



# Estudi del factor de transcripció Cabut en el desenvolupament i la regeneració de *Drosophila melanogaster*

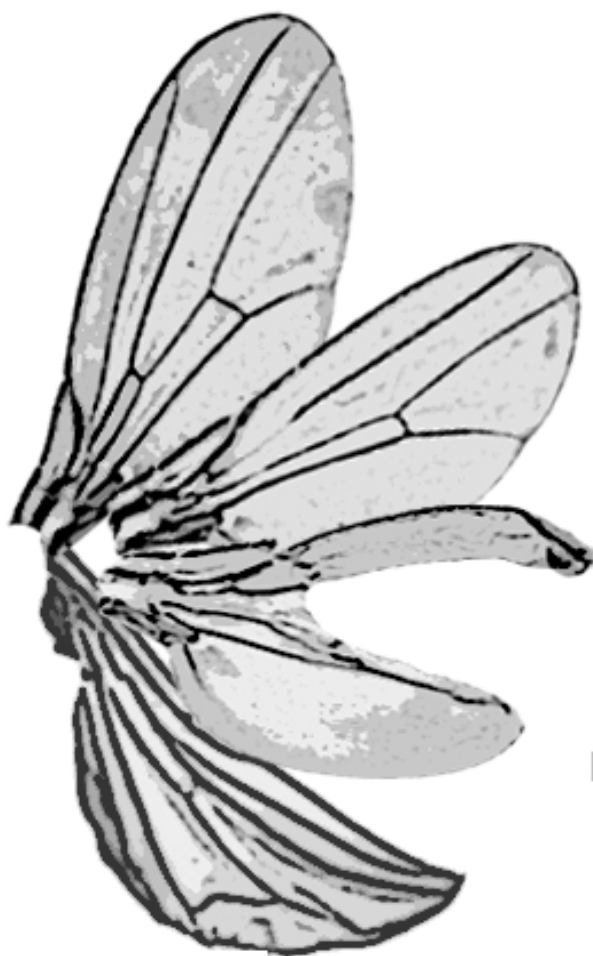
Marina Ruiz Romero

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Estudi del factor de transcripció Cabut en el  
desenvolupament i regeneració de  
*Drosophila melanogaster*



Marina Ruiz Romero  
Novembre 2012



Estudi del factor de transcripció Cabut en el  
desenvolupament i la regeneració de  
*Drosophila melanogaster*

Marina Ruiz Romero  
Barcelona, Novembre 2012



Departament de Genètica  
Programa de Doctorat de Genètica  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona

Estudi del factor de transcripció Cabut en el  
desenvolupament i la regeneració de  
*Drosophila melanogaster*

Memoria presentada per  
**Marina Ruiz Romero**

Per optar al grau de  
**Doctora**

Treball realitzat sota la direcció de la Dra. Montserrat Corominas Guiu  
en el Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona

Montserrat Corominas Guiu  
Directora de tesis

Marina Ruiz Romero  
autora

Barcelona, Novembre 2012



## ÍNDEX





## ÍNDEX DE FIGURES

## ÍNDEX DE TAULES

INTRODUCCIÓ.....	1
1. Desenvolupament del disc imaginal d'ala de <i>Drosophila</i> .....	4
Compartiments i dominis.....	4
Morfògens i senyalització.....	6
Proliferació i mort cel·lular.....	10
2. Regeneració dels discs imaginals.....	12
Tancament de la ferida.....	12
Formació del blastema i proliferació.....	14
Formació del patró.....	15
Vies de senyalització i regeneració.....	16
3. La via de la Jun-N-terminal kinasa (JNK).....	19
4. Cabut.....	24
Identificació i caracterització del gen <i>cabut</i> .....	24
La família de factors SP-1-like/Krüppel-like.....	25
Funcions de Cabut en el desenvolupament de <i>Drosophila</i> .....	27
MATERIALS I MÈTODES.....	35
1. Materials.....	37
Soques de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	37
Soques bacterianes.....	38
Plasmidis.....	38

Sondes Taqman per qRT-PCR.....	38
Oligonucleòtids.....	39
Anticossos.....	40
Marcatges immunohistoquímics .....	40
2. Mètodes.....	41
Tècniques d'inducció de regeneració .....	41
Sistema de fragmentació i cultiu <i>in vivo</i> .....	41
Sistema de mort cel·lular induïda (CDIR).....	42
Estudi fenotípic d'ales adultes.....	44
Tècnica de manipulació de DNA plasmídic .....	44
Tècniques d'anàlisi de DNA .....	44
Immunoprecipitació de cromatina i seqüenciació (ChIP-Seq) .....	44
Tècniques d'anàlisi de RNA .....	45
Síntesi de sonda de <i>cabut</i> .....	45
Hibridació <i>in situ</i> .....	46
Extracció de RNA i RT-PCR .....	47
Quantificació de RNA per <i>quantitative Real-Time PCR</i> (qRT-PCR) .....	47
Microarrays d'expressió .....	48
Tècniques d'anàlisi de proteïnes .....	48
Tincions immunohistoquímiques en discs imaginals .....	48
Electrophoretic movility shift assay (EMSA) .....	49
Electroforesi en gel d'acrilamida (SDS-PAGE).....	50
Western blot .....	50
Anàlisi d'imatges .....	50
Anàlisi bioinformàtica .....	51

Anàlisi funcional.....	51
Anàlisi de motius.....	51
Anàlisi del CHIPSeq.....	52
Estudi a gran escala <i>Yeast-One Hybrid (Y1H)</i> .....	53
 RESULTATS.....	 57
 Capítol I: Estudi del gen <i>cabut</i> en al regeneració del disc d'ala.....	 59
1. Anàlisi dels canvis d'expressió durant la regeneració dels discs d'ala.....	61
Transcriptoma dels discs regenerants.....	61
Anàlisi funcional dels gens.....	62
Gens diana del factor AP-1.....	65
2. Expressió del gen <i>cabut</i> durant la regeneració del disc d'ala.....	68
La via de la JNK regula l'expressió de <i>cabut</i> en el disc d'ala.....	68
Expressió de <i>cabut</i> durant la regeneració del disc d'ala.....	68
<i>cabut</i> com a gen diana de la via de la JNK.....	71
3. Funció de Cabut durant el procés de regeneració.....	73
Cabut està implicat en el tancament de la ferida.....	73
Cabut regula la proliferació durant la regeneració del disc d'ala.....	75
 Capítol II: Anàlisi dels gens diana de Cabut en el disc d'ala.....	 79
1. Localització de Cabut en el genoma del disc imaginal d'ala de <i>Drosophila</i> i descripció dels seus gens diana.....	81
Anàlisi dels gens diana de Cabut.....	81

Estat transcripcional dels gens diana de Cabut en el disc d'ala.....	85
2. Mecanismes d'acció de Cabut en la regulació dels seus gens diana.....	89
Estudi computacional de les seqüències dianes de Cabut .....	89
Cofactors de Cabut .....	92
3. Cabut regula l'expressió de gens lligats a la via de Notch.....	95
Gens diana de Cabut lligats a la via de Notch .....	97
Interacció genètica entre <i>Notch</i> i <i>cabut</i> .....	98
La sobreexpressió de <i>cabut</i> incrementa els nivells d'expressió de gens diana de la via de Notch .....	101
 Capítol III: Estudi dels factors de transcripció reguladors del gen <i>cabut</i> .....	103
1. Estudi dels reguladors de <i>cabut</i> .....	105
Anàlisi del promotor de <i>cabut</i> .....	106
Anàlisi del promotor de <i>cabut in silico</i> .....	112
 DISCUSSIÓ.....	115
1. El transcriptoma dels discs regenerats .....	117
Regeneració i vies de senyalització.....	118
Remodeladors de cromatina en regeneració.....	119
Gens diana de la via de la JNK .....	119
2. El gen <i>cabut</i> en regeneració .....	121
Regulació de l'expressió de <i>cabut</i> .....	121
Funcions de Cabut .....	124

3. Funció de Cabut en el disc d'ala .....	126
Mecanismes d'acció de cabut .....	127
Gens diana de Cabut en el desenvolupament i la regeneració .....	128
4. Altres reguladors del gen <i>cabut</i> .....	131
5. Cabut en el desenvolupament i la regeneració del disc d'ala ....	134
BIBLIOGRAFIA.....	141
ANNEX.....	157



## ÍNDEX DE FIGURES

### INTRODUCCIÓ

Figura 1. Determinació dels dominis del disc d'ala de <i>Drosophila</i> durant el desenvolupament...	6
Figura 2. Morfògens i senyalització del disc d'ala de <i>Drosophila</i> .....	9
Figura 3. Creixement de poblacions clonals en el disc d'ala..	10
Figura 4. Tancament de la ferida d'un disc imaginal .....	13
Figura 5. Proliferació i formació del blastema en discs regenerats.....	14
Figura 6. Regeneració del patró del disc de pota de <i>Drosophila</i> .....	16
Figura 7. La Via de la JNK a <i>Drosophila melanogaster</i> .....	20
Figura 8. Activitat de la via de la JNK en discs regenerats. ....	22
Figura 9. Estructura i dominis de Cabut. ....	25
Figura 10. Anàlisi filogenètica de Cabut. ....	26

### MATERIALS I MÈTODES

Figura 11. Mètode d'inducció de regeneració en discs imaginals per fragmentació i cultiu in vivo..	41
Figura 12. Mètode d'inducció de mort cel·lular (CDIR).....	43
Figura 13. Síntesi <i>in vitro</i> de les proteïnes Jun i DfosB .....	49
Figura 14. Tècnica <i>Yeast One Hybrid (Y1H)</i> . ....	54

### RESULTATS

Figura 15. Disseny dels microarrays amb discs regenerats. ....	61
Figura 16. Categories funcionals enriquides en el conjunt de gens de 0 a 24h .....	63



Figura 17. Categories funcionals enriquides en el conjunt de gens de 24 a 72h.....	64
Figura 20. Expressió de <i>cbt</i> en el disc d'ala i regulació per la via de la JNK.....	68
Figura 21. Expressió de <i>cbt</i> durant la regeneració del disc d'ala.....	69
Figura 22. Expressió de <i>cbt</i> en un disc en regeneració induïda per mort cel·lular (CDIR).....	70
Figura 18. Seqüència d'unió d'AP-1 del promotor de <i>cbt</i> . ....	71
Figura 19. Assaig EMSA amb Jun i D-fosB i la seqüència AP-1 del promotor de <i>cbt</i> .....	72
Figura 23. Anàlisi del tancament de la ferida i proliferació en mutants del gen <i>cbt</i> . ....	74
Figura 24. Inducció de mort cel·lular en els mutants de <i>cbt</i> .....	76
Figura 25. Inducció de mort cel·lular i sobreexpressió de <i>cbt</i> . ....	77
Figura 26. Perfil de Cbt en una regió del cromosoma 2L de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	82
Figura 27. Histograma de la localització de les dianes de Cbt respecte el TSS dels gens.....	83
Figura 28. Gens diàna del factor de transcripció Cbt en el disc d'ala. 83	
Figura 29. Categories funcionals enriquides dins dels gens diàna de Cbt en el disc d'ala. ....	85
Figura 30. Expressió dels gens diàna de Cbt en el disc d'ala.....	86
Figura 31. Correlació dels gens diàna de Cbt amb les marques H3K4me3 i H3K27me3. ....	87
Figura 32. Correlació entre els gens diàna de Cbt i els de Sin3A i GAF. ....	93
Figura 33. Superposició dels pics de Cbt i Sin3A i Cbt i GAF.....	94

Figura 34. Gens diana de Cbt de la via de N. ....	97
Figura 35. Interacció genètica entre l'al·lel de guany de funció de <i>N</i> i l'al·lel mutant de <i>cbt</i> <sup>EP(2)2237E1</sup> . ....	98
Figura 36. Interacció genètica entre l'al·lel de pèrdua de funció de <i>N</i> i l'al·lel mutant de <i>cbt</i> <sup>EP(2)2237E1</sup> . ....	99
Figura 37. Interacció genètica entre l'al·lel de guany de funció de <i>N</i> i l'al·lel mutant de <i>cbt dTIEG</i> <sup>S14</sup> . ....	100
Figura 38. Interacció genètica entre l'al·lel de pèrdua de funció de <i>N</i> i l'al·lel mutant de <i>cbt dTIEG</i> <sup>S14</sup> . ....	100
Figura 39. Quantificació de l'expressió dels gens <i>cycD</i> , <i>cut</i> , <i>ap</i> , <i>mam</i> en discs amb sobreexpressió de <i>cbt</i> . ....	101
Figura 40. Nivells d'expressió de <i>cbt</i> en teixits de la larva i l'adult....	105
Figura 41. Seqüències promotores de <i>cbt</i> . ....	106
Figura 42. Anàlisi de la interacció dels factors de transcripció de <i>Drosophila</i> amb les seqüències del promotor de <i>cbt</i> . ....	108
Figura 43. Interacció entre els factors de transcripció i la seqüència 1 (Seq1) de la regió promotora de <i>cbt</i> . ....	109

## DISCUSSIÓ

Figura 44. Seqüències AP-1 en les regions reguladores dels gens TIEG1 i TIEG2 en humà.. ....	122
Figura 45. Expressió de <i>cbt</i> en discs amb guany i pèrdua de funció de <i>N</i> . ....	123
Figura 46. Model de Cbt en el desenvolupament del disc d'ala. ....	134
Figura 47. Model del gen <i>cbt</i> en regeneració. ....	135



## ÍNDEX DE TAULES

### MATERIALS I MÈTODES

Taula 1. Línies de <i>Drosophila</i> utilitzades.....	37
Taula 2. Plasmidis utilitzats.....	38
Taula 3. Sondes Taqman utilitzades per qRT-PCR.....	38
Taula 4. Oligonucleòtids utilitzats.....	39
Taula 5. Anticossos utilitzats.....	40
Taula 6. Número total de gens amb canvis d'expressió durant el procés de regeneració .....	62
Taula 7. Gens sobreexpressats de 0 a 24h amb motius AP-1 predits en el seus promotors .....	66
Taula 8. Motius enriquits en les seqüències diana de Cbt. Motius enriquits obtinguts de l'algoritme MEME .....	90
Taula 9. Enriquiment de les matrius de les bases de dades Jaspar i Transfac en les seqüències diana de Cbt .....	91
Taula 10. Gens diana de Cbt que pertanyen a les vies de senyalització TGF $\beta$ , EGFR/MAPK, N i Wg.....	96
Taula 11. Interacció dels factors de transcripció amb el promotor de <i>cbt</i> .....	111
Taula 12. Seqüències d'unió dels factors de transcripció candidats en el promotor de <i>cbt</i> .....	113



## INTRODUCCIÓ



La regeneració és l'habilitat d'un organisme de restablir teixits o òrgans danyats o perduts. A la natura trobem un gran ventall de capacitats regeneratives des d'animals que poden regenerar completament totes les parts del cos com les hidres o les planàries, a altres que poden regenerar les extremitats i la cua com les salamandres o espècies que tenen una capacitat regenerativa limitada a certs òrgans o estadis del desenvolupament com és el cas de la regeneració del fetge dels humans (Galliot et al., 2008; 2006). També trobem processos regeneratius en els insectes com per exemple les paneroles i els grills els quals regeneren les potes durant els estadis de nimfa (Nakamura et al., 2008). Els individus adults de *Drosophila* no són capaços de regenerar les extremitats o els apèndix però sí que ho poden fer, durant el desenvolupament, els discs imaginals (primordis d'aquests apèndix) (Bergantiños et al., 2010b; Worley et al., 2012).

Nombrosos estudis han determinat les capacitats regeneratives de diferents organismes. Gràcies als avenços en biologia molecular i cel·lular s'han descrit mecanismes cel·lulars, processos i vies de senyalització necessaris per a la regeneració. Què determina la capacitat regenerativa d'un organisme? Com s'integren les diferents molècules que participen en el procés? Com es coordinen o es regulen? Són algunes de les preguntes que intenta resoldre la biologia regenerativa actual mitjançant les anàlisis genètiques en fons mutants, les expressions ectòpiques de transgens o els estudis d'expressió a gran escala. En aquest sentit *Drosophila* esdevé un organisme clau per a aportar una visió integrativa de la regeneració, tal i com ha succeït en estudis del desenvolupament.

Molts dels mecanismes i fenòmens descrits en els processos regeneratius succeeixen també durant el desenvolupament. Tant és així que hi ha hipòtesis que apunten a que la regeneració seria una recapitulació del desenvolupament (Martin and Parkhurst, 2004). Entre els mecanismes compartits en aquests processos destaquen les vies de senyalització i el seu paper com a reguladors de la transcripció.



Aquestes cascades transmeten senyals extracel·lulars fins al nucli de les cèl·lules, des d'on dirigeixen el comportament cel·lular en cada context. La regulació transcripcional doncs determina l'expressió d'aquells gens que seran claus per al desenvolupament i la regeneració d'un organisme. Actualment coneixem moltes dades sobre els components de les vies i les funcions en que participen. Tanmateix, encara hi ha poques evidències de com es coordinen entre elles per a dirigir els mateixos processos o de quins gens regulen en cada context.

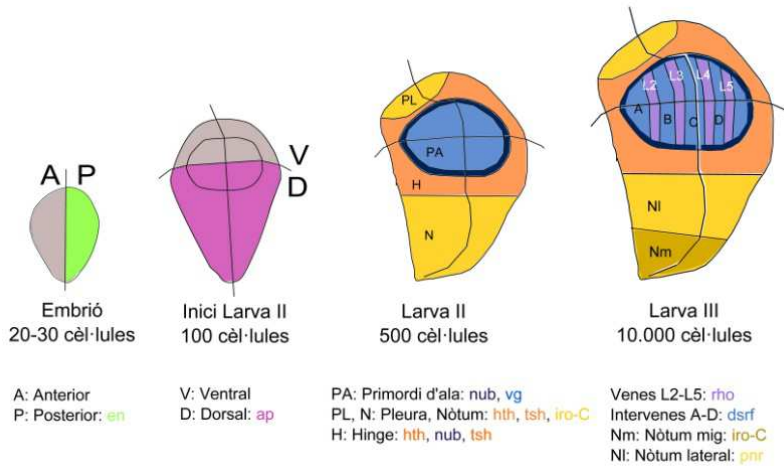
## 1. Desenvolupament del disc imaginal d'ala de *Drosophila*

A *Drosophila* els apèndix i la major part de les estructures epidèrmiques del cap i el tòrax provenen dels discs imaginals, sacs de cèl·lules epitelials especialitzades. Els discs imaginals s'originen en l'embrió com un grup de cèl·lules indiferenciades de l'ectoderm que s'invaginen constituint els primordis larvaris, aquestes cèl·lules després de la metamorfosi donaran lloc a les estructures adultes. Els discs imaginals estan formats per dos epitelis: l'epiteli columnar, pseudoestratificat, i la membrana peripodial, situada a la part més apical del disc. En el seu origen el disc imaginal d'ala està constituït per unes 20-30 cèl·lules que es divideixen activament fins a assolir les 50000 cèl·lules abans de la metamorfosi (Garcia-Bellido and Merriam, 1971; Milan et al., 1996).

### Compartiments i dominis

Durant el desenvolupament del disc d'ala les cèl·lules dels diferents territoris que donaran lloc a estructures particulars de l'adult es van especificant. A l'embriogènesi el gen selector *engrailed* (*en*), expressat a les parts posteriors del segments, divideix les cèl·lules del disc en el compartiment anterior (A) i posterior (P) (Garcia-Bellido and Santamaria, 1972; Lawrence and Morata, 1976; Tabata et al., 1995).

Posteriorment a la meitat de l'estadi de larva II (LII) les cèl·lules dorsals expressen *apterous (ap)* especificant així els compartiments dorsal (D) i ventral (V). A continuació, al final de l'estadi de LII, les cèl·lules que formaran el primordi d'ala expressen els gens *nubbin (nub)* i *vestigial (vg)*, i els gens *homothorax (hth)* i *teashirt (tsh)* restringeixen la seva expressió al *hinge* (articulació de l'ala) i al nòtum (cutícula del tòrax) respectivament (Azpiazu and Morata, 2000; Cifuentes and Garcia-Bellido, 1997; Williams et al., 1993; Wu and Cohen, 2002). A més mitjançant la via de senyalització de Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) les cèl·lules del nòtum activen l'expressió dels gens del complex Iroquis (Iro-C: *araucan (ara)*, *caupolican (Capdevila and Guerrero)* i *mirror (mir)*) (Zecca and Struhl, 2002). A l'estadi de LIII les cèl·lules del nòtum lateral expressen *pannier (pnr)* i deixen d'expressar els gens *Iro-C* diferenciant-se així de les cèl·lules del nòtum mig (Calleja et al., 2000). Finalment, al final de la LIII, les cèl·lules que formaran les futures venes expressen *rhomboïd (Gerhold et al.)* i silencien l'expressió de *Drosophila Serum Responding Factor (DSRF)*, establint així la diferències entre les venes i les intervenes (figura 1) (Fristrom et al., 1994; Martin-Blanco et al., 1999; Montagne et al., 1996; Sturtevant et al., 1993) .



**Figura 1. Determinació dels dominis del disc d'ala de *Drosophila* durant el desenvolupament.** Representació del desenvolupament del disc d'ala de l'embrió a l'estadi de LIII. S'indiquen els diferents compartiments i dominis així com els gens que els identifiquen.

Al final de l'estadi de LIII els compartiments i els dominis estan especificats. Aquests territoris donen una identitat concreta a cada cèl·lula, mantenint juntes les cèl·lules que presenten una mateixa identitat, degut a la seva afinitat, i separant-les de la resta. Tant es així que en experiments de disgregació/reagregació es va demostrar que les cèl·lules d'estructures diferents com el tòrax, el *hinge* o les venes es reconeixen entre elles reagregant-se després d'un procés de dissociació (Garcia-Bellido, 1966; Milan et al., 1997a). Aquesta especificació territorial però, no només dóna una identitat cel·lular sinó que també condiciona les cèl·lules d'un mateix domini a respondre d'una mateixa manera a un tipus de senyalització o a presentar un determinat patró de creixement.

## Morfògens i senyalització

Al 1983 Meinhardt va proposar que la divisió en diferents poblacions causa la formació de marges de compartiment. Aquests marges actuen com a centres organitzadors produint senyals que es

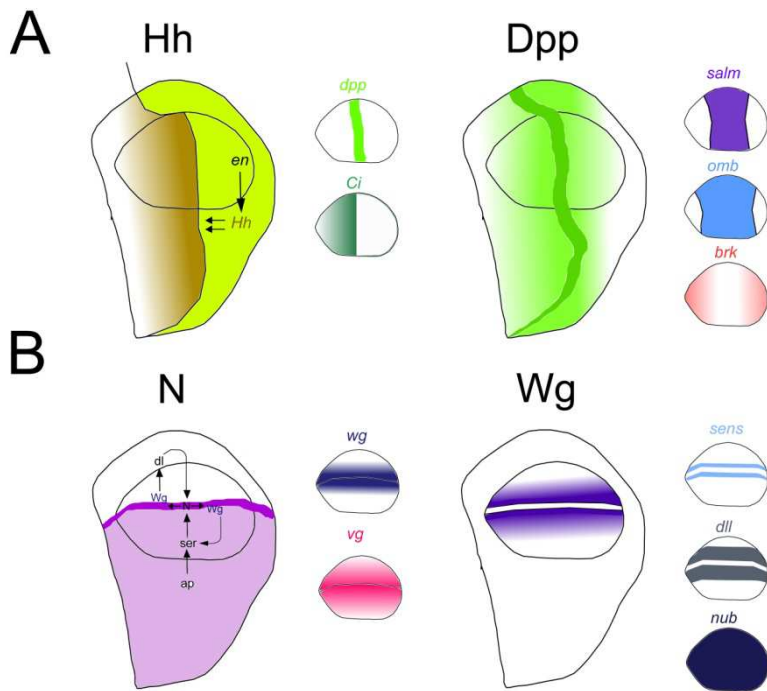
comporten com a morfògens determinant el patró del teixit (Meinhardt, 1983). En el cas del disc d'ala el gen *en* expressat en el compartiment posterior indueix l'expressió del morfògen *hedgehog* (*hh*) a la vegada que inhibeix la seva activitat en aquest compartiment (Tabata et al., 1992; Zecca et al., 1995). La senyal de Hh es propaga cap al compartiment anterior on s'uneix al seu receptor Patched (Ptc), el qual segresta Hh formant un gradient de l'activitat de Hh en el compartiment anterior (Chen and Struhl, 1996). Aquesta unió promou l'expressió i repressió de diferents gens entre els que destaca l'expressió de *decapentaplegic* (*dpp*) en el marge de compartiment, que esdevé un segon morfogen organitzador del patró Anterior/Posterior (A/P) (Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996; Zecca et al., 1995). Dpp és un membre de la família dels Transforming Growth Factors  $\beta$  (TGF $\beta$ ) i la seva funció principal és activar l'expressió de diferents gens segons la seva concentració, determinant així el patró de l'ala i regulant el seu creixement (Capdevila and Guerrero, 1994). Des del marge A/P Dpp difon cap ambdós compartiments formant un gradient. Dpp s'uneix al seus receptors tipus I: Thickveins (Tkv) i Saxophone (Matys et al.) i al receptor tipus II: Punt i inicia una cascada de fosforilacions que activa el factor de transcripció Mother against dpp (Mad) (Entchev et al., 2000; Tanimoto et al., 2000). Diferents nivells de la proteïna Mad fosforilada (pMad) regulen la transcripció de gens tant en el compartiment anterior com posterior: activa *spalt major* (*salm*) a altes concentracions, *optomotor blind* (*omb*) a nivells baixos i inhibeix *brinker* (*brk*) restringint la seva expressió a les zones perifèriques del disc (figura 2A) (Barrio et al., 1999; de Celis et al., 1996a; Minami et al., 1999; Nellen et al., 1996; Wiersdorff et al., 1996).

En el cas del marge Dorso/Ventral (D/V) succeeix un procés similar. Al principi de l'estadi de LII Wingless (Wg) i EGFR promouen l'expressió d'*ap* en les cèl·lules dorsals (Wang et al., 2000; Williams et al., 1993; Zecca and Struhl, 2002). Ap indueix l'expressió de *serrate* (*ser*), lligand de Notch (N), a les cèl·lules dorsals. Ser activa N en el

marge D/V i la seva activació promou l'expressió de *wg* i *delta (dl)* a les cèl·lules ventrals (Diaz-Benjumea and Cohen, 1995). DI, també lligand de N, promou l'expressió de *wg* i el manteniment de *ser* al compartiment dorsal (Doherty et al., 1996). Aquest mecanisme limita l'activitat de N a les cèl·lules del marge D/V i l'expressió de *wg* a les cèl·lules adjacents al marge (de Celis and Bray, 1997; de Celis et al., 1996c). A més N promou l'expressió de *vestigial (vg)* que forma un gradient proximo-distal en el disc, important per a la regulació de l'especificitat i el creixement del primordi d'ala. (Baena-Lopez and Garcia-Bellido, 2003; Couso et al., 1995; Klein and Arias, 1999; Zecca and Struhl, 2007) . Wg també actua com un morfogen formant un gradient D/V, s'uneix al seu receptor Frizzeld (Fzz) i inicia una cascada de senyalització que provoca la translocació de la proteïna de membrana  $\beta$ -catenina/Armadillo (Iglesias et al.) al nucli on actua de factor de transcripció dels gens: *achaete/scute (ac/sc)* i *senseless (sens)* a altes concentracions, *distalles (dll)* a nivells entremitjos, i *nub* a baixes concentracions (figura 2B) (Neumann and Cohen, 1997; Zecca et al., 1996)

En el cas del marge Dorso/Ventral (D/V) succeeix un procés similar. Al principi de l'estadi de LII Wingless (Wg) i EGFR promouen l'expressió d'*ap* en les cèl·lules dorsals (Wang et al., 2000; Williams et al., 1993; Zecca and Struhl, 2002). Ap indueix l'expressió de *serrate (ser)*, lligand de Notch (N), a les cèl·lules dorsals. Ser activa N en el marge D/V i la seva activació promou l'expressió de *wg* i *delta (dl)* a les cèl·lules ventrals (Diaz-Benjumea and Cohen, 1995). DI, també lligand de N, promou l'expressió de *wg* i el manteniment de *ser* al compartiment dorsal (Doherty et al., 1996). Aquest mecanisme limita l'activitat de N a les cèl·lules del marge D/V i l'expressió de *wg* a les cèl·lules adjacents al marge (de Celis and Bray, 1997; de Celis et al., 1996c). A més N promou l'expressió de *vestigial (vg)* que forma un gradient proximo-distal en el disc, important per a la regulació de l'especificitat i el creixement del primordi d'ala. (Baena-Lopez and Garcia-Bellido, 2003; Couso et al., 1995; Klein and Arias, 1999; Zecca

and Struhl, 2007) . Wg també actua com un morfogen formant un gradient D/V, s'uneix al seu receptor Frizzeld (Fz) i inicia una cascada de senyalització que provoca la translocació de la proteïna de membrana  $\beta$ -catenina/Armadillo (Iglesias et al.) al nucli on actua de factor de transcripció dels gens: *achaete/scute* (*ac/sc*) i *senseless* (*sens*) a altes concentracions, *distalles* (*dll*) a nivells entremitjos, i *nub* a baixes concentracions (figura 2B) (Neumann and Cohen, 1997; Zecca et al., 1996).

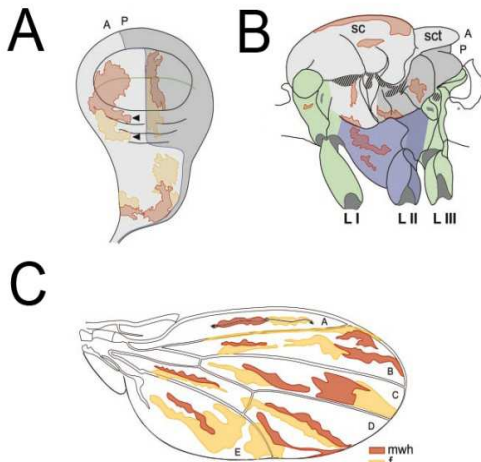


**Figura 2. Morfògens i senyalització del disc d'ala de *Drosophila*.** (A) Establiment del marge A/P mitjançant les vies de senyalització de Hh i Dpp en el disc. S'observa la formació dels gradients i alguns dels gens que regulen. (B) Establiment del marge D/V mitjançant les vies de senyalització de N i Wg. S'observa la formació del domini de N i del gradient de Wg i alguns dels gens que regulen. Anterior (esquerra), posterior (dreta), ventral (a d'alt) i dorsal (a baix).

## Proliferació i mort cel·lular

Durant el desenvolupament larvari el disc imaginal ha de créixer de les 50 cèl·lules inicials fins a 50000 cèl·lules abans de la metamorfosi. La taxa de proliferació és constant (una divisió cada 8-10h aproximadament) (Garcia-Bellido and Merriam, 1971). Els processos d'apoptosi són poc freqüents durant el desenvolupament del disc d'ala (Milan et al., 1997b), per tant la mida i forma final del disc sembla que està determinada principalment per la proliferació cel·lular.

Estudis d'anàlisi clonal demostren que el creixement és intercalar i exponencial. A més, el creixement presenta restriccions de compartiment, tal i com s'ha comentat. És a dir les poblacions clonals d'un compartiment no poden creuar a l'altre compartiment i viceversa. Aquestes limitacions territorials condicionen la mida dels clons i la seva orientació mitòtica. Així per exemple els clons en el primordi d'ala creixen en direcció Pròxim/Distal (P/D), mentre que en el nòtum presenten una forma més isodiamètrica. El mateix es pot veure en les estructures adultes, cosa que confirma que la mida i la forma s'estableixen durant l'estadi larvari (figura 3) (Resino et al., 2002) .



**Figura 3. Creixement de poblacions clonals en el disc d'ala.** Figura adaptada de Resino et al., (2002) (A) representació de dos poblacions clonals en el disc d'ala de LIII, es poden veure les formes allargades dels clons del primordi d'ala i la seva direcció P/D comparada amb la isodimetria dels clons que es localitzen en el nòtum. (B) Representació dels clons del nòtum en el tòrax de l'adult. (C) Representació dels clons en l'ala d'un individu adult. La disposició dels clons és exactament la mateixa que presenten en el disc d'ala.

Com es regula a nivell genètic aquest creixement és una de les preguntes que ha intentat resoldre la genètica del desenvolupament durant les últimes dècades i ha portat a l'establiment de nombrosos models de regulació (Affolter and Basler, 2007; Schwank and Basler, 2010). Tot i les controvèrsies dels diferents models, les hipòtesis més plausibles apunten a que la mida final del disc estaria regulada en part per un conjunt de vies de senyalització: Dpp, Hh, Wg, N, Hippo (Hppo) i Insulina (Ins), que aportarien la informació posicional necessària per a que les cèl·lules determinin la mida final del disc. Tot i així no es coneixen en detall els mecanismes que integren i/o coordinen aquestes vies ni molts dels gens que estan regulant.



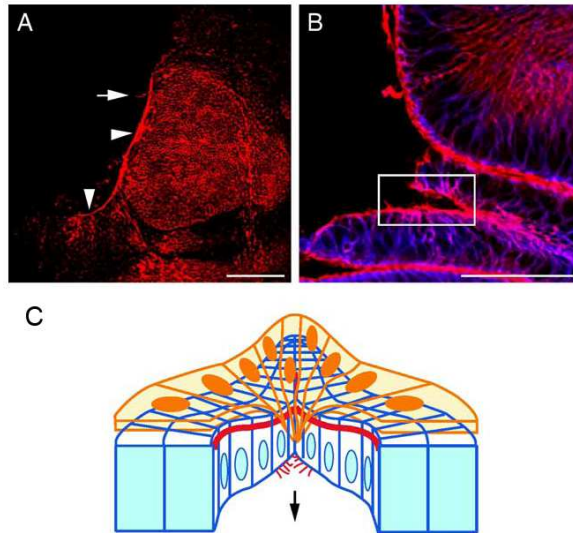
## 2. Regeneració dels discs imaginals

Hadorn i col·laboradors (1963) van determinar que un disc fragmentat i cultivat dins de l'abdomen d'una femella sofreix un procés de creixement regeneratiu. En la mateixa direcció experiments de irradiació demostraren que després de produir la mort del 50% de les cèl·lules, el disc pot donar lloc a una ala adulta completament normal, confirmant l'existència d'un procés regeneratiu (Bergantiños et al., 2010b; Worley et al., 2012). Aquestes evidències han portat al desenvolupament de diferents mètodes per a estudiar la regeneració dels discs imaginals. Entre ells destaquen la fragmentació i implantació en una femella adulta i la inducció de mort cel·lular (revisat a Bergantiños et al., 2010b).

En la majoria d'organismes la regeneració implica tancament de la ferida, proliferació i formació del patró. Aquests processos tot i estar clarament diferenciats entre ells es succeeixen en paral·lel en el temps.

### Tancament de la ferida

El tancament de la ferida en l'embrió i els discs imaginals de *Drosophila* té lloc sense la formació d'una cicatriu, com succeeix en altres organismes que regeneren, mentre que en l'adult sí produeix una cicatriu (Redd et al., 2004). En el disc imaginal la primera reacció que es produeix és la contracció de la ferida per tal de disminuir la seva superfície. Seguidament els epitelis columnar i peripodial es corben i estableixen contactes heterotípics entre ells. Les cèl·lules del vèrtex de la ferida es contrauen mentre que les dels marges s'estiren cap a la ferida per tal de tancar-la. Finalment es produeix un tancament en cremallera mitjançant fil·lopodis i es restableixen els contactes homotípics del disc (figura 4) (Bosch et al., 2005; Mattila et al., 2005; Reinhardt and Bryant, 1981; Reinhardt et al., 1977) .

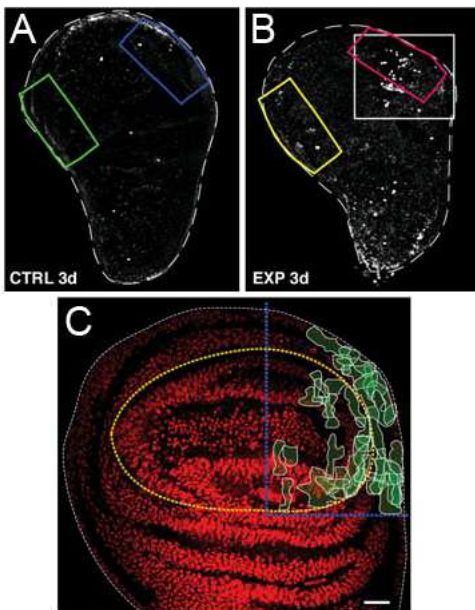


**Figura 4. Tancament de la ferida d'un disc imaginal.** (A-B) Tancament de la ferida d'un disc imaginal d'ala fragmentat. (A) S'observa el cable de F-actina (vermell) als marges de l'epiteli. (B) Imatge del vèrtex de la ferida on es pot veure la formació de fil·lopodis des dels dos marges de la ferida. (C) Esquema del tancament d'un disc fragmentat s'observa el tancament de la ferida en el disc imaginal. En blau l'epiteli columnar, en taronja l'epiteli peripodial i en vermell les remodelacions del citoesquelet (cable d'Actina i fil·lopodis) Bosch et al., 2005.

La cicatrització en l'embrió i els disc imaginals de *Drosophila* compren mecanismes molt similars als que succeeixen durant el tancament dorsal i el tancament del tòrax (Martin and Parkhurst, 2004). Aquests fenòmens són: la formació d'un cable de F-actina que manté la tensió en els marges de la ferida, la formació de fil·lopodis i lamel·lipodis i canvis de mida i forma cel·lular (Wood et al., 2002). Un altre fenomen que tenen en comú aquests processos és l'activació de la via de la Jun N-terminal Kinasa (JNK) que és imprescindible per a que es produeixi un tancament correcte en tots els casos (Bergantiños et al., 2010a; Bosch et al., 2005; Martin-Blanco et al., 2000; Mattila et al., 2005).

## Formació del blastema i proliferació

El blastema està format per un conjunt de cèl·lules amb capacitat per entrar en el cicle cel·lular i donar lloc a les cèl·lules que restabliran la mida del teixit. La contraposició de cèl·lules de diferents territoris, que succeeix durant el tancament de la ferida, podria ser un dels estímuls per promoure la proliferació i la formació del blastema, tot i que s'inicien abans de que l'epiteli estigui completament tancat (Reinhardt and Bryant, 1981). Durant la regeneració s'acumulen cèl·lules en divisió a la zona propera a la ferida en el disc imaginal d'ala. La proliferació s'inicia abans de les 24h de regeneració i assoleix els seu màxim entre les 48 i 72h (Bosch et al., 2008). Aquest creixement es produeix de forma localitzada, tant després de la fragmentació del disc com de la inducció de mort d'un domini o regió del disc (figura 5) (Bergantiños et al., 2010a; Bosch et al., 2008).



**Figura 5. Proliferació i formació del blastema en discs regenerats.** (A) Disc control no fragmentat després de 3 dies de cultiu, no s'observa proliferació. (B) Disc fragmentat després de 3 dies de regeneració s'observen cèl·lules en proliferació (marcades amb pH3) al voltant de la ferida (requadre blanc del compartiment posterior), no s'observa proliferació al compartiment anterior. (C) Anàlisi clonal en un disc de 3 dies de regeneració. S'observa que només s'observen clons al compartiment posterior al voltant de la ferida i que el creixement i forma dels clons és igual al que esperariem en condicions salvatges (Bosch et al., 2008).

En front d'un dany generalitzat del teixit, com la irradiació, s'activa una proliferació compensatòria en tot el disc. Tot i que la proliferació compensatòria també es caracteritza per una acceleració de la proliferació i una prolongació de l'estadi proliferatiu del disc com la regeneració (Gerhold et al., 2011; Milan et al., 1997b; Wells and Johnston, 2012), la proliferació és homogènia en tot el disc com en el desenvolupament. Aquest fet suggereix que els processos regeneratius tindrien una regulació diferent a la proliferació compensatòria tot i que probablement comparteixin els mateixos mecanismes que regulen el creixement i la mida final del disc durant el desenvolupament.

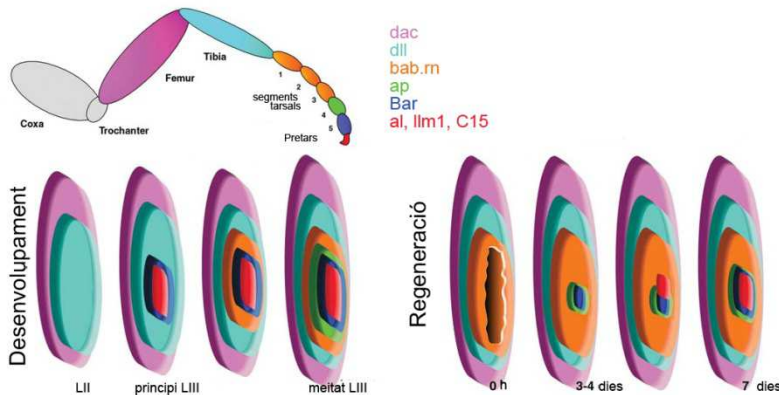
Com es regula la proliferació i s'estableix la mida final del disc en el procés de regeneració? Hi ha treballs que apunten a que l'activació de mitògens com Wg o dMyc és necessària per a promoure la proliferació i determinar la mida final del disc (Smith-Bolton et al., 2009). Altres suggereixen que és la via de Hppo la principal responsable del creixement del disc durant la regeneració (Grusche et al., 2011). Les evidències descrites fins ara fan plausible pensar que siguin un conjunt de senyals i els contactes cèl·lula-cèl·lula els que promoguin i determinin el creixement del disc, com succeeix durant el desenvolupament.

## Formació del patró

Per a una correcta regeneració del patró s'ha demostrat que és necessària la presència de totes les identitats dels compartiments, és a dir es requereixen cèl·lules de cada compartiment, en cas contrari els fragments es dupliquen (Gibson and Schubiger, 1999). Durant la regeneració a *Drosophila* els marges de compartiment es restableixen ràpidament i les cèl·lules del blastema mantenen la seva identitat d'origen, tal i com succeeix en els amfibis (Straube and Tanaka, 2006).

En el disc de pota, estudiat en detall en aquest procés, Dpp i Wg actuen de morfògens per organitzar les diferents identitats en el

eix P/D (Lecuit and Cohen, 1997), tot i que l'ordre en que es determinen els diferents segments no és igual al del desenvolupament (figura 6) (Bosch et al., 2010) i a més, en estadis tardans del desenvolupament les senyals dels organitzadors no són imprescindibles per a la formació del patró durant la regeneració (Estella et al., 2008) (Berganitiños et al., dades no publicades). Com es mantenen les identitats dels segments perduts sense els morfògens és una qüestió per resoldre, tot i que s'estan començant a estudiar mecanismes epigenètics que podrien mantenir la memòria cel·lular en aquest procés (Klebes et al., 2005).



**Figura 6. Regeneració del patró del disc de pota de *Drosophila*.** Esquema (adaptat de Bosch et al., 2010) de la comparació entre la formació del patró durant el desenvolupament i la regeneració. S'observen els diferents segments de la pota (a d'alt), els gens que els especifiquen i l'ordre amb el qual es van especificant els segments durant el desenvolupament (a baix a l'esquerra). A baix a la dreta es pot veure una representació d'un disc fragmentat i el seu procés de regeneració. S'observa com l'ordre amb el qual es restableixen els diferents segments i la posició d'aquests és diferent del que succeeix durant el desenvolupament.

## Vies de senyalització i regeneració

Com ja s'ha comentat totes les vies que regulen el creixement en condicions normals del disc són potencialment candidates a participar en el procés de regeneració, tanmateix és probable que els nivells d'activació o la seva regulació siguin diferents.

La via de la JNK s'activa davant el dany cel·lular tal i com s'observa mitjançant l'expressió del gen reporter *puckered (puc)* (gen diana de la via) i és essencial per al correcte tancament de la ferida en els discs imaginals (Bergantiños et al., 2010a; Bosch et al., 2005). També s'ha descrit la importància d'aquesta via en altres models de regeneració. Wg s'activa com a resposta a la fragmentació del disc o de la inducció de mort cel·lular (Gibson and Schubiger, 1999; McClure and Schubiger, 2008; Smith-Bolton et al., 2009), i encara que la seva funció específica no ha estat determinada en aquest procés, en altres organismes també s'ha comprovat que la via de Wnt s'activa com a resposta al dany cel·lular, demostrant que aquest mecanisme estaria conservat evolutivament (Gurley et al., 2008; Iglesias et al., 2008; Stoick-Cooper et al., 2007).

En els últims anys també s'ha relacionat la via de Hppo amb els processos regeneratius. La via de Hppo inhibeix el creixement mitjançant el segrest del coactivador transcripcional Yorkie (Yki). Després de la fragmentació o inducció de mort cel·lular es produeix un increment de Yki al nucli de les cèl·lules properes a la ferida i s'activa l'expressió de gens diana de Yki. A més una reducció dels nivells de Yki compromet el procés de regeneració (Grusche et al., 2011; Sun and Irvine, 2011).

Un altra via important implicada en el tancament de la ferida i reparació tissular és la via de N. Per exemple en la regeneració del tracte intestinal de *Drosophila* N és important per a la diferenciació cel·lular (Biteau et al., 2008; Jiang et al., 2009). En altres models, N participa en el tancament de la ferida en ratolí, en la regeneració cardíaca al peix zebra i en la regeneració de la cua a *Xenopus* (Beck et al., 2003; Chigurupati et al., 2007; Raya et al., 2003). Finalment altres vies, com la via de cytokine-activated Janus kinase (JAK/STAT), també tenen un paper important. La JAK/STAT s'indueix com a resposta a l'estrès després del dany d'un teixit, s'activa durant el procés de tancament de la ferida dels discs així com en la regeneració intestinal a *Drosophila* (Jiang et al., 2009; Pastor-Pareja et al., 2008).

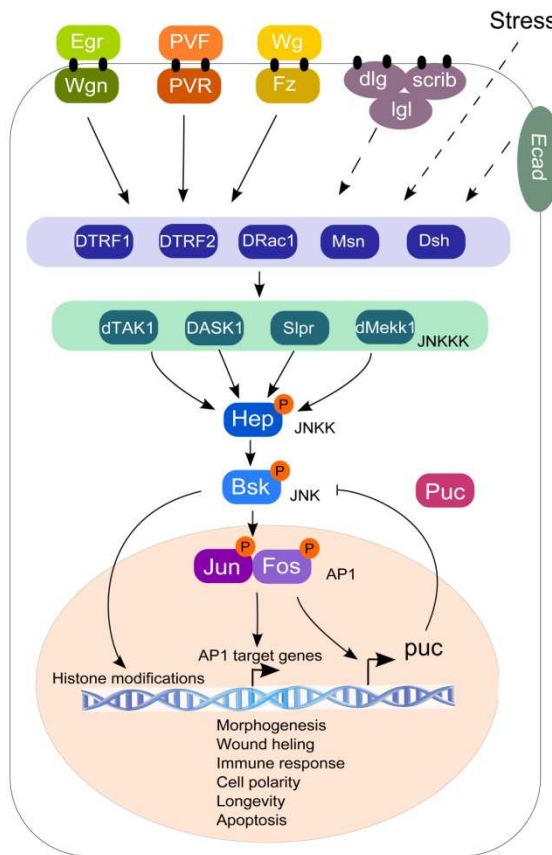
Tot i l'evidència de la importància d'aquestes vies durant la regeneració encara hi ha poques dades sobre quins mecanismes o gens estan regulant per a promoure el procés de regeneració.

### 3. La via de la Jun-N-terminal kinasa (JNK)

La via de la JNK és una de les vies *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) descrites. Aquestes vies transporten senyals des de la superfície cel·lular fins al nucli de les cèl·lules responant a diferents estímuls i mitjançant la fosforilació d'una sèrie de quinases. La JNK està implicada en la resposta a dany cel·lular i DNA, en resposta immune, regulació de l'apoptosi, diferenciació, morfogènesi i càncer (Kockel et al., 2001). La simplicitat d'aquesta via en *Drosophila* comparada amb la de vertebrats, confereix un atractiu particular a aquest model per a l'estudi de la via de la JNK i els processos en que participa.

A *Drosophila* la part central de la cascada de senyalització està formada per Basket (Bsk, la JNK)(Riesgo-Escovar et al., 1996) i les dues JNKK: Hemipterous (Hep) (homòleg de MKK7)(Glise et al., 1995) i dMKK4. Bsk fosforila els factors de transcripció Jun i Dfos que heterodimeritzen formant el complex Activator protein 1 (AP-1), es transloquen al nucli i s'uneixen a motius AP-1 (TGACTCA) (Lee et al., 1987; Perkins et al., 1990; Perkins et al., 1988). Un dels seus gens diana és *puckered (puc)*(Lee et al., 2005; Martin-Blanco et al., 1998), gen que codifica per una fosfatasa que regula negativament la via mitjançant la defosforilació de Bsk. Aquesta via de senyalització s'activa per mitjà de senyals extracel·lulars com les interaccions Eiger/Wengen (TNF/TNFR), PVF/PVR i Wg/Fz, citoquines o altres molècules d'estrès, components dels complexos de polaritat apico-basal (Lgl, Dlg i Scrib) o de les interaccions cèl·lula-cèl·lula mitjançades per la DE-cadherina (DE-cad) (figura 7) (Bakal et al., 2008; Igaki et al., 2002; Igaki et al., 2006; Ishimaru et al., 2004; Uhlirova et al., 2005).





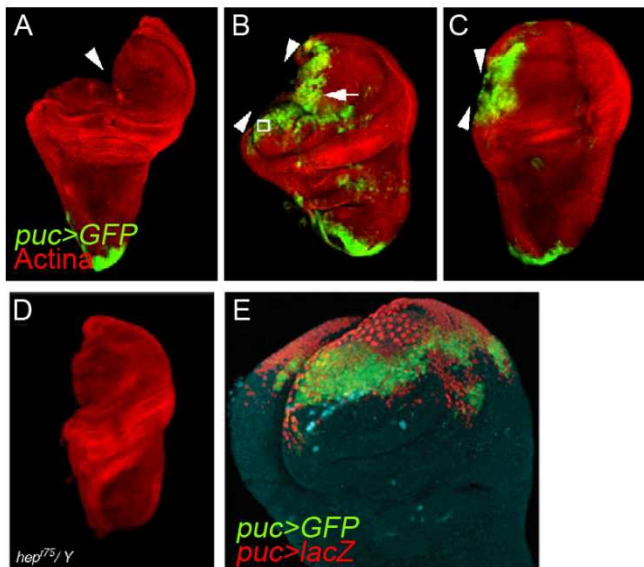
**Figura 7. La Via de la JNK a *Drosophila melanogaster*.** Esquema de la via de la JNK a *Drosophila*. Senyals extracel·lulars activen la via per mitjà de les interaccions cel·lulars de DE-cad, els complexos de polaritat apico-basal (Dlg, Lgl, Scrib) les interaccions lligand receptor: Egr/Wgn, PVF/PVR i Wg/Fz23, senyals d'estrès i citoquines. Aquestes senyals es transmeten fins a la JNKK Hep que fosforila Bsk (la JNK). Aquesta quinasa s'encarrega de fosforilar Jun i Fos que heterodimeritzen formant el complex Activator protein 1 (AP-1). AP-1 es transloca al nucli i promou la transcripció de gens diana com la fosfatasa Puc.

A *Drosophila* la JNK és essencial per al tancament dorsal en l'embriogènesi, tal com s'ha demostrat amb l'estudi de mutants que no poden completar el tancament dorsal (Glise et al., 1995). Tant els

embrions mutants de *hep* com els de *bsk* presenten una obertura dorsal i les seves cèl·lules epidèrmiques presenten una falta d'elongació. També s'ha descrit que els gens *puc* i *dpp* s'expressen a les cèl·lules dels marges dels epidermis de l'embrió de manera dependent de la JNK (Ring and Martinez Arias, 1993), tot i que en el cas de *dpp* no s'ha demostrat una unió directe. De fet el factor de transcripció Cabut (Cbt), gen diana de la JNK, també participa en l'activació de l'expressió de *dpp* al marge de l'epidermis (Munoz-Descalzo et al., 2005).

Una altra funció de la JNK en el desenvolupament dels discs d'ala i d'ull és l'activació de processos apoptòtics. Els gens *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*) i *grim* són inductors de mort cel·lular (White et al., 1994) mitjançant la inhibició de *Drosophila* inhibitor-of-apoptosis protein-1 (DIAP1), inhibidor de les Caspases (Martin, 2002). La inducció de mort cel·lular per sobreexpressió de *rpr* s'inhibeix parcialment en un fons mutant de *bsk*, indicant la participació d'aquesta via en el procés (Kuranaga et al., 2002). S'ha observat que la mort cel·lular produïda per irradiació es deguda a la via de la JNK de forma dependent de p53 i que una pèrdua de Dpp o Wg en els seus dominis, per tan una pèrdua de la informació posicional i la integritat de l'epiteli, activa l'expressió de *puc* i la mort cel·lular (Adachi-Yamada et al., 1999). Tanmateix, també hi ha evidències que la JNK afavoreix la supervivència cel·lular en un context apoptòtic. McEwen i Pfeifer (2005) proposen que després d'una irradiació l'expressió de *puc* modula els nivells de la JNK, evitant l'entrada en apoptosi i permeten a les cèl·lules la reparació del dany del DNA durant un període de temps. Passat aquest període si el dany persisteix i la JNK segueix activa es superaria el llindar i s'iniciaria l'apoptosi. És a dir la JNK actuaria com una balança entre la supervivència i la mort davant un dany o estrès, promouria un període de restitució induïnt la resposta de les cèl·lules afectades però en cas de que aquestes no es poguessin recuperar activaria la mort cel·lular per a mantenir la integritat de la resta del teixit.

Aquesta hipòtesi es veu recolzada pels estudis de la JNK en regeneració. Durant la regeneració dels disc imaginals de *Drosophila* *puc* s'expressa a la zona propera a la ferida i els mutants que afecten l'activitat de la via no tanquen bé la ferida. Els experiments de llinatge, a més, demostren que les cèl·lules del teixit format per reemplaçar el teixit perdut deriven majoritàriament de cèl·lules que han expressat *puc* durant la regeneració (figura 8) (Bergantiños et al., 2010a; Bosch et al., 2005; Repiso et al., 2011).



**Figura 8. Activitat de la via de la JNK en discs regenerats.** Expressió del gen *puc* (verd) durant la regeneració del disc d'ala. S'observa un disc fragmentat (*puc-Gal4; UAS-GFP*) a 0h (A), 12h (B) i 24h (C) de regeneració. S'indueix l'expressió de *puc* a la zona proper a la ferida. (D) Disc d'un individu mutant de *hep* (*hepr<sup>75</sup>/Y*) a 24h de regeneració, presenta defectes en el tancament de la ferida. (Bosch et al., 2005). (E) Experiment de llinatge de *puc*, s'observa un disc *puc-Gal4/arm>STOP>lacZ; UAS-GFP/UAS-flp* a 4 dies de regeneració. En verd l'expressió de *puc>GFP* i en vermell les cèl·lules marcades amb el *lacZ*, és a dir les cèl·lules filles de les que han expressat *puc* en algun moment (Bergantiños et al., 2010b).

En la mateixa direcció els estudis realitzats en regeneració i homeòstasi de l'intestí de *Drosophila* demostren una activació de la

via de la JNK en l'epiteli danyat i proposen que la JNK promou la proliferació de l'epiteli tant durant la regeneració com en el renovament del teixit en condicions normals (Biteau et al., 2008; Jiang et al., 2009). També recolza el paper proproliferatiu de la JNK en regeneració, un estudi recent que proposa que la JNK és la responsable de la translocació del factor Yki al nucli durant la regeneració, per promoure la proliferació cel·lular (Sun and Irvine, 2011).

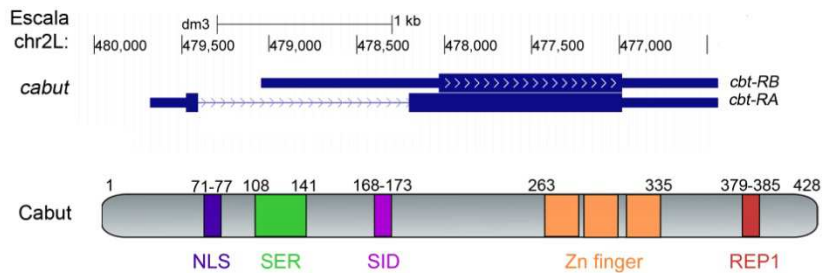
Finalment la via de la JNK també s'ha involucrat en altres processos com l'allargament de la vida (Biteau et al.), l'especificació durant el desenvolupament de l'ull i la regulació de la polaritat cel·lular planar (PCP) (Kockel et al., 2001). Tot i la importància de la JNK en el desenvolupament i el manteniment dels organismes, no es coneixen en detall els seus gens diana. En aquest treball hem identificat gens diana de la JNK en regeneració, entre els quals hi ha el gen *cabut*.

## 4. Cabut

### Identificació i caracterització del gen *cabut*

El gen *cabut* (*cbt*, *CG4427*) es va identificar en un estudi de cribratge de guany de funció amb l'objectiu d'identificar gens lligats a l'establiment de la polaritat cel·lular planar (PCP) (Rorth et al., 1998). En aquest treball es van utilitzar 2300 línies EP una de les quals, la *EP(2)2237*, al ser sobreexpressada amb *sev-Gal4* o *ap-Gal4* presentava defectes de PCP en l'ull o en l'ala i el tòrax, respectivament (Mlodzik and Paricio, resultats no publicats). Aquest element EP es troba inserit a 14 pb a 5' del inici de transcripció (TSS) del gen *CG4427* que es localitza a la posició 21C6 del cromosoma 2L. Els mutants homozigots d'aquest gen són letals en l'embrió i presenten defectes en el tancament dorsal. Aquest fenotip va portar a Muñoz Descalzo i col·laboradors (2005) a anomenar a aquest gen *cabut*.

El gen *cbt* presenta dues isoformes *cbt-RA* (*NM\_164384*) i *cbt-RB* (*NM\_134685*) que codifiquen per proteïnes de 428 aminoàcids (46.7 KDa) i 347 (37.9 KDa) respectivament. Aquestes proteïnes presenten al extrem C-terminal 3 dominis d'unió a DNA del tipus *Zinc finger* C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (262-335) (*Zn finger*) situats en tàndem amb una seqüència consens CX<sub>2-4</sub>CX<sub>12</sub>HX<sub>2-6</sub>H, típica de proteïnes d'unió al DNA o RNA que regulen la transcripció (Iuchi, 2001). També al extrem C-terminal presenta un domini repressor REP1 (379LRAIAPA<sub>385</sub>). A l'extrem N-terminal es localitza una regió rica en serina (SER<sub>108-141</sub>), un domini d'interacció a Sin3A (SID, 168AAEVAL<sub>173</sub>) i un domini *Nuclear localization site* (NLS, 71PNKKPRL<sub>77</sub>), necessari per al transport de la proteïna al nucli (figura 9) (Belacortu et al., 2012).

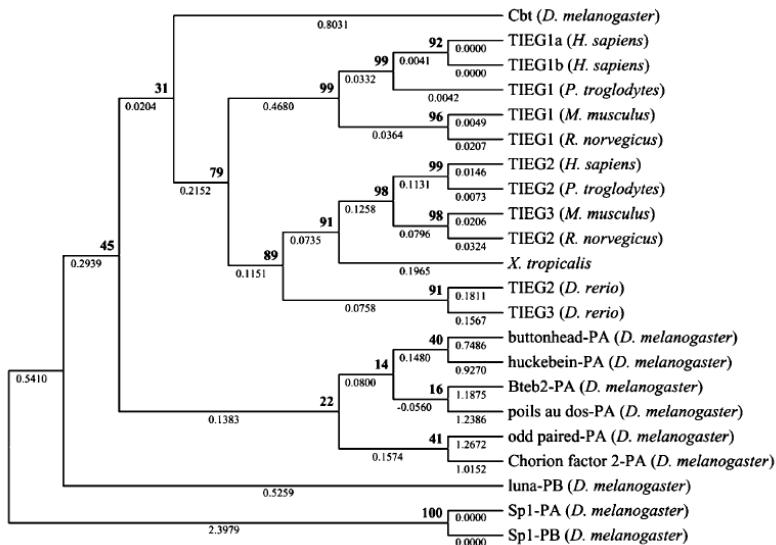


**Figura 9. Estructura i dominis de Cabut.** A d'alt localització del gen *cbt* en el cromosoma 2L de *Drosophila*, s'observen les isoformes *cbt-RA* i *cbt-RB*. A baix l'estructura de la proteïna *Cbt*, s'observen els dominis descrits NLS, SER, SID, 3 *Zn fingers* i REP1 (des de N-terminal a C-terminal).

### La família de factors SP-1-like/Krüppel-like

Al 2007 es van identificar les proteïnes ortòlogues de *cbt* en altres espècies de *Drosophila*, en altres invertebrats i en vertebrats (Munoz-Descalzo et al., 2007). En totes les espècies de *Drosophila* i invertebrats estudiats es va trobar un gen majoritàriament amb dos exons i un intró que codifica per un ortòleg de *cbt*. En el cas de les *Drosophilidae* l'estructura del gen i la localització presenta una alta conservació. Tot i que els ortòlegs d'altres invertebrats presenten més divergència, les dades obtingudes recolzen la presència d'un gen *cbt* en l'últim ancestre comú dels bilateris. A nivell de proteïna tots els ortòlegs identificats presenten els 3 dominis *Zn finger* en l'extrem C-terminal, en la majoria d'espècies de *Drosophila* també es troba conservat el domini SER a la part N-terminal mentre que en la resta dels ortòlegs d'invertebrats només s'ha identificat aquest domini en *A. Gambiae*. En aquest mateix treball es va classificar *cbt* com a membre de la família dels factors Sp1-like/Krüppel-like (Sp-1/KLF). L'anàlisi de les seqüències gèniques va identificar els gens *TGFβ inducible early genes 1 i 2 (TIEG1/KLF10 i TIEG2/KLF11)* com els ortòlegs de *cbt* en humans (Cook et al., 1998; Subramaniam et al., 1995; Suske et al., 2005). Aquests gens pertanyen al subgrup III de la família SP-1/KLF. En la resta d'espècies analitzades també es van identificar 2 ortòlegs

de *cbt* classificats com a factors de transcripció TIEG. La presència de 2 gens en comptes d'un és possiblement producte de la duplicació genòmica que van patir aquests organismes. Els ortòlegs de *cbt* en vertebrats són similars entre ells i més complexes que els d'invertebrats, majoritàriament presenten 4 exons i 3 introns. Aquests gens codifiquen per proteïnes de mida variable que també contenen 3 dominis *Zn finger C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>* al extrem C-terminal. L'anàlisi filogenètica d'aquestes proteïnes confirma la seva ortologia amb Cbt, ja que Cbt presenta més similituds amb els seus ortòlegs que amb altres proteïnes amb dominis *Zn finger* de *Drosophila*. Aquestes dades demostren que *cbt* està conservat en l'arbre filogenètic dels metazous suggerint una importància funcional a nivell biològic (figura 10) (Munoz-Descalzo et al., 2007).



**Figura 10. Anàlisi filogenètica de Cabut.** Arbre filogenètic amb diferents proteïnes de *Drosophila* amb 3 dominis *Zn finger* i els factors TIEG en vertebrats. Es pot observar com la proteïna Cbt forma un *clúster* filogenètic amb els membres TIEG, separat de la resta de proteïnes de *Drosophila*, confirmant la seva ortologia (Munoz-Descalzo et al., 2007).

Els gens TIEG d'humà i ratolí s'han relacionat amb la regulació del creixement (Alvarez-Rodriguez et al., 2007; Cook and Urrutia, 2000), la regulació transcripcional de la via de TGF $\beta$  (Johnsen et al., 2002a; Johnsen et al., 2002b), l'inducció d'apoptosi (Tachibana et al., 1997), la reparació de l'epidermis davant un dany tissular (Hori et al., 2012; Taguchi et al., 2008) i el renovament ossi (Hawse et al., 2008). A nivell de patologies els gens TIEG estan involucrats en càncer de pàncrees, de mama, de cèl·lules colorectals i de pròstata (Cook and Urrutia, 2000; Chen et al., 2003; Eid et al., 1998; Reinholz et al., 2004), en deficiències òssies (Subramaniam et al., 2005) i en hipertrofia cardíaca (Rajamannan et al., 2007).

Actualment hi ha evidències d'algunes similituds funcionals entre el factor Cbt de *Drosophila* i els factors TIEG, tot i així calen estudis més detallats dels mecanismes d'actuació d'aquests factors i dels gens diana que regulen per a determinar si Cbt i els seus ortòlegs presenten una conservació funcional a nivell evolutiu.

### Funcions de Cabut en el desenvolupament de *Drosophila*

Actualment no s'han descrit en detall les funcions de Cbt durant el desenvolupament, tanmateix els resultats provinents d'estudis de cribratge funcional o d'anàlisi a gran escala aporten algunes dades al respecte. A nivell d'estudis de guany de funció per exemple, *cbt* es va identificar en un estudi per descriure reguladors dels òrgans sensorials externs (Abdelilah-Seyfried et al., 2000) i està implicat en la guia d'axons motors i en la sinaptogènesi, tant en embrió com en larva (Kraut et al., 2001; Mindorff et al., 2007). En un altre treball es va determinar que *cbt* està participant en el desenvolupament toràcic. La sobreexpressió de *cbt* amb *pnr-Gal4* provoca deformacions en el *scutellum*, presència de macroquetes extres i pèrdua de microquetes a la línia mitja dorsal (Pena-Rangel et al., 2002). Finalment, també s'ha descrit que Cbt és important per a la formació del marge del compartiment D/V, ja que la seva sobreexpressió amb *ap-Gal4* rescata el fenotip de la pèrdua de funció d'*ap* (Bejarano et al., 2008).



A nivell d'expressió els estudis a gran escala demostren que l'expressió de *cbt* incrementa en resposta a la inhibició de la via de TOR, de manera dependent del factor Fork Head (FKH/FoxA) i relacionen el gen *cbt* amb l'estrès metabòlic (Bulow et al., 2010; Guertin et al., 2006). Altres treballs revelen que Cbt es troba lligat a la regulació del cycle circadià, que està regulat per el factor Clock i s'expressa en les neurones responsables del rellotge biològic (Kadener et al., 2007; Nagoshi et al., 2010). Finalment un estudi de microarrays de Beckstead i col·laboradors (2005) demostra que els nivells d'expressió de *cbt* durant l'entrada i desenvolupament de la pupa incrementen coincidint amb els pics de l'hormona Ecdisona i apunten a *cbt* com a gen diana del factor Ecdyson Receptor (EcR).

L'activitat del gen Cbt també s'ha associat a la senyalització d'algunes vies. Tal i com s'ha comentat Muñoz i col·laboradors van descriure que els mutants del gen *cbt* mostren defectes en el tancament dorsal de l'embriogènesi de *Drosophila*, i la majoria dels embrions mutants *cbt*<sup>EP(2)2237E1</sup> presenten letalitat i obertures a les cutícules. Aquest treball també reporta que *cbt* s'expressa a l'amnioserosa i a l'epidermis lateral durant el tancament dorsal de manera dependent de la JNK i regula l'expressió del gen *dpp* en les cèl·lules del marge de l'epidermis (Munoz-Descalzo et al., 2005). En la mateixa direcció s'han descrit dos gens diana de Cbt en el disc d'ala que pertanyen a la via de Dpp: *salm* i *omb*. La sobreexpressió de *cbt* incrementa l'expressió d'aquests dos gens. En aquest treball l'autora proposa que Cbt seria cofactor de pMad i que regularia els nivells d'activitat de la via de Dpp. Els resultats d'aquest treball suggereixen que Cbt podria estar regulant també altres vies com la de la JAK/STAT i que estaria implicat en la formació del patró i la regulació de la proliferació en el desenvolupament del disc d'ala (Rodriguez, 2011). En relació amb altres vies, Cbt i la via de Ras-MAPK també mostren una interacció positiva en cèl·lules S2 tal i com mostra un estudi a gran escala amb RNAis (Horn et al., 2011).

Tot i que existeixen evidències que mostren la importància del gen *cbt* durant diferents fases del desenvolupament i teixits, les dades sobre el paper que realitza Cbt i els gens que està regulant són molt escasses. Tampoc hi ha gaires indicis sobre com estaria actuant aquest gen. Un treball recent de Belacortu i col·laboradors (2012) proposa que Cbt seria un regulador negatiu de la transcripció. Mitjançant assajos luciferasa en cèl·lules S2 proposen que Cbt és un repressor transcripcional, capaç de reprimir el seu propi promotor, i que els dominis SID i REP1 són necessaris per a que Cbt pugui actuar com a repressor. En resum aquestes dades contradiuen les evidències observades *in vivo* que indiquen que Cbt regula positivament l'expressió de gens durant el desenvolupament de l'embrió i del disc d'ala.



OBJECTIUS



Els **objectius principals** d'aquesta tesi han estat:

- Analitzar els canvis d'expressió gènica en discs d'ala a diferents temps de regeneració i la seva relació amb la via de la JNK.
- Estudiar la funció del gen *cbt* durant la regeneració i el desenvolupament.

Els **objectius específics** plantejats durant aquest treball han consistit en:

- Analitzar el transcriptoma de discs regenerants i identificar els gens diana de la via de la JNK.
- Analitzar la funció de Cbt en la regeneració.
- Determinar els gens diana de Cbt en el disc d'ala i els seus Cofactors.
- Analitzar el paper de Cbt com a regulador de l'activitat de la via de N.
- Determinar els factors de transcripció que s'uneixen a la regió del promotor proximal de *cbt*.



MATERIALS i MÈTODES





## 1. Materials

La majoria dels reactius utilitzats en la realització dels experiments són de qualitat analítica i provenen de les cases comercials Merck, Fluka i Sigma. Els enzims són de Promega o Roche.

### Soques de *Drosophila melanogaster*

Les mosques utilitzades en aquest treball s'han cultivat en cambres climàtiques a 17°C, 25°C i/o 29°C en medi de *Drosophila* (Carolina Biological Supply) suplementat amb llevat. A la taula 1 s'indiquen les diferents línies utilitzades així com la seva procedència.

Línia	Procedència
<i>CantonS</i>	Bloomington Drosophila Stock Center
<i>w<sup>1118</sup>ISO;2iso,3iso</i>	DrosDel collection
<i>cbt<sup>EP(2)2237E1</sup>/CyO-twi:GFP</i>	Muñoz-Descalzo et al.,2005
<i>ap-Gal4:UAS GFP</i>	J.P. Causo
<i>en-Gal4</i>	Bloomington Drosophila Stock Center
<i>Salm-Gal4</i>	J.F. de Celis, CBMSO
<i>tub-Gal80<sup>ts</sup></i>	McGuire et al., 2003
<i>spalt<sup>PE</sup>-Gal4</i>	Barrio and de Celis, 2004
<i>UAS-hep<sup>CA</sup></i>	Adachi-Yamada et al., 1999
<i>UAS-rpr</i>	Wing et al. 1998
<i>UAS-cbt-flag</i>	Muñoz-Descalzo et al.,2005
<i>UAS-GFP</i>	Bloomington Drosophila Stock Center
<i>N<sup>AX-M1</sup>FRT101/FM7C</i>	de Celis et al.,1991
<i>N<sup>5e11</sup>FRT15/FM7:GFP</i>	Kidd et al.,1983
<i>dTIEG<sup>S14</sup>FRT40A/Cyo-Ubi:GFP</i>	Rodríguez 2010

**Taula 1. Línies de *Drosophila* utilitzades.** S'indica el genotip i la seva procedència.

## Soques bacterianes

Per a la manipulació de DNA plasmídic hem utilitzat cèl·lules competents d'*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

## Plasmidis

Els plasmidis utilitzats en aquest treball es recullen a la taula 2.

Vector	Insert	Experiment
pBluescript SK	<i>cbt</i>	síntesi sonda in vitro
pcDNA3.1(-)/Myc-His A	<i>jun</i>	síntesi de proteïna in vitro
pcDNA3.1(-)/Myc-His A	<i>D-fosB</i>	síntesi de proteïna in vitro
pcDNA3.1(-)/Myc-His A	<i>D-fosD</i>	síntesi de proteïna in vitro
pMW2 (PBHIS)	<i>Seq1 (0-600)</i>	Y1H
pMW2 (PBHIS)	<i>Seq2 (450-1050)</i>	Y1H
pMW2 (PBHIS)	<i>Seq3(900-1500)</i>	Y1H

**Taula 2. Plasmidis utilitzats.** S'indica el tipus de vector, el gen o seqüència que porta per insert i l'experiment en el qual s'ha emprat.

## Sondes Taqman per qRT-PCR

Per a la realització de les Real time PCR quantitatives (qRT-PCR) de discs regenerats i dels mutants de *N* vam utilitzar les següents sondes Taqman (taula 3).

Gen	Sonda Taqman
<i>cbt</i>	Dm01800197_s1
<i>dia</i>	Dm01811206_g1
<i>mRpL9</i>	Dm02135860_s1
<i>ptp61F</i>	Dm0183210_g1
<i>E(Spl)</i>	Dm02151501_s1
<i>ash2</i>	Dm02150755_g1

**Taula 3. Sondes Taqman utilitzades per qRT-PCR.** S'indica el gen que amplifica la sonda i la referència de la casa comercial.

## Oligonucleòtids

Els oligonucleòtids han estat sintetitzats per Sigma-Aldrich (taula 4).

Nom	Seqüència	Experiment
Cbt AP1 site FW	5' GATAACAAAGTAGCTCACGAAAAGCAGG 3'	EMSA
Cbt AP1 site RV	5' CCTGCTTTTCGTAGCATCTTTGTTATC 3'	EMSA
Cbt AP1 site m* FW	5' GATAGTCTAGATAGTCTACGAAAAGCAGG 3'	EMSA
Cbt AP1 site m* RV	5' CCTGCTTTTCGTAGACTACTAGACTATC 3'	EMSA
Cbt AP1SITRE m** FW	5' GATAACATCGATAGTCTACGTGAAGCAGG 3'	EMSA
Cbt AP1SITRE m** RV	5' CCTGCTTACGTAGACTATCGATGTTA TC 3'	EMSA
cbt RNA RT FW	5'CACTAAGGGAAAACAAGTTGG3'	Real time PCR
cbt RNA RT RV	5'TTCTGACTCTTTTGGGCCAC3'	Real time PCR
ap RNA RT FW	5'AGGACTGTGCA CGGAGATG3'	Real time PCR
ap RNA RT RV	5'AGGACTGTGCA CGGAGATG3'	Real time PCR
cut RNA RT FW	5'ATGCTTTCTCTCTCACCCCTC3'	Real time PCR
cut RNA RT RV	5'CACGACGACCAAGGACAAAG3'	Real time PCR
Su(H) RNA RT FW	5'ATTGCTATGCGTGGTGCCG3'	Real time PCR
Su(H) RNA RT RV	5'TTCCATCGTTGCGCACCAAG3'	Real time PCR
mam RNA RT FW	5'CAACCGCAACAGATTAGCAC3'	Real time PCR
mam RNA RT RV	5'TGTTGTTGTTACCGCTACCG3'	Real time PCR
sply RNA RT FW	5'CTTCCCGATTCCCGTAGC3'	Real time PCR
sply RNA RT RV	5'TGACGGGCTTAAAGGCAATC	Real time PCR
fis-1 RNA RT FW	5'CCA TACCCCTTTGCCACTTCC3'	Real time PCR
fis-1 RNA RT RV	5'CGAGTCAAATGATCAAAGTTCCG3'	Real time PCR
mRpL40 RNA RT FW	5'ATTACGTCA GTCCCGA TGG3'	Real time PCR
mRpL40 RNA RT RV	5'CTCATTTGACCTCCCACTTC3'	Real time PCR
cycD RNA RT FW	5'AGCAAAGTATA TGGCAAAGG3'	Real time PCR
cycD RNA RT RV	5'ATGGCTCTAGATTCGAGATG3'	Real time PCR
cbt 0-500 Fw	5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCGAAAAAGGCAAAGCCATTC3'	Y1H
cbt 0-500 RV	5'TGCGATGCTGAAAATCGCGACGCA3'	Y1H
cbt 450-1050Fw	5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCAAGACCCAAAAATCACCG3'	Y1H
cbt 450-1050 RV	5'TGCGATGCTGAAAATCGCGACTGTC3'	Y1H
cbt 900-1500 Fw	5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCAATAACGAAAAGGCATAGTGC3'	Y1H
cbt 9001-500 RV	5'TGCGATGCTGAAAATCGCGACATACCTCTAAAAGCGG3'	Y1H

**Taula 4. Oligonucleòtids utilitzats.** S'indica la seqüència i els experiments en que s'han utilitzat

## Anticossos

La taula 5 recull els anticossos utilitzats, juntament amb les seves característiques i procedència.

Anticossos Primaris	Característiques	Procedència
anti-GFP	Conill IQ: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology
anti- $\beta$ galactosidasa	Conill IQ: 1:1000	Cappel
anti-digoxigenina-AP	Ratolí ISH: 1:2000	Boehringer mannheim (Reinholz et al.)
anti-pH3	Conill IQ: 1:1000	Biothecnology milipore
anti-Cabut	Conill IQ: 1:40, IP: 2 $\mu$ l	Dra. Nuria Paricio
anti-myc(tag)	Ratolí WB: 1:3000	Abcam
Anticossos Secundaris	Característiques	Procedència
Ase-anti-conill-AlexaFluor555	1:200	Invitrogen
Cabra-anti-conill-AlexaFluor488	1:200	Invitrogen
Cabra-anti-conill-FITC	1:200	Jackson Immunoereserch
Ase-anti-ratolí-AlexaFluor555	1:200	Invitrogen
Cabra-anti-ratolíAlexaFluor488	1:200	Invitrogen
Cabra-anti-ratolí-POD	1:2000	Jackson Immunoereserch

**Taula 5. Anticossos utilitzats.** En les característiques s'especifica les concentracions utilitzades pels diferents assajos (IQ: immunohistoquímica, ISH: hibridació *in situ*, IP: immunoprecipitació, WB: Western Blot).

## Marcatges immunohistoquímics

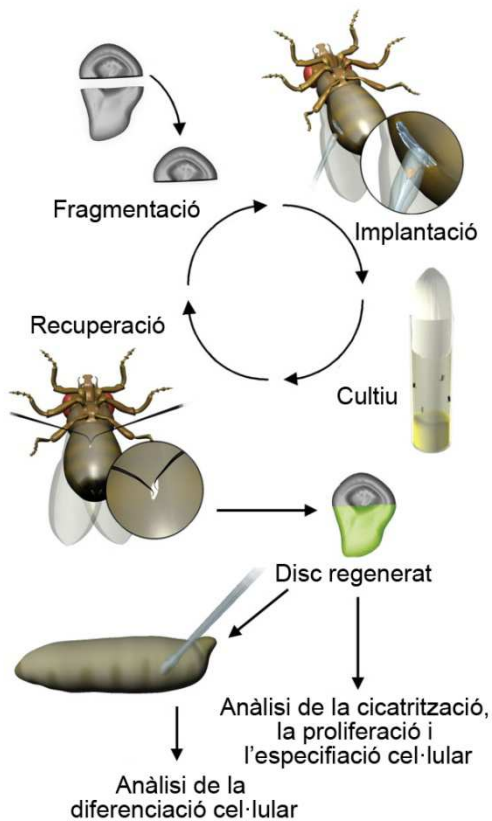
Es va utilitzar DAPI (Invitrogen) i TOPRO3 (Invitrogen) com a marcadors nuclears.

## 2. Mètodes

### Tècniques d'inducció de regeneració

#### Sistema de fragmentació i cultiu *in vivo*

El mètode d'inducció de regeneració dels discs imaginals per fragmentació i cultiu *in vivo* va ser dissenyat per Bryant (1971). Els experiments realitzats en aquest treball es van fer seguint els protocols descrits prèviament (Bosch et al., 2005) amb algunes modificacions (figura 11).

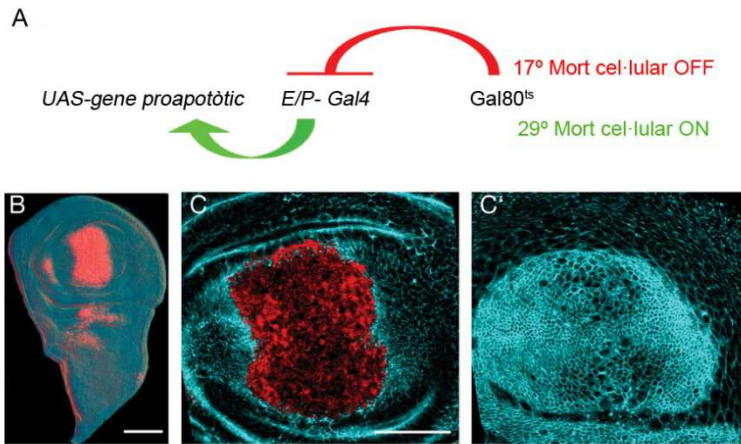


**Figura 11. Mètode d'inducció de regeneració en discs imaginals per fragmentació i cultiu *in vivo*.** Esquema (adaptat de (Bergantiños et al., 2010b)) del procediment per a induir la regeneració en els discs imaginals per fragmentació del disc i implantació en l'abdomen d'una femella. Després d'un temps determinat els discs regenerats es poden recuperar i processar per a l'anàlisi dels processos de cicatrització, proliferació i/o especificació cel·lular o ve implantar de nou en una larva en desenvolupament per a l'estudi de la diferenciació cel·lular.

Es van disseccionar els discs en PBS 1X i es van fragmentar amb agulles de tungstè en medi Shneider. A continuació es van implantar en PBS 1X mitjançant un capil·lar estirat a la flama. Es van recuperar els discs a 24, 48 o 72h de regeneració i es van processar.

### Sistema de mort cel·lular induïda (CDIR)

El sistema de mort induïda és un mètode que s'ha desenvolupat recentment (Bergantiños et al., 2010a; Smith-Bolton et al., 2009) que consisteix en promoure mort cel·lular en una regió del disc mitjançant la combinació dels sistemes Gal4-UAS i Gal80<sup>ts</sup> (Zeidler et al., 2004). Aquest sistema activa l'expressió del gen que es troba a 3' de la seqüència *UAS* en una regió concreta que estarà determinada per el promotor del factor Gal4. El Gal80<sup>ts</sup> és un inhibidor de la proteïna Gal4 dependent de temperatura. El mètode d'inducció de mort cel·lular (CDIR) consisteix en sobreexpressar un gen proapoptòtic en una regió específica durant un període de temps determinat. Així quan els individus es cultiven a 17°C el Gal80<sup>ts</sup> és actiu, bloqueja l'activitat de la proteïna Gal4 i no s'expressa el gen proapoptòtic. Quan es canvia la temperatura de cultiu de 17 a 29°C el Gal80<sup>ts</sup> deixa de ser actiu, el Gal4 pot unir-se a la seqüència *UAS* i indueix l'expressió del gen propapotòtic (figura 12).



**Figura 12. Mètode d'inducció de mort cel·lular (CDIR).** Esquema (adaptat de (Bergantiños et al., 2010b)) del procediment per a induir la regeneració en els discs imaginals amb el mètode CDIR. (A) Sistema d'inducció de mort cel·lular. E/P indica *enhancer* o promotor. (B) Imatge d'un disc imaginal d'ala *UAS-rpr; salm-Gal4; Gal80<sup>ts</sup>* després de 10h d'inducció (a 29°C) de l'expressió del gen proapoptòtic *rpr*. En vermell es pot veure el marcatge de Caspasa3, indicador de mort cel·lular i en blau la tinció d'actina. (C) Secció basal de l'ampliació de la regió del primordi de l'ala, s'observa la zona de mort i les restes cel·lulars. (C') Secció apical de la mateixa regió que C, s'observa com a la part apical l'epiteli tanca la ferida.

En els experiments realitzats en aquest treball es van mantenir les larves a 17°C, a les 96-100 hores de desenvolupament es van canviar els individus a 29°C i es van mantenir durant 16 hores. Tenint en compte la *perdurance* del Gal80<sup>ts</sup> (unes 6 hores) això suposa 10 hores d'inducció de la transcripció del gen proapoptòtic. Els promotors utilitzats van ser *salm-Gal4* (promotor de *salm* que promou l'expressió en el domini de *salm* del disc d'ala) i *spalt<sup>PE</sup>-Gal4* (un *enhancer* del gen *salm* que promou l'expressió només en el domini de *salm* del primordi d'ala). El gen proapoptòtic seleccionat va ser el gen *reaper* (*rpr*).



## Estudi fenotípic d'ales adultes

Es van fixar els individus adults durant 24h (glicerol:etanol 1:2) i es van disseccionar i muntar en àcid làctic: etanol (6:5). Les dades obtingudes es van representar segons les mides relatives agafant com a referència la mida de les ales salvatges o control.

## Tècnica de manipulació de DNA plasmídic

Les tècniques de DNA recombinant emprades en aquest treball es troben descrites per Sambrook (Sambrook et al., 1989).

Les cèl·lules DH5 $\alpha$  es van sotmetre a un xoc tèrmic (1 minut a 42°C) per tal de promoure la transformació seguint els protocols habituals. Es van seleccionar les colònies segons la resistència del vector i en els casos en que era adient mitjançant el sistema X-gal IPTG. Posteriorment es va obtenir el DNA plasmídic amb un Kit comercial (Miniprep KIT de Quiagen) seguint les indicacions facilitades per el fabricant.

## Tècniques d'anàlisi de DNA

### Immunoprecipitació de cromatina i seqüenciació (ChIP-Seq)

La tècnica del ChIP permet analitzar si una proteïna es localitza sobre una regió de DNA concreta. En aquest treball es van realitzar ChIPs a partir de 1600 discs imaginals d'ala de larva III salvatges i vam analitzar la localització de Cbt per seqüenciació seguint els protocols descrits (Perez-Lluch et al., 2011).

Els discs es van fixar mitjançant 5 incubacions de 5 minuts en una solució de crosslinking (1,8% de Formaldehid, 50mM Hepes pH 8, 1mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 100 mM NaCl). Es va utilitzar una solució stop durant 10 minuts per aturar la fixació (PBS, 0,01% Tritó X-100, 0.125 M glicina, la glicina inactiva les restes de formaldehid). I es van

fer rentats de 10 minuts amb tampó A (10 mM Hepes 8, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,25% Triton X-100) i tampó B (10mM Hepes 8, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 200 mM NaCl, 0,01 Tritó X-100).

Les mostres es van incubar en 700µl de tampó de sonicació (1% SDS, 50 mM Tris HCL pH 8, 10mM EDTA) i es van sonicar en un sonicador Branson fent 12 pols amb una amplitud del 35%. Posteriorment es van bloquejar amb 35µl de proteïnaA-sefarosa (GE-healthcare) i la immunoprecipitació es va fer durant 3h a 4°C amb tampó IP (1% tritó, 150 mM NaCl, 2mM EDTA 20 mM Tris HCl pH 8.0), 2µg d'anticòs i 30µl proteïnaA-sefarosa bloquejada prèviament amb IP al 1%de BSA (2h a 4°C). Després les mostres van ser rentades i decrosslinkades seguint els protocols habituals.

Finalment les mostres es van quantificar i preparar per a la seqüenciació seguint les indicacions de la casa comercial Solexa/Illumina en el servei d'ultraseqüenciació del Centre de Regulació Genòmica (CRG). Es van seqüenciar 36 nucleòtids per seqüència des d'un extrem (single end) que van produir 38257052 lectures de les quals 176262361 es van poder mapar en el genoma de *Drosophila* (*Drosophila melanogaster* Dm3).

## Tècniques d'anàlisi de RNA

### Síntesi de sonda de cabut

La sonda de cbt es va sintetitzar a partir del plasmidi pBluescript (pBSK) amb el cDNA de la isoforma *cbt-RA* clonat mitjançant els enzims de restricció XhoI i NotI, cedit per la Dra. Paricio. Primer es van linaritzar 10 µg de DNA plasmídic amb els enzims Sall (sonda *sense*) i BamHI (sonda *antisense*), el resultat de la digestió es va purificar amb el kit *Quiaquick PCR* (Qiagen). Per a la transcripció *in vitro* es van utilitzar les DNA polimerases T3 (sonda *sense*) i T7 (sonda *antisense*) (Promega) i dNTPS marcats amb digoxigenina (Dig RNA labelling Mix Roche) Les condicions i quantitats de reactiu es van establir seguint les recomanacions de la casa comercial.

Posteriorment es va tractar la mostra amb DNAsa (Zymo Reserch) per tal d'eliminar el cDNA i es va purificar el RNA sintetitzat amb el kit d'extracció *Mini RNA Isolation Kit* (Zymo-Reserch) seguint les instruccions del fabricant. Finalment es va hidrolitzar la sonda amb un tractament de carbonate buffer 2X a 65°C durant 40 minuts y es van purificar novament les mostres

### Hibridació *in situ*

La hibridació *in situ* es va fer seguint el protocol descrit prèviament (Sturtevant et al., 1997). Les larves es van dissecionar i fixar 20 minuts amb una solució de formaldehid (FA) al 4% en PBS1X i 20 minuts en FA al 4% en PBTween (PBS 1X, Tween20 0,1%), es van rentar amb PBTween i deshidratar amb diferents concentracions d'etanol per a congelar a -20°C. Posteriorment es van rehidratar les mostres i fixar novament amb FA4% en PBTween. Es va realitzar un tractament de Proteinasa K (50µg/ml) durant 2 minuts i dos tractaments de glicina (2mg/ml) d'un minut. Es van rentar les mostres amb PBTween i es van tornar a fixar amb FA4% en PBTween.

A continuació es va fer una prehibridació de 10 minuts a 55°C amb una solució 1:1 PBTween i solució A (100µg/ml esperma de salmó desnaturalitzat, 50µg/ml heparina, 50% Formamida, 5x SSC (3M NaCl, 0,3M Citrat de sodi),0.1% Tween20) i 30-60 minuts a 55°C amb solució A. La hibridació es va fer a 55°C durant tota la nit amb una solució de sonda de *cbt* diluïda en solució A (1:200). Després es van fer una sèrie de rentats amb solució B (50% Formamida, 5x SSC,0.1% Tween20) i PBTween. Les mostres es van incubar 1,5 hores amb un anticòs anti-digoxigenina, es van rentar i incubar amb AP buffer (100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl pH 9,5, Tween20 0,1%) i finalment es van revelar amb un preparat dels reactius NBT/BCIP (Reinholz et al.) o bé amb les Fast Red tablets (Reinholz et al.) per a les hibridacions *in situ* fluorescents.

## Extracció de RNA i RT-PCR

Les extraccions de RNA dels discs imaginals d'ala es va realitzar mitjançant el kit d'extracció Mini RNA Isolation Kit (Zymo-Reserch) seguint les indicacions del fabricant.

Per a realitzar la retrotranscripció es van utilitzar 0,5 µg (per a l'experiment de discs regenerats) o 1µg (per a l'experiment de sobreexpressió de *cbt* i els mutants de *N*). Es va utilitzar la retrotranscriptasa M-MLV (Promega) seguint les indicacions del fabricant.

## Quantificació de RNA per *Quantitative RealTime PCR* (qRT-PCR)

Les PCR quantitatives es van realitzar utilitzant els termocicladors 7700 ABI PRISM, Applied Biosystems (discs regenerats) i 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems. En el cas dels discs regenerats es van utilitzar sondes i oligonucleòtids TaqMan dissenyades per Applied Biosystems i una Master Mix per a la reacció (Applied Biosystems), en la resta de casos es van dissenyar oligonucleòtids amb el programa Oligo6 i es va utilitzar Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) per a la reacció. En tots els casos es van realitzar un mínim de dues rèpliques biològiques per a cada experiment. Les dades van ser analitzades mitjançant el mètode  $\Delta\Delta C_t$  seguint les indicacions de la casa comercial. En el cas dels discs regenerats es van utilitzar com a gens control: *dia*, *mRpL9* i *ptp61F* (que no presentaven canvis de nivell d'expressió en els microarrays de discs regenerats) i es van normalitzar les dades utilitzant el programa geNorm (Anstaett et al., 2010). En el cas de la sobreexpressió de *cbt* es va utilitzar *sply* com a gen control (tot i que els resultats eren reproduïbles també amb els controls *fis-1* i *mRpL40*, cap dels tres gens és gen diana de *cbt* i tots s'expressen en el disc d'ala). En el cas dels mutants de *N* es va utilitzar *ash2* com a control negatiu per a la normalització (aquest gen no presenta canvis d'expressió en

microarrays de cèl·lules S2 amb guany i pèrdua de funció de N (GSE2863).

## Microarrays d'expressió

La hibridació i normalització dels microarrays de dos colors va ser realitzada prèviament al laboratori (Blanco et al., 2010). Els microarrays es van dissenyar a la Plataforma de Transcriptòmica (SCT-PCB Universitat de Barcelona) utilitzant la versió *Drosophila genome Oligo Set 1.1* (Operon Biothechnologies Inc., Huntsville, AL., USA). Es van realitzar 2 extraccions de RNA independents de discs regenerats a 0, 24 i 72h, per fer comparacions de 0-24h i de 24-72h. Es van hibridar 4 microarrays per cada condició. Es van obtenir els resultats amb l'aparell Axon4000B scanner i el programa GenePix Pro6 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA). Les dades es van analitzar amb el paquet *Limma* del software Bioconductor, utilitzant els mateixos criteris per a totes les mostres. Finalment es van normalitzar utilitzant el mètode *mad* de OLIN. Es van considerar els gens que presentaven canvis d'expressió d'un mínim de l'ordre de 2 cops el valor inicial ( $p$ -valor < 0.05). Les dades crues i normalitzades i els detalls sobre la hibridació es poden consultar a la base de dades Gene Expression Omnibus (Adkins et al.) (Edgar et al., 2002) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>] amb el numero d'accés GSE17408.

## Tècniques d'anàlisi de proteïnes

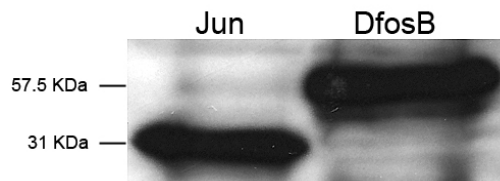
### Tincions immunohistoquímiques en discs imaginals

Els discs imaginals van ser fixats en paraformaldehid al 4% en PBS 1X (10-20 minuts), es van bloquejar amb una solució de bloqueig (PBS 1X, 0,3% Tritó X-100, 2% BSA) durant 1 hora i es van incubar tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari diluït en solució de bloqueig. Després de 3 rentats amb PBT (PBS 1X, 0,5% Tritó X-100) i d'un nou bloqueig (30 min) es van incubar les mostres amb l'anticòs secundari

2-3h. Finalment es van rentar les mostres amb PBT i es van muntar les preparacions en solució *antifade* en glicerol/PBS (SlowFade Antifade kit, Invitrogen).

### Electrophoretic movility shift assay (EMSA)

Per a l'assaig EMSA es van sintetitzar les proteïnes DFos-B i Jun *in vitro* a partir de plasmidis ((Pearson et al., 2009), cedits per el Dr. McGinnis) amb el kit quick-coupled transcription/translation system TNT (Promega) seguint les indicacions del fabricant. Vam comprovar la síntesi de les proteïnes per electroforesi en gel d'acrilamida i western blot amb un anticòs anti-myc(tag) (figura 13).



**Figura 13. Síntesi *in vitro* de les proteïnes Jun i DfosB.** Resultat del WB amb l'anticòs anti-myc(tag). Es van córrer 5  $\mu$ l de proteïna sintetitzada en cada cas. Al carril de l'esquerra Jun i a la dreta DfosB.

Posteriorment 500 pmols de cada oligonucleòtid de cadena simple es van incubar en tampó d'hibridació (10mM Tris base pH7,5, 20mM NaCl) a 95°C per obtenir fragments de DNA de doble cadena. Després es van marcar amb  $[P^{32}]$ ATP (Perkinelmer) mitjançant la polynucleotid kinasa T4 (New England BioLabs) 30 minuts a 37°C. Les dobles cadenes de DNA marcades es van purificar amb el kit QIAquick Nucleotid Removal kit (Qiagen). De 10 a 20 fmols de DNA marcat radioactivament i 1  $\mu$ l de proteïna sintetitzada *in vitro* van ser incubats en tampó d'unió (25mM Hepes pH7,9, 100mM KCl, 1mM DTT, 1% polyvinylalcohol, 1% Nonidet P-40, 0,1%BSA, 10% glicerol, 20 $\mu$ g/ml poly(dI-dC) 20 minuts a 4°C. Finalment les mostres es van córrer en un gel d'acrilamida 4% i 0,5X TBE. El gel es va deshidratar i es va autoradiografiar amb el Fosfoimager.

## Electroforesi en gel d'acrilamida (SDS-PAGE)

Vam utilitzar gels amb un 5% d'acrilamida a la part concentradora i diferents percentatges d'acrilamida (8%, 10%) a la part separadora del gel. Les mostres es van incubar a 95°C 3 minuts en tampó de càrrega de proteïnes (PLB) amb  $\beta$ -mercaptoetanol (1,5M). Es va utilitzar tampó Laemmli (0,1% SDS, 192mM glicina, 25mM Tris base pH 8,3) per a córrer les mostres. Com a marcador de pes molecular vam utilitzar el marcador Precision Plus Protein Standards All blue (BioRad).

## Western blot

Les proteïnes separades en el gel d'acrilamida es van transferir a una membrana de PVDF (prèviament activada amb metanol) tota la nit a 4°C a 50V en tampó de transferència (192mM glicina, 25mM Tris base pH , 15% metanol). La membrana va ser bloquejada (5% llet en pols, 0,05% de Tween20 en PBS) i incubada amb l'anticòs primari diluït en PB Tween 0,05% durant 1,5h. Després de rentats amb solució de bloqueig es va incubar amb l'anticòs secundari i es va rentar novament. Finalment es va revelar la membrana amb el kit Chemiluminescence Detection kit EZ-ECL (Biological industries) i es va exposar amb films d'autoradiografia SuperRX (Fujifilm). Els films es van revelar amb una reveladora automàtica (Fujifilm FPM-100A).

## Anàlisi d'imatges

Les imatges confocals van ser obtingudes amb els microscopis confocals Leica SP2 i SPE, mentre que les imatges de camp clar van ser obtingudes amb el microscopi Leica DMLB. Totes les imatges es van processar i quantificar amb els programes ImageJ i Adobe Photoshop 10.0.

## Anàlisi bioinformàtica

### Anàlisi funcional

Per a les anàlisis funcionals es van utilitzar les bases de dades AmiGO (Carbon et al., 2009) [<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>] i Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (Jiao et al., 2012) [<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>]. Aquestes eines detecten l'enriquiment de categories funcionals Gene Ontology (GO, (Consortium, 2008)) associades a un conjunt de gens. Per a validar estadísticament aquests enriquiments els algoritmes consideren els enriquiments de categories funcionals GO en tot el genoma com un segon conjunt de gens i es comparen els dos enriquiments estadísticament. En tots els casos només es van considerar aquelles categories que presentaven p-valors  $< 0.05$ . Per a determinar quins gens del conjunt de gens diana de Cbt pertanyen a vies de senyalització vam utilitzar les dades de Gene Ontology (GO, (Consortium, 2008)), de la base de dades Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway (KEGGPATHWAY) [<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>] i la bibliografia.

### Anàlisi de motius

Per a la cerca de motius es van utilitzar les bases de dades Jaspar (Portales-Casamar et al., 2010) i Transfac (Matys et al., 2003) i el programa MatScan (Blanco et al., 2006) que dona una llista de l'enriquiment de factors coneguts en un conjunt de seqüències. Per a la cerca de possibles motius de Cbt vam utilitzar el programa Multiple *Em for Motif Elicitation* (MEME) (Bailey and Elkan, 1994) [<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>]. Aquest algoritme busca seqüències al atzar conservades dins de un conjunt de seqüències de DNA, destacant aquelles seqüències que tenen en comú.



## Anàlisi del ChIPSeq

Es va utilitzar el programa PeakSeq (Rozowsky et al., 2009) per a normalitzar les dades obtingudes, aquest programa permet identificar les regions significativament enriquides d'un Chip-Seq comparant-les amb una mostra control o input (sense immunoprecipitació). Només es van considerar aquells pics que presentaven un p-valor  $< 1^{-40}$ . Es van obtenir 1951 seqüències diana de Cbt. El perfil de pics i seqüències diana de Cbt es van visualitzar com a pistes de la base de dades de University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser (Kuhn et al., 2009). Les dades crues i normalitzades del ChIP-Seq de Cbt es poden consultar a la base de dades GEO amb el número d'accés GSE40958.

Per a descriure la posició que ocupa Cbt respecte els seus gens diana es va dissenyar un algoritme que calculava la distància entre les seqüències diana de Cbt i el inici de transcripció (TSS) més pròxim a 3' o 5'. Mitjançant les seqüències de referència RefSeq (Pruitt et al., 2007) vam determinar els gens que presentaven Cbt en el seu promotor (de -1000 a +100 parells de bases (pb)) i/o en el seus introns. Aquest anàlisi ens va permetre descriure 2060 gens com a gens diana de Cbt.

Per a l'estudi dels nivells d'expressió en el disc d'ala dels gens diana de Cbt i les marques d'histones dels seus promotors vam emprar dades de RNA-Seq de disc d'ala (Pérez-Lluch dades no publicades) i dels ChIP-Seqs de H3K4me3 i H3K27me3 (Perez-Lluch et al., 2011), respectivament.

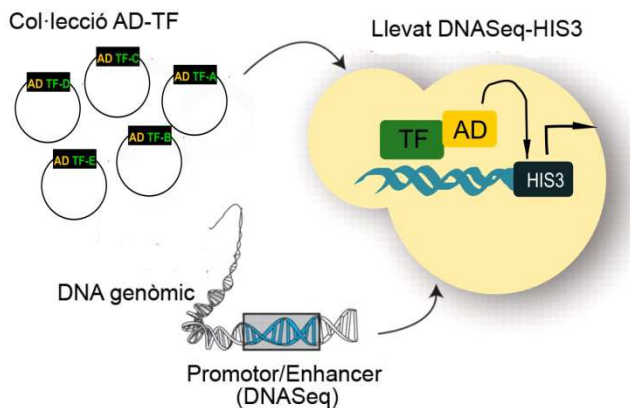
Les interseccions entre els gens diana de Cbt i els de Sin3A i GAGA Factor (GAF/Trl) es van calcular utilitzant les dades del projecte modENCODE (Negre et al., 2011). Per a determinar la posició d'aquests factors respecte els TSS dels seus gens diana es va fer una representació gràfica de la sobreposició dels pics de cada factor localitzats en promotors respecte el TSS dels gens diana comuns.

## Estudi a gran escala *Yeast-One Hybrid (Y1H)*

Per a realitzar l'estudi de Y1H vam seguir les indicacions descrites prèviament (Hens et al., 2011). Vam clonar en vectors pMW2 (PBDHis), amb els enzims de restricció NotI i XhoI, 3 seqüències independents de 600 bp que cobreixen uns 1500 parells de bases del promotor de *cbt* solapant-se entre elles: seqüència 1 (Seq 1, chr2L:479,683-480,252), seqüència 2 (Seq 2, chr2L:479,683-480,252) i seqüència 3 (Seq 3, chr2L:480,583-481,165). D'aquesta manera les seqüències de DNA estaven insertades a 5' del gen de la histidina3 (HIS3).

Vam lineartitzar les construccions amb l'enzim AflII (1h a 37°C) per tal de permetre la integració del plasmidi en el genoma del llevat. Vam transformar llevats competents per xoc tèrmic amb els plasmidis lineartitzats, seguint protocols estàndards, i els llevats resultants es van deixar créixer en plaques selectives per histidina (H-). De les colònies obtingudes vam seleccionar de 6 a 8 colònies per cada construcció i les vam fer créixer en medis selectius (H- amb inhibidor d'histidina 3-amino-1,2,3-trizole a diferents concentracions 10, 20 i 50 mM). L'anàlisi del creixement de les colònies en aquest medi permet seleccionar les colònies que presenten una integració òptima del plasmidi en el genoma (nivells basals d'expressió d'histidina).

Es va utilitzar per a l'experiment de Y1H a gran escala una col·lecció AD-TF de 722 factors de transcripció (96% dels factors de transcripció descrits al genoma de *Drosophila*). Aquests clons contenen el factor de transcripció clonat en pauta amb un domini d'activació (AD). La tècnica de Y1H consisteix en introduir en una mateixa cèl·lula una proteïna amb un domini d'activació i una seqüència de DNA a 5' d'un gen selector. El creixement d'aquesta cèl·lula en un medi selectiu (deficient per a la proteïna codificada per el gen selector) només es produeix si la proteïna amb el domini d'activació s'està unint a la seqüència de DNA promovent l'expressió ectòpica del gen selector (figura 14).



**Figura 14. Tècnica Yeast One Hybrid (Y1H).** La tècnica del Y1H es basa en transformar soques de llevat amb factors de transcripció (TF) fusionats a un domini d'activació (AD). Aquestes soques contenen una seqüència promotora o enhancer (DNaseq) a 5' d'un gen selector (HIS3) integrada en el genoma. Si el factor de transcripció té capacitat d'unir-se a la seqüència DNaseq el domini AD activarà l'expressió del gen HIS3 permetent el creixement del llevat en un medi selectiu.

Mitjançant una plataforma robòtica de transformació es van transformar llevats que portaven les seqüències 1, 2 o 3 insertades en el genoma amb cadascun dels 722 factors de transcripció de la col·lecció AD-TF. Les cèl·lules transformades es van deixar créixer en un medi permissiu (-H -Trp, només selecciona les colònies cotransformades). Un cop les colònies van estar formades es van replaquejar, mitjançant un robot d'array, per quadruplicat en medis permissius i medis selectius (amb diferents concentracions de 3-amino-1,2,3-trizole). Es van fer dues rèpliques de cada experiment a gran escala.

Després d'una setmana a 37°C les plaques es van fotografiar i analitzar amb el programa TIDY. Aquest software identifica les 4 colònies d'una mateixa transformació, denomina el factor de transcripció, compara el creixement mesurant intensitat i nombre de píxels tenint en compte la resta de la placa i assigna un valor

estadístic (p-valor) a la interacció DNA proteïna. Es van considerar només aquelles interaccions que eren positives en les dues rèpliques i que presentaven diferències significatives (p-valor < 0,05).



## RESULTATS



## Capítol I: Estudi del gen *cabut* en la regeneració del disc d'ala



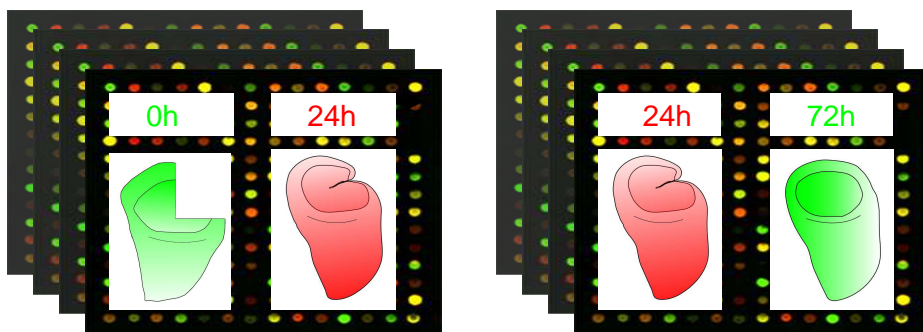


## 1. Anàlisi dels canvis d'expressió durant la regeneració dels discs d'ala

La regeneració dels discs imaginals de *Drosophila melanogaster* consta de tres processos diferenciats: Cicatrització, proliferació i formació del patró. Tal i com s'ha comentat, estudis previs mostren la rellevància que certes vies de senyalització com JNK, Wg o Dpp tenen durant aquest procés. No obstant això hi ha poques evidències de quin paper tenen i quins gens estan regulant. Per determinar els gens que participen en aquest procés a *Drosophila*, hem analitzat el perfil d'expressió de discs a diferents temps de regeneració.

### Transcriptoma dels discs regenerants

Per tal d'analitzar els canvis de regulació de l'expressió gènica que es produeixen durant la regeneració dels discs imaginals, es van realitzar 2 microarrays de dos colors a diferents temps de regeneració. En aquest estudi es van comparar per una banda els perfils d'expressió de discs d'ala de 0 i 24h i per l'altre de 24h i 72h (Figura 15). També es van dur a terme els mateixos experiments amb discs no tallats com a controls negatius (Blanco et al., 2010).



**Figura 15. Disseny dels microarrays amb discs regenerats.** Microarrays realitzats amb els discs regenerats comparant el perfil d'expressió de discs d'ala en diferents estadis del procés de regeneració: entre 0 i 24h i entre 24 i 72h.

Tots els microarrays van ser normalitzats seguint el mateix procediment. El nombre de gens que presentaven canvis d'expressió significatius (un canvi d'expressió relatiu  $>2$  i  $p < 0.05$ ) es recull a la taula 6.

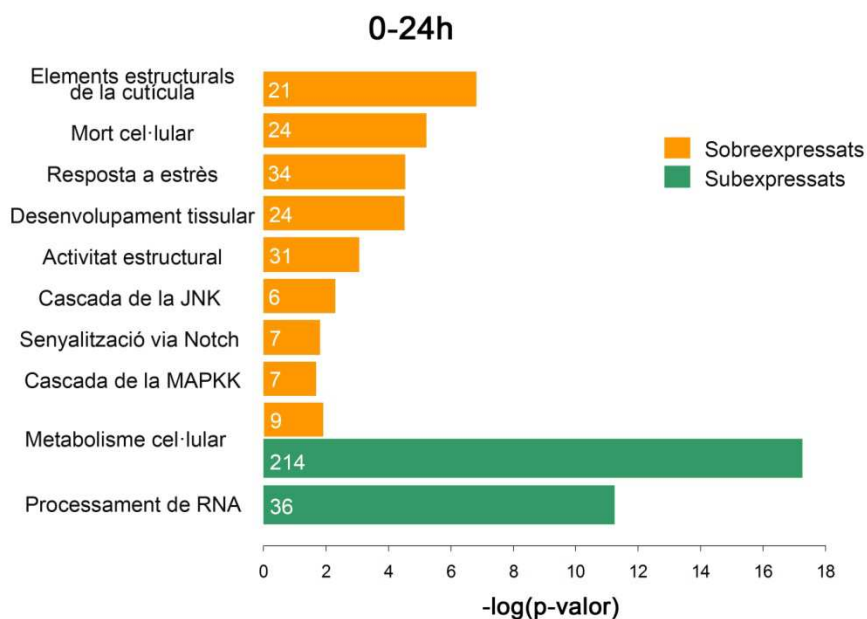
	C0→C24	C24→C72
Gens ↑	607	116
Gens ↓	576	165
TOTAL	1183	281

**Taula 6. Número total de gens amb canvis d'expressió durant el procés de regeneració.** Gens sobreexpressats (↑) i subexpressats (↓) de 0 a 24h de regeneració (C0→C24) i de 24 a 72h (C24→C72).

Cal destacar que durant el primer període de temps el nombre de gens amb expressions modificades és més elevat que en el següent període, la qual cosa apunta a que durant aquestes primeres 24h es requereixen més canvis a nivell de regulació de la transcripció.

### Anàlisi funcional dels gens

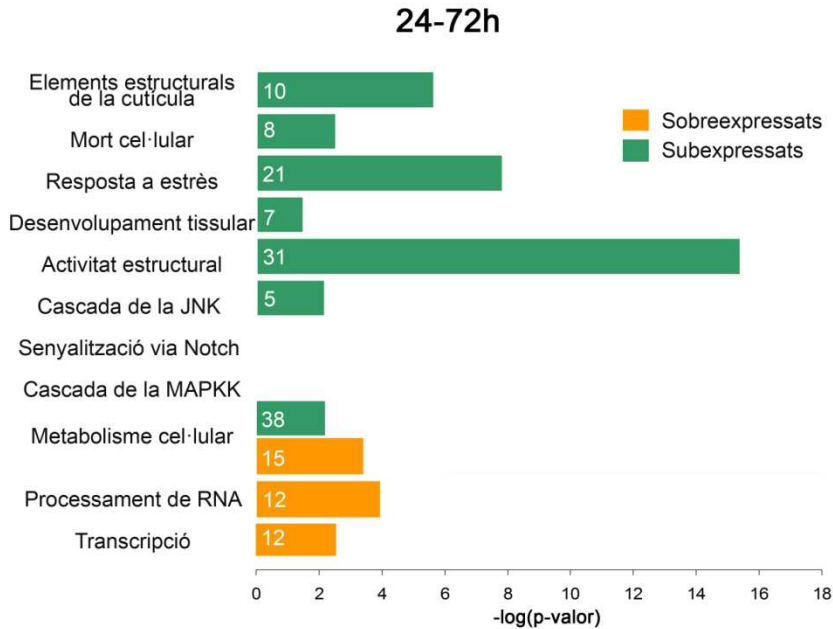
Un cop obtinguts els gens sobreexpressats i subexpressats a cada microarray es va analitzar a quines categories funcionals pertanyien aquests gens. Utilitzant l'algoritme AmiGO (Carbon et al., 2009) es va obtenir un llistat de categories de Gene Ontology (GO) (Consortium, 2008) que es trobaven enriquides en els conjunts de gens. La figura 16 mostra algunes de les categories estadísticament significatives ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) a les quals pertanyen els 607 gens sobreexpressats (taronja) i els 576 subexpressats (verd) de 0 a 24h.



**Figura 16. Categories funcionals enriquides en el conjunt de gens de 0 a 24h.** Categories funcionals enriquides en el conjunt de gens estudiat en comparació amb el genoma de *Drosophila*. Es mostren algunes de les categories estadísticament significatives ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) a les quals pertanyen els gens sobreexpressats (taronja) i subexpressats (verd) de 0-24h. La longitud de la barra indica la significació ( $-\log(p\text{-valor})$ ). El nombre a l'interior de les barres fa referència al número de gens que pertanyen a cada categoria.

S'observa com durant les primeres 24h del procés de regeneració s'incrementa l'expressió de gens lligats a mort cel·lular, resposta a estrès, desenvolupament tissular i activitats estructurals, així com gens lligats a les vies de senyalització de la JNK, N i MAPKK, vies que s'han associat prèviament a processos regeneratius en *Drosophila* i altres organismes. D'altra banda, dins dels gens subexpressats, aquesta anàlisi ens mostra un enriquiment en gens lligats a processos metabòlics i processament del RNA. Pel que fa als gens amb canvis d'expressió durant el segon període estudiat, de 24 a 72h, les categories enriquides coincideixen amb les que es van trobar de 0-24h, però en la majoria dels casos el comportament a nivell d'expressió és al revés (figura 17). Es a dir, en aquest cas els gens relacionats amb la resposta a l'estrès, el desenvolupament o la via de la JNK es troben subexpressats mentre que aquells gens que

presenten funcions associades a processos metabòlics es troben sobreexpressats, suggerint que la resposta inicial del teixit ja ha finalitzat i que s'estan restablint les funcions bàsiques en el disc.



**Figura 17. Categories funcionals enriquides en el conjunt de gens de 24 a 72h.** Categories funcionals enriquides en el conjunt de gens estudiat en comparació amb el genoma de *Drosophila*. Es mostren algunes de les categories estadísticament significatives ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) a les quals pertanyen els gens sobreexpressats (taronja) i subexpressats (verd) de 24-72h. La longitud de la barra indica la significació ( $-\log(p\text{-valor})$ ). El nombre a l'interior de les barres fa referència al número de gens del grup que pertanyen a cada categoria.

Cal destacar que entre els gens sobreexpressats durant ambdós períodes de temps trobem un enriquiment de gens relacionats amb la regulació de la transcripció, entre els quals hi ha diversos factors de transcripció com Arm, Cbt o Medea (Med) i reguladors de la cromatina com Abasent or small homeotic disc (ASH2) o HDAC6. Aquest fet suggereix que durant les primeres 72h de la regeneració dels discs imaginals s'han de produir canvis a nivell de la regulació transcripcional i que aquests seran necessaris per a que es pugui acomplir correctament el restabliment del teixit perdut.

## Gens diana del factor AP-1

Un dels objectius d'aquest treball és identificar gens diana de vies de senyalització, com la via de la JNK, necessàries durant la regeneració. La via de la JNK activa l'expressió dels seus gens diana a través dels factors de transcripció Activator protein 1 (AP-1) que s'uneix a la seqüència consens TGACTCA (Lee et al., 1987). Per tal de determinar gens diana d'AP-1 entre els gens identificats en els microarrays es va realitzar una cerca computacional de llocs d'unió d'AP-1 en els promotors proximals dels gens (al voltant de 1000 parells de bases des del inici de transcripció (TSS)). Es va utilitzar l'algoritme MatScan (Blanco et al., 2006; Lee et al., 1987) per obtenir la llista dels putatius gens diana d'AP-1, seleccionant només aquells motius que es trobaven conservats en un mínim de 5 espècies de *Drosophila* i que presentaven significació (p-valor < 0.05) tenint en compte l'abundància de motius AP-1 en el genoma.

Aquest estudi va permetre descriure llocs d'unió d'AP-1 en els promotors de 21 gens sobreexpressats de 0 a 24h (taula 7). Dos d'aquests gens *AnnIX* i *Thor* també estaven sobreexpressats de 24 a 72h durant la regeneració, però no es van trobar motius AP-1 significatius en gens que només estaven sobreexpressats durant el segon període. D'altra banda dins del conjunt de gens amb canvis d'expressió de 24 a 72h es van trobar 15 gens subexpressats. Aquests resultats concorden amb el que cabria esperar de gens diana de la via de la JNK, ja que sabem que aquesta via s'activa durant les primeres hores del procés de regeneració assolint el seu punt màxim a les 12h i posteriorment disminueix la seva activitat (Bosch et al., 2005). A més cal tenir en compte que alts nivells d'activitat de la via de JNK sostinguts durant un llarg període de temps acaben provocant l'activació de processos de mort cel·lular (Adachi-Yamada et al., 1999)

Gen	0-24h	24-72h	Descripció
<i>AnnIX</i>	↑	↑	Proteïna d'unió a actina, patró D/V del disc d'ala
<i>cbt</i>	↑	↓	<i>Zn finger</i> , tancament dorsal, morfogènesi del disc d'ala
<i>CG10126</i>	↑		Proteïna d'unió a calci, neurogènesi
<i>CG10337</i>	↑	↓	
<i>CG18507</i>	↑		
<i>CG1896</i>	↑		
<i>CG3164</i>	↑		Proteïna amb activitat ATPasa
<i>CG6613</i>	↑		Proteïna d'unió a diacilglicerol, <i>Zn finger</i> , transducció de senyals
<i>CG8712</i>	↑		
<i>Cht6</i>	↑		Activitat quitina, catabolisme de quitina
<i>Edg78E</i>	↑	↓	Proteïna de cutícula
<i>galectin</i>	↑		Proteïna d'unió a galactòsids
<i>h</i>	↑		Factor de transcripció hlh
<i>msi</i>	↑		Proteïna d'unió a RNA, manteniment de cèl·lules mare
<i>nec</i>	↑		Inhibidor d'activitat endopeptidasa, resposta immune
<i>obst-E</i>	↑		Activitat quitina, catabolisme de quitina
<i>ple</i>	↑	↓	Resposta a estrès, regulació del desenvolupament
<i>sda</i>	↑	↓	Resposta a estímuls mecànics
<i>SP18</i>	↑	↓	Inhibidor d'activitat endopeptidasa, proteòlisi
<i>Thor</i>	↑	↑	Resposta a estrès, regulació de creixement
<i>Tsf3</i>	↑		Transportador transmembrana de Fe, defensa a bacteris
<i>unc-115</i>	↑		
<i>vir-3</i>	↑		Resposta de defensa a virus
<i>yellow-b</i>	↑		

**Taula 7. Gens sobreexpressats de 0 a 24h amb motius AP-1 predits en el seus promotors.** S'indica els canvis d'expressió que presenten de 0-24h i de 24-72h i una breu descripció de la funció del gen.

Les dades observades indiquen que els gens diana de la via de la JNK augmenten d'expressió durant les primeres 24h de regeneració, coincidint amb la pujada de la JNK. De fet, l'anàlisi del conjunt de gens que estan sobreexpressats de 0-24 i subexpressats de 24-72h revela

que el 12% d'aquests gens presenten motius AP-1 en el seu promotor proximal. Aquests resultats suggereixen que els gens diana de la JNK presenten una regulació transcripcional molt fina en la regeneració. Dins del conjunt de putatius gens diana de la JNK trobem gens associats a categories funcionals com resposta a estrès, resposta a estímuls, defensa immunològica i algunes categories lligades a desenvolupament del disc imaginal d'ala.

Alguns dels gens identificats es troben lligats a la via de la JNK en altres contextos. Així per exemple el gen *pale* (*ple*) s'activa en resposta a ferides a l'epiteli en embrió via JNK (Pearson et al., 2009). *cbt* està implicat en el tancament dorsal durant l'embriogènesi de *Drosophila* (procés que comparteix similituds amb el tancament d'una ferida (Martin and Parkhurst, 2004)) i està regulat per la via de la JNK (Munoz-Descalzo et al., 2005).

A partir d'aquestes dades es va escollir el gen *cbt* com a candidat per a continuar amb un estudi monogràfic sobre la funció d'aquest gen en regeneració i la seva relació amb la via de la JNK.



## 2. Expressió del gen *cabut* durant la regeneració del disc d'ala

La via de la JNK regula l'expressió de *cabut* en el disc d'ala

Coneixent que la via de la JNK podia regular l'expressió de *cbt* en embrió (Munoz-Descalzo et al., 2005) ens vam preguntar si l'activitat d'aquesta via podia regular l'expressió de *cbt* en el disc imaginal d'ala. Mitjançant hibridació *in situ* vam comprovar que l'expressió de *cbt* en el disc imaginal d'ala és lleu i ubiqua en tot el disc (figura 20A). Aquest tipus de patró fa pensar que l'expressió basal de *cbt* en el disc d'ala no està regulada per la via de la JNK, donat que no hi ha evidències que la via estigui activa a totes les cèl·lules del disc. Tanmateix si sobreactivem la via de manera ectòpica, mitjançant la sobreexpressió d'un al·lel constitutivament actiu de la JNKK *hemipterus* (*hep<sup>CA</sup>*) en el compartiment posterior del disc, observem un increment de l'expressió de *cbt* (figura C). Aquest fet demostra que la via de la JNK pot regular els nivells de *cbt* en el disc d'ala.



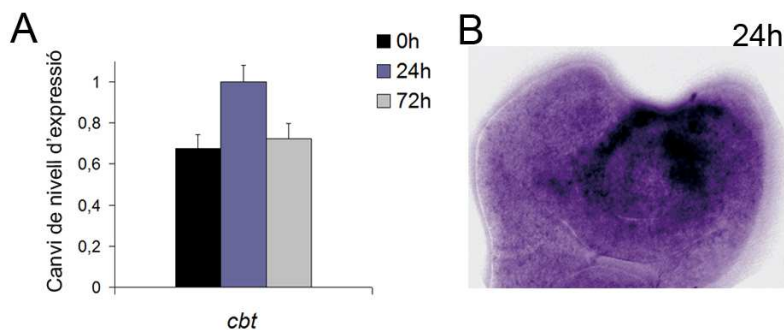
**Figura 20. Expressió de *cbt* en el disc d'ala i regulació per la via de la JNK.** Hibridació *in situ* de *cbt* en un discs d'ala de l'estadi de LIII. (A) L'expressió de *cbt* és ubiqua en tot el disc d'ala en condicions salvatges en comparació amb (B) control negatiu utilitzant una sonda *sense*. (C) Sobreexpressió de l'al·lel *hep<sup>CA</sup>* en el compartiment posterior on s'expressa engrailed (*en*) (*enGal4*, *Gal80<sup>ts</sup>/UAS-hep<sup>CA</sup>*), s'observa un increment de l'expressió del gen *cbt* en aquest compartiment.

Expressió de *cabut* durant la regeneració del disc d'ala

Les dades dels microarrays analitzats mostren un increment de l'expressió de *cbt* de 0 a 24h i una baixada de 24 a 72h. Per tal de

confirmar aquests resultats vam realitzar extraccions de RNA de discs de 0, 24 i 72h de regeneració i vam quantificar els nivells d'expressió del *cbt* mitjançant la tècnica de Real-time PCR.

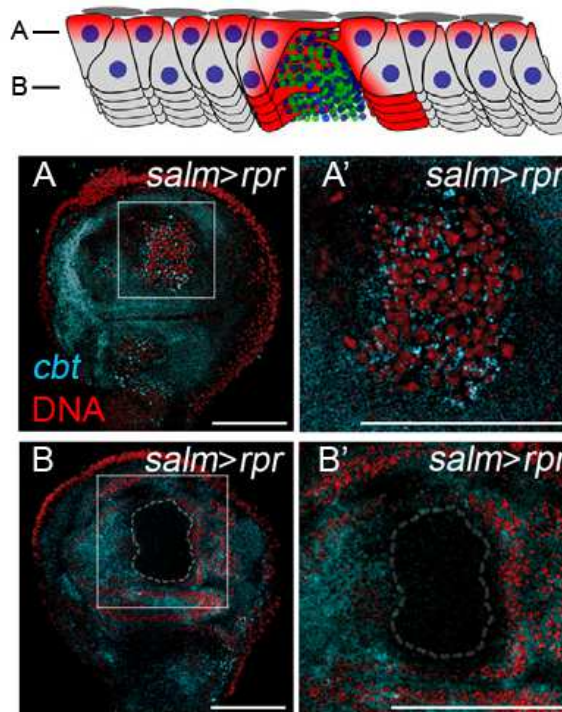
La figura 21A confirma que l'expressió de *cbt* augmenta de 0 a 24h i disminueix a les 72h. A més aquesta tècnica ens permet definir que a les 72h els nivells de *cbt* assoleixen els seus nivells basals, cosa que no ens permetien conèixer els arrays de dos colors. A més per determinar on és localitza l'augment d'expressió de *cbt* vam realitzar hibridacions *in situ* de *cbt* en discs a 24h de regeneració (figura 21B). Aquests resultats mostren un increment de l'expressió de *cbt* en les cèl·lules pròximes a la ferida, concretament a la zona del blastema. Aquest tipus d'expressió recorda l'expressió que presenta el gen diana de la via de la JNK *puc* que s'utilitza com a gen reporter de la via (Bosch et al., 2005).



**Figura 21. Expressió de *cbt* durant la regeneració del disc d'ala.** (A) Quantificació de l'expressió del gen *cbt* mitjançant Realtime PCR de discs a 0, 24 i 72h de regeneració. S'observa com l'expressió augmenta a les 24h i recupera els seus nivells basals a les 72h. (B) Hibridació *in situ* de *cbt* en discs d'ala a 24h de regeneració. Es pot veure que l'increment de l'expressió de *cbt* està localitzat als marges de la ferida, a la zona del blastema.

Finalment, per confirmar que aquesta inducció de l'expressió del gen *cbt* en regeneració és deguda a una resposta del teixit enfront al dany ocasionat i no a cap efecte produït per la tècnica de fragmentació i cultiu *in vivo* dels discs, vam analitzar el perfil d'expressió de *cbt* en discs regenerats mitjançant el mètode d'inducció de mort cel·lular (CDIR). L'expressió temporal del gen proapoptòtic *reaper* (*rpr*) en el domini del gen *spalt major* (*salm*) produeix la mort de les cèl·lules d'aquest domini que són extrudides per la part basal del disc. A la figura 22A i 22A' s'observa com a la zona apical del disc les cèl·lules

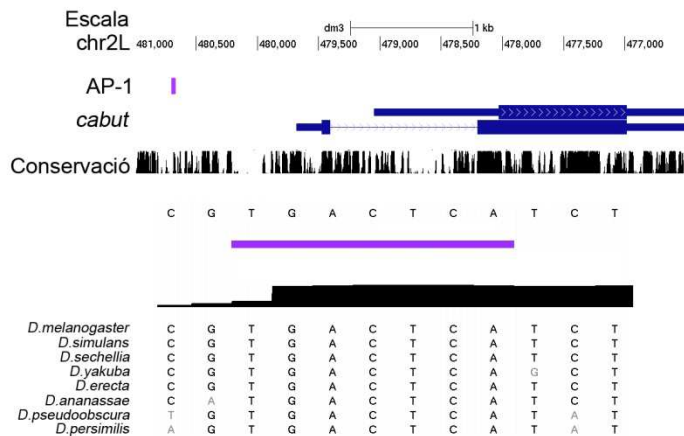
que tanquen la ferida presenten nivells d'expressió de *cbt* més elevats que els que trobem a la resta de cèl·lules situades més basalment (figura 22B i 22B'). Aquestes dades demostren que davant qualsevol procés regeneratiu del disc d'ala es produeix un augment de l'expressió del gen *cbt* en aquelles cèl·lules que duen a terme la regeneració. Els resultats obtinguts suggereixen que Cbt podria tenir un paper important per a la restauració del teixit perdut davant danys mecànics o fenòmens de mort cel·lular.



**Figura 22. Expressió de *cbt* en un disc en regeneració induïda per mort cel·lular (CDIR).** L'esquema (adaptat de Bergantiños *et al.*, 2010b) representa una projecció en l'eix Z d'un disc després de 10h d'inducció de mort cel·lular. S'observa com el tancament de la ferida es produeix primer per la zona apical del disc (A) mentre que les restes apoptòtiques són extrudides per la part basal (B). (A i B) Hibridació *in situ* fluorescent del gen *cbt* (blau) en un disc 10h CDIR; en vermell marcatge nuclear. (A) Secció confocal de la part apical del disc on s'observen les cèl·lules que estan tancant la ferida. (A') Ampliació del requadre de A. (B) Secció confocal de la zona basal del disc on es pot veure el domini de *salm* on s'ha induït la mort cel·lular (línia discontinua). (B') Ampliació del requadre de B. Comparant els nivells d'expressió del gen *cbt* en A' i B' s'observa que el marcatge és més intens en aquelles cèl·lules que es troben a la part apical del disc tancant la ferida. Barres d'escala: 50μm.

## *cbut* com a gen diana de la via de la JNK

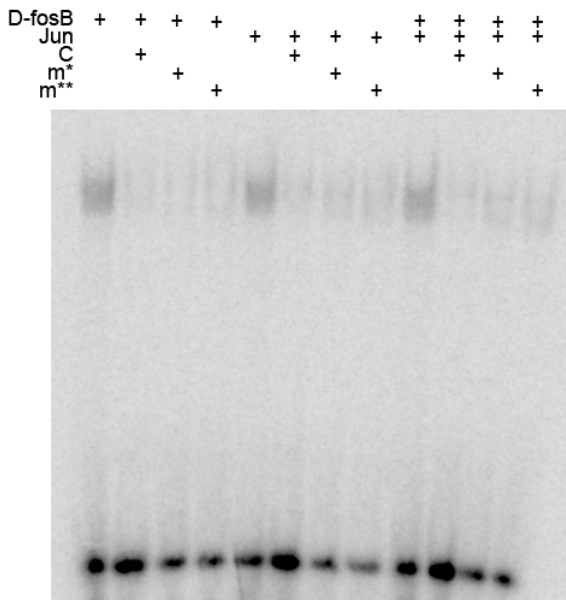
L'expressió del gen *cbt* en les cèl·lules del marge de l'epidermis durant el tancament dorsal de l'embrió depèn de l'activació de la via de la JNK (Munoz-Descalzo et al., 2005), tot i així no estava demostrat que aquesta activació es produís de manera directa ni estava descrita en altres teixits. Donat que el promotor proximal de *cbt* presenta un lloc d'unió d'AP-1, es va voler comprovar la capacitat del factor AP-1 d'unir-se a aquest motiu descrit. Aquest motiu AP-1 es troba localitzat aproximadament a uns 1000 pb del lloc d'inici de transcripció de la isoforma A de *cbt* en una regió que presenta alta conservació dins de la família *Drosophilidae* (figura 18).



**Figura 18. Seqüència d'unió d'AP-1 del promotor de *cbt*.** A la part superior representació de la localització en el genoma de l'AP-1 (requadre lila) respecte el gen *cbt*. A la part inferior seqüència exacte del motiu d'unió AP-1 i la seva conservació en diferents espècies de *Drosophila*.

Per tal de comprovar la capacitat d'unió del factor AP-1 a la seqüència descrita en el promotor de *cbt* vam realitzar un assaig EMSA que permet detectar la unió entre proteïnes i una seqüència concreta de DNA. Tal i com s'havia fet per confirmar altres gens diana d'AP-1 (Pearson et al., 2009) es van sintetitzar *in vitro* les proteïnes Jun i D-fosB i es van combinar amb la seqüència de DNA del promotor de *cbt* que conté el motiu d'unió d'AP-1. El resultat d'aquest assaig mostra que tant Jun com D-fosB individualment (per tant formant homodimers) com combinats (formant heterodimers) tenen capacitat

d'unir-se a la seqüència AP-1 del promotor de *cbt* provocant un retard durant l'electroforesi, degut al pes molecular de les proteïnes (figura 19). Per tal de comprovar l'especificitat d'aquesta unió vam realitzar dos controls, el primer un assaig de competitivitat (amb grans quantitats de la mateixa seqüència de DNA sense marcar) i el segon amb seqüències que presentaven mutacions. En ambdós casos el retard observat en el gel es perd, confirmant així l'especificitat d'unió entre les proteïnes i la seqüència AP-1 (figura 19, carrils positius per C i m respectivament).



**Figura 19. Assaig EMSA amb Jun i D-fosB i la seqüència AP-1 del promotor de *cbt*.** Imatge del gel on s'observa el retard produït per la unió entre les proteïnes D-fosB i/o Jun a la seqüència de DNA del promotor de *cbt*. El signe + indica la presència de proteïna i el tipus de seqüència utilitzada. C indica assaig de competitivitat i m mutació en la seqüència de l'AP-1.

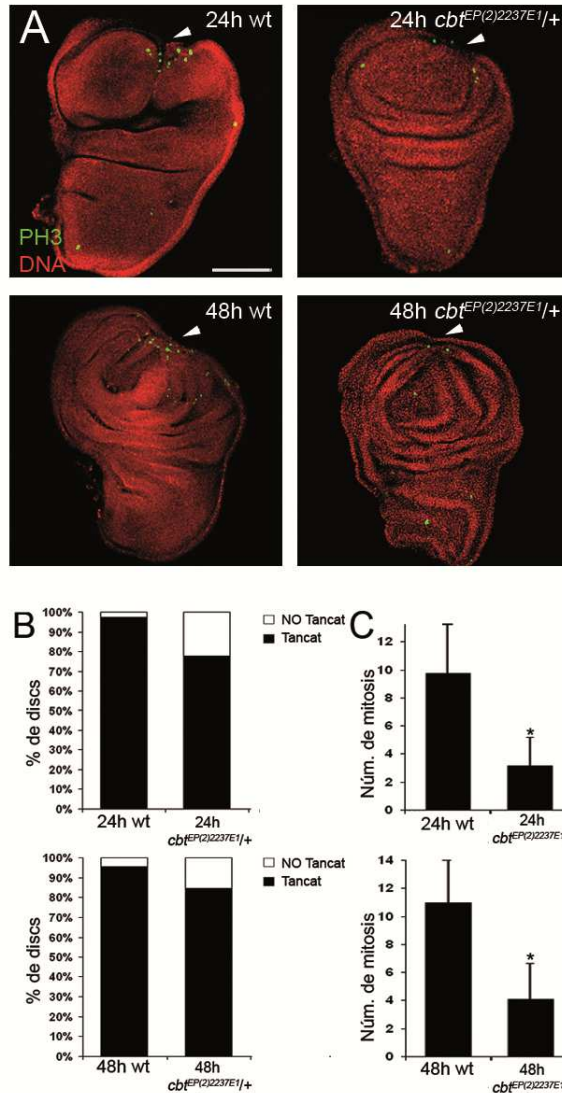
### 3. Funció de Cabut durant el procés de regeneració

La dinàmica d'expressió de *cbt* i la seva localització durant la regeneració del disc d'ala apunten a que aquest factor de transcripció podria tenir-hi un rol important en aquest procés.

#### Cabut està implicat en el tancament de la ferida

Tal i com s'ha comentat després d'una lesió els discs imaginals han de patir 3 processos diferenciats per aconseguir una completa regeneració: el tancament de la ferida, el restabliment del teixit perdut mitjançant la divisió cel·lular i la restauració del patró. Per tal de determinar el paper del factor de transcripció Cbt durant la regeneració del disc d'ala vam analitzar discs provinents de soques mutants de *cbt* després de fragmentar-los i mantenir-los en cultiu *in vivo* durant 24 i 48h (figura 23). Degut a la importància que té aquest gen durant l'embriogènesi la majoria dels individus mutants homozigots per *cbt* moren abans d'arribar a l'estadi de LI, és per això que els individus utilitzats per a realitzar aquests experiments eren mutants en heterozigosi, la qual cosa ens permet tenir un fons mutant sensibilitzat tot i que no presenti una pèrdua total de l'expressió del gen.

El primer que vam analitzar va ser la capacitat de cicatritzar que presenten els discs. Tal i com es pot observar en la figura 23 en condicions normals més del 90% dels discs presenten un tancament correcte a les 24h de regeneració. En canvi, més d'un 20% dels discs mutants heterozigots per *cbt* en el mateix temps de regeneració presenten la ferida oberta. Més tard, a les 48h, el percentatge de discs mutants per *cbt* que presenta una completa cicatrització augmenta fins al 85%, tot i que segueix sent inferior al que trobem en condicions normals. Aquests resultats suggereixen que la pèrdua parcial del gen *cbt* està produint un retard durant les primeres hores del procés de regeneració a nivell del tancament de la ferida.



**Figura 23. Anàlisi del tancament de la ferida i proliferació en mutants del gen *cbt*.** (A) Tinció immunohistoquímica de Histona 3 fosforilada (PH3) (verd), marcador de mitosis, i nuclis (vermell) en discs regenerants. A d'alt discs a 24h de regeneració, a la part de baix discs a 48h de regeneració. Els individus salvatges (*wt*) es troben a la columna de l'esquerra i els mutants de *cbt* (*cbt<sup>EP(2)2237E1/+</sup>*) a la columna de la dreta. (B) Quantificació del nombre de discs que presenten o no un correcte tancament de la ferida a 24 i 48h. S'observa com en el cas dels mutants de *cbt* (*cbt<sup>EP(2)2237E1/+</sup>*) hi ha un percentatge de discs no tancats (blanc) més elevat que en condicions salvatges. (C) Quantificació del número de mitosis presents en el blastema dels discs regenerats a 24 i 48h. Es pot observar com en els mutants de *cbt* (*cbt<sup>EP(2)2237E1/+</sup>*) el nombre de mitosis es inferior al esperat en condicions salvatges. Barra d'escala: 100µm. \* indica p-valor<0.005.

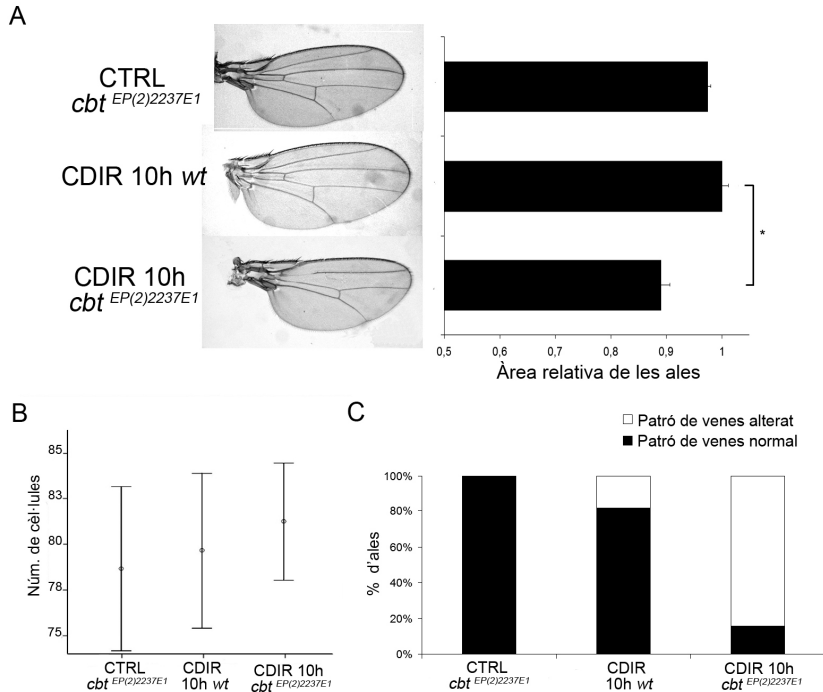
## Cabut regula la proliferació durant la regeneració del disc d'ala

En el mateix experiment vam quantificar la proliferació de tots els discs, tan els que presentaven una correcta cicatrització com els que no. La figura 23C mostra la mitjana del nombre de mitosis del blastema per disc i es pot observar com els discs mutants per *cbt* presenten un nombre de mitosis significativament menor que les observades en condicions normals. Aquests resultats apunten a que Cbt estaria promovent o regulant la proliferació cel·lular dels discs en regeneració.

Tot i que els resultats obtinguts mostren que els mutants de *cbt* presenten una reducció en el nombre de mitosis, cal descartar que això sigui degut a una acceleració del cicle cel·lular. Un increment de la velocitat de la taxa de proliferació podria fer que observéssim menys mitosis perquè aquestes són més ràpides. Per tal de descartar aquest fenomen vam utilitzar el sistema de regeneració CDIR que ens permet analitzar la regeneració completa en l'individu adult. Vam promoure la mort cel·lular del domini de *salM* del primordi d'ala amb la construcció *spalt<sup>PE</sup>-Gal4*, d'aquesta manera només s'afecta el primordi de l'ala garantint sempre la viabilitat de l'individu.

Després de 10h d'inducció de mort els mutants de *cbt* comparats amb els individus salvatges mostren una clara reducció de la superfície de l'ala (figura 24A). Aquest fet no es atribuïble a cap problema que pugui suposar la pèrdua de *cbt* durant el desenvolupament, doncs els controls mutants de *cbt* sense mort induïda (CTRL *cbt<sup>EP(2)2237E1</sup>*) presenten una mida similar a la dels organismes salvatges (figura 24A). Per descartar la possibilitat de que el nombre de cèl·lules de les ales no estigués afectat i la reducció fos deguda a una disminució de la mida de les cèl·lules, vam quantificar el nombre de cèl·lules presents en una àrea determinada, tant en organismes salvatges com en mutants i no es van trobar diferències significatives (figura 24B). Aquestes dades confirmen que la reducció de l'expressió del gen *cbt* afecta a la proliferació necessària per a dur a terme un correcte procés de regeneració.

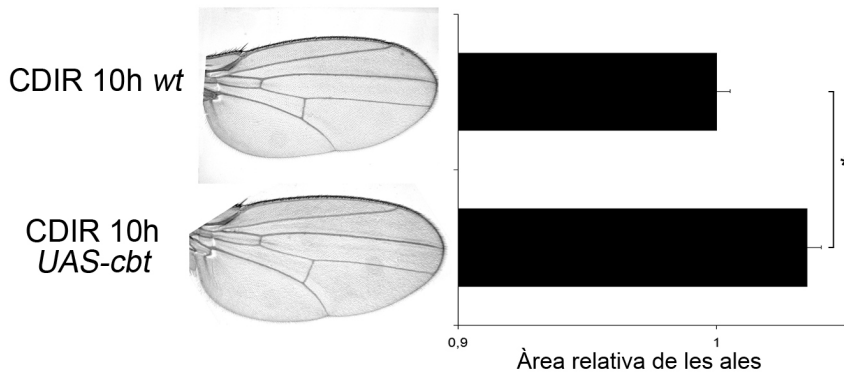




**Figura 24. Inducció de mort cel·lular en els mutants de *cbt*.** (A) Quantificació de les àrees de les ales després de la inducció de mort cel·lular, la representació gràfica mostra la mida relativa de l'àrea de les ales respecte als individus salvatges regenerats. De dalt a baix, CTRL *cbt*<sup>EP(2)2237E1</sup>; individus control mutants de *cbt* sense mort induïda (*Spalt*<sup>PE</sup>-*Gal4*/*cbt*<sup>EP(2)2237E1</sup>; *tub-Gal80*<sup>ts</sup>), CDIR 10h: individus salvatges amb mort induïda (*UAS-rpr*; *Spalt*<sup>PE</sup>-*Gal4*; *tub-Gal80*<sup>ts</sup>), CDIR 10h *cbt*<sup>EP(2)2237E1</sup>: individus mutants de *cbt* amb mort induïda (*UAS-rpr*; *Spalt*<sup>PE</sup>-*Gal4*/*cbt*<sup>(2)Ep2237E1</sup>; *tub-Gal80*<sup>ts</sup>). Es pot observar que els mutants de *cbt* no són capaços de regenerar un ala completament normal. La mida d'aquestes ales és inferior a la dels organismes salvatges que han patit el mateix procés de regeneració. \* indica p-valor < 0.05. (B) Quantificació del nombre de cèl·lules presents en una regió determinada de les ales de cada genotip analitzat, les barres indiquen el interval entre el qual es troba el 95% de les mostres en cada cas. Es pot veure com no existeixen diferències significatives entre les mostres analitzades, confirmant que no hi ha diferències entre la mida de les cèl·lules dels diferents genotips. (C) Representació gràfica del percentatge d'individus que mostren alteracions en el patró de venes i/o interveines (blanc) i els individus amb un fenotip de venes igual que els individus salvatges (Negre et al.). S'observa que en el cas dels mutants de *cbt* que han sofert un procés de regeneració més del 80% dels individus presenten algun tipus d'alteració en el patró.

A més un alt percentatge de les ales dels mutants de *cbt* presenten alteracions en el patró de venes (figura 24C), concretament mostren una absència de la vena LII en ocasions acompanyada de pèrdua de la intervena anterior i la vena LIII. Aquestes observacions apunten a que *cbt* també podria tenir un rol en el restabliment del patró de les venes durant la regeneració.

Per determinar si l'increment de l'expressió de *cbt* està lligat amb l'establiment de la mida final del disc vam sobreexpressar *cbt* durant el procés de regeneració. Mitjançant l'expressió ectòpica de *cbt* en les mateixes cèl·lules que induïm l'expressió del gen proapoptòtic *rpr* i durant el mateix període de temps, vam comprovar que les ales amb una expressió ectòpica de *cbt* presenten una mida més gran que les ales salvatges induïdes (figura 25).



**Figura 25. Inducció de mort cel·lular i sobreexpressió de *cbt*.** Quantificació de les àrees de les ales després de promoure l'expressió de *rpr* i *cbt* en el domini *spalt<sup>PE</sup>*. CDIR 10 wt: individus després de 10h d'inducció de mort (*UAS-rpr*; *Spalt<sup>PE</sup>-Gal4*; *tub-Gal80<sup>ts</sup>/UAS-GFP*) i CDIR 10h *UAS-cbt*: individus després de 10h de sobreexpressió de *rpr* i *cbt* (*UAS-rpr*; *Spalt<sup>PE</sup>-Gal4*; *tub-Gal80<sup>ts</sup>/UAS-cbt*). S'observa com les ales que presenten una sobreexpressió de *cbt* tenen una mida lleugerament, més gran que les ales salvatges induïdes. \* indica p-valor < 0.05.

Aquests resultats suggereixen que *cbt* estaria regulant el creixement i la mida final del disc durant la regeneració. Durant el desenvolupament del disc d'ala *cbt* també és important per a la regulació del creixement i l'expressió de dos gens que determinen el patró de l'ala (Rodríguez, 2011). Determinar quins gens o mecanismes està regulant *Cbt* en cada context permetria aprofundir en el rol d'aquest gen en ambdós processos.

En conjunt les dades obtingudes dels microrrays de discs regenerants indiquen que durant el procés de regeneració es produeixen una gran quantitat de canvis a nivells d'expressió que són necessaris per al restabliment del teixit. La presència de nombrosos gens associats a la regulació transcripcional mostren la importància d'una fina regulació per a poder dur a terme aquest procés. Alguns d'aquests canvis estan lligats a la l'activació de la via de la JNK com en el cas del gen *cbt*. Els experiments realitzats demostren la capacitat d'unió del factor AP-1 al promotor del gen *cbt* i que l'activació de la via de la JNK incrementa els nivells d'expressió de *cbt* en el disc d'ala. El canvi d'expressió de *cbt* és necessari durant el procés de regeneració dels discs d'ala, no només per a una correcta cicatrització, funció associada a la via de la JNK, sinó que també regula el procés de creixement i formació del patró del disc.

## Capítol II: Anàlisi dels gens diana de Cabut en el disc d'ala

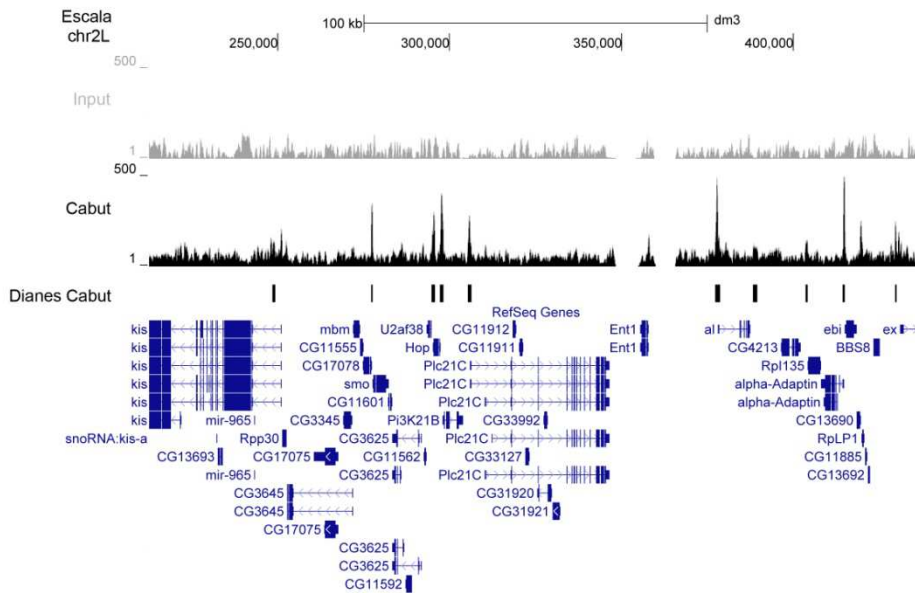


## 1. Localització de Cabut en el genoma del disc imaginal d'ala de *Drosophila* i descripció dels seus gens diana

Cabut és un factor de transcripció essencial pel desenvolupament de *Drosophila melanogaster*, i com s'ha demostrat en aquest treball també té un paper important durant la regeneració dels discs d'ala. Al 2011 es va publicar un treball (Rodríguez, 2011) en el qual es proposava que Cbt està implicat en la regulació de la via de Dpp en el disc d'ala i com a conseqüència en la regulació del seu creixement. Tot i les evidències de la importància d'aquest factor durant el desenvolupament del disc d'ala és desconegut els gens que està regulant. En aquest treball ens vam plantejar descriure els gens diana de Cbt en els discs d'ala de l'estadi de LIII.

### Anàlisi dels gens diana de Cabut

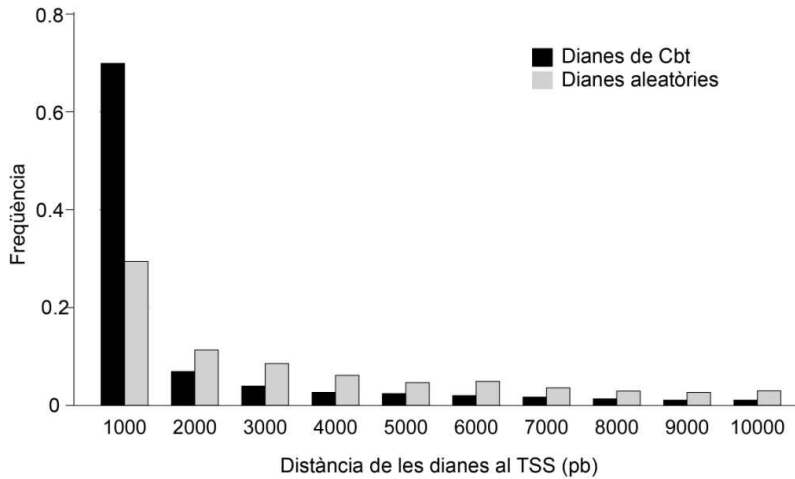
Per tal de determinar els gens regulats per Cbt vam realitzar una immunoprecipitació de cromatina en discs d'ala amb un anticòs contra Cbt (Belacortu et al., 2011) i posterior seqüenciació (ChIP-Seq). Després de mapar en el genoma les dades obtingudes de la seqüenciació vam obtenir el resultat del perfil de Cbt en el genoma que ens mostra els llocs concrets on es localitza Cbt en forma de pics (figura 26).



**Figura 26. Perfil de Cbt en una regió del cromosoma 2L de *Drosophila melanogaster*.** Representació del perfil de Cbt en una regió del cromosoma 2L, obtingut després de la seqüenciació del ChIP. S'observa el perfil de la seqüenciació del Input (gris) o control negatiu, el de Cbt (Negre et al.), les dianes de Cbt obtingudes després de normalitzar les dades (rectangles negres) i els gens que es troben en aquesta regió segons RefSeq (blau).

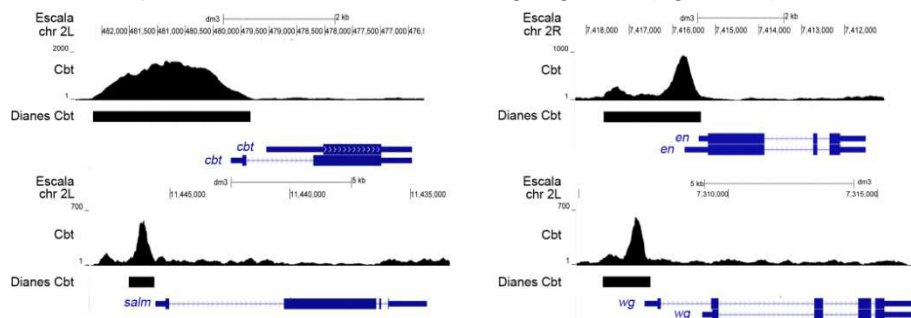
Aquest perfil va ser comparat amb el perfil obtingut de la seqüenciació d'un control negatiu (*Input*) per tal de normalitzar-lo. Mitjançant l'algoritme PeakSeq vam determinar quines eren les regions enriquides en la nostra mostra i així vam poder descriure 1951 dianes de Cbt en el genoma de les cèl·lules dels discs d'ala de LIII.

Per determinar on estan localitzades les dianes de Cbt versus la posició del inici de transcripció dels gens (TSS) es va representar la posició de les diferents dianes respecte el TSS més pròxim. Es pot observar que Cbt es localitza majoritàriament a menys de 1000 pb del TSS dels gens, la qual cosa indica que en la majoria dels casos es troba unit a seqüències promotores dels seus gens diana o en introns propers al TSS (figura 27).



**Figura 27. Histograma de la localització de les dianes de Cbt respecte el TSS dels gens.** Representació de la posició que ocupen les diferents dianes de Cbt (Negre et al.) i un conjunt de la mateixa mida de dianes aleatòries (gris) respecte el TSS dels gens que tenen més pròxims en el genoma. S'observa com més del 70% de les dianes de Cbt es troben a menys de 1000 pb.

Tenint en compte aquesta localització vam descriure 2060 gens diana de Cbt, considerant aquells gens que presenten una o més dianes dins del seu promotor (de -100 a +1000pb des del TSS) i/o en algun intró. Dins d'aquest conjunt de gens en trobem alguns descrits prèviament com *dpp* (Muñoz-Descalzo et al., 2005), *salm*, *omb* (Rodríguez I. 2011) o el propi *cbt* (Belacortu et al., 2012) però també molts gens coneguts per la seva importància durant el desenvolupament del disc d'ala com *wg*, *vg* o *en* (figura 28).



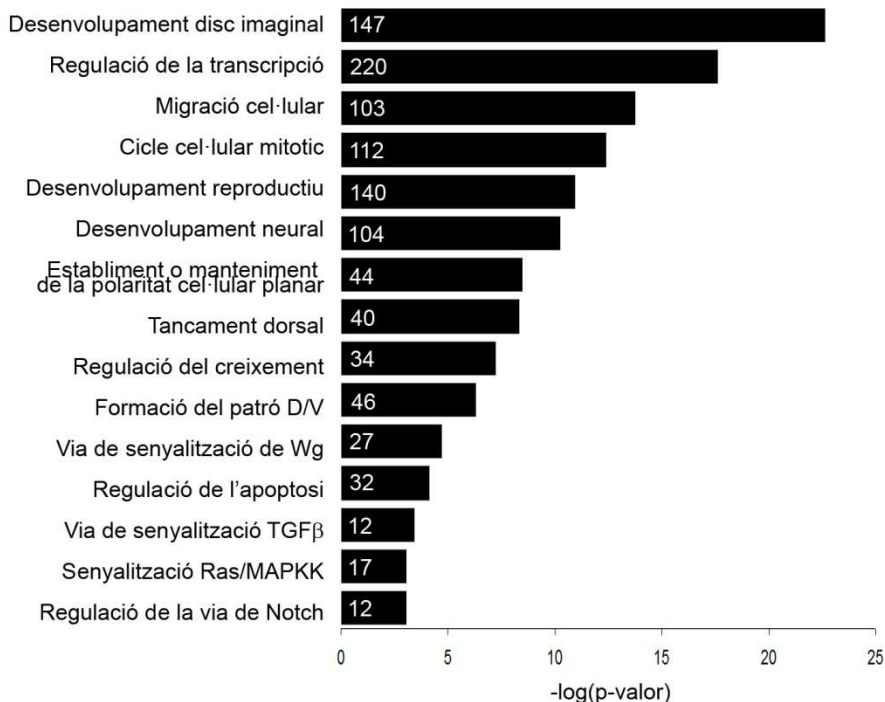
**Figura 28. Gens diana del factor de transcripció Cbt en el disc d'ala.** Exemples de gens diana de Cbt implicats en el desenvolupament del disc d'ala de *Drosophila*. A l'esquerra el perfil de Cbt (Negre et al.) sobre les regions cromosòmiques de *cbt* i *salm*. A la dreta el perfil de Cbt en les regions d'*en* i *wg*, gens no descrits prèviament com a gens diana de Cbt.



Un cop establerta la posició en que es troba Cbt i els seus gens diana, vam determinar quins tipus de gens està regulant Cbt durant el desenvolupament del disc d'ala. Vam analitzar les categories funcionals (GO) a les que pertanyen aquests gens utilitzant el programa *Database for Annotation, visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (Jiao et al., 2012) [<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>]. Aquest algoritme permet veure quines categories funcionals es troben enriquides dins d'un conjunt de gens respecte les categories de tots els gens del genoma.

A la figura 29 podem observar que els gens diana de Cbt estan associats al desenvolupament dels discs imaginals, la regulació de la transcripció, la migració i el cicle cel·lular. També trobem enriquiment en gens lligats al desenvolupament reproductiu i neural, al establiment de la PCP, al tancament dorsal que es produeix a l'embriogènesi, a la regulació del creixement durant el desenvolupament, a l'apoptosi, a la formació del patró D/V i a la regulació de les vies de senyalització de Wg, TGF $\beta$ , MAPKK i N entre d'altres categories menys representades.

L'enriquiment que trobem d'algunes categories coincideix amb la anotació funcional descrita per Cbt, per exemple el seu paper durant el tancament dorsal (Munoz-Descalzo et al., 2005) o la seva implicació en el creixement i desenvolupament del disc d'ala per mitjà de la regulació de la via de senyalització de TGF $\beta$  (Rodriguez, 2011). Aquests resultats confirmen l'especificitat de l'experiment de Chip-Seq i aporten noves dades sobre possibles funcions en les que Cbt podria tenir un rol important.

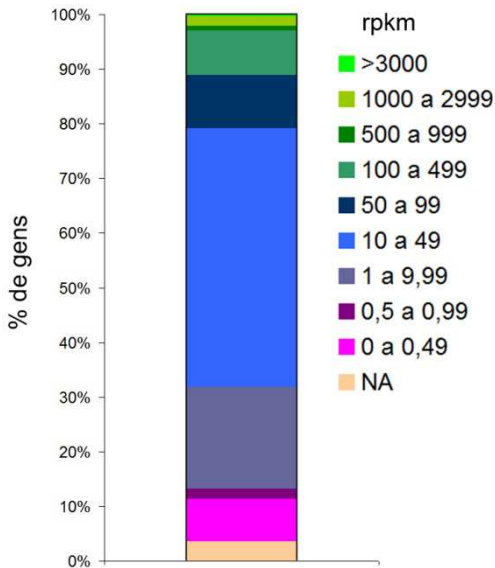


**Figura 29. Categories funcionals enriquides dins dels gens diana de Cbt en el disc d'ala.** Categories GO enriquides dins del conjunt de gens diana de Cbt en comparació amb els gens del genoma de *Drosophila* (p-valor < 0.05 en tots els casos). El nombre de gens que pertanyen a cada categoria s'indica a l'interior de les barres. La longitud de les barres indica la significació del grup.

## Estat transcripcional dels gens diana de Cabut en el disc d'ala

Actualment no és conegut amb detall el rol que té Cbt en la transcripció dels seus gens diana, de fet les dades que existeixen apunten en direccions oposades. Els resultats obtinguts per Rodríguez I. (2011) suggereixen que Cbt estaria regulant positivament els gens diana de Dpp *salm* i *omb*. D'altra banda un treball recent en el qual s'analitzen i es descriuen els dominis de la proteïna Cbt, demostra, mitjançant assajos amb luciferasa, que Cbt és un repressor transcripcional *in vitro* (Belacortu et al., 2012). Per tal de determinar si Cbt funciona com a factor de transcripció repressor o activador vam analitzar en quin estat transcripcional es troben els gens diana de Cbt en el disc d'ala. Primer

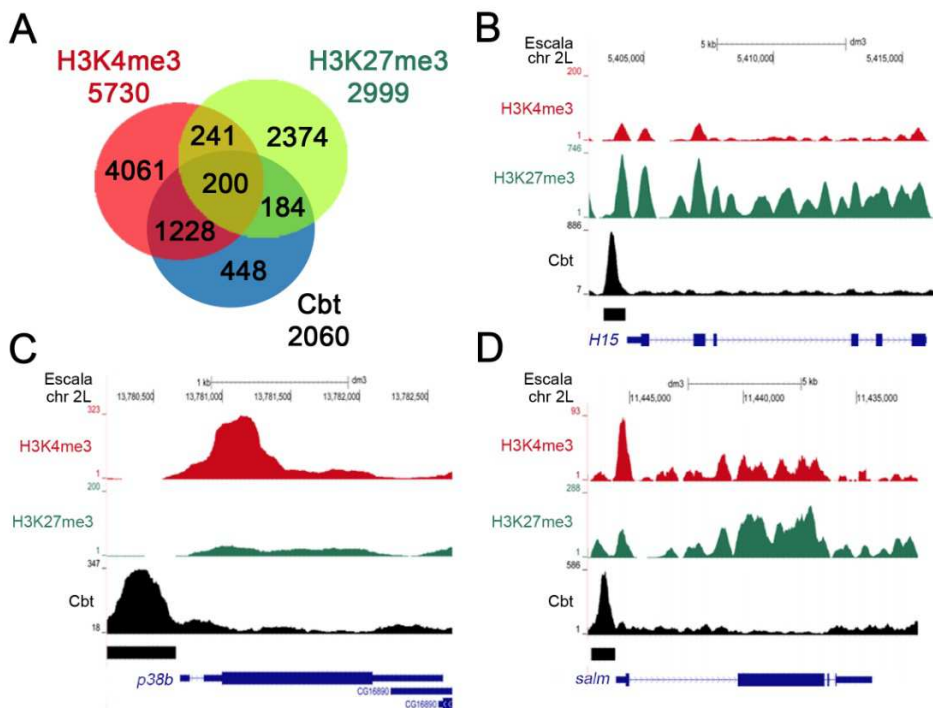
i gràcies a dades provinents de la seqüenciació de RNA (RNA-Seq) dels discs d'ala (Pèrez-Lluch, dades no publicades) vam determinar que en aquest teixit 197 gens del conjunt de gens diana de Cbt estan silenciats (<1 rpkm), 1788 s'estan expressant (1-5000rpkm) i cap presenta nivells molt elevats d'expressió (>5000rpkm). Pels 75 gens restants no hi havia dades de RNA-Seq disponibles. Aquests resultats indiquen que com a mínim el 86.8% dels gens diana de Cbt s'estan expressant en el disc imagnal d'ala (figura 30).



**Figura 30. Expressió dels gens diana de Cbt en el disc d'ala.** Representació gràfica del creuament de les dades del Chip-Seq de Cbt amb dades de RNA-Seq de discs d'ala. S'observa el percentatge de gens que presenten diferents nivells d'expressió (rpkm) dins del conjunt de gens diana de Cbt. NA indica gens sense valors de referència de RNA-Seq. De 0 a 0.99 es consideren gens silenciats i de 1 a 4999 gens expressats.

Aquestes dades no indiquen que Cbt sigui un repressor general de la transcripció, doncs la majoria dels seus gens diana s'estan expressant. Tot i així no podem oblidar que dins d'aquest grup de gens hi ha molts gens lligats al desenvolupament que sabem tenen un patró específic d'expressió dins del disc, és a dir s'expressen només en les cèl·lules de certes regions del disc i estan silenciats en la resta de cèl·lules. Les limitacions de les tècniques de Chip-Seq i RNA-Seq no ens permeten saber en quines d'aquestes cèl·lules Cbt es troba en el promotor d'aquests gens i per tant no podem concloure que Cbt sigui un activador transcripcional.

Una altra aproximació per conèixer l'activitat transcripcional dels gens és analitzar les modificacions de les histones (Bird, 2002). S'ha descrit que la trimetilació de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) és una marca que es troba en regions obertes de la cromatina i per tant ens gens que es requereixen activats. En canvi la trimetilació de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) és troba localitzada en gens silenciats en regions on la cromatina està més empaquetada (Volkel and Angrand, 2007). Tenint en compte aquests coneixements vam fer una correlació entre els gens diana de Cbt i la ocupació de les marques d'histones H3K4me3 i H3K27me3 en el disc d'ala (Perez-Lluch et al., 2011). A la figura 31 es pot observar que 184 gens diana de Cbt presenten només la marca repressora H3K27me3, 200 gens estan ocupats per ambdós marques i 1228 gens presenten només H3K4me3 en el seus promotors.



**Figura 31. Correlació dels gens diana de Cbt amb les marques H3K4me3 i H3K27me3.** Correlació de Cbt, H3K4me3 i H3K27me3 i exemples, consultar el peu de figura a la pàgina següent.

Aquests resultats indiquen que el 69% dels gens diana de Cbt presenten H3K4me3 en els seus promotors. Tot i que alguns d'aquests gens també tenen H3K27me3, possiblement els gens que s'expressen de forma territorial, la majoria no presenta la marca de silenciament transcripcional. Aquestes dades suggereixen que Cbt no actuaria com un repressor de la transcripció en la majoria dels seus gens diana en el disc d'ala.

---

(A) El diagrama de Venn mostra la correlació entre els gens diana de Cbt (blau) i les marques d'histones H3K4me3 (vermell) i H3K27me3 (verd), els números indiquen el nombre de gens que pertanyen a cada categoria. (B) Exemple de la regió cromosòmica del gen *H15*. S'observa la trimetilació de l'H3K27 en tota la regió del gen. (C) Exemple de la regió cromosòmica del gen *p38b*. S'observa la trimetilació de l'H3K4 al inici de transcripció del gen. (D) Exemple de la regió cromosòmica del gen *salm*. S'observa la trimetilació de l'H3K4 al inici de transcripció del gen i la trimetilació de H3K27 a la zona de la regió del gen. Aquest tipus de perfil és habitual en gens que presenten expressió en un determinat domini del disc. En tots els exemples en negre el perfil de Cbt i la diana descrita.

## 2. Mecanismes d'acció de Cbt en la regulació dels seus gens diana



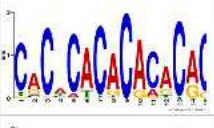
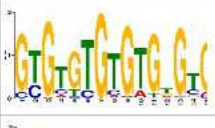
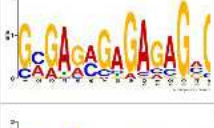

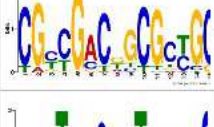

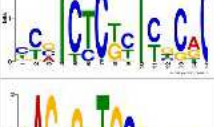
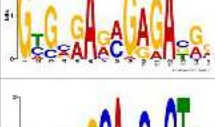
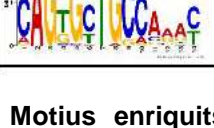
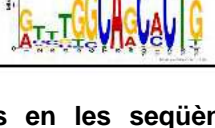
Els resultats del ChIP-Seq apunten Cbt com un regulador de la transcripció de gens necessaris per el desenvolupament del disc d'ala però hi ha molt poques evidències de com actuaria Cbt a nivell molecular en la transcripció d'aquests gens i a quines seqüències s'uniria.

### Estudi computacional de les seqüències dianes de Cbt

Els resultats obtinguts de la comparació de la proteïna de *Drosophila* amb les de vertebrats mostren que la regió que presenta una major conservació evolutiva és la seqüència dels dominis *Zn finger* d'unió a DNA (Munoz-Descalzo et al., 2007). Chrisman i Tindall (2003) van descriure el motiu d'unió consens de TIEG: 5'GGTGTG3' amb experiments de mutagènesi *in vitro*. Altres treballs proposen que el factors TIEG1 i TIEG2 s'uneixen a seqüències riques en CGs similars a les del factor Sp1. Cbt també té capacitat per unir-se *in vitro* a seqüències riques en CGs del promotor de *en*, igual que Sp1 i altres factors *Zn finger* de la família (Brown et al., 2005). Aquestes observacions ens han portat a analitzar les seqüències de les dianes d'unió de Cbt per tal de determinar una possible seqüència consens per aquest factor de transcripció.

Per tal de trobar una seqüència d'unió de Cbt no descrita vam utilitzar el programa *Multiple Em for Motif Elicitation* (MEME) (Bailey and Elkan, 1994) [<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>] per cercar motius que estiguessin conservats en les dianes de Cbt. Després de processar les 1951 dianes de Cbt amb aquest algoritme vam obtenir un llistat de motius enriquits (taula 8) dels quals només el primer era estadísticament significatiu (p-valor <0.05). Aquest motiu correspon a una seqüència rica en GAs que es troba 162 vegades dins de les 1951 seqüències diana de Cbt. Tot i que no és estadísticament significatiu

també és va identificar un motiu ric en GTs que es troba present 67 cops dins de les dianes de Cbt.

Motiu	Motiu	p-valor	Posicions
		6.4e-142	125
		3.8e-066	67
		1.7e-051	88
		3.3e-016	39
		5.2e-017	67
		6.2e-012	48

**Taula 8. Motius enriquits en les seqüències diana de Cbt. Motius enriquits obtinguts de l'algoritme MEME.** S'observa les seqüències del motiu, el p-valor i el nombre de vegades que s'ha trobat aquest motiu dins el conjunt de seqüències donades.

Aquests resultats suggereixen que Cbt no s'està unint a seqüències amb un alt grau de conservació, més aviat les dades apunten a que les seqüències d'unió de Cbt són degenerades i per això no podem identificar-les mitjançant l'alineament de les seqüències.

Tot i que no vam poder d'identificar nous motius d'unió per al factor Cbt amb l'algoritme MEME el resultat de la cerca reporta un motiu ric en la seqüència GAGA conegut per ser el motiu d'unió del factor de transcripció GAGA Factor (GAF) (Biggin and Tjian, 1988; Omelina et al., 2011). La presència de motius d'unió coneguts d'altres factors podria indicar que aquests factors s'uneixen a les mateixes

regions que Cbt. Per això vam decidir realitzar una segona aproximació per determinar quins motius coneguts estaven sobrerrepresentats dins la nostra mostra de seqüències. Vam utilitzar l'algoritme MatScan (Blanco et al., 2006), que utilitza les matrius de la base de dades de motius consens de Jaspar (Portales-Casamar et al., 2010) i Transfac (Matys et al., 2003) per buscar motius coneguts i enriquits en un conjunt de seqüències.

La taula 9 recull les seqüències de matrius conegudes que es van obtenir. Coincidint amb els resultats anteriors el motiu més representat dins les seqüències diana de Cbt és el motiu de GAF (també anomenat Trithorax like (Trl)), també trobem altres motius en menys freqüència com son motius GCs i el motiu de Sp1. Les dades obtingudes apunten que en alguns casos Cbt podria estar unit a aquestes seqüències CGs, igual que passa amb els gens TIEG1 i TIEG2, tot i que no podem concloure que aquest motiu correspongui al motiu consens de Cbt, doncs el trobem en baixa freqüència dins el conjunt de seqüències diana de Cbt.

Matrix	Ratio	Núm. de posicions en les dianes	Núm. de posicions en el genoma
GAGA			
FACTOR_Q6	0,0241256	816	33823
Trl	0,0239385	707	29534
MZF1_Q2	0,0138525	35	1763
SMAD4_Q6	0,0189621	19	1002
GC_Q1	0,0179739	33	1836
SP1_Q6_Q1	0,0177788	81	4556
SP1	0,0170862	112	6555
SP1_Q4	0,0170411	44	2582
VDR_Q3	0,0165426	20	1209
SP1_Q6	0,016	38	2375

**Taula 9. Enriquiment de les matrius de les bases de dades Jaspar i Transfac en les seqüències diana de Cbt.** Llista dels motius coneguts (matrius) trobats a les seqüències diana de Cbt, s'indica el nombre de vegades que es troba el motiu dins de les dianes de Cbt i la presència del motiu en el genoma de *Drosophila melanogaster*. La ratio indica la divisió entre aquests dos paràmetres.

L'estudi de les seqüències dianes de Cbt indica que Cbt es localitza en regions que contenen llocs d'unió per al factor GAF. Aquest factor de transcripció és un regulador de la transcripció de gens importants



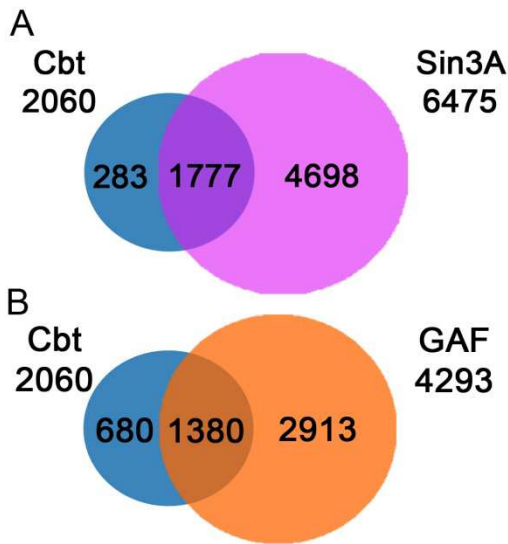
per al desenvolupament i sembla que podria actuar reclutant reguladors de la cromatina tant del grup Trithorax (GTx) com Polycomb (GPc) (Adkins et al., 2006; Granok et al., 1995). Aquesta evidència ens va portar a formular la hipòtesi de que Cbt podria estar actuant amb GAF com a cofactor per dur a terme la regulació dels seus gens.

## Cofactors de Cabut

Un dels cofactors dels ortòlegs de Cbt, els factors TIEG, és el repressor transcripcional Sin3A (Zhang et al., 2001). Tanmateix Cbt, igual que els seus ortòlegs, presenta un domini d'interacció amb Sin3A que és important per a la seva activitat repressora (Belacortu et al., 2012). Sin3A és un factor de transcripció que forma part de complexos deacetilasa de les histones (HDAC) i regula l'activitat transcripcional de múltiples processos del desenvolupament tant en *Drosophila* com en mamífers. S'ha demostrat que Sin3A és important per a la viabilitat durant l'embriogènesi, la progressió del cycle cel·lular, la replicació i reparació del DNA i la biogènesi mitocondrial, entre d'altres. Tot i que la majoria d'estudis sobre Sin3A s'han basat en el seu paper com a repressor transcripcional hi ha evidències que Sin3A pot actuar també com a activador de la transcripció. Els complexos HDAC no tenen dominis d'unió al DNA i per tant es creu que actuen com a cofactors d'altres factors de transcripció amb capacitat d'unir-se al DNA (Silverstein and Ekwall, 2005; Spain et al., 2010).

El domini d'interacció a Sin3A no és l'únic domini d'interacció proteïna-proteïna que presenten aquests factors de la família Sp1. TIEG1 i TIEG2 tenen una regió rica en prolina en el seu extrem N-terminal i Cbt conté una regió rica en serina, dominis d'interacció proteïna-proteïna. Tenint en compte aquestes dades i les reportades anteriorment vam estudiar la possibilitat que Cbt interaccionés amb els factors de transcripció Sin3A i GAF. En primer lloc, utilitzant les dades de CHIP-Seq de diferents factors de transcripció extretes del projecte ModENCODE (Negre et al., 2011) vam determinar les correlacions entre els gens diana de Cbt i els gens diana de Sin3A i GAF. Els diagrames de Venn (figura 32) mostren que Cbt i Sin3A tenen en

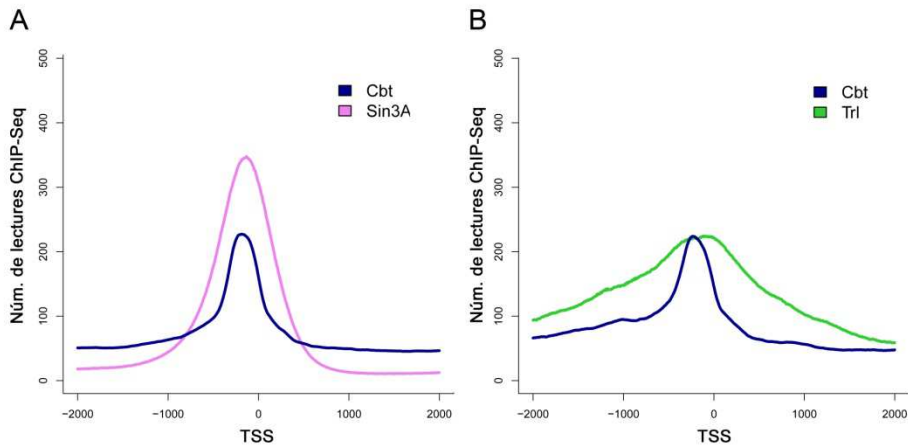
comú 1777 gens diana (86.3% de gens diana de Cbt), mentre que Cbt i GAF en tenen 1380 (67% del gens diana de Cbt)



**Figura 32. Correlació entre els gens diana de Cbt i els de Sin3A i GAF.** Diagrames de Venn representant els gens diana que tenen en comú (A) Cbt (blau) i Sin3A (Abdelilah-Seyfried et al.; Bejarano et al.) (Bejarano et al.) i (B) Cbt (blau) i GAF (taronja). Els nombres indiquen el número de gens que pertanyen a cada categoria.

Aquestes correlacions recolzen la hipòtesi de la interacció de Cbt amb aquests dos factors per a dur a terme la regulació dels seus gens diana. Cal tenir en compte però que els factors Sin3A i GAF regulen un elevat nombre de gens del conjunt del genoma, que els experiments de ChIP-Seq no s'han realitzat en els mateixos teixits i que la correlació no aporta evidències de que aquests 3 factors es localitzin en la mateixa regió del genoma.

Per determinar si la posició d'aquests factors és similar en els gens que tenen en comú vam fer una projecció dels pics respecte el TSS dels gens diana comuns (figura 33). Es pot observar que Cbt es localitza aproximadament a -200pb del TSS, Sin3A es localitza entre el pic de Cbt i el TSS (-100pb) i GAF ocupa una posició més propera al TSS tot i que l'amplada dels pics és més ampla indicant que la llargada de les seves seqüències dianes és més llarga o que la seva posició és més variable, tot i trobar-se propera al TSS. Aquestes dades suggereixen que podria existir una interacció física entre aquestes proteïnes.



**Figura 33. Superposició dels pics de Cbt i Sin3A i Cbt i GAF.** (A) Representació gràfica de la superposició dels pics de Cbt (blau) i Sin3A (Abdelilah-Seyfried et al.) localitzats en promotors dels gens diana que tenen en comú. (B) Representació gràfica de la superposició dels pics de Cbt (blau) i GAF (verd) localitzats en els promotors dels gens diana que tenen en comú. L'eix de les Y indica el nombre de lectures dels ChIP-Seqs i l'eix de les X la posició relativa al TSS.

Les dades obtingudes en aquest estudi suggereixen que Sin3A i GAF podrien actuar com a cofactors de Cbt. La demostració de la seva interacció física requerirà experiments de coimmunoprecipitació, per demostrar la interacció directa de les proteïnes, i estudis de col-localització en cromosomes politènics, els quals permetran comprovar si en una mateixa cèl·lula es troben aquests factors en les mateixes regions cromosòmiques.

### 3. Cbut regula l'expressió de gens lligats a la via de Notch

Les dades obtingudes de l'anàlisi del CHIP-Seq de Cbt indiquen que molts dels gens diana de Cbt estan lligats a la regulació de la transcripció i tenen funcions associades al desenvolupament dels discs imaginals. A més també vam trobar enriquiments funcionals en moltes vies de senyalització importants per la formació del patró i la regulació del creixement. A partir de les bases de dades *the Gene Ontology (GO)* i *Kegg Pathway* i utilitzant el programa DAVID o la bibliografia vam cercar en el conjunt de gens diana de Cbt components, gens diana o gens relacionats amb les vies de senyalització importants pel desenvolupament: TGF $\beta$ , N, Wg, EGFR/MAPK, JNK, JAK/STAT, Hh, Hppo i TOR. La taula 10 recull els gens diana de Cbt que pertanyen a les vies de TGF $\beta$ , N, Wg i EGFR/MAPK (que són categories funcionals enriquides dins del conjunt de gens diana de Cbt). El fet que estigui regulant membres de les diferents vies recolza la hipòtesi de Cbt com a regulador i mediador de diferents vies de senyalització.

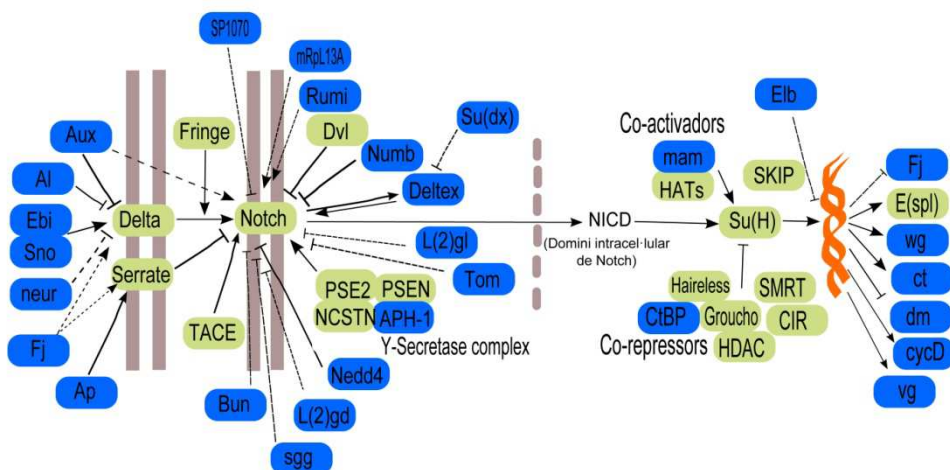
TGFβ	EGFR/MAPK		N	Wg	
<i>baboon</i>	14-3-3 protein epsilon	PTP-ER	<i>al</i>	<i>abd-A</i>	<i>gish</i>
<i>Dad</i>	14-3-3 protein zeta	<i>rac1</i>	<i>ap</i>	<i>alpha-Cat</i>	<i>Hel89B</i>
<i>dally</i>	<i>alph</i>	<i>Ras85D</i>	<i>aph-1</i>	<i>Antp</i>	
<i>dpp</i>	<i>aop (Yan)</i>	<i>rhogap86f</i>	<i>aux</i>	<i>Apc</i>	<i>Iswi</i>
<i>l(2)gl</i>	<i>argos</i>	<i>RhoL</i>	<i>bun</i>	<i>aPKC</i>	<i>Mad</i>
<i>Mad</i>	<i>aru</i>	<i>rin</i>	<i>ct</i>	<i>arr</i>	<i>Med</i>
<i>Med</i>	<i>bsk</i>	<i>RN-tre</i>	<i>CtBP</i>	<i>babo</i>	<i>mor</i>
<i>mts(PP2A)</i>	<i>C3G</i>	<i>rok</i>	<i>cycD</i>	<i>Bap60</i>	<i>mts</i>
<i>omb</i>	<i>cenG1A</i>	<i>rtGEF</i>	<i>dm</i>	<i>B-H2</i>	<i>NFAT</i>
<i>p38b</i>	<i>cni</i>	<i>sgg</i>	<i>dx</i>	<i>bsk</i>	<i>nkd</i>
<i>pnr</i>	<i>csw</i>	<i>son</i>	<i>ebi</i>	<i>CadN2</i>	<i>osa</i>
<i>Rbf</i>	<i>cv-c</i>	<i>spen</i>	<i>eIB</i>	<i>Cklalpha</i>	<i>Pkc98E</i>
<i>Rho1</i>	<i>ebi</i>	<i>spi</i>	<i>fj</i>	<i>Cklbeta</i>	<i>Plc21C</i>
<i>salm</i>	<i>ed</i>	<i>Src42A</i>	<i>heph</i>	<i>CtBP</i>	<i>Pp2B-14D</i>
<i>Sara</i>	<i>ffl</i>	<i>step</i>	<i>l(2)gd1</i>	<i>CycD</i>	<i>Rac1</i>
<i>shn</i>	<i>fus</i>	<i>sty</i>	<i>l(2)gl</i>	<i>DAAM</i>	<i>rok</i>
<i>skp1</i>	<i>Gap1</i>	<i>vap (RasGAP)</i>	<i>mam</i>	<i>dally</i>	<i>Scr</i>
<i>tkv</i>	<i>Gug</i>	<i>vn</i>	<i>Nedd4</i>	<i>dco</i>	
	<i>Krn</i>	<i>wkd</i>	<i>neur</i>	<i>Dfd</i>	<i>sgg</i>
	<i>MAPK-Akt2 (MK2)</i>		<i>numb</i>	<i>dm</i>	<i>shf</i>
	<i>mbt</i>		<i>RpL13A</i>	<i>dx</i>	<i>skpA</i>
	<i>msk</i>		<i>rumi</i>	<i>ebi</i>	<i>slmb</i>
	<i>Mtl (Edgar et al.)</i>		<i>sgg</i>	<i>en</i>	<i>smo</i>
	<i>Nrg</i>		<i>sno</i>	<i>fj</i>	<i>spen</i>
	<i>p38a</i>		<i>SP1070 (Uif)</i>	<i>fry</i>	<i>tkv</i>
	<i>p38b</i>		<i>Su(dx)</i>	<i>fz2</i>	<i>trbd</i>
	<i>phl</i>		<i>Tom</i>	<i>fz2</i>	<i>ttv</i>
	<i>Pk61C</i>		<i>vg</i>	<i>fz4</i>	<i>Ubx</i>
	<i>Pld</i>		<i>wg</i>	<i>fz4</i>	<i>wg</i>
	<i>pnt</i>			<i>Galpa49B</i>	

**Taula 10. Gens diana de Cbt que pertanyen a les vies de senyalització TGFβ, EGFR/MAPK, N i Wg.** La taula recull els gens diana de Cbt amb anotació funcional lligada a les vies de TGFβ, EGFR/MAPK, N i Wg.

En el cas de la via de Dpp, el nostre estudi confirma que *cbt* regula de manera directa els gens *salm* i *omb* i aporta 16 gens més lligats a la via de Dpp que són gens diana de Cbt. També ens ha permès descriure 59 gens lligats a la via de Wg, 29 a la de N, i 49 lligats a la de EGFR/MAPK. Donat que una de les categories funcional sobrerrepresentada en el conjunt de gens diana de Cbt era el desenvolupament del patró D/V, i que existeixen evidències experimentals que suggereixen que *cbt* estaria intervenint en la formació del marge D/V (Bejarano et al., 2008), vam establir com a següent objectiu d'aquest treball determinar com actua Cbt en relació a la via de N i la formació del marge D/V.

### Gens diana de Cabut lligats a la via de Notch

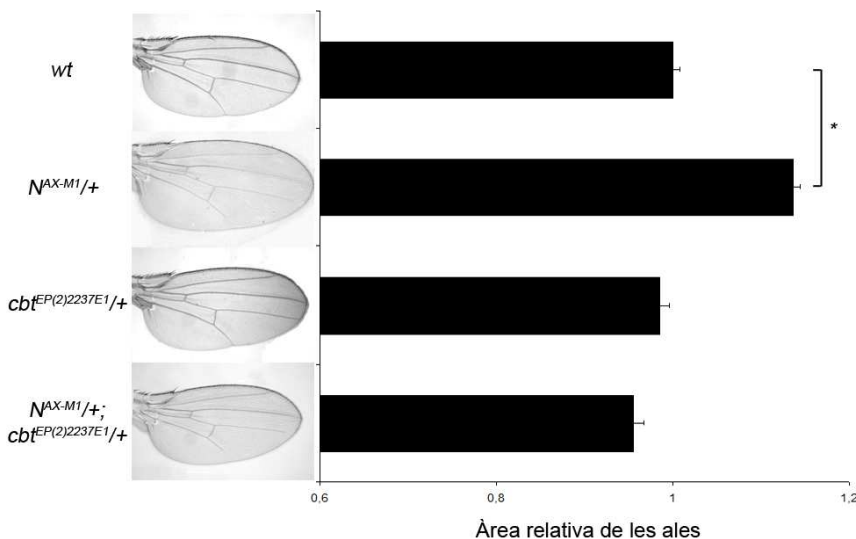
Dins dels 29 gens diana de Cbt lligats a la via de N trobem gens descrits com a reguladors dels lligands Delta (DI) i Serrate (Ser) com *aristaleless* (*al*), *neuralized* (*neur*) i *apterpus* (*ap*); reguladors del receptor N com *anterior pharinx defective* (*aph1*) (gen del complex  $\gamma$ -Secretasa que és el complex que s'encarrega de tallar el receptor N perquè pugui entrar al nucli) *rumi*, *numb*, *deltex* (*dx*), *Nedd4* o *lethal* (2) *giant disc* (*l(2)gd*); el coactivador de la via *mastermind* (Igaki et al.), el seu repressor *C-terminal Binding Protein* (*CtBP*) i gens diana de la via de N *wingless* (*wg*), *cut* (Negre et al.), *diminutive* (*dm*) i ciclina D (*cycD*), entre altres (figura 34).



**Figura 34. Gens diana de Cbt de la via de N.** Esquema de la via de N de *Drosophila* on s'indiquen els gens diana de Cbt (blau).

## Interacció genètica entre Notch i Cabut

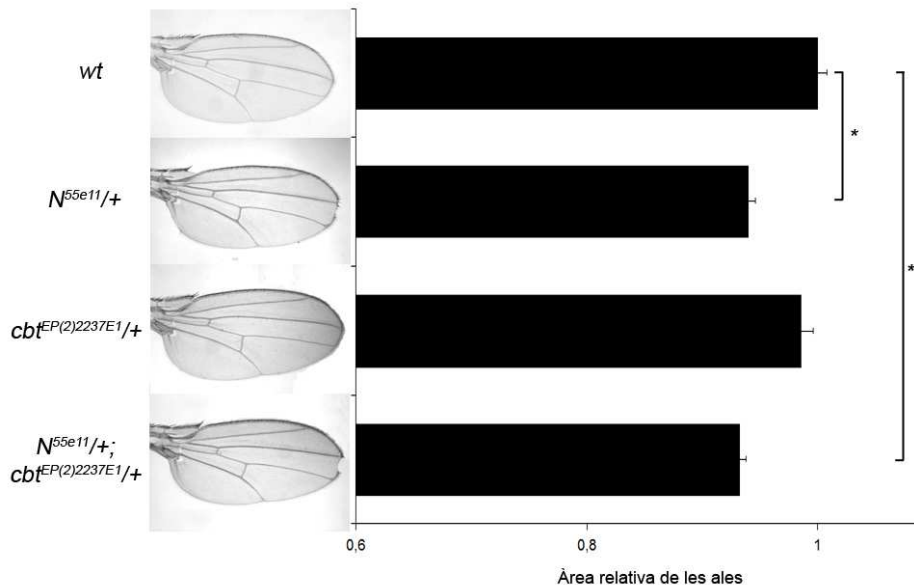
Bejarano i col·laboradors (2008) en un experiment de cribratge en el que es buscaven reguladors de la via de N van comprovar que la sobreexpressió de *cbt* rescata la pèrdua de funció d'*ap*. Vam utilitzar els mutants de *cbt* en heterozigosi per comprovar aquesta interacció. Les ales dels individus que porten un al·lel de guany de funció de *N* en heterozigosi ( $N^{Ax-M1}/+$ ) són més gran que les ales dels individus salvatges (*wt*), mentre que els mutants de *Cbt* en heterozigosi ( $cbt^{EP(2)2237E1}/+$ ) no presenten diferències significatives amb els individus salvatges. Les ales dels dobles mutants de *N* i *cbt* ( $N^{Ax-M1}/+; cbt^{EP(2)2237E1}/+$ ) tenen la mida de les ales igual que els individus salvatges. Aquests resultats demostren que el mutant de *cbt* rescata el guany de funció de *N* (figura 35).



**Figura 35. Interacció genètica entre l'al·lel de guany de funció de *N* i l'al·lel mutant de *cbt*<sup>EP(2)2237E1</sup>.** Histograma de les àrees relatives de les ales d'individus salvatges (*wt*), mutants de guany de funció de *N* ( $N^{Ax-M1}/+$ ), mutants de *cbt* ( $cbt^{EP(2)2237E1}/+$ ) i dobles mutants de *N* i *cbt* ( $N^{Ax-M1}/+; cbt^{EP(2)2237E1}/+$ ). \* indica p-valor <0.05.

Per confirmar que *Cbt* modula l'activitat de *N* vam utilitzar la mateixa estratègia amb el mutant nul de *N* en heterozigosi ( $N^{55e11}/+$ ) que presenta ales més petites que els individus salvatges. En aquest cas

els individus dobles mutants  $N^{55e11}/+; cbt^{EP(2)2237E1}/+$  presenten el mateix fenotip que les ales dels mutants de  $N$ , per tant no mostren un *enhancement* del fenotip (figura 36).



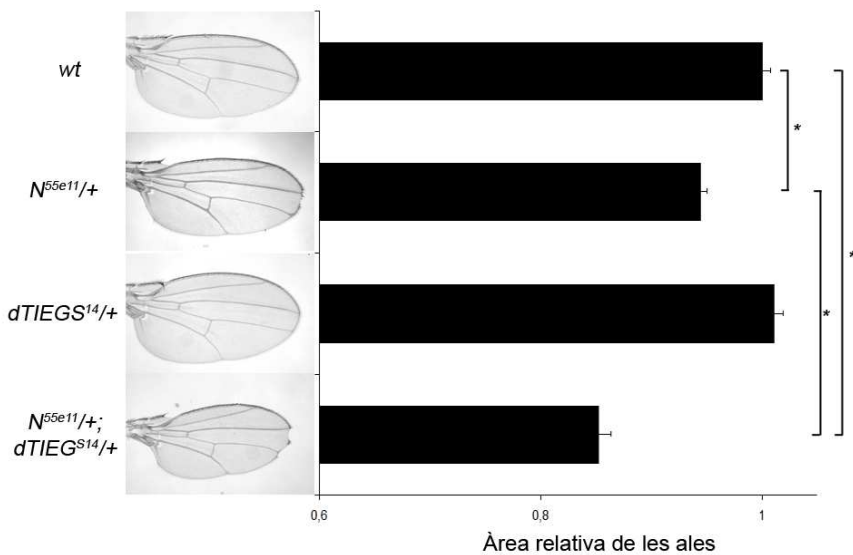
**Figura 36. Interacció genètica entre l'al·lel de pèrdua de funció de  $N$  i l'al·lel mutant de  $cbt^{EP(2)2237E1}$ .** Histograma de les àrees relatives de les ales d'individus salvatges ( $wt$ ), mutants de guany de funció de  $N$  ( $N^{55e11}/+$ ), mutants de  $cbt$  ( $cbt^{EP(2)2237E1}/+$ ) i dobles mutants de  $N$  i  $cbt$  ( $N^{55e11}/+; cbt^{EP(2)2237E1}/+$ ). \* indica  $p$ -valor  $< 0.05$ .

Per confirmar els resultats obtinguts vam utilitzar un nou al·lel de  $cbt$ :  $dTIEG^{S14}$ , recentment publicat (Rodríguez, 2011). Aquest al·lel rescata parcialment el guany de funció de  $N$ , les ales dels individus  $N^{Ax-M1}/+; dTIEG^{S14}/+$  presenten una mida més petita que les dels individus  $N^{Ax-M1}/+$  tot i que són més grans que les dels individus salvatges ( $wt$ ) (figura 37). Els individus dobles mutants  $N^{55e11}/+; dTIEG^{S14}$  tenen ales més petites que les dels mutants de  $N$  demostrant que una pèrdua de funció de  $cbt$  disminueix els nivells d'activitat de la via de  $N$ . A més, a nivell del marge D/V un alt percentatge dels mutants de  $N$  presenten un marge D/V irregular. Tot i que no hi ha un increment de la penetrància d'aquest fenotip en els dobles mutants de  $N$  i  $cbt$  sí observem un increment en la severitat del fenotip, les incisions són més marcades i abundants (figura 38).





**Figura 37. Interacció genètica entre l'al·lel de guany de funció de  $N$  i l'al·lel mutant de  $cbt$   $dTIEG^{S14}$ .** Histograma de les àrees relatives de les ales d'individus salvatges ( $wt$ ), mutants de guany de funció de  $N$  ( $N^{AX-M1}/+$ ), mutants de  $cbt$  ( $dTIEG^{S14}/+$ ) i dobles mutants de  $N$  i  $cbt$  ( $N^{AX-M1}/+; dTIEG^{S14}/+$ ). \* indica p-valor <0.05, \*\* indica p-valor <0.005.

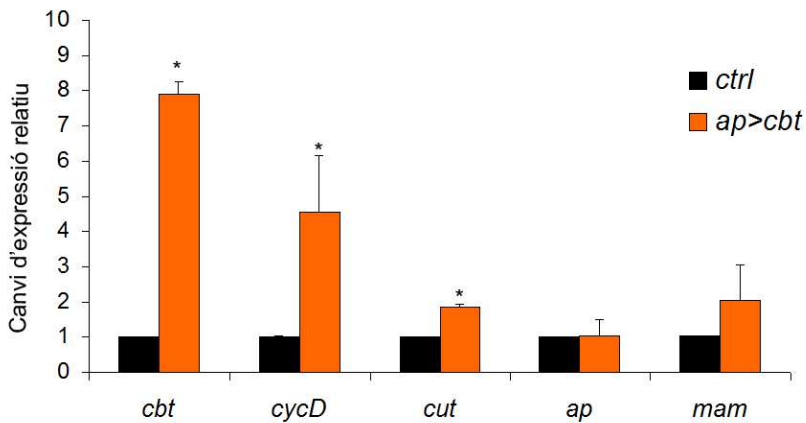


**Figura 38. Interacció genètica entre l'al·lel de pèrdua de funció de  $N$  i l'al·lel mutant de  $cbt$   $dTIEG^{S14}$ .** Histograma de les àrees relatives de les ales d'individus salvatges ( $wt$ ), mutants de pèrdua de funció de  $N$  ( $N^{55e11}/+$ ), mutants de  $cbt$  ( $dTIEG^{S14}/+$ ) i dobles mutants de  $N$  i  $cbt$  ( $N^{55e11}/+; dTIEG^{S14}/+$ ). \* indica p-valor <0.0005.

Els resultats obtinguts indiquen que Cbt regula els nivells d'activitat de la via de N afectant tant la formació del marge D/V com la regulació del creixement del disc d'ala.

### La sobreexpressió de *cbt* incrementa els nivells d'expressió de gens diana de la via de Notch

Les dades obtingudes indiquen que Cbt es troba en els promotors o introns de gens lligats a la via de N i que existeix una interacció genètica entre el factor de transcripció Cbt i la via de N. Aquests resultats suggereixen que Cbt estaria regulant els nivells d'expressió de gens lligats a aquesta via. Per confirmar aquesta hipòtesi vam quantificar els nivells d'expressió de gens diana de Cbt lligats a la via de N en discs salvatges i en discs on s'estava sobreexpressant *cbt* en el compartiment dorsal (*ap>cbt*). A la figura 39 es pot observar la quantificació relativa dels nivells de RNA dels gens *cycD*, *cut*, *ap* i *mam*. Els gens diana de la via de N *cycD* i *cut* presenten un increment estadísticament significatiu de la seva expressió en els discs amb sobreexpressió de *cbt*.



**Figura 39. Quantificació de l'expressió dels gens *cycD*, *cut*, *ap*, *mam* en discs amb sobreexpressió de *cbt*.** qRT-PCR de discs en condicions salvatges (*ctrl*, negre) i discs amb sobreexpressió de *cbt* en el compartiment dorsal (*ap>cbt*, taronja) dels gens *cbt* (control positiu), *cycD*, *cut*, *ap* i *mam*. A l'eix de les Y s'indica el canvi d'expressió relatiu considerant 1 els nivells en condicions salvatges.

Aquestes observacions demostren que Cbt incrementa els nivells d'expressió de gens diana de la via de N. Els dos gens testats que formen part de la via no presenten diferències significatives. Les dades suggereixen que Cbt està regulant probablement la senyalització final de la via de N com a cofactor o modulador d'aquesta. Caldria testar altres gens que formen part de la via per descartar que també reguli l'activitat de la via modificant els nivells d'expressió dels seus component.

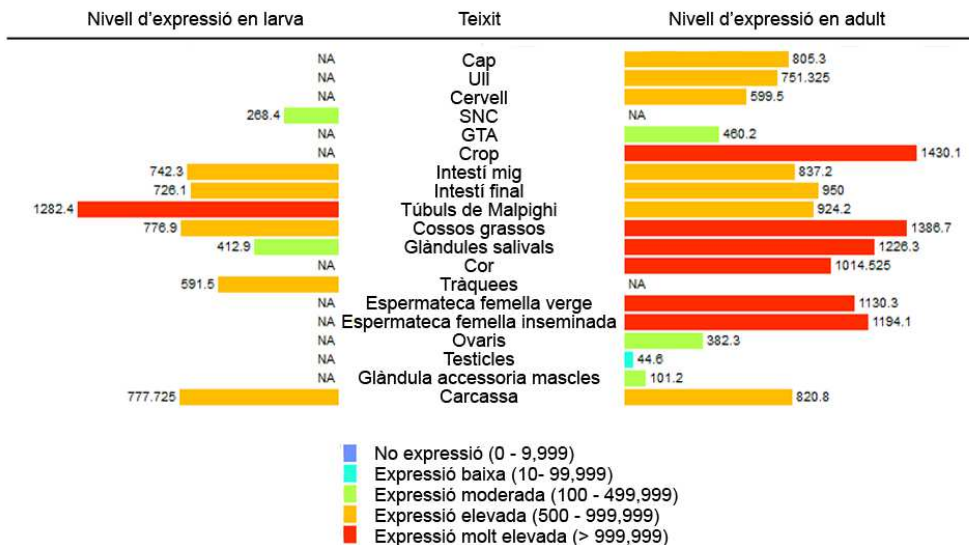
En conjunt els nostres resultats reporten 2060 gens diana de Cbt. L'anàlisi d'aquests gens suggereix noves funcions del gen Cbt i ha permès identificar com a possibles cofactors d'aquest factor de transcripció: Sin3A i GAF. A més l'estudi detallat del paper de Cbt en la regulació de la via de N demostra que Cbt regula l'activitat d'aquesta via i intervé en la formació del marge D/V i la regulació del creixement del disc d'ala.

## Capítol III: Estudi de factors de transcripció reguladors del gen *cabut*



## 1. Estudi dels reguladors de *cbt*

En aquest treball hem analitzat la regulació del gen *cbt* per la via de la JNK durant el procés de regeneració. El gen *cbt*, però, s'expressa de forma ubíqua en tots els teixits imaginals, cosa que fa pensar que els nivells basals de *cbt* no estan regulats només per aquesta via. Segons les dades de l'estudi a gran escala del projecte *FlyAtlas* (Chintapalli et al., 2007) en l'estadi larvari *cbt* s'expressa en el sistema nerviós central (SNC), a l'intestí, als túbuls de Malpighi, al cossos grassos, a les glàndules salivals, a les tràquees i a la carcassa, mentre que en els individus adults es troba expressat al cap, als ulls, al cervell, al gangli toràctic abdominal (GTA), al *crop*, a l'intestí, als túbuls de Malpighi, als cossos grassos, a les glàndules salivals, al cor, als òrgans sexuals i a la carcassa (figura 40).



**Figura 40. Nivells d'expressió de *cbt* en teixits de la larva i l'adult.** Figura modificada de *FlyAtlas* (Chintapalli et al., 2007) indica els nivells d'expressió del gen *cbt* en els teixits de la larva (esquerra) i de les mosques adultes (dreta).

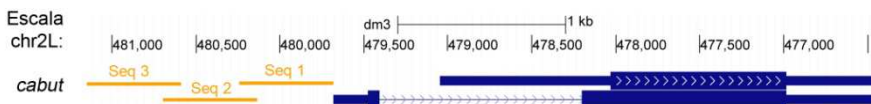
Hi ha algunes evidències de la regulació del gen *cbt* durant el desenvolupament de la larva. Es coneix, com s'ha comentat, que la seva transcripció respon al increment de la producció de l'hormona

Ecdisona (Beckstead et al., 2005) i també s'ha identificat *cbt* com a gen diana de Fork Head (FKH, ortòleg de Fox A) implicat en l'estrès metabòlic i la regulació negativa de la via de TOR en aquestes condicions (Bulow et al., 2010). En aquest estudi els autors mostren que la transcripció del gen *cbt* incrementa amb la sobreexpressió de FKH o amb la inhibició de la via de TOR. Finalment el nostre treball recolza *cbt* com a gen diana de la via de JNK, la qual pot regular els seus nivells tant en el disc d'ala (Blanco et al., 2010) com en l'embrió (Munoz-Descalzo et al., 2005).

### Anàlisi del promotor de *cabut*

Com a primera aproximació per determinar la regulació transcripcional de *cbt* per diferents vies, condicions d'estrès o moments puntuals del desenvolupament (com els canvis de muda, l'entrada en pupa o el tancament dorsal), vam analitzar quins factors de transcripció s'uneixen al seu promotor. Vam utilitzar un mètode automatitzat desenvolupat en el laboratori del Dr. Bart Deplancke al *Ecole Polytechnique Fédéral de Lausanne (EPFL)* basat en la tècnica d'interacció DNA-proteïna en llevat *Yeast-One Hybrid (Y1H)* (Hens et al., 2011). Aquesta metodologia permet identificar quins dels factors de transcripció descrits a *Drosophila* tenen capacitat d'unió a una seqüència de DNA donada.

Vam dissenyar 3 construccions de 600 pb aproximadament que cobreixen uns 1500 parells de bases del promotor de *cbt* solapant-se entre elles: seqüència 1 (Seq 1, chr2L:479,683-480,252), seqüència 2 (Seq 2, chr2L:480,133-480,696) i seqüència 3 (Seq 3, chr2L:480,583-481,165) (figura 41).



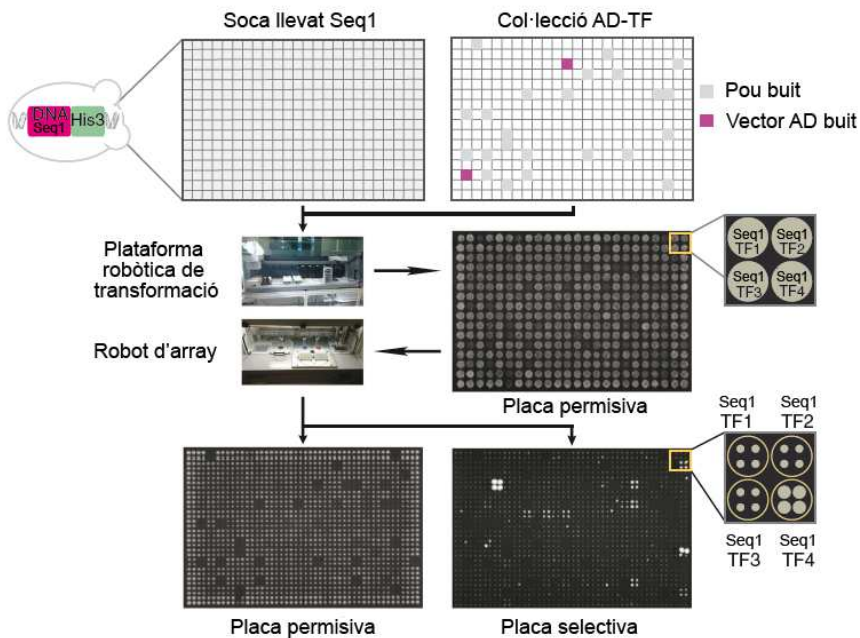
**Figura 41. Seqüències promotores de *cbt*.** Esquema de la posició de les seqüències 1, 2 i 3 utilitzades per a l'experiment de Y1H respecte l'inici de transcripció del gen *cbt*.

Cada seqüència es va clonar en un vector (PBD-His3) a 5' del gen de la Histidina3. Aquestes construccions linealitzades les vam utilitzar per

transformar llevats. Vam seleccionar una soca per a cada construcció tenint en compte la inhibició del creixement de les colònies transformades en medis a diferents concentracions de l'inhibidor de Histidina: 3-amino-1,2,4-triazol. Aquesta selecció garanteix una correcta integració del plasmidi en el genoma del llevat. Vam cultivar i processar les soques seleccionades i finalment les vam utilitzar per a l'experiment de cribratge de Y1H a gran escala.

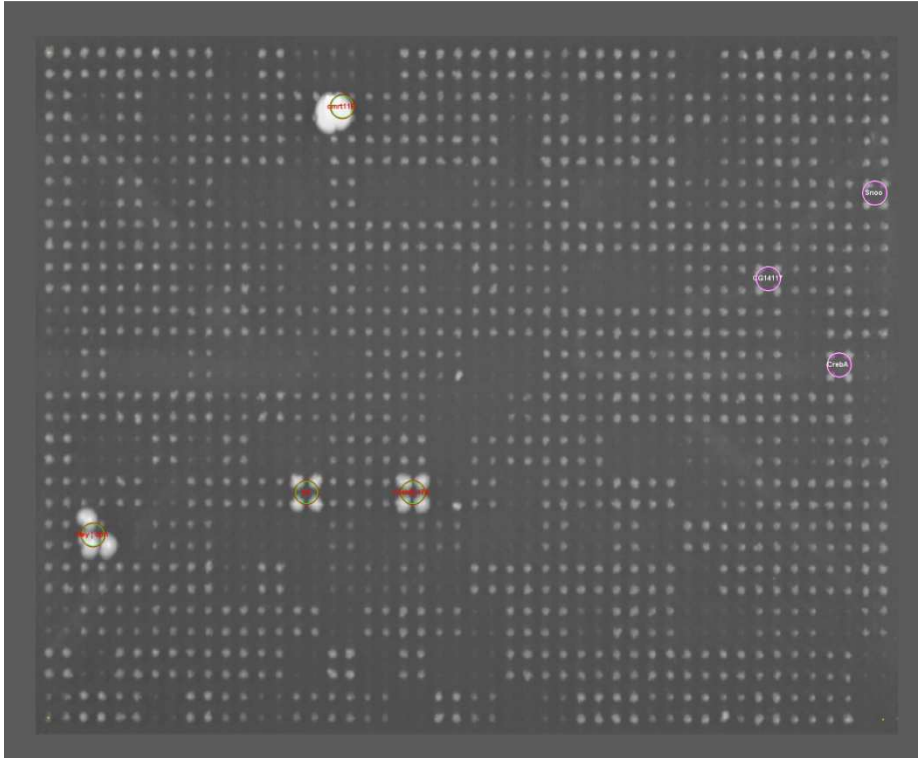
Aquest experiment consisteix en transformar cadascuna de les soques de llevat amb les seqüències integrades en el genoma (Seq1, Seq2 i Seq3) amb cadascun dels 722 factors de transcripció de *Drosophila* de la col·lecció AD-TF, mitjançant una plataforma robòtica de transformació. Els llevats transformats es deixen créixer en un medi permissiu. Posteriorment les colònies són replaquejades per quadruplicat en plaques permissives i selectives. De l'anàlisi del creixement de les diferents colònies de llevat a les plaques selectives es van extreure els factors de transcripció que s'uneixen a les seqüències del promotor de *cbt*. De cadascun d'aquests experiments a gran escala vam realitzar dues rèpliques per tal de garantir l'especificitat de la interacció entre el factor de transcripció i la seqüència de DNA (figura 42).





**Figura 42. Anàlisi de la interacció dels factors de transcripció de *Drosophila* amb les seqüències del promotor de *cbt*.** Esquema del procés de transformació de les soques de llevat que porten les seqüències del promotor de *cbt* (per exemple Seq1) amb els 722 factors de transcripció de la col·lecció AD-TF. S'observa, al mig, l'aspecte que presenta una placa permissiva després de la transformació (els llocs on no hi ha creixement indiquen els pous control sense vector o amb vector sense insert). Finalment, a baix, es pot veure el resultat de replaquejar per quadruplicat les colònies amb un robot d'array en medi permissiu i selectiu.

A la figura 43 s'observa una placa obtinguda després del processament i l'anàlisi de les mostres. Es pot veure com en alguns casos la interacció entre el factor de transcripció i la seqüència promotora de *cbt* promou l'expressió del gen de la *histidina3* permetent el creixement en el medi selectiu.



**Figura 43. Interacció entre els factors de transcripció i la seqüència 1 (Seq1) de la regió promotora de *cbt*.** Imatge del resultat obtingut de l'experiment amb la construcció de la seqüència 1 del promotor de *cbt*. Cada 4 colònies representen una mateixa interacció, cal destacar que les colònies identificades amb un cercle presenten un creixement major al de la resta de colònies. Els cercles vermells indiquen que la diferència de creixement és estadísticament significativa ( $p$ -valor  $< 0,05$ ), els cercles liles són interaccions detectades que no passen el llindar estadístic.

La taula 11 recull els factors de transcripció que presenten una interacció estadísticament significativa amb una o més de les seqüències del promotor de *cbt*. S'indica la seqüència, els processos en els quals estan involucrats els factors, si es coneix el tipus d'activitat transcripcional que exerceixen i les vies a les que pertanyen o amb les que es troben relacionats en la literatura.

Factor de transcripció	Seqüència	Funció	Activadors /Inhibidors	Vies de senyalització
Abd-B	2	Identitat segmental, desenvolupament d'òrgans	A/I	
Antp	2	Identitat segmental	I	
Ase	3	Proliferació epitelial, desenvolupament neuronal		N
Bsh	2	desenvolupament SNC		
CEB/P	2	migració cel·lular		N
Cf2	3	desenvolupament muscular, regulació de l'elongació	A/I	EGFR
CG10321	2			
CG11294	3			
CG11617	3			
CG13296	3			
CG14655	1, 2			
CG15710	2			
CG17186	3			
CG17806	2			
CG31510	1			
CG31875	3			
CG34376	2			
CG4318	2			
CG4360	3			
CG4496	3			
CG6765	2			
CG9215	2			
CrebA	1	formació del patró D/V, desenvolupament de la cutícula, desenvolupament de les glandules salivals	A	cAMP signalling
CrebB-17A	1, 3	memoria, cicle circadià, formació de venes	A	cAMP signalling
D	2	desenvolupament neuronal, formació del D/V		
Dif	3	resposta a estrès i dany del DNA		TOLL
dmrt93B	3	diferenciació sexual		
GATAAd	3	resposta immune		
Gcm	2	determinació del llinatge glial		
Gt	3	AP specification, segment specification, processus metabòlics	I	
Hey	3	negative regulation of N		
Hr78	2	autofagia, desenvolupament traqueal, neurogenesis		

Hsf	2	respostes de defensa, neurogenesis	A	
lmd	2	desenvolupament muscular		
Lz	3	response to stress, eye development		
Max	1	integració de vies de senyalització	A	
Mes4	1	resposta a dany del DNA		
Mid	2	neurogenesis, regulació de la diferenciació	A	
Mnt	2	regulació del cicle cel·lular i creixement, fagocitosis	A/I	
Nau	1, 3	desenvolupament muscular	A	
Opa	2, 3	morfogenesis de l'ull, migració cel·lular	A	TGFβ, Wg
pBP95	2	inhibició lateral		
Pfk	3	neurogenesis		
Pnt	2	desenvolupament de l'ull, proliferació, neurogenesis, morfogenesis	A	EGFR
Rel/NFKB	2	resposta immune, guia axonal, proliferació i diferenciació	A	TOLL
Sd	1	proliferació cel·lular, diferenciació sensorial	A	Hppo
Seq	2	regulació axonal, desenvolupament d'òrgans sensorials	I	FGF
Side	1, 2, 3	guia axonal		
Snoo	1	creixement, regulació del patró, desenvolupament neuronal	A/I	TGFβ, Wg
Sox21b	2			
Stat92E	2	patró de l'ala, determinació de l'ull, resposta de defensa	A	JAK/STAT
Tgo	3	resposta a estrès, diferenciació neuronal, resposta a hormones, metabolisme	A	
Toy	2	morfogenesis neuronal, desenvolupament del disc d'ull-antena	A	
Trr	1	morfogenesis de l'ull, metilació d'histones	A	EcR

**Taula 11. Interacció dels factors de transcripció amb el promotor de *cbt*.**

La taula recull els factors de transcripció que interaccionen amb les seqüències del promotor de *cbt*. S'indica, en aquest ordre, el nom del factor, el número de la seqüència a la que s'uneix, els processos en els que estan involucrats, si són activadors (A) i/o inhibidors (I), i les vies de senyalització a les que pertanyen o amb les que estan relacionats.

Les dades obtingudes dels experiments de Y1H identifiquen 54 factors de transcripció que s'uneixen a la regió promotora de *cbt*. Entre aquests factors 17 són factors de transcripció poc estudiats i no es coneixen en detall els processos en els que participen. Entre els altres 37 factors trobem gens *hox* lligats a la determinació dels segments, factors lligats al desenvolupament neuronal com: Pointed i Signal-transducer and activator of transcription protein at 92E (Stat92E), factors implicats en la resposta a estrès i a agents bacterians com: Dorsal-related immunity factor (Dif) i Relish (Rel/NF-KB), factors relacionats amb l'establiment del patró o factors que regulen el creixement.

Algunes de les interaccions descrites en aquest estudi coincideixen amb dades publicades prèviament. Per exemple en un estudi a gran escala realitzat en cèl·lules S2 de *Drosophila* es detectava una interacció positiva entre Cbt i la via de Ras-MAPK (Horn et al., 2011), via de senyalització que té com a factor de transcripció el factor Pnt. Trr ha estat descrit com a cofactor del Receptor de l'Ecdisona (EcR) (Sedkov et al., 2003) que regula els nivells de *cbt* al final de l'estadi LIII i a l'inici de la pupa (Beckstead et al., 2005). Aquestes dades recolzen les interaccions obtingudes de l'assaig Y1H realitzat. Cal tenir en compte però que amb aquest tipus d'experiment podem estar perdent possibles reguladors de *cbt* que actuïn de forma cooperativa (cofactors que formin heterodímers per exemple) o factors que necessitin d'una activació mitjançada per una via de transducció de senyal que no estigui present en llevats en condicions normals.

### Anàlisi del promotor de *cabut in silico*

Per tal de seleccionar alguns candidats per realitzar estudis en detall de com aquests factors regulen la transcripció del gen *cbt*, vam utilitzar les bases de dades Jaspar (Portales-Casamar et al., 2010) i Transfac (Matys et al., 2003) per cercar motius dels putatius reguladors de *cbt* dins les seqüències promotores de *cbt*. Tenint en compte les matrius dels motius d'unió d'aquests factors vam determinar 13 factors candidats que presenten llocs d'unió al DNA en les seqüències del promotor de *cbt*. La taula 12 recull les seqüències diana que es van trobar dins del promotor de *cbt*.

Factor de transcripció	Seqüència	Motiu
Abd-B	1, 2	CCAAAAA
Abd-B	2	TTCATGG
Abd-B	2	TTAATAA
Abd-B	2	TAACAAA
Antp	1, 2	TAATCAA
Antp	2	GCATTAA
Antp	2	TTCATTAATAA
Bsh	2	GTAATCA
Bsh	2	TTCATGG
Bsh	2	ATAATCG
Bsh	2	GCATTAA
Bsh	2	TCATTAA
CEB/P (Slbo)	2	ATGCCCCA
CEB/P (Slbo)	2	TTTGCATTAA
CEB/P (Slbo)	2	TTTGAAG
CEB/P (Slbo)	2	ATTAATAA
CEB/P (Slbo)	2	ATAACAAA
Cf2	3	TTACATTTAT
D	2, 3	ATAACAAAGAT
Dif	3	TGAAACCCT
Gt	2, 3	ATAACAAAGAT
Hsf	2	TGAATAATCG
Hsf	2	CGAAA
Nau (MyoD)	1, 3	ATCAGCTGTT
Opa	2, 3	CACTGCGGGGTC
Pnt	2	ACGGAAG
Rel	2	CAGACACACCC
Sd	1	GTAAAGAATGAC
Sd	1	TCTAAAAGTGTA
Sd	1	ATTTAAATGTT
Stat92E	2	CGGAAGTCTGTG
Stat92E	2	GATTCAT

**Taula 12. Seqüències d'unió dels factors de transcripció candidats en el promotor de *cbt*.** La taula mostra el nom dels factors de transcripció candidats, la seqüència de *cbt* en la qual hi ha la seqüència diana i la seqüència diana de 5' a 3' en la direcció del DNA.

Vam determinar 15 candidats que presentaven dianes d'unió al promotor de *cbt*. Entre aquests candidats trobem factors lligats al desenvolupament neuronal, a resposta estrès, creixement cel·lular o determinació dels segments durant el desenvolupament. Els resultats obtinguts suggereixen nous reguladors de *cbt* i obren noves portes al paper que podria tenir aquest factor de transcripció en processos com el desenvolupament neuronal. Com a perspectiva de futur per tal del validar aquests resultats caldria realitzar experiments *in vivo* que demostrassin la capacitat d'aquests factors de regular la transcripció del gen *cbt* i la seva capacitat d'unir-se a les seqüències del seu promotor.

DISCUSSIÓ





La regulació de l'expressió gènica requereix la coordinació espacial i temporal de diferents factors de transcripció, generals i específics, en les regions reguladores del genoma. Establir les xarxes d'interacció d'aquests amb els seus cofactors i reguladors epigenètics esdevindrà clau per a entendre la regulació transcripcional i desxifrar el codi que permet el desenvolupament dels diferents organismes i entendre quins mecanismes permeten la seva regeneració (Hawkins and Ren, 2006; Heintzman and Ren, 2007).

## 1. El transcriptoma dels discs regenerats

L'anàlisi dels microarrays de discs regenerats a diferents temps després de la fragmentació ens ha permès identificar els canvis d'expressió gènica durant la regeneració del disc d'ala. Cal destacar que alguns dels gens trobats havien estat identificats prèviament en un estudi de microarrays de discs d'ala i pota regenerats i discs transdeterminats (Klebes et al., 2005). Els gens *Sox15*, *Bap60* i *slamdance (sda)* estaven sobreexpressats en discs de pota transdeterminats. *headcase (hdc)* i *regucalcin* també es trobaven sobreexpressats en discs d'ala i pota regenerats. També, en el mateix treball, es van identificar els gens *Enhancer of split (E(spl))* i *HIHm7*, gens lligats a la via de N (de Celis et al., 1996b), subexpressats en discs transdeterminats. Els nostres resultats en canvi, mostren que *E(spl)* està sobreexpressat de 24 a 72h i que l'expressió de *HIHm7* augmenta en els dos períodes analitzats. A més de validar les nostres anàlisis aquests resultats apunten a que durant la regeneració i la transdeterminació dels discs imaginals es produeixen canvis similars a nivell de regulació gènica però també específics.

L'estudi dels canvis d'expressió a diferents temps de regeneració mostra que durant el primer període analitzat es produeixen més canvis a nivell transcripcional. Aquest fet podria deures a un efecte derivat de la tècnica utilitzada, que requereix la manipulació i implantació dels discs. Per tal de determinar quins efectes té la implantació del disc en l'abdòmen d'una femella adulta hem realitzat el mateix anàlisi de microarrays amb discs implantats sense tallar de 0 a 24h. Entre els gens sobreexpressats n'hi ha que estan associats a la resposta a l'estrès, el desenvolupament,

l'apoptosi i la via de la JNK. Malgrat aquestes categories també les trobem enriquides en els gens sobreexpressats de 0-24h en discs tallats, no tots els gens identificats són els mateixos i, el que és més important, algunes de les categories enriquides en els discs tallats com la via de N i Wg no les trobem en l'anàlisi dels discs no tallats. En resum aquesta aproximació ens ha permès descriure els gens associats a l'inici de la regeneració descartant l'efecte d'implantació dels discs. El desenvolupament de noves tècniques per induir la regeneració, com el mètode CDIR (Bergantiños et al., 2010a), suposa una alternativa per evitar els efectes derivats de la manipulació dels discs.

## Regeneració i vies de senyalització

L'anàlisi de les categories funcionals dels gens amb canvis d'expressió durant les primeres hores de regeneració revela un enriquiment de gens lligats a les vies de JNK, Ras/MAPK i N. Les tres vies de senyalització participen en processos de regeneració en diferents organismes. Per exemple N participa en la regeneració del cor de peix zebra (Raya et al., 2003), la JNK en la regeneració del fetge en ratolí (Schwabe et al., 2003) i la via de Ras/MAPK en la regeneració de planària (Beck et al., 2003; Fraguas et al., 2011; Goldshmit et al., 2012; Raya et al., 2003; Schwabe et al., 2003). A *Drosophila* la via de Ras/MAPK dirigeix la resposta del tancament de la ferida en embrions i intervé en la regulació de l'homeòstasi i la regeneració intestinal (Jiang et al., 2011; Kim and McGinnis, 2010). La via de N està implicada en promoure la diferenciació cel·lular després de la regeneració intestinal i s'ha associat a la proliferació de les cèl·lules glials en front d'un dany en el sistema nerviós central (Biteau et al., 2008; Kato et al., 2011). Les vies de N i Ras/MAPK però, no s'havien relacionat abans amb la regeneració dels discs imaginals.

Mitjançant l'estudi de mutants de *N* i del complex *E(spl)*, hem demostrat que N intervé en la regulació de la proliferació durant la regeneració (Annex). En el nostre estudi també hem identificat gens lligats a la via de la JNK com *cbt*, *Gadd45*, *ple*, *Collagen type IV* (*Cgc25*), *Drosomycine* (*Drs*), *Immune induced molecule 1* (*IM1*), *cryptocephal* (*crc*) o *Transferrin* (*Tsf1*); gens lligats a la via de Wg com *arm* o *Sox15* o gens de la via de Dpp com *Med*. El fet que alguns

d'aquests gens siguin factors de transcripció, com *E(spl)*, *arm* i *Med*, ens porta a hipotetitzar que possiblement algunes vies no s'activen de nou durant el procés de regeneració, com en el cas de la JNK, sinó que senzillament es modulen mitjançant la regulació transcripcional d'algun dels seus components.

## Remodeladors de cromatina en regeneració

Els remodeladors de cromatina són factors que participen en la resposta transcripcional a curt termini. El fet que molts factors també presentin canvis en els resultats dels microarrays confirma que participen en els canvis d'expressió durant la regeneració. Alguns d'aquests gens són *pipsqueak* (*psq*), cofactor de GAF (Schwendemann and Lehmann, 2002), sobreexpressat a les 24h de regeneració. La desacetilasa *HDAC6* i dos membres del complex Brahma: *Brahma associated protein 60KDa* (*BAP60*) i *dalao* (Kal et al., 2000), sobreexpressat en el segon període. I *modifier of mdg4* (*mod(mdg4)*) i *absent small homeotic disc 2* (*ash2*), un membre del grup Trithorax (Trx-G) necessari per a la trimetilació de l'H3K4 (Beltran et al., 2007), sobreexpressats durant tot el procés. Dades experimentals amb mutants d'*ash2* a diferents temps de regeneració indiquen que la reducció d'aquesta proteïna compromet el procés de regeneració (Annex) i confirmen el requeriment de factors epigenètics per a que es dugui a terme la regeneració.

## Gens diana de la via de la JNK

L'activació de la via de la JNK és essencial per la regeneració del disc d'ala (Bergantiños et al., 2010a; Bosch et al., 2005). Un dels gens diana de la JNK més estudiat és el gen *puc*. Aquest gen codifica per una fosfatasa que s'encarrega d'autoregular la via mitjançant la inhibició de Bsk (Martin-Blanco et al., 1998). Estudis prèvis mostren que durant la regeneració l'expressió de *puc* incrementa en les cèl·lules del blastema, assolint els seus màxims a les 12h (Bosch et al., 2005). Aquests estudis però s'han realitzat amb construccions reporterres d'aquest gen, i per tant és probable que el canvi d'expressió de *puc* es produeixi abans de les 12h de regeneració. En el nostre estudi no hem identificat canvis en l'expressió de *puc*,

possiblement perquè a les 24h de regeneració els nivells de *puc* ja s'han downregulat ja que la via de la JNK ja no està activa. Un altre estudi mostra que la JNK inhibeix proteïnes del grup Polycomb (Pc-G) durant la transdeterminació (Lee et al., 2005). Malgrat en el nostre estudi tampoc hem trobat canvis en l'expressió d'aquests gens, sí els hem descrit en altres remodeladors de la cromatina, alguns dels quals pertanyen al grup Trithorax (Trx-G).

Tanmateix, hem identificat altres gens diana de la JNK en regeneració mitjançant la cerca computacional de motius d'AP-1 conservats a varies espècies de *Drosophila*. Tot i que la comparació genòmica és una bona eina per a la descripció d'*enhancers* potencials (Visel et al., 2007), no deixa de ser una predicció computacional que necessita validació experimental. El fet que alguns dels gens obtinguts com, *cbt* o *ple*, hagin estat relacionats anteriorment amb la JNK (Munoz-Descalzo et al., 2005; Pearson et al., 2009), i que Jun i DFos s'uneixin a la seqüència AP-1 descrita al promotor de *cbt* recolza l'especificitat de la cerca.

Una publicació recent proposa que la JNK Bsk pot regular l'activitat transcripcional de forma independent d'AP-1 mitjançant la fosforilació de la serina 10 de la Histona 3 (H3S10P), durant la diferenciació de cèl·lules mare (Tiwari et al., 2011). Per tant és possible que gens que no tenen motius d'unió d'AP-1 en el promotor estiguin també regulats per la via de la JNK. A més planteja un nou escenari transcripcional on la JNK i potser altres vies de senyalització produeixen canvis transcripcionals mitjançant la remodelació de la cromatina.

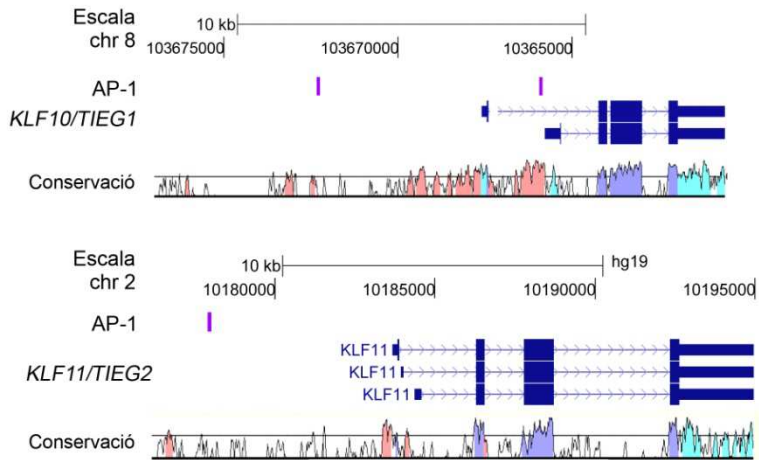
## 2. El gen *cbt* en regeneració

A partir de les dades dels microarrays hem seleccionat *cbt* per realitzar un estudi detallat de la seva relació amb la via de la JNK i el seu paper en la regeneració.

### Regulació de l'expressió de *cbt*

Prèviament s'havia reportat que durant el tancament dorsal a l'embriogènesi, els mutants de *bsk* (*bsk*<sup>2</sup>) i *jun* (*jun*<sup>2</sup>) presenten nivells d'expressió de *cbt* més baixos en l'epidermis que els embrions salvatges (Munoz-Descalzo et al., 2005), però no estava demostrat que la JNK regulés directament la transcripció de *cbt*. Malgrat l'especificitat que hem observat en la unió de Jun i DfosB al promotor de *cbt*, no podem descartar que *in vivo* i en diferents contextos aquestes proteïnes actuïn de forma diferent. Tanmateix hem comprovat que la JNK pot *upregular* l'expressió de *cbt* en el disc d'ala, fet que recolza que *cbt* és un gen diana de la JNK.

No hi ha estudis que relacionin els ortòlegs de *cbt* *TIEG1* i *TIEG2* amb la via de la JNK. En canvi sí sabem que estan regulats per l'activitat de TGFβ, concretament pels factors Smad. Sovint les proteïnes Smad necessiten la presència d'altres factors de transcripció amb els que actuen de forma cooperativa (Cook and Urrutia, 2000). Per exemple, c-Jun i c-Fos actuen cooperativament amb Smad3 i Smad4 per a promoure la regulació transcripcional de la senyal de TGFβ en alguns contextos (Zhang et al., 1998). En fer una anàlisi preliminar dels promotors dels gens *TIEG1* i *TIEG2* en ratolí i humà hem trobat que també presenten seqüències AP-1 (figura 44).



**Figura 44. Seqüències AP-1 en les regions reguladores dels gens TIEG1 i TIEG2 en humà.** Representació de la localització dels gens TIEG1 (superior) i TIEG2 (inferior) i les seqüències AP-1 (rectangle lila) trobades a les seves regions reguladores (promotor fins a 5Kb a 5' del TSS i introns). S'observa la conservació de la regió en comparació amb el genoma de ratolí (VISTA (Frazer et al., 2004) [<http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2>]), vermell indica alta homologia en introns i regions reguladores, blau homologia entre exons).

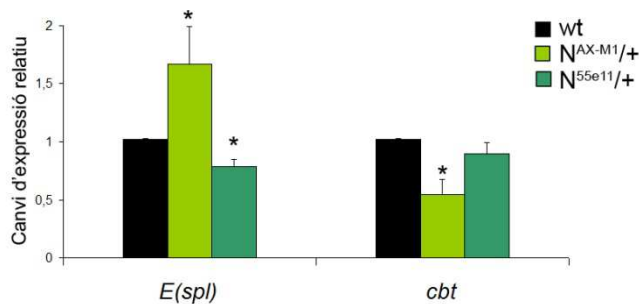
Tot i que és requereixen evidències experimentals, els resultats són prou suggerents per plantejar la hipòtesi de que, com en el cas de *cbt* a *Drosophila*, la regulació dels gens de la família *TIEG* pugui dependre, en certs contextos, de la via de la JNK, cosa que implicaria una conservació de la regulació transcripcional de la família *TIEG*.

En quan a la relació entre *cbt* i la JNK també cal destacar el fet que un gen diana d'aquesta via reguli la proliferació. A més de la seva funció durant el tancament de la ferida, en un estudi en el que analitzaven l'origen de la proliferació del blastema dels discs imaginals, Bosch i col·laboradors (2008) van determinar que la majoria de cèl·lules del blastema provenen de cèl·lules que han expressat el gen *puc*. L'anàlisi de la proliferació en discs mutants de *hep* també va revelar que a 12h i 3 dies de regeneració el nombre de mitosis en el blastema era significativament inferior a l'observat en discs salvatges regenerats. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en altres teixits i models de regeneració on la JNK promou la proliferació per a

la restauració dels teixits (Schwabe et al., 2003). Malgrat estudis prèvis demostren que l'activació de la via de la JNK promou processos apoptòtics en els discs imaginals (Igaki et al., 2006; Kuranaga et al., 2002; Shlevkov and Morata, 2012), les nostres dades confirmen que la JNK, mitjançant la *upregulació* del gen *cbt*, regula el creixement després d'un dany en el disc d'ala de *Drosophila*.

Els nivells d'expressió de *cbt* es restableixen abans de les 72h de regeneració. Aquesta disminució de l'expressió podria ser deguda únicament a la inhibició de la via de la JNK però també és possible que altres factors estiguin implicats en la repressió de *cbt*. La via de N intervé regulant negativament la via de la JNK en el tancament dorsal durant l'embriogènesi i en l'homeòstasi i regeneració de l'intestí de *Drosophila* (Biteau et al., 2008; Zecchini et al., 1999). Per tant, donat que vam trobar diversos membres del complex de *E(spl)* sobreexpressats durant la regeneració vam fer una cerca de motius EBOX: CACGTG (seqüències diana dels factors E(spl)) (Jennings et al., 1999) i vam trobar que *Cbt* presenta 2 EBOXes en el seu promotor proximal. És plausible doncs pensar que N podria estar implicat en la *downregulació* de la via de la JNK i de *cbt* en la regeneració.

Una primera anàlisi dels nivells d'expressió de *cbt* en discs mutants de N mostra que la pèrdua de funció de N no afecta els nivells basals de *cbt*. En canvi, el guany de funció reprimeix la seva expressió, suggerint que en certs contextos la via de N podria reprimir l'expressió de *cbt*. (figura 45).



**Figura 45. Expressió de *cbt* en discs amb guany i pèrdua de funció de N.** Real-time PCR de *E(Spl)*(control positiu) i *cbt* en discs salvatges (wt), amb guany de funció de N ( $N^{AX-M1}/+$ ) i amb pèrdua de funció de N ( $N^{55e11}/+$ ).



Aquestes dades indiquen que N podria ser el responsable de retornar l'expressió de *cbt* als seus nivells basals. Malgrat tot, s'hauria de demostrar experimentalment si la repressió per N és directe, a través de les EBOXes en el promotor de *cbt*, o si es deu a una regulació negativa de la via de la JNK per part de N. També hem de tenir en compte que Cbt podria autoregular-se, ja que s'uneix al seu propi promotor i pot reprimir la seva expressió (Belacortu et al., 2012). El nostre estudi però, evidencia la importància d'una fina regulació del gen *cbt* cosa que concorda amb el fet que un increment de l'expressió de *cbt* durant un llarg període de temps activa processos apoptòtics (Rodríguez, 2011) igual que succeeix amb la via de la JNK (Igaki et al., 2006; Kuranaga et al., 2002; Shlevkov and Morata, 2012).

## Funcions de Cabut

Els mutants homozigots de *cbt* no són capaços de realitzar correctament el tancament dorsal i sembla que Cbt podria estar regulant els canvis de morfologia cel·lular així com la reorganització del citoesquelet en aquest procés. (Munoz-Descalzo et al., 2005). El gen *TIEG1* és necessari per a la cicatrització de l'epidermis en ratolins ja que mutants *knockout* de *TIEG1* presenten un retard en la reepitelització (Hori et al., 2012; Taguchi et al., 2008). Els nostres resultats indiquen que els mutants de *cbt* presenten defectes en el tancament de la ferida. El fet que els fenotips observats en els mutants en heterozigosi no siguin molt severos fa pensar que la copia del gen *wt* que tenen o algun altre factor implicat en el procés podrien ser suficients per compensar la pèrdua parcial de *cbt* en el context estudiat. Tot i així aquestes dades són una evidència clara de que els gens de la família *TIEG* comparteixen similituds a nivell funcional en la resposta del tancament de la ferida.

El defecte més evident que presenten els mutants de *cbt* regenerants és la reducció de la mida de l'ala per una falta de proliferació. Un article publicat durant el transcurs d'aquest treball ja va reportar que Cbt és necessari per al creixement del disc d'ala durant el desenvolupament (Rodríguez, 2011). Els gens *TIEG* també regulen el creixement. *TIEG1* s'ha descrit com a supressor tumoral de diferents tipus de càncer i com a regulador negatiu de la proliferació en precursors neuronal i per altra banda la sobreexpressió de *TIEG2* en

cèl·lules també inhibeix la proliferació (Alvarez-Rodriguez et al., 2007; Cook et al., 1998; Subramaniam et al., 2007). De fet, en altres contextos *cbt* també s'ha descrit com un inhibidor de la proliferació a *Drosophila*, ja que el seu silenciament mitjançant RNAi incrementa la mida i proliferació de les cèl·lules en cultiu (Guertin et al., 2006). Les dades observades suggereixen que la regulació del creixement també és una funció conservada evolutivament per als gens *TIEG*. En *Drosophila*, però, sembla que *cbt* podria actuar promovent o inhibint la proliferació depenent del context. Tenint en compte el perfil d'expressió de *cbt* durant el desenvolupament i la regeneració és probable que els nivells d'expressió d'aquest gen, entre altres factors, condicionin la seva funció en el control de la proliferació.

### 3. Funció de Cbt en el disc d'ala

La identificació dels gens diana d'un factor de transcripció com Cbt és una de les maneres possibles d'aproximar la seva funció en un determinat context. Estudis com el nostre de ChIP-Seq es realitzen, a gran escala, dins del projecte modENCODE (Negre et al., 2011) i han permès identificar regions d'alta complexitat transcripcional, compartides per molts factors de transcripció en els mateixos estadis del desenvolupament, i descriure una xarxa de interaccions entre ells.

L'estudi de categories funcionals GO enriquides en el conjunt de gens diana de Cbt revela que la majoria de gens estan implicats en la regulació transcripcional i el desenvolupament dels discs imaginals. Entre les categories obtingudes n'hi ha que coincideixen amb funcions prèviament associades a Cbt com el desenvolupament neural, el tancament dorsal i la regulació del creixement (Kraut et al., 2001; Munoz-Descalzo et al., 2005; Rodriguez, 2011). També trobem categories associades a les vies de senyalització de Wg, TGF $\beta$ , Ras/MAPKK i N, cosa que concorda amb la hipòtesi de Rodriguez (2011), qui suggereix que Cbt és un modulador de diferents vies de senyalització importants per regular la diferenciació i el creixement dels discs imaginals. Finalment, les nostres anàlisis aporten informació sobre altres processos en els quals Cbt podria tenir un paper rellevant com ara la migració cel·lular, el desenvolupament reproductiu o el desenvolupament neuronal.

La correlació entre dades de ChIP-Seq de factors de transcripció, marques d'histones i RNA-Seq d'un mateix teixit permet descriure l'expressió dels gens diana d'un factor. Així s'ha trobat que els gens amb nivells molt elevats d'expressió (>5000 rpkm) i els gens amb expressió ubiqua es caracteritzen per estar en regions de baixa complexitat, en canvi els gens amb expressions restringides a patrons específics es troben associats a mòduls de regulació on s'uneixen múltiples factors (Negre et al., 2011). Cal recordar que alguns dels gens diana de Cbt presenten patrons restringits en el disc d'ala.

Hem comprovat amb les correlacions del ChIP-Seq de Cbt amb el RNA-Seq i els ChIP-Seqs de modificacions d'histones que Cbt es localitza en promotors de gens transcripcionalment actius. Es coneix que Cbt regula positivament els gens *dpp*, *salm* i *omb* (Munoz-

Descalzo et al., 2005; Rodriguez, 2011), però un estudi recent demostra que també inhibeix l'activitat transcripcional general *in vitro* i concretament, que Cbt es capaç de regular negativament el seu promotor (Belacortu et al., 2012). El nostre treball demostra que Cbt s'uneix a les regions promotores d'aquests gens confirmant que són gens diana directes de Cbt en el disc d'ala. Per tant, Cbt podria ser un factor dual, activador o repressor depenent dels contextos i/o nivells. De fet un rol semblant s'ha associat al seu ortòleg TIEG1 que per exemple regula positivament el gen *Smad2* i inhibeix *Smad7*, promovent una activació de la via de TGF $\beta$  (Johnsen et al., 2002b).

## Mecanismes d'acció de cabut

L'anàlisi de motius d'unió de factors de transcripció a seqüències biològiques ha estat un dels principals mètodes utilitzats per a determinar els elements reguladors d'un conjunt de gens (Zambelli et al., 2012).

La cerca de les seqüències d'unió de Cbt no ha reportat cap motiu d'unió conservat en les seves seqüències diana. Un treball previ mostra que Cbt s'uneix a seqüències riques en CGs en el promotor de *en* (Brown et al., 2005) i la predicció *in silico* de motius per a factors de la família *Zn finger C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>* proposa que Cbt s'uneix al motiu GGGCGGG (Kaplan et al., 2005). A més, Belacortu i col·laboradors (Belacortu et al., 2012) suggereixen que Cbt s'uneix a seqüències riques en CGs en el seu promotor. No hem trobat, però, aquests motius concrets en la majoria de seqüències diana de Cbt. És possible que Cbt s'uneixi a seqüències similars a les descrites i que no les detectem perquè Cbt té la capacitat d'unir-se a seqüències degenerades amb una gran variabilitat o perquè la seva unió al DNA depèn d'altres factors.

Tanmateix la nostra cerca va revelar la presència de motius d'unió del factor de transcripció GAF, cosa que ens va portar a pensar en la possibilitat de que Cbt actuï amb GAF com a cofactor. A part d'aquest factor, Sin3A és un altre candidat a possible cofactor de Cbt, tal i com ho indica la presència d'un domini conservat a unió a Sin3A en la proteïna Cbt (Belacortu et al., 2011). Aquesta interacció estaria conservada evolutivament donat que els factors TIEG també s'uneixen a Sin3A i el seu domini d'unió és important per a la seva activitat repressora.

En correlacionar les anàlisis dels ChIP-Seqs de Sin3A i GAF amb el de Cbt hem trobat un gran nombre de gens que són gens diana de Cbt i Sin3A i de Cbt i GAF. Això ens suggereix que hi ha gens diana de Cbt que poden presentar aquests factors en les seves regions reguladores. Cal considerar que el ChIP-Seq de Sin3A està fet en embrions (0-12h) mentre que el de GAF està fet en la línia cel·lular Kc167. Per tant, malgrat no podem garantir que el solapament existeixi realment és possible que Cbt pugui estar interaccionant físicament amb aquests factors i actuant en els mateixos promotors en algun context. Estudis de col·localització en cromosomes politènics i experiments de coimmunoprecipitació en larves LIII permetran determinar si aquestes proteïnes interaccionen *in vivo*.

## Gens diana de Cabut en el desenvolupament i la regeneració

S'han descrit paral·lelismes entre els mecanismes que es produeixen durant el desenvolupament i els fenòmens necessaris per a portar a terme la regeneració (Martin and Parkhurst, 2004). Durant la regeneració del disc d'ala hem demostrat que l'expressió de *cbt* augmenta i que aquest factor és necessari per a promoure el tancament de la ferida, la proliferació i la formació del patró. També hem descrit que Cbt s'uneix a les regions reguladores de 2060 gens en el disc d'ala de LIII. Cbt actua regulant els mateixos gens durant la regeneració del disc d'ala que durant el seu desenvolupament?

Resultats prèviament publicats mostren que alguns gens diana de Cbt es troben sobreexpressats durant la regeneració del disc d'ala. L'expressió de *wg* i *dm* (*dmyc*) incrementa després de la inducció de mort del domini de *rotund* (*rn*) (Smith-Bolton et al., 2009). El gen *puc*, diana de la JNK que s'expressa al blastema durant la regeneració (Bosch et al., 2005), també es troba entre els gens diana de Cbt. A més, els gens diana de Cbt: *vg*, *tailup* (*tup*), *ap*, *Drop* (*Dr*), *POU domain protein 2* (*pdm2*), *regucalcin*, *eyes absent* (*eya*) i *inflated* (*if*); presenten un increment d'expressió durant la regeneració del disc d'ala (Klebes et al., 2005). La correlació entre els gens diana de Cbt i les dades del transcriptoma de discs regenerants indica que 128 gens sobreexpressats i 158 gens subexpressats de 0-24h i 28 gens

sobreexpressats i 29 subexpressats de 24-72h són gens diana de Cbt en el disc d'ala. Entre aquests hi ha gens associats al desenvolupament del disc d'ala, al tancament dorsal, al cycle cel·lular, a l'apoptosi, a la regulació de la transcripció o a l'envelliment. Seria necessari realitzar estudis detallats per comprovar si l'activació o repressió d'alguns d'aquests gens està lligada a l'increment de l'expressió de *cbt* en regeneració. No hem d'oblidar a més, que entre els gens diana de Cbt hi ha gens implicats en vies de senyalització com JAK/STAT, JNK o Hppo, necessàries durant la regeneració dels discs. Donat que la via de la JNK incrementa l'expressió de *cbt* en regeneració es podria inferir l'existència d'un *loop* en la regulació de *cbt* i la via de la JNK. També trobem gens lligats al citoesquelet d'actina, a la proliferació del disc i a la formació de patró que podrien tenir alguna funció durant la regeneració. Tanmateix no podem descartar que en un context on *cbt* està sobreexpressat s'uneixi a dianes diferents a les que ocupa en el desenvolupament normal.

Malgrat no es coneix el catàleg de gens diana dels factors TIEG, se sap que TIEG1 regula el gen *Nmyc* en cèl·lules precursors neuronals (Alvarez-Rodriguez et al., 2007). El seu ortòleg en *Drosophila*, el gen *diminutive (dm/Dmyc)*, també és gen diana de Cbt en el disc d'ala. TIEG1 i TIEG2 regulen els nivells d'expressió de *Smad2* i *Smad7* i Cbt es localitza a les regions reguladores dels seus ortòlegs *Mad* i *Med*. Per tant sembla que els gens diana de Cbt podrien estar conservats en alguns casos.

Les interaccions genètiques amb els mutants de *cbt* i els al·lels de pèrdua i guany de funció de *N* ( $N^{55e11}$  i  $N^{AX-M1}$ ) mostren una interacció positiva entre aquests factors. L'anàlisi de l'expressió d'alguns dels gens diana de Cbt que pertanyen a la via de *N*, tant en discs salvatges com amb sobreexpressió de *cbt* mostra que l'augment de *cbt* promou un increment dels nivells d'expressió dels gens *cut* i *cycD*, gens que es troben per sota de la via de *N* (Kugler and Nagel, 2007). Aquests resultats suggereixen que Cbt regula la via de *N* mitjançant la regulació dels seus gens diana. Caldrà analitzar més gens diana de Cbt lligats a la via de *N* i realitzar estudis de immunohistoquímica per comprovar si els nivells de proteïna estan afectats. No hem d'oblidar a més que tenim evidències que *N* també podria regular els nivells de Cbt. En conjunt les dades obtingudes ens

porten a plantejar la hipòtesi de que existeixi un feedback *loop* entre Cbt i N, en el qual Cbt activi N i N reprimeixi Cbt, per mitjà dels factors E(spl). Per tant, de manera semblant al que succeeix amb la JNK, hom pot pensar que es requereix una fina regulació de les vies de senyalització per dirigir el creixement durant el desenvolupament.

Les dades obtingudes fins ara mostren que Cbt interacciona amb la via de N i Dpp, regulant els seus gens diana. Cbt podria estar actuant com un cofactor de les diferents vies de senyalització per tal d'integrar i coordinar les seves funcions en el desenvolupament del disc d'ala. Experiments de coimmunoprecipitació podrien determinar si Cbt forma complexos proteics amb els factors de transcripció d'aquestes vies.

## 4. Altres reguladors del gen *cbt*

En aquest treball hem mostrat que l'expressió de *cbt* en els discs imaginals és ubiqua. Tot i que s'ha proposat que existeixen uns nivells basals molt baixos d'activitat de la via de la JNK en el disc imaginal d'ala (McEwen and Peifer, 2005), les hibridacions *in situ* de *cbt* en clons *flip-out* que sobreexpressaven una forma dominant negativa de Fos (*fos<sup>DN</sup>*) no mostraven canvis dels nivells d'expressió de *cbt* (dades no mostrades). No coneixem, doncs, quins factors estan regulant l'expressió de *cbt* en els teixits imaginals ni en altres teixits de la larva i l'adult.

Una aproximació per determinar els reguladors d'un gen és descriure quins factors s'uneixen a la seva seqüència promotora. Existeixen diverses tècniques per a identificar l'especificitat de la interacció proteïna-DNA, una de les quals és l'anàlisi per Y1H. Hem realitzat un estudi de cribratge a gran escala en llevat amb els factors de transcripció descrits a *Drosophila* i la seqüència del promotor proximal de *cbt*, per determinar quins d'aquests factors tenen capacitat d'unir-se a les regions reguladores de *cbt*. Una de les primeres observacions que cal fer en examinar la llista de factors que s'uneixen al promotor de *cbt* és que no hi són presents cap dels factors que sabem que regulen l'expressió d'aquest gen. Una de les explicacions possibles és que, tal i com hem comentat, aquests factors s'uneixen al promotor de *cbt* en resposta a un determinat estímul. Cal recordar que amb aquesta tècnica no treballem amb un teixit dins d'un organisme i que per tant aquelles unions que puguin dependre de senyals sistèmiques com en els casos d'AP-1, EcR o FKH és molt probable que no les puguem detectar en aquest sistema. A més, també hem de considerar que cada colònia transformada contindrà un sol factor de transcripció de *Drosophila*. Alguns dels factors de transcripció com Jun i DFos actuen en forma d'heterodimers, altres com EcR actuen amb un cofactor, que en el cas de EcR és Usp. El fet que el nostre estudi estigui limitat a un sol factor en cada colònia, pot fer que perdem aquests tipus d'interaccions. Tampoc hem detectat la unió de Cbt en el seu promotor, descrita en aquest i altres treballs (Belacortu et al., 2012). Malauradament en la col·lecció utilitzada el clon del factor de transcripció Cbt conté la isoforma B d'aquest gen (*cbt-RB*), una



isoforma que no ha estat detectada a *Drosophila* fins al moment. Donat que aquest clon es va originar a partir de RNA de cultius cel·lulars, sabem que en cèl·lules en cultiu la isoforma s'expressa però no podem garantir que la proteïna sigui funcional com en el cas de Cbt-PA, que és la que s'uneix al promotor de *cbt*.

Tanmateix hem trobat nombrosos factors lligats al desenvolupament del sistema nerviós amb capacitat d'unir-se al promotor proximal de *cbt*, entre els quals destaquen els factors Pnt i STAT92E factors de transcripció de Ras/MAPK i JAK/STAT, respectivament. El gen *cbt* ha estat prèviament associat a la guia d'axons, a la sinaptogènesi i a la remodelació del sistema nerviós durant la metamorfosi (Kraut et al., 2001; Mindorff et al., 2007; Zhao et al., 2008). Durant l'embriogènesi *cbt* s'expressa en el sistema nerviós central (SNC), és localitza a les neurones, en els axons d'aquestes i en cèl·lules glials. Finalment també es troba present en els axons del sistema nerviós perifèric (Belacortu et al., 2011). Hi ha publicacions que proposen que les neurones són capaces de transportar a través dels axons factors de transcripció. És el cas de Dorsal, un factor NF-KB, que es localitza en els axons terminals i les dendrites del SNC a *Drosophila* i que a més està implicat en la guia d'axons (Mindorff et al., 2007) igual que *cbt*.

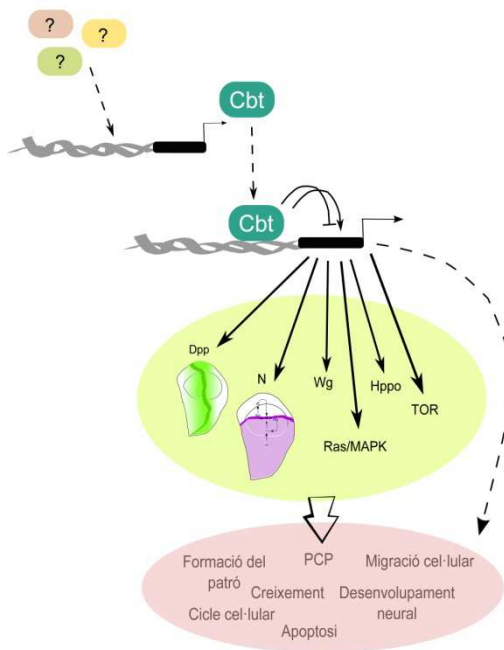
Durant el desenvolupament del disc imaginal d'ull és produïx l'especificació neural de tots els fotoreceptors, i s'estableixen les connexions que seran necessàries per a garantir una correcta visió. Les vies de senyalització de Ras/MAPK, JAK/STAT i N tenen un paper clau en la determinació d'aquests fotoreceptors (Doroquez and Rebay, 2006). L'anàlisi del patró d'expressió de *cbt* en el disc d'ull de *Drosophila* mostra una expressió ubíqua. A nivell de proteïna, tot i que també es troba en totes les cèl·lules del disc, Cbt es localitza en els axons dels fotoreceptors, igual que succeeix en l'embrió. La via de Ras/MAPK és important per a la determinació dels fotoreceptors, però els seus nivells d'activitat no són iguals en tots els fotoreceptors. Per a la determinació del fotoreceptor R7, encarregat de la detecció de la llum UV, és necessiten alts nivells de Ras/MAPK que s'obtenen per mitjà de l'activació de dos receptors *tyrosin-kinase*: EGFR i Sevenless (Sev) (Tomlinson and Ready, 1986). La sobreactivació de la via de Ras (amb l'al·lel *sev<sup>S11</sup>*) durant el desenvolupament promou la

formació de fotoreceptors R7 extres en els ommatidis, on en condicions salvatges només se'n forma un. Com a resultat els organismes presenten un fenotip d'ulls rugosos. La sobreexpressió de *cbt* en ull en les cèl·lules que expressen *sev*, mitjançant la construcció *sev-Gal4*, produeix també un fenotip d'ull rugós (Belacortu et al., 2012). Aquestes dades coincideixen amb les observacions d'interacció de Pnt amb el promotor de *cbt*. Com a experiment preliminar per confirmar la posició de *cbt* per sota de la via de Ras hem sobreexpressat aquest gen amb la mateixa construcció *sev-Gal4* però en un fons mutant de guany de funció *sev<sup>S11</sup>*. Els resultats obtinguts mostren un increment de la rugositat dels ulls confirmant una interacció positiva entre *cbt* i la via de Ras/MAPK.

Per tant els nostres resultats indiquen que la via de Ras/MAPK podria estar regulant l'expressió de *cbt* en el disc d'ull, confirmant les interaccions descrites a l'assaig de Y1H, i suggerint que Cbt podria tenir també un paper en la determinació dels fotoreceptors durant el desenvolupament. Caldrà confirmar les interaccions descrites i determinar la funció de Cbt en el SNC. Finalment cal assenyalar que altres factors associats a processos com la resposta a bacteris, el sistema immunològic o la segmentació també s'uneixen al promotor de *cbt*. Durant les primeres hores de la regeneració dels discs tallats i implantats s'activa una resposta immunològica en el disc de l'ala mitjançada per la via de JAK/STAT (Pastor-Pareja et al., 2008). Podria ser que aquesta resposta regulés també l'expressió de *cbt* en regeneració i que Cbt tingués alguna funció lligada al sistema de defensa en la regeneració del disc d'ala.

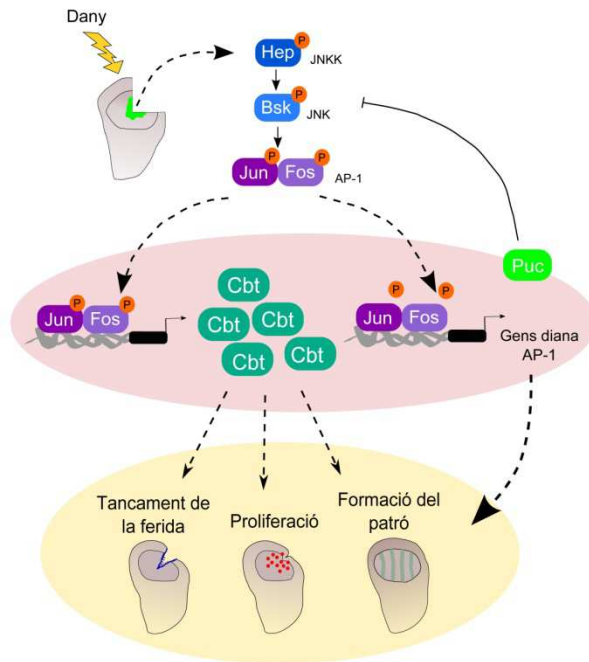
## 5. Cabut en el desenvolupament i la regeneració del disc d'ala

Agafats conjuntament els nostres resultats suggereixen que el factor de transcripció Cbt modula l'activitat de diferents vies de senyalització, possiblement actuant com a cofactor dels seus factors de transcripció, per regular el desenvolupament i la homeòstasi del disc d'ala (figura 46). No es coneixen, però, els factors que controlen l'expressió basal de *cbt* a totes les cèl.lules del disc.



**Figura 46. Model de Cbt en el desenvolupament del disc d'ala.** Cabut regula l'expressió de gens lligats a vies de senyalització. En concret modula l'activitat de les vies de Dpp i N mitjançant la regulació dels seus gens diana. Probablement Cabut participa, també, en el desenvolupament del disc modulant l'activitat d'altres vies de senyalització i regulant l'expressió de gens implicats en la formació del patró, el creixement, l'apoptosi o la PCP.

En regeneració és requereix una activació temporal i controlada de l'expressió de *cbt*. La via de la JNK s'activa en resposta a un dany del teixit dels disc, com la fragmentació o la mort cel·lular induïda, promovent l'augment de *cbt* i altres gens diana. Sembla, doncs, que la via de la JNK dirigeix tot el procés de regeneració mitjançant la regulació dels seus gens diana. Entre aquests gens *cbt* és essencial per a que es puguin dur a terme el tancament de la ferida, la proliferació i la formació del patró necessaris per a que es doni una correcta regeneració (figura 47).



**Figura 47. Model del gen *cbt* en regeneració.** Davant d'un dany del teixit del disc imaginal, com la fragmentació, s'activa la via de la JNK que té com a resultat la fosforilació del factor AP-1 i la seva translocació al nucli. Aquest factor activa la transcripció dels seus gens diana, entre els quals hi ha el gen *cbt*. L'increment de l'expressió de *cbt* és necessària per al tancament de la ferida, la proliferació i la formació del patró durant la regeneració.



## CONCLUSIONS



1. El transcriptoma dels discs d'ala regenerats a 24h i 72h està enriquit en gens associats a l'estrès, al desenvolupament tissular, a la mort cel·lular, a vies de senyalització com la JNK i a la regulació transcripcional.
2. L'expressió de *cbt* incrementa en resposta a la via de la JNK en el disc d'ala i els factors de transcripció Jun i D-Fos són capaços d'unir-se a la seqüència AP-1 descrita en el promotor de *cbt*.
3. El factor de transcripció Cbt és necessari per al tancament de la ferida, la proliferació i la formació del patró durant el procés de regeneració del disc d'ala.
4. Cbt es localitza a les regions reguladores de gens transcripcionalment actius. Aquests gens estan lligats al desenvolupament del disc imaginal, la regulació de la transcripció, creixement i a vies de senyalització com Dpp o N.
5. Cbt interacciona amb la via de N regulant el creixement del disc d'ala. La sobreexpressió de *cbt* activa l'expressió de gens diana de la via de N.
6. Factors de transcripció associats a la segmentació, creixement, resposta a estrès i desenvolupament neural tenen capacitat d'unir-se al promotor proximal de *cbt*.





## BIBLIOGRAFIA



## A

**Abdelilah-Seyfried, S., Chan, Y. M., Zeng, C., Justice, N. J., Younger-Shepherd, S., Sharp, L. E., Barbel, S., Meadows, S. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (2000). A gain-of-function screen for genes that affect the development of the *Drosophila* adult external sensory organ. *Genetics* **155**, 733-52.

**Adachi-Yamada, T., Fujimura-Kamada, K., Nishida, Y. and Matsumoto, K.** (1999). Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. *Nature* **400**, 166-9.

**Adkins, N. L., Hagerman, T. A. and Georgel, P.** (2006). GAGA protein: a multi-faceted transcription factor. *Biochem Cell Biol* **84**, 559-67.

**Affolter, M. and Basler, K.** (2007). The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* **8**, 663-74.

**Alvarez-Rodriguez, R., Barzi, M., Berenguer, J. and Pons, S.** (2007). Bone morphogenetic protein 2 opposes Shh-mediated proliferation in cerebellar granule cells through a TIEG-1-based regulation of Nmyc. *J Biol Chem* **282**, 37170-80.

**Anstaett, O. L., Brownlie, J., Collins, M. E. and Thomas, C. J.** (2010). Validation of endogenous reference genes for RT-qPCR normalisation in bovine lymphoid cells (BL-3) infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV). *Vet Immunol Immunopathol* **137**, 201-7.

**Azpiazu, N. and Morata, G.** (2000). Function and regulation of homothorax in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Development* **127**, 2685-93.

## B

**Baena-Lopez, L. A. and Garcia-Bellido, A.** (2003). Genetic requirements of vestigial in the regulation of *Drosophila* wing development. *Development* **130**, 197-208.

**Bailey, T. L. and Elkan, C.** (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**, 28-36.

**Bakal, C., Linding, R., Llense, F., Heffern, E., Martin-Blanco, E., Pawson, T. and Perrimon, N.** (2008). Phosphorylation networks regulating JNK activity in diverse genetic backgrounds. *Science* **322**, 453-6.

**Barrio, R., de Celis, J. F., Bolshakov, S. and Kafatos, F. C.** (1999). Identification of regulatory regions driving the expression of the *Drosophila* spalt complex at different developmental stages. *Dev Biol* **215**, 33-47.

- Beck, C. W., Christen, B. and Slack, J. M.** (2003). Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate. *Dev Cell* **5**, 429-39.
- Beckstead, R. B., Lam, G. and Thummel, C. S.** (2005). The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Genome Biol* **6**, R99.
- Bejarano, F., Luque, C. M., Herranz, H., Sorrosal, G., Rafel, N., Pham, T. T. and Milan, M.** (2008). A gain-of-function suppressor screen for genes involved in dorsal-ventral boundary formation in the *Drosophila* wing. *Genetics* **178**, 307-23.
- Belacortu, Y., Weiss, R., Kadener, S. and Paricio, N.** (2011). Expression of *Drosophila* Cabut during early embryogenesis, dorsal closure and nervous system development. *Gene Expr Patterns* **11**, 190-201.
- Belacortu, Y., Weiss, R., Kadener, S. and Paricio, N.** (2012). Transcriptional activity and nuclear localization of Cabut, the *Drosophila* ortholog of vertebrate TGF-beta-inducible early-response gene (TIEG) proteins. *PLoS One* **7**, e32004.
- Beltran, S., Angulo, M., Pignatelli, M., Serras, F. and Corominas, M.** (2007). Functional dissection of the *ash2* and *ash1* transcriptomes provides insights into the transcriptional basis of wing phenotypes and reveals conserved protein interactions. *Genome Biol* **8**, R67.
- Bergantiños, C., Corominas, M. and Serras, F.** (2010a). Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. *Development* **137**, 1169-79.
- Bergantiños, C., Vilana, X., Corominas, M. and Serras, F.** (2010b). Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology. *Bioessays* **32**, 207-17.
- Biggin, M. D. and Tjian, R.** (1988). Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. *Cell* **53**, 699-711.
- Bird, A.** (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21.
- Biteau, B., Hochmuth, C. E. and Jasper, H.** (2008). JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut. *Cell Stem Cell* **3**, 442-55.
- Biteau, B., Karpac, J., Hwangbo, D. and Jasper, H.** Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling. *Exp Gerontol* **46**, 349-54.
- Blanco, E., Messegue, X., Smith, T. F. and Guigo, R.** (2006). Transcription factor map alignment of promoter regions. *PLoS Comput Biol* **2**, e49.
- Blanco, E., Ruiz-Romero, M., Beltran, S., Bosch, M., Punset, A., Serras, F. and Corominas, M.** (2010). Gene expression following induction of regeneration in *Drosophila* wing imaginal discs. Expression profile of regenerating wing discs. *BMC Dev Biol* **10**, 94.

**Bosch, M., Baguna, J. and Serras, F.** (2008). Origin and proliferation of blastema cells during regeneration of *Drosophila* wing imaginal discs. *Int J Dev Biol* **52**, 1043-50.

**Bosch, M., Bishop, S. A., Baguna, J. and Couso, J. P.** (2010). Leg regeneration in *Drosophila* abridges the normal developmental program. *Int J Dev Biol* **54**, 1241-50.

**Bosch, M., Serras, F., Martin-Blanco, E. and Baguna, J.** (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* **280**, 73-86.

**Brown, J. L., Grau, D. J., DeVido, S. K. and Kassis, J. A.** (2005). An Sp1/KLF binding site is important for the activity of a Polycomb group response element from the *Drosophila* engrailed gene. *Nucleic Acids Res* **33**, 5181-9.

**Bryant, P. J.** (1971). Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **26**, 637-51.

**Bulow, M. H., Aebersold, R., Pankratz, M. J. and Junger, M. A.** (2010). The *Drosophila* FoxA ortholog Fork head regulates growth and gene expression downstream of Target of rapamycin. *PLoS One* **5**, e15171.

## C

**Calleja, M., Herranz, H., Estella, C., Casal, J., Lawrence, P., Simpson, P. and Morata, G.** (2000). Generation of medial and lateral dorsal body domains by the pannier gene of *Drosophila*. *Development* **127**, 3971-80.

**Capdevila, J. and Guerrero, I.** (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *Embo J* **13**, 4459-68.

**Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C. J., Shu, S., Marshall, B. and Lewis, S.** (2009). AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25**, 288-9.

**Cifuentes, F. J. and Garcia-Bellido, A.** (1997). Proximo-distal specification in the wing disc of *Drosophila* by the nubbin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11405-10.

**Consortium, T. G. O.** (2008). The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Res* **36**, D440-4.

**Cook, T., Gebelein, B., Mesa, K., Mladek, A. and Urrutia, R.** (1998). Molecular cloning and characterization of TIEG2 reveals a new subfamily of transforming growth factor-beta-inducible Sp1-like zinc finger-encoding genes involved in the regulation of cell growth. *J Biol Chem* **273**, 25929-36.

**Cook, T. and Urrutia, R.** (2000). TIEG proteins join the Smads as TGF-beta-regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G513-21.

- Couso, J. P., Knust, E. and Martinez Arias, A.** (1995). Serrate and wingless cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in *Drosophila*. *Curr Biol* **5**, 1437-48.
- Chen, G. G., Xu, H., Lee, J. F., Subramaniam, M., Leung, K. L., Wang, S. H., Chan, U. P. and Spelsberg, T. C.** (2003). 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid arrests growth of colorectal cancer cells via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Int J Cancer* **107**, 837-43.
- Chen, Y. and Struhl, G.** (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**, 553-63.
- Chigurupati, S., Arumugam, T. V., Son, T. G., Lathia, J. D., Jameel, S., Mughal, M. R., Tang, S. C., Jo, D. G., Camandola, S., Giunta, M. et al.** (2007). Involvement of notch signaling in wound healing. *PLoS One* **2**, e1167.
- Chintapalli, V. R., Wang, J. and Dow, J. A.** (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet* **39**, 715-20.
- Chrisman, H. R. and Tindall, D. J.** (2003). Identification and characterization of a consensus DNA binding element for the zinc finger transcription factor TIEG/EGRalpha. *DNA Cell Biol* **22**, 187-99.
- de Celis, J. F., Barrio, R. and Kafatos, F. C.** (1996a). A gene complex acting downstream of dpp in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature* **381**, 421-4.

## D

- de Celis, J. F. and Bray, S.** (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 3241-51.
- de Celis, J. F., de Celis, J., Ligoxygakis, P., Preiss, A., Delidakis, C. and Bray, S.** (1996b). Functional relationships between Notch, Su(H) and the bHLH genes of the E(spl) complex: the E(spl) genes mediate only a subset of Notch activities during imaginal development. *Development* **122**, 2719-28.
- de Celis, J. F., Garcia-Bellido, A. and Bray, S. J.** (1996c). Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* **122**, 359-69.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 4215-25.
- Doherty, D., Feger, G., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in *Drosophila* wing formation. *Genes Dev* **10**, 421-34.

**Doroquez, D. B. and Rebay, I.** (2006). Signal integration during development: mechanisms of EGFR and Notch pathway function and cross-talk. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**, 339-85.

## E

**Edgar, R., Domrachev, M. and Lash, A. E.** (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* **30**, 207-10.

**Eid, M. A., Kumar, M. V., Iczkowski, K. A., Bostwick, D. G. and Tindall, D. J.** (1998). Expression of early growth response genes in human prostate cancer. *Cancer Res* **58**, 2461-8.

**Entchev, E. V., Schwabedissen, A. and Gonzalez-Gaitan, M.** (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* **103**, 981-91.

**Estella, C., McKay, D. J. and Mann, R. S.** (2008). Molecular integration of wingless, decapentaplegic, and autoregulatory inputs into Distalless during Drosophila leg development. *Dev Cell* **14**, 86-96.

## F

**Fraguas, S., Barberan, S. and Cebria, F.** (2011). EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Dev Biol* **354**, 87-101.

**Frazer, K. A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E. M. and Dubchak, I.** (2004). VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res* **32**, W273-9.

**Fristrom, D., Gotwals, P., Eaton, S., Kornberg, T. B., Sturtevant, M., Bier, E. and Fristrom, J. W.** (1994). Blistered: a gene required for vein/intervein formation in wings of Drosophila. *Development* **120**, 2661-71.

## G

**Galliot, B., Tanaka, E. and Simon, A.** (2008). Regeneration and tissue repair: themes and variations. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3-7.

**Garcia-Bellido, A.** (1966). Pattern reconstruction by dissociated imaginal disk cells of Drosophila melanogaster. *Dev Biol* **14**, 278-306.

**Garcia-Bellido, A. and Merriam, J. R.** (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of Drosophila melanogaster. *Dev Biol* **24**, 61-87.

**Garcia-Bellido, A. and Santamaria, P.** (1972). Developmental analysis of the wing disc in the mutant engrailed of Drosophila melanogaster. *Genetics* **72**, 87-104.



- Gerhold, A. R., Richter, D. J., Yu, A. S. and Hariharan, I. K.** (2011). Identification and characterization of genes required for compensatory growth in *Drosophila*. *Genetics* **189**, 1309-26.
- Gibson, M. C. and Schubiger, G.** (1999). Hedgehog is required for activation of engrailed during regeneration of fragmented *Drosophila* imaginal discs. *Development* **126**, 1591-9.
- Glise, B., Bourbon, H. and Noselli, S.** (1995). hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* **83**, 451-61.
- Goldshmit, Y., Sztal, T. E., Jusuf, P. R., Hall, T. E., Nguyen-Chi, M. and Currie, P. D.** (2012). Fgf-dependent glial cell bridges facilitate spinal cord regeneration in zebrafish. *J Neurosci* **32**, 7477-92.
- Granok, H., Leibovitch, B. A., Shaffer, C. D. and Elgin, S. C.** (1995). Chromatin. Ga-ga over GAGA factor. *Curr Biol* **5**, 238-41.
- Grusche, F. A., Degoutin, J. L., Richardson, H. E. and Harvey, K. F.** (2011). The Salvador/Warts/Hippo pathway controls regenerative tissue growth in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **350**, 255-66.
- Guertin, D. A., Guntur, K. V., Bell, G. W., Thoreen, C. C. and Sabatini, D. M.** (2006). Functional genomics identifies TOR-regulated genes that control growth and division. *Curr Biol* **16**, 958-70.
- Gurley, K. A., Rink, J. C. and Sanchez Alvarado, A.** (2008). Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science* **319**, 323-7.

## H

- Hawkins, R. D. and Ren, B.** (2006). Genome-wide location analysis: insights on transcriptional regulation. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 1**, R1-7.
- Hawse, J. R., Subramaniam, M., Ingle, J. N., Oursler, M. J., Rajamannan, N. M. and Spelsberg, T. C.** (2008). Estrogen-TGFbeta cross-talk in bone and other cell types: role of TIEG, Runx2, and other transcription factors. *J Cell Biochem* **103**, 383-92.
- Heintzman, N. D. and Ren, B.** (2007). The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell Mol Life Sci* **64**, 386-400.
- Hens, K., Feuz, J. D., Isakova, A., Iagovitina, A., Massouras, A., Bryois, J., Callaerts, P., Celniker, S. E. and Deplancke, B.** (2011). Automated protein-DNA interaction screening of *Drosophila* regulatory elements. *Nat Methods* **8**, 1065-70.
- Hori, K., Ding, J., Marcoux, Y., Iwashina, T., Sakurai, H. and Tredget, E. E.** (2012). Impaired cutaneous wound healing in transforming growth factor-beta inducible early gene1 knockout mice. *Wound Repair Regen* **20**, 166-77.

**Horn, T., Sandmann, T., Fischer, B., Axelsson, E., Huber, W. and Boutros, M.** (2011). Mapping of signaling networks through synthetic genetic interaction analysis by RNAi. *Nat Methods* **8**, 341-6.

**Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T. and Miura, M.** (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway. *Embo J* **21**, 3009-18.

## I

**Igaki, T., Pagliarini, R. A. and Xu, T.** (2006). Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in Drosophila. *Curr Biol* **16**, 1139-46.

**Iglesias, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Salo, E. and Adell, T.** (2008). Silencing of Smed-betacatenin1 generates radial-like hypercephalized planarians. *Development* **135**, 1215-21.

**Ishimaru, S., Ueda, R., Hinohara, Y., Ohtani, M. and Hanafusa, H.** (2004). PVR plays a critical role via JNK activation in thorax closure during Drosophila metamorphosis. *Embo J* **23**, 3984-94.

**Iuchi, S.** (2001). Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci* **58**, 625-35.

## J

**Jennings, B. H., Tyler, D. M. and Bray, S. J.** (1999). Target specificities of Drosophila enhancer of split basic helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 4600-10.

**Jiang, H., Grenley, M. O., Bravo, M. J., Blumhagen, R. Z. and Edgar, B. A.** (2011). EGFR/Ras/MAPK signaling mediates adult midgut epithelial homeostasis and regeneration in Drosophila. *Cell Stem Cell* **8**, 84-95.

**Jiang, H., Patel, P. H., Kohlmaier, A., Grenley, M. O., McEwen, D. G. and Edgar, B. A.** (2009). Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the Drosophila midgut. *Cell* **137**, 1343-55.

**Jiao, X., Sherman, B. T., Huang da, W., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C. and Lempicki, R. A.** (2012). DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics* **28**, 1805-6.

**Johnsen, S. A., Subramaniam, M., Janknecht, R. and Spelsberg, T. C.** (2002a). TGFbeta inducible early gene enhances TGFbeta/Smad-dependent transcriptional responses. *Oncogene* **21**, 5783-90.

**Johnsen, S. A., Subramaniam, M., Katagiri, T., Janknecht, R. and Spelsberg, T. C.** (2002b). Transcriptional regulation of Smad2 is required for enhancement of TGFbeta/Smad signaling by TGFbeta inducible early gene. *J Cell Biochem* **87**, 233-41.

## K

- Kadener, S., Stoleru, D., McDonald, M., Nawathean, P. and Rosbash, M.** (2007). Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev* **21**, 1675-86.
- Kal, A. J., Mahmoudi, T., Zak, N. B. and Verrijzer, C. P.** (2000). The *Drosophila* brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev* **14**, 1058-71.
- Kaplan, T., Friedman, N. and Margalit, H.** (2005). Ab initio prediction of transcription factor targets using structural knowledge. *PLoS Comput Biol* **1**, e1.
- Kato, K., Forero, M. G., Fenton, J. C. and Hidalgo, A.** (2011). The glial regenerative response to central nervous system injury is enabled by pros-notch and pros-NFkappaB feedback. *PLoS Biol* **9**, e1001133.
- Kim, M. and McGinnis, W.** (2010). Phosphorylation of Grainy head by ERK is essential for wound-dependent regeneration but not for development of an epidermal barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 650-5.
- Klebes, A., Sustar, A., Kechris, K., Li, H., Schubiger, G. and Kornberg, T. B.** (2005). Regulation of cellular plasticity in *Drosophila* imaginal disc cells by the Polycomb group, trithorax group and lama genes. *Development* **132**, 3753-65.
- Klein, T. and Arias, A. M.** (1999). The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in *Drosophila*. *Development* **126**, 913-25.
- Kockel, L., Homsy, J. G. and Bohmann, D.** (2001). *Drosophila* AP-1: lessons from an invertebrate. *Oncogene* **20**, 2347-64.
- Kraut, R., Menon, K. and Zinn, K.** (2001). A gain-of-function screen for genes controlling motor axon guidance and synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol* **11**, 417-30.
- Kugler, S. J. and Nagel, A. C.** (2007). putzig is required for cell proliferation and regulates notch activity in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* **18**, 3733-40.
- Kuhn, R. M., Karolchik, D., Zweig, A. S., Wang, T., Smith, K. E., Rosenbloom, K. R., Rhead, B., Raney, B. J., Pohl, A., Pheasant, M. et al.** (2009). The UCSC Genome Browser Database: update 2009. *Nucleic Acids Res* **37**, D755-61.
- Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., Ichijo, H., Okano, H. and Miura, M.** (2002). Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **4**, 705-10.

## L

- Lawrence, P. A. and Morata, G.** (1976). Compartments in the wing of *Drosophila*: a study of the engrailed gene. *Dev Biol* **50**, 321-37.
- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M.** (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* **381**, 387-93.
- Lecuit, T. and Cohen, S. M.** (1997). Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature* **388**, 139-45.
- Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L. and Paro, R.** (2005). Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* **438**, 234-7.
- Lee, W., Mitchell, P. and Tjian, R.** (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**, 741-52.

## M

- Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. and Martinez-Arias, A.** (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 557-70.
- Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. and Garcia-Bellido, A.** (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7888-93.
- Martin-Blanco, E., Roch, F., Noll, E., Baonza, A., Duffy, J. B. and Perrimon, N.** (1999). A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **126**, 5739-47.
- Martin, P. and Parkhurst, S. M.** (2004). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* **131**, 3021-34.
- Martin, S. J.** (2002). Destabilizing influences in apoptosis: sowing the seeds of IAP destruction. *Cell* **109**, 793-6.
- Mattila, J., Omelyanchuk, L., Kyttala, S., Turunen, H. and Nokkala, S.** (2005). Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. *Int J Dev Biol* **49**, 391-9.
- Matys, V., Fricke, E., Geffers, R., Gossling, E., Haubrock, M., Hehl, R., Hornischer, K., Karas, D., Kel, A. E., Kel-Margoulis, O. V. et al.** (2003). TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res* **31**, 374-8.
- McClure, K. D. and Schubiger, G.** (2008). A screen for genes that function in leg disc regeneration in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* **125**, 67-80.

- McEwen, D. G. and Peifer, M.** (2005). Puckered, a Drosophila MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. *Development* **132**, 3935-46.
- Meinhardt, H.** (1983). Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields. *Dev Biol* **96**, 375-85.
- Milan, M., Baonza, A. and Garcia-Bellido, A.** (1997a). Wing surface interactions in venation patterning in Drosophila. *Mech Dev* **67**, 203-13.
- Milan, M., Campuzano, S. and Garcia-Bellido, A.** (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 640-5.
- Milan, M., Campuzano, S. and Garcia-Bellido, A.** (1997b). Developmental parameters of cell death in the wing disc of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5691-6.
- Minami, M., Kinoshita, N., Kamoshida, Y., Tanimoto, H. and Tabata, T.** (1999). brinker is a target of Dpp in Drosophila that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* **398**, 242-6.
- Mindorff, E. N., O'Keefe, D. D., Labbe, A., Yang, J. P., Ou, Y., Yoshikawa, S. and van Meyel, D. J.** (2007). A gain-of-function screen for genes that influence axon guidance identifies the NF-kappaB protein dorsal and reveals a requirement for the kinase Pelle in Drosophila photoreceptor axon targeting. *Genetics* **176**, 2247-63.
- Montagne, J., Groppe, J., Guillemin, K., Krasnow, M. A., Gehring, W. J. and Affolter, M.** (1996). The Drosophila Serum Response Factor gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to blistered. *Development* **122**, 2589-97.
- Munoz-Descalzo, S., Belacortu, Y. and Paricio, N.** (2007). Identification and analysis of cabut orthologs in invertebrates and vertebrates. *Dev Genes Evol* **217**, 289-98.
- Munoz-Descalzo, S., Terol, J. and Paricio, N.** (2005). Cabut, a C2H2 zinc finger transcription factor, is required during Drosophila dorsal closure downstream of JNK signaling. *Dev Biol* **287**, 168-79.

## N

- Nagoshi, E., Sugino, K., Kula, E., Okazaki, E., Tachibana, T., Nelson, S. and Rosbash, M.** (2010). Dissecting differential gene expression within the circadian neuronal circuit of Drosophila. *Nat Neurosci* **13**, 60-8.
- Nakamura, T., Mito, T., Miyawaki, K., Ohuchi, H. and Noji, S.** (2008). EGFR signaling is required for re-establishing the proximodistal axis during distal leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus* nymph. *Dev Biol* **319**, 46-55.
- Negre, N., Brown, C. D., Ma, L., Bristow, C. A., Miller, S. W., Wagner, U., Kheradpour, P., Eaton, M. L., Loriaux, P., Sealfon, R.**

**et al.** (2011). A cis-regulatory map of the *Drosophila* genome. *Nature* **471**, 527-31.

**Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K.** (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-68.

**Neumann, C. J. and Cohen, S. M.** (1997). Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 871-80.

## O

**Omelina, E. S., Baricheva, E. M., Oshchepkov, D. Y. and Merkulova, T. I.** (2011). Analysis and recognition of the GAGA transcription factor binding sites in *Drosophila* genes. *Comput Biol Chem* **35**, 363-70.

## P

**Pastor-Pareja, J. C., Wu, M. and Xu, T.** (2008). An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis Model Mech* **1**, 144-54; discussion 153.

**Pearson, J. C., Juarez, M. T., Kim, M., Drivenes, O. and McGinnis, W.** (2009). Multiple transcription factor codes activate epidermal wound-response genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2224-9.

**Pena-Rangel, M. T., Rodriguez, I. and Riesgo-Escovar, J. R.** (2002). A misexpression study examining dorsal thorax formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **160**, 1035-50.

**Perez-Lluch, S., Blanco, E., Carbonell, A., Raha, D., Snyder, M., Serras, F. and Corominas, M.** (2011). Genome-wide chromatin occupancy analysis reveals a role for ASH2 in transcriptional pausing. *Nucleic Acids Res* **39**, 4628-39.

**Perkins, K. K., Admon, A., Patel, N. and Tjian, R.** (1990). The *Drosophila* Fos-related AP-1 protein is a developmentally regulated transcription factor. *Genes Dev* **4**, 822-34.

**Perkins, K. K., Dailey, G. M. and Tjian, R.** (1988). Novel Jun- and Fos-related proteins in *Drosophila* are functionally homologous to enhancer factor AP-1. *Embo J* **7**, 4265-73.

**Portales-Casamar, E., Thongjuea, S., Kwon, A. T., Arenillas, D., Zhao, X., Valen, E., Yusuf, D., Lenhard, B., Wasserman, W. W. and Sandelin, A.** (2010). JASPAR 2010: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* **38**, D105-10.

**Pruitt, K. D., Tatusova, T. and Maglott, D. R.** (2007). NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* **35**, D61-5.

## R

- Rajamannan, N. M., Subramaniam, M., Abraham, T. P., Vasile, V. C., Ackerman, M. J., Monroe, D. G., Chew, T. L. and Spelsberg, T. C.** (2007). TGFbeta inducible early gene-1 (TIEG1) and cardiac hypertrophy: Discovery and characterization of a novel signaling pathway. *J Cell Biochem* **100**, 315-25.
- Raya, A., Koth, C. M., Buscher, D., Kawakami, Y., Itoh, T., Raya, R. M., Sternik, G., Tsai, H. J., Rodriguez-Esteban, C. and Izpisua-Belmonte, J. C.** (2003). Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11889-95.
- Redd, M. J., Cooper, L., Wood, W., Stramer, B. and Martin, P.** (2004). Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 777-84.
- Reinhardt, C. A. and Bryant, P. J.** (1981). Wound healing in the imaginal discs of *Drosophila*. II. Transmission electron microscopy of normal and healing wing discs. *J Exp Zool* **216**, 45-61.
- Reinhardt, C. A., Hodgkin, N. M. and Bryant, P. J.** (1977). Wound healing in the imaginal discs of *Drosophila*. I. Scanning electron microscopy of normal and healing wing discs. *Dev Biol* **60**, 238-57.
- Reinholz, M. M., An, M. W., Johnsen, S. A., Subramaniam, M., Suman, V. J., Ingle, J. N., Roche, P. C. and Spelsberg, T. C.** (2004). Differential gene expression of TGF beta inducible early gene (TIEG), Smad7, Smad2 and Bard1 in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* **86**, 75-88.
- Repiso, A., Bergantinos, C., Corominas, M. and Serras, F.** (2011). Tissue repair and regeneration in *Drosophila* imaginal discs. *Dev Growth Differ* **53**, 177-85.
- Resino, J., Salama-Cohen, P. and Garcia-Bellido, A.** (2002). Determining the role of patterned cell proliferation in the shape and size of the *Drosophila* wing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7502-7.
- Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A. and Hafen, E.** (1996). The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* **10**, 2759-68.
- Ring, J. M. and Martinez Arias, A.** (1993). puckered, a gene involved in position-specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the *Drosophila* larva. *Dev Suppl*, 251-9.
- Rodriguez, I.** (2011). *Drosophila* TIEG is a modulator of different signalling pathways involved in wing patterning and cell proliferation. *PLoS One* **6**, e18418.
- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Lavery, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansorge, W. et al.** (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**, 1049-57.

Rozowsky, J., Euskirchen, G., Auerbach, R. K., Zhang, Z. D., Gibson, T., Bjornson, R., Carriero, N., Snyder, M. and Gerstein, M. B. (2009). PeakSeq enables systematic scoring of ChIP-seq experiments relative to controls. *Nat Biotechnol* **27**, 66-75.

## S

**Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F.** (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sanchez Alvarado, A. and Tsonis, P. A.** (2006). Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet* **7**, 873-84.

**Schwabe, R. F., Bradham, C. A., Uehara, T., Hatano, E., Bennett, B. L., Schoonhoven, R. and Brenner, D. A.** (2003). c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology* **37**, 824-32.

**Schwank, G. and Basler, K.** (2010). Regulation of organ growth by morphogen gradients. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001669.

**Schwendemann, A. and Lehmann, M.** (2002). Pipsqueak and GAGA factor act in concert as partners at homeotic and many other loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12883-8.

**Sedkov, Y., Cho, E., Petruk, S., Cherbas, L., Smith, S. T., Jones, R. S., Cherbas, P., Canaani, E., Jaynes, J. B. and Mazo, A.** (2003). Methylation at lysine 4 of histone H3 in ecdysone-dependent development of *Drosophila*. *Nature* **426**, 78-83.

**Shlevkov, E. and Morata, G.** (2012). A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*. *Cell Death Differ* **19**, 451-60.

**Silverstein, R. A. and Ekwall, K.** (2005). Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr Genet* **47**, 1-17.

**Smith-Bolton, R. K., Worley, M. I., Kanda, H. and Hariharan, I. K.** (2009). Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc. *Dev Cell* **16**, 797-809.

**Spain, M. M., Caruso, J. A., Swaminathan, A. and Pile, L. A.** (2010). *Drosophila* SIN3 isoforms interact with distinct proteins and have unique biological functions. *J Biol Chem* **285**, 27457-67.

**Stoick-Cooper, C. L., Weidinger, G., Riehle, K. J., Hubbert, C., Major, M. B., Fausto, N. and Moon, R. T.** (2007). Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* **134**, 479-89.

**Straube, W. L. and Tanaka, E. M.** (2006). Reversibility of the differentiated state: regeneration in amphibians. *Artif Organs* **30**, 743-55.



- Sturtevant, M. A., Biehs, B., Marin, E. and Bier, E.** (1997). The spalt gene links the A/P compartment boundary to a linear adult structure in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 21-32.
- Sturtevant, M. A., Roark, M. and Bier, E.** (1993). The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes Dev* **7**, 961-73.
- Subramaniam, M., Gorny, G., Johnsen, S. A., Monroe, D. G., Evans, G. L., Fraser, D. G., Rickard, D. J., Rasmussen, K., van Deursen, J. M., Turner, R. T. et al.** (2005). TIEG1 null mouse-derived osteoblasts are defective in mineralization and in support of osteoclast differentiation in vitro. *Mol Cell Biol* **25**, 1191-9.
- Subramaniam, M., Harris, S. A., Oursler, M. J., Rasmussen, K., Riggs, B. L. and Spelsberg, T. C.** (1995). Identification of a novel TGF-beta-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res* **23**, 4907-12.
- Subramaniam, M., Hawse, J. R., Johnsen, S. A. and Spelsberg, T. C.** (2007). Role of TIEG1 in biological processes and disease states. *J Cell Biochem* **102**, 539-48.
- Sun, G. and Irvine, K. D.** (2011). Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. *Dev Biol* **350**, 139-51.
- Suske, G., Bruford, E. and Philipson, S.** (2005). Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* **85**, 551-6.

## T

- Tabata, T., Eaton, S. and Kornberg, T. B.** (1992). The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev* **6**, 2635-45.
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. and Kornberg, T. B.** (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development* **121**, 3359-69.
- Tachibana, I., Imoto, M., Adjei, P. N., Gores, G. J., Subramaniam, M., Spelsberg, T. C. and Urrutia, R.** (1997). Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest* **99**, 2365-74.
- Taguchi, M., Moran, S. L., Zobitz, M. E., Zhao, C., Subramaniam, M., Spelsberg, T. C. and Amadio, P. C.** (2008). WOUND-HEALING PROPERTIES OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR beta (TGF-beta) INDUCIBLE EARLY GENE 1 (TIEG1) KNOCKOUT MICE. *J Musculoskelet Res* **11**, 63-69.
- Tanimoto, H., Itoh, S., ten Dijke, P. and Tabata, T.** (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol Cell* **5**, 59-71.

- Tiwari, V. K., Stadler, M. B., Wirbelauer, C., Paro, R., Schubeler, D. and Beisel, C.** (2011). A chromatin-modifying function of JNK during stem cell differentiation. *Nat Genet* **44**, 94-100.
- Tomlinson, A. and Ready, D. F.** (1986). Sevenless: a cell-specific homeotic mutation of the *Drosophila* eye. *Science* **231**, 400-2.

## U

- Uhlirava, M., Jasper, H. and Bohmann, D.** (2005). Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a *Drosophila* tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13123-8.

## V

- Visel, A., Bristow, J. and Pennacchio, L. A.** (2007). Enhancer identification through comparative genomics. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 140-52.
- Volkel, P. and Angrand, P. O.** (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* **89**, 1-20.

## W

- Wang, S. H., Simcox, A. and Campbell, G.** (2000). Dual role for *Drosophila* epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev* **14**, 2271-6.
- Wells, B. S. and Johnston, L. A.** (2012). Maintenance of imaginal disc plasticity and regenerative potential in *Drosophila* by p53. *Dev Biol* **361**, 263-76.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H.** (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677-83.
- Wiersdorff, V., Lecuit, T., Cohen, S. M. and Mlodzik, M.** (1996). Mad acts downstream of Dpp receptors, revealing a differential requirement for dpp signaling in initiation and propagation of morphogenesis in the *Drosophila* eye. *Development* **122**, 2153-62.
- Williams, J. A., Paddock, S. W. and Carroll, S. B.** (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* **117**, 571-84.
- Wood, W., Jacinto, A., Grose, R., Woolner, S., Gale, J., Wilson, C. and Martin, P.** (2002). Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* **4**, 907-12.
- Worley, M. I., Setiawan, L. and Hariharan, I. K.** (2012). Regeneration and Transdetermination in *Drosophila* Imaginal Discs. *Annu Rev Genet.*

**Wu, J. and Cohen, S. M.** (2002). Repression of Teashirt marks the initiation of wing development. *Development* **129**, 2411-8.

## Z

**Zambelli, F., Pesole, G. and Pavesi, G.** (2012). Motif discovery and transcription factor binding sites before and after the next-generation sequencing era. *Brief Bioinform.*

**Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 2265-78.

**Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-44.

**Zecca, M. and Struhl, G.** (2002). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1357-68.

**Zecca, M. and Struhl, G.** (2007). Control of *Drosophila* wing growth by the vestigial quadrant enhancer. *Development* **134**, 3011-20.

**Zecchini, V., Brennan, K. and Martinez-Arias, A.** (1999). An activity of Notch regulates JNK signalling and affects dorsal closure in *Drosophila*. *Curr Biol* **9**, 460-9.

**Zeidler, M. P., Tan, C., Bellaiche, Y., Cherry, S., Hader, S., Gayko, U. and Perrimon, N.** (2004). Temperature-sensitive control of protein activity by conditionally splicing inteins. *Nat Biotechnol* **22**, 871-6.

**Zhang, J. S., Moncrieffe, M. C., Kaczynski, J., Ellenrieder, V., Prendergast, F. G. and Urrutia, R.** (2001). A conserved alpha-helical motif mediates the interaction of Sp1-like transcriptional repressors with the corepressor mSin3A. *Mol Cell Biol* **21**, 5041-9.

**Zhang, Y., Feng, X. H. and Derynck, R.** (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* **394**, 909-13.

**Zhao, T., Gu, T., Rice, H. C., McAdams, K. L., Roark, K. M., Lawson, K., Gauthier, S. A., Reagan, K. L. and Hewes, R. S.** (2008). A *Drosophila* gain-of-function screen for candidate genes involved in steroid-dependent neuroendocrine cell remodeling. *Genetics* **178**, 883-901.

ANNEX



RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Gene expression following induction of regeneration in *Drosophila* wing imaginal discs. Expression profile of regenerating wing discs

Enrique Blanco<sup>3</sup>, Marina Ruiz-Romero<sup>3</sup>, Sergi Beltran<sup>1,3</sup>, Manel Bosch<sup>1,3</sup>, Adrià Punset<sup>2,3</sup>, Florenci Serras<sup>3</sup>, Montserrat Corominas<sup>3\*</sup>

## Abstract

**Background:** Regeneration is the ability of an organism to rebuild a body part that has been damaged or amputated, and can be studied at the molecular level using model organisms. *Drosophila* imaginal discs, which are the larval primordia of adult cuticular structures, are capable of undergoing regenerative growth after transplantation and *in vivo* culture into the adult abdomen.

**Results:** Using expression profile analyses, we studied the regenerative behaviour of wing discs at 0, 24 and 72 hours after fragmentation and implantation into adult females. Based on expression level, we generated a catalogue of genes with putative role in wing disc regeneration, identifying four classes: 1) genes with differential expression within the first 24 hours; 2) genes with differential expression between 24 and 72 hours; 3) genes that changed significantly in expression levels between the two time periods; 4) genes with a sustained increase or decrease in their expression levels throughout regeneration. Among these genes, we identified members of the JNK and Notch signalling pathways and chromatin regulators. Through computational analysis, we recognized putative binding sites for transcription factors downstream of these pathways that are conserved in multiple *Drosophilids*, indicating a potential relationship between members of the different gene classes. Experimental data from genetic mutants provide evidence of a requirement of selected genes in wing disc regeneration.

**Conclusions:** We have been able to distinguish various classes of genes involved in early and late steps of the regeneration process. Our data suggests the integration of signalling pathways in the promoters of regulated genes.

## Background

The process of regeneration allows organisms to recreate the original shape, size and function of body parts that have been lost or damaged. Regenerative capacity varies between species, ranging from simple wound healing to unrestricted regeneration of all body parts [1,2]. Since the basis of regeneration was first established by T. H. Morgan [3], an extensive body of literature has been published describing the different mechanisms of regeneration employed in many different species. For instance, regeneration of complete individuals from any tiny body fragment has been studied in

freshwater planarians and hydra [4,5], and limb regeneration after amputation has been explored in detail in amphibians and teleost fish [6-8]. Regeneration of heart, liver, pancreas, and other organs has been also extensively studied in zebrafish, mouse and human [9-12].

*Drosophila* imaginal discs, the larval primordia of adult cuticular structures, are capable of undergoing regenerative growth. When imaginal discs are manually fragmented and cultured in the abdomen of adult flies, cells at the wound site undergo proliferation and regenerate the missing part. Pioneering experiments demonstrated that regeneration induces limited cell plasticity, enabling the reconstitution of missing tissue while disc identity is maintained (reviewed in [13,14]). In rare cases, however, the initial fate was lost in some subsets of proliferating cells, which acquired the identity of

\* Correspondence: mcorominas@ub.edu

<sup>3</sup>Departament de Genètica, and Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Diagonal 645, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article

another disc type in a phenomenon named transdetermination [15,16]. As in many other systems, regeneration of imaginal discs involves wound healing and blastema formation [17,18]. In a rapid response to injury, epithelial and cytoskeletal changes occur during the first 24 hours. Concomitantly, local proliferation increases and peaks around 2-3 days after fragmentation [19,20]. This in vivo culture system has proven to be a powerful method for studying the regenerative process at the tissue and cellular level, and what is known about the underlying molecular mechanisms implicates several signalling pathways.

The JNK signal transduction cascade is activated by exposure of cells to cytokines or environmental stress. Multiple studies have demonstrated that JNK regulates cell proliferation, apoptosis, inflammatory responses, tissue morphogenesis, and polarity [21,22]. In the *Drosophila* embryo, several downstream target genes of this signalling pathway are involved in dorsal closure and thorax formation [23,24]. The JNK pathway is required during imaginal disc regeneration [17,18,25] and is activated near the wound as well as in cell death-induced regeneration [26]. The Wnt signalling cascade plays a key role in most aspects of embryonic development [27] and is involved in multiple processes during regeneration [28,29]. Induction of ectopic expression of *wingless* (*wg*), a member of the Wnt family, mimics the pattern changes observed in leg imaginal discs after fragmentation (including regeneration), and promotes cell-fate plasticity such as leg-to-wing transdetermination [30,31]. The Notch signalling pathway is essential to determine cell fate and regulate pattern formation during embryonic and adult life [32]. It has been also reported to participate in the regeneration of zebrafish heart [33], *Xenopus* tail [6], mice muscle [34] and in transdetermination of imaginal discs [31]. Finally, *dpp* is induced by the JNK pathway in the leading edge cells during dorsal closure [22] although no upregulation of its expression has been found during the process of regeneration [35].

The outcome of these signalling pathways is the transcriptional regulation of target genes that will elicit the ultimate response. Precisely which genes are required for the process of regeneration has been examined in the last few years by the use of genetic and molecular techniques in various model organisms (such as planarians, hydra, amphibians and zebrafish). For example, a large-scale RNAi-based screen was performed to survey gene function in planarian regeneration [36] and a global analysis of gene expression was carried out in *Xenopus* limb regeneration [37]. In *Drosophila*, a collection of lethal P-lacZ enhancer trap lines was used to screen for genes that function in leg disc regeneration [20]. Klebes et al. [31] reported the expression profiles of cells induced by ectopic *wg* expression to

transdetermine from leg to wing disc, thus generating a list of candidate regulators of cellular plasticity in flies. Despite these studies, however, it remains unclear whether regeneration requires the reactivation of earlier developmental genes or signalling pathways, or if it involves the activation of novel genes specific to the regeneration process. In an attempt to answer these questions we have taken a systematic approach and determined the expression profile of regenerating wing imaginal discs at different times after fragmentation and culture. By combining experimental and computational techniques, we have been able to decipher the transcriptional status of regenerating discs and link signalling circuits to gene regulation.

## Results and Discussion

### Whole genome expression analysis of intact and regenerating wing discs

Previous studies from our group showed that epithelial and cytoskeleton changes occur during the first 24 hours of regeneration [17] and that proliferation peaks two to three days after the cut [19]. To study different stages of the regenerative process we designed 12 microarrays containing 12,254 genes annotated in RefSeq from *D. melanogaster* [38]. Four microarrays (non cut, NC0→NC24) were used to assess the effect of the implantation procedure in intact wing discs. The remaining eight were used to measure changes in gene expression in the first 24 hours after disc dissection and implantation (cut, C0→C24) and during the period between 24 hours and 72 hours after the cut (C24→C72). The entire set of microarrays was normalized following the same protocol, extracting in each case the list of significant genes (at least two-fold change, false discovery rate (FDR)-corrected *P* value < 0.05, see Methods). The genes identified in these microarrays were functionally annotated using the Gene Ontology (GO terms [39]).

The number of genes whose expression was significantly modified during regeneration is shown in Table 1. More genes were reported in C0→C24 in comparison to NC0→NC24, which reflects the combination of regeneration events and the implantation effect at this early stage. In fact, half of the genes whose expression was significantly upregulated or downregulated during this period in cut discs were not detected in non-

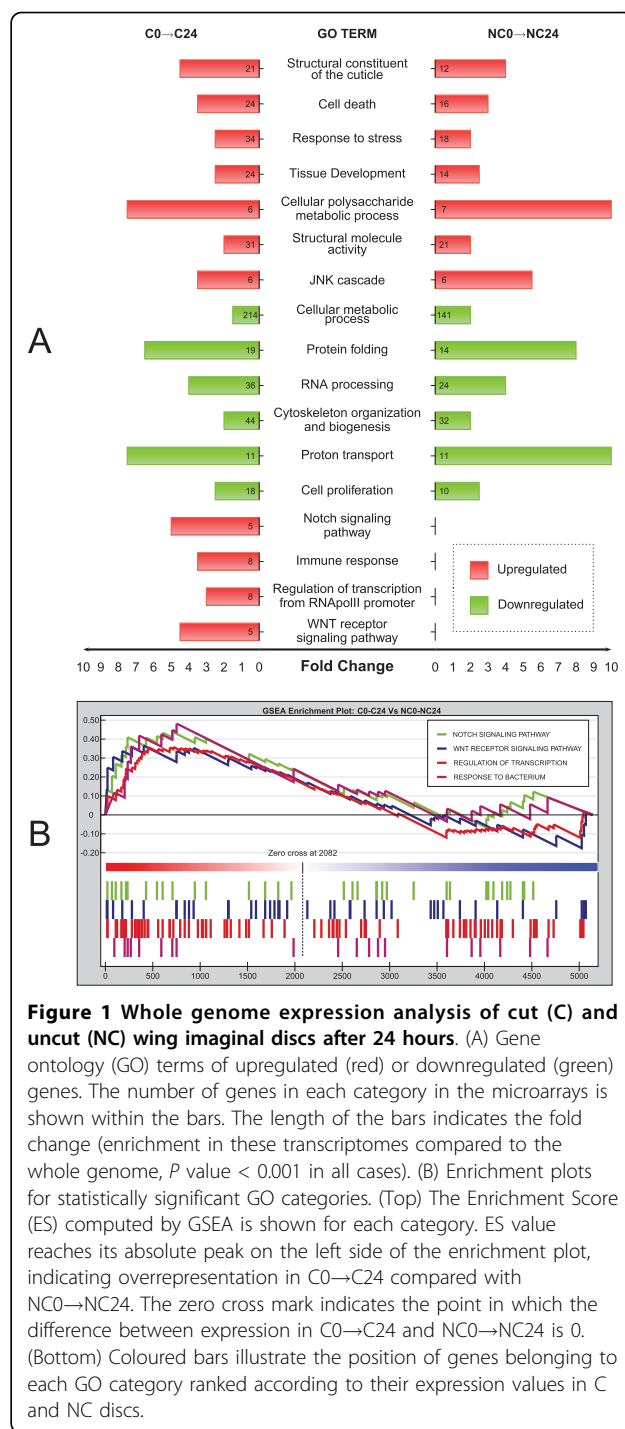
**Table 1 Total number of up and downregulated genes in NC0→NC24, C0→C24 and C24→C72 microarrays**

	NC0→NC24	C0→C24	C24→C72
Genes ↑	407	607	116
Genes ↓	356	576	165
TOTAL	763	1183	281

fragmented ones (44% of 1,183 differentially expressed genes in C0→C24 were not found in NC0→NC24). Conversely, most relevant genes in the intact discs transcriptome presented the same expression pattern in cut discs (87% of 763 genes in NC0→NC24 were in C0→C24). The number of genes in C0→C24 was also higher than in C24→C72 confirming the strong initial response during the first 24 hours.

Functional annotation of both C0→C24 and NC0→NC24 microarrays reveals significant enrichment in genes associated with apoptosis, response to stress, cytoskeletal activity, and JNK pathway regulation (Figure 1A), which agrees well with previous results reported for early regeneration of wing imaginal discs [17,18]. The cellular machinery required for gene expression (RNA processing and protein synthesis) seems to be blocked during the first 24 hours after implantation. We analyzed the set of genes displaying expression changes only in cut and implanted discs (200 upregulated and 220 downregulated genes in C0→C24), which presumably represents the early regeneration signature in wing imaginal discs. Many upregulated genes (Figure 1A) are associated with the immune response to other organisms and probably constitute a response to surgical manipulation. It has been reported that mechanical wounding is able to induce an antibacterial response that might prime the organism to fight what is perceived to be an increased likelihood of infection [40]. More importantly, we identified several genes involved in the Notch and Wg signalling pathways and transcription factor-encoding genes whose expression is increased only in cut discs during the first 24 hours (Additional file 1). Functional analysis of downregulated genes identified enrichment associated with multiple metabolic processes.

While direct comparison between upregulated and downregulated genes in C0→C24 and NC0→NC24 provides a qualitative description of both transcriptomes, GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) is able to reconstruct a quantitative portrait of the functional differences between these microarrays. GSEA is a computational method that determines whether a defined set of genes (e.g. GO categories) shows statistically significant differences between two biological conditions (e.g. cut versus intact discs) [41]. Genes associated with a given GO category were ranked according to their expression profiles (C0→C24 versus NC0→NC24). Then, the enrichment score (ES) was calculated to evaluate if the GO terms were randomly distributed or found at the extremes (left or right) of the ranked list. While GSEA analysis detected a significant enrichment in C0→C24 ( $P$  value < 0.01) of genes involved in Notch and Wg signalling pathways, several transcription factors and the immune response (Figure 1B), no particular categories were found to be



**Figure 1 Whole genome expression analysis of cut (C) and uncut (NC) wing imaginal discs after 24 hours.** (A) Gene ontology (GO) terms of upregulated (red) or downregulated (green) genes. The number of genes in each category in the microarrays is shown within the bars. The length of the bars indicates the fold change (enrichment in these transcriptomes compared to the whole genome,  $P$  value < 0.001 in all cases). (B) Enrichment plots for statistically significant GO categories. (Top) The Enrichment Score (ES) computed by GSEA is shown for each category. ES value reaches its absolute peak on the left side of the enrichment plot, indicating overrepresentation in C0→C24 compared with NC0→NC24. The zero cross mark indicates the point in which the difference between expression in C0→C24 and NC0→NC24 is 0. (Bottom) Coloured bars illustrate the position of genes belonging to each GO category ranked according to their expression values in C and NC discs.

specific only in intact discs. This observation strengthens the early regeneration signature identified by direct comparisons of upregulated and downregulated genes.

By comparing the differential gene expression between cut and uncut discs, we have been able to describe the implantation effect at the transcriptomic level. However, as biological processes governing disc regeneration may be pertinent for the implantation response, a clear



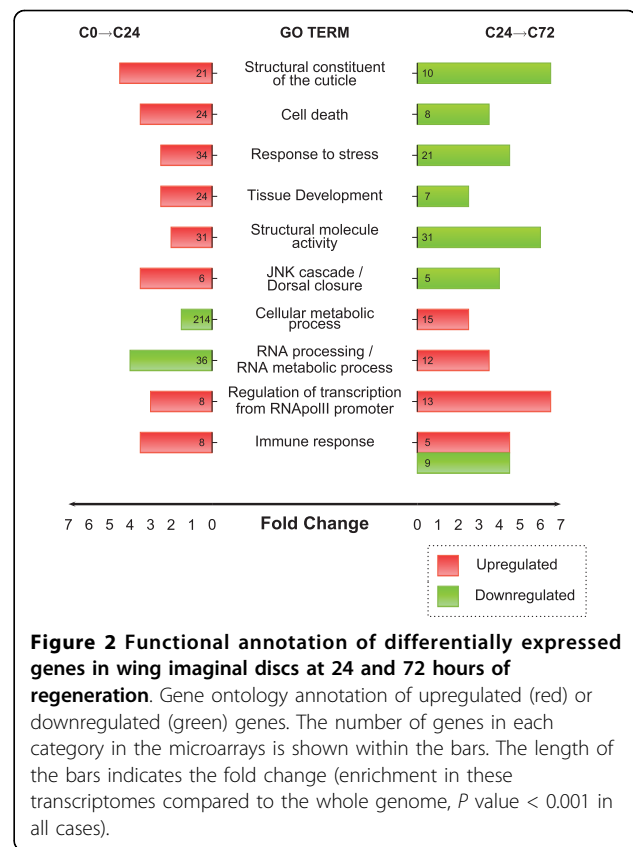
distinction between C0→C24 and NC0→NC24 gene sets is rather difficult to make at this point. For instance, genes involved in apoptosis and regulation of the JNK cascade, which have been reported to be essential for imaginal disc wound healing and dorsal closure [17,24], were identified as upregulated in microarrays for intact discs. Implantation probably results in sufficient stress to trigger the JNK pathway and these genes cannot be eliminated as relevant. Moreover, members of the Notch and Wg signalling pathways, which show increased expression only in cut discs, have been previously reported in other regeneration systems [31,33]. As an alternative, the nonsurgical method for inducing tissue damage and regeneration [26,28] emerges as a very powerful system not only to avoid the technical difficulties associated with disc transplantation but also to perform new molecular screens and validate our results.

#### Identification of genes with putative roles in regeneration

We next examined the set of 281 genes showing expression changes in the C24→C72 microarrays and detected an enrichment of transcription factors during this second regeneration stage (Figure 2 and Additional file 2). When compared to C0→C24 experiments, we observed a significant increase in genes involved in the regulation of RNA metabolism and gene expression in the set of upregulated genes, whereas genes involved in apoptotic processes, structural activities and dorsal closure were augmented in the set of downregulated genes (Figure 2). These results suggest that the normal activity of imaginal discs, interrupted in response to dissection and implantation, is resumed during the 24-72 hours of regeneration. In addition, we detected functional categories associated with the immune system in both, upregulated genes (related to the stress response) and downregulated genes (related to the defense response to bacteria).

We performed GSEA analysis of C0→C24 and C24→C72 microarrays in order to elucidate which GO categories are enriched in the full transcriptomes. The GSEA plot in Figure 3A shows the functional classes overrepresented in early regeneration. The results of that analysis confirmed the enrichments previously identified (Figure 2). Moreover, in addition to RNA processing and protein folding activities, GSEA analysis of C24→C72 identified an enrichment in genes associated with cell proliferation and chromatin remodeling processes during late regeneration of wing discs (Figure 3B).

To further characterize the regeneration process, we defined four classes of genes according to their expression levels (Figure 4): Class I, genes showing differential expression only in C0→C24; Class II, genes with differential expression only in C24→C72; Class III, genes displaying changing expression levels between the two



**Figure 2 Functional annotation of differentially expressed genes in wing imaginal discs at 24 and 72 hours of regeneration.** Gene ontology annotation of upregulated (red) or downregulated (green) genes. The number of genes in each category in the microarrays is shown within the bars. The length of the bars indicates the fold change (enrichment in these transcriptomes compared to the whole genome,  $P$  value < 0.001 in all cases).

periods; and Class IV, genes that steadily increase or decrease their expression levels. For each class, we graphically defined their characteristic functional signature using GSEA analysis (for a list of representative genes, see Figure 5 and Additional file 3).

Class I genes show a significant change, either increasing or decreasing expression between 0 hours and 24 hours after the cut, but remain constant during the second period of time. Most genes in C0→C24 present this expression pattern (82% of upregulated genes and 93% of downregulated genes, Additional file 4). As expected, we found upregulated genes associated with dorsal closure, the JNK cascade, MAP kinase activity, and the Notch and Wg signalling pathways. In addition, other genes associated with imaginal disc development, immune response, and apoptotic processes were detected. Moreover, we identified several downregulated genes in this class associated with growth regulation or involved in chromatin remodeling and wing disc development. This category is a representation of the additive response of the implantation effect and the process of regeneration.

Class II genes display increased or decreased expression between 24 and 72 hours but remain constant in C0→C24. Approximately half of the genes in C24→C72 showed this expression pattern (44% of upregulated

genes and 49% of downregulated genes, Additional file 4). A significant enrichment of upregulated transcription factors was observed in Class II, including *Sox box protein 15* (*Sox15* or *SoxF*), *Enhancer of split* (*E(spl)*) and *Medea* (*Med*). *SoxF* codes for a transcription factor involved in the Wg signalling pathway that has been linked to control of proliferation in *Drosophila* [42] and also skeletal muscle regeneration in mice [43]. *E(spl)* is an essential Notch signalling pathway mediator [32] and *Med*, a component of the *dpp* pathway [44]. Moreover, several chromatin regulators showing increasing expression levels are also included in this class. Brahma associated protein 60 kD (Bap60) and Dalao are components of the Brahma complex involved in chromatin remodeling [45] and Nucleosome assembly protein 1 (Nap1) has been implicated in nucleosome assembly [46]. *Bap60* and *Sox15* have been also identified in microarrays of leg disc transdetermination [31]. Activation of these genes together with the presence in this class of splicing and translation initiation factors indicates that the normal RNA processing machinery resumes its activity in the disc at this stage. In contrast, genes involved in the wound healing response and cytoskeletal organization processes were downregulated, presumably indicating that cell shape changes and cytoskeletal reorganization described in early healing have been accomplished.

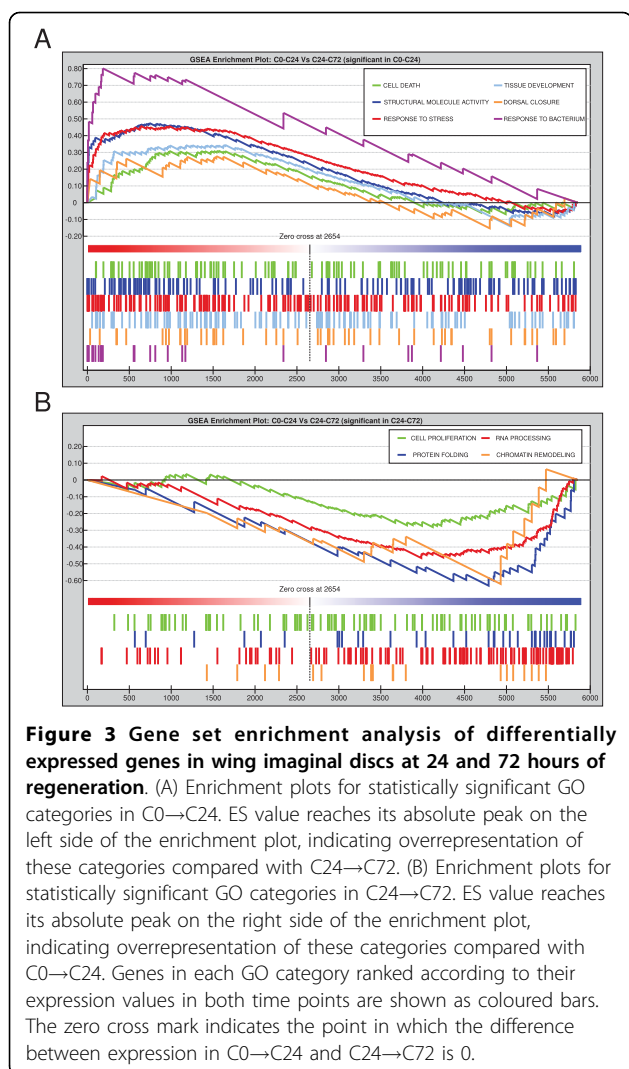
Class III represents the set of genes whose expression changed dramatically, from significant upregulation to downregulation or vice versa. Up to 48 genes were identified as upregulated in C0→C24 and downregulated in C24→C72 (29% of downregulated genes in C24→C72, Additional file 4) but only two genes had the opposite expression pattern. This module represented only 8% of upregulated genes in C0→C24 (Additional file 4). Class III was, in fact, enriched in genes associated with the stress response, response to stimuli, defense response, and structural activities, as well as several downstream targets of the JNK regulatory cascade. For example, we found the Krüppel-like transcription factor *cabut* (*cbt*) [47,48], the *Collagen type IV* (*Cg25C*) gene related to dorsal closure, and *Drosomycin* (*Drs*), *Immune induced molecule I* (*IM1*), *Transferrin* (*Tsf1*) and *Gadd45*, which play a role in the defensive response [40,49]. The increase in the expression of other genes that play a defensive function during the first 24 hours and the subsequent decrease up to 72 hours correlates well with their role in the defensive immune response. Furthermore, the *slamdance* (*sda*) gene, belonging to this category, has also been identified in other regeneration screens using leg imaginal discs [31]. Most genes identified in Class III exhibit an increase/decrease pattern of expression during regeneration. These genes could account for the cellular responses to injury, which would then be switched off once wound healing is completed.

Finally, Class IV includes genes whose expression remains significantly increased or decreased throughout the whole process, indicating their relevance during the 72 hours after the cut. A large fraction of upregulated and downregulated genes in C24→C72 (56% of upregulated genes and 22% of downregulated genes, Additional file 4) had the same expression pattern observed in C0→C24. While both microarrays were characterized by an enrichment of upregulated genes whose products are involved in apoptotic processes and transcription factors, the set of downregulated genes was rich in products with defensive response functions. Among the genes whose expression pattern was upregulated throughout the experiment, we found *headcase* (*hdc*) and *regucalcin*, which were previously identified in imaginal disc regeneration [31]. In addition, we detected the *cryptocephal* (*crc*) gene, different chromatin remodeling factors such as *absent*, *small*, or *homeotic discs 2* (*ash2*) and *modifier of mdg4* (*mod(mdg4)*) as well as three basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors (*bigmax*, *HLHm3* and *HLHm7*), indicating again that transcriptional regulation plays a critical role in regeneration. Finally, *Inhibitor of apoptosis 2* (*Iap2*), *longitudinals lacking* (*lola*), and *Thor* are related to the immune response. *Crc* is a downstream target of the JNK pathway implicated in wound healing [22,50] and it has been reported that the activity of *Thor* in aging also depends on the JNK pathway [51]. The set of genes that remained downregulated throughout the 72-hour period comprised a group of actin and heat shock proteins that were probably activated just after the injury, and the endopeptidases *tolloid* (*tld*) and *tolkin* (*tok*), involved in imaginal disc morphogenesis.

#### Transcriptional regulators acting in early and late regeneration

Among the plethora of genes identified as having altered expression during the regeneration process, we draw attention to the potential role played by those associated with transcriptional regulation. We first analyzed the putative targets of several transcription factors which are candidate participants in disc wound healing and regeneration. We computationally searched for binding sites of these transcription factors in promoter sequences of misregulated genes, using the genomes of 12 *Drosophilas* [52] to solidify the predictions (conserved sites at least in *D. pseudoobscura* and four additional *Drosophilids*, enrichment calculated in comparison to the total number of conserved sites of each class in the *D. melanogaster* genome, see Methods).

The JNK signalling pathway activates the AP1 (Activator Protein 1) transcription factor, a dimer of *jun* and *fos* [53,54]. We searched for AP1 binding sites in the promoters of upregulated and downregulated genes in

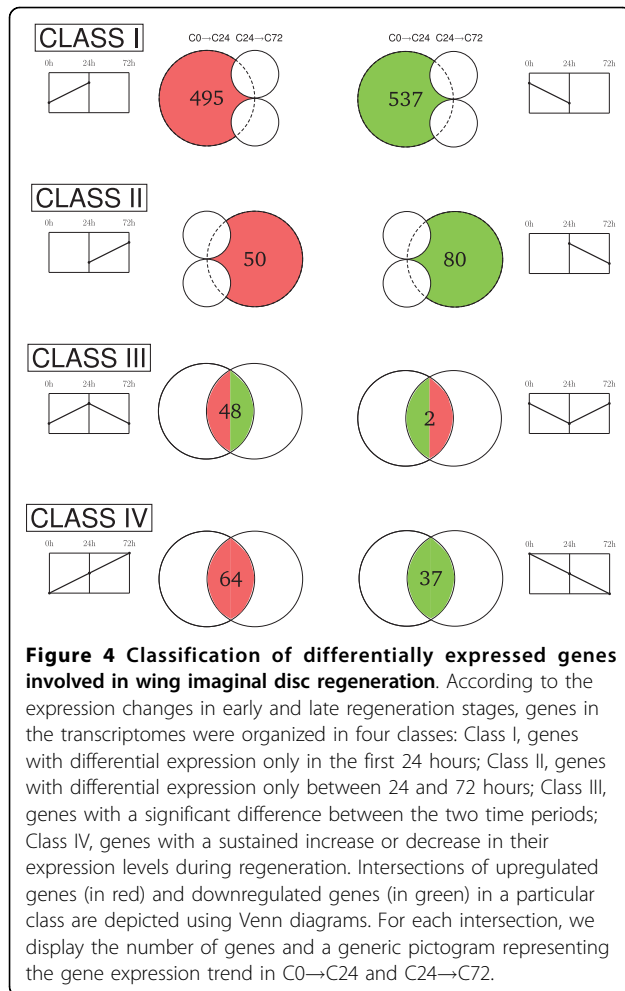


C0→C24 (Figure 6). We found putative binding sites in the promoters of 24 upregulated genes conserved in several *Drosophila* species (371 genes identified in the whole genome,  $P$  value  $< 10^{-6}$ ). Interestingly, 11 out of these 24 genes were reported only in cut discs. The number of AP1 predictions in the downregulated genes was not statistically significant. This was as anticipated, given the role of AP1 as a transcriptional activator. The number of AP1 occurrences was not significant in the upregulated genes of the C24→C72 microarrays, while 15 AP1 binding sites were identified in 12 downregulated genes ( $P$  value  $< 10^{-8}$ ). When correlating these predictions with the gene classes previously established, in addition to the expected abundance of Class I genes, we identified a significant enrichment of Class III genes. Despite a small amount of misregulated genes belong to this class (Additional file 4), we identified AP1 sites in six Class III genes in both C0→C24 and C24→C72 microarrays ( $P$  value  $< 0.001$  and  $P$  value  $< 0.05$ ,

respectively). These results suggest that the JNK pathway regulates the expression of Class I and Class III genes through AP1 during the first few hours of wing disc healing and that its activity decreases during later stages of regeneration. As expected, different elements of the JNK pathway have been identified in our expression profiles, confirming its activation during regeneration. The phosphatase *puckered* (*puc*) has been used as a molecular readout of the activated JNK pathway and its expression seems directly controlled by AP1. In imaginal disc fragmentation experiments, the expression of *puc* is activated in several rows of cells near the wound edges at 5 hours after the fragmentation, peaking at 12 hours and decreasing from 24 hours onwards, as the wound is healed [17,19]. Differences in *puc* expression would therefore be very difficult to detect at the time points used in this study. However, by using bioinformatics analysis we have identified a significant enrichment of AP1 sites in the promoters of several other genes with differential expression only in cut discs that are phylogenetically conserved in multiple *Drosophila* species, suggesting that they could be direct targets of the JNK pathway.

Many members of the (*E(spl)*) gene complex show a significant increase in their expression levels during wound healing and regeneration stages. In particular, we observed that the *E(spl)* gene is upregulated in C24→C72 microarrays (Class II). *E(spl)* is a bHLH transcription factor that binds regulatory sequences containing the E-box palindromic motif CACGTG [55,56]. We performed a search of E-boxes in the promoters of misregulated genes in C24→C72 (Figure 6). We identified six evolutionarily conserved E-boxes in the promoters of downregulated genes (346 genes in the whole genome of *D. melanogaster*,  $P$  value  $< 0.01$ ). Four of those six genes display an expression pattern fitting Class III genes ( $P$  value  $< 0.05$ ), in contrast to the lower total number of genes in this class in C24→C72 (Additional file 4). Although these results suggest that the genes identified are potential downstream targets of the Notch pathway, it should be pointed out that other proteins, such as dMyc, could also recognize the general consensus sequence for the E-box element [57].

Finally, besides transcription factors we have also identified genes that encode for chromatin remodelers. This finding highlights the importance of transcription and chromatin remodeling in regeneration and is consistent with similar studies [31]. It has been demonstrated that suppression of Polycomb group (PcG) proteins by JNK induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs and that this downregulation is directly controlled by the JNK signalling pathway [25]. We have not found PcG genes in our screen. Instead, the majority of chromatin regulators encode proteins that may play a



general role as transcriptional activators. Among these, Ash2, a member of the *trithorax* group (*trxG*), is required for histone H3 trimethylation at lysine 4 (H3K4me3) and belongs to multiple methylation complexes [58,59], and BAP60 and Dalao are members of the Brahma complex [60,61]. The transcriptional activation of this small number of cofactors may lead to the enzymatic activation of several proteins involved in chromatin activity. According to our results, global transcription slows at the beginning of regeneration but resumes concurrent to wound repair.

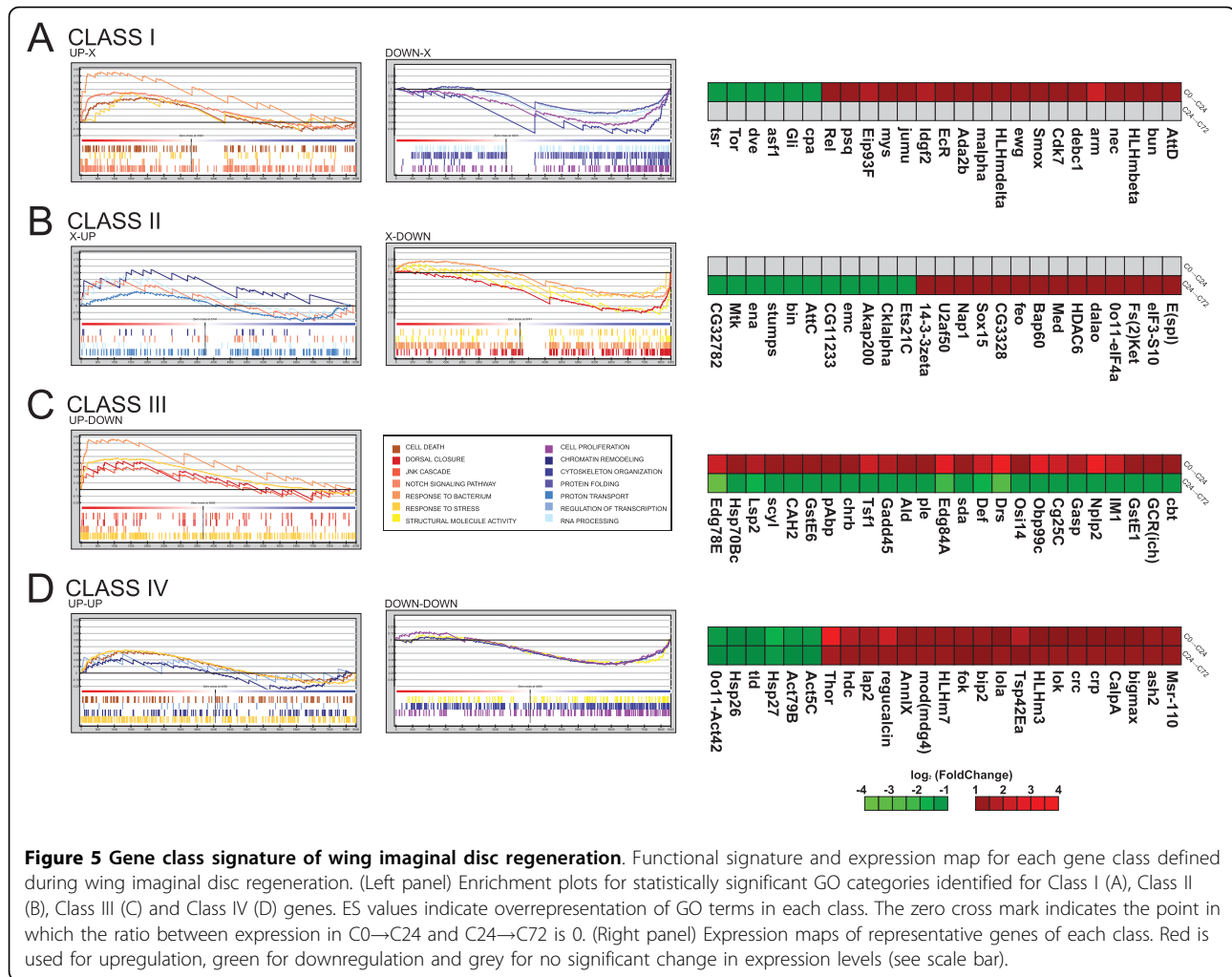
#### Requirement of transcription factors and chromatin remodelers in regeneration

We expect impairment on the ability to regenerate in mutants for the genes identified in our molecular screen. The requirement of the JNK pathway in wing imaginal disc regeneration has already been described [17-19,26] and alterations in the expression levels of Notch members have also been reported [31]. After validating the changes in expression levels of selected genes

by quantitative PCR (Additional file 5), we investigated their involvement in regeneration. Wing discs from heterozygous flies (the homozygous condition being lethal) were fragmented as above, implanted and recovered after 24 and 48 hours (Figure 7). Although healing did not seem to be affected in *N<sup>trIN-ts2</sup>* mutant discs, proliferation, measured by counting the number of mitotic cells labelled with anti-Phospho-Histone3 (PH3), was impaired. We also analyzed regeneration in imaginal discs from heterozygous flies with a deficiency of all *E (spl)* complex genes. Despite the fact that wound closure did not seem to be compromised, a significant decrease in proliferation occurs at 24 and 48 hours. Moreover, to inquire into the role of Class III genes in regeneration, we examined *cbt* mutant discs. Even though the discs healed properly, there was lower proliferation in analyzed discs. Finally, since the category of chromatin regulators is significant (this report and [31]), we examined the requirement for *ash2*, a Class IV member, in regeneration. Heterozygous discs for the *ash2<sup>II</sup>* allele were smaller and showed wound healing defects at 24 hours, probably hampering the proper assessment of their proliferative capacity. Although proliferation seems to be affected at 48 hours, it is probable that the absence of regeneration in these mutant discs is due to healing impairment.

#### The transcription factor Cbt as an example of Class III genes

Most genes identified in Class III display a characteristic increase/decrease pattern of expression during regeneration, suggestive of tight regulation associated with the requirement of the proteins encoded by these genes in a particular window of time. As a member of Class III, *cbt* was upregulated during the first 24 hours after disc fragmentation, decreasing dramatically in the following 48-hour period. As already suggested by Muñoz *et al.* [47], we found an AP1 binding site present in the proximal promoter of *cbt* conserved in multiple *Drosophila* species (Figure 8A), which indicates that is directly regulated by AP1. In third instar larvae, *cbt* is ubiquitously expressed in the wing disc (Figure 8B, C), and according to our predictions, we observed an increase in the level of expression of *cbt* after activating the JNK pathway in the posterior compartment (Figure 8D). More importantly, we detected an increase in the regenerating tissue, confirming the induction of its expression after injury (Figure 8E). As an alternative method to avoid microsurgery, regeneration was induced by triggering apoptosis in the wing disc in a spatially and temporally regulated manner. Recent reports have already shown that cell death can be locally induced in certain domains of the disc using the Gal4/UAS binary system in combination with Gal80<sup>ts</sup> [26,28]. The use of the *salm-Gal4*



**Figure 5 Gene class signature of wing imaginal disc regeneration.** Functional signature and expression map for each gene class defined during wing imaginal disc regeneration. (Left panel) Enrichment plots for statistically significant GO categories identified for Class I (A), Class II (B), Class III (C) and Class IV (D) genes. ES values indicate overrepresentation of GO terms in each class. The zero cross mark indicates the point in which the ratio between expression in C0→C24 and C24→C72 is 0. (Right panel) Expression maps of representative genes of each class. Red is used for upregulation, green for downregulation and grey for no significant change in expression levels (see scale bar).

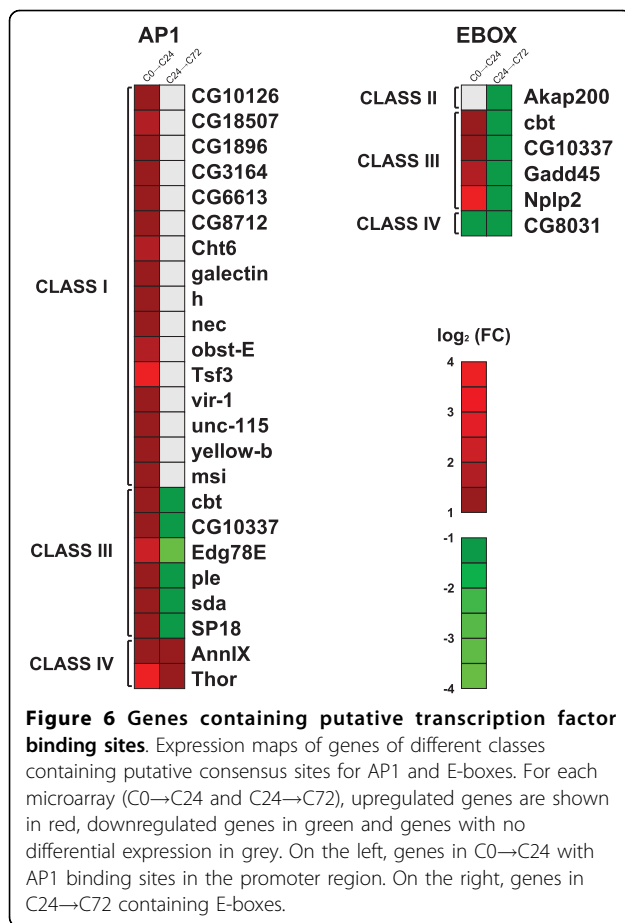
construct to drive expression of the pro-apoptotic gene *reaper* (*rpr*) results in a region of dead cells in the *spalt* (*sal*) domain. Higher levels of *cbt* expression can be detected in the regenerating cells that close the wound apically (Figure 8E-H). We have already demonstrated that during cell death-induced regeneration, the JNK pathway is activated at the leading edges of healing tissue, and is required in the living cells for the regulation of healing and regenerative growth [26]. Our results point to the transcription factor Cbt as a crucial downstream mediator gene of JNK signalling during microsurgery or cell death-induced regeneration.

Although further experiments are required, it is possible that E(spl) binds to the E-boxes identified in the promoters of *cbt* and other members of Class III genes contributing to their downregulation in the 24-72 hours period. In fact, in addition to *cbt* and *CG10337*, we found three more genes of this class (*Cg25C*, *Gadd45* and *ple*) containing conserved AP1 sites and E-boxes in their promoter regions when we extended our analysis

up to 10 Kb upstream of the TSS (Additional file 6). All these genes are precisely known JNK targets [40,47,62,63]. In *Drosophila*, the Notch pathway is known to participate in the regulation of growth in the wing [64] and a relationship between both the JNK and Notch pathways has recently been documented in tissue homeostasis in aging flies [65]. In that study, it was shown that tissue regeneration in the fly intestinal epithelium depends on a sensitive balance between JNK and Notch signalling events regulating stress responses, stem cell proliferation, and cell differentiation. Therefore, it is tempting to speculate that both JNK and Notch pathways cooperate by regulating the transcriptional activity of the same set of genes during wound healing and regeneration of wing imaginal discs.

## Conclusions

By determining expression profiles at different times of regeneration, we have been able to identify early and late genes involved in the process. The onset of wound



healing is the first necessary step for regeneration [66] and the role of the JNK pathway in this type of processes has been widely documented [17,19,25]. Different elements of the JNK pathway have been identified in our expression profiles, confirming its activation during regeneration. Our analysis show a significant enrichment of AP1 sites in the promoters of several genes with differential expression only in cut discs, suggesting that they could be direct targets of the JNK pathway. Several genes identified in our work encode for transcription factors, some of them of known signalling pathways, and chromatin remodelers. This finding highlights the importance of transcription and chromatin dynamics in regeneration and is consistent with similar studies [31]. A comprehensive description of the regeneration process will be enriched in the future by incorporating information complementary to our expression data. Thus, additional biological processes that are not directed by transcriptional responses, such as translational control and subcellular localization, should be recognized. However, the characterization of the relative contribution of critical pathways [67], or more precisely, of key genes may ultimately lead to the identification of therapeutic targets for use in regenerative medicine.

## Methods

### *Drosophila* strains and experimental conditions

All *Drosophila* strains and crosses were kept on standard media at 25°C. For microarray and qRT-PCR experiments, imaginal disc regeneration was induced in the *w<sup>1118</sup>ISO*; 2iso; 3iso isogenic line from the DrosDel collection [68]. The following strains were used: CS; *ash2<sup>11</sup>/TM6C* [69]; *N<sup>11N-ts2</sup>rb'*; *FRT82gro<sup>+</sup>: Df(3R)gro<sup>b32.2</sup>/TM6B* (a complete deficiency of all *E(spl)* complex genes, in this paper referred to as *Df(E(spl))*); *cbt<sup>EP(2)2237E1</sup>/CyO-twi:GFP* [47]; *en-Gal4;Gal80<sup>ts</sup>/SM6a-TM6B*; *UAS-hep<sup>CA</sup>*. All strains were kept at a constant temperature of 25°C, with the exception of *Notch<sup>11N-ts2</sup>*, which was kept at 17°C until the dissection of discs and then at 25°C from just after implantation until the end of the experiment.

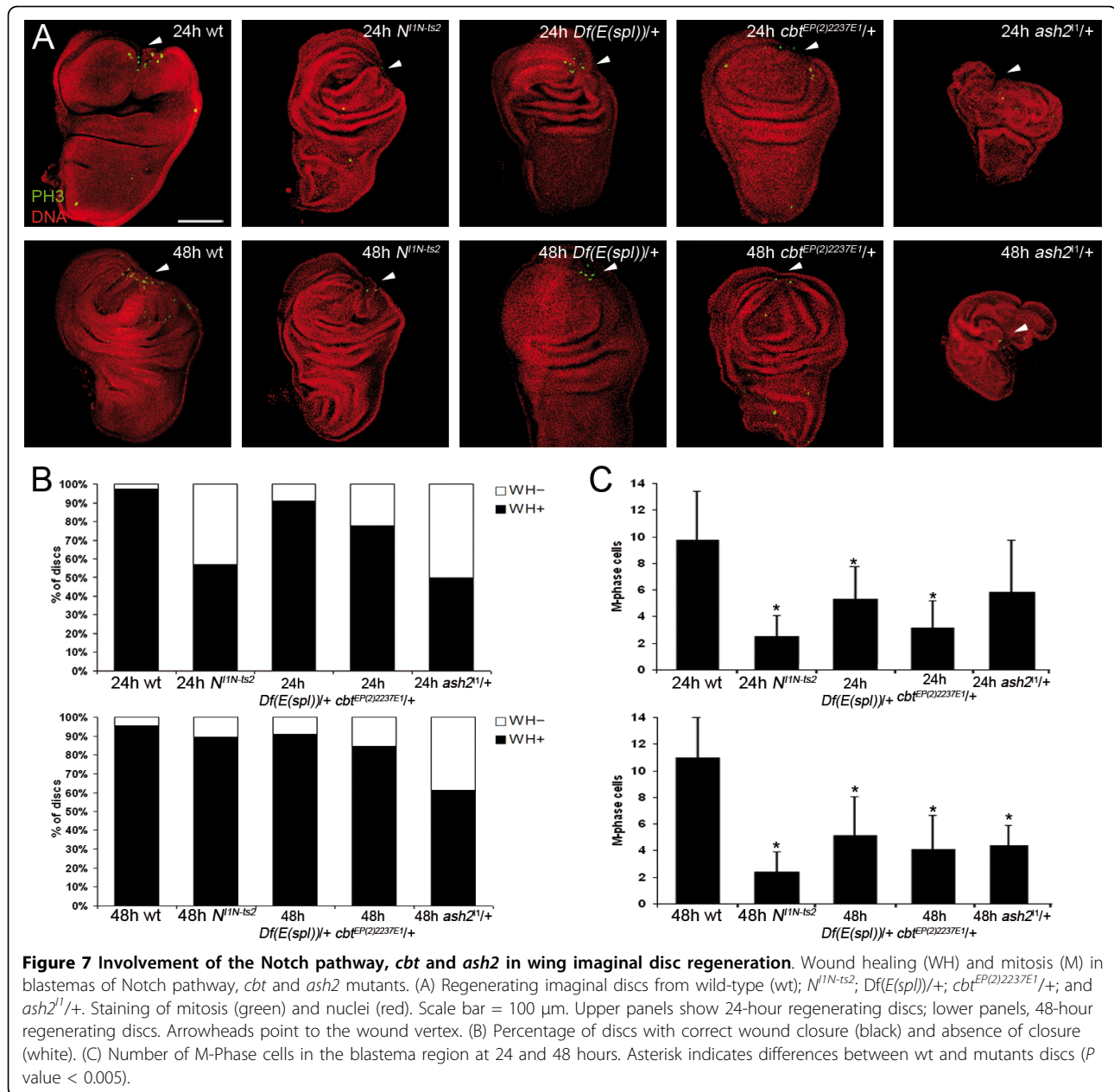
For cell death induction, *UAS-rpr/Gal80<sup>ts</sup>*; *salm-Gal4* flies were used as described [26]. Larvae were kept at 17°C to avoid *rpr* expression until third instar larvae (approximately 120 hours after egg laying). Next, they were shifted to 29°C to activate *rpr* expression for 10 hours, and then larvae were dissected and fixed with 4% formaldehyde.

### Imaginal disc manipulation and labeling of mitosis

Imaginal disc manipulation, either of wild type or mutant discs, was performed as described previously [17]. Wing discs were removed from third instar larvae and a 90° sector was dissected out from the posterior (P) compartment, leaving a 3/4 anterior fragment. Experimental and control (uncut) discs were implanted into recently eclosed Canton S females and kept at 25°C. Regenerating fragments were recovered at 24 and 48 hours after implantation, fixed with 4% paraformaldehyde and immunostained following standard protocols with anti-PH3 (1:1000, Upstate Biotechnology, Inc), FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1: 200, Jackson ImmunoResearch, Inc.) and TOPRO3 (Molecular Probes, Inc) for nuclei staining. Imaginal discs were mounted in SlowFade Light Antifade (Molecular Probes, Inc.) prior to confocal analyses (Leica SPE). Images were treated with ImageJ (NIH) and Adobe Photoshop software. For analysis of wound healing and proliferation, at least 10 discs were analyzed for each condition. The number of M-phase cells near the wound was determined using ImageJ (NIH) software. We used SPSS Statistics 17.0 for statistical analysis.

### In situ hybridization

In situ hybridization of wing imaginal discs fixed with 4% formaldehyde was performed as described previously [70]. *cbt* sense and antisense RNA probes were synthesized using a complete cDNA (a gift from N. Paricio) with DIG RNA labeling Mix (Roche, Inc.) and

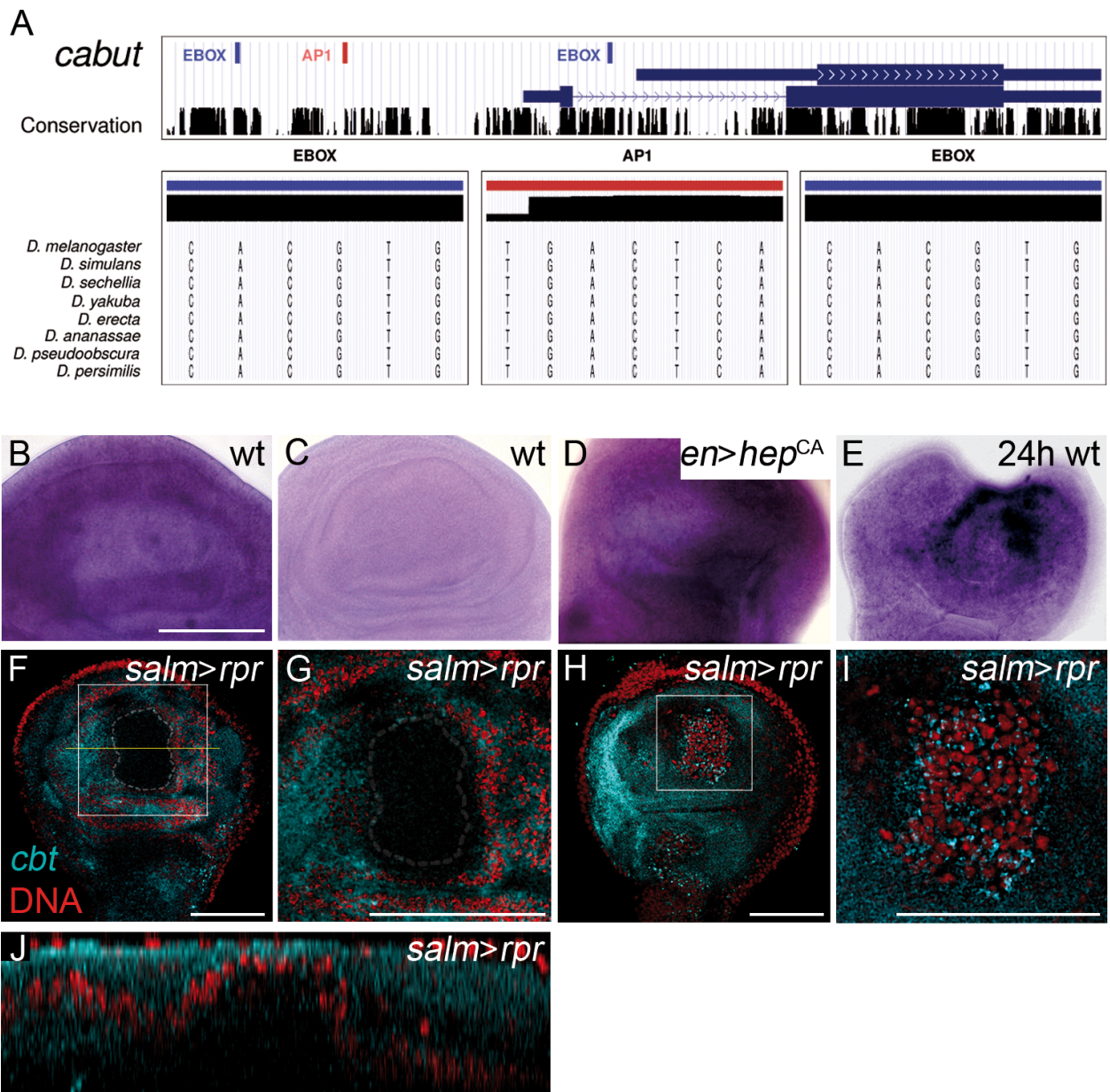


hydrolyzed prior to hybridization. An antibody conjugated with alkaline phosphatase (Roche, Inc.) was used against Digoxigenin probes. NBT/BCIP (Roche, Inc.) was used to develop in situ hybridizations and fast red tablets (Roche, Inc.) for fluorescent in situ hybridization. Discs were analyzed with a Leica DMLB fluorescent microscope and a Leica SP2 confocal microscope.

#### Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted using the Mini RNA Isolation I Kit™ (Zymo Research Corp., CA, USA). Reverse transcription reactions with 500 ng of RNA isolated from

regenerating discs were used to synthesize cDNA with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The qRT-PCR was performed with an ABI PRISM 7700 following the recommended protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each sample was replicated three times and average values were used for further analysis. Data were analyzed by the  $\Delta$ CT method and normalized by subtracting the value of the geometric average of three control genes (*dia*, *mRpl9* and *ptp61F*) obtained using geNorm software [71]. TaqMan primers and probes designed and synthesized by Applied



**Figure 8 Analysis of *cbt* promoter, expression and requirement in cell death- induced regeneration.** (A) Graphical representation of one AP1 site and two E-boxes that are evolutionarily conserved in the promoter of *cbt* and detailed sequences of each binding site in different *Drosophila* species. This picture was produced using the UCSC genome browser [76]. (B-E) In situ hybridizations in wing imaginal discs. (B) Wild-type disc showing ubiquitous *cbt* expression. (C) Wild-type disc with *cbt* sense RNA probe as a control. (D) *cbt* expression in *en > hep<sup>CA</sup>* disc. Notice upregulation of *cbt* in the posterior compartment. (E) Confocal section of a wing disc after 24 hours of regeneration. *cbt* is overexpressed near the wound. (F-J) Fluorescent in situ hybridization (blue) in disc in which cell death has been induced; nuclei are stained red. (F) Basal confocal section of a wing disc after 10 hours of *rpr* induction in the *salm* domain. The dotted line indicates the cell death domain. *cbt* expression is constant throughout the disc. (G) High-magnification view of the white square in F. (H) Apical confocal section of a wing disc after 10 hours of *rpr* induction in the *salm* domain. Regenerating cells in this domain show a high level of *cbt* expression. (I) High-magnification view of the white square in H, showing increased expression of *cbt*. (J) Cross-section through a stack of images (from apical to basal) at the level of the yellow line in F. Scale bars = 50  $\mu$ m.



Biosystems for this analysis were: Dm02150755\_g1 (*ash2*); Dm01800197\_s1 (*cbt*); Dm02151501\_s1 (*E(spl)*); Dm01821420\_m1 (*Sox15*); Dm02151361\_g1 (*tld*), Dm01811206\_g1 (*dia*); Dm02135860\_s1 (*mRPL9*); Dm0183210\_g1 (*ptp61F*).

### Microarray analysis

Microarrays were printed at the Plataforma de Transcriptòmica (SCT-PCB, Universitat de Barcelona, Spain) using the *Drosophila* genome Oligo Set version 1.1 (Operon Biotechnologies Inc., Huntsville, AL., USA) as described previously [69,72] (GEO platform number GPL3797). Total RNA was extracted as described above from wing discs recovered after 0, 24 and 72 hours for cut discs, and at 0 and 24 hours for uncut discs. At least two independent RNA extractions were carried out. In the case of cut discs, RNA extracted after 24 hours of implantation was used as a common reference and therefore three pair-wise comparisons were set: C0→C24, C24→C72 and NC0→NC24. Four microarrays were hybridized for each experiment in biological replicate pairs including dye swaps to take dye bias into account. Microarray analyses were performed as described previously [72]. GenePix Results (GPR) data files were obtained for each microarray with an Axon 4000B scanner and GenePix Pro 6 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA). All GPR files were analyzed with the Limma package from BioConductor [73,74] using the same criteria. Array normalization was carried out independently for each set of four arrays using the *mad* method from OLIN, and a linear model was fitted and FDR corrected [73]. We obtained a list of genes that displayed at least two-fold differential expression (FDR-corrected *P* value < 0.05). Further experimental and statistical details together with raw and normalized data can be accessed through NCBI's Gene Expression Omnibus [75] series number GSE17408.

All gene sets have been mapped in the genome of *D. melanogaster* using the RefSeq track of the UCSC genome browser [76] annotations (genome assembly dm3, April 2006). We used the TermEnrichment tool from the AmiGO suite [77] to assess the statistical significance of GO term enrichments on each list of genes using the whole genome as a second reference set (*P* value < 0.001, each enrichment must contain at least five genes). We employed the program GSEA [41] to perform gene-set-enrichment analyses in the full transcriptome of each microarray (rank function: difference of expression values). The Enrichment Score (ES) was calculated by walking down the ranked list, increasing the cumulative sum when a gene is present in a given GO category and decreasing it if a gene is not (see [41] for further details).

### Promoter characterization

We extracted 1,000 nucleotides upstream of the transcription start site of each gene according to RefSeq annotations in the UCSC Genome browser [76]. Using the predictive models published in the literature for AP1 and E(spl) [54,55], we used the MatScan program [78] to obtain the list of putative transcription factor binding sites on the set of gene promoters. We converted these predictions into the UCSC custom track format to map them along the *D. melanogaster* genome. Using the Conservation track (multiple alignment of *Drosophila* species), we filtered out the predictions that were not conserved in at least five species (including *D. pseudoobscura* or more distant species). We randomly sampled 10,000 datasets containing the same number of genes of each up or downregulated gene sets, using a Z-test to evaluate the statistical significance on each set of predictions in comparison to the whole genome.

### Additional material

**Additional file 1: Gene signature of wing imaginal disc early regeneration.** For each gene we display the functional annotation according to the Gene Ontology.

**Additional file 2: List of transcription factors in C24→C72.** For each transcription factor we display the binding molecule (DNA or protein) and the functional annotation according to the Gene Ontology.

**Additional file 3: Representatives of regeneration gene classes.** For each class in the catalogue we show the list of selected representatives and the functional annotation according to the Gene Ontology.

**Additional file 4: Number of genes on each class in C0→C24 and C24→C72.** For each microarray we display the number of misregulated genes distributed in classes according to the gene catalogue.

**Additional file 5: Quantitative RT-PCR for target genes in regenerating discs after 0, 24 and 72 hours.** Twenty-four hour expression levels were used as reference for comparison (baseline). Arrows represent significant expression changes (*P* < 0.005); red arrows indicate upregulation and green arrows downregulation.

**Additional file 6: AP1 sites and E-boxes identified in the promoter region of Class III genes.** For each gene we display the length of the promoter sequence, the position of AP1 sites (in red) and E-boxes (in blue), the beginning of the gene (in white) and the conservation level of the sequence according to the multiple alignment of *Drosophila* species (UCSC genome browser Conservation track).

### Acknowledgements

We thank J. Casanova and C.B. Byars for critically reading the manuscript, H. Auer for insightful suggestions for the real time PCR and N. Paricio and F. Schweisguth for fly stocks. We also thank the Program for Genomic Applications at the Institute for Genomic Research for providing us with *A. thaliana* spike-in controls and the Plataforma de Transcriptòmica of the Universitat de Barcelona (PCB-SCT-UB) for help with microarray preparation. EB was supported by Juan de la Cierva postdoctoral fellowship, AP by grant BFU05-24129-E, and SB and MRR by a FPI fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), Spain. This project was funded by grants BMC2006-07334, ACI2009-0903 and Consolider Ingenio 2010 (CSD2007-00008) from MICINN, Spain.

#### Author details

<sup>1</sup>Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona (SCT-UB), Barcelona, Catalonia, Spain. <sup>2</sup>Fibran SA, Sant Joan de les Abadesses, Catalonia, Spain. <sup>3</sup>Departament de Genètica, and Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Diagonal 645, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain.

#### Authors' contributions

EB performed the bioinformatics analysis; SB, MB, FS and MC conceived and designed the experiments; MRR, SB, MB and AP performed the experiments; FS and MC contributed reagents and materials; EB and MC wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 28 June 2010 Accepted: 2 September 2010

Published: 2 September 2010

#### References

1. Brockes JP, Kumar A: Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008, **24**:525-549.
2. Galliot B, Tanaka E, Simon A: Regeneration and tissue repair: themes and variations. *Cell Mol Life Sci* 2008, **65**:3-7.
3. Morgan TH: Regeneration and Liability to Injury. *Science* 1901, **14**:235-248.
4. Saló E: The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *Bioessays* 2006, **28**:546-559.
5. Galliot B, Miljkovic-Licina M, de Rosa R, Chera S: Hydra, a niche for cell and developmental plasticity. *Semin Cell Dev Biol* 2006, **17**:492-502.
6. Tseng AS, Levin M: Tail regeneration in *Xenopus laevis* as a model for understanding tissue repair. *J Dent Res* 2008, **87**:806-816.
7. Yokoyama H: Initiation of limb regeneration: the critical steps for regenerative capacity. *Dev Growth Differ* 2008, **50**:13-22.
8. Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Maden M, *et al*: Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 2009, **460**:60-65.
9. Poss KD: Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol* 2007, **18**:36-45.
10. Dor Y, Stanger BZ: Regeneration in liver and pancreas: time to cut the umbilical cord? *Sci STKE* 2007, **66**.
11. Zaret KS, Grompe M: Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 2008, **322**:1490-1494.
12. Lien CL, Schebesta M, Makino S, Weber GJ, Keating MT: Gene expression analysis of zebrafish heart regeneration. *PLoS Biol* 2006, **4**:e260.
13. Marsh JL, Theisen H: Regeneration in insects. *Semin Cell Dev Biol* 1999, **10**:365-375.
14. Bergantinos C, Vilana X, Corominas M, Serras F: Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology. *Bioessays* 2010, **32**:207-217.
15. Hadorn E: Transdetermination in cells. *Sci Am* 1968, **219**:110-114, passim.
16. Maves L, Schubiger G: Transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: a model for understanding pluripotency and selector gene maintenance. *Curr Opin Genet Dev* 2003, **13**:472-479.
17. Bosch M, Serras F, Martin-Blanco E, Baguna J: JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* 2005, **280**:73-86.
18. Mattila J, Omelyanchuk L, Kyttala S, Turunen H, Nokkala S: Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. *Int J Dev Biol* 2005, **49**:391-399.
19. Bosch M, Baguna J, Serras F: Origin and proliferation of blastema cells during regeneration of *Drosophila* wing imaginal discs. *Int J Dev Biol* 2008, **52**:1043-1050.
20. McClure KD, Schubiger G: A screen for genes that function in leg disc regeneration in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* 2008, **125**:67-80.
21. Martin P, Parkhurst SM: Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 2004, **131**:3021-3034.
22. Ip YT, Davis RJ: Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 1998, **10**:205-219.
23. Zeitlinger J, Bohmann D: Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development* 1999, **126**:3947-3956.
24. Martin-Blanco E, Gampel A, Ring J, Virdee K, Kirov N, *et al*: puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* 1998, **12**:557-570.
25. Lee N, Maurange C, Ringrose L, Paro R: Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* 2005, **438**:234-237.
26. Bergantinos C, Corominas M, Serras F: Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. *Development* 2010, **137**:1169-1179.
27. Clevers H: Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006, **127**:469-480.
28. Smith-Bolton RK, Worley MI, Kanda H, Hariharan IK: Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc. *Dev Cell* 2009, **16**:797-809.
29. Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Riehle KJ, Hubbert C, Major MB, *et al*: Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* 2007, **134**:479-489.
30. Maves L, Schubiger G: Wingless induces transdetermination in developing *Drosophila* imaginal discs. *Development* 1995, **121**:1263-1272.
31. Klebes A, Sustar A, Kechris K, Li H, Schubiger G, *et al*: Regulation of cellular plasticity in *Drosophila* imaginal disc cells by the Polycomb group, trithorax group and lama genes. *Development* 2005, **132**:3753-3765.
32. Bray SJ: Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:678-689.
33. Raya A, Koth CM, Buscher D, Kawakami Y, Itoh T, *et al*: Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**(Suppl 1):11889-11895.
34. Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA: Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 2003, **302**:1575-1577.
35. Mattila J, Omelyanchuk L, Nokkala S: Dynamics of decapentaplegic expression during regeneration of the *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc. *Int J Dev Biol* 2004, **48**:343-347.
36. Reddien PW, Bermange AL, Murfitt KJ, Jennings JR, Sanchez Alvarado A: Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Dev Cell* 2005, **8**:635-649.
37. Grow M, Neff AW, Mescher AL, King MW: Global analysis of gene expression in *Xenopus* hindlimbs during stage-dependent complete and incomplete regeneration. *Dev Dyn* 2006, **235**:2667-2685.
38. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR: NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:D61-65.
39. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, *et al*: Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000, **25**:25-29.
40. Stramer B, Winfield M, Shaw T, Millard TH, Woolner S, *et al*: Gene induction following wounding of wild-type versus macrophage-deficient *Drosophila* embryos. *EMBO Rep* 2008, **9**:465-471.
41. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, *et al*: Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:15545-15550.
42. Dichtel-Danjoy ML, Caldeira J, Casares F: SoxF is part of a novel negative-feedback loop in the wingless pathway that controls proliferation in the *Drosophila* wing disc. *Development* 2009, **136**:761-769.
43. Lee HJ, Goring W, Ochs M, Muhlfeld C, Steding G, *et al*: Sox15 is required for skeletal muscle regeneration. *Mol Cell Biol* 2004, **24**:8428-8436.
44. Affolter M, Basler K: The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* 2007, **8**:663-674.
45. Kal AJ, Mahmoudi T, Zak NB, Verrijzer CP: The *Drosophila* brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev* 2000, **14**:1058-1071.
46. Ito T, Bulger M, Kobayashi R, Kadonaga JT: *Drosophila* NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol Cell Biol* 1996, **16**:3112-3124.
47. Munoz-Descalzo S, Terol J, Paricio N: Cabut, a C2H2 zinc finger transcription factor, is required during *Drosophila* dorsal closure downstream of JNK signaling. *Dev Biol* 2005, **287**:168-179.
48. Munoz-Descalzo S, Belacortu Y, Paricio N: Identification and analysis of cabut orthologs in invertebrates and vertebrates. *Dev Genes Evol* 2007, **217**:289-298.

49. Peretz G, Bakhrat A, Abdu U: **Expression of the *Drosophila melanogaster* GADD45 homolog (CG11086) affects egg asymmetric development that is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway.** *Genetics* 2007, **177**:1691-1702.
50. Hewes RS, Schaefer AM, Taghert PH: **The *cryptocephal* gene (ATF4) encodes multiple basic-leucine zipper proteins controlling molting and metamorphosis in *Drosophila*.** *Genetics* 2000, **155**:1711-1723.
51. Wang MC, Bohmann D, Jasper H: **JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling.** *Cell* 2005, **121**:115-125.
52. Clark AG, Eisen MB, Smith DR, Bergman CM, Oliver B, *et al*: **Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny.** *Nature* 2007, **450**:203-218.
53. Jochum W, Passegue E, Wagner EF: **AP-1 in mouse development and tumorigenesis.** *Oncogene* 2001, **20**:2401-2412.
54. Eferl R, Wagner EF: **AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:859-868.
55. Jennings BH, Tyler DM, Bray SJ: **Target specificities of *Drosophila* enhancer of split basic helix-loop-helix proteins.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:4600-4610.
56. Jones S: **An overview of the basic helix-loop-helix proteins.** *Genome Biol* 2004, **5**:226.
57. Orian A, van Steensel B, Delrow J, Bussemaker HJ, Li L, *et al*: **Genomic binding by the *Drosophila* Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network.** *Genes Dev* 2003, **17**:1101-1114.
58. Beltran S, Blanco E, Serras F, Perez-Villamil B, Guigo R, *et al*: **Transcriptional network controlled by the trithorax-group gene *ash2* in *Drosophila melanogaster*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:3293-3298.
59. Shilatifard A: **Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation.** *Curr Opin Cell Biol* 2008, **20**:341-348.
60. Papoulas O, Daubresse G, Armstrong JA, Jin J, Scott MP, *et al*: **The HMG-domain protein BAP111 is important for the function of the BRM chromatin-remodeling complex in vivo.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:5728-5733.
61. Moller A, Avila FW, Erickson JW, Jackle H: ***Drosophila* BAP60 is an essential component of the Brahma complex, required for gene activation and repression.** *J Mol Biol* 2005, **352**:329-337.
62. Noselli S, Agnes F: **Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis.** *Curr Opin Genet Dev* 1999, **9**:466-472.
63. Pearson JC, Juarez MT, Kim M, Drivenes O, McGinnis W: **Multiple transcription factor codes activate epidermal wound-response genes in *Drosophila*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:2224-2229.
64. Herranz H, Milan M: **Signalling molecules, growth regulators and cell cycle control in *Drosophila*.** *Cell Cycle* 2008, **7**:3335-3337.
65. Biteau B, Hochmuth CE, Jasper H: **JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**:442-455.
66. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT: **Wound repair and regeneration.** *Nature* 2008, **453**:314-321.
67. Stoick-Cooper CL, Moon RT, Weidinger G: **Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine.** *Genes Dev* 2007, **21**:1292-1315.
68. Ryder E, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Drummond J, Webster J, *et al*: **The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource.** *Genetics* 2007, **177**:615-629.
69. Beltran S, Angulo M, Pignatelli M, Serras F, Corominas M: **Functional dissection of the *ash2* and *ash1* transcriptomes provides insights into the transcriptional basis of wing phenotypes and reveals conserved protein interactions.** *Genome Biol* 2007, **8**:R67.
70. Sturtevant MA, Biehs B, Marin E, Bier E: **The *spalt* gene links the A/P compartment boundary to a linear adult structure in the *Drosophila* wing.** *Development* 1997, **124**:21-32.
71. Vandesompele J, De Preter K, Patryn F, Poppe B, Van Roy N, *et al*: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**: RESEARCH0034.
72. Blanco E, Pignatelli M, Beltran S, Punset A, Perez-Lluch S, *et al*: **Conserved chromosomal clustering of genes governed by chromatin regulators in *Drosophila*.** *Genome Biol* 2008, **9**:R134.
73. Smyth GK: **Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments.** *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004, **3**:Article 3.
74. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, *et al*: **Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.** *Genome Biol* 2004, **5**:R80.
75. Edgar R, Domrachev M, Lash AE: **Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:207-210.
76. Kuhn RM, Karolchik D, Zweig AS, Trumbower H, Thomas DJ, *et al*: **The UCSC genome browser database: update 2007.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**: D668-673.
77. The Gene Ontology Consortium: **The Gene Ontology project in 2008.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:D440-444.
78. Blanco E, Messeguer X, Smith TF, Guigo R: **Transcription factor map alignment of promoter regions.** *PLoS Comput Biol* 2006, **2**:e49.

doi:10.1186/1471-213X-10-94

**Cite this article as:** Blanco *et al*: Gene expression following induction of regeneration in *Drosophila* wing imaginal discs. Expression profile of regenerating wing discs. *BMC Developmental Biology* 2010 **10**:94.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

