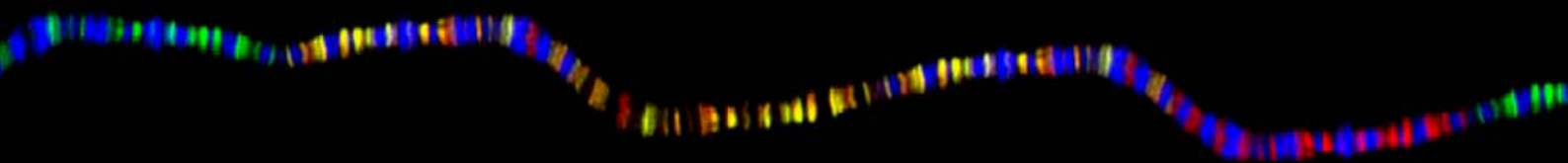


A grayscale micrograph showing a dense field of fine, hair-like structures (trichomes) on a light-colored surface, likely a Drosophila wing. The hairs are oriented in various directions, creating a complex, textured pattern.

***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

DISCUSSION

Els trxG i PcG són reguladors transcripcionals implicats en el manteniment d'estats activats i reprimits, respectivament. Aquestes proteïnes regulen la cromatina per bloquejar l'expressió dels gens, creant configuracions estables que revelin estats d'activació o silenciament. La majoria dels estudis s'han realitzat per entendre com els PcG i trxG actuen en estadis primerencs del desenvolupament per consolidar les decisions cel·lulars establertes pels gens Hox, però hi ha relativament poques anàlisis sobre com actuen els trxG per estabilitzar decisions més tardanes. Tot i que *ash2* es considera un regulador de la cromatina de la família trxG poc se sap de la seva funció biològica i molecular. L'anàlisi genètica dels al·lels d'*ash2* revelen que aquest gen no només s'encarrega de la regulació dels gens homeòtics sinó que la seva activitat és necessària per mantenir el destí diferenciat d'intervena versus vena a l'ala de *Drosophila*.

Ja fa més de 30 anys que s'estudia el patró de venació, i concretament, els estudis realitzats per Antonio García-Bellido i col·laboradors mitjançant interaccions genètiques sorprenen per la seva acurada aproximació al funcionament de les regulacions gèniques que tenen lloc en la formació de les venes i intervenes (Diaz-Benjumea and Garcia-Bellido, 1990; Garcia-Bellido and de Celis, 1992). Aquestes interaccions són altament informatives per decidir si dos gens estan funcionalment relacionats o no, examinant si es produeix un increment o un rescat del fenotip provocat per un dels gens. En el nostre cas, amb les interaccions realitzades amb mutants de *bs*, de *net* i dobles mutants *rho vn* ja es pot inferir que *ash2* té un paper essencial en el manteniment de l'estat d'intervena. La tècnica d'anàlisi clonal en disc imaginal és també de gran valor per determinar si un gen està regulant o no l'expressió d'un altre, i alhora ens ha servit per reforçar els resultats observats a les interaccions. Malgrat la seva capacitat informativa, aquests tipus d'anàlisis queden limitats a gens candidats que han estat prèviament descrits i no serveixen per entendre els mecanismes moleculars d'*ash2*. Per això, l'ús de la tècnica de microarrays amb mutants d'*ash2* ens ha permès delimitar la funció reguladora d'aquest gen i determinar mitjançant una classificació dels resultats quines són les classes funcionals més representatives regulades per *ash2*. A més, l'anàlisi comparativa amb altres microarrays, juntament amb posteriors assaigs de coimmunoprecipitació, ens han permès identificar algunes de les proteïnes amb que pot interaccionar ASH2 per dur a terme la regulació. El defecte principal d'aquestes tècniques és que cap d'elles et permet identificar els gens diana directament regulats per ASH2 però tot i així, la combinació d'aquests estudis aporta nous coneixements sobre les interaccions gèniques i proteïques d'aquest gen.

En resum, els estudis realitzats en aquesta Tesi evidencien que *ash2* té un paper crucial en el desenvolupament de l'ala de *Drosophila* com a regulador dels

gens de vena i intervena, actuant principalment en el manteniment de la identitat d'intervena i en la repressió del gen *kni*, organitzador de vena L2. D'altra banda, es demostra que el regulador de la proliferació HCF interacciona amb ASH2 i Sin3A i que totes tres proteïnes colocalitzen en molts loci dels cromosomes politènics, suggerint que poden ser subunitats d'un complex multimèric similar al prèviament trobat en humans (Wysocka et al., 2003).

Bloc1

Els mutants d'*ash2*

El gen *ash2* es considera un membre del *trxG* perquè compleix tots els requisits que caracteritzen aquest grup (veure introducció; apartat 2.1). Mutacions en *ash2* provoquen transformacions homeòtiques similars a la pèrdua de funció dels gens homeòtics selectors, suprimeixen el fenotip de pintes tarsals extres causat per mutacions de *Pc* i incrementen el fenotip causat per altres mutants *trxG* (Adamson and Shearn, 1996; Shearn, 1989; Shearn et al., 1987). Però a més, a diferència dels altres *trxG*, mutacions en *ash2* provoquen anomalies específiques en la formació del patró i la diferenciació cel·lular a l'ala.

1.1 - Característiques genètiques dels mutants d'*ash2*

Els mutants utilitzats en aquesta Tesi són *ash2*¹¹²⁴¹¹ i *ash2*¹. El primer al·lel es considera més feble que el segon ja que, tot i que la majoria d'individus moren en estadi de farat hi ha aproximadament un 12% que arriba fins adult, mentre que l'al·lel *ash2*¹ provoca letalitat en estadi de larva tardana/pupa primerenca (Amoros et al., 2002; Beltran et al., 2003). Els individus *ash2*¹¹²⁴¹¹ homozigots presenten un fenotip de venes transversals extres, lleuger engruiximent de venes L3 i L5, *Notches* en el marge posterior, disrupció distal de la vena L2 i reducció de la mida de l'ala. De la mateixa manera, però de forma més severa, clons mutants per *ash2*¹ a l'ala adulta mostren un augment del teixit de vena i una reducció del teixit d'intervena. Els fenotips observats en adults homozigots *ash2*¹¹²⁴¹¹ són d'individus que aconsegueixen superar la fase de letalitat a farat, per tant pot ser que mostrin les conseqüències d'una baixa expressivitat de l'al·lel. En canvi els fenotips que mostren els clons mutants per *ash2*¹ poden ser reflex de les conseqüències de la pèrdua de funció d'*ash2*.

Els discs imaginals dels mutants d'*ash2*, sobretot en el cas d'*ash2*¹, presenten una mida reduïda i una forma anòmala, suggerint que la pèrdua d'*ash2* afecta la proliferació i la formació del patró. La disminució de la mida del disc es pot explicar per una disminució de la proliferació, un augment de l'apoptosi o per una combinació dels dos processos. Un dels gens implicats en la formació de l'ala és *vg*, el qual juntament amb *sd*, actua com a promotor de la proliferació (Halder et al., 1998; Paumard-Rigal et al., 1998). Malgrat estudis inicials semblaven indicar que l'expressió de *Vg* no estava massa alterada en un fons mutant per *ash2* (article 1), estudis posteriors van demostrar que la proteïna es troba disminuïda en mutants d'*ash2* i per tant podria explicar parcialment els defectes en la proliferació dels discs mutants. D'altra banda, els experiments de TUNEL i la detecció de la Caspasa3 en els discs d'ala d'individus *ash2*¹¹²⁴¹¹ no indiquen un

augment remarcable de l'apoptosi, suggerint que la lleugera disminució de la mida dels discs podria ser deguda simplement a defectes en la proliferació. Per contra, els discs imaginals mutants *ash2¹* sí que presenten un elevat grau de mort cel·lular, indicant que ASH2 també és necessari per la supervivència de les cèl·lules. La mort cel·lular es troba localitzada principalment en el domini d'ala (*wing pouch*) recordant en alguns casos al patró d'expressió de gens d'intervena. Reforçant el fet que ASH2 regula positivament la proliferació i inhibeix l'apoptosi, s'ha trobat una disminució del regulador del cicle cel·lular Cyclin A (CycA) (Beltran et al., 2003) en clons mutants per *ash2¹* i una elevada sobreexpressió del gen pro-apoptòtic *reaper (rpr)* en discs *ash2¹* per microarrays.

Hi ha dues evidències que demostren que els fenotips observats són deguts a la manca d'*ash2*:

1.- L'escissió de l'element transponible insertat en el quart intró d'*ash2* reverteix els fenotips mutants (Amoros et al., 2002).

2.- La sobreexpressió d'*ash2* mitjançant una línia transgènica rescata els fenotips d'ala. El *driver nub-gal4* condueix la sobreexpressió d'*ash2* per tot el domini d'ala fent que l'ala adulta tingui un fenotip salvatge, rescatant la mida, l'aparició de venes transversals extres i la ventralització de la triple filera. Amb el *driver MS1096-gal4*, que condueix la sobreexpressió d'*ash2* més fortament a la regió dorsal de l'ala, s'observa tant el rescat dels fenotips mutants d'ala com el rescat de la pèrdua de quetes del *scutellum*. A més, la sobreexpressió d'*ash2* mitjançant *drivers* ubicuos rescata parcialment la letalitat d'*ash2¹*, augmentant el percentatge d'individus que arriben a l'estadi de pupa primerenca i rescatant la mida dels disc d'aquests mutants. El fet que el rescat de letalitat sigui tan lleuger pot ser degut a que els *drivers* utilitzats (*scabrous-gal4* i *daughterless-gal4*), tot i ser ubicuos, només provoquin uns nivells baixos d'expressió d'*ash2*, insuficients per rescatar fins estadis més avançats.

1.2 - Característiques moleculars dels mutants d'*ash2*

Mitjançant estudis per Northern Blot es va demostrar que les larves salvatges presenten dos transcrits d'*ash2*, un de 2.0kb i un de 1.4kb (Beltran et al., 2003). Larves homozigotes *ash2¹¹²⁴¹¹* tenen els dos transcrit però el de 2.0kb es troba a nivells més baixos, indicant que l'element transponible provoca una disminució de la transcripció del transcrit llarg (Beltran et al., 2003). L'escissió d'aquest element va donar lloc a la mutació *ash2¹*, la qual provoca la pèrdua completa del transcrit de 2.0kb. Les úniques anomalies moleculars detectades en aquest mutant van ser una deleció de 2bp i una inserció de 5bp. Aquesta última crea un lloc putatiu de *splicing* alternatiu que si fos utilitzat donaria lloc a un transcrit amb un codó prematur d'aturada de la traducció (Beltran et al., 2003). L'absència del transcrit de 2.0kb podria ser deguda a un mecanisme semblant al *nonsense mediated*

decay (Hentze and Kulozik, 1999) que s'encarrega d'eliminar transcrits que codifiquen per proteïnes sense sentit.

Els pesos moleculars predits per les proteïnes codificades pels transcrits de 2.0kb i 1.4kb són de ~63kDa i ~40kDa, respectivament. Treballs realitzats per Western Blot amb el mateix anticòs contra ASH2 van detectar diferents pesos moleculars, ja que al principi es descrivia una proteïna de 70kDa en estadis de larva i una de 53kDa en estadis de pupa (Adamson and Shearn, 1996), i posteriorment es va detectar una proteïna de 48kDa en tots els estadis del desenvolupament a banda d'una de 94kDa en embrions i una de 65kDa en els altres estadis (Cheng and Shearn, 2004). En aquesta Tesi, per aclarir quins són realment els pesos moleculars de les proteïnes d'ASH2 hem fet ús d'unes construccions que porten clonades sota control del promotor de l'actina el transcrit llarg o el transcrit petit en pauta de lectura amb els marcadors V5-Hisx6. Aquestes construccions s'han transfectat en cèl·lules S2 de *Drosophila* per permetre les modificacions post-traduccionals que es farien *in vivo* en aquest organisme. La traducció d'aquestes proteïnes de fusió permet la detecció d'ASH2 mitjançant un anticòs contra l'epítip V5 i evidència que el transcrit llarg codifica per una proteïna de ~68kDa i el transcrit petit per una de ~44kDa. Si restem el pesos moleculars dels marcadors, que són en ambdós casos de ~4.5kDa, les bandes detectades s'ajusten perfectament als pesos calculats amb els programes de predicció. Per tant, podem concloure que el transcrit llarg codifica per una proteïna de ~63kDa i el petit per una de ~40kDa que en principi no es modificarien post-traduccionalmet.

La proteïna llarga consta de quatre dominis importants: PEST, PHD, NLS-BP i SPRY (de N'-t a C'-t) (Adamson and Shearn, 1996; Ponting et al., 1997). En canvi la proteïna curta, al sorgir del transcrit d'1.4kb, només tindria el NLS-BP i el domini SPRY. Per estudis d'immunolocalització en cèl·lules S2 de *Drosophila* transfectades amb les construccions anteriors hem demostrat que totes dues proteïnes es troben al nucli. El domini PHD present a la proteïna llarga d'ASH2 podria conferir-li en part la funció *trxG* ja que aquest domini s'ha trobat en altres membres dels *trxG* o *PcG* com *Trx*, *ASH1* i *PcL* (Aasland et al., 1995), es troba en els homòlegs d'ASH2 a llevats i a mamífers i és clau per portar a terme interaccions proteïna-proteïna. A més, recentment s'ha descobert que el domini PHD s'uneix a nucleosomes, suggerint que podria reconèixer les modificacions dipositades a les cues d'histones (Bienz, 2006; Ragvin et al., 2004). Donat que la mutació *ash2^{l1}* no presenta el transcrit de 2.0kb no tindria la proteïna llarga i per tant tampoc el domini PHD, comportant-se com un mutant dels *trxG*, tal i com demostra la disminució de l'expressió d'*Ubx* en clons mutants per *ash2^{l1}* (Beltran et al., 2003). D'altra banda, *ash2^{l1}* sí que conté el transcrit petit, el qual tot i codificar per una proteïna on manquen els dominis PEST i PHD, segueix mantenint la capacitat d'interaccionar amb altres proteïnes, com per exemple SKTL, possiblement a través del seu domini SPRY (Cheng and Shearn, 2004). El

conjunt de totes aquestes observacions suggereix que la proteïna llarga d'ASH2 pot portar a terme les funcions canòniques que realitza un membre del grup trxG. D'altra banda, que la proteïna curta es trobi localitzada al nucli i pugui interaccionar amb altres proteïnes, indica que podria funcionar en altres mecanismes de regulació gènica.

En aquesta Tesi s'ha produït un anticòs que detecta la proteïna llarga d'ASH2 però no la forma curta. Desafortunadament, l'anticòs purificat només detecta ASH2 per immunofluorescència quan la proteïna es troba a elevades concentracions. Per exemple, es detecta ASH2 a la part posterior de l'ala quan se sobreexpressa la proteïna mitjançant el *driver hh-gal4* confirmant que l'anticòs reconeix realment ASH2 i suggerint que a l'ala, aquesta proteïna s'expressa a nivells basals. A més, es detecta marcatge en el nucli de les glàndules salivals de larves salvatges però no en el nucli de glàndules de mutants *ash2^{l1}*, evidenciant definitivament que en aquest mutant manca la proteïna de 63kDa.

Bloc2

ash2 regula el patró de venes i intervenes

La funció d'ASH2 com a membre del grup *trxG* és mantenir l'activació d'estats transcripcionals però a més, certs fenotips en mutants d'*ash2* indiquen que podria jugar papers més específics. A part de regular el creixement i la mort cel·lular en el disc imaginal d'ala, *ash2* també és necessari per la correcta formació del patró de venes i intervenes.

2.1 - El gen *ash2* en la formació del patró de venes i intervenes

Clons homozigots mutants per *ash2*¹ presenten una reducció d'intervena i una aparició de teixit venós extra, preferentment pròxima a les zones de vena. Aquest fenotip és conseqüència de què les cèl·lules d'intervena perden la seva identitat i adquireixen les característiques morfològiques de les cèl·lules de vena, suggerint que *ash2* podria funcionar com un regulador negatiu de la diferenciació de venes en territoris d'intervena. Per testar aquesta hipòtesi es van fer interaccions gèniques amb al·lèls de pèrdua i guany de funció de la via de l'*Egfr*, que és una de les vies més importants en la formació de venes. Es va observar que mutacions en el gen *ash2* provoquen un rescat de la pèrdua de funció de la via de l'*Egfr* i un increment dels fenotips de guany de funció. Cal destacar que en totes aquestes interaccions el grau de rescat o d'increment és diferent degut a què l'al·lel *ash2*¹¹²⁴¹¹ presenta expressivitat variable. Una de les interaccions més informativa és la que es realitza amb els mutants *rho*^{ve}*vn*¹. Aquesta doble combinació de mutacions hipomorfes pertorba la via de l'*Egfr* de manera que les venes no es poden diferenciar (Diaz-Benjumea and Garcia-Bellido, 1990; Sturtevant et al., 1993). El fet que en individus triples mutants *rho*^{ve}*vn*¹*ash2*¹¹²⁴¹¹ es produeixi un rescat del fenotip suggereix que *ash2* es requereix per mantenir l'estat d'intervena, ja sigui reprimint la formació de les venes, activant els gens d'intervena o ambdós alhora. Interaccions semblants realitzades amb mutants de *rho vn* i el gen d'intervena *bs* també produeixen rescats dels fenotips similars però segons quin sigui l'al·lel de *bs* utilitzat les ales seran gairebé *wild-type* o bé totes les cèl·lules tindran aparença de vena (Montagne et al., 1996; Roch et al., 1998), indicant que *ash2*¹¹²⁴¹¹ funcionaria com un mutant lleu d'intervena. En posteriors experiments hem demostrat que l'expressió de *rho* en ales pupals de mutants homozigots *ash2*¹¹²⁴¹¹ s'estén en dominis més amples del normal i que l'expressió dels gens d'intervena *net* i *bs* està disminuïda. Com que l'expressió del gen *rho* és mútuament excloent i antagonica a la dels gens *bs* i *net* no podem determinar si *ash2* actua directament sobre *rho* produint una disminució de *net* i *bs* o si actua

sobre *net* i *bs* produint una disminució de *rho*. De totes maneres, el fet que *ASH2* reguli l'expressió de *bs* tant en estadis de larva com de pupa permet especular que *ash2* manté la identitat d'intervena preservant un estat transcripcionalment actiu del gen *bs* al llarg del desenvolupament, i que la pèrdua d'*ash2* provocaria una disminució dels gens d'intervena que comportaria un augment en l'expressió de *rho*.

Cal destacar que *bs* i *rho* comencen a ser interdependents a partir de l'estadi de pupa, mentre que *net* i *rho* ho són des de l'inici del desenvolupament de les venes (Brentrup et al., 2000; Roch et al., 1998). Per tant, *ash2* podria mantenir l'estat d'intervena en el disc imaginal mitjançant *net* i durant estadis de pupa mitjançant *net* i *bs*. D'altra banda *ash2* no regula l'expressió dels gens implicats en la formació d'intervena *px* (Matakatsu et al., 1999) i *E(spl)mβ* (de Celis et al., 1997), indicant que l'acció d'*ash2* és específica. La interacció entre *ash2*¹¹²⁴¹¹ i *px*⁷² revela un fenotip semblant al de la interacció dels mutants de *bs* i *ash2* però l'expressió de la proteïna Px no es veu alterada en clons *ash2*¹ suggerint que el fenotip observat a la interacció és indirecte. D'altra banda, *E(spl)mβ* és un gen de la via de Notch que codifica per una proteïna, que igual que *net*, també té domini bHLH i també actua reprimint l'expressió de *rho*. La pèrdua de funció de la via de Notch provoca un engruiximent de les venes, per tant mutacions en aquesta via podrien explicar el fenotip d'*ash2*. No es va observar cap tipus d'interacció entre *E(spl)mβ* i *ash2* però caldria estudiar altres elements com *N* o *DI* per saber si hi ha interacció o no amb la via de Notch. De fet els resultats dels microarrays en discs d'ala mutants per *ash2* indiquen que l'expressió del transcrit d'*E(spl)mβ* no està alterada tot i que *DI* i *N* sí que presenten una expressió lleugerament disminuïda. D'altra banda, podria ser que l'engruiximent de venes en clons *ash2*¹ fos també degut a la disminució de l'expressió de *bs*, ja que clons mutants per aquest gen també provoquen engruiximent de les venes (Fristrom et al., 1994; Roch et al., 1998).

Una de les característiques dels mutants d'*ash2* és que ni per clons ni per interaccions amb altres mutants d'intervena s'observen fenotips a la regió d'intervena C (entre L3-L4). Curiosament, aquesta observació no és típica dels mutants d'*ash2* sinó que també s'ha trobat en combinacions de mutants de la via de Dpp (de Celis et al., 1996). A més, l'absència de l'activitat de *net* al disc d'ala resulta en la desrepressió de *rho* per totes les regions d'intervena excepte la regió C, suggerint que la inhibició de *rho* en aquest domini no depèn només de *net* (Brentrup et al., 2000). La intervenció C és una regió sota control del gen *kn* com a resposta al morfògen Hh. Kn s'encarrega de suprimir l'expressió de la via de l'*Egfr* en aquesta zona i d'activar l'expressió de *bs*, de manera que les venes L3 i L4 s'especifiquen als marges del domini de Kn (Crozatier et al., 2002; Mohler et al., 2000; Vervoort et al., 1999). D'altra banda, l'expressió de *bs* al disc d'ala està controlada per dos *enhancers*. El *boundary enhancer* depèn de l'expressió de Hh i determina l'expressió de *bs* a la intervenció C a través de *kn* mentre que l'altre

enhancer sembla integrar senyals de la via de Dpp i es requereix per tal que *bs* s'expressi a les intervenes B i D (Nussbaumer et al., 2000). Els resultats obtinguts per anàlisi clonal mostren que la disminució de *bs* en clons mutants *ash2*¹ és molt més evident a les intervenes B i D que a la intervena C, suggerint que la regulació que *ash2* exerceix sobre *bs* podria donar-se a través de l'*enhancer* de Dpp. Per tant, si en mutants d'*ash2* es disminueix l'expressió de *net*, o de *bs* a través de l'*enhancer* de Dpp, l'augment en l'expressió de *rho* i la formació de teixit venós extra es veuria només a les intervenes B i D. Alternativament, la similitud entre les interaccions d'*ash2* amb *net* o *bs* i les combinacions mutants de Dpp, on també es poden perdre les intervenes B i D, suggereix que els efectes d'*ash2* podrien ser conseqüència de l'alteració dels gens diana de la via de Dpp, com *salm*. Tot i que l'expressió de *salm* està lleugerament disminuïda en clons mutants per *ash2*¹ la proteïna està present al centre del domini d'ala en individus mutants per *bs* o *net* i *ash2*¹¹²⁴¹¹, indicant que els fenotips observats no són conseqüència d'una disminució de l'expressió de *salm*.

L'anàlisi dels transcriptomes de discs imaginals d'ala dels al·lels *ash2*¹ i *ash2*¹¹²⁴¹¹, mitjançant microarrays d'expressió, revela que la majoria de gens involucrats en el desenvolupament de l'ala es troben alterats en aquests mutants (article 2). Tot i que els microarrays es realitzen amb oligonucleòtids de 70 bases i han de passar un filtratge de dades i una anàlisi estadística exhaustiva, alguns dels gens relacionats amb el patró de venes i intervenes superen aquestes barreres i la seva expressió es veu alterada, tal i com s'havia descrit prèviament mitjançant hibridació *in situ* i anàlisi clonal (article 1).

2.2 - El gen *ash2* regula l'expressió del gen organitzador de vena L2

La distorsió de la part distal de la vena L2 dels adults *ash2*¹¹²⁴¹¹, juntament amb l'engruïment de vena L2 present en clons mutants *ash2*¹ ens va portar a preguntar-nos si el gen organitzador d'aquesta vena està regulat per *ash2*. Efectivament, vam observar que *kni* queda desreprimat quan falta ASH2 i que per tant, ASH2 actua com un repressor d'aquest gen. Sembla ser però, que mentre l'expressió de *Kni* a la vena L2 és nuclear, l'augment d'expressió de *Kni* en els clons mutants *ash2*¹ és majoritàriament citoplasmàtica. Aquest fet podria significar que tot i que la proteïna augmenta, no és del tot funcional. *kni* actua per sota de *salm* i per sobre de gens de vena i intervena, activant l'expressió de *rho* i inhibint l'expressió de *bs* (Lunde et al., 1998). La sobreexpressió de *kni* resulta en una ala adulta amb tot el teixit semblant a vena degut a que l'expressió de *rho* s'ha estès, per tant, si la pèrdua d'*ash2* se sembla a la sobreexpressió de *kni* esperariem una ala semblant a la descrita. Donat que aquest no és el cas, es reforça la idea que l'augment de l'expressió de *Kni* en clons mutants per *ash2* pugui ser no funcional perquè no hi ha prou proteïna al nucli. Per tant, podria ser

que l'augment de teixit venós en mutants d'*ash2* no seria deguda a la desrepressió de *kni* sinó a la regulació exercida per ASH2 sobre els gens de vena i intervena .

Experiments per RT-PCR amb larves salvatges i *ash2^{l1}* van confirmar l'augment de *kni* en condicions mutants per *ash2*. A més, es van fer interaccions gèniques amb el mutant *radius incompletus (kni^{ri1})* i es va observar que es produeix un rescat de la pèrdua de vena L2 en interaccions de *kni^{ri1}* amb *ash2¹¹²⁴¹¹*. Aquest rescat del fenotip es pot explicar de dues maneres diferents: 1) per augment de l'expressió de Kni en fons mutant *ash2¹¹²⁴¹¹*, tot i que la proteïna no vagi totalment al nucli, o 2) per augment de l'expressió de *rho* en aquest mutant, ja que *rho* és capaç de rescatar la pèrdua de vena L2 quan es dirigeix la seva expressió mitjançant un *driver* de vena L2 (*L2-gal4*) (Lunde et al., 2003). A més, dobles mutants *kni^{ri1}* i *net* també rescaten parcialment la pèrdua d'aquesta vena (Diaz-Benjumea and Garcia-Bellido, 1990).

La desrepressió de *kni* quan *ash2* està mutat suggereix que *ash2* regula l'expressió de *kni*, però no resol si la regulació és directe o indirecte. El gen *kni* ha estat objecte de molts estudis i s'ha pogut identificar un *enhancer* de *kni* que dirigeix l'expressió del gen a vena L2. La seqüència mínima d'expressió d'aquest *enhancer* (EX-lacZ) presenta dos dominis diferenciats, un és activador i l'altre repressor de la transcripció de *kni*, amb llocs d'unió predits per Sd/Vg, En, Brk i Salr (Fig.D1) (Lunde et al., 2003). Quan només s'expressa el domini activador, sense la part repressora, l'expressió de *kni* s'estén ectòpicament en dominis amples tant a la part anterior com posterior (complementaris a l'expressió de *salm*). Per tant, podria ser que en els mutants d'*ash2* es donés una alteració de

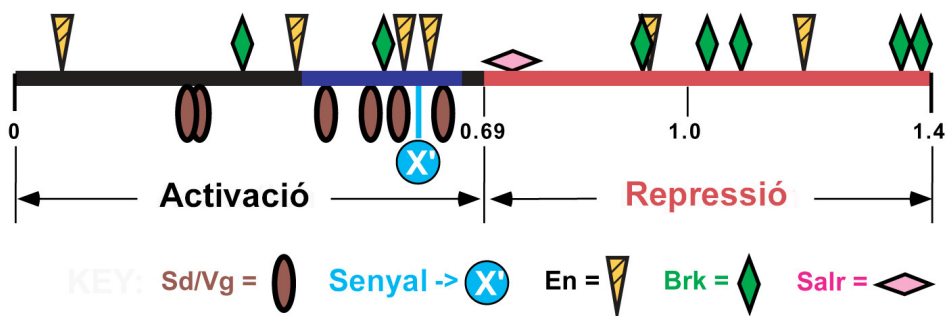


Fig. D1 - L'enhancer de *kni* de vena L2 es divideix en una subregió que promou l'activació (barra negra) i una subregió que reprimeix l'expressió a partir de l'enhancer (barra rosa). En el domini activador hi ha llocs d'unió pel complex Sd/Vg (ovals marrons) i per un factor desconegut X' (blau) que s'uniria, igual que d'altres proteïnes, a la regió que està delecionada en el mutant *Kni^{ri1}* (barra blau fosc) explicant la pèrdua de vena L2 en aquest mutant per manca de senyals activadors. En el domini repressor s'uneix la proteïna Brk (rombo verd), En (triangles grocs) i Salr (rombo rosa), tot i que es prediu l'existència de més llocs d'unió encara per identificar per proteïnes repressores com Salm. Figura adaptada de Lunde et al, 2003.

l'expressió dels gens que regulen el domini repressor de *kni* provocant la desinhibició d'aquest gen.

L'anàlisi clonal en mutants d'*ash2* de les proteïnes reguladores d'aquest *enhancer* indica que Sd i Brk no estan regulats per ASH2 mentre que Vg, En i Sal disminueixen lleugerament en clons mutants *ash2*¹. El complexe Sd/Vg seria un activador de l'expressió de *kni*, per tant la disminució de Vg no pot explicar l'augment de Kni fora del seu domini de vena L2. D'altra banda es va pensar que la disminució dels nivells de Salm observada en clons mutants per *ash2*¹ podria estar creant noves fronteres entre cèl·lules que expressen Salm a elevada concentració i cèl·lules que l'expressen a baixa concentració, promovent l'activació de Kni degut a l'aparició d'aquests nous marges. De totes maneres, Kni es troba augmentat per tot el disc d'ala i a més, hem demostrat mitjançant experiments d'expressió ectòpica de Salm i Salr per tot el domini d'ala que la inhibició de Kni exercida per *ash2* és independent d'aquests dos gens. Per últim, ja que l'expressió del propi *enhancer* monitoritzada a través de *lacZ* tampoc es troba alterada en clons *ash2*¹, l'única proteïna que queda per comentar és En, la qual es troba disminuïda en clons mutants per *ash2*. La disminució d'En podria explicar la manca de repressió de Kni en el compartiment posterior de l'ala però fa difícil d'entendre la desrepressió observada en el compartiment anterior, per això es proposa que *ash2* podria estar regulant *kni* directament o a través d'un altre *enhancer* més global diferent al de vena L2. Es pot considerar la possibilitat de què existeixi una molècula X produïda per les cèl·lules que expressen Sal-C, que seria necessària per induir l'expressió de *kni* en les cèl·lules anteriors que no expressen Sal-C. Si aquesta teoria, coneguda amb el nom de "Fort-Export-Only-Signaling" (Bier, 2000), és certa, ASH2 també podria estar alterant l'expressió d'aquesta molècula X reguladora.

S'ha descrit que els membres del grup trxG i PcG reconeixen els seus gens diana a través de seqüències PREs. El gen *kni* presenta aquestes seqüències (Ringrose et al., 2003). Donat que l'expressió de Kni està regulada pels PcG des de l'embrió (McKeon et al., 1994; Pelegri and Lehmann, 1994; Saget et al., 1998), es pot hipotetitzar que *ash2*, a través dels PREs, mantindria l'expressió de *kni* inhibida fora del seu domini natural mitjançant un mecanisme epigenètic de memòria cel·lular similar al dels gens homeòtics. A més, no és la primera vegada que a un gen del grup trxG se li atribueix una funció repressora, ja que per exemple, Osa i altres membres del complexe Brm es requereixen per mantenir reprimits els gens diana de la via de Wg (Collins and Treisman, 2000). La possibilitat d'una interacció directe és un aspecte a estudiar en un futur.

En conjunt, totes aquestes dades ens permeten proposar dos possibles models d'actuació d'ASH2 en la formació de les venes i intervenes (Fig.D2). El primer seria un model seqüencial, on ASH2 regula la formació de les venes a través de l'expressió de Kni (representat en rosa), mentre que el segon model

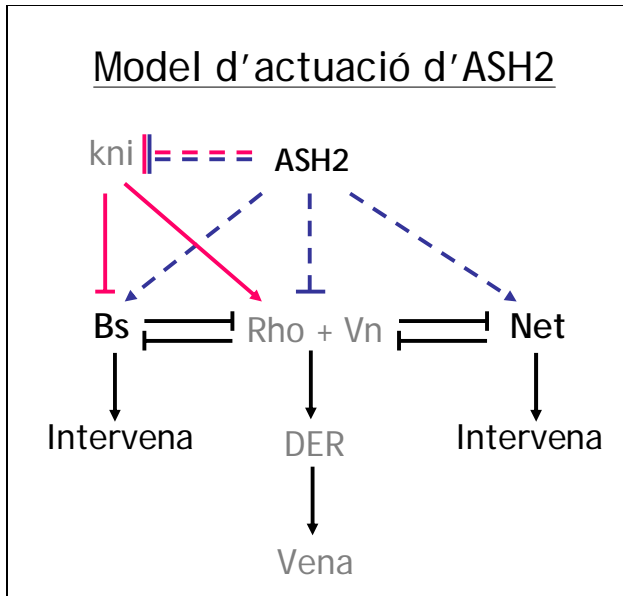


Fig. D2 - Model d'actuació on ASH2 manté *kni* reprimint i controla la formació de venes i intervenes. Podria ser que ASH2 regulés la formació de les venes i intervenes indirectament a través del gen *kni*, ja que *Kni* inhibeix *bs* i activa l'expressió de *rho* (color rosa), o bé, més probablement, podria ser que ASH2 tingui dos funcions independents (1) reprimir *Kni* fora del domini de vena L2 i (2) regular la formació del patró de venació a través de la regulació dels gens promotors de vena e intervena (color blau). Les bandes contínues indiquen el que ja està descrit a la literatura i les discontinues el que es proposa en aquesta Tesi.

proposa dos funcions independents per ASH2, regular *Kni*, i a banda, regular l'expressió dels gens promotors de vena i intervena (representat en blau).

La clau del problema és saber si ASH2 actua en un complex regulador de la cromatina que serviria per mantenir un determinat estat d'expressió gènica a llarg termini, com per exemple podria ser el cas de la regulació dels gens *bs* o *kni* en determinades zones de l'ala. Donat que l'expressió dels gens de vena i intervena no es pot preservar bloquejada durant el desenvolupament sinó que ha de ser una expressió modulable, podria ser que ASH2, més que "congelar" el manteniment d'una decisió jugui un paper en crear estats de configuració de la cromatina que facilitin una regulació adequada de l'expressió dels gens de vena i intervena. Si això fos així, els complexos *trxG* haurien de presentar una composició dinàmica o contenir proteïnes repressores formant part d'aquests complexos, permetent canviar entre estats reprimits i activats de manera ràpida segons les necessitats del desenvolupament.

2.3 - Els *trxG* a l'ala de *Drosophila*

En un intent per esbrinar si *ash2* tindria una funció específica a l'ala o bé una funció semblant a la dels altres *trxG*, es va fer anàlisi clonal en adult mitjançant raigs X per mutants *trx* i *ash1*. A la literatura hi ha força informació sobre els fenotips de mutants *trx* a l'ala, però per *ash1* només s'ha comentat les transformacions homeòtiques que provoca la seva manca de funció (Shearn et al., 1987). En tot cas vam fer un cribratge per comprovar que les mutacions escollides

es comportaven de manera similar al que s'ha descrit prèviament (Ingham, 1981; Ingham, 1985). Efectivament, la mutació *trx^{E2}* provoca una anteriorització del compartiment posterior deguda a l'aparició de quetes del marge anterior a la part posterior i una disrupció del teixit venós (en els nostres resultats l'anomalia majoritària és la pèrdua de la vena L5).

En quant a *ash1* es va observar que es produeix una reducció del compartiment on es localitza el clon mutant, que en casos molt elevats la pèrdua d'*ash1* provoca l'aparició de pigmentació extra indicant que les cèl·lules no s'han diferenciat correctament i que la localització de clons a la part anterior provoca una alteració en la formació de la triple filera disminuint el nombre de quetes del marge. A més, el fet que el nombre de cèl·lules del clon mutant sigui inferior al nombre de cèl·lules del clon control indica defectes en la supervivència de les cèl·lules mutants.

Tot i que els transcriptomes d'*ash2* i *ash1* indiquen que aquests dos gens estan funcionalment relacionats, segons les anotacions del GO, mentre que els dos al·lels d'*ash2* es comporten pràcticament de manera idèntica, *ash1* presenta algunes diferències. Per exemple, a diferència d'*ash2*, en els microarrays d'*ash1* l'expressió de la majoria dels gens de formació de venes no es veu afectada, reforçant el fet que el paper d'*ash2* en la formació del patró de venació és més important que el paper dels altres *trxG*.

Les mutacions en clons mutants *trx^{E2}* en adult tampoc se semblen a les d'*ash2* però per anàlisi clonal en disc imaginal s'ha comprovat que regulen en comú alguns gens necessaris pel correcte desenvolupament de l'ala, com és el cas d'*en* i *nub*, suggerint que els fenotips anòmals del patró de l'ala depenen de la regulació de més d'un gen. A més, els al·lels escollits per fer els estudis són molt importants ja que l'expressivitat dels efectes és al·lel dependent. Per exemple, en els mutants utilitzats en les primeres publicacions d'*ash2* (LaJeunesse and Shearn, 1995) no es va trobar alteració en l'expressió del gen *en*, però en canvi, sí que s'observa una disminució de l'expressió d'*En* en clons mutants *ash2¹*.

D'altra banda la comparació dels fenotips provocat per interaccions gèniques d'*ash2* i de *brm* amb mutants de vena i intervena (Marenda et al., 2003) també reforcen que la funció d'*ash2* a l'ala és més important, ja que els efectes de *brm* i de la subunitat del complex *snr1* són molt més febles i es troben localitzats preferentment només a la vena L5.

Bloc3

Aproximació al complexe proteic d'ASH2

La memòria cel·lular s'encarrega de mantenir les identitats adquirides per una expressió gènica diferencial durant el desenvolupament. Tenint en compte la necessitat de canviar els patrons d'expressió dels gens de manera natural durant el procés de diferenciació, la memòria cel·lular ha de ser un mecanisme robust, però alhora flexible. Donat que els PcG i els trxG són responsables de recordar quins són els gens que s'han de mantenir activats o silenciats després de cada divisió cel·lular, cal conèixer amb tot tipus de detall el funcionament d'aquestes proteïnes. Els PcG han estat objecte de més estudis que els trxG però, com l'objectiu final d'aquests dos grups és mantenir la memòria cel·lular, encara que en termes generals en direcció oposada, algunes de les característiques dels PcG han estat extensibles als trxG. Per entendre el seu funcionament és necessari conèixer amb més profunditat quins són els mecanismes d'acció, com detecten els seus gens diana i quina és la composició dels complexos en els quals es troben. Per aquest motiu un dels objectius d'aquesta Tesi va ser augmentar el coneixement sobre les interaccions proteiques d'ASH2 a *Drosophila*.

3.1 - Interaccions proteiques d'ASH2

Els complexos on s'ha trobat ASH2 estan molt conservats entre llevats i mamífers, per tant, una de les maneres d'identificar proteïnes candidates a interaccionar amb ASH2 a *Drosophila* és fixar-se amb les proteïnes associades a ASH2 en els altres organismes.

Una de les possibles candidates és la proteïna Sin3A, ja que hi ha dues evidències clares que indiquen que ASH2 pot interaccionar a *Drosophila* amb aquesta proteïna:

- 1) L'anàlisi comparativa dels arrays realitzats amb mutants d'*ash2* i *ash1* amb els arrays de *sin3A* (Pile et al., 2003) indica, tot i les diferències de metodologia utilitzades entre els dos experiments, que *ash2* però no *ash1*, comparteix amb Sin3A molts dels gens desregulats (article 2).
- 2) Una de les variants del complexe Set1 d'humans inclou ASH2 i Sin3A associades mitjançant HCF a un supercomplexe que integra activitats oposades (Wysocka et al., 2003), ja que ASH2 sempre s'ha trobat formant part de complexos activadors que metilen la H3K4, i Sin3A associat amb proteïnes repressores com la histona desacetilasa Rpd3.

Tenint en compte aquestes observacions vàrem voler esbrinar si a *Drosophila* podria existir un complexe homòleg al Set1/ASH2 d'humans que inclogui les proteïnes Sin3A i HCF. Mitjançant l'ús de construccions que produeixen proteïnes de fusió amb un epítip a C'-t, es va determinar que Sin3A-HA, HCF-Flag i ASH2-V5 es localitzen al nucli. Aquest fet, que és d'esperar per proteïnes reguladores de la transcripció, demostra que els epítips enganxats a les proteïnes no varien la localització cel·lular d'aquestes. Es van escollir les cèl·lules S2 per fer experiments de coimmunoprecipitació perquè són cèl·lules d'embrió de *Drosophila* de manera que les proteïnes se sintetitzen en un entorn cel·lular molt similar al que pot haver a l'organisme.

Els estudis de coimmunoprecipitació indiquen que HCF interacciona amb ASH2 i Sin3A. Cal destacar que segons el mètode de purificació utilitzat les proteïnes associades poden variar, és a dir, si dues proteïnes interaccionen fortament, podran resistir condicions més severes mentre que si dues proteïnes interaccionen de manera feble o indirectament només seran identificades si el tampó de lisi que es fa servir és suau. Aquest fet explica, per exemple, que la proteïna Rpd3 només s'hagi trobat associada al complexe PRC2 en determinades condicions (Kuzmichev et al., 2002). En el nostre cas, hem testat les coimmunoprecipitacions amb dos tampons de lisi diferents (mirar materials i mètodes de l'article 2). HCF i ASH2 sempre coimmunoprecipiten però HCF i Sin3A només coimmunoprecipiten amb un dels tampons de lisi, indicant que la interacció entre aquestes dues proteïnes no és tan estable. Reforçant aquest fet, hi ha dos articles en mamífers que troben que ASH2 i HCF interaccionen (Wysocka et al., 2003; Yokoyama et al., 2004) però només en un s'observa interacció entre Sin3 i HCF (Wysocka et al., 2003).

Cal recordar que HCF és una proteïna gran, de 1500aa, que es proteolitza donant lloc a dues subunitats, de ~120kDa (subunitat N'-t) i ~70kDa (subunitat C'-t), que es mantenen unides (Mahajan et al., 2003). Donat que nosaltres detectàvem HCF a través d'un FLAG que està a C'-t i que les condicions d'elució de les proteïnes es van fer en condicions desnaturalitzants, en el Western Blot només podíem detectar la subunitat de 70kDa. Com que en humans s'ha descrit que Sin3 i ASH2 interaccionen amb HCF a través de dominis de la subunitat N'-t, la immunoprecipitació d'HCF amb ASH2 i Sin3A reforça el fet que aquestes dues subunitats romanguin unides després de la proteòlisi d'HCF, o alternativament, que s'uneixin a través de la subunitat C'-t. Tot i que amb les nostres condicions de treball no hem estat capaços de determinar si ASH2 i Sin3A es troben en el mateix complexe, el fet que aquestes dues proteïnes sí que interaccionin en mamífers i que presentin un elevat grau de solapament en els cromosomes politènics de les glàndules salivals, fa proposar que també podrien estar interaccionant a *Drosophila*.

És sorprenent però no exclusiu que en un mateix complexe es puguin trobar reguladors positius i negatius de la remodelació de la cromatina, ja que

Sin3A s'ha trobat en el mateix complexe que els trxG Brm i ALL-1 (Nakamura et al., 2002). HCF és un regulador de la proliferació cel·lular que en humans interacciona amb activadors de la transcripció i que s'ha identificat recentment a *Drosophila* formant part d'un complexe acetilador de les histones H3 i H4 (Guelman et al., 2006). En el mateix sentit, tots els complexos on s'ha trobat ASH2 activen la transcripció per metilació de la H3K4. Així doncs, tant HCF com ASH2 estan relacionats amb l'activació de la transcripció mentre que Sin3A forma part de complexos desacetiladors de les histones repressors. Aquesta activitat antagònica en un mateix complexe es pot explicar per diferents hipòtesis:

- HCF s'encarrega de modular l'acció de les proteïnes amb les que interacciona permetent canviar de forma ràpida d'un estat gènic activat a un de silenciats.
- Els complexos que regulen la transcripció varien de forma dinàmica de composició segons el context cel·lular i les necessitats de la cèl·lula en resposta als estímuls.

A la introducció s'ha comentat que Sin3A s'uneix a moltes proteïnes amb funcions diferents, per tant Sin3A és un regulador flexible, generalment lligat amb la repressió, però que també podria estar implicat amb l'activació d'alguns gens. De la mateixa manera, el gen *ash2* podria en ocasions actuar com a repressor. Per exemple, s'ha descrit que *ash2* pot tenir una funció repressora mantenint el gen *kni* silenciats fora del seu domini d'expressió (article 1). Curiosament, la proteïna Kni s'ha trobat en embrions formant part d'un complexe de ~450kDa, associada a la HDAC Rpd3 a través de la proteïna repressora CtBP, i no es descarta que pugui trobar-se en el mateix complexe que Sin3A (Struffi and Arnosti, 2005). A més, el fet que en els arrays de falta de funció d'*ash2* i *sin3A* s'observi que els gens mitocondrials estan sobreexpressats, indica que ASH2 i Sin3A poden actuar en el mateix sentit repressor. D'altra banda, Sin3/Rpd3, en ocasions s'han vist implicats en l'activació d'alguns gens. Per exemple, en llevats es va demostrar que el complexe Sin3/Rpd3 es requereix per una màxima repressió d'aquells gens que no han estat induïts però per una activació dels gens induïts prèviament (Vidal and Gaber, 1991; Vidal et al., 1991) i a més s'ha trobat Rpd3 associat a promotors que dicten activitats transcripcionals elevades (Kurdistani et al., 2002) evidenciant que Sin3/Rpd3 no funciona exclusivament com a repressor de la transcripció.

3.2 - HCF, ASH2 i Sin3A colocalitzen en cromosomes politènics

Tant HCF, com Sin3A com ASH2 presenten un patró de bandes àmpliament distribuït pels cromosomes. El marcatge d'ASH2 va ser detectat a través de

l'epítot HA mitjançant la sobreexpressió amb el transgènic *UAS-ash2-HA* amb els *drivers sgs3-gal4* i *Act5C-gal4*, detectant el mateix patró de bandes indistintament del *driver* utilitzat.

Es va observar que totes tres proteïnes colocalitzen en molts loci dels cromosomes i que presenten un patró majoritàriament no solapant amb el marcatge de DAPI, reforçant els resultats obtinguts per mètodes bioquímics. Està descrit que el complex Sin3/Rpd3 s'uneix a les interbandes d'eucromatina menys condensades i hipoacetilades però que es troba absent de l'eucromatina condensada i hiperacetilada i de l'heterocromatina (Pile and Wassarman, 2000). En el cromosoma 4, que conté uns 40 gens i està format per β -heterocromatina, colocalitzen HCF i ASH2 però Sin3A no s'hi troba, i sembla que en el cromocentre només es detecta HCF. El fet que les tres proteïnes colocalitzin en molts loci suggereix que HCF, ASH2 i Sin3A podrien formar part d'un complex abundant a les cèl·lules de *Drosophila* mentre que les bandes de no colocalització podrien indicar l'existència d'aquestes proteïnes en complexos addicionals independents. El conjunt d'aquests resultats suggereix que ASH2 podria trobar-se a *Drosophila* en un complex semblant al Set1/ASH2 de llevats i humans que contindria subunitats modificadores de les histones. Nous experiments seran necessaris per demostrar possibles interaccions d'ASH2 amb proteïnes HMT.

3.2.1- ASH2 i HCF colocalitzen amb la trimetilació de la H3K4

Com que la marca més relacionada amb l'activació transcripcional és la trimetilació de la H3K4 (Santos-Rosa et al., 2002), i en llevats s'ha demostrat que Bre2 es requereix per timetilar però no per mono-, ni dimetilar la H3K4 (Schneider et al., 2005) es va analitzar si les bandes marcades amb ASH2, HCF i Sin3A també presenten un patró solapant amb la trimetilació de la H3K4. L'anàlisi del patró indica que en algunes bandes on s'ha trobat marcatge de les tres proteïnes també hi ha marcatge per la trimetilació de la H3K4. El fet que Sin3A/Rpd3 es trobi en llocs on podria haver activació transcripcional tornaria a suggerir que aquest complex no funciona exclusivament com a repressor. De totes maneres, la comparació de la trimetilació de la H3K4 entre cromosomes politènics de mutants d'*ash2* i de larves salvatges o la detecció d'aquesta modificació en nucleosomes d'aquests individus mitjançant Western Blot podria aportar llum a aquesta qüestió.

3.3 - Model de funcionament d'ASH2

Totes les evidències que es recullen en el segon article i la informació prèviament publicada permeten formular un model d'actuació de la proteïna ASH2. En el segon article s'ha demostrat que *ash2* i *ash1* estan funcionalment relacionats ja que la manca d'un o de l'altre provoca alteracions transcripcionals similars i per tant suggereix mecanismes d'acció semblants, tot i formar part de complexos

diferents (Papoulas et al., 1998). Malgrat això, existeixen certes diferències importants entre aquests dos gens. L'anàlisi clonal amb mutants d'*ash2* i *ash1* mostra que els fenotips que provoquen aquestes mutacions són diferents. La proteïna ASH1 té un domini SET amb capacitat HMT per metilar la H3K4, H3K9 i la H4K20 (Beisel et al., 2002) mentre que ASH2 no té capacitat de metilació per si mateixa sinó que forma part de complexos amb subunitats metiladores de la H3K4 homòlogues a Set1 de llevats (Goo et al., 2003; Hughes et al., 2004; Lee and Skalnik, 2005; Nagy et al., 2002; Roguev et al., 2003; Roguev et al., 2001; Sierra et al., 2006; Wysocka et al., 2003; Yokoyama et al., 2004). A més, ASH1 coimmunoprecipita i colocalitza en molts llocs dels cromosomes politènics amb Trx (Rozovskaia et al., 1999), i a l'igual que aquesta, pot també interaccionar amb la HAT CBP (Bantignies et al., 2000; Petruk et al., 2001). L'anàlisi de microarrays realitzats amb larves mutants d'*ash2* i *trx* (Beltran, 2006) indicaria que aquests dos gens no estarien actuant conjuntament en la regulació gènica, ja que els transcriptomes no correlacionen. Per tant, podria ser que en alguns casos ASH1 s'unís a Trx i en altres al putatiu complexe Set1/ASH2 de *Drosophila*.

A partir d'estudis de cromosomes politènics amb mutants d'*ash1* es va mostrar que mentre que ASH2 necessitaria la presència o funció d'ASH1 per unir-se als cromosomes, ASH1 no necessitaria ASH2 (Cheng and Shearn, 2004). De la mateixa manera, la unió de Trx és dependent d'ASH1 (Kuzin et al., 1994). En aquests cromosomes mutants, hi ha absència de metilació de la H3K4, suggerint que ASH1 es requereix per aquesta funció i per crear subseqüents metilacions, mentre que en cromosomes de mutants nuls d'*ash2* la metilació de la H3K4 està reduïda però mantenint una distribució correcta (Byrd and Shearn, 2003). Més estudis s'han fet en llevats, on s'ha vist que el complexe COMPASS té capacitat per mono-, di- i trimetilar la H3K4 però sembla que la subunitat Bre2 només es requereix per trimetilar i no per mono- ni dimetilar (Schneider et al., 2005). D'altra banda, a partir de cromosomes mutants per *ash2* i per *sktl*, s'infereix que aquestes proteïnes es requereixen per reprimir la hiperfosforilació de la H1 i per tant per reprimir la condensació de la cromatina (Cheng and Shearn, 2004), relacionant a ASH2 amb altres modificacions de les histones.

Totes aquestes evidències apunten a un model d'actuació seqüencial on primer ASH1 s'uniria a la cromatina per mono- i di-metilar les histones i posteriorment es reclutaria un complexe semblant al Set1/ASH2 de llevats per trimetilar la H3K4 (Fig.D3).

La unió d'ASH1 es portaria a terme a través d'ARNs no codificants que resulten de la transcripció dels TREs (Sanchez-Elsner et al., 2006) de gens prèviament activats, ja que ASH1 es requereix per mantenir l'activació però no per activar directament (Klymenko and Muller, 2004). La HAT CBP podria anar associada a ASH1 ja que interaccionen i sembla conferir part de la funció activadora als *trxG* per acetilació de les histones. Una altra proteïna que interacciona amb ASH1 i la CBP és Trx. Per tant aquestes proteïnes mono- i

MODEL D'ACTUACIÓ SEQÜENCIAL ASH1-ASH2

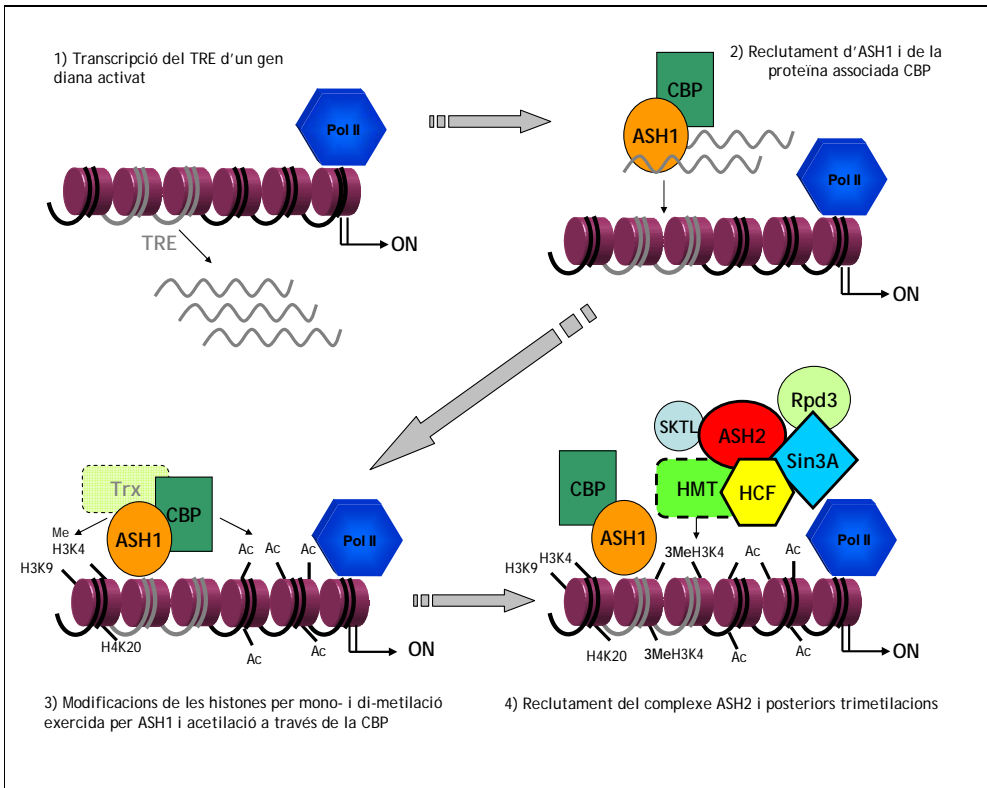


Fig. D3 - Model d'actuació seqüencial de les proteïnes ASH1 i ASH2 on ASH1 es recluta primer a través d'ARN no codificant dels TREs, juntament amb la HAT CBP per mono- i dimetil·lar la H3K4 (MeH3K4), la H3K9 i la H4K20 i acetilar (Ac). Posteriorment seria reclutat el putatiu complexe Set1/ASH2 de *Drosophila* per trimetil·lar la H3K4 (3MeH3K4) i mantenir l'activació transcripcional (veure text a continuació).

dimetil·larien la H3K4 dels nucleosomes i acetil·larien les histones reclutant posteriorment el complexe on es troba ASH2. Aquest complexe tal i com s'ha vist en aquesta Tesi, podria contenir HCF i Sin3A, i proteïnes associades a Sin3A com Rpd3 o associades a ASH2 com SKTL. A més, tot i que encara no se sap a *Drosophila* quina és la proteïna encarregada de trimetil·lar la H3K4, el complexe hauria de tenir una HMT per portar a terme aquesta funció. Trx podria ser un dels candidats a funcionar com HMT del complexe Set1/ASH2 de *Drosophila* perquè el seu domini SET té homologia amb la proteïna Set1 de llevats i li confereix activitat per metil·lar la H3K4, però no hi ha evidències de que ASH2 i Trx formin part del mateix complexe i a més, sembla que no estarien regulant els mateixos gens (Beltran, 2006). Un altre candidat proposats per ser l'homòleg de Set1 a *Drosophila* és el gen CG17396 (Roguev et al., 2001). Per tant, ASH1 podria

interaccionar amb Trx o alternativament reclutar ASH2 directament o que les modificacions que ha fet reclutin el putatiu complexe Set1/ASH2 de *Drosophila*, dependent dels gens diana i dels factors que dirigeixen les proteïnes a l'ADN. Finalment, no es pot descartar la formació d'un complexe extra ASH2, HCF i Sin3A independent del complexe ASH1.

En aquesta Tesi s'ha aportat coneixement sobre la funció d'*ash2* en el manteniment de la identitat d'intervena a l'ala i s'ha fet una aproximació al desconegut complexe ASH2 de *Drosophila*. En conjunt, tant alguns dels resultats presentats, com el model de funcionament d'ASH2, obren la porta a nous estudis per entendre la funció biològica i els mecanismes d'acció d'aquest *trxG*. A més, algunes de les eines generades, com per exemple les construccions *ash2-V5* o *UAS-ash2-HA*, poden permetre en un futur pròxim purificar el complexe ASH2 en cèl·lules S2 transfectades o en embrions transgènics.

CONCLUSIONS

- 1.- El gen *ash2* dels *trxG* és essencial pel correcte desenvolupament de l'ala i la formació del patró de venes i intervenes.

- 2.- El gen *ash2* manté la identitat d'intervena preservant el gen *bs* i *net* en un estat transcripcionalment actiu i *rho* en un estat inactiu.

- 3.- La regió d'intervena C no es troba alterada en mutants d'*ash2*, cosa que suggereix la presència d'altres gens encarregats de mantenir la identitat del teixit d'intervena en aquesta regió.

- 4.- *ash2* actua com a repressor del gen organitzador de vena L2 *kni*. La inhibició que *ash2* exerceix sobre *kni* és independent de *salm* i *salr*, i podria ser directa a través dels PREs o indirecta a través de reguladors d'un *enhancer* més global que el de vena L2.

- 5.- La pèrdua de funció dels membres dels *trxG*, *trx*, *ash1* i *ash2*, provoca fenotips diferents a l'ala.

- 6.- Davant la controvèrsia sobre els pesos moleculars de les proteïnes ASH2, podem afirmar que els transcrits d'*ash2* de 2.0kb i 1.4kb codifiquen per proteïnes de ~ 63kDa i ~40kDa respectivament, tal i com es prediu mitjançant anàlisis de seqüència proteica.

- 7.- Les proteïnes de 63kDa i 40kDa es localitzen al nucli de cèl·lules S2, igual que Sin3A i HCF. La proteïna de 63kDa no està present en el nucli de glàndules salivals de mutants *ash2*¹.

- 8.- ASH2 i Sin3A coimmunoprecipiten amb HCF i totes tres proteïnes presenten un alt grau de colocalització en cromosomes politènics. A més, HCF i ASH2 colocalitzen amb la trimetilació de la H3K4, una marca d'activació transcripcional. Aquestes dades suggereixen que ASH2 a *Drosophila* formaria part d'un complex amb activitat HMT homòleg al Set1/ASH2 d'humans.

