Pc (Armstrong et al., 2002). El complexe actuaria activant la transcripció per remodelació de la posició i conformació dels nucleosomes que alhora facilitaria la unió de factors activadors de la transcripció, tot i que podria ser una funció no exclusiva, ja que aquest complexe també podria participar reprimint alguns gens. S'ha proposat que Brm es reclutat a les regions reguladores de la transcripció mitjançant la proteïna Zeste d'unió a l'ADN (Kal et al., 2000).

L'any 1998 es va demostrar que ASH1 i ASH2 no formaven part del complexe Brm, sinó que aquestes proteïnes, a l'embrió de *Drosophila*, formen part de tres complexos diferents (Papoulas et al., 1998). Evidències bioquímiques d'aquest mateix estudi indiquen que el complexe que conté ASH1 tindria una mida de 2MDa mentre que el complexe ASH2 seria de 500kDa. Malauradament, les

Taula 2. Proteïnes del TrxG, el seu símbol, dominis conservats i homòlegs en humans

trxG <i>Drosophila</i>			trxG humans
Proteïnes trxG	Símbol	Característiques	Símbol
Complexe TAC1			
Trithorax	Trx	HMT (H3K4); Domini SET i PHD	MLL/ALL-1
Complexe Brm			
Brahma	Brm	Subunitat ATPasa, bromodomini, dominis helicasa. Homòleg de SWI2/SNF2 de llevat	BRG1, hBRM
Osa	Osa	Domini ARID d'unió a l'ADN	ELD/OSA1
Moira	Mor	Homòleg a SWI3 de llevat.	BAF170/BAF155
Complexe ASH1			
Absent, Small or Homeotic disc 1	ASH1	Domini SET. HMT (H3K9, K4; H4K20)	ASH1L
Complexe ASH2			
Absent, Small or Homeotic disc 2	ASH2	PHD i domini SPRY	ASH2L
Complexe GAF-FACT			
GAGA Factor	GAF	Dit de Zinc; domini BTB-POZ; interacciona amb Trx; s'uneix a ADN: (GA) _n	
Altres proteïnes trxG			
Kismet	Kis	Cromodomini; domini relacionat a SNF-2; Helicasa d'ADN, DEDXc, BRK; domini Myb-like	
Tonalli	Tna	SP-RING, dit de Zinc	
Zeste	Z	Dominis HTH i cremallera de leucines; forma oligòmers	
Little imaginal disc 1	Lid	Domini ARID i domini PHD	
Trithorax-related	Trr	Domini SET	
Proteïnes associades a trxG			
CREB-Binding protein	CBP	Histona acetiltransferasa; interacciona amb ASH1 i Trx	
SBF1	SBF1	Fosfatasa	
Snf5 related 1	SNR1	Interacciona amb Trx i Brm	
Modifier of mdg4	mdg4	Domini BTB-POZ.	
SPT16		Desenrotllador d'ADN	

proteïnes que formarien part d'aquests complexes no han estat encara identificades, tot i que es coneix alguna de les seves interaccions proteiques. Respecte la proteïna **ASH1**, estudis de coimmunoprecipitació i colocalització en cromosomes politènics demostren que interacciona amb Trx (a través dels seus dominis SET) (Rozovskaia et al., 1999) i amb la HAT del complexe TAC1, dCBP (Bantignies et al., 2000). Degut a què l'acetilació de les histones correlaciona amb l'activació de la transcripció, és probable que el reclutament de la proteïna CBP per part de Trx (Petruk et al., 2001) i ASH1 els hi confereixi part de la seva funció activadora. ASH1 conté un domini SET amb activitat HMT preferent per la H3K4,

H3K9 i la H4K20 (Beisel et al., 2002; Byrd and Shearn, 2003). La metilació de les H3K4 i H3K9 és capaç de reclutar els membres Brm i Mor del complexe Brm i d'inhibir la unió de proteïnes PcG (Beisel et al., 2002).

ASH2 és el tema principal d'aquesta Tesi per tant s'ha dedicat tot l'apartat següent a descriure els coneixements obtinguts sobre aquest gen.

1.2.6 - Com els trxB reconeixen els seus gens diana?

Igual que els PcG, els trxB requereixen seqüències específiques d'unió a l'ADN anomenades **Trithorax Response Elements (TREs)**. Els TREs estan molt menys caracteritzats que els PREs però sembla que aquestes seqüències se solapen en l'ADN i que la unió de complexos PcG i trxB no és mútuament excloent (Brock and van Lohuizen, 2001; Tillib et al., 1999). Els PcG colocalitzen amb alguns trxB en les mateixes regions cromosòmiques, ja que aproximadament la meitat dels llocs d'unió de Trx i ASH1 en cromosomes politènics són compartits per Pc (Chinwalla et al., 1995; Tripoulas et al., 1996). El fet que una mateixa regió pugui ser reconeguda per PcG i trxB fa que moltes vegades els PREs i TREs s'anomenin PREs indistintament.

La proximitat entre PREs i TREs es veu reflexada per la habilitat dual de mantenir estats activats i silenciatos de la cromatina. Per exemple, l'element *Fab-7* del BX-C és capaç de canviar d'un estat silenciat heretable a un estat activat mitjançant un estímul embrionari transitori de transactivació (Cavalli and Paro, 1999). L'estat activat depèn de la proteïna Trx, que podria ser reclutada pels factors GAF i Zeste. Experiments *in vitro* demostren que GAGA i Trx coimmunoprecipiten i que els motius d'unió a GAGA als elements PREs de *bx* són capaços de reclutar Trx (Poux et al., 2002). GAGA es considera una proteïna que obre la cromatina i podria reclutar tant PcG com trxB als elements PRE/TRE. Per contra, sembla que la unió de Zeste estaria involucrada en una resposta per part dels trxB més que pels PcG (Dejardin and Cavalli, 2005). De fet, Zeste pot interaccionar amb el complexe Brm a través de les subunitats Mor i Osa (Dejardin and Cavalli, 2004).

La informació de que un promotor està activat podria venir donada per ARN no codificant transcrit a partir dels propis PREs. Aquesta transcripció correlaciona amb la transcripció del gen regulat pels PREs i l'establiment epigenètic d'un estat activat de la cromatina (Rank et al., 2002; Schmitt et al., 2005). Recentment s'ha publicat un estudi sobre el gen *ash1* on es mostra que la transcripció dels TREs del gen homeòtic *Ubx*, coincideix amb la transcripció del gen *Ubx* i el reclutament d'ASH1 (Sanchez-Elsner et al., 2006), reforçant aquesta última hipòtesi.

1.2.7 - Mecanismes d'activació dels trxB

Hi ha tres activitats identificades en els complexos trxB implicades en mantenir la cromatina oberta: la modificació de les histones, el remodelament de la cromatina

pel complexe Brm ATP-dependent i el remodelament de l'estructura de la cromatina ATP-independent.

Pel que fa a la modificació de les histones, cal destacar en particular l'acetilació i la metilació de la H3K4, que es poden considerar un senyal epigenètic activador. La metilació de la H3K4 és una activitat que es troba tant en el complexe que conté Trx (Czermin et al., 2002) com en ASH1 (Beisel et al., 2002; Byrd and Shearn, 2003), ja que són les dues úniques proteïnes trxG que presenten el domini SET (Fig.13). Tot i així, sembla que cada proteïna fa una funció específica, ja que la manca d'una o de l'altra provoca un silenciament de l'expressió d'*Ubx* deguda a l'acció dels PcG. A més, en dobles mutants PcG/trxG es dona una expressió anòmala d'*Ubx*, suggerint que ASH1 i Trx són necessaris per mantenir l'estat activat però no ho són per provocar l'activació de la

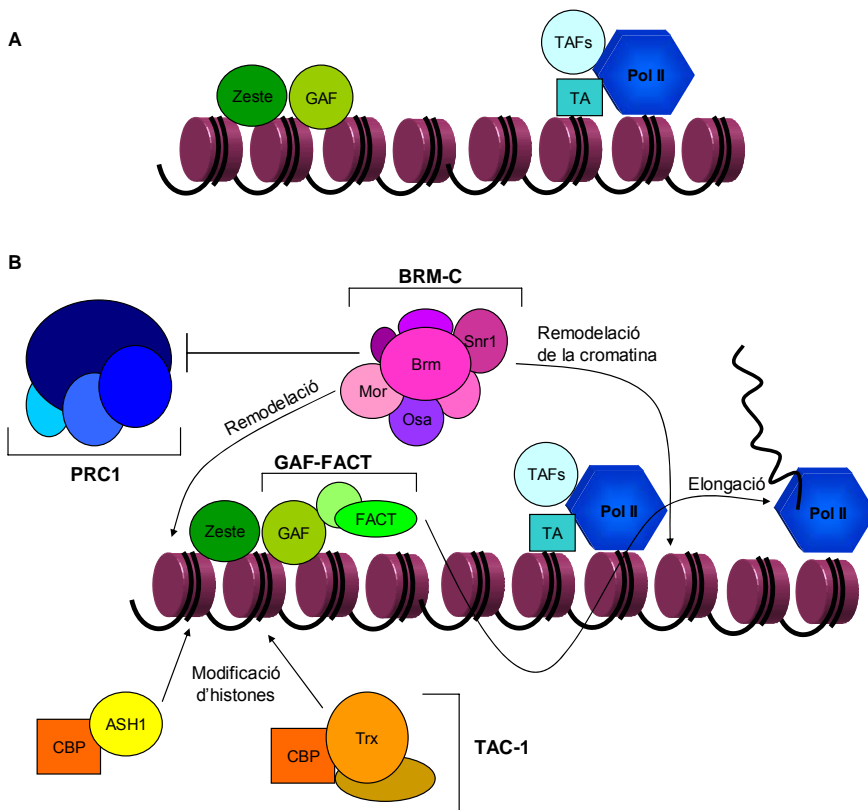


Fig. 13 - Model de funcionament dels trxB. (A) Un gen activat per un factor de transcripció (TAF, TA) provoca el reclutament dels factors d'unió a l'ADN GAF i Zeste. (B) L'estat activat es manté a través de l'acció dels diferents complexos trxB, els quals actuen a diferents nivells per mantenir l'activació. El complexe TAC1 i ASH1 poden modificar les histones per metilació i/o acetilació (mitjançant la CBP), l'associació GAF-FACT afavoreix l'expressió del gen per estimulació de l'elongació transcripcional i el complexe BRM, que podria ser reclutat per Zeste o per les histones acetilades, actua afavorint la transcripció per remodelació de la cromatina i prevenint l'associació del complexe PRC1. Model adaptat de Dejardin and Cavalli, 2005.

transcripció (Klymenko and Muller, 2004). Per tant, ASH1 i Trx es requereixen durant tot el desenvolupament per contrarestar l'efecte basal del silenciament provocat pels PcG.

Malgrat que encara no es coneix amb exactitud com la metilació de la H3K4 pot resultar en estats oberts de la cromatina, una de les hipòtesis contempla que aquesta metilació sigui una marca reconeguda per algun domini conservat de les proteïnes, de manera similar a com el cromodomini de la proteïna Pc reconeix la metilació de la H3K27. Només un membre del grup *trxG*, *kismet*, conté un cromodomini però no s'ha pogut purificar encara cap complexe que contingui Kismet, per tant, o hi ha d'haver altres dominis proteics que reconeixin les lisines metilades o bé resten membres de la família *trxG* per descobrir (revisat a Dejardin and Cavalli, 2005).

Tant el complexe TAC1 com el complexe ASH1 inclouen la proteïna CBP, i per tant tots dos complexos poden ser responsables de l'acetilació de les histones. A més, aquesta acetilació pot ser una diana pel complexe Brm remodelador de la cromatina, ja que sembla que el bromodomini present a la proteïna Brm pot reconèixer nucleosomes amb histones acetilades (Hassan et al., 2002). La funció molecular d'aquest complexe Brm és mobilitzar els nucleosomes (Fig.13), i per tant, podria estar desplaçant els complexos PcG als PREs i permetent l'accés de la maquinària transcripcional als promotors. És interessant recordar que, a l'inrevés de Trx, les proteïnes Brm i Pc són mútuament excloents en cromosomes politènics (Armstrong et al., 2002).

Una altra manera d'obrir la cromatina mitjançant una remodelació ATP-independent, és a través de GAF i FACT, dues proteïnes que formen part del mateix complexe. Degut a que FACT facilita l'elongació per l'ARN polimerasa II en mamífers (Orphanides et al., 1998), es creu que GAF pot funcionar regulant l'elongació transcripcional. A més, estudis *in vitro* demostren que FACT facilita el remodelament de la cromatina per GAF (Fig.13).

Bloc2

El gen *ash2*

Els gens *ash2* i *ash1* van ser identificats en un cribratge del cromosoma tres per mutants a larva/pupa primerenca amb anomalies als discs imaginals (Shearn et al., 1971). D'aquí l'abreviació *ash*: absent, small or homeotic disc. Els primers estudis que es van realitzar amb aquests gens van ser portats a terme per Allen Shearn i col·laboradors (Adamson and Shearn, 1996; LaJeunesse and Shearn, 1995; Shearn, 1989; Shearn et al., 1987) i es basaven en interaccions gèniques per estudiar els efectes de les mutacions en el gen *ash1* i *ash2* i saber si aquests gens estaven funcionalment relacionats.

2.1- Estudis genètics d'*ash2* i d'*ash1*

Hi ha diferents criteris per identificar si un gen pertany al grup dels *trxG*. Bàsicament, mutacions en gens *trxG*: (1) presenten transformacions homeòtiques similars entre ells i similars a les mutacions de pèrdua de funció dels gens homeòtics, (2) incrementen el fenotip de mutacions en altres *trxG* i (3) supprimeixen el fenotip homeòtic causat per mutacions en els *PcG* (LaJeunesse and Shearn, 1995; Shearn, 1989; Shearn et al., 1987).

ash1 i *ash2* es van identificar perquè mutacions en aquests loci provocaven una gran varietat de transformacions homeòtiques entre les quals es van descriure el canvi d'antena a pota, de la primera i tercera pota a la segona pota, d'halterí a ala i de genitals a pota i/o antena. Aquestes transformacions eren similars pel gen *ash1*, *ash2* i *trx* però diferents a les causades per mutacions en el grup *PcG* (Shearn 1987). A més, el fenotip homeòtic de combinacions de dobles mutants per *ash1* i *ash2* presentava un major grau d'expressivitat i penetrància, suggerint que aquests dos gens interaccionen en el mateix procés. També es va observar que alguns mutants simples i dobles mutants per *ash1* i *ash2* es caracteritzaven per l'absència i/o reducció dels discs imaginals. Aquests resultats van portar a pensar que *ash1* i *ash2* són essencials per la proliferació dels discs imaginals i que la reducció de l'expressió d'aquests gens, ja sigui per separat o alhora, comporta que els discs no creixin, que es redueixi el creixement o que es produeixin transformacions homeòtiques, dependent del grau de severitat dels mutants. Així doncs, degut a què les mutacions d'*ash1*, *ash2* i *trx* causaven el mateix tipus de transformacions homeòtiques (Ingham, 1981; Ingham, 1983; Shearn, 1989; Shearn et al., 1987) i que dobles mutants per *ash1* i *ash2* incrementaven els fenotips, es va proposar que aquests gens formaven l'anomenat "Grup de gens *trithorax*" i que estaven funcionalment relacionats.

Per testar aquesta hipòtesi es van fer tests genètics basats en la interacció de dobles i triples mutants per *ash1*, *ash2* i *trx*, i es va veure que es potenciaven els fenotips dels mutants senzills i/o se'n donaven de nous (Shearn, 1989). A més, els al·lels dels tres gens podien suprimir total o parcialment el fenotip de pintes tarsals extrems en el primer parell de potes dels mascles provocat per una mutació en el gen *Pc*. El fet que mutacions en cada un dels tres gens produís un resultat similar en els tests realitzats evidenciava que *ash1*, *ash2* i *trx* són membres d'un conjunt de gens involucrats en processos semblants (Shearn, 1989).

Posteriorment, es va estudiar com mutacions en *ash1* i *ash2* alteraven l'expressió dels gens homeòtics selectors. Els resultats d'aquestes anàlisis van indicar que *ash1* es requereix per la correcta expressió del gen *Antennapedia*, *sex combs reduced*, *engrailed* i *Ultrabithorax*, mentre que *ash2* es requereix per l'expressió de *sex comb reduced* en el primer disc de pota i *Ultrabithorax* en el tercer disc de pota i halteri però no per l'expressió d'*engrailed* i *Antennapedia* (LaJeunesse and Shearn, 1995). Per tant, *ash1* jugaria un paper més general en la regulació positiva dels gens homeòtics mentre que *ash2* seria més selectiu en les seves funcions. Aquests gens però, no només s'encarreguen de la regulació positiva dels gens homeòtics sinó que estan implicats en altres funcions. En el cas d'*ash2* (tal i com es veurà més endavant) els mutants també presenten anomalies en els patrons de formació de l'ala.

2.2 - Caracterització molecular del gen *ash2*

El gen *ash2* es localitza en el braç dret del cromosoma tres, concretament a la regió citològica 96A13. Conté vuit exons i s'estén al llarg de 3435 nucleòtids. Malgrat al principi només s'havia descrit un transcrit de 2.0kb (Adamson and Shearn, 1996) posteriors estudis per Northern Blot, van demostrar l'existència d'un nou transcrit de 1.4kb (Fig.14A), que contenia de l'exó 5 al 8 del transcrit prèviament descrit, més un nou exó de 62 parells de bases (bp) a 5' (Beltran et al., 2003). A més, en aquest mateix treball, estudis per Northern Blot a partir d'ARN de diferents estadis mostren l'expressió dels dos transcrits al llarg de tot el desenvolupament, excepte en embrions d'entre 0 i 12 hores, on només es detecta el transcrit llarg.

El transcrit de 2.0kb codifica per una proteïna de 572 aa amb un pes molecular predit de 65kDa (Adamson and Shearn, 1996). S'ha descrit la presència dels següents dominis conservats: un motiu bipartit de localització nuclear (**NLS-BP**), una seqüència **PEST** (són seqüències riques en prolines, àcids glutàmics, àcids aspàrtics, serines, i treonines característiques en proteïnes de vida curta), un domini **PHD** (domini ric en cisteïnes que conté dos dits de Zinc i es troba en moltes proteïnes reguladores de la transcripció, involucrat en interaccions proteïna-proteïna) i finalment un domini **SPRY** (de funció desconeguda tot i que

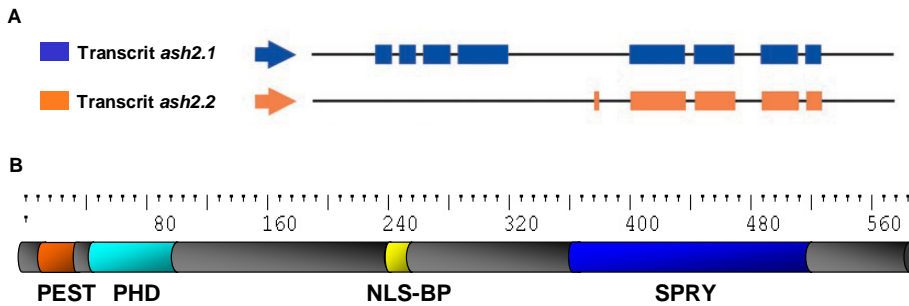


Fig. 14 - Esquema del transcrit i proteïna llarga d'*ash2*. (A) Els rectangles blaus corresponen als 8 exons del transcrit de 2.0kb (*ash2.1*) i en taronja es representen els exons que conté el transcrit de 1.4kb (*ash2.2*). (B) Dibuix esquemàtic de la proteïna d'ASH2 de 572 aa amb els seus dominis reconeguts.

podria dur a terme interaccions proteïna-proteïna) (Adamson and Shearn, 1996; Beltran et al., 2003; Ponting et al., 1997) (Fig.14B). Utilitzant un anticòs purificat contra la proteïna de fusió ASH2-GST es va descriure que ASH2 és una proteïna nuclear, ubiqua i que s'expressa a baixos nivells en els discs imaginals de larva i a nivells més alts després de la formació de la pupa (Adamson and Shearn, 1996).

Estudis per Western Blot a partir d'extractes proteics de diferents estadis del desenvolupament van detectar la presència de dues proteïnes, una de ~70kDa en estadis de larva, i una de ~53kDa, en estadis de pupa. Es va inferir que la proteïna de 70kDa corresponia a la forma llarga d'ASH2 amb modificacions post-traduccionals que augmentarien el seu pes molecular, mentre que la proteïna de 53kDa corresponia a modificacions post-traduccionals que provocarien el trencament de la proteïna en estadis pupals (Adamson and Shearn, 1996). Posteriorment, es va descriure en extractes d'embrions una proteïna d'ASH2 amb un pes molecular de ~94kDa (Papoulas et al., 1998). Actualment, el conjunt de les anàlisis per Western Blot apunten a què el transcrit de 2.0kb es tradueix en una proteïna de 65kDa, que per modificacions post-traduccionals resulta en la forma de 94kDa que es detecta en embrions (Cheng and Shearn, 2004).

A més, podria ser que el transcrit d'1.4kb codifiqués per una proteïna de ~48kDa (Cheng and Shearn, 2004) que no contindria ni el domini PEST ni el domini PHD presents a la isoforma llarga (Beltran et al., 2003).

2.3 - Els complexos ASH2

El coneixement dels complexos que contindrien la proteïna ASH2 a *Drosophila* és bastant escàs. Més estudis s'han realitzat però en llevats i en humans, on els homòlegs d'ASH2 s'han purificat i associat a diferents complexos.

A *Drosophila*, les primeres aproximacions bioquímiques van proposar que en embrions es podia trobar l'existència de tres complexos trxG independents: el complexe Brm de 2MDa, el complexe ASH1 de 2MDa i el complexe ASH2 de 500kDa (Papoulas et al., 1998). Tot i això, se sap molt poc sobre les proteïnes que formarien part del complexe ASH2. S'ha descrit que ASH2 interacciona amb Skittles (SKTL), una fosfatidilinositol 4-fosfat 5-quinasa que es requereix per la viabilitat cel·lular (Cheng and Shearn, 2004). En embrions, SKTL s'associa a la proteïna ASH2 de 48kDa, per tant és probable que SKTL es trobi en un altre complexe d'ASH2 i no en el descrit prèviament de 500kDa, el qual conté la proteïna de 94kDa. A més, en el mateix estudi es va observar que la hiperfosforilació de la histona H1 augmenta dramàticament en cromosomes politéncics de glàndules mutants per *ash2* i per *sktl*, fet que implica un augment en la condensació dels cromosomes i una reducció en la transcripció en aquests mutants.

A llevats, la proteïna Set1 és la més similar a la proteïna Trx de *Drosophila*. Concretament a *Saccharomyces cerevisiae* hi ha sis proteïnes que contenen el domini SET (Set1-6) però el domini SET de Set1 és el més similar al de la proteïna Trx (44% idèntic) (Nagy et al., 2002). Mitjançant estudis bioquímics es va caracteritzar el complexe Set1 (Set1C) i es va veure que estava format per 8 membres: Set1, Bre2, Swd1, Spp1, Swd2, Swd3, Sdc1, Shg1 (Roguev et al., 2001). Altres investigadors que van fer la mateixa aproximació, van purificar i identificar els mateixos membres, confirmant la composició del complexe Set1C o també anomenat **COMPASS** (Complex Protein Associated with Set1) (Miller et al., 2001; Nagy et al., 2002). Anàlisis de seqüència de Bre2 descriuen que conté un domini SPRY, molt similar al que es troba en ASH2 a *Drosophila*. De fet, la regió d'homologia entre aquestes dues proteïnes s'estén també fora d'aquest domini però Bre2 no conté el domini PHD present en ASH2. Per contra, la proteïna Spp1 sí que presenta un domini PHD, fet que va suggerir que el Set1C incorpora un homòleg d'ASH2 per associació de dues proteïnes (Bre2 i Spp1) que porten cadascuna una part de la seqüència d'ASH2. Una altra característica d'aquest complexe és que té la capacitat de metilar la H3K4 (Krogan et al., 2002; Nagy et al., 2002; Roguev et al., 2001). Per això es va evaluar si soques de llevats deficients per membres d'aquest complexe presentaven alteracions en la metilació de la H3K4 i es va observar una pèrdua completa de metilació tant per mutants de Set1 com per mutants de Swd1 i Swd3. Soques deficients per Bre2 i Spp1 presentaven una reducció del 90% i 50% respectivament (Nagy et al., 2002). De fet, el complexe Set1C es requereix per mono-, di- i trimetilar la H3K4, sent la trimetilació l'estat associat a gens d'elevada activitat transcripcional (Bernstein et al., 2002; Santos-Rosa et al., 2002). Les subunitats Bre2 i Spp1 es requereixen per la correcta trimetilació de la H3K4 i a més, tal i com s'ha vist amb estudis de purificació de complexos COMPASS mutants per Bre2, aquesta subunitat es requereix concretament per trimetilar la H3K4 però no per mono- ni dimetilar

(Schneider et al., 2005). Degut a què en eucariotes s'ha trobat altres homòlegs de Set1 es va proposar que en aquests organismes els Set1C també actuarien com a HMT i inclourien homòlegs d'ASH2 (Roguev et al., 2001).

El llevat de fissió *Schizosaccharomyces pombe* sembla estar més pròxim a eucariotes que *S.cerevisiae*. El complexe Set1 caracteritzat en aquest llevat també és capaç de metilar la H3K4 i a més, conté les mateixes proteïnes anteriorment descrites, tot i que en aquest cas ASH2 apareix en forma d'una sola proteïna, que presenta tant el domini SPRY com el domini PHD (Roguev et al., 2003).

2.3.1 - Complexes ASH2 a mamífers

Des de que l'*ash2* humana va ser clonada i caracteritzada junt amb el de ratolí (Ikegawa et al., 1999), s'han publicat estudis que han descrit ASH2 com a component de diferents complexos. En aquest apartat es resumeixen els membres d'aquests complexos i alguns d'ells es representen a la Figura 16 (Fig.16).

A) Complexe ASCOM

ASC-2 (Activating Signal Cointegrator 2) és un coactivador transcripcional que es troba amplificat en càncers humans i que estimula la transactivació per receptors nuclears i altres factors de transcripció. ASC-2 pertany a un complex de 2MDa (ASC-2 complex, ASCOM) que inclou la proteïna d'unió a retinoblastoma RBQ-3, les tubulines- α/β i les proteïnes del txG ALR-1 i ALR-2 (MLL-2), HALR (MLL-3) i ASH2. Aquest complex està implicat en la metilació de la H3K4 i la transactivació del receptor de l'àcid retinoic (Goo et al., 2003).

B) Complexe ASH2/HCF-1/Sin3

Host Cell Factor (HCF-1) és un regulador de la proliferació cel·lular. Tant en humans com en *Drosophila* aquest gen codifica per una proteïna bastant gran (Fig.15) que es proteolitza donant lloc a dues subunitats, l'amino (N'-t) i la carboxi-terminal (C'-t), que romanen unides de manera no covalent (Mahajan et al., 2003; Wilson et al., 1995). La part N'-t conté un domini bàsic on s'associa el complex Sin3/HDAC (Sin3, HDAC-1, HDAC-2, RbAp48, RbAp46 i Sds3) i un domini Kelch on s'associa el complex Set1/ASH2 humana (Set1, ASH2 i WDR5). Sin3/HDAC està relacionat amb la repressió de la transcripció, tot i que les proteïnes amb les que s'ha trobat interaccionant presenten un ampli rang de funcions (Silverstein and Ekwall, 2005), mentre que Set1/ASH2 correspon a l'homòleg en humans del complex Set1 a *S.cerevisiae*, i està relacionat amb l'activació de la transcripció i la metilació de la H3K4. Per tant, HCF-1 regularia la transcripció tant positivament com negativament, modulant l'estructura de la cromatina (Wysocka et al., 2003).

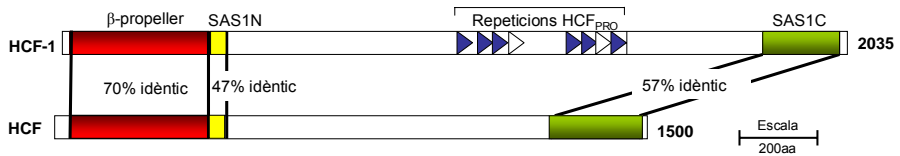


Fig. 15 - Organització conservada dels dominis funcionals entre HCF-1 i HCF de *Drosophila*. Es mostra el grau de similitud entre les seqüències del domini β -propeller i SAS1 i el nombre d'aminoàcids de cada proteïna. A HCF-1 existeixen unes repeticions (HCF_{PRO}, triangles blaus) per on es produeix el trencament proteolític que genera les dos subunitats C'-t i N'-t (els triangles blancs corresponen a repeticions no funcionals degenerades). A *Drosophila*, tot i que no hi ha homologia amb les seqüències HCF_{PRO}, la proteïna també es proteolitza i les subunitats es mantenen associades. A part dels dominis indicats a la figura, a la part N'-t de HCF-1 també hi ha un domini Kelch i un domini bàsic mentre que a la part C'-t hi ha un domini àcid. Adaptat de Mahajan et al., 2003.

C) Complexes MLL/Menin

MLL (Mixed Lineage Leukemia) és l'homòleg en humans de la proteïna Trx de *Drosophila* i es descriu com un proto-oncogen que es troba mutat en diferents leucèmies. Presenta activitat HMT (conté domini SET) i manté l'expressió dels gens Hox. La purificació bioquímica del complexe MLL demostra que s'associa amb les següents proteïnes: ASH2, HCF-1, HCF-2, Menin (producte del gen supressor de tumors *men1*), RBQ-3 i WDR5 (Yokoyama et al., 2004). Altres aproximacions a aquest complexe sorgeixen de la purificació del complexe que conté la proteïna Menin, i en aquest cas, a part de trobar associació amb ASH2, RBQ-3 i WDR5, també identifiquen la subunitat gran de l'ARN polimerasa II (Rpb2), un altre membre del *trxG* (MLL2 o ALR-1), i l'homòleg en mamífers de Sdc1 (hDPY-30) (Hughes et al., 2004). Aquests estudis destaquen perquè relacionen la proteïna supressora de tumors Menin amb l'activitat HMT de MLL.

D) Complexe CFP1/Set

La proteïna CFP1, necessària per la correcta metilació de l'ADN i per la diferenciació cel·lular, és homòloga a Spp1 i forma part d'un complexe d'~450kDa amb capacitat per mono-, di- i trimetil·lar la H3K4, on s'hi troben associats sis homòlegs de mamífers de les set proteïnes del complexe COMPASS, entre ells ASH2. La importància d'aquest complexe recau en que intervé en la metilació de l'ADN i de les histones, dos mecanismes implicats en la regulació epigenètica (Lee and Skalnik, 2005).

Finalment, el complexe Set1/ASH2 HMT humà s'ha vist associat amb el domini C'-t de la β -catenina i la tri-metilació de la H3K4 en gens diana activats de la via de Wingless (Wnt/Wg) com c-Myc (Sierra et al., 2006).

Cal destacar la relació que hi ha entre els complexos que contenen ASH2 i alguns tipus de càncer com les leucèmies, ja que línies cel·lulars leucèmiques amb característiques eritrocítiques i megacariocítiques expressen una elevada quantitat del transcrit *ash2*, el qual disminueix ràpidament quan s'indueix la diferenciació d'aquestes cèl·lules amb forbol éster (Wang et al., 2001).

A diferència de *Drosophila*, on Trx i ASH2 sembla que són membres de dos complexos diferents, en humans els homòlegs de Trx (Set1/MLL) i ASH2 s'han trobat en alguns casos al mateix complexe. Tots aquests complexos de mamífers, similars al Set1C de llevats, tenen en comú la capacitat de modificar les histones (per metilació de la H3K4). No s'ha descrit homòlegs en llevats, ni per HCF ni per Menin, però l'elevat grau de conservació evolutiva entre els altres membres fa pensar que es puguin aïllar complexos relacionats, amb funcions semblants com a HMTs en organismes com *Drosophila*.

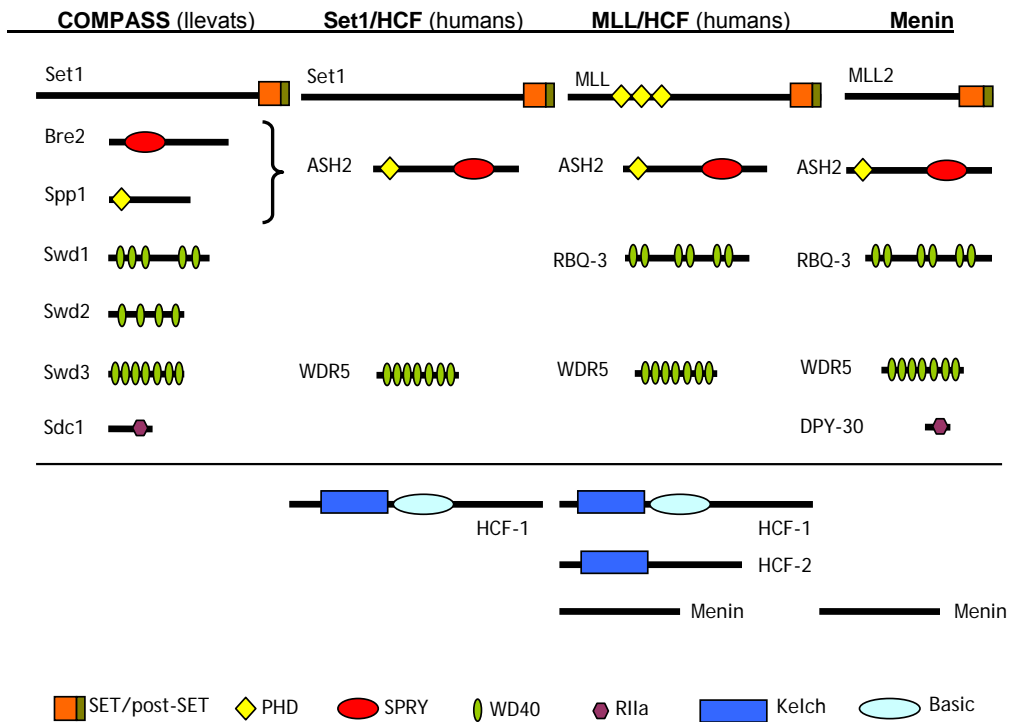


Fig. 16 - Complexos d'ASH2 a llevats i humans. Es mostren alguns dels components dels complexos COMPASS/Set1C de llevats (Miller et al., 2001; Nagy et al., 2002; Roguev et al., 2001) i els seus homòlegs en els complexos Set1/ASH2 HMT: Set1/HCF (Wysocka et al., 2003), MLL/HCF (Yokoyama et al., 2004) i Menin (Hughes et al., 2004) d'humans. En llevats, Bre2 i Spp1 podrien formar una associació funcional equivalent a ASH2. A sota de la figura s'indica quin domini representa cada símbol de color.

Com s'ha mencionat anteriorment, el coneixement sobre les proteïnes associades a ASH2 i la seva funció a *Drosophila* és escàs. Aquest organisme ofereix la possibilitat de realitzar estudis alterant la funció d'aquest gen i analitzant els efectes en els teixits durant el desenvolupament i en l'adult. Un dels teixits més ben estudiat i que és un sistema molt valuós per realitzar estudis de funció gènica és l'ala. Per aquest motiu, d'ara en endavant la introducció de la Tesi es centra en descriure *Drosophila*, la formació del patró de venes i intervenes i el paper dels *trxG* a l'ala.

Bloc3

L'ala de *Drosophila* com a model d'estudi

Estudis realitzats per Allen Shearn indicaven que *ash2* i *ash1* estarien funcionalment relacionats (Shearn, 1989; Shearn et al., 1987), però que *ash2* podria tenir un paper més específic. Confirmant aquesta hipòtesi, es va veure que el gen *ash2* està implicat en el correcte desenvolupament de l'ala, ja que mutacions en aquest gen provoquen l'augment dels territoris de vena i la reducció de les regions d'intervena (Amoros et al., 2002).

L'ala de *Drosophila* i concretament l'organització del patró de venes i intervenes és un bon sistema per estudiar el manteniment de les identitats cel·lulars degut a la gran quantitat de mutants i d'informació sobre els gens i les vies de senyalització que s'encarreguen de formar aquest patró. Com que *ash2* forma part d'un grup de gens implicats en el manteniment de l'estat diferenciat, els fenotips mutants observats a l'ala porten a preguntar-nos si *ash2* és un regulador dels gens de vena i intervena i quins són els seus mecanismes d'acció. A partir dels resultats previs on es demostra que la pèrdua de funció d'*ash2* resulta en l'augment de teixit venós, la nostra hipòtesi de treball es basa en què *ash2* podria actuar mantenint la identitat d'intervena. Per intentar demostrar aquesta hipòtesi ens hem servit dels avantatges de treballar amb *Drosophila*, les quals es detallen a continuació juntament amb una descripció extensa de la formació del patró de vena i intervena.

3.1 - *Drosophila melanogaster* com a organisme model

La Biologia del Desenvolupament ha fet ús de diferents organismes models per estudiar els problemes biològics amb més facilitat. El fet que els mecanismes genètics bàsics que defineixen la forma i les estructures d'un animal siguin molt semblants i conservats al llarg de l'evolució entre diferents espècies fa possible que la informació obtinguda sigui extrapolable entre elles.

Drosophila melanogaster ha estat escollit com a organisme model per presentar un cicle biològic de curta durada, elevat nombre de descendència i fàcil manteniment degut a les seves dimensions reduïdes. Aquestes característiques, afegides a la facilitat per l'anàlisi genètica i el gran ventall de tècniques dissenyades per manipular l'organisme, han fet que s'acumulin gaire bé 100 anys d'estudi.

Drosophila melanogaster és un dípter holometàbol; és a dir, presenta unes etapes larvals (larva I, II i III) i una etapa adulta, separades per unes etapes pupals on té lloc una metamorfosi completa. Els **discs imaginals** són unes estructures semblants a uns sacs discoidals formats en els estadis de larva però

que comencen a determinar-se durant l'embriogènesi a partir d'un conjunt d'entre 10 i 40 cèl·lules precursors que més endavant invaginen per donar lloc a les estructures de l'adult (Held, 2002) (Fig.17). Es formen a partir de la informació posicional provinent de l'eix primari del cos, que s'ha establert anteriorment i ajuda a conferir una identitat específica a cada un dels discs imaginals. Durant les etapes larvals es donen processos de proliferació i formació de patró fent que els discs imaginals creixin, es determinin i adoptin una forma específica. Durant la metamorfosi, es moren aproximadament el 90% dels teixits larvals i els discs imaginals experimenten processos de reorganització i diferenciació, i evertixen donant lloc a les estructures de l'individu adult. Així doncs, els discs imaginals són uns teixits òptims per l'estudi de diferents aspectes del desenvolupament, com per exemple, la determinació, la diferenciació, la proliferació i el manteniment d'identitats cel·lulars.

Un dels avantatges de *Drosophila* és la possibilitat d'induir mutacions per inferir la funció del gen mutat a partir del fenotip que s'observa. Per obtenir mutants del gen que es vol estudiar, es pot fer ús d'agents químics mutagens, de la irradiació amb raigs X o de les col·leccions de mutants originats per inserció d'elements transponibles en el genoma de *Drosophila*. Aquests elements es poden fer saltar per tal d'obtenir un mutant més sever del gen on es troba insertat l'element a mobilitzar. A més, recentment el nostre grup ha participat en generar una col·lecció d'elements transponibles insertats en un fons isogènic per tal d'obtenir un kit a l'abast de tothom de deleccions mapades que cobreixi gran part del genoma de *Drosophila* (col·lecció DrosDel) (Ryder et al., 2004).

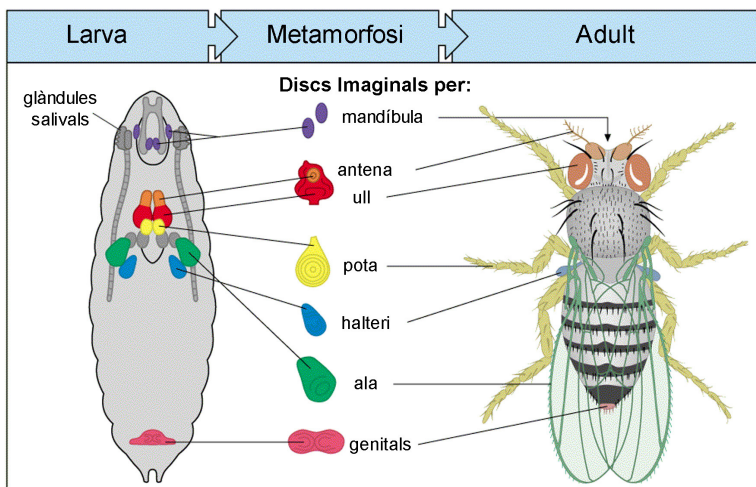


Fig. 17 - Formació d'una mosca adulta a partir dels discs imaginals. Els discs imaginals proliferen durant els estadis de larva i es reorganitzen, es diferencien i evertixen durant la metamorfosi, donant lloc a les estructures de la mosca adulta. Traduït de Wolpert, L. et al. *Principles of Development (2nd Edition)*, 2001.

L'observació dels fenotips produïts per diferents mutacions i la combinació entre elles permet establir relacions funcionals entre els gens i predir si participen o no en els mateixos processos. Els **cromosomes balancejadors** a *Drosophila* eviten que es produeixi recombinació entre les cromàtides dels cromosomes de les femelles fent possible les interaccions gèniques. D'aquesta manera, mitjançant encreuaments genètics es poden "construir" mosques amb el genotip mutant que hom desitja i mantenir-les en forma d'*stock* al laboratori.

A nivell més molecular, cal destacar la seqüenciació del genoma de *Drosophila* (Adams et al., 2000) i les col·leccions de clons generades (Berkeley *Drosophila* Genome Project), que han facilitat molt l'ús de tècniques més actuals com els microarrays.

La gran quantitat d'estudis i projectes realitzats a partir de *Drosophila* ha portat a la creació de diferents bases de dades on s'emmagatzema la informació generada i es facilita la seva obtenció. Una de les principals és FlyBase (<http://www.flybase.org>), on es presenta pràcticament tota la informació disponible pels gens descrits a *Drosophila*: informació de seqüència genòmica i proteica, al·lels, *stocks* disponibles, referències i a més, presenta *links* cap a altres pàgines web importants.

A més, el gran ventall de tècniques dissenyades per realitzar estudis funcionals a *Drosophila* han fet potenciar el seu ús en el camp de la Genètica i el Desenvolupament. Entre aquestes tècniques cal destacar la generació de **mosaics genètics** (Garcia-Bellido et al., 1973), que permet estudiar una mutació letal en homozigosi més enllà de la seva fase de letalitat, tant en discs imaginals com en adult. Mitjançant la combinació de marcadors genètics i recombinació mitòtica es poden generar, en un fons heterozigot per la mutació, clons homozigots de cèl·lules mutants i clons homozigots de cèl·lules germanes salvatges. Aquesta tècnica es pot realitzar per irradiació amb raigs X o utilitzant unes seqüències anomenades Flipase Recombination Targets (FRT) (Xu and Rubin, 1993) reconegudes per una recombinasa induïble, la flipasa (FLP) (Fig.18). Una variant de la tècnica anomenada *Minute* (Morata and Ripoll, 1975), permet estudiar mutacions que afecten a la viabilitat cel·lular, ja que incorpora una mutació en un gen ribosomal. Aquest mètode elimina el clon de cèl·lules salvatges i dóna avantatge proliferatiu al clon de cèl·lules mutants facilitant l'estudi de la mutació.

D'altra banda, el sistema **Gal4/UAS** ha permès obtenir gran quantitat d'informació basada en l'expressió ectòpica dels gens (Brand and Perrimon, 1993). Gal4 és una proteïna de llevats que activa la transcripció de diferents gens mitjançant la unió a unes seqüències anomenades *Upstream Activating Sequence* (UAS). Per utilitzar aquest sistema a *Drosophila*, és indispensable l'ús de línies transgèniques que portin la proteïna Gal4 sota el control d'un promotor que s'expressi quan i on es desitja (*driver*) i el gen que es vol estudiar clonat darrera

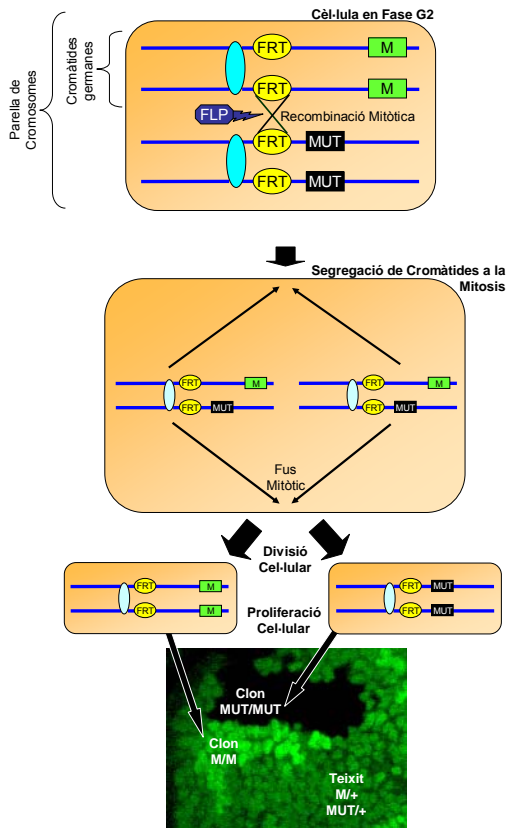


Fig. 18 - Generació de clons per recombinació mitòtica. La Flipasa (FLP) s'expressa per l'activació d'un promotor induïble per xoc tèrmic (*heat shock* o *hs*) que reconeix les *Flipase Recombination Targets* (FRT o Diances de Recombinació per Flipasa), situades en els cromosomes complementaris, provocant la recombinació mitòtica. Es generen dues cèl·lules diferents, una homocigòtica per un marcador *M* (en aquest cas *Green Fluorescent Protein: GFP* o Proteïna Verda Fluorescent) que serveix de control, i l'altra homocigòtica per una mutació (*MUT*). Les subseqüents divisions d'aquestes cèl·lules donaran lloc a dos clons diferents emmarcats en un fons heterocigot. El clon amb doble còpia del marcador s'acostuma a anomenar *twin clone* (clon bessó).

de les seqüències UAS. Així, la proteïna Gal4 reconeixerà les seqüències UAS i induirà la sobreexpressió del gen.

Un altre avantatge de treballar amb *Drosophila* com a organisme model és l'existència de **cromosomes politènics** a les glàndules salivals. Els cromosomes politènics són cromosomes gegants que resulten degut a que l'ADN d'aquestes cèl·lules es replica moltes vegades sense que se separin les cromàtides resultants. Tots els centròmers dels cromosomes s'uneixen formant una estructura anomenada cromocentre. Al llarg dels cromosomes s'observen bandes (ADN empaquetat) i interbandes que es mantenen més o menys constants dins de cada espècie, permetent el reconeixement dels braços de cada cromosoma segons el patró de bandes que presenta. En algunes fases del desenvolupament, es poden trobar *puffs* o regions més amples que perden la morfologia de bandes i interbandes i que estan associades a la transcripció dels gens. Els cromosomes politènics, degut a la seva grandària permeten estudis d'estructura, funció i organització cromosòmica, impossibles de dur a terme en cromosomes normals, així com determinar a quins loci s'uneixen aquelles proteïnes d'unió a ADN.

3.2 - L'ala de *Drosophila* com a model per estudiar la funció d'*ash2*

L'ala adulta de *Drosophila* està formada per dues superfícies adherides, la dorsal i la ventral, dividides en territoris de vena i intervena. Les venes són tubs conductors de fluids que confereixen rigidesa a l'ala. Estan formades per cèl·lules densament empaquetades, amb cutícula més pigmentada i superfície apical més petita que les intervenes (revisat a Bier 2000; De Celis, 2003). A més, les cèl·lules de les venes sobreviuen en l'adult, mentre que els teixits d'intervena es moren just després de l'eclosió de la pupa. A *Drosophila melanogaster* hi ha 6 venes longitudinals (L1-L6) que es distribueixen al llarg de l'ala, una vena que ressegueix el marge anterior, i dues venes transversals, l'anterior (a-cv) i la posterior (p-cv), que són perpendiculars a les venes longitudinals i connecten les venes L2-L3 i L4-L5, respectivament (Fig.19). Cada vena presenta un patró de **corrugació** (protruberància cap a una de les superfícies de l'ala) independent, que la classifica com a dorsal o com a ventral. Així, mentre que la vena L2 i la part proximal de la vena L4 corruguen cap a ventral, la vena L3, la part distal de la vena L4 i la vena L5 són dorsals. La distribució de les venes a l'ala defineix alhora uns territoris d'intervena, anomenats de la lletra A a la E, tal i com s'indica a la Figura 19. El desenvolupament de les venes i intervenes ha estat objecte de molts estudis i l'ampli coneixement dels gens i mecanismes que participen en aquest procés, ha fet que l'ala de *Drosophila* esdevingui un dels millors sistemes model per estudiar processos de formació i manteniment de patrons.

El disc imaginal d'ala és l'estructura a partir de la qual s'originen tant l'ala com la meitat del notum de l'individu adult. Aquest disc es desenvolupa a partir d'un conjunt de ~15-20 cèl·lules que s'invaginen a partir de l'ectoderm lateral del segment mesotoràcic durant l'embriogènesis i prolifera durant els estadis larvals fins a generar una monocapa epitelial de ~50.000 cèl·lules (Bate and Arias, 1991; Cohen et al., 1993). En el disc imaginal, les cèl·lules se semblen molt a nivell histològic però difereixen en el patró de gens que expressen, de manera que dintre del mateix disc es crearan diferents territoris de grups de cèl·lules que adquiriran diferents identitats (Fig.19). La formació del patró té lloc progressivament, a mesura que el disc va proliferant i augmentant de grandària (Williams et al., 1993). Durant l'inici del desenvolupament pupal el disc es plega per una línia que constituirà el marge anterior de l'ala adulta formant una bicapa de cèl·lules. La part dorsal i ventral dels territoris especificats com a vena es comuniquen entre elles mitjançant senyals d'inducció per tal d'alinejar-se i formar uns tubs ininterromputs que correspondran a les venes de l'ala adulta (Garcia-Bellido and de Celis, 1992). Les venes transversals també es formen durant el període de pupa.

El desenvolupament de les venes és una seqüència temporal d'esdeveniments que s'inicia a l'estadi de larva III, quan la posició de les

intervenues i venes longitudinals s'estableix al llarg de l'eix antero-posterior (A/P) del disc d'ala i comencen a expressar-se els gens de vena en una sèrie de bandes amples i paral·leles anomenades "provenes" (Biehs et al., 1998; De Celis, 2003; Sturtevant and Bier, 1995). Seguidament, durant les fases de pupa, les venes s'acaben de diferenciar. Tant venes com intervenues resulten de la contribució de vàries vies de senyalització cel·lular i de l'expressió localitzada i diferencial per a cada regió de determinats factors de transcripció. Entre aquests cal destacar les vies de senyalització de l'Epidermal Growth Factor Receptor (*Egfr* o DER) i Decapentaplegic (Dpp), les quals promouen la formació de les venes, i la via de Notch, que actua com antagonista de la via de l'*Egfr* (revisat a De Celis, 2003). A més, l'expressió a les zones de vena de la proteïna transmembrana Rhomboid (Rho) és necessària per promoure l'activació de l'*Egfr* (Sturtevant et al., 1993) mentre que l'expressió a les regions d'intervena de les proteïnes Blistered (Bs o DSRF, ja que és l'homòleg del Serum Response Factor) (Fristrom et al., 1994; Montagne et al., 1996; Roch et al., 1998) i Net (Brentrup et al., 2000), es requereix per inhibir el senyal d'aquesta via. Per entendre com s'organitza el patró de venes i intervenues cal conèixer com les cèl·lules d'una ala van adquirint un destí diferenciat, on es posicionaran les venes per formar-se i com es diferenciaran al llarg del desenvolupament.

3.2.1 - Posicionament de les venes al llarg de l'eix A/P

El primordi del disc imaginal es divideix ja a l'embriogènesis en dues poblacions de cèl·lules que no es poden barrejar entre elles i que defineixen els compartiments anterior (A) i posterior (P). Aquesta divisió va seguida per una

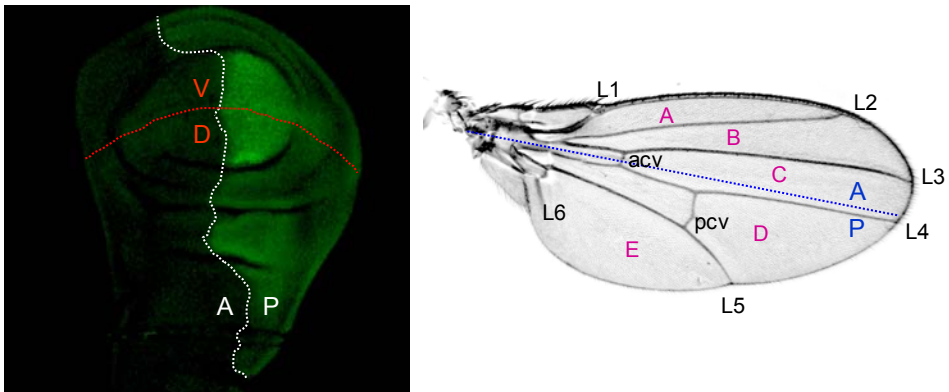


Fig. 19 - Organització de l'ala en compartiments. Disc imaginal d'ala amb marcatge de la proteïna posterior En en verd. L'eix antero-posterior (A/P) de l'ala està marcat amb línies blanques mentre que l'eix dorso-ventral (D/V) està representat amb línies vermelles. A l'ala adulta també es mostra l'eix A/P i a més es representen les venes longitudinals (L1-L6) i les venes transversals anterior (acv) i posterior (pcv). Les venes L1 i L6 són incompletes.

segona compartimentalització a l'estadi de larva II que separa les cèl·lules dorsals (D) de les ventrals (V) (Fig.19). Els compartiments corresponen a dominis d'expressió dels **gens selectors**, com és el cas d'*engrailed* (*en*) a les cèl·lules posteriors o *apterous* (*ap*) a les cèl·lules dorsals (Held, 2002). Per tant, aquelles cèl·lules que expressin *en* hauran decidit ser posteriors mentre que aquelles que no l'expressin adquiriran la identitat anterior. De la mateixa manera, les cèl·lules que expressin *ap* s'especificaran com a dorsals i les que no com a ventrals. Estudis per anàlisi clonal mostren que les cèl·lules de diferents compartiments no es poden barrejar entre elles, respectant les fronteres genètiques. L'eix A/P es situa entre les venes L3 i L4 mentre que l'eix D/V correspon al marge de l'ala adulta. A més, es considera que els marges que es defineixen entre els compartiments actuen com a "**centres organitzadors**" que juguen un paper determinant en el creixement i la formació del patró de l'ala.

L'acurat posicionament de les venes a l'ala adulta depèn de valors posicionals establerts en el disc imaginal al llarg de la frontera A/P (Biehs et al., 1998; de Celis et al., 1996; Sturtevant et al., 1997; Sturtevant and Bier, 1995). Com aquest eix A/P actua de font d'informació posicional és objecte de molts estudis des de fa més de 30 anys. Aquests estudis han portat a un model en el qual es descriu l'activació dependent de dosi de diferents factors de transcripció en resposta al senyal de morfògens. Les cèl·lules posteriors expressen *en* però no expressen *cubitus interruptus* (*ci*), un gen reprimat per *en* amb expressió limitada al compartiment anterior. A més, les cèl·lules posteriors secreten la proteïna Hedgehog (Hh), la qual difon cap al compartiment anterior on activa l'expressió de diferents gens diana implicats en la formació del patró de la part central del disc imaginal. *en*, al compartiment posterior, també inhibeix la resposta de senyalització de Hh a través de la inhibició de Ci (Dominguez et al., 1996). Aquestes cèl·lules just anteriors a l'eix A/P que responen al senyal de Hh formen el centre organitzador A/P. Entre les dianes de Hh s'inclou el gen *decapentaplegic* (*dpp*), que codifica per una molècula de senyalització homòloga al TGF- β (Basler and Struhl, 1994; Tabata and Kornberg, 1994) (Fig.110A). Tot i que l'ARN de *dpp* només s'expressa en el centre organitzador A/P entre els primordis de vena L3 i L4, la proteïna Dpp difon cap a les cèl·lules A i P per regular tant el creixement com l'organització del patró (Teleman and Cohen, 2000). Per tant, Dpp s'expressa en forma de gradient, on el punt de màxima concentració es troba a la regió central del disc d'ala i va disminuint de nivell a mesura que s'estén cap a l'extrem més anterior i posterior del disc imaginal (Fig.110B). L'activació del senyal de Dpp es pot monitoritzar a través de la fosforilació del seu efector, Mad (P-Mad). Es va observar que els nivells de P-Mad són alts a prop de la font de Dpp però que inesperadament disminueixen en aquelles cèl·lules que expressen Dpp (cèl·lules del centre organitzador) (Fig.110C). Aquesta disminució de P-Mad és deguda a Hh i a la repressió transcripcional del receptor de Dpp, *thick veins* (*tkv*) (Funakoshi et al., 2001; Tanimoto et al., 2000). Hh i Dpp són dos morfògens que activen de

manera dosi-dependent l'expressió de diferents gens diana; és a dir, diferents nivells de senyalització d'aquestes proteïnes especifiquen diferents destins cel·lulars (Gurdon and Bourillot, 2001). Hh actua com un morfògen de curt rang per controlar el patró de la regió central de l'ala mentre que Dpp es considera un morfògen de llarg rang que s'encarrega del control de la resta del disc.

Un dels gen activats per alts nivells de Hh és *knot (kn)/collier (col)*, que s'expressa entre les venes L3 i L4 i juga un paper molt important en la formació del patró de la regió central del disc (Mohler et al., 2000; Vervoort et al., 1999). Les conseqüències de la pèrdua de l'activitat de *kn* són: la desaparició del territori d'intervena C (entre L3/L4), la desaparició de la vena L4 (només es forma una part molt petita de la regió proximal), l'engruiximent i desplaçament cap al compartiment posterior de la vena L3 i una reducció de la mida de l'ala (Crozatier et al., 2002). Tots aquests fenotips són deguts a canvis en l'expressió de gens directament implicats en la formació de venes i intervenes. A la intervenció C, *kn* activa l'expressió del gen promotor d'intervenies *bs*, disminueix la senyalització de l'*Egfr* (Mohler et al., 2000; Vervoort et al., 1999) i augmenta l'expressió del lligand de l'*Egfr*, *vein (vn)*, el qual activa la via de l'*Egfr* en cèl·lules posteriors adjacents a l'eix A/P, promovent la formació de la vena L4 (Crozatier et al., 2002) (Fig.110B). *vn* codifica per una proteïna de la família de les neuregulines que s'expressa a la intervenció entre L3 i L4 i a la vena L4, tot i que presenta un patró d'expressió dinàmic que varia en els estadis de pupa (Schnepp et al., 1996; Simcox et al., 1996). Mutants de *vn* homozigots viables mostren interrupcions a la vena L4. A més, la disminució del senyal de Dpp que s'observa en cèl·lules amb elevats nivells de Hh (corresponen a les cèl·lules del centre organitzador A/P) també és deguda a *kn*. Per promoure la formació de la vena L4 són necessaris Vn, Kn i alts nivells de senyalització de Dpp, mentre que per promoure la formació de la vena L3 no es requereixen ni Vn ni Kn, fet que indica que la vena L3 i la vena L4 s'especifiquen per mecanismes independents. L'activitat de Kn juga un paper molt important en la formació del patró de la regió central a través de la combinació dels efectes de la via de senyalització de Hh, Dpp i DER.

El posicionament de la vena L3 està relacionat amb l'activitat de Hh a través de la regulació d'*iroquois (iro)* (Fig.110B). El complex *iroquois (iro-C)* codifica per tres proteïnes amb homeodomini que s'expressen a la provena L3 i també a les provenes L1 i L5. En totes aquestes regions l'expressió dels gens *iro* és necessària per la formació de les venes i la regulació de gens promotors de vena (revisat a De Celis, 2003). L'expressió d'*iro* se solapa parcialment amb l'expressió de *kn* i per tant, com *Kn* està implicat en destins d'intervenció, només aquelles cèl·lules que expressin *iro* però no expressin *Kn* activaran els gens de vena per formar la provena L3. El límit anterior de l'expressió d'*iro* ve marcat per l'activitat repressora dels gens *spalt-major (salm)* i *spalt-related (salr)* (Fig.110B) que formen el complex *spalt (sal-C)* i codifiquen per dues proteïnes amb dits de Zinc (de Celis and Barrio, 2000). En absència dels gens del *sal-C* la mida de l'ala

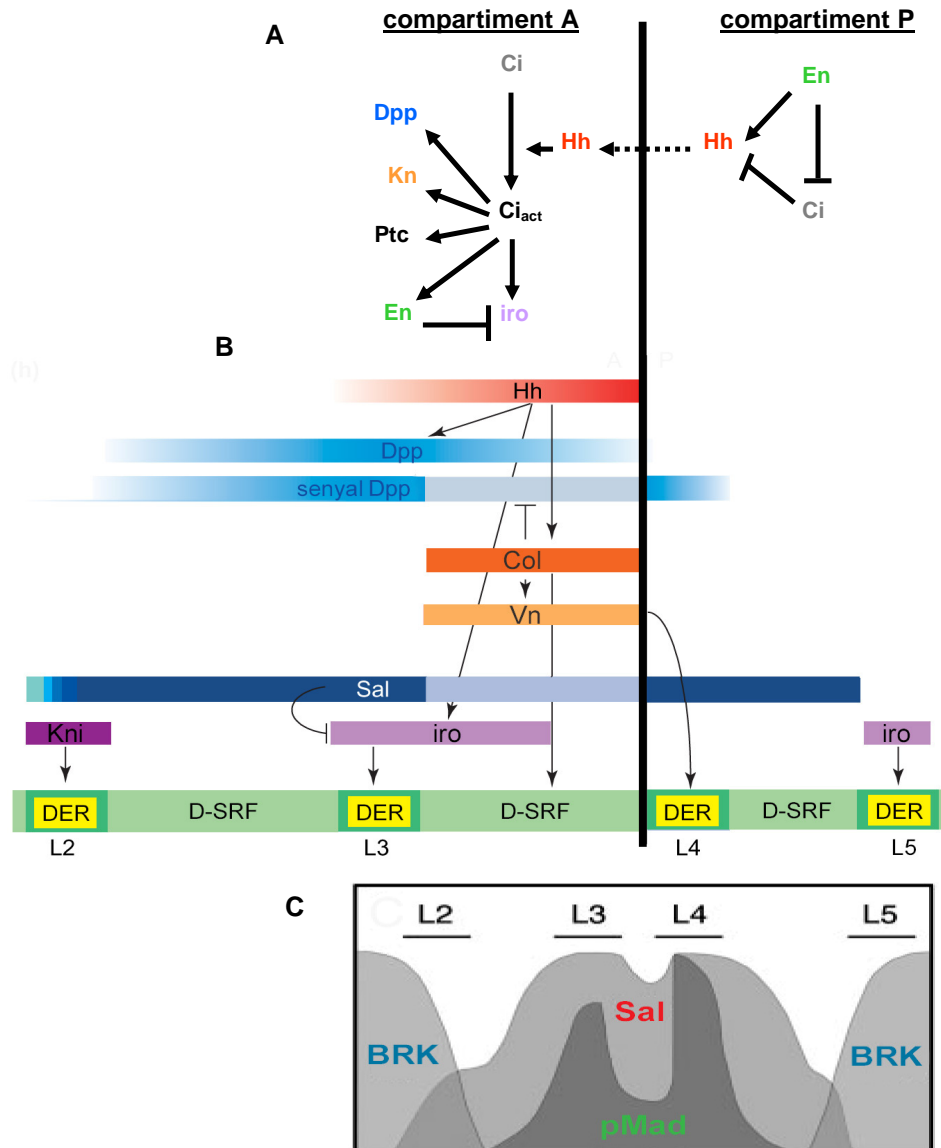


Fig. 110 - Paper realitzat per les vies de senyalització de Hh i Dpp en el posicionament de les provenes. (A) Resum de les interaccions gèniques que tenen lloc en l'eix A/P. Els principals intermediaris de la via de senyalització de Hh són Kn i Dpp. (B) Representació esquemàtica de l'expressió dels gens que estan implicats en el posicionament i formació de les provenes (veure text) començant pels gens de la via de Hh i Dpp i acabant amb els gens promotors de vena o intervena. (C) Esquema dels nivells d'expressió dels gens de la via de Dpp. El Mad fosforilat (pMad) colocalitza amb nivells alts de la proteïna Sal en les presuntes venes L3 i L4 mentre que aquestes proteïnes són menys abundants a l'eix A/P. Brk se solapa amb regions de baixa expressió de Sal. Adaptat de de Celis 2003, Crozatier et al, 2004 i Barrio and de Celis, 2004.

es redueix, la vena L2 no es forma i les venes L4 i L5 es fusionen i es desplacen cap a anterior, mentre que quan un dels dos gens és expressat ectòpicament, les venes L2 i L5 no es formen i la mida de l'ala es redueix (Barrio and de Celis, 2004; de Celis and Barrio, 2000). L'expressió dels gens *sal-C* depèn del senyal de la via de Dpp i té lloc en el domini central del disc imaginal d'ala (de Celis et al., 1996), contribuint al posicionament de les provenes L2 i L5. El gradient de Dpp regula els gens del *sal-C* i *optomotorblind (omb)* i a més crea un gradient invers de *brinker (brk)* (Fig.110C) que serveix per controlar l'expressió dels gens diana de Dpp i el creixement del disc d'ala (Campbell and Tomlinson, 1999; Minami et al., 1999; Muller et al., 2003). Per tant, *sal-C* i *omb* són activats pel senyal de Dpp de manera dosi-dependent i reprimits per Brk. Així, mentre que baixos nivells de Sal-C activen el gens del complex *knirps (kni-C)*, *Knirps (kni)* i *Knirps-related (knrf)*, implicat en el posicionament de la provena L2, alts nivells de Sal-C inhibeixen *Kni* (de Celis and Barrio, 2000).

Els gens del *Kni-C* codifiquen per factors de transcripció que s'expressen de manera molt similar en el primordi de vena L2. L'activitat de *kni-C* reprimeix el gen d'intervena *bs* i activa el gen de vena *rho*, definint la posició de la provena L2 i organitzant el seu desenvolupament (Lunde et al., 1998). El mutant de *Kni*, *radius incompletus (kni^{ri})*, presenta una pèrdua de la majoria de la vena L2. Sal-C també reprimeix l'expressió d' *iro* en el seu domini excepte en aquelles cèl·lules que presenten uns nivells apropiats de senyalització de Hh. Per tant, l'expressió d'*iro* es localitza a la provena L5, adjacent al domini Sal-C, i a la provena L3, on l'activitat de Hh activa l'expressió d'*iro* (Gomez-Skarmeta and Modolell, 1996).

El posicionament de la vena L5 implica l'activació del gen *abruptex (ab)* a la provena L5, que se situa anterior al marge de cèl·lules que expressen *omb* i *brk* (Cook et al., 2004). Sembla ser que l'activació del gen *ab* depèn de manera autònoma de l'expressió d' *Omb* i de manera no autònoma d'una molècula de senyalització a curt rang encara desconeguda que provindria de les cèl·lules que expressen Brk. Mutants pel gen *ab* resulten en la pèrdua de la part distal de la vena L5. Tot i que es requereixen més estudis per entendre com les venes es posicionen al llarg de l'eix A/P i com es delimita l'expressió dels gens de posicionament, es pot concloure que les vies de senyalització de Hh i Dpp juguen un paper molt important mitjançant els intermediaris *kn* i *sal* per elaborar el patró de la regió central (L3/L4) i de la perifèria (L2 i L5) de l'ala, respectivament.

3.2.2 - Formació i diferenciació de les venes

El posicionament de venes al llarg de l'eix A/P durant l'estadi de larva III prové dels gradients dels morfògens Hh i Dpp i resulta en l'expressió localitzada de *rho* en tires de cèl·lules paral·leles que coincideixen amb els primordis de vena, i que es troben en un patró altern al del gen d'intervenes *bs*. Les venes longitudinals tenen en comú l'expressió de *rho* i l'absència de *bs*, però es diferencien en que hi ha gens que s'expressen en unes venes i no en altres. Per exemple, el gen *Delta*

(*Dl*) s'expressa a totes les venes excepte a la vena L2, *capoulican* i *araucan* s'expressen només a les venes imparells i *achaete* i *scute* només s'expressen a la vena L3 (revisat a Bier, 2000). Aquesta expressió gènica diferencial permet que cada vena pugui ser identificada i suggereix per cada una d'elles un programa genètic específic de desenvolupament.

Tant la formació com la diferenciació de les venes longitudinals implica les activitats coordinades de les vies de l'*Egfr*, Dpp i Notch. L'*Egfr* pertany a una família de receptors amb activitat tirosina kinasa (RTK) que activen la cascada de senyalització Ras/MAPK i com a conseqüència alteren l'expressió dels seus gens diana. Aquesta via intervé en el control de la proliferació i en moltes decisions de destí cel·lular al llarg del desenvolupament. La seva funció és essencial per la formació de les venes, com mostren els fenotips d'individus mutants per al·lels viables de l'*Egfr* (*Torpedo*, *Top*) que presenten venes truncades. Recíprocament, l'expressió ectòpica d'una forma activada de l'*Egfr* (λ -*Top*) o al·lels de guany de funció (*Ellipse*, *Elp*) resulten en la formació de venes ectòpiques (Diaz-Benjumea and Garcia-Bellido, 1990). Rho participa en l'activació del lligand de l'*Egfr* *vn*, de manera que l'expressió localitzada de *rho* i *vn* activa la via de l'*Egfr*. Mutants *rho*^{ve} presenten les venes truncades i la sobreexpressió de *rho* resulta en l'aparició de venes ectòpiques (Sturtevant et al., 1993). A més, individus doble mutants *rho*^{ve} *vn*¹ presenten una completa pèrdua de les venes, confirmant que *rho* i *vn* juguen un paper clau per activar la via de l'*Egfr* i desencadenar la formació de les venes.

Notch és un receptor transmembrana que es requereix per la proliferació cel·lular, per la formació del marge de l'ala i per restringir la diferenciació de les cèl·lules de vena (de Celis and Garcia-Bellido, 1994). L'activació de la via de l'*Egfr* i de Notch crea dos dominis de senyalització complementaris: la vena, on la via de l'*Egfr* està activa, i les cèl·lules adjacents que separen les venes de les intervenes, on està activa la via de Notch. Mentre la via de l'*Egfr* s'encarrega de promoure la formació de les venes, el senyal de Notch serveix per prevenir-la. Les interaccions antagòniques entre aquestes dues vies són necessàries perquè les venes es diferenciïn amb l'amplada correcta (de Celis et al., 1997; Sotillos and De Celis, 2005). *rho* s'expressa en línies d'una o dues cèl·lules d'amplada que corresponen als primordis de vena mentre que els altres gens de vena s'expressen en dominis més amples competents per ser vena (provenes) (Biehs et al., 1998). El domini d'expressió de *rho* es troba en el centre de les provenes i només aquest és el que donarà lloc a les venes adultes per activació de la via de l'*Egfr* i posteriors processos de manteniment i refinament de les venes. El lligand de Notch *Dl* s'expressa a les venes, activa Notch a les cèl·lules adjacents, i com a conseqüència s'activa el gen de la via *Enhancer of split mβ* (*E(spl)mβ*) en les cèl·lules del marge que separen les venes de les intervenes. *E(spl)mβ* s'encarrega de reprimir *rho* fent que quedi situat en el centre de la provena i per tant, restringint la diferenciació de les venes (Fig. I11). En absència de Notch, les venes apareixen correctament localitzades però estan engruixides degut a errors en el

mecanisme d'inhibició lateral. D'altra banda, la via de DER es requereix per prevenir l'expressió de *bs* a les provenes i per mantenir l'expressió de *DI* (de Celis et al., 1997). Per tant, Notch i l'*Egfr* esdevenen mútuament dependents, l'*Egfr* regulant l'expressió de *DI* a les venes i Notch reprimint *rho* a les cèl·lules adjacents.

Durant el desenvolupament del disc imaginal d'ala les venes i les intervenes s'especifiquen però és durant els estadis pupals quan la diferenciació cel·lular d'aquestes té lloc. Malgrat que els mecanismes que porten a terme la diferenciació no són tan ben coneguts, se sap que es produeixen canvis en els patrons d'expressió dels factors que es necessiten per la formació de les venes. En els discs imaginals l'expressió de Dpp es troba a l'eix A/P però després de la formació de la pupa Dpp s'activa en les cèl·lules de vena i es requereix per la seva diferenciació (de Celis, 1997; Yu et al., 1996). Les interaccions que s'estableixen entre Notch i l'*Egfr* en el disc imaginal es mantenen durant el desenvolupament de pupa i contribueixen a determinar els llocs on s'expressarà Dpp (de Celis et al., 1997; Sotillos and De Celis, 2005). Un cop Dpp està activat, promou la formació de les venes indirectament per l'activació i manteniment de l'expressió de *rho*, ja que s'estableixen circuits de retroalimentació positius entre la via de Dpp i DER (Martin-Blanco et al., 1999; Sotillos and De Celis, 2005).

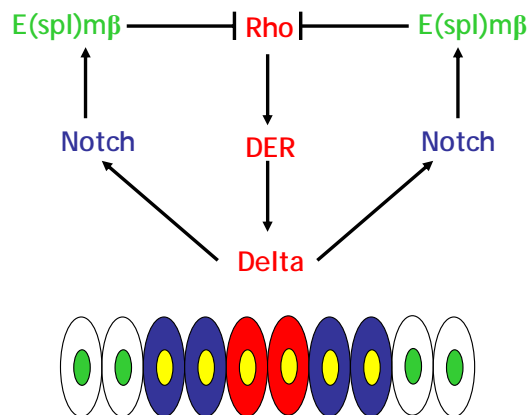


Fig. I11 - Resum de les interaccions gèniques entre la via de Notch i la via de l'*Egfr*. L'expressió de Rho produeix l'activació de DER i l'expressió de *DI* a les venes. El lligand *DI* activa Notch a les cèl·lules adjacents i aquest activa l'expressió d' *E(spl)mβ*. L'expressió de Rho queda restringida a les venes per la repressió a través d' *E(spl)mβ*. El dibuix mostra els dominis d'activació de l'*Egfr* i de Notch (rodones vermelles i blaves respectivament) en relació a l'expressió dels factors de transcripció de vena e intervena (cercles grocs i verds respectivament). La vena es diferenciarà en les cèl·lules vermelles durant el desenvolupament de la pupa. Adaptat de de Celis, 2003.

El patró d'expressió de la via de l'*Egfr* i els gens que es troben sota el seu control també estan temporalment i espacialment regulats durant el desenvolupament de l'ala. Per exemple, l'expressió de *vn* es situa entre la intervènia L3 i L4 en estadi de larva però en estadis de pupa s'estén fins ocupar tots els territoris d'intervènia. L'expressió dels gens *ventral veinless* (*vvl*) i *nubbin* (*nub*) es va perdent progressivament de les intervènies i només es manté a les provenes durant la pupa. Per contra, *argos* (*aos*), que és un antagonista de la via de DER, s'expressa a les cèl·lules de vena des del tercer estadi larval i només a les intervènies durant els estadis de pupa. Aquesta regulació dinàmica de l'expressió està associada amb la correcta formació del patró de venes.

La formació dels territoris d'intervènia ve marcada per l'expressió dels gens *bs* i *net*. *Bs* o D-SRF s'expressa a les intervènies i es requereix perquè les cèl·lules adoptin la identitat d'intervènia. Aquesta proteïna també està implicada en l'adhesió dels epitelis dorsal i ventral, motiu que explica les bombolles o "blisters" que s'originen a l'ala de mutants per aquest gen, a part de l'aparició de venes ectòpiques (Fristrom et al., 1994; Montagne et al., 1996). *net* codifica per una proteïna amb domini bàsic helix-loop-helix que també s'expressa a les intervènies i presenta patrons de transcripció complementaris i activitats mútuament excloents amb *rho* (Brentrup et al., 2000). L'expressió ectòpica de *rho* reprimeix

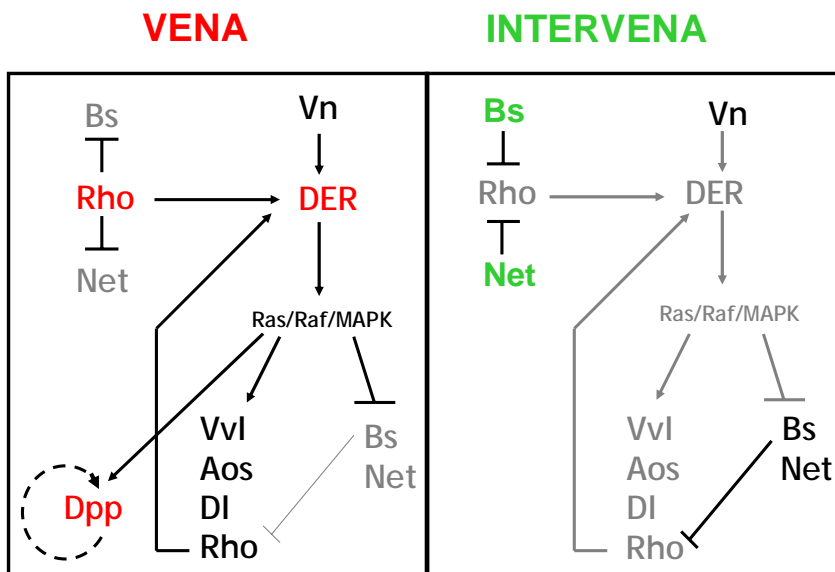


Fig. I12 - Representació esquemàtica de la via de senyalització de l'*Egfr*. A les venes, el gen *rho* manté inhibits els gens promotors d'intervènia *net* i *bs* i ajuda a l'activació del receptor de la via de l'*Egfr* per *Vn*. *Dpp* comença a activar-se a les venes a partir de l'estadi de pupa. A les intervènies són *Bs* i *Net* qui inhibeixen *Rho* permetent la diferenciació de les mateixes. En gris es mostren els gens que estarien inactius en cada territori i en vermell o verd alguns dels gens més importants per la correcta formació del patró de venes i intervènies.

completament la transcripció de *net*, mentre que *net* s'estén pels primordis de vena quan falta l'activitat de *rho* (i viceversa). Net i Bs inhibeixen el senyal de DER a les regions d'intervena prevenint el desenvolupament de venes en aquestes regions (Fig.112), però, mentre que *net* i *rho* són mútuament excloents ja en estadi de larva III, *bs* i *rho* només ho són en estadis de pupa (Fristrom et al., 1994; Roch et al., 1998). Un altre gen promotor d'intervenues és *plexus* (*px*), que codifica per una proteïna de matriu nuclear que s'encarrega de reprimir el desenvolupament de les venes a l'ala reprimint *rho* i activant *bs*. *px* també seria un regulador del gen de posicionament de vena L2, *kni* (Matakatsu et al., 1999).

Després d'haver fet una revisió de *Drosophila*, del desenvolupament de l'ala i de la formació del patró de venes i intervenues, a continuació es detallen els fenotips dels al·lels mutants per *ash2* amb els que s'ha treballat en aquesta Tesi.

3.3 - Caracterització dels mutants d'*ash2*

La línia *l(3)112411* va sorgir d'una col·lecció de mutants generats per la inserció d'un element *P-lacW* en el cromosoma tres de *Drosophila* (Deak et al., 1997). La posterior caracterització d'aquesta línia va demostrar que l'element *P-lacW* està inserat en el quart intró del gen *ash2* (Amoros et al., 2002; Beltran et al., 2003).

La mutació en homozigosi de la línia *l(3)112411*, actualment anomenada *ash2*¹¹²⁴¹¹, provoca la mort en estadi de farat, tot i que aproximadament un 12% dels individus arriba a adult. Aquestes mosques només poden viure uns dies, són estèrils i, tal i com és d'esperar per una mutació en un gen *trxG*, presenten fenotips associats a transformacions homeòtiques. S'ha descrit la transformació del primer al segon parell de potes degut a una reducció de les pintes tarsals, una transformació parcial d'halterí a ala (tot i que en un percentatge molt baix) i una interacció entre el gen *ash2* i *Antennapedia*, a l'observar un increment del fenotip homeòtic produït pel guany de funció del mutant *Antp*^{NS} (Amoros, 2001). A part, s'ha observat anomalies en el patró de diferenciació dels apèndixs, com la reducció o pèrdua total de les macroquetes del *scutellum*. El fenotip més evident és l'aparició de venes transversals extres a l'ala, amb una penetrància del 95%, i preferentment associades a les zones proximals de la intervena entre les venes L2 i L3 i les venes L4 i L5. A més, la mida de les ales és reduïda, i pot presentar mossegades o "Notches" al llarg del marge posterior, lleuger engruiximent de les venes L3 i L5 i distorsió de la part distal de la vena L2.

Un segon al·lel del gen *ash2*, més fort que l'anterior, prové de l'escissió imprecisa de l'element transponible *P-lacW* i es va anomenar *ash2*^{1'}. Individus homozigots per la mutació moren en estadi de larva III tardana/pupa primerenca. Aquests mutants, a l'estadi de larva presenten discs imaginals anòmals de mida molt reduïda (Amoros et al., 2002).

La única modificació observada a l'al·lel *ash2*¹ és una deleció de 2bp i una inserció de 5bp en el quart intró del gen *ash2* que crearia un lloc d'*splicing* alternatiu (Amoros et al., 2002). Anàlisis de *Northern Blot* a partir d'extractes d'ARN de larves III demostren que larves mutants *ash2*¹, en lloc de tenir els dos transcrits d'*ash2* (2.0 i 1.4kb) presents a les larves salvatges, només presenten el transcrit de mida petita (Beltran et al., 2003). A més, per comprovar que aquest mutant es comporta com un mutant del *trxG* es van generar clons de cèl·lules homozigòtiques per l'al·lel *ash2*¹ en discs imaginals de pota i halteri i es va veure que els nivells de la proteïna Ubx estaven disminuïts, confirmant un comportament similar als gens *trxG* pel que fa a les funcions homeòtiques (Beltran et al., 2003).

Com era d'esperar, el mutant *ash2*¹ no complementa la mutació *ash2*¹¹²⁴¹¹. Tot i que un percentatge molt baix d'individus pot arribar a l'estadi d'adult (aquests també presenten venes transversals extres), la majoria es moren en estadi de pupa. Per estudiar si el gen *ash2* tenia un paper en la formació de les venes longitudinals i intervenes es van generar clons de cèl·lules mutants *ash2*¹ mitjançant recombinació mitòtica en fons *Minute* i es van observar els fenotips a l'ala adulta de *Drosophila*. Aquestes ales presenten bombolles o "blisters" i una reducció del compartiment on es localitza el clon, fet que suggereix un paper d'*ash2* en l'adhesivitat entre les cèl·lules de la superfície dorsal i ventral i en la proliferació cel·lular. A més, aquests clons resulten en un engruïment del teixit de vena i una reducció de les zones d'intervena, excepte per la vena L4 i la regió d'intervena entre les venes L3 i L4, on no es formen *blisters* (Amoros et al., 2002). Aquests fenotips relacionen *ash2* amb la formació dels teixits de vena i intervena, i per això, entendre com *ash2* s'encarrega de regular la correcta formació d'aquest patró és un dels objectius d'aquesta Tesi.

Un altre de les aproximacions per intentar identificar quins són els gens diana del gen *ash2* va ser utilitzar la tècnica dels microarrays i comparar la transcripció de larves salvatges en estadi III amb larves mutants *ash2*¹ del mateix estadi. D'un total de 5.139 gens, 235 estaven regulats per *ash2*, dels quals 140 estaven regulats positivament i 95 negativament. La classificació funcional mitjançant les anotacions del Gene Ontology (GO) indiquen que molts d'aquests gens regulats per *ash2* pertanyen a classes de cicle cel·lular, proliferació i adhesió cel·lular entre d'altres (Beltran et al., 2003).

3.4 - Funció dels altres gens *trxG* a l'ala

Donat que la majoria de mutants *trx* es moren a l'estadi d'embrió, es va fer ús de la tècnica d'anàlisi clonal per raigs X per poder estudiar els fenotips de diferents al·lells del gen *trx*. Clons mutants a l'halteri provoquen la transformació de la zona on es localitza el clon en teixit d'ala. Les ales dels animals irradiats indiquen que la pèrdua de la funció *trx* no afectaria la viabilitat o la taxa de divisió de les cèl·lules del disc, tot i que els clons presenten una morfologia anòmala, sobretot si

es troben en el compartiment posterior (Ingham, 1981; Ingham, 1985). El fenotip observat d'aquests clons a posterior va ser l'aparició de quetes diferenciades semblants a les del marge anterior de l'ala, mentre que clons anteriors presenten lleugeres alteracions en la distribució i mida de les quetes del marge. Ja que els clons posteriors provoquen l'aparició d'estructures anteriors, es va suggerir que *trx* estava implicat en el manteniment de la identitat posterior per mitjà de la regulació d'*en*. Posteriorment, es va demostrar per interaccions gèniques que els fenotips d'*en* es veien incrementats per mutants *trx* i que la proteïna Trx s'uneix a la regió dels cromosomes politènics que conté *en* (Breen et al., 1995). A més, la manca de *trx* produeix una disrupció de les venes com la formació anòmala de la vena L2.

D'altra banda, el complex Brm ha estat més íntimament relacionat amb el desenvolupament de l'ala. Es coneix que *osa* o *eyelid* actua a l'ala antagonitzant la funció de *wingless* (*wg*). Un dels efectes dels clons de cèl·lules mutants per *osa* induïts aviat en el desenvolupament és la transformació del notum posterior en una ala parcial (de manera similar als efectes produïts per la sobreexpressió de *wg* al notum). Els clons mutants induïts més tardanament provoquen l'aparició no autònoma de quetes del marge anterior, sempre i quan es localitzin a la superfície dorsal del compartiment anterior. El nombre de cèl·lules de clons mutants per *osa* és molt baix comparat amb el nombre de clons salvatges totals observats, indicant que *osa* es requereix per la viabilitat de les cèl·lules (Treisman et al., 1997). Posteriorment es va demostrar que la pèrdua de funció d'*osa* indueix l'expressió ectòpica dels gens diana de *Wg* i que la sobreexpressió d'*osa* pot reprimir l'expressió endògena d'aquests gens (Collins and Treisman, 2000). A més, es va observar que la pèrdua de funció d'altres membres del complex Brm també provocaven els mateixos efectes. Per exemple, en clons mutants per Brm o Mor el gen *nub* de la via de *Wg* es troba ectòpicament expressat. Per tant, es va suggerir que la repressió dels gens diana de *Wg* requereix l'activitat remodeladora de la cromatina del complex Brm.

Mitjançant anàlisi clonal, es va trobar que la pèrdua completa de funció de Brm disminueix dramàticament la viabilitat cel·lular i provoca defectes en el sistema nerviós perifèric de l'adult però no revela cap efecte significatiu en el patró de l'ala. Estudis amb l'expressió d'una forma dominant-negativa de Brm i de Snr1 mostren la pèrdua de l'estructura distal de la vena L5 (Collins et al., 1999; Elfring et al., 1998) i l'aparició de venes extres (Marenda et al., 2003) respectivament, indicant que membres d'un mateix complex poden tenir efectes diferents, promovent o reprimint el desenvolupament de les venes. L'examen del gen d'intervenues *bs* indica que la funció de Brm es requereix per la repressió de *bs* durant el desenvolupament de larva en la provena L5, mentre que Snr1 es requereix pel manteniment de *bs* en les cèl·lules d'intervenues durant els primers estadis de pupa. A més, Snr1 i Net interaccionen físicament per reprimir l'expressió en estadis de pupa de *rho* a través del bloqueig de l'activitat de Brm en determinades cèl·lules. Aquest bloqueig també depèn de l'acció d'histones

desacetilases com Rpd3. El conjunt d'aquests resultats suggereix un mecanisme per la repressió donada pel complex Brm que depèn de la funció de la subunitat Snr1 per bloquejar o canviar les funcions transcripcionals activadores del complex en determinats gens d'un conjunt de cèl·lules (Marenda et al., 2003).

Un altre membre del complex Brm, Mor, també està implicat en la formació de l'ala ja que es requereix per la transcripció d'*en* (Brizuela and Kennison, 1997). En aquest treball, es va estudiar la pèrdua de funció de *mor* en un fons *Minute* per poder obtenir clons més grans (*mor* pot ser letal cel·lular) i es va observar que clons *mor* a posterior provoquen una distorsió de la forma de l'ala i del patró de venes i l'aparició de quetes semblants a les del marge anterior, tal i com s'havia observat per clons mutants *trx*.

Gairebé no es té informació d'*ash1* pel que fa referència al seu paper a l'ala. Els únics estudis realitzats per anàlisi clonal es basen en l'observació de les transformacions homeòtiques que provoca la pèrdua de funció d'aquest gen (Shearn et al., 1987). En el cas d'*ash2*, els treballs realitzats anteriorment ens van fer pensar que, a part de regular els gens homeòtics, podria tenir un paper en el desenvolupament de l'ala. Per això, aquesta Tesi es basa en entendre la funció d'ASH2 en el manteniment de decisions més tardanes com la de formar una vena o una intervena (article 1) i en caracteritzar interaccions d'ASH2 amb altres proteïnes (article 2).

OBJECTIUS

Aquesta Tesi té com objectiu principal entendre la funció d'ASH2 utilitzant *Drosophila* com a sistema model:

OBJECTIU 1: Funció d'ASH2 en el desenvolupament de l'ala de *Drosophila*

1.1 - Estudiar la funció d'*ash2* en la formació del patró del disc imaginal d'ala i la decisió vena-intervena:

- Realitzar interaccions gèniques amb gens promotors de la formació de vena i intervena.
- Analitzar l'expressió de gens involucrats en aquests processos en discs imaginals i clons de cèl·lules mutants per *ash2*.
- Estudiar si *ash2* regula els gens de posicionament de venes.

1.2 - Analitzar si altres gens de la família *trxG* poden tenir la mateixa funció que *ash2* en el manteniment de les identitats cel·lulars a l'ala.

OBJECTIU 2: Aproximació al complex ASH2 de *Drosophila*

2.1 - Identificar interaccions proteiques d'ASH2 a *Drosophila*.

