

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

TESI DOCTORAL

**Anàlisi de l'estructura de la cromatina del Complex Bitòrax
de *Drosophila melanogaster* i contribució de les proteïnes
dSAP18 i GAGA en la seva regulació**

Sílvia Pérez Lluch

Març de 2007

Programa de Bioquímica i Biologia Molecular (Opció A)

**Anàlisi de l'estructura de la cromatina del Complex Bitòrax
de *Drosophila melanogaster* i contribució de les proteïnes
dSAP18 i GAGA en la seva regulació**

Memòria presentada per Sílvia Pérez Lluch per aspirar al grau de Doctora en Biologia. Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció de la Dra. M^a Lluïsa Espinás Janer al Departament de Biologia Molecular i Cel·lular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC).

Vist-i-plau de la directora

Vist-i-plau de la tutora

Dra. M^a Lluïsa Espinás Janer

Dra. Maria Plana Coll

AGRAÏMENTS

ÍNDEX

ÍNDEX GENERAL

ÍNDEX GENERAL	iii
ÍNDEX DE FIGURES	ix
ÍNDEX DE TAULES	xii
ABREVIATURES	xiii

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. La cromatina	3
1.1.1. Estructura de la cromatina i implicació en l'expressió gènica	3
1.1.1.1 El nucleosoma	3
1.1.1.2. La fibra de cromatina	4
1.1.1.3. Organització de la cromatina en estructures d'ordre superior	11
1.1.2. Cromatina i regulació de l'expressió gènica al llarg de les divisions cel·lulars	18
1.1.2.1. Elements PRE/TRE	19
1.1.2.2. Complexes del Grup Polycomb	21
1.1.2.3. Complexes del Grup Trithorax	23
1.1.2.4. Enhancers de Pc i Trx	26
1.1.2.5. La proteïna GAGA	26
1.1.2.6. Models de silenciament i activació	30
1.1.2.7. Models d'herència de l'estat de la cromatina	34
1.2. Implicació de la cromatina en el desenvolupament de <i>Drosophila</i>	36
1.2.1. Els inicis de la segmentació embrionària	36
1.2.2. Els gens homeòtics	36
1.2.3. El Complex Bitòrax	38
1.2.4. El gen <i>Abdominal-B</i>	39
1.2.4.1. Els elements iniciadors	41
1.2.4.2. Els elements de manteniment	42
1.2.4.3. Els elements Frontabdominals	44
1.2.4.4. Els elements PTS	47

1.2.4.5. Transcripció al llarg del Complex Bitòrax	48
1.2.4.6. L' <i>Abd-B</i> és regulat per dominis independents a cada segment	49
2. OBJECTIUS	51
3. MATERIALS I MÈTODES	55
3.1. Materials	57
3.1.1. Reactius i enzims	57
3.1.2. Soques bacterianes	57
3.1.3. Plasmidis buits emprats	57
3.1.4. Plasmidis generats	57
3.1.5. Oligonucleòtids	59
3.1.6. Anticossos específics	60
3.1.7. Cèl·lules eucariotes	60
3.1.8. <i>Stocks</i> de mosques	61
3.1.8.1. Cromosomes balancejadors i marcadors	61
3.1.8.2. Soques de <i>Drosophila melanogaster</i> utilitzades	61
3.2. Mètodes	63
3.2.1. Tècniques de manipulació de DNA plasmídic	63
3.2.1.1. Tècniques de DNA recombinant	63
3.2.1.2. Transformació de cèl·lules competents	63
3.2.1.3. Extracció de DNA plasmídic pel mètode de la lisi alcalina ràpida	63
3.2.1.4. Maxipreparació de DNA plasmídic	64
3.2.2. Manteniment de cultius cel·lulars	65
3.2.2.1. Manteniment de cultius cel·lulars	65
3.2.2.2. Descongelació de cèl·lules	65
3.2.2.3. Congelació de cèl·lules	65
3.2.2.4. Comptatge de cèl·lules	65
3.2.3. Tècniques d'anàlisi genètic de <i>Drosophila</i>	66
3.2.4. Tècniques d'anàlisi de DNA	66
3.2.4.1. Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)	66
3.2.4.2. Southern Blot	67

3.2.4.3. Immunoprecipitació de cromatina (ChIP)	70
3.2.4.4. Hipersensibilitats a DNasaI	75
3.2.4.5. <i>Chromosome Conformation Capture</i>	78
3.2.5. Tècniques d'anàlisi d'RNA	79
3.2.5.1. Extracció d'RNA	79
3.2.5.2. RT-PCRs	80
3.2.6. Tècniques d'anàlisi de proteïnes	82
3.2.6.1. Extracció de proteïnes d'embrions i larves de <i>Drosophila</i>	82
3.2.6.2. Electroforesi en gel d'acrilamida (SDS-PAGE)	82
3.2.6.3. Tinció dels gels d'acrilamida amb Comassie	83
3.2.6.4. Western Blot	83
3.2.6.5. Purificació d'anticòs per afinitat	85
4. RESULTATS	87
4.1. Identificació i anàlisi de noves regions reguladores del Complex Bitòrax	89
4.1.1. L'element Fab-7 del BX-C és hipersensible	89
4.1.2. Hipersensibilitats a DNasaI al domini iab-6	90
4.1.3. Caracterització de les noves regions hipersensibles	94
4.1.3.1. Expressió del gen reporter <i>white</i> sota el control de diferents regions reguladores	94
4.1.3.2. Les proteïnes dels grups Pc i Trx alteren l'activitat dels elements ectòpics	99
4.1.3.3. Construccions transgèniques del domini iab-6: un nou element PRE	101
4.2. Estructura de la cromatina del Complex Bitòrax	108
4.2.1. Les regions reguladores del BX-C es troben hipoacetil·lades i hipermetil·lades a embrions de <i>Drosophila</i>	108
4.2.2. Les hipersensibilitats a DNasaI són molt estables, però depenen de la funcionalitat de l'element regulador	110
4.2.2.1. Les hipersensibilitats del Fab-7 i l'iab6PRE s'estableixen a estadis primerencs i es mantenen al llarg del desenvolupament de la mosca	110
4.2.2.2. L'IAB6 només és hipersensible en estadis primerencs del desenvolupament	112

4.2.2.3. La regió del Fab-7 també és hipersensible en còpies ectòpiques	113
4.2.2.4. Les hipersensibilitats no depenen de la presència d'elements de manteniment	115
4.2.2.5. La cromatina és accessible a la DNasaI quan es troba en un estat totalment silenciada	116
4.2.3. Les diferents regions reguladores contacten entre elles al nucli de cèl·lules en cultiu	117
4.4.3.1. <i>Chromosome Conformation Capture</i>	118
4.2.3.2. Les nostres cèl·lules S2 no expressen l' <i>Abd-B</i>	120
4.2.3.3. Les regions reguladores contacten entre sí i amb el promotor de l' <i>Abd-B</i>	120
4.3. Participació de dSAP18 i GAGA en la regulació de l' <i>Abdominal-B</i>	124
4.3.1. dSAP18 està implicat en el silenciament del Fab-7 però no n'altera la cromatina	124
4.3.1.1. La falta de dSAP18 altera el silenciament promogut pels elements Fab-7 i iab7PRE ectòpics	124
4.3.1.2. La falta de dSAP18 no altera l'acetil·lació de les histones del Fab-7 ni les hipersensibilitats a DNasaI	126
4.3.2. GAGA i la regulació del Complex Bitòrax	128
4.3.2.1. GAGA es troba sobre algunes regions reguladores del BX-C	128
4.3.2.2. La disminució de GAGA indueix una desrepressió de l'element iab7PRE ectòpic	129
4.3.2.3. Eliminació de GAGA mitjançant RNAi	131
5. DISCUSSIÓ	147
5.1. Identificació de noves regions reguladores de l' <i>Abd-B</i>	149
5.1.1. L'iab6PRE: un nou element de manteniment	150
5.1.2. Existeix el Fab-6 ?	152
5.2. Estructura de la cromatina de l' <i>Abd-B</i>	155
5.2.1. El BX-C està hipoacetil·lat	155
5.2.2. Els llocs hipersensibles són molt estables	157
5.2.3. La hipersensibilitat de l'IAB6 no es manté al llarg del desenvolupament	158

5.2.4. Les regions reguladores del BX-C contacten entre sí a cèl·lules S2	159
5.3. Regulació de l'activitat dels elements reguladors del BX-C	162
5.3.1. GAGA i la regulació del Complex Bitòrax	162
5.3.1.1. L'RNAi de GAGA promou la transformació A6 a A5	163
5.3.1.2. La transformació homeòtica no es deu a un canvi de les hipersensibilitats ni del patró de modificacions de les histones	165
6. CONCLUSIONS	169
7. BIBLIOGRAFIA	173
8. ANNEX	189

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1.1. Estructura del nucleosoma	3
Figura 1.2. Modificacions postraduccionals de les histones	6
Figura 1.3. Models del moviment translacional del nucleosoma	10
Figura 1.4. Cromosomes politènics de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
Figura 1.5. Models d'interacció entre enhancer i promotor	14
Figura 1.6. Models proposats per a les diferents activitats dels insulators	15
Figura 1.7. Model de recrutament del complex PRC1	22
Figura 1.8. Estructura de la proteïna GAGA	27
Figura 1.9. Model de funcionament dels complexos de GAGA	28
Figura 1.10. Models d'establiment d'estats reprimits de la cromatina	32
Figura 1.11. Models d'establiment d'estats activats de la cromatina	33
Figura 1.12. Models de manteniment d'estats reprimits i activats de la cromatina	34
Figura 1.13. Relació entre els segments i parasegments de <i>Drosophila</i>	37
Figura 1.14. Esquema de la regió reguladora del Complex Bitòrax de <i>Drosophila</i>	39
Figura 1.15. Esquema de la regió 3' <i>cis</i> -reguladora del gen <i>Abdominal-B</i>	40
Figura 1.16. Model de contacte entre elements de manteniment	44
Figura 1.17. Expressió de l' <i>Abd-B</i> a embrions salvatges i embrions que presenten deleccions de les regions reguladores del gen	45
Figura 1.18. Model de funcionament dels elements PTS	48
Figura 3.1. Esquema de la transferència de DNA per capil·laritat	68
Figura 3.2. Esquema de la tècnica d'immunoprecipitació de cromatina	71
Figura 3.3. Representació de l'assaig d'hipersensibilitat a DNaseI	76
Figura 3.4. Esquema de la reacció d'RT-PCR	81
Figura 3.5. Esquema de la transferència de proteïnes	84
Figura 3.6. Gel d'acrilamida de les al·lotes extretes durant la purificació d'anticòs	85
Figura 4.1. Esquema del patró d'hipersensibilitats a DNaseI de la regió del Fab-7	89

Figura 4.2. Esquema de les diferents regions reguladores de l' <i>Abd-B</i>	90
Figura 4.3. Hipersensibilitats a DNasaI del domini iab-6	92
Figura 4.4. Model utilitzat en la generació de construccions transgèniques	94
Figura 4.5. Ulls de mosques de la línia lambda-4.1	95
Figura 4.6. Resultats obtinguts amb la construcció B+P7	96
Figura 4.7. Resultats obtinguts amb la construcció Fab-7	98
Figura 4.8. Fenotip de femelles B+P7 salvatges i mutants per a Pc i BRM	100
Figura 4.9. Representació de les diferents regions hipersensibles identificades a l'iab-6	102
Figura 4.10. Resultats obtinguts amb la construcció iab6HS	103
Figura 4.11. El silenciament de la construcció iab6HS depèn de Pc-G	104
Figura 4.12. El PSS de la construcció iab6HS depèn de Pc-G	105
Figura 4.13. Representació dels diferents fragment de l'iab-6 utilitzats per a generar mosques transgèniques	106
Figura 4.14. Resultats obtinguts amb les diferents construccions dels dominis iab-7 i iab-6	109
Figura 4.15. ChIPs amb anticossos que reconeixen les histones H3 i H4 modificades	111
Figura 4.16. Hipersensibilitats a DNasaI de la regió del Fab-7 i de l'iab6PRE a diferents estadis del desenvolupament	112
Figura 4.17. Hipersensibilitats a DNasaI de l'IAB6 a diferents estadis del desenvolupament	114
Figura 4.18. Hipersensibilitats a DNasaI de la línia 5F24	115
Figura 4.19. Hipersensibilitats a DNasaI de dues línies de la construcció Fab-7	117
Figura 4.20. Hipersensibilitats a DNasaI d'individus heterozigots i homozigots de la línia iab6HS2-9.2	119
Figura 4.21. Esquema de l'assaig de 3C	120
Figura 4.22. RT-PCRs de l' <i>Abd-B</i> a cèl·lules i embrions	122
Figura 4.23. Interaccions observades entre elements reguladors de l' <i>Abd-B</i>	125
Figura 4.24. Mosques de la línia B+P7 salvatge i mutants per dSAP18 i Pc	127
Figura 4.25. ChIPs amb anticossos de les histones modificades i hipersensibilitats a DNasaI de la regió del Fab-7 endogen i ectòpic en absència de dSAP18	129

Figura 4.26. ChIPs d'embrions amb l'anticòs que reconeix GAGA	130
Figura 4.27. Mosques de la línia B+P7 salvatge i mutant per GAGA i BRM	131
Figura 4.28. Esquema del sistema d'RNA d'interferència	132
Figura 4.29. Model utilitzat per a la generació de mosques interferents	133
Figura 4.30. WB i hipersensibilitats a DNasaI de la regió del Fab-7 d'embrions que expressen l'RNAi de GAGA	135
Figura 4.31. Transformació homeòtica abdominal observada als individus UAS-RNAiGAGA4.2/+;69BGAL4/+	137
Figura 4.32. WBs i hipersensibilitats a DNasaI de les regions del Fab-7 i iab6PRE dels individus UAS-RNAiGAGA4.2/+;69BGAL4/+	138
Figura 4.33. WBs dels individus hsGAL4/UAS-RNAiGAGA7.2	140
Figura 4.34. Esquema del funcionament del sistema induïble GAL80	141
Figura 4.35. Transformació homeòtica abdominal dels individus que expressen l'RNAi de GAGA de forma induïble	143
Figura 4.36. WBs dels individus tubGAL80/UAS-RNAiGAGA4.2;daGAL4/+	144
Figura 5.1. Els dominis reguladors de l'expressió de l' <i>Abd-B</i> funcionen de forma independent	150
Figura 5.2. Esquema de les regions reguladores de l' <i>Abd-B</i>	154
Figura 5.3. Model de control de l'expressió de l' <i>Abd-B</i> mitjançant el contacte de regions reguladores	161
Figura 5.4. Models de participació de GAGA en el manteniment d'un estat activat de la cromatina	166

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1.1. Superfamília SF2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	9
Taula 1.2. Enhancers de Pc i Trx	26
Taula 3.1. Oligonucleòtids utilitzats al llarg d'aquest treball	59
Taula 3.2. Anticossos utilitzats als assajos de WB i ChIP	60
Taula 3.3. Balancejadors i marcadors de <i>Drosophila</i>	61
Taula 3.4. <i>Stocks</i> de <i>Drosophila</i> utilitzats	62
Taula 3.5. Reactius i cicles de la reacció de PCR	67
Taula 4.1. Efecte fenotípic de la falta de Pc a la construcció Fab-7	100
Taula 4.2. Efecte fenotípic de la falta de Pc i de dSAP18 a la construcció Fab-7	126
Taula 4.3. Drivers generals i induïbles utilitzats per a l'expressió de l'RNAi de GAGA	133

ABREVIATURES

3C	<i>Chromosome Conformation Capture</i> , Captura de la Conformació de la Cromatina
Abd-A	<i>Abdominal-A</i>
Abd-B	<i>Abdominal-B</i>
Abs	Absorvència
ACF	<i>ATP-utilizing Chromatin Assembly and Remodeling Factor</i> , Factor d'Ensamblatge i Remodelació de la Cromatina ATP-dependent
act	Actina
ANT-C	Complex Antennapèdia
ADP	Adenosin Difosfat
ATP	Adenosin Trifosfat
ATPasa	Adenosin Trifosfatasa
bp	<i>base pairs</i> , parells de bases
BRM	Brahma
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Albúmina Sèrica Bovina
BX-C	Complex Bitòrax
cDNA	DNA codificant
CHD	<i>Chromodomain-Helicase-DNA binding</i> , unió DNA-Helicasa-Cromodomini
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i> , Immunoprecipitació de Cromatina
CHRAC	<i>Chromatin Accessibility Complex</i> , Complex d'Accessibilitat de la Cromatina
C-terminal	extrem carboxi-terminal
da	<i>daughterless</i>
dCBP	<i>Drosophila CREB Binding Protein</i> , Proteïna d'Unió a CREB de <i>Drosophila</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid Desoxiribonucleic
DNasaI	Ribonucleasa I
dNTPs	desoxiribonucleòtids
dSAP18	<i>Sin3-Associated-Polypeptid</i> de 18 KDa de <i>Drosophila</i>
DTT	ditiotreitòl
EDTA	àcid etilen-diamin-tetraacètic
EGTA	àcid etilen-glicol-tetraacètic
EM	Element de Manteniment
ESC	Extra Sex Combs
ETP	Enhancer de Polycomb i Trithorax
E(Z)	Enhancer of Zeste
Fab	element frontabdominal
FACT	<i>facilitates chromatin transcription</i> , facilitador de la transcripció de la cromatina
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i> , Sèrum Boví Fetal
FISH	hibridació <i>in situ</i> fluorescent

GBP	complex GAGA/Batman/Pipsqueak
HAT	<i>Histone Acetyl-Transferase</i> , acetiltransferasa d'histones
HDAC	<i>Histone Deacetylase</i> , desacetil·lasa d'histones
HMT	<i>Histone Methyl-Transferase</i> , metiltransferasa d'histones
Hox	gen homeòtic
HP1	<i>Heterochromatin Protein 1</i> , Proteïna d'Heterocromatina 1
HS	<i>Hypersensitive Site</i> , Lloc Hipersensible
hsp	<i>heat-shock proteins</i> , proteïnes induïdes per xoc tèrmic
iab	domini infraabdominal
IAB	iniciador/enhancer infraabdominal
IgGs	Immunoglobulines de tipus I
ISWI	<i>imitation switch</i>
K	lisina
Kbp	Kiloparells de bases
KDa	KiloDaltons
LB	Luria-Bertrani
LCRs	<i>Locus Control Regions</i>
MBT	<i>malignant brain tumor</i> , tumor de cervell maligne
MCP	<i>Miscadestral Pigmentation</i>
mRNA	RNA missatger
NLS	<i>Nuclear Localization Site</i> , Lloc de Localització Nuclear
nm	nanòmetre
NP40	Nonidet P-40
N-ter	Extrem amino-terminal
NuRD	<i>Nucleosome Remodeling Histone Deacetylase Complex</i> , Complex Desacetil·lasa d'Histones i Remodelador de la Cromatina
NURF	<i>Nucleosome Remodeling Factor</i> , Factor Remodelador del Nucleosoma
PAGE	Gel d'Electroforesi en Poliacrilamida
Pc	Polycomb
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacció en Cadena de la Polimerasa
PEV	<i>Position Effect Variegation</i>
PH	Polyhomeotic
Pho	Pleihometic
Pi	Pirofosfat
PMSF	Fluorur de fenilmetil sulfònic
POZ/BTB	<i>Poxvirus and Zinc-finger/Broad Complex Tramtrack Bric-a-Brac</i>
PRC	<i>Polycomb Repressive Complex</i>
PRE/TRE	Element de Resposta a Polycomb/Trithorax
PS	Parasegment
PSA	Persulfat d'amoni
PSC	Posterior Sex Combs
PSQ	Pipsqueak
PSS	<i>Pairing-Sensitive Silencing</i>

PTS	<i>Promoter Targeting Sequence</i>
RNA	Àcid Ribonuclèic
RNasaA	Ribonucleasa A
RNAi	RNA d'interferència
rpm	revolucions per minut
RT	Retrotranscripció
S	Segment
S2	<i>Schneider Cell Line 2</i> , línia cel·lular Schneider 2
SCM	<i>Sex comb on midleg</i>
sd	<i>scalloped</i>
SDS	sodium dodecil sulfat
SET	Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax
SF2	Superfamília Helicasa 2
Sin-3	<i>switch-independent 3</i>
S/MAR	<i>Scaffold/Matrix Anchorage Region</i> , Regió d'ancorament a l'Scaffold i a la Matriu
ssDNA	DNA d'esperma de salmó
Su(Z)12	Supressor of Zeste
SWI2/SNF2	<i>switch 2/sucrose-non-fermenting 2</i>
Ubx	<i>Ultrabithorax</i>
TAF	<i>TBP associated factor</i> , factor associat a TBP
TBP	<i>TATA binding protein</i> , proteïna d'unió a TATA
TEMED	N, N, N'-(tetrametil)-etilendiamino
Trx	Trithorax
tub	tubulina
WB	Western Blot

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La cromatina

1.1.1. Estructura de la cromatina i implicació en l'expressió gènica

1.1.1.1 El nucleosoma

El DNA es compacta al nucli de la cèl·lula eucariota en forma de cromatina. La cromatina està formada per un conjunt de proteïnes histones i no-histones que s'uneixen i compacten la doble hèlix de DNA. En aquesta memòria centrarem la nostra atenció en el paper que juga la cromatina i la seva organització en la transcripció gènica.

La unitat bàsica de la cromatina és el nucleosoma i està format per les histones H2A, H2B, H3 i H4 i el DNA que s'hi associa (aproximadament 146 bp). El nucleosoma conté dues còpies de cada histona, de manera que es forma un octàmer: $2(\text{H2A-H2B})-(\text{H3})_2(\text{H4})_2$. L'hèlix de DNA dóna una volta i tres quarts al voltant de l'octàmer; aquesta associació de l'octàmer d'histones i el DNA s'ha anomenat *core* del nucleosoma (figura 1.1). El DNA que connecta un nucleosoma amb el següent s'ha anomenat DNA *linker* i és de longitud variable (Kornberg *et al.*, 1999).

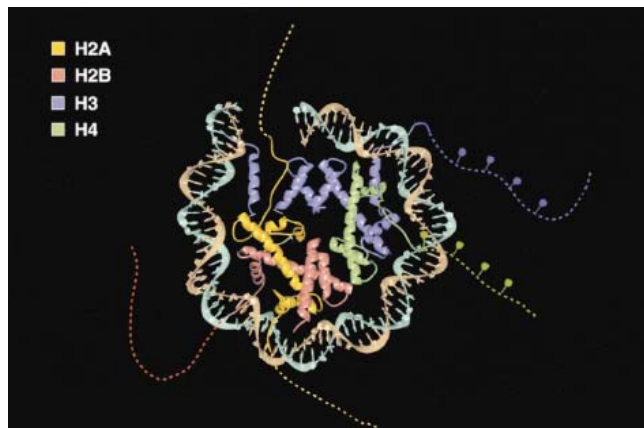


Figura 1.1. Estructura del nucleosoma. El DNA dóna una volta i tres quarts al voltant del nucleosoma. Es poden veure les cues de les histones sobresortint del *core* (Kornberg *et al.*, 1999).

Les histones de l'octàmer comparteixen un domini peptídic similar, el *histone fold*, que consisteix en una hèlix- α central flanquejada per tots dos costats per hèlixs més petites i

loops que interaccionen amb el DNA. A més, presenten de 15 a 38 residus amino-terminals que es troben desestructurats i que s'han anomenat cues de les histones (Arents *et al.*, 1995).

S'ha vist que la interacció entre el DNA i les histones es dona cada deu parells de bases, quan el solc petit de l'hèlix de DNA s'encara cap a l'octàmer. Els contactes DNA-histones tenen lloc mitjançant ponts d'hidrogen amb els fosfats del DNA i interaccions hidrofòbiques amb els grups de la pentosa. El fet que les histones no contactin amb les bases nitrogenades concorda amb la falta d'especificitat de posicionament del nucleosoma (Luger *et al.*, 1997). No obstant, s'ha observat que determinades regions de DNA presenten un patró particular a l'hora de posicionar els nucleosomes. S'ha vist que regions reguladores de l'expressió gènica, com enhancers i promotors, presenten regions lliures de nucleosomes; s'ha pensat que aquests patrons de posicionament dels nucleosomes podrien prevenir el recrutament de proteïnes a les seqüències emmascarades pel nucleosoma, o potenciar-ne la unió a les seqüències exposades (Kornberg *et al.*, 1999).

1.1.1.2. La fibra de cromatina

S'ha descrit un cinquè tipus d'histona que no forma part del *core* del nucleosoma: la histona H1. Els nucleosomes i el DNA *linker* s'empaqueten en una estructura superior anomenada fibra de cromatina o fibra de 30 nm. L'H1 s'uneix al DNA *linker* i sembla que jugaria un paper important en la formació d'aquesta fibra de cromatina (Ramakrishnan, 1997).

Les dues voltes de l'hèlix de DNA al voltant del nucleosoma es troben alineades, de manera que es generen prou forats per a que les cues de les histones sobresurtin del *core* i siguin susceptibles d'interaccionar amb d'altres proteïnes i de ser modificades (Luger *et al.*, 1997). També les cues de les histones són necessàries per a que es pugui donar aquest nivell superior d'empaquetament, ja que s'ha vist que la cua de l'H4 d'un nucleosoma pot contactar amb la superfície del següent (Luger *et al.*, 1997).

◆ Factors moduladors de la fibra de cromatina

El nucleosoma, en general, s'ha descrit com a un element repressor de la transcripció, donat que la seva localització no permet que el DNA es trobi accessible a les proteïnes

encarregades de la transcripció (Han *et al.*, 1988). Recentment, però, s'ha vist que el fet que una regió sigui lliure de nucleosomes no implica que es trobi transcripcionalment activa sinó, més d'aviat, transcripcionalment competent; a més, el fet que una regió es trobi accessible a factors reguladors de l'expressió gènica pot permetre tant el recrutament de factors activadors com repressors (Ercan *et al.*, 2004).

Així doncs, la modulació dels elements de la fibra de cromatina és molt important a l'hora de regular l'estat transcripcional d'un determinat gen. S'han descrit diversos mecanismes epigenètics que es troben implicats en aquesta modulació, com l'adició de modificacions a les cues de les histones i la modificació de la posició dels nucleosomes mitjançant els complexos remodeladors de la cromatina ATP-dependents.

a) El codi de les histones

Les cues de les histones H2B i H3 sobresurten del *core* del nucleosoma a través dels solcs de l'hèlix de DNA; les cues de l'H2A i l'H4 sobresurten de les cares planes del *core*. Tot això les exposa a la interacció amb d'altres proteïnes no-histones i a possibles modificacions (Kornberg *et al.*, 1999). S'ha proposat que les modificacions de les cues de les histones podrien alterar l'estructura de la cromatina influint les interaccions histona-histona i histona-DNA (Strahl *et al.*, 2000). S'han descrit diversos tipus de modificacions covalents que afegeixen o eliminen radicals de les cues de les histones: acetil·lacions, metil·lacions, fosforil·lacions, ADP-ribosil·lacions, ubiquitinacions, sumoil·lacions, carbonil·lacions i glicosil·lacions.

Al principi s'havia suggerit que les modificacions de les histones promourien per sí mateixes canvis a la conformació de la cromatina, però la gran quantitat de modificacions que poden patir les cues de les histones, les múltiples combinacions d'aquestes modificacions i el descobriment de proteïnes amb dominis capaços d'interaccionar específicament amb els residus modificats han conduït a pensar en l'existència d'un llenguatge codificat a les cues de les histones i llegit per determinades proteïnes per a modular tant l'expressió gènica com l'estructura de la cromatina: el codi de les histones (figura 1.2) (Strahl *et al.*, 2000).

Les proteïnes capaces d'interaccionar específicament amb els residus modificats s'han anomenat els "lectors del codi". Aquestes proteïnes estan formades per dominis que poden reconèixer aquestes modificacions (bromodominis, cromodominis...) i són les responsables

de la traducció en una funció determinada, ja sigui promovent canvis a l'estructura de la cromatina o mitjançant el recrutament d'altres complexos proteïcs (Mellor, 2006b).

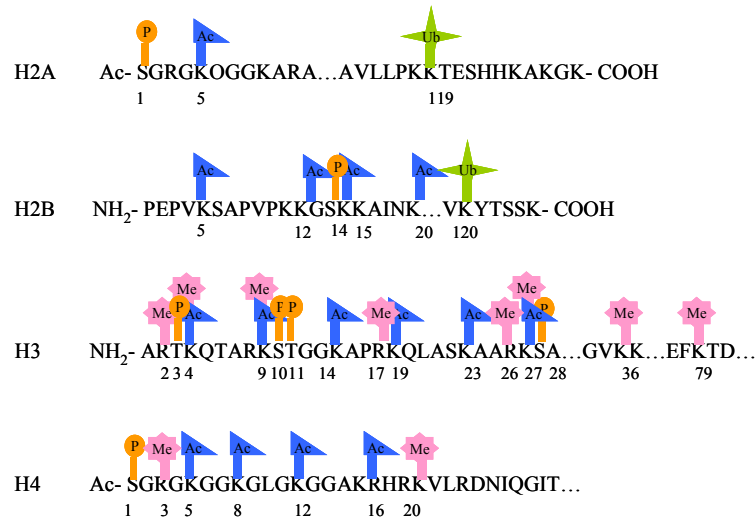


Figura 1.2. Modificacions que poden presentar les diferents histones. Algunes, com l'acetil·lació i la metil·lació de l'H3K9 són mútuament exclouents.

L'acetil·lació i la desacetil·lació són les modificacions de les histones que es coneixen de fa més temps, i afecten els residus lisina dels dominis N-terminals de les histones. L'acetil·lació consisteix en l'adició d'un radical acetil a un residu lisina. En origen, aquestes modificacions es van relacionar amb l'activitat gènica; el descobriment dels complexos acetil·ladors (HAT) i desacetil·ladors (HDAC) i el desenvolupament d'anticossos específics contra els residus modificats han permès aprofundir en la funció d'aquestes modificacions (Narlikar *et al.*, 2002). D'aquesta manera, per exemple, s'ha vist que l'estat d'acetil·lació de les cues de les histones H3 i H4 és important per a que tingui lloc l'ensamblatge dels nucleosomes a la fibra de 30 nm (Shogren-Knaak *et al.*, 2006; Verreault *et al.*, 1996).

Un altre tipus de modificació molt ben estudiada és la metil·lació. La metil·lació consisteix en l'adició d'un radical metil a les arginines o a les lisines de les proteïnes. Fins ara, s'havia pensat que la metil·lació era una modificació molt estable i que es mantenia al llarg de les divisions cel·lulars però, recentment, s'han descrit diversos enzims capaços de catalitzar la reacció inversa, és a dir, la desmetil·lació (Shi *et al.*, 2004).

A diferència de l'acetil·lació, un mateix residu lisina es pot trobar en un estat mono, di o trimetil·lat; s'ha vist que la metil·lació promou estats activats o reprimits de la cromatina

dependent del residu que afecti. Així doncs, la metil·lació també s'ha relacionat amb l'activitat gènica. De fet, s'ha suggerit que aquesta modificació jugaria un paper molt important en el silenciament gènic i en la formació de l'heterocromatina (Ebert *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2003).

Un tercer tipus de modificació molt coneguda és la fosforil·lació. La fosforil·lació es va descriure com una modificació molt abundant a cèl·lules mitòtiques i es va relacionar amb condensació i segregació cromosòmica (Hendzel *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 1999). Aquesta modificació també s'ha detectat a loci de *heat-shock* transcripcionalment activats, suggerint que també juga un paper en la regulació gènica (Nowak *et al.*, 2000).

Les modificacions descrites fins el moment són les més conegudes, però no són les úniques. S'ha descrit que les histones poden ser també ubiquitinades, sumoil·lades, ADP-ribosil·lades, carbonil·lades i glicosil·lades (Mellor, 2006a).

Si bé, el fet que les histones presentin modificacions en determinats residus no és tan important com quines combinacions poden presentar segons el context en què es trobin i la funció que hagin de promoure, és a dir, el codi de les histones. El fet que una mateixa modificació estigui implicada en més d'un procés biològic sembla recolzar aquesta teoria, donat que la introducció d'aquesta modificació en un context amb d'altres modificacions pot conferir l'especificitat de funció. Per exemple, la fosforil·lació de la serina 10 de la histona H3 de *Drosophila* està implicada en condensació i segregació cromosòmica, però també participa en la compensació del cromosoma X dels mascles; el cromosoma X de *Drosophila*, però, presenta un estat d'hiperacetil·lació de la lisina 16 de l'H4 que no es detecta en metafase, suggerint que és la combinació fosfo-H3S10/acetil-H4K16 l'encarregada de mantenir l'estat hiperactivat del cromosoma X (Turner *et al.*, 1992; Y. Wang *et al.*, 2001).

Aquesta hipòtesi també es veu recolzada pel fet que moltes de les proteïnes que catalitzen les reaccions d'acetil·lació i de metil·lació tenen també un domini capaç de reconèixer residus modificats (bromodominis i cromodominis, respectivament), que permet el recrutament d'aquests enzims a regions prèviament modificades, promovent la modificació de nous residus (Ebert *et al.*, 2006; Hassan *et al.*, 2002).

b) Remodelació de la cromatina ATP-dependent

Ja hem dit abans que, tot i que els nucleosomes no presenten especificitat de seqüència en posicionar-se, s'ha vist que no es troben distribuïts uniformement sobre el DNA, de manera que sembla que presenten un patró particular a l'hora de situar-se en determinades regions. Els nucleosomes semblen situar-se al voltant de regions reguladores de l'expressió gènica, per exemple, deixant-les lliures per a possibles interaccions amb factors de transcripció o amb proteïnes reguladores (Kornberg *et al.*, 1999; Luger *et al.*, 1997). Els encarregats de l'ensamblatge i el posicionament dels nucleosomes a la fibra de cromatina són els complexos remodeladors de la cromatina ATP-dependents.

S'han identificat remodeladors ATP-dependents en tots els organismes. Tots els remodeladors de la cromatina ATP-dependents de *Drosophila* coneguts pertanyen a la superfamília helicasa 2 (SF2), anomenada així perquè el seu domini ATPasa conté set motius característics de les helicases (Eisen *et al.*, 1995).

En base a la filogènia de les seqüències del domini ATPasa dels diferents complexos, a *Drosophila*, la superfamília SF2 s'ha dividit en diverses subfamílies, les més importants: SWI2/SNF2 (*switch 2/sucrose-non-fermenting 2*), CHD (*chromodomain-helicase-DNA binding*) i ISWI (*imitation switch*) (taula 1.1) (Bouazoune *et al.*, 2006).

Si bé, generalment, els complexos remodeladors de la cromatina ATP-dependents s'han associat amb la generació d'estats oberts de la cromatina i, per tant, amb l'activació de l'expressió gènica, recentment també se'ls ha relacionat amb els mecanismes de repressió. La proteïna dMi-2 de la família CHD, per exemple, sembla potenciar els fenotips de transformació homeòtica observats a mutants de proteïnes del Grup Polycomb; dMi-2 forma part d'un complex multiprotèic (dNuRD) que està comprès, entre d'altres subunitats, per la desacetil·lasa d'histones RPD3/p55, que no només potenciaria la generació d'estats silencis de la cromatina sinó que, a més, sembla que estimula l'activitat ATPasa de dMi-2 (Kehle *et al.*, 1998).

S'han descrit diverses activitats dependents dels remodeladors de la cromatina, com l'ensamblatge i desensamblatge dels nucleosomes i el lliscament al llarg de l'hèlix de DNA, però el que encara no es coneix, són els mecanismes emprats en aquests processos (Narlikar *et al.*, 2002).

Pel que fa el lliscament o *sliding* dels nucleosomes, per exemple, s'ha vist que no promou un augment de la quantitat de DNA exposat, només canvia la localització d'aquest DNA. Els complexos ACF i CHRAC, de la família ISWI, poden desplaçar els nucleosomes uns 10 parells de bases, mentre els SWI2/SNF2 poden translocar-lo de 50 a 80 bp (Kassabov *et al.*, 2002; Kassabov *et al.*, 2003). Degut a les diferents activitats mediades pels complexos de les famílies SWI2/SNF2 i ISWI, s'han proposat diferents models de lliscament del nucleosoma (figura 1.3).

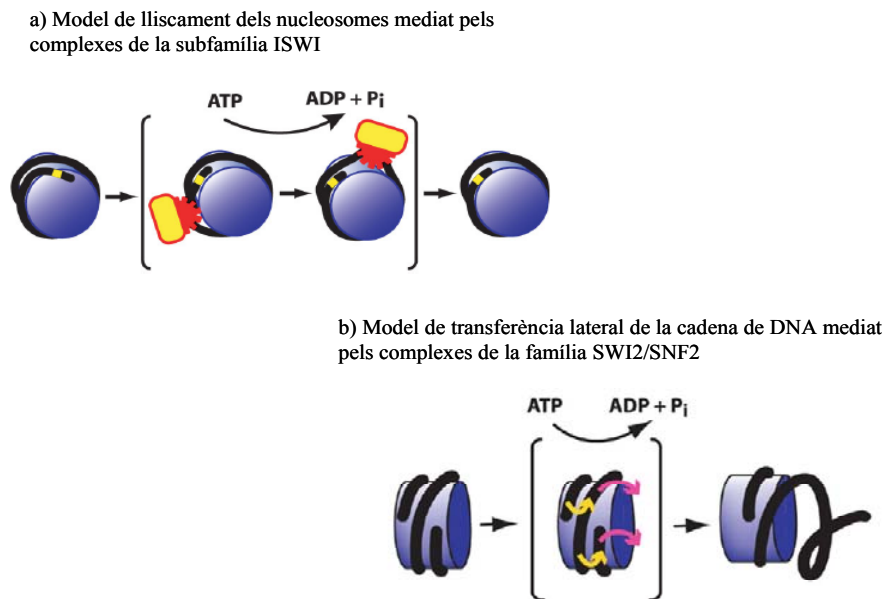
En primer lloc, segons les característiques biològiques observades als complexos de la família ISWI, s'ha suggerit un model de lliscament clàssic basat en la formació d'un *loop* de

Taula 1.1. Superfamília SF2 de *Drosophila melanogaster* (Bouazoune *et al.*, 2006).

ATPases de <i>Drosophila melanogaster</i>	Dominis/motius conservats	Homòlegs arquetípics	Complexes de <i>Drosophila</i>	Composició dels complexos	Funcions
BRM	Bromodomini, BRK, HSA	SWI1/SNF2, STH1, hBRM, BRG1	BAP PBAP	Específics de BAP: OSA, BAP74 Comuns: BRM, SNR1, BAP47, BAP55, BAP60, MOR, BAP155, BAP111 Específics de PBAP: PB, BAP170	Activació de la transcripció
ISWI	AT-hook, SANT, SLIDE, HAND	SNF2H, SNF2L, xISWI, ISW1, ISW2	ACF CHRAC NURF	ISWI, ACF1 ISWI, ACF1, CHRAC14, CHRAC16 ISWI, NURF301, p55, NURF38	Estructures del DNA d'ordre superior Transcripció Renovació de les <i>Stem Cells</i>
dCHD1	Cromodominis	CHD1, CHD2, HRP3, HRP1	/	/	Elongació transcripcional
dCHD3	Cromodominis, PHD <i>fingers</i>	CHD3, PICKLE	?	?	?
dMi-2	Cromodominis, PHD <i>fingers</i>	CHD4, LET-418	dNuRD	dMi-2, drPD3, p55, dMBD2/3, dMTA, p66	Repressió transcripcional
KIS-L	Cromodominis, BRK	CHD6-9	?	?	Elongació transcripcional
CG5899	UBA	FUN30, ETL1	?	?	?
dXNP	/	ATRX, ATRXL	?	?	?
CG4049	/	ARIP4	?	?	?
dRAD54	/	RAD54, RAD54B	?	?	Reparació del DNA
DOM-A,B	HSA, SANT (només la forma A)	SWR1, SRCAP, p400	dTIP60	DOM-A, dTIP60, dPON, dREP, dMRG15, H2Av, dTRA1, dGAS41, dING3, E(Pc), H2B	Reparació del DNA, intercanvi d'histones, renovació d' <i>Stem Cells</i>
dINO80	DBINO	INO80	?	?	?
dMOT1	HEAT	MOT1	?	?	Transcripció, resposta immune innata
LDS	/	TTF2, CeF2	?	?	Terminació transcripcional
dSMARCAL1	HARP	SMARCAL1	?	?	?

DNA a la superfície del nucleosoma i al lliscament de l'hèlix de DNA degut a la interacció amb el complex remodelador, que es translocaria mitjançant l'energia proporcionada per la seva activitat ATPasa (figura 1.3.a) (Lusser *et al.*, 2003).

D'altra banda, s'han proposat d'altres mecanismes possibles de remodelació promoguda pels complexos de la família SWI2/SNF2. En primer lloc, s'ha suggerit la



possibilitat de que es produeixi un canvi conformacional a l'estructura del nucleosoma degut a la hidròlisi de l'ATP, de manera que es permetria la formació d'un intermediari que podria contactar de forma diferent amb el DNA i promoure el moviment translacional (Narlikar *et al.*, 2002). També s'ha proposat un model pel qual el nucleosoma es podria desplaçar tota una volta de DNA; aquesta transferència promouria un desplaçament net de 80 bp (figura 1.3.b). No s'ha proposat, però el mecanisme pel qual aquesta transferència podria tenir lloc (Lusser *et al.*, 2003).

Finalment, no es poden descartar els models que proposen que el desplaçament dels nucleosomes implica la dissociació de tota l'estructura i la unió en un lloc diferent, mecanisme que seria possible donat la capacitat dels complexos ISWI i SWI2/SNF2 d'ensamblar i desensamblar nucleosomes, respectivament (Lorch *et al.*, 1999).

1.1.1.3. Organització de la cromatina en estructures d'ordre superior

Com hem vist, la cromatina de les cèl·lules eucariotes es troba condensada d'una forma hieràrquica; de la mateixa manera, l'expressió gènica es veu regulada per diferents mecanismes que actuen als diferents nivells de compactació. En aquest apartat farem un resum de l'organització superior que presenta la cromatina al nucli cel·lular i dels diferents mecanismes que control·len l'expressió gènica en aquests nivells de compactació.

◆ Eucromatina i heterocromatina

La cromatina es pot trobar en diferents estats al nucli interfàsic segons la condensació i l'accessibilitat que presenti. L'eucromatina és la cromatina que es descondensa durant la interfase del cicle cel·lular i on es troben la majoria de gens que codifiquen per a proteïnes. L'heterocromatina és la cromatina que es manté condensada i inaccessible i que es troba generalment en blocs d'heterocromatina pericentromèrica, al nuclèol i als telòmers. Aquestes regions d'heterocromatina constitutiva estan compostes principalment de seqüències repetitives i contenen molt pocs gens. L'heterocromatització de regions eucromàtiques resulta en un altre tipus d'heterocromatina, la facultativa, que representa un mecanisme epigenètic de silenciament gènic que s'estableix als inicis del desenvolupament embrionari i es manté al llarg de les divisions cel·lulars de l'organisme fins a l'adult (Ebert *et al.*, 2006). S'ha vist que el patró de posicionament dels nucleosomes en regions obertes de la cromatina és diferent de l'observat en transgens totalment insertats en regions heterocromàtiques, en que la cromatina es troba en un estat silenciament (Wallrath *et al.*, 1995)

Una eina molt emprada per a l'estudi de la cromatina han estat els cromosomes politènics de les glàndules salivars de *Drosophila*. A les glàndules salivars, es produeix un fenomen d'endoreduplicació del DNA sense divisions nuclears, on les fibres de DNA replicat s'associen paral·lelament a les anteriors, de manera que es formen unes estructures anomenades cromosomes politènics. La tinció dels cromosomes politènics amb intercal·ladors del DNA mostra un patró molt característic de bandes i interbandes (figura 1.4) (Zhimulev *et al.*, 2004). Als cromosomes politènics de les glàndules salivars de *Drosophila* les regions eucromàtiques es correlacionen amb les regions interbanda, mentre l'heterocromatina es correspon a les bandes d'aquests cromosomes (Ebert *et al.*, 2006).

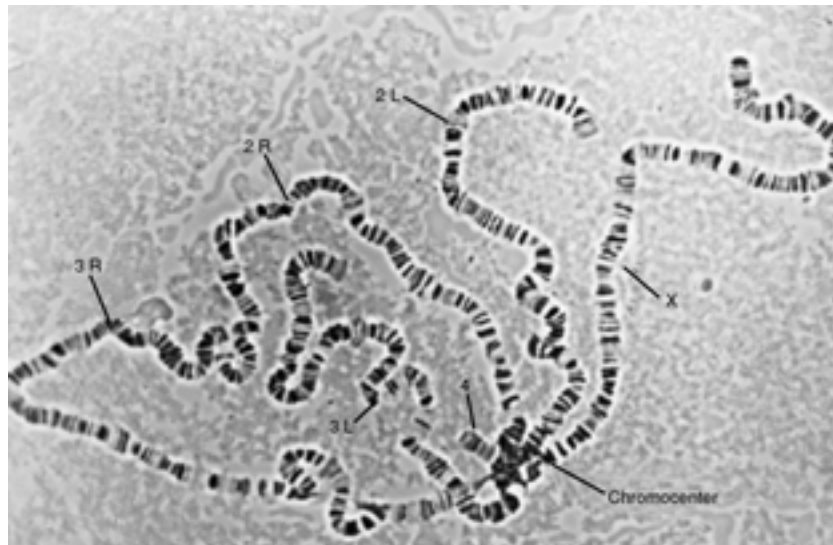


Figura 1.4. Cromosomes politènics de *Drosophila melanogaster*. Els cromosomes es creuen en una regió anomenada cromocentre (Newfoundland)

L'euromatina i l'heterocromatina també presenten diferents patrons d'acetil·lació de les cues de les histones (Grunstein, 1997). Mitjançant anticossos específics contra les lisines acetil·lades de l'H4 s'ha vist que, a l'euromatina, tots els residus susceptibles de ser acetil·lats es troben modificats, de manera que l'euromatina es troba en una situació d'hiperacetil·lació, mentre que l'heterocromatina es troba en un estat hipoacetil·lat (O'Neill *et al.*, 1995). Sembla que cap lisina de l'H4 es troba modificada al cromosoma-X inactiu dels mamífers, mentre que, a *Drosophila* i a llevats, l'heterocromatina només sembla estar acetil·lada a la K12 de l'H4 (Braunstein *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1992). S'ha vist, però, que la mutació de la K12 de l'H4 no aboleix la formació de l'heterocromatina, de manera que sembla que aquesta modificació no deu ser necessària per a que es doni la compactació (Megee *et al.*, 1990).

Igualment, el patró de metil·lació presenta diferències entre les diferents regions de cromatina. D'aquesta manera, per exemple, a l'heterocromatina pericentromèrica de *Drosophila* trobem H3K9 mono, di i trimetil·lada, H3K27 mono, di i trimetil·lada i H4K20 trimetil·lada. Aquestes modificacions no són exclusives d'aquestes regions, però s'hi troben acumulades (Ebert *et al.*, 2006). L'H3K9 trimetil·lada, que és la principal marca heterocromàtica a mamífers (Peters *et al.*, 2003), és detectada a *Drosophila* principalment a la regió del cromocentre (Ebert *et al.*, 2004). També al cromocentre es pot detectar H3K27 mono i dimetil·lada, que també es troba a la majoria de bandes dels cromosomes politènics,

mentre la trimetil-H3K27 només es pot detectar a unes 100 bandes i al nucli del cromocentre (Ebert *et al.*, 2006). De fet, s'ha suggerit que el procés de formació d'heterocromatina es donaria a través del recrutament de la proteïna de l'heterocromatina 1 (HP1), que conté un cromodomini capaç d'interaccionar específicament amb l'H3K9 trimetil·lada, i de Polycomb, amb un cromodomini capaç d'interaccionar amb l'H3K27 trimetil·lada (Mellor, 2006b).

D'altra banda, l'eucromatina, que es correspon a les regions interbanda dels cromosomes politènics de *Drosophila*, és rica en marques relacionades amb un estat activat de la cromatina, com la metil·lació de l'H3K4 i de l'H3K36 (Jenuwein *et al.*, 2001).

◆ Alguns gens es troben agrupats formant *clusters*

Alguns gens, com els que codifiquen per a les histones, els de les α -globines i les β -globines i els gens *Hox* es troben agrupats en el genoma de manera que formen unes estructures que anomenem *clusters*. Una qüestió important és si l'activitat gènica es troba control·lada individualment o si es troba control·lada a nivell de tot el *cluster* (van Driel *et al.*, 2003). S'ha vist que molts grups de gens que es troben formant *clusters*, a part de regular-se de forma individual, presenten una regulació a nivell de tota l'estructura. Si bé l'existència de *clusters* de gens funcionalment relacionats és rara, s'ha vist que molts gens que s'expressen sota les mateixes condicions o en el mateix nivell s'agrupen també d'aquesta manera (Festenstein *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Oliver *et al.*, 2002; Spellman *et al.*, 2002).

En primer lloc, per a que cada gen pugui ésser regulat de forma individual dins d'un *cluster* cal que tot el domini es trobi en un estat transcripcionalment competent. Per a que això tingui lloc, cal que un element control·lador del *cluster* (el *Locus Control Region*) promogui el canvi entre un estat actiu i inactiu de la cromatina quan sigui necessari (Li *et al.*, 2002). Aquests elements reguladors són els encarregats de reclutar proteïnes que promoguin el canvi d'un estat tancat de la cromatina a un estat obert o competent, com proteïnes modificadores de les cues de les histones o remodeladors de l'estructura de la cromatina ATP-dependents. Una característica molt important que s'ha observat als LCRs és que són plenament capaços de conduir l'activitat de tots els gens del domini que regulen fins i tot quan són translocats o insertats en d'altres regions del genoma, independentment del lloc d'inserció (Dean, 2006).

En segon lloc, un cop el domini s'ha establert com a transcripcionalment competent, cada gen es troba regulat de forma individual mitjançant la presència de promotors i enhancers. Per a que aquests elements reguladors, que es poden trobar molt allunyats a la fibra de cromatina, condueixin l'expressió d'un gen en el moment i el lloc adequat i amb la intensitat adequada, s'ha de produir un acostament i una interacció entre ells.

El mecanisme pel qual els diferents tipus d'enhancers condueixen l'expressió d'un gen no es coneix, però s'han proposat diversos models en que l'enhancer és l'encarregat de reclutar les proteïnes activadores que han de contactar amb el promotor per a induir el reclutament de la maquinària de transcripció (figura 1.5) (Dean, 2006; Dorsett, 1999; Li *et al.*, 2006). El contacte entre enhancer i promotor es pot produir també en *trans*, és a dir entre diferents cromosomes. L'IAB-7, per exemple, és un enhancer que condueix l'expressió del gen *Abdominal-B* al segment abdominal A6 de l'embrió de *Drosophila* i és capaç de contactar en *trans* amb el seu promotor i activar-lo (Sipos *et al.*, 1998). S'ha postulat que l'aparellament entre cromosomes homòlegs pot induir l'acostament entre ambós elements (Morris *et al.*, 1998).

Finalment, els *clusters* es troben separats dels dominis adjacents mitjançant boundaries o insulators, que no permeten que les proteïnes reguladores d'un domini

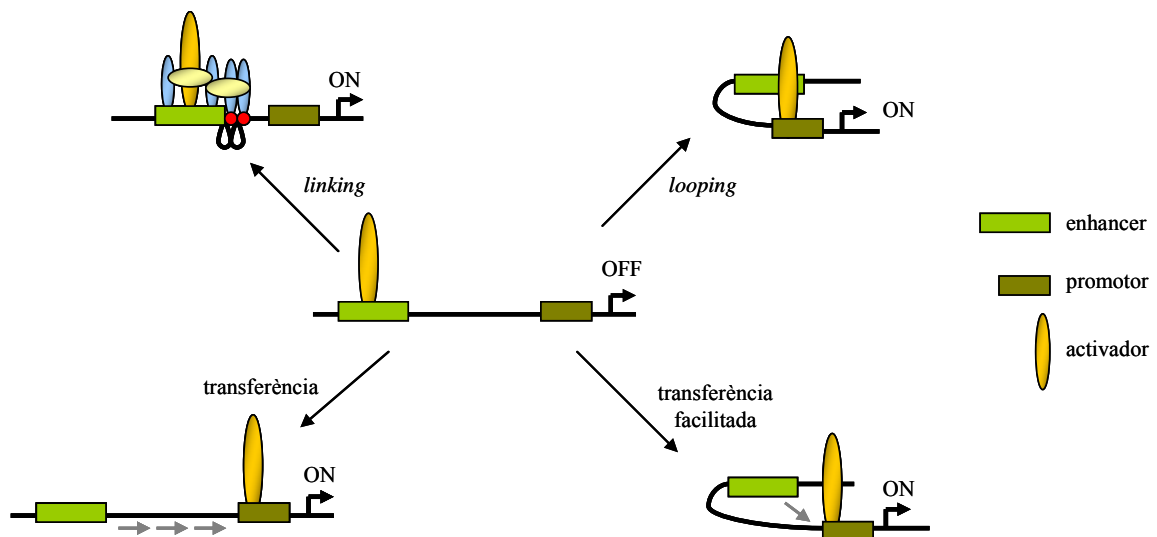


Figura 1.5. Models d'interacció entre enhancer i promotor. En tots els models una proteïna activadora que se situa sobre l'enhancer ha de contactar amb el promotor per a promoure l'expressió del gen. El model de *linking* proposa que els dos elements reguladors s'apropen mitjançant l'ajut d'unes proteïnes facilitadores que promouen la formació de petits *loops* de DNA entre ells. El *looping* suggereix que la proteïna activadora ha d'estar en contacte amb tots dos elements reguladors per a promoure l'activació, i proposa que això té lloc mitjançant la formació d'un *loop* de DNA que acosta els dos elements. La transferència és un model que proposa que la proteïna facilitadora o el senyal que aquesta promou és transferida entre l'enhancer i el promotor. Finalment, la transferència facilitada proposa que aquesta transferència és possible gràcies a l'acostament entre els dos elements reguladors a través de la formació d'un *loop* de DNA.

s'extenguin cap els dominis adjacents. Els insulators presenten dues propietats funcionals: en primer lloc protegeixen els transgens dels efectes de posició deguts a la inserció en regions de cromatina transcripcionalment activa o reprimida. S'ha suggerit que la protecció contra l'efecte de posició està relacionada amb la modulació de l'acetil·lació i la metil·lació de les histones (figura 1.6.a) (Burgess-Beusse *et al.*, 2002). En segon lloc, els insulators presenten activitat de bloqueig d'enhancer quan es troben situats entre aquest i el promotor que activa. S'ha descrit que per a que un insulator bloquegi l'activitat de l'enhancer és necessari que aquests elements es trobin en *cis*, és a dir, al mateix cromosoma, de manera que s'ha suggerit que podrien interferir en els mecanismes de contacte entre ambdós (figura 1.6.b) (Krebs *et al.*, 1998).

L'insulator de *Drosophila* més ben estudiat és el *gypsy* i es va identificar com la regió del retrotransposó *gypsy* responsable de mutacions específiques de teixit a molts gens

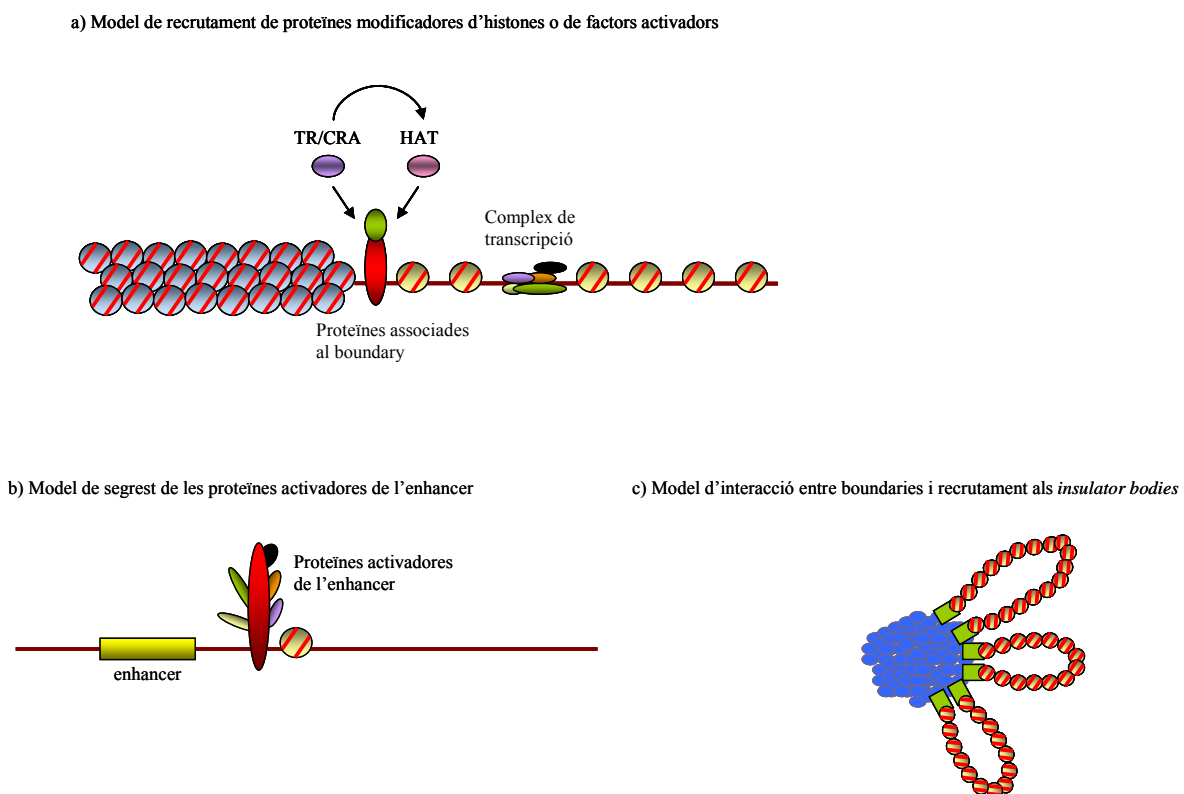


Figura 1.6. Models proposats per a les diferents activitats dels insulators. Els diferents models són complementaris entre ells. a) Els insulators podrien actuar com a barrera i evitar la propagació d'estats reprimits de la cromatina mitjançant el recrutament de proteïnes modificadores de les histones o activadores de l'estructura de la cromatina que permetessin la formació d'un estat activat (Kuhn *et al.*, 2003). b) S'ha proposat un model en que els insulators podrien capturar els factors activadors que s'uneixen als enhancers i evitar d'aquesta manera el contacte entre les dues regions reguladores (Geyer *et al.*, 2002). c) També s'ha suggerit que l'activitat dels insulators podria ser deguda a la interacció amb d'altres elements insulator o amb regions d'ancorament; d'aquesta manera, interaccions estables entre les proteïnes que s'uneixen a aquests elements formarien un llaç que bloquejaria físicament la capacitat de l'enhancer de contactar amb el promotor (Bell *et al.*, 1999).

(Dorsett, 1993). Totes les proteïnes que es troben implicades en l'activitat d'aquest insulador col·localitzen a centenars de llocs del genoma que no corresponen al *gypsy*, suggerint que deuen estar relacionades amb l'activitat insulador d'altres elements (Gerasimova *et al.*, 1996). De fet, s'ha suggerit que aquestes proteïnes formen complexos estables, que s'han anomenat *insulator bodies*, i que es troben relacionats amb la capacitat de formar estructures de cromatina d'ordres superiors (figura 1.6.c) (Pai *et al.*, 2004).

També s'han descrit insulators a vertebrats; el més ben estudiat és l'insulador de la regió reguladora del *locus* de la β -globina de pollastre. L'insulador del pollastre funciona també a sistemes heteròlegs (a cèl·lules humanes i de *Drosophila*), indicant que els mecanismes pels quals operen els insulators deuen ser molt conservats (Chung *et al.*, 1993).

◆ Organització tridimensional de la cromatina nuclear

Fins ara, hem tractat el genoma com si es tractés d'una unitat lineal en que els elements reguladors poden actuar només en *cis* (tot i que, com hem dit, sembla que els enhancers podrien actuar també en *trans* gràcies a l'aparellament entre cromosomes homòlegs) (Morris *et al.*, 1998; Sipos *et al.*, 1998). Però els enhancers no són els únics elements que poden contactar amb d'altres regions que es troben molt lluny a la seqüència o, fins i tot, en d'altres cromosomes. La cromatina es troba altament plegada al nucli cel·lular, de manera que *loci* molt separats al genoma poden ser acostats (van Driel *et al.*, 2003).

El nucli interfàsic es troba funcionalment compartimentalitzat (Carmo-Fonseca, 2002; Francastel *et al.*, 2000). Hi ha evidències considerables de que l'arquitectura del nucli es troba altament relacionada amb la funció del genoma; d'aquesta manera, la posició d'un gen dintre del nucli és important, ja que algunes àrees poden ser repressives, mentre d'altres poden promoure la transcripció (Andrulis *et al.*, 1998; Spector, 2001).

Mitjançant assajos d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH), s'ha vist que a diferents organismes i a diferents tipus cel·lulars, cada cromosoma interfàsic ocupa un espai únic i relativament compacte, que s'ha anomenat territori cromosòmic (Cremer *et al.*, 2001). S'ha proposat que aquesta localització és possible degut a que els cromosomes no es descondensen totalment després de la mitosi, ja que s'ha vist que la cromatina interfàsica només és cinc cops menys densa que la mitòtica (Visser *et al.*, 2000). D'aquesta manera, només els

fragments que es trobin altament descondensats seran capaços d'envair els territoris cromosòmics adjacents i els espais intercromosòmics (Mahy *et al.*, 2002).

Els espais intercromosòmics, que són els espais que no es troben ocupats per cap cromosoma, permeten la difusió de diferents macromolècules a través del nucli, com proteïnes de la maquinària de transcripció o proteïnes reguladores (Politz *et al.*, 1999). Així doncs, s'ha vist que les regions que han de ser transcrites es concentren a la superfície dels dominis de cromatina compacta, als espais intercromosòmics (Cmarko *et al.*, 1999). De fet, s'ha proposat que el fet que alguns gens que presenten un patró d'expressió similar s'agrupin formant *clusters* podria ser el resultat d'aquesta organització cromosòmica interfàsica. Els *clusters* podrien sobresortir dels seus territoris cromosòmics en forma de *loops* i envair d'altres espais nuclears i, fins i tot, mesclar-se amb la cromatina d'altres cromosomes (van Driel *et al.*, 2003). De la mateixa manera, els *loci* silenciats d'una manera dependent de Pc-G, sembla que també es localitzen predominantment en aquestes àrees pericromàtiques (Cmarko *et al.*, 2003).

Però com pot ser que la cromatina presenti una localització tan específica al nucli? Com hem dit, durant la mitosi, el DNA es compacta fins a formar una estructura altament condensada que s'anomena cromosoma. S'ha suggerit que l'estructura del cromosoma podria presentar un esquelet o *scaffold* format d'RNA i proteïnes. Si bé hi ha evidències creixents de l'existència d'aquestes estructures d'ancorament de la cromatina, s'ha vist que aquest esquelet presenta una natura molt dinàmica al llarg del cicle cel·lular, de manera que també s'ha anomenat matriu nuclear (Bode *et al.*, 2003). S'ha suggerit que la matriu nuclear seria la base estructural responsable de promoure l'ordre intranuclear. La matriu nuclear està formada per una xarxa de lamines, que es localitzen a la cara interna de la membrana nuclear, i per una xarxa interna de filaments (Wan *et al.*, 1999).

S'ha vist que la cromatina s'ancora a la matriu nuclear a través d'unes regions que s'han anomenat *scaffold/matrix attachment regions* (S/MARs); aquestes regions són capaces d'interaccionar amb els diferents tipus de lamines nuclears i formar xarxes internes (Harborth *et al.*, 1999; Luderus *et al.*, 1992). S'han atribuït moltes funcions a aquests elements, però generalment s'ha pensat que representaven els boundaries estructurals, de manera que aquestes regions es mantindrien ancorades a la matriu i formarien uns *loops* que representarien els diferents dominis, com per exemple regions d'heterocromatina i d'eucromatina (Bell *et al.*, 1999).

Si bé, l'únic insulator de *Drosophila* on s'han observat seqüències S/MAR és el *gypsy*; s'ha vist que després de repetides extraccions nuclears i digestions amb nucleases, aquests elements de DNA s'associen preferentment amb la matriu nuclear (Hart *et al.*, 1998; Laemmli *et al.*, 1992). Com hem dit, les proteïnes responsables de l'activitat insulator del *gypsy* s'associen als *insulator bodies*; la correcta localització d'aquests complexos al nucli de la cèl·lula requereix que l'estructura de la matriu nuclear estigui intacta, i en particular és imprescindible la presència de lamina i RNA, de manera que els *insulator bodies* podrien ser els intermediaris de l'ancorament entre la cromatina i la matriu nuclear (Capelson *et al.*, 2005; Gerasimova *et al.*, 2000).

1.1.2. Cromatina i regulació de l'expressió gènica al llarg de les divisions cel·lulars

Com hem vist, el control de l'expressió gènica en una cèl·lula determinada no només depèn de la seqüència de DNA sinó que també depèn de la història de la cèl·lula, és a dir, del procés de diferenciació. L'estructura de la cromatina és una característica heredable al llarg de les divisions cel·lulars de l'organisme. Hem vist que la cromatina pot ser modulada pels complexos modificadors de les cues de les histones i pels ATP-dependents i que es pot organitzar en estructures d'ordre superior al nucli interfàsic per tal de regular els diferents processos biològics. Totes aquestes modificacions són heredables al llarg de les divisions cel·lulars i al llarg del desenvolupament de l'organisme. S'han identificat diversos mecanismes epigenètics involucrats en el procés de diferenciació cel·lular i en l'herència d'aquests estats diferenciats, com la localització de les variants de les histones, el mecanisme d'RNAi, la metil·lació del DNA i el moment de replicació gènica (Holmquist *et al.*, 2006), però en aquesta memòria ens centrarem en el paper que juguen les proteïnes del Grup Polycomb (Pc-G) i del Grup Trithorax (Trx-G) en el manteniment dels diferents estats de la cromatina al llarg del desenvolupament de *Drosophila* (Marx, 2005)

El gen *Polycomb* va ser descobert per Pamela Lewis el 1947 analitzant un mutant de *Drosophila melanogaster* que presentava un fenotip amb una transformació homeòtica al segon i al tercer parell de potes. Anàlisis més detallats de mutants de Pc van indicar que la pèrdua de funció d'aquest gen conduïa a una transformació global dels segments embrionaris al segment més posterior. Per aquest motiu, Pc es va definir com a un regulador negatiu dels

gens homeòtics de la regió del Complex Bitòrax (BX-C), encarregada del desenvolupament antero-posterior de l'organisme (I. Duncan *et al.*, 2002). A partir d'aquí, es van descriure diversos gens que presentaven fenotips similars al de Pc o que potenciaven la seva activitat; aquests gens es van incloure en un grup anomenat Pc-G.

Les proteïnes del Pc-G no actuen com a repressors clàssics, ja que mostren un silenciament similar al que s'observa en els gens que es troben sotmesos a *position effect variegation* (PEV). La PEV és un fenomen pel qual regions eucromàtiques són heterocromatitzades (i, per tant, silenciades) com a resultat de la inserció en una regió heterocromàtica a causa de reorganitzacions cromosòmiques. En el silenciament dependent de Pc, com en la PEV, la decisió de si un gen s'expressa o no, té lloc a l'inici del desenvolupament, i resulta en l'expressió del gen en un nombre variable de cèl·lules; el silenciament es manté al llarg de les divisions cel·lulars de manera que aquests gens s'expressen de forma variegada, generant teixits mosàics (Schwartz *et al.*, 2007). Així doncs, per exemple, el silenciament del gen *mini-white* (que codifica per una proteïna que proporciona pigmentació vermella a l'ull dels individus adults) dependent de Pc-G condueix a una pigmentació variegada de l'ull.

Els gens del Trx-G van ser identificats per la seva capacitat de contrarrestar l'efecte de les proteïnes del Pc-G. Es va veure que mutacions del gen *trithorax* provocaven transformacions dels segments de *Drosophila* a segments més anteriors. D'aquesta manera, aquests gens es van definir com a activadors de la regió del Complex Bitòrax (Grimaud *et al.*, 2006b).

Així doncs, tradicionalment, els gens del Pc-G s'han relacionat amb el manteniment de l'estat reprimat de la cromatina, mentre els gens del Trx-G s'han relacionat amb l'estat activat.

1.1.2.1. Elements PRE/TRE

Per tal de permetre l'herència dels estats reprimits o activats de la cromatina, les proteïnes dels Pc-G i Trx-G interaccionen amb el DNA mitjançant unes seqüències anomenades *Polycomb Response Elements* (PREs) i *Trithorax Response Elements* (TREs), respectivament (Francis *et al.*, 2001).

La diferenciació entre PRE i TRE no sembla ser molt clara, donat que sembla que els PREs i els TREs solapen parcialment (Tillib *et al.*, 1999); a més, s'ha vist que seqüències PRE/TRE ectòpiques actuen com a PRE per defecte, i que mutacions tant de proteïnes del Pc-G com del Trx-G n'afecten l'activitat (Cavalli *et al.*, 1998). De fet, assajos d'immunoprecipitació de cromatina, mostren una distribució solapada de les proteïnes Pc i Trx al genoma (Orlando *et al.*, 1998). Per aquests motius, freqüentment, els elements PRE/TRE s'anomenen simplement PREs o elements de manteniment (EMs).

La majoria de PREs s'han identificat per la seva capacitat de silenciar gens en assajos amb gens reporter ectòpics i de mantenir l'estat reprimat d'aquests gens al llarg del desenvolupament de l'organisme. En aquests assajos, es va veure que un PRE funcional pot silenciar un gen reporter de forma dependent del Pc-G, de manera que una mutació en aquestes proteïnes n'altera el silenciament (Busturia *et al.*, 1997; Horard *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2001). També s'ha vist que l'activitat silenciadora del PRE no depèn de la seva posició (*upstream* o *downstream*) respecte el gen que silencia, ni de la seva orientació (Busturia *et al.*, 1997), i que la presència d'un PRE en un transgèn genera una unió ectòpica de proteïnes del Pc-G en cromosomes politènics (Dejardin *et al.*, 2005).

D'altra banda, la presència de dues còpies homòlogues d'un transgèn que contingui un PRE provoca un silenciament més fort que la presència d'una única còpia. Aquesta és una propietat particular dels PREs, i s'ha anomenat *Pairing-Sensitive Silencing* (PSS). Aquesta característica dels PREs suggereix que aquests elements contacten entre ells dintre de l'embolcall nuclear. El fet que mutacions a proteïnes del Pc-G i del Trx-G afectin també el PSS indica que l'aparellament entre les diferents còpies del PRE també implica aquestes proteïnes (Kassis, 2002).

El tamany dels PREs descrits oscil·la entre uns dos-cents i un miler de parells de bases. Els PREs no presenten homologia de seqüència, però solen contenir diverses còpies de seqüències d'unió d'algunes proteïnes dels grups Pc i Trx, com Zeste, DSP1, Pleihomeotic (Pho) i GAGA. S'ha vist que aquestes proteïnes s'encarreguen de reclutar els complexos dels grups Pc i Trx als elements de manteniment, i que els seus llocs d'unió són imprescindibles per a l'activitat de l'element (Busturia *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2001; Strutt *et al.*, 1997) (Horard *et al.*, 2000). Sembla, però, que aquests llocs d'unió no són suficients per a que tingui lloc l'activitat PRE (Shimell *et al.*, 2000).

1.1.2.2. Complexes del Grup Polycomb

S'ha predit l'existència d'uns 40 gens que deuen pertànyer al Pc-G però, fins el moment, només se n'han caracteritzat 15. Estudis genètics primerencs ja van suggerir que tant les proteïnes del Pc-G com les del Trx-G devien actuar a través de complexos multiprotèics, donat que els fenotips descrits a *Drosophila* es veien fortament potenciats quan es produïen dues o tres mutacions als gens dels grups Pc o Trx i ja que només algunes de les proteïnes descrites com a membres d'aquests grups tenen capacitat d'interaccionar directament amb el DNA (Grimaud *et al.*, 2006b).

◆ El complex PRC2

El *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2) inicialment es va identificar com un complex format per les proteïnes del Pc-G *Extra Sex Combs* (ESC) i *Enhancer of Zeste* [E(Z)] (Ng *et al.*, 2000). Més recentment s'ha vist que aquest complex també inclou les proteïnes NURF-55 i *Supressor of Zeste 12* [SU(Z)12] i que pot associar-se a la desacetil·lase d'histones RPD3 (Cao *et al.*, 2002; Czermin *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002; Tie *et al.*, 2001).

La proteïna E(Z) és la subunitat catalítica del complex PRC2 i s'encarrega de trimetil·lar la lisina 27 de la histona H3. El domini SET d'E(Z) permet que la proteïna interaccionï amb PHO, promovent la unió de PRC2 a elements PRE (L. Wang *et al.*, 2004). ESC i SU(Z)12 contribueixen de forma crítica a l'activitat enzimàtica d'E(Z) *in vivo* (Ketel *et al.*, 2005), mentre la funció de NURF-55, proteïna que ja hem vist que forma part dels complexos NURF i CAF-1, no ha estat descrita encara (Badenhorst *et al.*, 2002). Pel que fa a la desacetil·lase d'histones RPD3, s'ha proposat que podria catalitzar la desacetil·lació de les cues de les histones (van der Vlag *et al.*, 1999).

S'ha suggerit que la funció del complex PRC2 podria ser el recrutament del complex del Pc-G PRC1 a través de la metil·lació de l'H3K27, modificació que seria reconeguda pel cromodomini de la proteïna Pc, del complex PRC1 (figura 1.7), alhora que promouria estats silenciosos de la cromatina a través de la hipocetil·lació de les histones i la hipermetil·lació de l'H3K27 (L. Wang *et al.*, 2004). De fet, recentment s'ha vist que les proteïnes Pc, PSC i E(Z) col·localitzen als PRE de més de 200 *loci* de *Drosophila*. Tot i que la localització observada

de la modificació trimetil-H3K27 és més àmplia, s'observa també col·localització amb les proteïnes del PRC2 (Schwartz *et al.*, 2006).

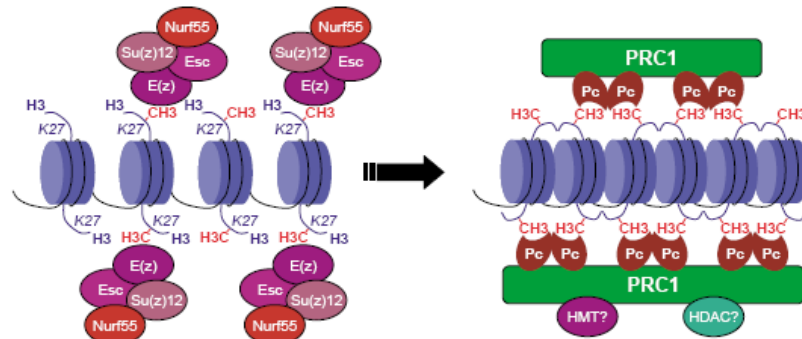


Figura 1.7. Model que proposa que el complex PRC2 ([ESC/E(Z)] és l'encarregat de reclutar el complex PRC1 a través de la metil·lació de l'H3K27, modificació que és reconeguda per la proteïna Pc del PRC1 (Lund *et al.*, 2004).

◆ El complex PRC1

El *Polycomb Repressive Complex 1* (PRC1) està format per les proteïnes Polycomb (Pc), *Posterior Sex Combs* (PSC), Polyhomeotic (PH), *Sex comb on midleg* (SCM) i dRING, codificada pel gen *Sex comb extra*. S'ha vist que el complex PRC1 és capaç d'interaccionar amb més de 30 proteïnes, inclosos alguns factors associats a *TATA Binding Proteins* (TAFs) (Fritsch *et al.*, 2003; Saurin *et al.*, 2001; Shao *et al.*, 1999).

Ja hem dit que s'ha proposat un reclutament de PRC1 a través del reconeixement i la interacció del cromodomini de Pc i la trimetil-H3K27 (L. Wang *et al.*, 2004), però també s'ha vist que PRC1 pot ser conduït cap els PREs mitjançant la interacció amb les proteïnes Pipsqueak, Zeste i PHO (Huang *et al.*, 2004; Mahmoudi *et al.*, 2003; Saurin *et al.*, 2001). S'ha suggerit que el complex PRC1 podria ser reclutat independentment de la modificació de l'H3, ja que sembla que les proteïnes del Pc-G es troben localitzades als PREs mentre la marca trimetil-H3K27 s'extèn per tot el locus. S'ha proposat que el cromodomini de Pc fós requerit per a la formació de *loops* que permeten l'expansió de la metil·lació, que seria important per a l'estabilització dels complexos (Kahn *et al.*, 2006).

◆ Els complexes de Pho

Recentment s'ha identificat un complex format per les proteïnes *Pleiohomeotic* (PHO) i dSfmbt que s'ha anomenat PhoRC (*Pho Repressive Complex*). dSfmbt és una proteïna que conté quatre repeticions MBT (*malignant brain tumor*) capaces d'unir-se a l'H3K9 i l'H4K20 mono i dimetil·lades, però que no reconeixen els residus trimetil·lats o no modificats. S'ha vist que el complex PhoRC s'uneix als PREs dels gens homeòtics *Ultrabithorax* i *Abdominal-B*, i que aquesta interacció depèn dels llocs d'unió al DNA de la proteïna PHO. S'ha suggerit que el complex PhoRC contribuiria al manteniment d'un estat silenciament de la cromatina dependent de Pc mitjançant un reconeixement específic de les histones modificades i interaccions dèbils amb els complexos PRC1 i/o PRC2, que conduirien a la trimetil·lació dels residus reconeguts per dSfmbt i al silenciament (Klymenko *et al.*, 2006).

La proteïna Pho també s'ha vist associada al complex dINO80 (Klymenko *et al.*, 2006), homòleg al complex INO80 de *Saccharomyces cerevisiae*. S'ha descrit que aquest complex és un remodelador de la cromatina ATP-dependent i que indueix la transcripció i la remodelació de la cromatina *in vitro* (Shen *et al.*, 2000). Aquesta observació i el fet que Pho també s'hagi identificat interaccionant amb les proteïnes BRM, MOIRA i OSA suggereix una implicació d'aquests complexos remodeladors de la cromatina en repressió (Mohd-Sarip *et al.*, 2002).

1.1.2.3. Complexes del Grup Trithorax

◆ El complex BAP

El complex BAP de *Drosophila* es va identificar com a un complex implicat en la remodelació de la cromatina ATP-dependent i està format per les proteïnes Brahma, OSA, MOIRA, Snr1, BAP55, BAP60, BAP111 i actina (Mohrmann *et al.*, 2004).

BRM és la subunitat que presenta l'activitat ATPasa del complex i conté un bromodomini a la seva regió C-terminal que permet la seva interacció amb les lisines acetil·lades de les cues de les histones (Hassan *et al.*, 2002). No obstant, la mutació del bromodomini no sembla afectar la interacció de la proteïna amb la cromatina *in vivo*, suggerint que no és un domini crític per a que es doni aquesta interacció (Elfring *et al.*, 1998).

S'ha vist que BRM es troba àmpliament associada amb l'RNA polimerasa II activa i el complex BAP col·localitza amb cromatina hiperacetil·lada, indicant que està implicat en l'activació gènica (Armstrong *et al.*, 2002; Mohrmann *et al.*, 2004). Alguns estudis, però, també han suggerit una funció repressora de la transcripció del complex BAP, ja que s'ha observat que Pho interacciona amb diverses subunitats d'aquest complex (Mohd-Sarip *et al.*, 2002) i que la mutació d'*osa*, confereix desrepressió a alguns gens (Collins *et al.*, 2000).

◆ Els complexos d'ISWI

ISWI és la subunitat amb activitat ATPasa que forma part dels altres dos complexos remodeladors de la cromatina del Trx-G: NURF i ACF.

El domini C-terminal d'ISWI presenta una forma cilíndrica formada per 12 hèlixs- α plegades en tres motius estructurals fortament connectats, coneguts com els dominis HAND, SANT i SLIDE; s'ha proposat que tots tres dominis es moguin com un sol durant el procés de remodelació (Grune *et al.*, 2003). S'ha descrit que el domini SANT d'altres proteïnes és capaç d'interaccionar amb les cues de les histones; de fet, s'ha vist que la cua de l'H4 és imprescindible per la remodelació nucleosomal conduïda per ISWI, suggerint que ISWI interacciona per sí mateixa amb el DNA (Clapier *et al.*, 2001; de la Cruz *et al.*, 2005).

En primer lloc, el complex NURF està format per les proteïnes ISWI, que és la responsable de l'activitat ATPasa del complex, NURF55, NURF35 i NURF301 (Gdula *et al.*, 1998; Martinez-Balbas *et al.*, 1998; Tsukiyama *et al.*, 1995a; Xiao *et al.*, 2001). La subunitat NURF301 està formada, entre d'altres dominis, per un bromodomini que li permet reconèixer les lisines acetil·lades de les cues de les histones i, juntament amb ISWI, promou l'activitat remodeladora de la cromatina del complex NURF (Xiao *et al.*, 2001). S'ha vist que aquest complex és necessari per a que es produeixi la correcta activació dels gens homeòtics (Badenhorst *et al.*, 2002)

En segon lloc, el complex ACF (*ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor*) està format per dues úniques subunitats: ISWI, que també proporciona l'activitat ATPasa, i Acf1. S'ha vist que el complex ACF és capaç de catalitzar la reacció de transferència de les histones de les xaperones al DNA per a promoure el periòdic posicionament dels nucleosomes (Loyola *et al.*, 2001).

◆ Els complexos ASH1, TAC1 i ASH2

La proteïna Ash1 conté un domini SET que catalitza la trimetil·lació de la lisina 4 de la histona H3 (Beisel *et al.*, 2002) i forma part d'un complex del Trx-G que també s'ha anomenat ASH1 (Papoulas *et al.*, 1998). Només s'ha identificat una proteïna que interaccioni genètica i funcionalment amb Ash1: la *CREB Binding Protein* (dCBP), que és una acetiltransferasa d'histones que pot ser responsable d'induir estats activats a la cromatina (Bantignies *et al.*, 2000).

S'ha vist que Ash1 pot ser reclutat als elements TRE dels gens homeòtics a través de la seva interacció amb els trànscrips d'aquestes regions i que promou així l'activació del gen. Aquests resultats impliquen una estreta relació entre l'activació de l'expressió gènica induïda per la transcripció al llarg dels dominis reguladors dels gens homeòtics i els complexos del Trx-G (Sanchez-Elsner *et al.*, 2006). També s'ha descrit que aquesta proteïna és reclutada al promotor del gen *Ultrabithorax* i que, mitjançant la trimetil·lació de la lisina 4 de l'H3, conduiria a l'activació de la transcripció gènica (Papp *et al.*, 2006).

D'altra banda, s'ha proposat que el patró de metil·lació establert per l'HMT Ash1 podria generar una superfície d'unió per als complexos de BRM, de manera que sembla que també els complexos del Trx-G actuen de forma conjunta i coordinada en la regulació de l'expressió gènica (Beisel *et al.*, 2002).

La proteïna Trithorax (Trx) també està formada per un domini SET que catalitza la trimetil·lació de l'H3K4. Trx forma part del complex del Trx-G TAC1 (*Trithorax Acetylation Complex 1*), que també conté dCBP i l'antifosfatasa SBF1 (Petruk *et al.*, 2001).

S'ha vist que TAC1 catalitza les reaccions d'acetil·lació i metil·lació de les histones que es troben a l'extrem 5' de l'inici de la traducció dels gens de *heat-shock* i que és capaç de facilitar l'elongació de gens induïts per *heat-shock* (Smith *et al.*, 2004).

La presència de dCBP en els complexos ASH1 i TAC1 i l'activitat redundante de metil·lació de l'H3K4 suggereixen que aquests dos complexos també poden actuar de forma conjunta en el manteniment de l'expressió dels gens homeòtics al llarg del desenvolupament (Grimaud *et al.*, 2006b).

Finalment, s'ha descrit un altre complex del Trx-G: l'ASH2, del qual només s'ha descrit una subunitat, la mateixa proteïna Ash2. Aquesta proteïna s'ha relacionat àmpliament amb el desenvolupament de l'ala de la mosca, i s'ha proposat que pot jugar un paper

important per a mantenir la identitat cel·lular durant el desenvolupament de l'ala (Angulo *et al.*, 2004).

1.1.2.4. Enhancers de Pc i Trx

Ja hem dit que els complexos del Pc-G sempre s'han relacionat amb estats reprimits i els del Trx-G amb estats activats. També hem vist, però, que la separació entre repressors del Pc-G i activadors del Trx-G no és tan clara. S'ha observat una funció dual a moltes proteïnes que originalment s'havien classificat en un dels dos grups i s'han descrit moltes proteïnes que poden interaccionar amb els diferents complexos i poden mostrar funcions tant d'activació com de repressió (taula 1.2), és per això que a aquest conjunt de proteïnes se les ha classificat en un tercer grup que s'ha anomenat Enhancers de Polycomb i Trithorax (EPTs) (Grimaud *et al.*, 2006b). El factor GAGA de *Drosophila* forma part d'aquest grup de proteïnes amb una funció dual.

	Recrutadors de Pc i Trx	Cofactors de Pc i Trx
Taula 1.2. Enhancers de Pc i Trx descrits fins ara (Grimaud <i>et al.</i> , 2006b). GAGA s'ha classificat com a implicat en el recrutament dels complexos dels grups Pc i Trx al DNA a través del seu domini d'unió a DNA.	Pipsqueak Grainyhead Zeste GAGA	Asx E(Pc) Su(Z)2 Corto Lolal/Batman PCL Domino dMi2 Kismet Tonalli Skuld Kohtalo

1.1.2.5. La proteïna GAGA

◆ Isoformes i dominis de GAGA

La proteïna GAGA està codificada pel gen *Trithorax-like (trl)* de *Drosophila melanogaster*. GAGA és una proteïna essencial per a la viabilitat de la mosca i presenta herència materna (Farkas *et al.*, 1994). No obstant, no és una proteïna que es trobi conservada al llarg de l'evolució, donat que només es troba a *Drosophila*. S'ha vist que GAGA s'uneix al

DNA a través de repeticions d(GA·CT); la seqüència d'unió d'aquesta proteïna es troba a les regions reguladores de multitud de gens de *Drosophila* (Granok *et al.*, 1995).

GAGA presenta dues isoformes generades per *splicing* alternatiu d'un únic RNA missatger: GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁ (Benyajati *et al.*, 1997), que poden presentar diverses modificacions postraduccionals (Bonet *et al.*, 2005). Aquestes dues proteïnes només difereixen en el seu extrem C-terminal i sembla que presenten funcions solapants (Benyajati *et al.*, 1997). S'ha suggerit que la variant GAGA₅₁₉ podria ser més activa donat que sembla ser més efectiva a l'hora de rescatar els fenotips derivats de la mutació de *trl* (Greenberg *et al.*, 2001).

GAGA presenta quatre dominis estructurals (figura 1.8). A l'extrem N-terminal trobem el domini POZ/BTB (*Poxvirus and Zing-finger/Broad Complex Tramtrack Bric-a-brac*), domini implicat en l'homodimerització i heterodimerització de GAGA (Espinass *et al.*, 1999). Es troba seguit d'un domini X, del qual es desconeix la funció i on, es creu, es troba el senyal de localització nuclear (NLS) (Lintermann *et al.*, 1998). La regió DBD és un *DNA Binding Domain* que conté un *Zn-finger* flanquejat per tres regions riques en aminoàcids bàsics que permet el contacte entre la proteïna i l'àcid nucleic. Finalment, a C-terminal, es localitza un domini ric en glutamines, responsable de l'activitat transcripcional de GAGA (Vaquero *et al.*, 2000).

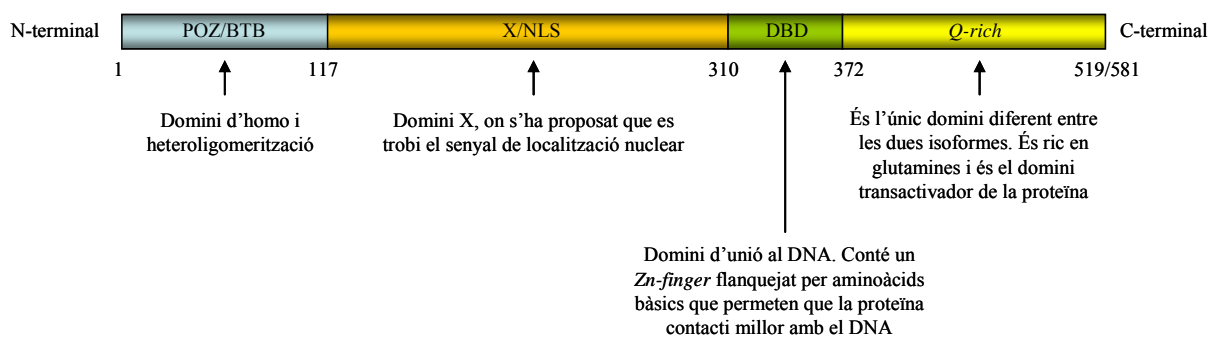


Figura 1.8. Estructura de la proteïna GAGA.

◆ Funcions i complexos de GAGA

GAGA és un factor de transcripció i s'han descrit llocs d'unió per a aquesta proteïna a molts gens induïbles, constitutius i de desenvolupament, entre els que es troben l'*hsp70*, *fushi-*

tarazzu, *engrailed* i *Ultrabithorax* (Granok *et al.*, 1995; Hagstrom *et al.*, 1997; Soeller *et al.*, 1993; Wilkins *et al.*, 1997). GAGA actua com a activador de molts gens, però s'ha vist que presenta activitat repressora sobre el seu propi promotor (Kosoy *et al.*, 2002), de manera que sembla que controla la seva pròpia expressió. GAGA també s'ha vist relacionada amb processos de condensació i segregació cromosòmica (Greenberg *et al.*, 2001).

D'altra banda, GAGA s'ha associat amb processos de remodelació de la cromatina i s'ha vist que col·labora amb dos complexos amb els que participa per a modular el posicionament dels nucleosomes: el complex FACT (*facilitates chromatin transcription*) i el complex ATP-dependent NURF (figura 1.9) (Lehmann, 2004). S'ha vist que GAGA interacciona amb NURF i que, conjuntament, catalitzen el desplaçament dels nucleosomes del promotor de l'*hsp70 in vitro* (Tsukiyama *et al.*, 1995b). En segon lloc, GAGA interacciona amb FACT (Shimajima *et al.*, 2003), que és un complex heterodimèric format per les proteïnes dSPT16 i dSSRP1, descrites a mamífers per la seva capacitat de facilitar la transcripció de la RNA polimerasa II a través del nucleosoma (Orphanides *et al.*, 1998). S'ha vist que dFACT i GAGA s'uneixen als nucleosomes i promouen el desplaçament en una mostra de cromatina reconstituïda (Shimajima *et al.*, 2003).

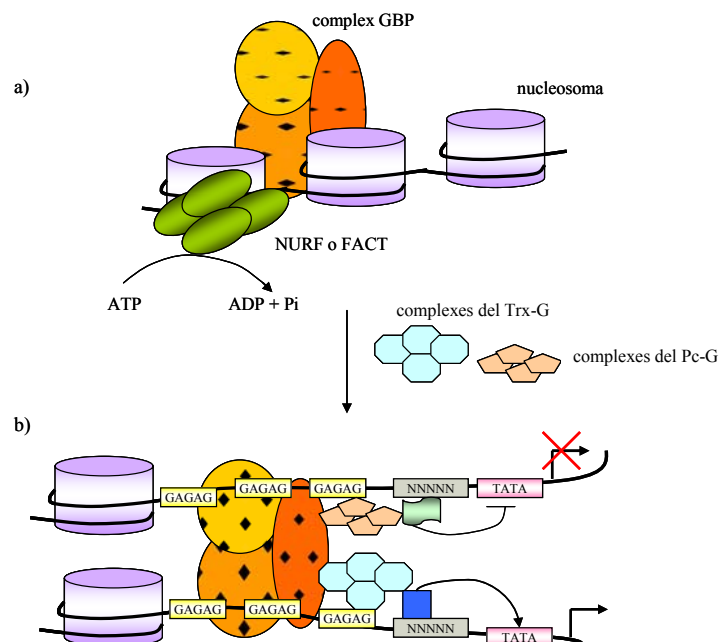


Figura 1.9. Model de funcionament dels complexos de GAGA. a) En un primer pas, GAGA, amb l'ajut dels complexos FACT o NURF podria promoure el desplaçament del nucleosoma, permetent que llocs de reconeixement per d'altres proteïnes estiguin accessibles. b) En un segon pas, GAGA podria facilitar l'establiment d'un estat activat o reprimat de la regió a través del recrutament de proteïnes dels grups Pc o Trx (Lehmann, 2004)

Així doncs, s'ha suggerit que la funció activadora de GAGA podria ser deguda a la seva participació en la modulació de l'estructura de la cromatina, donat que s'ha vist que indueix la reorganització dels nucleosomes dels gens *hsp70* i *hsp26*; s'ha pensat que GAGA podria promoure un estat obert de la cromatina que facilités la unió d'activadors transcripcionals.

GAGA és un enhancer de *position effect variegation* i, tot i que es va definir com a membre del Trx-G donat que es comportava com a regulador positiu de l'expressió dels gens homeòtics (Farkas *et al.*, 1994), s'ha vist que és capaç d'interaccionar tant amb complexos del Trx-G com del Pc-G i s'ha suggerit que podria ser important per al recrutament d'aquests complexos als seus llocs d'unio (Lehmann, 2004). D'aquesta manera, s'ha vist que GAGA col·localitza amb Pc a diferents PREs (Strutt *et al.*, 1997), i que els seus llocs d'unio són imprescindibles per a que es doni el silenciament promogut per Pc (Busturia *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2001).

No obstant, cap proteïna dels grups Pc i Trx sembla contactar directament amb GAGA, de manera que s'ha suggerit que d'altres proteïnes deuen mediar les interaccions observades. S'ha proposat que la proteïna Corto podria representar aquest intermediari, ja que s'ha vist que és capaç d'interaccionar *in vivo* amb GAGA i amb proteïnes dels complexos PRC1 i PRC2 (Salvaing *et al.*, 2003).

GAGA s'ha vist àmpliament associada amb dues proteïnes amb les que s'ha suggerit que podria formar un complex: el complex GBP, format per GAGA, Batman (Ban) i Pipsqueak (PSQ) (figura 1.9) (Lehmann, 2004). PSQ és una proteïna que s'uneix a la mateixa seqüència consens que GAGA (Lehmann *et al.*, 1998) i que presenta la mateixa localització a cromosomes politènics (Schwendemann *et al.*, 2002). S'ha proposat que aquestes dues proteïnes podrien presentar funcions complementàries. Batman és una proteïna que conté bàsicament un domini BTB i que mostra les mateixes propietats que GAGA i PSQ en l'activació i repressió dels gens homeòtics (Faucheux *et al.*, 2003; L. Wang *et al.*, 2002). S'ha proposat que el complex GBP podria formar un pont entre regions enhancer i promotor, de manera que acostaria elements de DNA molt allunyats en seqüència (Lehmann, 2004) ja que s'ha vist que l'activitat activadora d'un enhancer depèn del domini BTB de GAGA i dels llocs GAGA del promotor (Mahmoudi *et al.*, 2002).

GAGA no només s'ha vist implicada en l'acostament entre regions reguladores, sinó que també s'ha relacionat amb l'activitat bloquejadora d'enhancer d'alguns insulator (Ohtsuki

et al., 1998); de fet, podem trobar llocs d'unió per a la proteïna GAGA a diversos elements boundary de *Drosophila* (Belozarov *et al.*, 2003; Mihaly *et al.*, 1998), i s'ha vist que aquests llocs d'unió són imprescindibles per a l'activitat *enhancer-blocking* d'aquests elements (Melnikova *et al.*, 2004; S. Schweinsberg *et al.*, 2004).

Finalment, mitjançant el crivellatge per doble híbrid d'una llibreria embrionària de *Drosophila* amb el domini POZ de la proteïna GAGA es va trobar la interacció d'aquest factor amb un polipèptid que mostra una elevada homologia a la proteïna SAP18 (*Sin3-Associated Polypeptid*) de mamífers (Espinás *et al.*, 2000), una proteïna associada al complex corepressor Sin3/HDAC (*switch-independent 3-histone deacetylase*) (Zhang *et al.*, 1997).

Aquesta interacció es va veure recolzada per assajos *in vitro* de *pull-down* i pel fet que ambdues proteïnes col·localitzen als cromosomes politènics de *Drosophila*, concretament a la regió del Complex Bitòrax (BX-C). A més, es va observar una interacció genètica entre ambdues proteïnes, indicadora de la possible cooperació dels dos factors en la regulació de l'expressió del gen *Abdominal-B* (Espinás *et al.*, 2000). També s'ha descrit una col·localització entre GAGA, dSAP18 i la desacetil·lasa d'histones RPD3 a la regió del Fab-7 del Complex Bitòrax de *Drosophila*, i s'ha vist que dSAP18 participa en la funcionalitat d'aquest element (Canudas *et al.*, 2005).

dSAP18 és una proteïna de 18 KDa i es troba associada al DNA i a la matriu nuclear (Costa *et al.*, 2006). dSAP18 interacciona amb diverses proteïnes relacionades amb el desenvolupament, com Bicoid, i copurifica amb la proteïna E(Z), suggerint que aquesta proteïna podria col·laborar amb diferents complexos (L. Wang *et al.*, 2002).

Paral·lelament, a humans s'ha vist que SAP18 pot formar part d'un altre complex, ASAP, que s'ha relacionat amb l'apoptosi i també amb el processament de l'RNA missatger (Schwerk *et al.*, 2003). Recentment, a *Drosophila* també s'ha suggerit una associació entre dSAP18 i l'*splicing*, ja que s'ha descrit que interacciona amb la proteïna dPinina, identificada a mamífers com a un factor involucrat amb el processament de l'RNA (Costa *et al.*, 2006).

1.1.2.6. Models de silenciament i activació

Els complexos dels grups Pc i Trx són els responsables de l'herència dels estats activats o reprimits de la cromatina. Aquests complexos no són, però, responsables de l'establiment d'aquests estats, sinó que són capaços de llegir la informació impresa a la

cromatina que indica si una regió s'ha de mantenir transcripcionalment activa o reprimida (Orlando *et al.*, 1995).

L'estat activat o reprimat de diferents dominis de DNA s'estableix mitjançant el recrutament de factors específics de seqüència, com els productes dels gens *gap* i *pair-rule*. Aquests factors o l'estructura de la cromatina que estableixen són reconeguts per les proteïnes dels grups Pc o Trx, que s'hi uneixen i poden promoure canvis heredables (Peel, 2004; Sanson, 2001). S'ha proposat que les proteïnes del Pc-G s'unirien per defecte als elements de manteniment, però que la unió de proteïnes del Trx-G a aquests elements exclouria els complexos del grup Pc, de manera que s'establiria un domini actiu. En absència de les proteïnes del grup Trx s'hi podrien unir les del Pc-G i es promouria el manteniment d'un estat silenciament (Francis *et al.*, 2001; Klymenko *et al.*, 2004).

◆ Silenciament

S'han proposat múltiples models per a l'establiment de dominis reprimits mediats pel Pc-G. En primer lloc, s'ha suggerit que els complexos del Pc-G podrien promoure la formació d'estructures de la cromatina inaccessibles per a la maquinària de transcripció o per a factors activadors (figura 1.10.1). S'ha vist que el complex PRC1 és capaç d'inhibir per sí sol la remodelació de la cromatina promoguda per la proteïna SWI/SNF, homòloga de BRM (Francis *et al.*, 2001). A més, s'ha vist que la proteïna PSC és capaç de promoure la compactació dels nucleosomes, de manera que s'agrupen fins un punt en que són indistingibles (Marx, 2005) i que una variant del complex PRC1 conté la proteïna desacetil·lase d'histones HDAC1; la desacetil·lació, igual que la induïda pel complex PRC2, pot promoure la condensació dels cromosomes degut a l'augment de la càrrega positiva de les histones, que poden interaccionar millor amb les molècules de DNA (Huang *et al.*, 2004).

D'altra banda, la presència de TAFs en alguns complexos PRC1 suggereix que aquest complex podria actuar com a repressor transcripcional mitjançant contactes directes amb els factors de transcripció; aquests contactes podrien evitar el recrutament de les proteïnes encarregades de la iniciació de la transcripció (figura 1.10.2) (Dellino *et al.*, 2004; Saurin *et al.*, 1998).

Finalment, s'ha proposat un model en què el silenciament conduït per les proteïnes del Pc-G estigui mediat pel recrutament de les regions que han d'esdevenir silenciades en uns

dominis de repressió (figura 1.10.3). Mitjançant assajos d'immuno-FISH s'ha vist que durant el cicle cel·lular les proteïnes del Pc-G s'acumulen en unes estructures que s'han anomenat *Polycomb bodies* (Saurin *et al.*, 1998) i que poden reclutar determinades regions de DNA, com el Complex Bitòrax de *Drosophila melanogaster*, suggerint que es poden formar uns dominis de repressió intranuclears (Bantignies *et al.*, 2003).

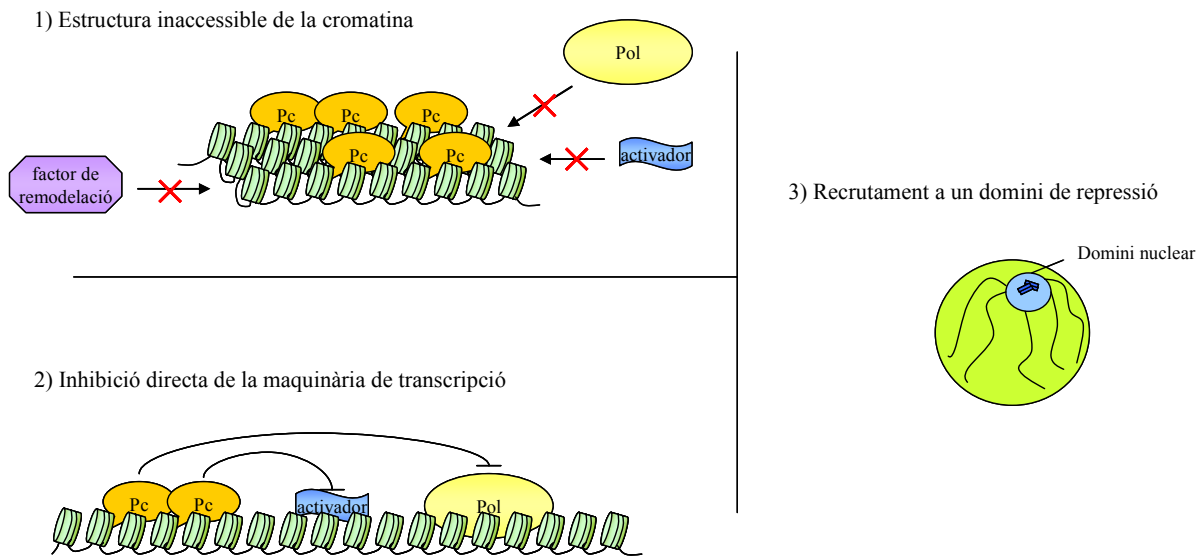


Figura 1.10. Models d'establiment d'estats reprimits de la cromatina heretables al llarg de les divisions cel·lulars. Els diferents models no són exclouents.

◆ Activació

L'establiment d'un estat activat de la cromatina heretable sembla que podria implicar l'activitat remodeladora dels complexos BAP, NURF i ACF (Armstrong *et al.*, 2002; Badenhorst *et al.*, 2002; Loyola *et al.*, 2001; Mohrmann *et al.*, 2004). S'ha suggerit que el complex BAP, per exemple, podria contrarrestar l'activitat de les proteïnes del Pc-G mitjançant el reconeixement de regions hiperactivades, a través del bromodomini de BRM, i l'establiment de dominis de DNA accessibles a factors de transcripció, a través de la seva implicació en el lliscament i el desensamblatge dels nucleosomes (figura 1.11.1) (Grimaud *et al.*, 2006b).

D'altra banda, també s'ha vist que la inducció de la maquinària de transcripció en una regió silenciada pot promoure un canvi a un estat activat (Bender *et al.*, 2002; Hogga *et al.*,

2002; Rank *et al.*, 2002; Sanchez-Elsner *et al.*, 2006; Schmitt *et al.*, 2005); el fet que TAC1 promogui l'elongació de la transcripció (Smith *et al.*, 2004), i que Ash1 sigui reclutat als TREs mitjançant els trànscrips d'aquests elements reguladors (Sanchez-Elsner *et al.*, 2006) sembla recolzar la hipòtesi de que la transcripció juga un paper important en l'establiment d'estats activats heredables (figura 1.11.2).

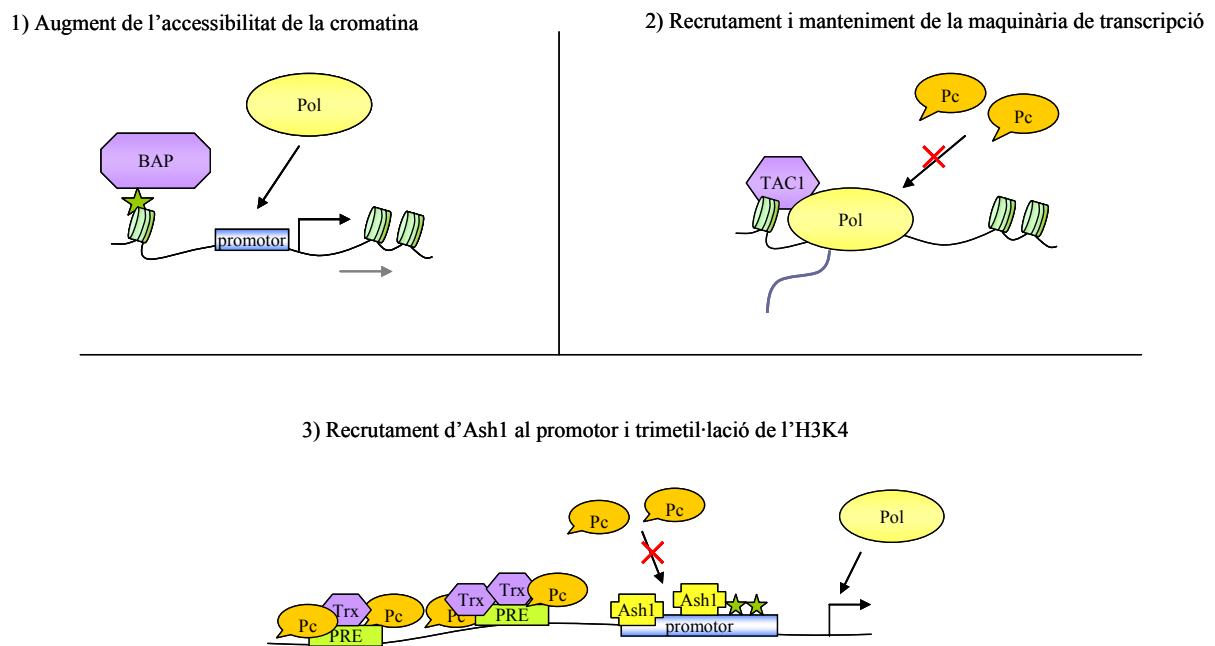


Figura 1.11. Models d'establiment d'estats actius de la cromatina heredables al llarg de les divisions cel·lulars.

Finalment, s'ha vist que moltes proteïnes dels grups Pc i Trx col·localitzen als elements de manteniment del gen *Ultrabithorax*, tant en cèl·lules en que aquest s'expressa com en cèl·lules a les que es troba inactiu; la diferència entre els dos estats és la presència de la proteïna Ash1 al promotor de l'*Ubx* de les cèl·lules en que el gen s'expressa, on promouria la trimetil·lació de la lisina 4 de la histona H3 i previndria les modificacions que s'han associat amb repressió transcripcional (trimetil·lació de les lisines 9 i 27 de la histona H3 i 20 de la histona H4), de manera que conduiria a l'establiment d'un estat activat (figura 1.11.3) (Papp *et al.*, 2006).

1.1.2.7. Models d'herència de l'estat de la cromatina

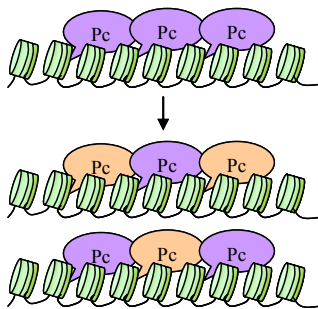
Hem dit que els complexos dels grups Pc i Trx són els encarregats de l'herència dels estats reprimits i activats de la cromatina al llarg de les divisions cel·lulars i del desenvolupament de l'organisme. Els diferents estats de la cromatina es transmeten al llarg de les divisions mitòtiques, però també s'ha descrit que aquests estats activats o reprimits es poden heredar a través de divisions meiótiques. Així doncs, a mosques amb dues còpies transgèniques de l'*iab7PRE* del Complex Bitòrax de *Drosophila melanogaster* insertades al *locus scalloped*, s'ha vist que es manté l'estat desreprimat de la cromatina induït per la presència d'una deleció heterozigòtica de l'*iab7PRE* endogen a les següents generacions, tot i que aquestes tinguin dues còpies de l'*iab7PRE* endogen (Bantignies *et al.*, 2003).

Però com és possible que aquests complexos o les estructures de la cromatina que promouen es mantinguin fins i tot a través de la replicació del DNA? S'han proposat diferents models possibles.

En primer lloc, s'ha pensat que l'herència de les proteïnes dels grups Trx i Pc podria ser semiconservativa, com la de les histones, de manera que en replicar-se el DNA algunes proteïnes anirien a parar a la cadena nova mentre les altres es quedarien a l'original. Els complexos es reestablirien un cop acabada la divisió cel·lular (figura 1.12.a) (Francis *et al.*, 2001).

En un segon model possible, donat que com hem vist els complexos del Pc-G poden conduir modificacions a les cues de les histones, aquestes marques podrien ser les heredables al llarg de la replicació; un cop acabat tot el procés les proteïnes dels grups Pc i Trx podrien

a) Model d'herència semiconservativa de les proteïnes dels grups Pc i Trx



b) Model d'herència de modificacions de les histones capaces de recrutar els complexos de manteniment després de la replicació

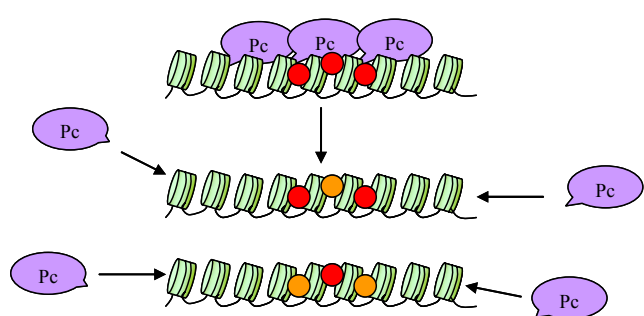


Figura 1.12. Models de manteniment dels complexos del Pc-G i del Trx-G al llarg de les divisions cel·lulars i durant tota la vida de l'organisme (L. Wang *et al.*, 2004).

reconèixer les modificacions i unir-s'hi específicament segons si indiquen que la regió ha de ser activada o reprimida (figura 1.12.b) (L. Wang *et al.*, 2004).

Durant molt de temps s'ha pensat que un cop establerts els patrons d'activació i repressió aquests ja no eren reversibles; no obstant, treballs recents han suggerit que el manteniment d'un o altre estat de la cromatina potser no és tan rígid. En primer lloc, s'ha vist que conduir la transcripció d'un domini silenciats promou un canvi a activat (Sanchez-Elsner *et al.*, 2006); en segon lloc, el patró de localització de les proteïnes del Pc-G Polycomb i Polyhomeotic canvia al llarg del desenvolupament embrionari de *Drosophila*, suggerint que la funció d'aquestes proteïnes en la regulació d'alguns gens pot ser dinàmica (Negre *et al.*, 2006). Finalment, s'ha vist que les proteïnes del Pc-G es troben implicades en el silenciament dels gens de diferenciació a cèl·lules totipotencials, com les *stem cells* embrionàries (ES), però que aquest silenciament pot ser revertit després mitjançant factors de diferenciació i senyals d'especificitat de llinatge cel·lular (Buszczak *et al.*, 2006).

1.2. Implicació de la cromatina en el desenvolupament de *Drosophila*

1.2.1. Els inicis de la segmentació embrionària

Els primers passos de la segmentació embrionària de *Drosophila* es coneixen de fa temps, i depenen de la progressiva metamerització de l'eix antero-posterior de l'organisme en 14 parasegments mitjançant gens materns, gap, pair-rule i de polaritat de segment.

La majoria d'aquests esdeveniments tenen lloc abans de la cel·lularització de l'embrió, a l'estat de sinciti, on els gradients dels factors de transcripció materns (nanos, bicoid...) emanen de l'eix anterior al posterior establint els dominis d'expressió dels gens gap (Lawrence *et al.*, 1996).

Durant la segmentació del tronc, per exemple, els gens gap (*hunchback*, *Krüppel*, *knirps*...) controlen l'expressió primerenca dels gens pair-rule *hairy*, *even-skipped* i *runt*. Diferents enhancers actuen de forma aditiva per a conduir l'expressió alternada d'aquests gens. Els pair-rule primerencs promouen l'expressió d'una segona cascada de pair-rule, entre els que es troben *fushi tarazu* i *paired*, activant amb ells el control de l'expressió dels gens de polaritat de segment (*engrailed*, *wingless* i *hedgehog*) (Peel, 2004).

Els pair-rule també activen l'expressió dels gens homeòtics (*Hox*), que són els responsables del desenvolupament antero-posterior de *Drosophila* i que s'encarreguen d'establir la identitat de cada segment de l'embrió, el control dels quals també es troba influenciat per un grup de gens gap. Conjuntament, els *Hox* i els gens de polaritat de segment, actuen en el control de la diferenciació de cada segment de la futura larva (Sanson, 2001).

1.2.2. Els gens homeòtics

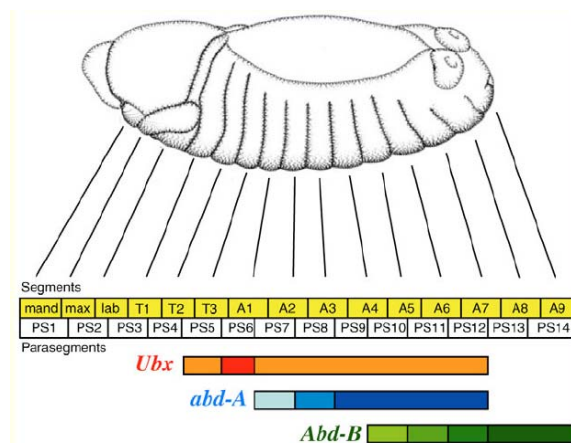
A l'organisme adult, els 14 parasegments embrionaris formen els tres segments del cap, els tres toràcics i els vuit abdominals. Tot i que hi ha un nombre semblant de segments i parasegments, la majoria d'ells es troben desplaçats, especialment al tòrax i a l'abdomen, on un parasegment (PS) comprèn la meitat posterior d'un segment (S) i la meitat anterior del següent (figura 1.13) (Maeda *et al.*, 2006).

Els *Hox* són gens molt conservats i se'n troben homòlegs a la majoria d'invertebrats i a tots els vertebrats formant un únic *cluster* anomenat HOM-C (Beeman, 1987).

A *Drosophila*, els gens *Hox* s'organitzen en dos *clusters*: el Complex Antenapèdia (ANT-C) i el Complex Bitòrax (BX-C) (T. C. Kaufman, R. Lewis and B. Wakimoto, 1980; Lewis, 1978).

El Complex Antenapèdia de *Drosophila* rep el nom del guany de funció observat en el mutant *Antennapedia* (*Antp*), en que les dues antenes se substitueixen per un parell de potes (Denell, 1994). L'ANT-C comprèn els gens encarregats del desenvolupament dels segments que formaran el cap i el tòrax anterior: *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) i *Antennapedia* (*Antp*) (T. C. Kaufman *et al.*, 1990).

Figura 1.13. Relació entre segments i parasegments a l'embrió, i patró d'expressió dels tres gens homeòtics del BX-C. L'*Ubx* s'expressa amb més intensitat al PS6, l'*Abd-A* del PS9 al PS12, i l'*Abd-B* als PS13 i 14 (Maeda *et al.*, 2006).



El Complex Bitòrax controla la identitat dels segments que donaran lloc al tòrax posterior i l'abdomen (Lewis, 1978) i està format per tres gens: l'*Ultrabithorax* (*Ubx*), l'*Abdominal-A* (*Abd-A*) i l'*abdominal-B* (*Abd-B*) (Sanchez-Herrero *et al.*, 1985).

Tots els gens *Hox* tenen un domini comú molt conservat entre ells i amb d'altres espècies: l'homeobox, que és una seqüència de 180 parells de bases (bp) que permet que la proteïna s'uneixi al DNA de forma específica (McGinnis *et al.*, 1984).

Els gens de l'ANT-C (a excepció de *pb*) i del BX-C mostren colinearitat en els seus patrons d'expressió, és a dir, que la seva posició en el cromosoma està relacionada amb el segment on s'expressa. Aquesta correlació entre la posició del gen al cromosoma i la posició relativa on s'expressa també és una característica conservada entre moltes espècies (McGinnis *et al.*, 1992).

L'elevada homologia de seqüència i de colinearitat dels *Hox*, suggereix que són gens imprescindibles per al desenvolupament dels organismes; de la mateixa manera, és imprescindible que la seva regulació sigui precisa i acurada per a determinar la correcta formació de l'adult, fins el punt en que una desregulació del patró d'expressió d'un d'ells provoca la transformació d'un segment de l'organisme en un altre (Lewis, 1978). Per aquest motiu s'ha estudiat àmpliament el complex sistema de regulació d'aquests gens, especialment els del BX-C, en els que nosaltres hem volgut aprofundir.

1.2.3. El Complex Bitòrax

El Complex Bitòrax comprèn més de 300 Kb i està format pels gens *Ubx*, *Abd-A* i *Abd-B* i per les seves regions reguladores. Només un 1,4% del BX-C codifica per a les tres homeoproteïnes (Martin *et al.*, 1995).

Tot i que el BX-C només codifica per a tres proteïnes, es coneixen nou tipus de mutacions que afecten els dos terços posteriors de la mosca. Aquestes mutacions mapen al cromosoma en l'ordre que corresponen als segments de l'organisme en els que actuen (Karch *et al.*, 1985; Lewis, 1978).

Aquesta paradoxa es va resoldre quan es va descriure el patró d'expressió dels tres gens. L'*Ubx*, l'*Abd-A* i l'*Abd-B* s'expressen en diferents intensitats i de forma aditiva al llarg de l'eix antero-posterior de l'embrió, de manera que als segments posteriors s'hi expressen tots tres (tot i que l'*Ultrabithorax* i l'*Abdominal-A* en molt poca quantitat) (figura 1.13) (Beachy *et al.*, 1985; Celniker *et al.*, 1990; Karch *et al.*, 1990; Macias *et al.*, 1990; White *et al.*, 1985)

Es va veure que els tres gens del BX-C estan regulats d'una forma molt acurada mitjançant nou dominis reguladors ordenats de la mateixa manera que els parasegments que controlen (figura 1.14).

Així doncs, els dominis *abx/bx* i *bxd/pbx* són els responsables de l'expressió de l'*Ubx* als PS5 i 6, respectivament (White *et al.*, 1985), els dominis *iab-2* a *iab-4*, controlen l'*Abd-A* als PS7, 8 i 9 (Karch *et al.*, 1990) i, finalment, els dominis *iab-5* a *iab-8,9* regulen l'expressió de l'*Abd-B* als PS10-14 (Celniker *et al.*, 1990). La regulació de l'*Abdominal-B*, que determina la identitat dels segments abdominals A5-A9 de la mosca, és la més complexa del grup, i està

sota el control de quatre dominis que s'extenen més de 100 Kb a 3' i a 5' de l'inici de transcripció (Mihaly *et al.*, 1998).

Les diferents morfologies entre dos segments regulats per un mateix gen vénen donades per diferències espacials i temporals de l'expressió del gen (I. W. Duncan, 2002). D'aquesta manera, els nivells de cada proteïna en cada segment són crucials per a la correcta determinació de la identitat del segment (Galloni *et al.*, 1993).

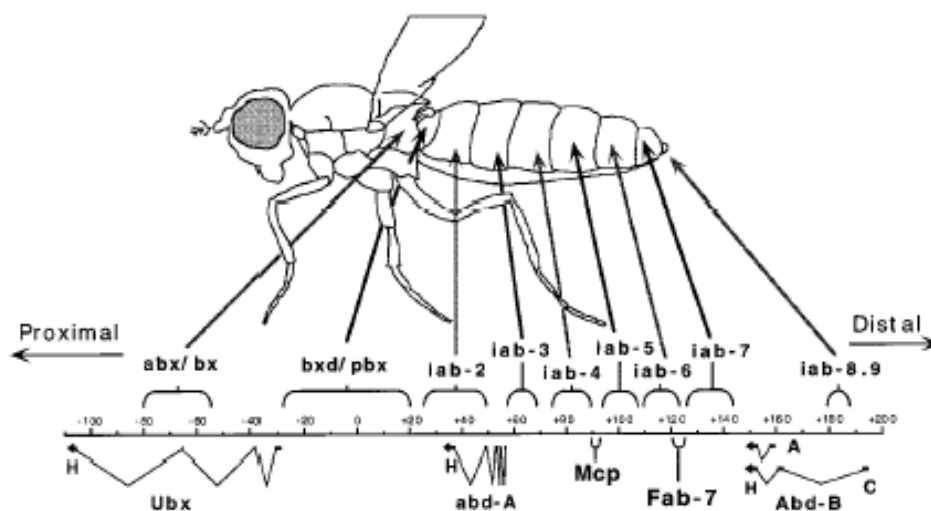


Figura 1.14. Esquema de la regió reguladora del Complex Bitòrax. El BX-C està format per tres gens, l'*Ubx*, l'*Abd-A* i l'*Abd-B*, i pels dominis que els regulen. Les fletxes indiquen el segment regulat per cada domini (Mihaly *et al.*, 1998).

1.2.4. El gen *Abdominal-B*

El locus *Abd-B* codifica per a dues proteïnes que comparteixen l'extrem C-terminal, que inclou l'homeodomini, però difereixen en el seu extrem N-terminal. Com ja hem dit, aquesta proteïna s'expressa en els parasegments 10 a 14, amb concentracions més elevades als parasegments més posteriors (Estrada *et al.*, 2002).

Aquest gradient de concentracions ve determinat pels diferents dominis reguladors que es troben a 3' i a 5' del seu inici de transcripció (figura 1.15). La regió reguladora de l'*Abd-B* està dividida en quatre grans dominis, anomenats infraabdominals (iab), i separats entre ells per unes regions anomenades Frontabdominals (Fab) (Celniker *et al.*, 1990; Karch *et al.*, 1994; Mihaly *et al.*, 1997; Sanchez-Herrero, 1991; Zhou *et al.*, 1999a)

Cada domini regulador iab conté un enhancer (IAB) que modula l'expressió del gen *Abd-B* en els diferents parasegments durant el desenvolupament de *Drosophila*, i es troba separada de l'adjacent mitjançant un element Fab, que evita que l'*Abd-B* s'expressi en un segment sota el control de l'enhancer del domini anterior o del posterior (Maeda *et al.*, 2006).

La regulació gènica del BX-C està dividida en dues fases: iniciació i manteniment. Durant les primeres fases de l'embriogènesis, quan se selecciona la identitat inicial dels segments del cos de l'organisme, els productes dels gens gap i pair-rule se situen sobre les regions reguladores infraabdominals activant-les o reprimint-les depenent del parasegment que hagin d'esdevenir. D'aquesta manera, als primers estadis del desenvolupament, al parasegment 11 les proteïnes activadores se situen sobre l'iab-6, però no sobre l'iab-7, que, en canvi, es troba activat per aquestes proteïnes en el parasegment 12. De la mateixa manera, les proteïnes repressores recobreixen l'iab-7 al PS11 i l'iab-8,9 al PS12 (Mihaly *et al.*, 1998).

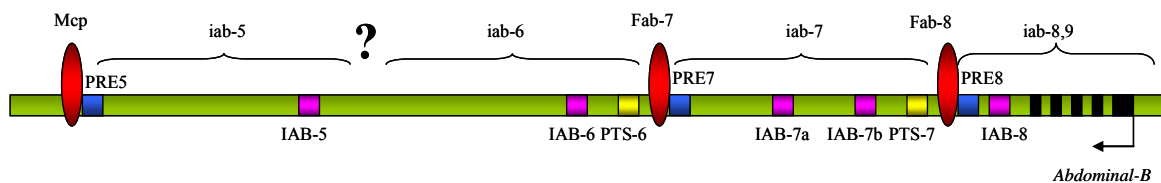


Figura 1.15. Esquema de la regió 3' cis-reguladora de l'*Abd-B* i totes les regions reguladores descrites. Els rectangles negres representen la regió codificant de l'*Abd-B*; els rectangles roses els elements iniciadors; els blaus els elements de manteniment i els grocs els PTS. Els òvals vermells representen els boundaries.

Els productes dels gens gap i pair-rule es localitzen als dominis reguladors del BX-C només transientment, però els patrons d'activació o repressió que estableixen es mantenen al llarg de tot el desenvolupament embrionari. El manteniment de l'estat activat o reprimint dels gens homeòtics en cada segment és imprescindible pel desenvolupament correcte de l'individu. S'ha vist que les proteïnes dels PcG i TrxG són les encarregades d'estabilitzar els patrons d'expressió establerts per les gap i les pair-rule a cada parasegment promovent un estat reprimint o activat dels dominis de cromatina, mitjançant la interacció amb els Elements de Resposta a Polycomb o Trithorax (PREs o TREs). D'aquesta manera, les proteïnes del grup Pc s'establiran a dominis que no han estat activats prèviament, mentre les del grup Trx, se situaran en dominis actius de la cromatina (Busturia *et al.*, 2001; Mihaly *et al.*, 1998; Orlando *et al.*, 1998; Sengupta *et al.*, 2004).

Els elements als quals s'uneixen els productes dels gens *gap* i *pair-rule* s'han anomenat iniciadors, i els que uneixen les proteïnes del Pc-G i del Trx-G (PREs i TREs) s'han anomenat elements de manteniment (Maeda *et al.*, 2006).

1.2.4.1. Els elements iniciadors

Els elements iniciadors són enhancers específics que confereixen un patró d'expressió concret a un gen, en el nostre cas l'*Abdominal-B*, durant el desenvolupament embrionari. Els iniciadors són capaços de llegir la informació que determina l'eix antero-posterior de l'organisme i transmetre-la al promotor (Maeda *et al.*, 2006).

A l'inici del desenvolupament, els productes dels gens *gap* i *pair-rule* se situen a sobre de les regions iniciadores i estableixen un estat activat o reprimat de la cromatina segons el segment que s'ha de desenvolupar, de manera que es promou una expressió gradual de l'*Abd-B*.

Totes les dades disponibles fins el moment semblen indicar que tant el domini *iab-5* com l'*iab-6* es troben regits per un únic iniciador cadascun (l'IAB-5 i l'IAB-6), mentre la situació dels dominis *iab-7* i *iab-8* sembla més complexa, ja que s'han descrit dos elements iniciadors a cadascun (Barges *et al.*, 2000; Busturia *et al.*, 1993; Estrada *et al.*, 2002; Mihaly *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 1999a). Els iniciadors de l'*iab-7* s'han anomenat IAB-7a i IAB-7b, i sembla que promouen nivells d'expressió de l'*Abd-B* al PS12 diferents, ja que en assajos amb gens reporter s'ha vist que els nivells d'expressió promoguts per l'IAB-7a són més alts que els promoguts per l'IAB-7b (Mihaly *et al.*, 2006). Al domini *iab-8* també s'han descrit dos elements iniciadors, un que es troba a la regió 3' *cis*-reguladora del domini, i un altre que es troba *upstream* del promotor de l'*Abd-B*, és a dir a la regió 5' *cis*-reguladora de l'*iab-8* (Estrada *et al.*, 2002).

Delecions de regions iniciadores es manifesten a l'adult mitjançant una pèrdua de funció, i una transformació d'un segment a l'anterior. Per exemple, la deleció d'un fragment de l'*iab-6* que inclou l'iniciador IAB-6 provoca que, al PS11, l'expressió de l'*Abd-B* es trobi sota el control de l'*iab-5*, i això es reflecteix a l'adult amb una transformació del segment abdominal A6 a A5. Tot i que la deleció d'un iniciador elimina completament la funció d'un domini regulador, la presència d'un element iniciador no és suficient per a determinar l'activitat de tot el domini. Així doncs, per exemple, delecions que eliminen fragments de

l'iab-6 però deixen intacte l'IAB-6, provoquen una transformació parcial del PS11 al PS10. D'altra banda, gens reporters situats sota el control d'aquests enhancers, mostren un patró d'expressió específic de parasegment. Així doncs, el gen reporter lacZ sota el control de l'IAB-6 s'expressa, a partir del parasegment 11, a tots els segments posteriors de l'embrió (Mihaly *et al.*, 2006).

Cal remarcar que, tot i que s'havia suggerit que les activitats dels diferents iniciadors eren aditives, l'activitat dels iniciadors anteriors no és necessària per al desenvolupament dels segments més posteriors. Així doncs, delecions que afecten l'IAB-6 no afecten el correcte desenvolupament del PS12, que es forma correctament sota el control de l'IAB-7 (Mihaly *et al.*, 2006).

S'ha descrit un altre tipus d'enhancers als dominis reguladors del BX-C que s'han denominat enhancers específics de teixit o de tipus cel·lular. En assajos amb gens reporters, aquests enhancers s'expressen d'una forma reiterada al llarg de tots els segments de l'embrió, però en el context del BX-C, el patró d'expressió que promouen és específic de teixit o del tipus cel·lular. Aquest efecte pot ser degut a la regulació conjunta d'aquests enhancers amb d'altres elements reguladors del BX-C (Pirrotta *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1993).

1.2.4.2. Els elements de manteniment

A la majoria de casos, quan acaba la fase d'iniciació i les proteïnes productes dels gap i els pair-rule decauen (cap a les sis hores després de la posta), les proteïnes reporter expressades sota el control de l'iniciador perden la seva expressió localitzada, i es poden detectar al llarg de tot l'eix antero-posterior de l'embrió. Aquesta observació suggereix que els elements iniciadors no tenen la capacitat de mantenir el patró d'expressió dels gens que controlen al llarg del temps. Sovint, però, els iniciadors van associats a uns elements que permeten mantenir el patró d'expressió al llarg del desenvolupament embrionari i larvari: els elements de manteniment (Maeda *et al.*, 2006).

Quan l'element de manteniment es troba associat a un element iniciador s'encarrega de mantenir el patró d'expressió específic induït per l'iniciador (Busturia *et al.*, 1997; Hagstrom *et al.*, 1997; Mihaly *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 1993). D'aquesta manera, per exemple, l'iniciador IAB-8 sembla estar associat a un EM que manté l'expressió d'un gen reporter induïda per aquest enhancer fins a estadis tardans del desenvolupament embrionari

(Barges *et al.*, 2000; Mihaly *et al.*, 2006). S'han descrit diversos EMs en tots els dominis reguladors de l'*Abd-B*, i s'ha proposat la possibilitat de que es trobin de forma redundant a cada domini.

Mitjançant assajos amb gens reporter s'ha vist que tant el silenciament com el PSS induïts pels PREs del BX-C no només es veuen alterats per mutacions que afecten les proteïnes dels grups Pc i Trx, sinó que també es veuen alterats quan són mutats els llocs d'unió de les proteïnes Pleihometic i GAGA, suggerint que aquestes proteïnes juguen un paper important en l'activitat dels elements de manteniment (Horard *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2001).

◆ Interacció entre elements de manteniment

Com hem dit, una de les característiques principals dels PREs és que presenten activitat *Pairing-Sensitive Silencing*. A més, però, s'ha observat que còpies transgèniques de PREs del BX-C no només són capaces de contactar amb les còpies homòlogues, sinó que també contacten amb els elements de manteniment endògens. D'aquesta manera, un element *iab7PRE* insertat a prop del *locus scalloped (sd)*, que està involucrat en el desenvolupament de l'ala, no només contacta amb el seu homòleg i promou el silenciament del *locus*, que es detecta fenotípicament per les malformacions a les ales de l'adult, sinó que també contacta amb l'*iab7PRE* endogen, al BX-C. S'ha vist que una deleció en homozigosi de l'*iab7PRE* endogen altera el silenciament promogut per les dues còpies ectòpiques al *locus sd*, de manera que no s'observen les malformacions a les ales, suggerint que es desreprimeix la regió (Bantignies *et al.*, 2003).

L'aparellament entre còpies no homòlogues també s'ha observat a l'*iab5PRE*, que promou la interacció entre còpies ectòpiques no insertades en el mateix *locus*. Aquest PSS depèn de la posició al cromosoma i la seva penetrància és variable. Insercions localitzades al mateix cromosoma mostren PSS amb més freqüència que insercions situades en cromosomes diferents (Vazquez *et al.*, 2006). S'ha observat que l'aparellament pot involucrar fins a quatre elements de manteniment, i que aquests aparellaments depenen també de proteïnes del Pc-G, ja que mutacions del gen *grappa*, gen que codifica per a una proteïna classificada al Pc-G i que catalitza la metil·lació de la lisina 79 de la histona H3 (Shanower *et al.*, 2005), redueixen dràsticament els nivells de PSS (Vazquez *et al.*, 2006).

Fins ara, però, no s'ha observat aparellament entre elements de manteniment diferents, tot i que s'ha suggerit una regulació conjunta de tots els elements de manteniment mitjançant contactes estables a grans distàncies.

El mecanisme pel qual els diferents EMs contacten entre ells encara no es coneix, però s'ha suggerit un model en què els PREs col·localitzarien amb els cossos Pc, que no són estàtics i permetrien l'exploració del territori nuclear i el contacte amb d'altres cossos Pc. Els PREs podrien moure's entre diferents *Pc bodies* i passar d'uns a uns altres que contindrien d'altres PREs, fins a contactar amb el *locus* homòleg, de manera que s'afavoriria l'establiment i el manteniment d'interaccions específiques entre elements de manteniment homòlegs (figura 1.16) (Bantignies *et al.*, 2003).

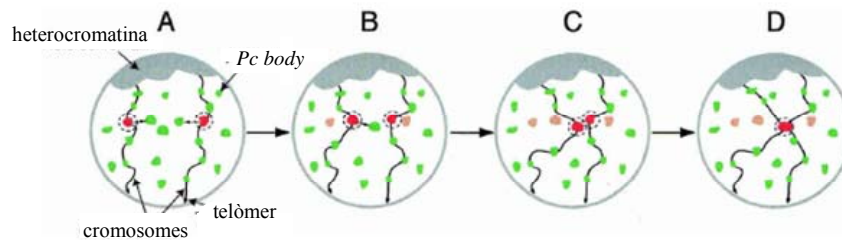


Figura 1.16. Model de contacte entre elements de manteniment. Els PREs recrutarien les proteïnes del Pc-G i s'associarien als *Pc bodies*. Aquestes seqüències es mourien d'un cos Pc a un altre fins que les seqüències homòlogues contactessin (Dejardin *et al.*, 2005; Francis *et al.*, 2001; Narlikar *et al.*, 2002).

Recentment s'ha proposat que el mecanisme d'RNA d'interferència podria estar implicat en el manteniment de les interaccions entre diferents elements *iab7*PRE endògens i ectòpics i els cossos Polycomb. De fet, s'ha vist que diversos components del mecanisme de l'RNAi estan involucrats en el manteniment del silenciament mediat per Pc i en el contacte entre PREs, però no en el recrutament de proteïnes del Pc-G (Grimaud *et al.*, 2006a).

1.2.4.3. Els elements Frontabdominals

Al BX-C s'han descrit diversos PREs que promouen que un determinat domini es trobi en un estat activat o reprimat depenent del segment que hagin de regular. Però els dominis que presenten diferents estats de la cromatina s'han de separar de manera que no solapin les diferents activitats i que es produeixi una correcta expressió dels gens homeòtics. Els elements que permeten que els dominis es comportin de forma aïllada són els elements boundary, que al BX-C s'han anomenat elements Frontabdominals.

Els boundaries són regions de DNA que separen dominis activats i reprimits de cromatina. Aquests elements defineixen els límits de cada regió reguladora i estableixen unitats d'activitat genètica independent mantenint els elements reguladors aïllats de les influències dels dominis adjacents. Els boundaries són la conseqüència natural de la necessitat d'organitzar la cromatina en dominis (Bell *et al.*, 1999).

Els elements boundary són crucials per a la regulació acurada de l'expressió dels gens homeòtics a cada segment durant el desenvolupament (Barges *et al.*, 2000; Belozarov *et al.*, 2003; Mihaly *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1999a). Al BX-C aquests elements boundaries s'han anomenat Frontabdominals (Fab) en contraposició als infraabdominals que separen. S'han descrit tres elements Fab: l'MCP, el Fab-7 i el Fab-8.

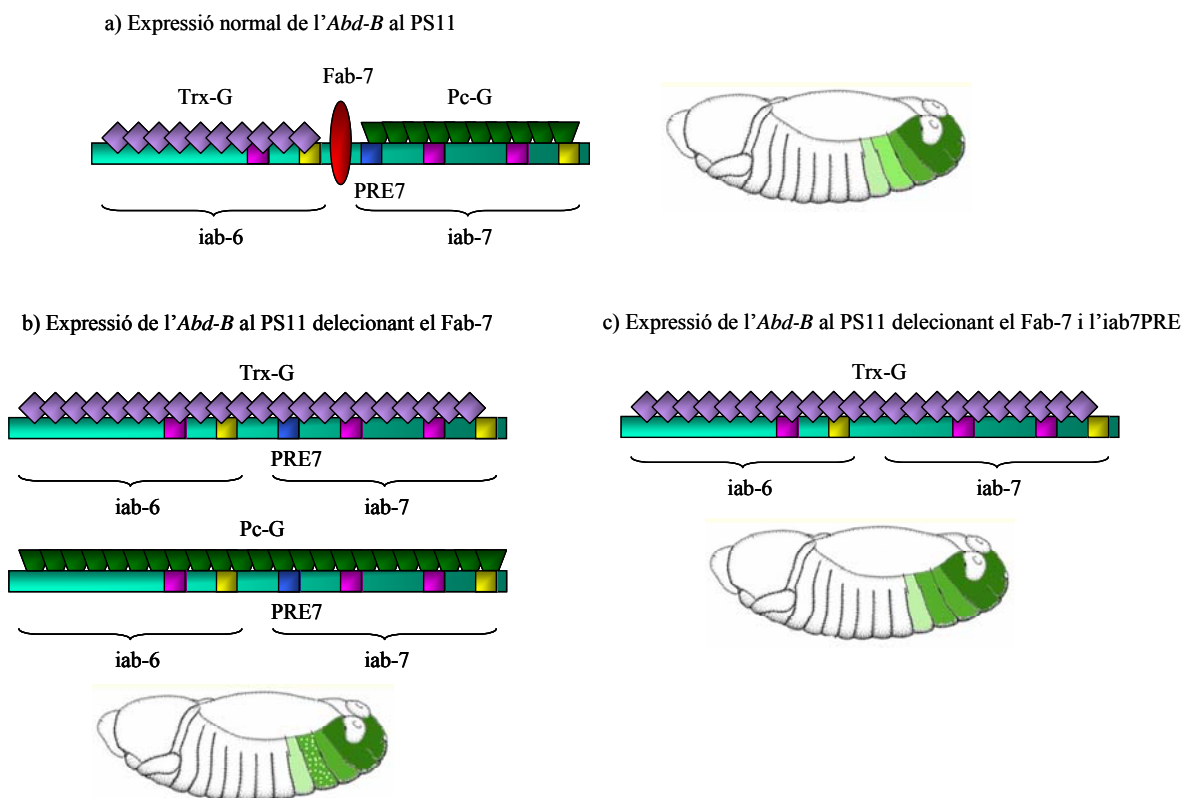


Figura 1.17. a) Expressió del gen *Abd-B* en el PS11 en una mosca salvatge. Les proteïnes dels Trx-G permeten que el domini *iab-6* estigui actiu mentre les del Pc-G reprimeixen el domini *iab-7*. b) Expressió de l'*Abd-B* al PS11 en una mosca que té delectat el boundary Fab-7 del BX-C. En aquest mutant, a la majoria de cèl·lules del PS11 les proteïnes del Trx-G que activen l'*iab-6* s'extenen al llarg de l'*iab-7*, degut a la manca de l'element boundary, i expressen l'*Abd-B* com si fós el PS12; a unes altres, però, els elements repressors recrutats a l'*iab7PRE* s'extenen al llarg dels dominis *iab-7* i *iab-6*, i les cèl·lules pateixen una pèrdua de funció i expressen el gen homeòtic com al PS10. c) Expressió de l'*Abd-B* en una mosca amb una delectió que elimina tant el Fab-7 com l'*iab7PRE*. A les cèl·lules d'aquests mutants les proteïnes del Trx-G que activen l'*iab-6* s'extenen al llarg de l'*iab-7*, però en aquest cas la manca de l'element repressor *iab7PRE* promou que la transformació PS11 a PS12 sigui completa.

Delecions d'aquests boundaries desemboquen en una complexa situació de guany-pèrdua de funció. D'aquesta manera, la deleció del Fab-7 provoca una fusió dels dominis iab-6 i iab-7 i altera l'especificació del PS11; a la majoria de les cèl·lules del PS11 els elements activadors de l'iab-6 activen ectòpicament el domini iab-7. Com a conseqüència, l'expressió de l'*Abd-B* en aquestes cèl·lules es troba conduïda pels elements reguladors del domini iab-7 enlloc dels de l'iab-6 i assumeixen la identitat del PS12. A la resta de les cèl·lules del PS11, els elements negatius de l'iab-7 inactiven inapropiadament l'iab-6 (i l'iab-7), i l'expressió de l'*Abd-B* es troba sota el control del domini iab-5, de manera que les cèl·lules adopten la identitat del PS10 (Mihaly *et al.*, 1997) (figura 1.17, comparar a i b).

Tant l'MCP, com el Fab-7 i el Fab-8 delimiten amb elements PREs. Delecions dels dos elements, boundary i PRE, condueixen a un fenotip de guany de funció; així, per exemple, la deleció del Fab-7 i l'iab7PRE provoca que, al PS11, les proteïnes activadores de l'iab-6 s'extenguin al llarg de l'iab-7 i que l'expressió de l'*Abd-B* es trobi sota el control de l'iab-7, de manera que el PS11 es transformi en PS12 (figura 1.17, comparar a i c) (Karch *et al.*, 1985).

◆ Els boundaries tenen activitat *enhancer-blocking*

Una característica comú a molts boundaries és la seva capacitat d'actuar com a *enhancer-blocking*. El fet que els boundaries presentin aquesta activitat s'ha emprat molt en assajos amb gens reporter, de manera que seqüències amb una possible activitat boundary s'han intercal·lat entre un enhancer i el seu promotor i s'ha testat la seva activitat bloquejadora d'enhancer (Barges *et al.*, 2000; Gruzdeva *et al.*, 2005; Hagstrom *et al.*, 1996; S. E. Schweinsberg *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 1999a; Zhou *et al.*, 1996). L'expressió del gen *miniwhite* sota el control del seu enhancer és molt elevada, i això es tradueix en una pigmentació molt vermella de l'ull (Pirrotta *et al.*, 1985). Intercal·lar un insulador entre ambdós bloqueja el contacte i disminueix molt l'expressió del gen, de manera que la pigmentació de l'ull es troba visiblement reduïda.

Els tres boundaries descrits al BX-C presenten activitat *enhancer-blocking*, de manera que situats entre un enhancer i un promotor bloquegen el contacte entre ells. Així doncs, els boundaries del BX-C no només permeten separar dominis de cromatina, sinó que també eviten que el promotor sigui activat per més d'un enhancer. Sembla, però, que els boundaries

del BX-C presenten característiques especials que no es troben a d'altres elements bloquejadors de *Drosophila*, donat que la substitució del Fab-7 per un element *gypsy* o *scs* no funciona correctament (Hogga *et al.*, 2001).

El mecanisme de funcionament dels boundaries no es coneix, però s'ha vist que el Fab-7 presenta diversos llocs d'unió de la proteïna GAGA i que la mutació puntual d'aquests llocs redueix la freqüència de línies transgèniques que mostren activitat bloquejadora, i enfosqueix el color d'ulls de les línies que sí presenten bloqueig (S. Schweinsberg *et al.*, 2004). S'ha vist que la proteïna GAGA col·localitza amb el Fab-7 a cromosomes politènics (Canudas *et al.*, 2005), que és capaç d'unir-se *in vivo* a aquest element i que la mutació de *trl* n'altera l'activitat *enhancer-blocking* (S. Schweinsberg *et al.*, 2004; Strutt *et al.*, 1997).

L'activitat bloquejadora del Fab-8 es troba mediada, d'altra banda, per la proteïna dCTCF. CTCF és una proteïna amb onze dominis *Zn-finger* molt conservats de *Drosophila* a mamífers. Aquesta proteïna és la responsable de l'activitat bloquejadora d'enhancer a tots els insulators descrits a vertebrats (Ohtsuki *et al.*, 1998). Sembla que dCTCF interacciona *in vivo* i *in vitro* amb el Fab-8, i que mutar els llocs d'unió de dCTCF al Fab-8 aboleix totalment aquesta activitat (Moon *et al.*, 2005).

1.2.4.4. Els elements PTS

Hem dit que els boundaries situats entre un enhancer i un promotor no permeten que s'estableixi el contacte entre ells, però si això és cert, com és possible que els enhancers distals del BX-C (com l'IAB-5) activin el promotor de l'*Abd-B* adequadament si el Fab-7 i el Fab-8 no permeten que contactin? S'ha proposat que això és possible degut a l'existència d'uns elements anomenats *Promoter Targeting Sequences* (PTSs), que permeten que un enhancer eviti el bloqueig de l'insulator.

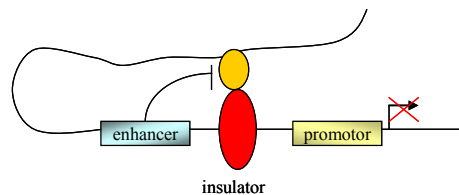
Mitjançant assajos amb gens reporter, s'han descrit dos PTSs al BX-C: un situat a 3' del Fab-8 (PTS7) i un a 3' del Fab-7 (PTS6) (Chen *et al.*, 2005). El PTS7 permet que l'IAB-7 contacti amb l'*Abd-B* sense ésser bloquejat pel Fab-8; el PTS-6 permet que l'IAB-6 contacti amb el promotor ignorant tant el Fab-7 com el Fab-8 (figura 1.18).

Els PTSs permeten que els enhancers del BX-C sobrepassin específicament els seus boundaries, però també insulators heteròlegs com el *gypsy*. Per a que aquesta activitat es doni, però, és necessari que tant el PTS com l'element boundary es trobin entre l'enhancer i el

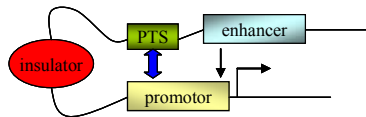
promotor. També s'ha descrit que són capaços de dirigir l'activitat de l'enhancer a un únic promotor (Lin *et al.*, 2003). S'ha vist, que l'activitat PTS a un transgèn és independent de teixit i d'especificitat temporal, i que es manté a totes les cèl·lules somàtiques en absència de l'activació del promotor. Aquesta activitat es manté fins i tot després de translocar el transgèn a un altre cromosoma (Lin *et al.*, 2004).

a) L'insulator no permet el contacte entre l'enhancer i el pomotor

Figura 1.18. S'ha proposat que la funció dels elements PTS seria acostar l'enhancer i el promotor i evitar l'efecte del boundary.



b) L'element PTS permet que les regions reguladores contactin



Totes aquestes observacions semblen suggerir que els elements PTS no només facilitarien les interaccions enhancer-promotor a llargues distàncies, sinó que a més podrien establir una estructura estable entre els dos elements.

No obstant, delecions que eliminen tot l'element PTS no mostren cap efecte fenotípic a l'adult, de manera que s'ha suggerit la presència de múltiples i redundants PTSs a cada domini (Mihaly *et al.*, 2006).

1.2.4.5. Transcripció al llarg del Complex Bitòrax

S'han identificat múltiples RNAs no codificants que es transcriuen al llarg de tot el BX-C. S'ha descrit que aquesta transcripció precedeix l'activació dels gens *Abd-A* i *Abd-B* i que mostra colinearitat, de manera que a cada parasegment es transcriu el domini iab que el regula (Bae *et al.*, 2002). A més, s'ha vist que els RNAs que s'expressen als diferents dominis iab són discrets, i que no s'extenen a través dels elements boundaries que defineixen aquestes regions. Delecions que eliminen l'element MCP, per exemple, aboleixen la transcripció del

domini iab-4, i el parasegment 9 es transforma en PS10 (Drewell *et al.*, 2002). Aquestes dades suggereixen que els RNAs intergènics podrien jugar un paper important en la iniciació de la regulació del BX-C i en la definició dels dominis reguladors a l'inici del desenvolupament.

D'altra banda, també s'ha proposat que la transcripció podria promoure l'activació de dominis reprimits del BX-C (Bender *et al.*, 2002; Hogga *et al.*, 2002; Rank *et al.*, 2002; Schmitt *et al.*, 2005). L'activació de cada domini seria important per a la correcta expressió del gen que regula. S'ha vist que és necessari que un PRE es transcriuï per a que aquest element passi d'un estat reprimat a activat, i que la contínua transcripció a través del PRE evita l'establiment del silenciament degut a proteïnes del Pc-G, com a mínim, fins al final de l'embriogènesi (Schmitt *et al.*, 2005).

El mecanisme pel qual la transcripció dels PREs indueix un estat activat de la cromatina no es coneix, però s'ha suggerit que podria afavorir el recrutament de proteïnes del Trx-G a aquests elements de manteniment. En aquest sentit, s'ha vist que la transcripció de diversos TREs del gen *Ubx* recruta la proteïna del Trx-G Ash1, que és capaç d'unir-se als trànscrits, i que és transportada de forma específica per cada trànscrit a un determinat TRE. La degradació específica dels trànscrits mitjançant siRNAs disminueix el recrutament d'Ash1 i l'expressió del gen *Ubx* (Sanchez-Elsner *et al.*, 2006).

Recentment, però, s'ha suggerit que la transcripció de determinades regions reguladores del gen homeòtic *Ultrabithorax* podria estar implicada en la repressió, enlloc de l'activació gènica. De fet, s'ha vist que el complex TAC1 és recrutat a la regió codificant de l'*Ubx* a cèl·lules en que aquest gen és transcrit, mentre és recrutat a l'element PRE BXD en cèl·lules on el gen es troba reprimat, suggerint que la transcripció promoguda pel recrutament de TAC1 al PRE indueix un estat reprimat del gen (Petruk *et al.*, 2006).

1.2.4.6. L'*Abd-B* és regulat per dominis independents a cada segment

El fet que els elements descrits siguin presents a cada domini regulador de l'*Abd-B* suggereix que cada domini controla autònomament l'expressió del gen a cada parasegment. D'aquesta manera, cada domini de l'*Abd-B* seria una regió modular formada per tots els elements necessaris per a la correcta expressió del gen a un determinat parasegment (Mihaly *et al.*, 2006).

S'ha proposat un model en què el centre funcional del domini seria l'iniciador, que determinaria si els productes dels gens *gap* i *pair-rule* que s'hi localitzen són els adequats per a l'activitat del domini. Si la localització d'aquestes proteïnes és correcta, l'iniciador envia un senyal a la resta del domini per a activar els enhancers específics de teixit. Aquest senyal deu ser anterior al senyal de silenciament que promourien els PREs, i podria ser degut a la transcripció dels dominis reguladors. Trobant-se els elements de manteniment en un estat activat, els enhancers són lliures d'activar l'expressió de l'*Abd-B*. Si les proteïnes que recobreixen el domini no són les adequades, llavors les proteïnes del Pc-G silencien tota la regió. Entre totes aquestes situacions, els boundaries són els encarregats de que els senyals no passin d'un segment a un altre i de que els dominis es mantinguin de forma independent (Mihaly *et al.*, 2006).

2. OBJECTIUS

En aquest treball ens vam proposar els següents objectius:

-Estudiar l'estructura de la cromatina i analitzar la seva implicació en la regulació del Complex Bitòrax de *Drosophila melanogaster* i caracteritzar noves regions reguladores en aquest complex homeòtic

-Analitzar la implicació de les proteïnes dSAP18 i GAGA en la regulació de l'estructura de la cromatina del BX-C i en el funcionament dels diferents elements reguladors

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Materials

3.1.1. Reactius i enzims

La majoria de productes que hem utilitzat en la realització dels experiments són de qualitat analítica i provenen de les cases comercials Merck, Fluka i Sigma. Els enzims que hem fet servir són de Fermentas, Roche, Promega, Gibco, Biolabs i Biotools

3.1.2. Soques bacterianes

Per a la manipulació de DNA plasmídic hem utilitzat sempre cèl·lules competents d'*Escherichia coli* DH5 α (deoR endA1 gyrA96 hsdR17 (rk⁻mk⁺)recA1 relA1 supE44 thi-1 F'[traD36 proAB⁺ lac1^q lacZ Δ M15]).

3.1.3. Plasmidis buits emprats

1. pBluescript SK (+/-) (Stratagene)
2. pTOPO·TA (Invitrogen)
3. pCaSpeR4 (Dr. Pirrotta)

3.1.4. Plasmidis generats

◆ **pTOPO·TA/AbdBP.** Vam amplificar un fragment de 320 bp amb els oligos AbdBU i AbdBL i el vam purificar i clonar a un pTOPO·TA.

◆ **pTOPO·TA/bxdPRE.** Vam amplificar un fragment de 2 Kb amb els *primers* bxdPREU i bxdPREL i el vam clonar a un pTOPO·TA.

◆ **pTOPO·TA/EnhW.** Vam amplificar un fragment de 2 Kb amb els *primers* EnhWU i WL i el vam clonar al pTOPO·TA.

◆ **pTOPO·TA/iab6.** Vam amplificar un fragment de 3,8 Kb corresponent a la regió entre el 94.300 i el 98.100 del BX-C (entre els dominis iab-5 i iab-6) amb els *primers* iab6CU i iab6CL, i vam clonar el fragment a un pTOPO·TA.

◆ **pTOPO·TA/IAB6.** Vam amplificar un fragment de 600 bp amb els oligos IAB6U i IAB6L i el vam clonar al pTOPO·TA.

◆ **pTOPO·TA/MCP.** Amb els oligos MCPmU i MCP_{ECO} vam amplificar un fragment de 2,5 Kb i el vam clonar al pTOPO·TA.

◆ **pBS/iab7.** Es van clonar les regions reguladores que es localitzen entre els dominis iab-6 i iab-7 del Complex Bitòrax de *Drosophila melanogaster* a partir del clon DS04698 del genoma de *D. melanogaster*, que abarca tota la regió del gen *Abdominal-B*. Es va tallar el clon amb *HindIII* (que correspon a la regió del 82.552-86.164 del BX-C de *Drosophila*) i es va clonar a un pBSK digerit *HindIII* i desfosforil·lat.

◆ **pBS/B+P7.** Conté la regió descrita com a *boundary Fab7* i el PRE7. Va ser generat tallant el pBS/iab7 amb *PstI* i relligant-lo.

◆ **pBS/Fab-7.** Es correspon a la regió del *boundary Fab7*, i es va generar digerint el pBS/B+P7 amb *ApaI* i relligant el plasmidi.

◆ **pBS/lambda.** Es va clonar la banda de 2,3 Kb del marcador III de Fermentas (marcador de pes molecular de DNA generat a base de fragments del fag lambda digerit amb *HindIII*) i es va clonar al pBSK digerit amb *HindIII* i desfosforil·lat.

◆ **pBS/iab6.** Vam digerir el pTOPO·TA/iab6 amb *EcoRI* i vam clonar el fragment d'1,7 Kb al pBS digerit amb *EcoRI* i desfosforil·lat.

◆ **pCaSpeR4/EnhW.** Vam digerir el pTOPO·TA/EnhW amb *EcoRV* i vam purificar el fragment d'1,7 Kb, i el vam clonar al pCaSpeR4 digerit amb *StuI* i desfosforil·lat.

◆ **pCaSpeR4/EnhW/B+P7.** Vam purificar el fragment de 2,3 Kb obtingut en digerir el plasmidi pBS/B+P7 amb *KpnI/SacII* i el vam clonar al pCaSpeR4/EnhW digerit *KpnI/SacII*.

◆ **pCaSpeR4/EnhW/Fab-7.** Vam digerir el pBS/Fab-7 amb *SmaI/NotI* i vam clonar el fragment d'1,2 Kb purificat en el pCaSpeR/EnhW tallat *KpnI/roms* i *NotI*.

◆ **pCaSpeR4/EnhW/iab6HS.** Vam digerir el pBSK/iab6 amb *SacII* i vam clonar el fragment d'1,7 Kb al pCaSpeR/EnhW digerit amb *SacII* i desfosforil·lat.

◆ **pCaSpeR4/EnhW/iab6HS1.** Vam digerir el pTOPO·TA/iab6 amb *HindIII/roms* i *ScaI*, i vam clonar el fragment de 900 bp al pCaSpeR4/EnhW digerit amb *NotI/roms* i desfosforilat.

◆ **pCaSpeR4/EnhW/iab6HS2.** El pBS/iab6 va ser digerit *XbaI/roms* i *ScaI* i es va purificar el fragment de 900 bp, que va ser clonat al pCaSpeR4/EnhW digerit *NotI/roms*.

◆ **pCaSpeR4/EnhW/iab63^{HS}**. Es va digerir el pTOPO·TA/iab6 amb *XbaI/BclI*; vam purificar el fragment de 900 bp i el vam clonar al pCaSpeR/EnhW digerit *KpnI*/roms.

◆ **pCaSpeR4/EnhW/lambda**. Es va digerir el pBS/lamda amb *KpnI/SacII* i es va clonar el fragment de 2,3 Kb al pCaSpeR4/EnhW digerit amb *KpnI/SacII*.

3.1.5. Oligonucleòtids

Oligo	Seqüència	Experiments per als que s'ha fet servir
98L	5' CTG ATA AGG TTC CTC GAT TGC 3'	Sonda
98U	5' AAA TAT GAG TGA TGA CCC TCG 3'	Sonda i 3C
AbdBL	5' GTC CTC GAC GAA GTT GCA G 3'	Clonatges i 3C
AbdBU	5' CTC TCT TCC AAG TCA CAC G 3'	Clonatges
actinL	5' TCT GGC ACC ACA CCT TCT ACA ATG 3'	RT-PCRs
actinU	5' GCT CTG GCG GGG CAA TGA T 3'	RT-PCRs
bxdPREL	5' GTT AGA GAG AGT CCC AAG CGA GAG 3'	Clonatges
bxdPREU	5' CTT TGC CGC CAT TCT TTC TG 3'	Clonatges i 3C
EnhWU	5' AAG TCA ACC CAG ACC AAC C 3'	Clonatges
Fab7L	5' TCA AGC TGT GTG GCG GGG 3'	ChIPs
Fab7U	5' TTG CGG TGG TGT GCG TGC 3'	ChIPs
Fab8L	5' TGA ATG CTG TTT TGG AAT GC 3'	ChIPs i 3C
Fab8U	5' CAG ACA TCT TCC GTT CAT CC 3'	ChIPs i 3C
hspTATAU	5' GAG GCG CTT CGT CTA CGG 3'	Sonda
iab6CL	5' TCC ACA TTT TCA GAG TCA CG 3'	Clonatges
iab6CU	5' CCA GCT AAA GTC AGT CAC G 3'	Clonatges
iab6HSL	5' ATC TAC TGG GTG TGC GAG G 3'	ChIPs
iab6HSU	5' ATT CAA ATT CCG TTA GGT GC 3'	ChIPs
IAB6L	5' TTT TGT TTT CCG AAG ATT GG 3'	Sonda i clonatges
IAB6U	5' AGA TAG CCT CCG ACG TTC C 3'	Sonda, clonatges i 3C
LACZL	5' GAC GGG ATC GCG CTT GAG 3'	Sonda
MCP _{ECO}	5' CCT CTATGC TTC CTC CTC G 3'	Clonatges i 3C
MCPmL	5' ACA ACC CAC CAG AGG ACG 3'	ChIPs
MCPmU	5' TGC ATT CTC ATT TTC CCG C 3'	Clonatges i ChIPs
PRE7L	5' TTC GGT CGC TCA CGT CGC 3'	ChIPs
PRE7U	5' GTC GGC AAT TCG GAT TCC C 3'	ChIPs
RT-AbdBL	5' GGT TGT GGT TGC TGC TCG 3'	RT-PCRs
RT-AbdBU	5' GGC ACA TCG ACG TCC AGC 3'	RT-PCRs
Sap5'	5' GTG CGA TAG GAT TGC TGC 3'	ChIPs
SapM	5' GTT GGG GTA CAC GCA AGC 3'	ChIPs
WL	5' GTG AAA GGG GAC GAA TGG G 3'	Clonatges

Taula 3.1. Oligonucleòtids utilitzats en aquest treball. S'indica la seqüència i els experiments en què s'ha fet servir.

En aquest treball s'han utilitzat oligonucleòtids sintetitzats per SIGMA. A la taula 3.1 es fa una relació de tots els oligonucleòtids emprats i dels experiments en què s'han utilitzat.

3.1.6. Anticossos específics

En aquest treball s'han fet servir diferents anticossos per als assajos d'immunoprecipitació de cromatina i de Western Blot. A la taula 3.2 s'indiquen tots els anticossos específics utilitzats així com la seva procedència.

	Anticòs	Característiques	Fabricant	Referència
anticossos primaris	GAGA	Anticòs policlonal de conill. Reconeix les dues isoformes de GAGA (581 i 519) i les variants postraduccionals	generat al laboratori	
	dSAP18	Anticòs policlonal de conill. Reconeix la proteïna SAP18 de <i>Drosophila</i>	generat al laboratori	
	Acetil-H3	Anticòs policlonal de conill. Reconeix la histona H3 acetil·lada als residus K9 i K14	Upstate	06-599
	Acetil-H4	Anticòs policlonal de conill. Reconeix la histona H4 acetil·lada als residus K5, K8, K12 i K16	Upstate	06-866
	TrimetilH3K27	Anticòs policlonal de conill. Reconeix el residu K27 de la histona H3 trimetil·lat	Upstate	07-449
	Tubulina	Anticòs policlonal de ratolí. Reconeix la cadena B de la tubulina	Chemicon International	MAB3408
	Actina	Anticòs policlonal de ratolí. Reconeix les cinc isoformes de l'actina de <i>Drosophila</i>	SIGMA	A2547
anticossos secundaris	anti-rabbit	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill, i està conjugat a la peroxidasa	Amersham	NA934
	anti-mouse	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de ratolí, i està conjugat a la peroxidasa	Jackson	715-035-150

Taula 3.2. Anticossos utilitzats als assajos de CHIP i de Western Blot.

3.1.7. Cèl·lules eucariotes

En els experiments que hem realitzat hem emprat cèl·lules S2 de *Drosophila melanogaster*, que són derivades de teixits embrionaris de *Drosophila*. Aquestes cèl·lules són d'aspecte esfèric i creixen tant enganxades a la superfície del recipient en que es troben com en suspensió.

3.1.8. Stocks de mosques

3.1.8.1. Cromosomes balancejadors i marcadors

Els balancejadors són cromosomes que presenten un elevat nombre de reordenacions que impedeixen que es produeixi recombinació. Normalment, els balancejadors contenen algun marcador que presenta un fenotip particular i que permet que siguin identificats respecte el cromosoma salvatge. D'altra banda, també disposem de marcadors que no s'associen a un cromosoma balancejat. Tots aquests marcadors s'utilitzen per al manteniment d'*stocks* de mosques així com per al mapatge de transgens.

A la taula 3.3 s'indiquen els diferents balancejadors i marcadors utilitzats al llarg d'aquest treball.

Balancejador	Cromosoma	Reorganitzacions	Marcador associat	Fenotip
CyO	II	In(2LR)O, Cy ¹ dp ^{wt} pr ¹ cn ²	Cy	Ales curvades
TM3	III	In(3LR)TM3, y ^r ry sb ser Su(Hw) ² bx ^{34e} e	Sb i Ser	Quetes toràciques curtes i ales retallades
TM6B	III	In(3LR)TM6B, P{ }, Antp ^{tsu} e ¹ Tb ¹	Hu i Tb	Quetes a les espatlles i larves arrodonides

Marcador	Cromosoma	Fenotip
Irregular face	II	Ull petit i rugós
Lyra	III	Ales tallades pels marges

Taula 3.3. Balancejadors i marcadors genètics de *Drosophila* utilitzats en aquest treball.

3.1.8.2. Soques de *Drosophila melanogaster* utilitzades

En aquest treball s'han utilitzat també diferents soques de *Drosophila melanogaster*. A la taula 3.5 s'indiquen els diferents *stocks* utilitzats, així com les característiques que presenten i la seva procedència (la majoria d'*stocks* provenen de l'*Stock Center* de Bloomington).

Stock	Cromosoma	Característiques	Referència
<i>white</i>	X	<i>Wild type</i> . Té una mutació al gen <i>white</i> que elimina tota la proteïna. Ulls blancs.	w ¹¹¹⁸
w ¹ :1f/CyO; Ly/TM3	doble balancejat	Presenta balancejadors i marcadors als cromosomes II i III sobre un fons <i>white</i> .	B-4911
w ¹ :1f/CyO; MKRS/TM6B	doble balancejat	Presenta balancejadors i marcadors als cromosomes II i III sobre un fons <i>white</i> .	B-3703
<i>Pc³</i>	III	Mutació al gen que codifica per a Polycomb. Només és viable en heterozigosi.	B-3677
<i>pl410</i>	X	Mutació al gen que codifica per a Polyhomeotic.	B-5813
<i>P^{sc}</i>	II	Mutació al gen que codifica per a Posterior Sex Combs. Només és viable en heterozigosi.	B-5547
<i>brm2</i>	III	Mutació al gen que codifica per a Brahma. Només és viable en heterozigosi.	B-3619
<i>tr⁶⁷</i>	III	Conté una mutació al gen que codifica per GAGA. Només és viable en heterozigosi.	Farkas <i>et al.</i> , 1994
<i>Df(3R)abd⁴⁵</i>	III	Deficiència que cobreix tota la regió de dSAP18. Només es pot mantenir en heterozigosi.	B-3678
<i>bin1</i>	III	Salt d'un element P que es trobava inserat a la regió de dSAP18. Només es pot mantenir en heterozigosi.	Singh <i>et al.</i> , 2005
nulloGAL4	II	Proteïna GAL4 sota el control del promotor nul·lo.	Kunwar <i>et al.</i> , 2003
daughterlessGAL4	III	Proteïna GAL4 sota el control del promotor <i>daughterless</i> .	B-8641
actinaGAL4	II	Proteïna GAL4 sota el control del promotor actina.	B-4414
69BGAL4	III	Proteïna GAL4 sota el control de la regió 69B.	B-1774
heat-shockGAL4	III	Proteïna GAL4 sota el control del promotor <i>heat-shock</i> .	B-1799
tubulinaGAL80	II/III	Proteïna GAL80 sota el control del promotor tubulina.	McGuire <i>et al.</i> , 2004
5F24	X	Conté els gens reporter β -galactosidasa i <i>white</i> sota el control del Fab-7 i l'iab7PRE; es troba inserat a prop del gen <i>scalloped</i> .	Zink <i>et al.</i> , 1995
lambda	X/II/III	Conté un fragment de 2,3 Kb del fag lambda entre l'enhancer i el promotor del <i>miniwhite</i> .	
B+P7	X/II/III	Conté el Fab-7 i l'iab7PRE entre l'enhancer i el promotor del <i>miniwhite</i> .	
Fab-7	X/II/III	Conté el Fab-7 entre l'enhancer i el promotor del <i>miniwhite</i> .	
iab6HS	X/II/III	Conté les dues hipersensibilitats del 96500 del BX-C entre l'enhancer i el promotor del <i>miniwhite</i> .	
iab6HS1	X/II/III	Conté la hipersensibilitat 1 de l'iab6PRE entre l'enhancer i el promotor del <i>miniwhite</i> .	
iab6HS2	X/II/III	Conté la hipersensibilitat 2 de l'iab6PRE entre l'enhancer i el promotor del <i>miniwhite</i> .	
iab63'HS	X/II/III	Conté un fragment de 900 bp que se situa a 3' de l'iab6PRE entre l'enhancer i el promotor del <i>miniwhite</i> .	
UAS-RNAiGAGA	II/III	Expressa l'RNAi de GAGA sota el control d'uns llocs d'unió a GAL4.	generades al laboratori per a la realització d'aquest treball

Taula 3.5. Stocks de mosques emprats al llarg d'aquest treball. S'hi indiquen el cromosoma, les característiques principals i la procedència.

3.2. Mètodes

3.2.1. Tècniques de manipulació de DNA plasmídic

3.2.1.1. Tècniques de DNA recombinant

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

3.2.1.2. Transformació de cèl·lules competents

Incubar les cèl·lules amb 5 µL de la lligació durant 20 minuts en gel. Fer un xoc tèrmic dos minuts a 42°C a un bany. Recuperar les cèl·lules en 400 µL de medi LB sense antibiòtic durant 10 minuts (temps que triguen les cèl·lules en sintetitzar l'antibiòtic). A la flama, plaquejar la transformació en plaques d'LB amb antibiòtic. Deixar tota la nit a una estufa a 37°C.

LB (Luria-Bertrani Broth)

10 g/L triptona
5 g/L extracte de llevat
10 g/L NaCl
1 mM NaOH

3.2.1.3. Extracció de DNA plasmídic pel mètode de la lisi alcalina ràpida

Inocular 4 mL de medi LB amb antibiòtic amb una colònia aïllada. Deixar créixer tota la nit a 37°C. Passar 1,5 mL de cultiu a un eppendorf i centrifugar a 9000 rpm a una centrífuga eppendorf durant 1 minut. Treure el sobrenedant amb pipeta Pasteur i resuspendre en 100 µL de GTE vortexant. Afegir 200 µL de solució 0,2 N NaOH 1% SDS, invertir dos o tres cops i deixar en gel durant 5 minuts. Afegir 150 µL d'acetat sòdic 3 M, agitar i desar en gel 5 minuts més. Centrifugar 5 minuts a 14000 rpm i passar el sobrenedant a un eppendorf nou. Afegir 450 µL de fenol/cloroform, vortexar i centrifugar 2 minuts a 14000 rpm.

Recuperar la fase aquosa (superior) i afegir-hi 1 mL d'etanol 100% fred. Invertir 2 ó 3 cops i centrifugar 5 minuts a 14000 rpm. Treure el sobrenedant i rentar el pellet amb 300 µL d'etanol fred al 70%. Centrifugar 3 minuts a 14000 rpm, descartar el sobrenedant i deixar eixugar el pellet a 37°C.

Resuspendre el pellet en 50 µL de TE amb 1µg de RNasaA. Digerir l'RNA amb RNasaA durant 15 minuts a 37°C.

TE	GTE
10 mM Tris HCl pH 8.0 1 mM EDTA	50 mM glucosa 10 mM EDTA 25 mM Tris HCl pH 8.0

3.2.1.4. Maxipreparació de DNA plasmídic

Inocular 500 mL de medi LB amb antibiòtic amb un precultiu de dia de la soca transformada amb el plasmidi que es vol amplificar. Incubar tota la nit en agitació a una cambra de 37°C. Al matí, recollir en pots de 250 mL i centrifugar en una centrífuga Beckman a 4500 rpm. Descartar el medi i procedir a l'extracció i purificació del DNA plasmídic segons instruccions de Nucleobond®.

Deixar assecar el pellet de DNA i resuspendre'l en 500 µL d'aigua o de TE. Per a conèixer la concentració del DNA, fem una dil·lució 1/100 de la mostra llegim i l'absorvència a 260 nm en un espectrofotòmetre UV-1603 (Shimadzu); obtenim la [DNA] segons la següent relació:

$$[\text{DNA}] \text{ mg/mL} = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times 5.$$

Es comproben la integritat i la puresa del DNA carregant 200 ng de la mostra amb tampó de càrrega Orange G a un gel 1% agarosa i 1xTBE.

TBE (10x)	Orange G
90 mM Tris base 24 mM EDTA 0,8 M àcid bòric	50% glicerol 20 mM EDTA Orange G (una punta d'espàtula)

3.2.2. Manteniment de cultius cel·lulars

3.2.2.1. Manteniment de cultius cel·lulars

Les cèl·lules de mosca es mantenen en medi Schneider (*Schneider's insect Medium*, de Sigma) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (FBS, GIBCO) i un 1% de Penicil·lina/Streptomicina. Es mantenen a un densitat de 10^6 cèl·lules/mL, a l'estufa de 25°C. Dos cops per setmana, es passa 1 mL de cèl·lules (no cal tripsinitzar-les) a un flascó Corning de 25 cm² amb 4,5 mL de medi nou.

3.2.2.2. Descongelació de cèl·lules

Treure un criotub amb cèl·lules del N₂ líquid i descongelar amb les mans molt de pressa. Passar les cèl·lules amb pipeta Pasteur a un falcon de 15 mL amb 5 mL de medi. Centrifugar 2 minuts a 1500 rpm i fer un segon rentat amb medi. Passar les cèl·lules a un flascó de cultiu de 25 cm² i incubar a l'estufa de 25°C.

3.2.2.3. Congelació de cèl·lules

D'un flascó de 25 cm², recollim les cèl·lules i les centrifuguem a un falcon de 15 mL. Descartem el sobrenadant i recuperem les cèl·lules en FBS. Passem $1,5 \cdot 10^7$ cèl·lules a un criotub i hi afegim 100 µL de DMSO (Dimetilsulfòxid) gota a gota. Ràpidament congelem les cèl·lules i les deixem dues hores a -20°C. Passem el criotub al congelador de -80°C i el deixem tota la nit. Finalment, podem guardar-lo a N₂ líquid.

3.2.2.4. Comptatge de cèl·lules

Lès cèl·lules es recullen en un falcon i es posen 10 µL a cada camp de la cambra de Neubauer. Es compten com més camps millor i es fa un promig. Per conèixer la concentració de cèl·lules es multiplica el nombre de cèl·lules d'un camp (16 quadrats) per 10^4 . S'obté, d'aquesta manera, el nombre de cèl·lules per mL de medi.

3.2.3. Tècniques d'anàlisi genètic de *Drosophila*

Les mosques utilitzades en aquest treball s'han crescut a 18°C, 25°C i 30°C en cambres climàtiques. En la manipulació i el creixement de les mosques s'han seguit les tècniques descrites per Sullivan, Ashburner i Hawley (Sullivan *et al.*, 2000). Les línies transgèniques generades al llarg d'aquest treball s'han realitzat amb el suport tècnic d'Esther Fuentes Díaz.

Per a l'anàlisi fenotípic de les mosques, s'han congelat els individus 1 hora a -20°C i s'han realitzat fotografies dels ulls i dels abdòmens amb una lupa Leica MZ16F.

3.2.4. Tècniques d'anàlisi de DNA

3.2.4.1. Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La tècnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permet amplificar regions de DNA a partir de mostres de DNA genòmic o plasmídic. Aquesta tècnica consisteix en un procés cíclic de desnaturalització del DNA i d'amplificació de les dues cadenes resultants, de manera que en cada cicle d'amplificació el nombre de cadenes de DNA es multiplica per dos.

Aquesta reacció en cadena és possible gràcies al descobriment de les polimerases termoestables (són les encarregades de la replicació del DNA d'organismes adaptats a altes temperatures, com la bactèria *Thermus aquaticus*). Aquestes polimerases mostren una activitat òptima a elevades temperatures, característica imprescindible per assegurar l'especificitat de la reacció.

Per a que l'amplificació tingui lloc, cal que uns encebadors (*primers* o oligos) s'uneixin als extrems de la seqüència que es vol amplificar, de manera que cada oligo és complementari a una de les cadenes de DNA. Per a que aquests encebadors s'uneixin de forma específica a la seva seqüència complementària de la mostra, es realitza un *annealing* a una temperatura elevada, de manera que s'eviten les unions inespecífiques. Un cop els oligos s'han unit a la seva seqüència complementària, la polimerasa pot començar el procés d'amplificació, que és ATP i Mg²⁺ dependent, afegint desoxiribonucleòtids a l'extrem 3' de

l'encebador. Aquest procés es produeix de forma cíclica gràcies a un aparell termociclador, que condueix canvis molt ràpids de la temperatura de la mostra.

A la taula 3.6 es detallen els reactius i el procés d'una reacció de PCR estàndard.

Reactius	Cicles	
2 ng DNA	2' 95°C	
tampó de la reacció (1x)	30 x {	
MgCl ₂ 2,5 mM		1' 95°C ← desnaturalització
dNTPs 0,4 mM		1' 55°C ← <i>annealing</i>
<i>primers</i> 0,5 pmol/μL	1' 72°C ← amplificació	
DNA polimerasa 0,05 U/μL	10' 72°C	

Taula 3.6. Reacció de PCR en unes condicions estàndard.

3.2.4.2. Southern Blot

El Southern Blot és una tècnica que permet identificar fragments específics de DNA en una mostra heterogènia (per exemple, DNA genòmic). La tècnica del Southern es fonamenta en la separació dels diferents fragments de DNA segons el seu pes molecular mitjançant electroforesis en gel d'agarosa, i en la transferència de les mostres a una membrana, que s'hibrida de forma específica amb una sonda marcada radiactivament i homòloga als fragments que volem identificar.

◆ Electroforesi i transferència

Així doncs, en primer lloc, la mostra s'ha de córrer en un gel d'agarosa per a que els fragments de DNA se separin segons el seu pes molecular. En segon lloc, transferim el gel amb les mostres a una membrana de nylon (Hybond-N+ d'Amersham) mitjançant el mètode de capil·laritat. A la figura 3.1 es troba detallat un esquema del montatge de la transferència del Southern Blot per capil·laritat.

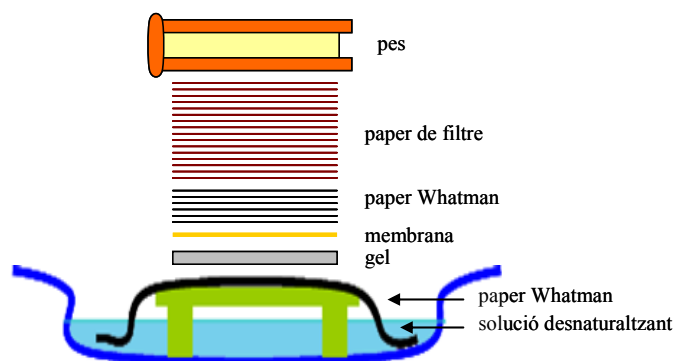


Figura 3.1. Esquema de la transferència de DNA per capil·laritat.

Per a fer la transferència, primer s'incuba el gel durant 10' amb solució desnaturalitzant en agitació. S'omple una safata amb solució desnaturalitzant i es mullen dos papers 3MM, que hauran d'estar en contacte contínuament amb la solució i el gel (es posen a sobre d'una superfície que permeti que les puntes del paper contactin amb la solució desnaturalitzant per a que no s'assequi mai, i el gel es posa a sobre, contactant totalment amb els papers mullats). La membrana es mulla primer amb aigua ultrapura i després en solució desnaturalitzant, i es col·loca sobre el gel, assegurant-nos de que no quedin bombolles. A sobre de la membrana es col·loquen dos papers 3MM mullats i quatre de secs, i a sobre uns 100 fulls de paper de filtre. Es tapa tota la transferència amb paper de film per a evitar que s'evapori la solució i es posa un pes a la part superior. Es deixa tota la nit transferint.

Al matí següent, la membrana es marca per darrera amb un llapis, s'incuba 5' en solució neutralitzant i es mulla en 2xSSC; s'asseca amb paper de filtre i es crosslinka 1' a un UV Stratalinker. La membrana es guarda entre dos papers de filtre a temperatura ambient per a evitar que s'humitegi fins que s'hibridi.

solució desnaturalitzant	solució neutralitzant	SSC 10x
0,5 M NaOH 1,5 M NaCl	0,5 M Tris HCl pH 8.0 1,5 M NaCl	43,75 g NaCl 22 g Citrat Sòdic Volum final 500 mL

◆ Prehibridació de la membrana i marcatge de la sonda

Abans d'hibridar la membrana, aquesta s'ha de prehibridar amb la mateixa solució. La solució d'hibridació s'ha de prescalfar a 65°C (temperatura a la que es fa la hibridació).

Un cop escalfada, la membrana es posa en un *roller* amb la superfície per on s'ha transferit el DNA cap a l'interior. A la membrana se li efegeixen 20 mL de solució d'hibridació amb 200 μ L d'ssDNA (DNA d'esperma de salmó: serveix per a bloquejar la mostra i s'ha de desnaturalitzar 5' a 95°C i 2' en gel abans d'afegir-lo). S'incuba 30 minuts a 65°C donant voltes.

Mentre la membrana prehibrida, es realitza el marcatge de la sonda (que ha d'haver estat obtinguda prèviament per amplificació per PCR o mitjançant digestions de DNAs plasmídics). La quantitat de sonda òptima està entre 50-200 ng de DNA. El marcatge es realitza amb el kit d'amplificació *Ready-To-Go* d'Amersham. La sonda s'ha de desnaturalitzar 5' a 95°C i 2' en gel. S'afegeix aigua fins a un volum final de 46 μ L, i s'afegeix una boleta del kit (inclou el tampó de la reacció, la polimerasa i dATP, dTTP i dGTP). S'afegeixen 4 μ L de dCTP marcat radiactivament (Redivue α^{32} P-dCTP 10 mCi/mL d'Amersham) i s'incuba 30' a 37°C en un bany. La sonda es purifica per columneta (MicroSpin S-300 HR d'Amersham).

solució d'hibridació

7% SDS
0,25 M fosfat sòdic pH 7.2
1 mM EDTA pH 8.0

◆ Hibridació de la membrana, rentats i revelat

Abans de la hibridació, es desnaturalitzen la sonda i l'ssDNA 5' a 95°C i 2' en gel. A un falcon posem 20 mL de solució d'hibridació i 200 μ L de ssDNA desnaturalitzat. Treiem la solució de prehibridació i afegim la solució d'hibridació al *roller*. Afegim al final la sonda marcada i incubem tota la nit donant voltes a 65°C.

Al dia següent, la sonda es recull en falcons de 50 mL i es guarda a -20°C per si s'ha de tornar a utilitzar. Fem cinc rentats de 10 minuts amb solució de rentat prescalfada a 65°C.

Per a l'exposició, la membrana es posa a sobre d'un contrafilm i s'embolica amb paper de film. S'exposa a una pantalla de Phosphorimager activada 15' durant tota una nit (aquesta pantalla reconeix el senyal emès per la sonda i el captura). Al dia següent, s'escaneja la pantalla en un Molecular Dynamics amb el programa Typhoon Scanner Control.

solució de rentat

20 mM fosfat sòdic pH 7.2
1% SDS
1 mM EDTA

3.2.4.3. Immunoprecipitació de cromatina (ChIP)

La tècnica de ChIP permet analitzar si una determinada proteïna es localitza sobre una regió de DNA concreta, ja sigui mitjançant una interacció directa o indirecta amb el DNA. Aquesta tècnica es fonamenta en la fixació de les estructures cel·lulars mitjançant un tractament amb formaldehid, de manera que les interaccions proteïna-proteïna i proteïna-DNA es fixen mitjançant la formació d'enllaços covalents (figura 3.2). Aquesta cromatina crosslinkada se sonica per a obtenir fragments més petits i fàcils d'immunoprecipitar (al voltant de 500 bp); s'ha vist que la relació entre el crosslinking i la sonicació és crítica en els assajos de ChIP.

Un cop obtingut l'extracte, la mostra s'immunoprecipita amb anticossos específics que reconeguin la proteïna que es vol analitzar, de manera que precipiten també les proteïnes i el DNA que hi interaccionen. Els anticossos units a proteïna i DNA se separen de la resta de cromatina mitjançant la seva afinitat per la proteïna A, que es troba unida a una reïna de sefarosa. Al final de l'assaig, s'elueix la mostra i s'obté un *pool* de cromatina en què les regions de DNA que interaccionen directa o indirectament amb la nostra proteïna es troben enriquides respecte la resta. Finalment, aquest enriquiment és detectat mitjançant amplificació per PCR.

En aquest treball hem realitzat ChIPs a partir d'embrions i de larves de *Drosophila melanogaster*, i hem analitzat tant la localització del factor de transcripció GAGA com el patró de modificacions de les histones H3 i H4. Donat que la interacció que presenten aquestes proteïnes amb el DNA és molt diferent hem hagut d'utilitzar protocols diferents per al seu estudi.

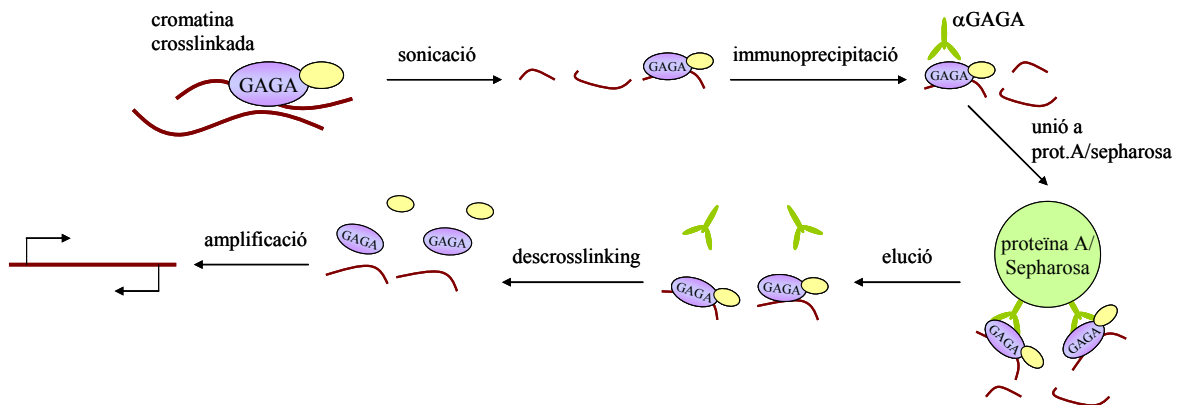


Figura 3.2. Procés seguit en els assajos d'immunoprecipitació de cromatina.

◆ Obtenció de cromatina crosslinkada per a l'anàlisi de les modificacions de les histones

Per a realitzar els ChIPs amb els anticòssos de les histones hem posat a punt un protocol en que crosslinkem directament els nuclis cel·lulars, enlloc de les cèl·lules senceres, de manera que eliminem soroll de fons en el procés. Això és possible degut a que les histones es troben fortament unides al DNA, i no es veuen alterades en realitzar tractaments agresius abans de la fixació. Donat que hem realitzat ChIPs a partir d'embrions i de larves de mosca, hem utilitzat diferents protocols a l'hora d'extreure els nuclis.

a) Extracció de nuclis a partir d'embrions de *Drosophila*

Partim de 300 μ L d'embrions decorionats que rentem dos cops amb PBS-tritó 0,1%. Es renten dos cops amb Tris HCl pH 7.5 10 mM i es resuspenen en 4 mL de buffer ENB. Passem els embrions a un Dounce i disgreguem la mostra amb 15 moviments de l'èmbol L (deixa un espai molt gran entre l'èmbol i l'homogeneitzador). Es filtra la mostra a través de dues gases i se centrifuga 5' a 5000 rpm. Es resuspenen els nuclis en 973 μ L de buffer TS.

PBS	buffer ENB	buffer TS
125 mM NaCl	10% sacarosa	15 mM Tris pH 7.5
16 mM Na ₂ HPO ₄	10 mM Tris HCl pH 8.0	60 mM KCl
8,4 mM NaH ₂ PO ₄	1 mM CaCl ₂	2 mM EDTA
pH 7.3	0,1 mM PMSF	1 mM DTT

b) Extracció de nuclis a partir de larves en estadi III de *Drosophila*

Partim de 50 o 60 larves congelades a -20°C . Es resuspenen les larves en 3 mL de buffer A⁻ i es passen a un Dounce. Es disgreguen un primer cop homogeneitzant 10 cops amb l'èmbol L. Es filtra la mostra per dues gases, s'afegeixen 3 mL més de buffer A⁻ al Dounce i es passa 5 cops més l'èmbol L. Es filtra el segon extracte per les gases i s'ajunten els dos extractes. Se'ls afegeix 1 mL de buffer AS i se centrifuga 5' a 1500 g.

Es resuspèn el pellet en 3 mL de tampó A⁻ i es torna a passar al Dounce. Es passa 5 cops per l'èmbol S (deixa un espai petit entre l'èmbol i el Dounce) i es torna a afegir 1 mL d'AS. Se centrifuga i es torna a repetir aquest procés però homogeneitzant 10 cops amb l'èmbol S. Finalment, els nuclis es resuspenen en 973 μL de buffer TS.

buffer A⁻	buffer AS
60 mM KCl	60 mM KCl
15 mM NaCl	15 mM NaCl
13 mM EDTA	1 mM EDTA
0,1 mM EGTA	0,1 mM EGTA
15 mM Tris HCl pH 7.5	15 mM Tris HCl pH 7.5
0,15 mM espermina	0,15 mM espermina
0,5 mM espermidina	0,5 mM espermidina
0,5 mM DTT	0,5 mM DTT
0,5 % NP40	0,3 M sacarosa

Un cop s'han extret els nuclis, el protocol de crosslinking i sonicació és el mateix per a totes dues mostres.

S'afegeix formaldehid a una concentració final de l'1% i s'incuba 30' a la roda a 4°C . Se centrifuga 5' a 5000 rpm i es renten els nuclis amb 1 mL de glicina 0,125 M durant 10' a 4°C (la glicina inactiva les restes de formaldehid). Es tornen a centrifugar i es resuspenen en 350 μL de buffer TS. Se soniquen els nuclis 3 cops durant 10'' a una amplitud del 30% d'un sonicador Branson. Se centrifuguen els extractes 30' a 14000 rpm a 4°C i s'utilitzen 100 μL de l'extracte per cada immunoprecipitació. Es passa cada mostra a buffer IP en un volum final d'1 mL.

buffer IP

1 % tritó
150 mM NaCl
2 mM EDTA
20 mM Tris HCl pH 8.0
PMSF 2 µL/mL
Aprotinina 2 µL/mL
Leupeptina 1 µL/mL

◆ Obtenció de la cromatina crosslinkada per a l'anàlisi de GAGA

Aquest protocol de crosslinking és recomanable quan es volen analitzar factors de transcripció que s'uneixen directa o indirectament al DNA, però que poden saltar si el tractament de la mostra abans de la fixació és molt agressiu (com l'extracció de nuclis que es fa en el protocol anterior). D'aquesta manera, tots els contactes proteïna-proteïna i proteïna-DNA que es produeixen al nucli són fixats i poden ser detectats.

Per a realitzar ChIPs amb l'anticòs de GAGA partim de 50 µL d'embrions 0-24h decorionats (amb lleixiu). Els embrions es renten amb PBS-Tritó 0,1% i es recullen en un eppendorf de 2 mL. Es renten dos cops amb PBS-Tritó 0,01% deixant sedimentar. Es crosslinken els embrions al mateix eppendorf amb 0,3 mL de solució de crosslinking i 0,9 mL d'heptà (permeabilitza la membrana dels embrions i permet l'entrada del formaldehid) i s'agiten vigorosament durant 15 minuts a temperatura ambient.

Per a eliminar el tampó i l'heptà se centrifuga la mostra 30 segons a 9000 rpm i es renten els embrions en PBS-Tritó 0,01%/0,125 glicina 10' a la roda. Es fan dos rentats amb buffer I i buffer II deixant sedimentar els embrions i es resuspenen en 700 µL de buffer de lisi. Se sonica quatre cops durant 30 segons al 35% d'amplitud d'un sonicador Branson, amb descansos de 30". Un cop acabada la sonicació se centrifuga la mostra 30 minuts a 14000 rpm a 4°C i es passa el sobrenedant a un tub nou.

Per a cada immunoprecipitació es fan servir 100 µL d'aquest extracte, que es passen a buffer RIPA en un volum final d'1 mL.

tampó de crosslinking	buffer I	buffer II
20 µL formaldehid 37% 15 µL Hepes 1M pH 7.9 0,6 µL EDTA 0,5M 0,5 µL EGTA 0,5M 7,5 µL NaCl 4M 256,4 µL H ₂ O	0,25% tritó 10 mM EDTA 0,5 mM EGTA 10 mM Hepes pH 6.5	200 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 10 mM Hepes pH 6.5
buffer lisi	buffer RIPa	
1% SDS 50 mM Tris pH 8.0 10 mM EDTA PMSF 2 µL/mL Aprotinina 2 µL/mL Leupeptina 1 µL/mL	490 µL de TE 100 µL Tritó 10% 100 µL Na deoxycholate 10% 100 µL SDS 1% 100 µL NaCl 1,4 M 50 µL Tris HCl pH 8.0 0,1 M 50 µL EDTA 10 mM 10 µL PMSF 100 mM Volum final: 1 mL	

◆ Immunoprecipitació, purificació i anàlisi del ChIP

Abans de realitzar la immunoprecipitació és aconsellable fer un preentat de la mostra, afegint a cada tub 2 µg ssDNA desnaturalitzat, 1 µg d'anticòs preimmune i 30 µL proteïnaA-sefarosa i incubant 1h en agitació a 4°C. Se centrifuguen les mostres 2' a 3000 rpm i es passen els sobrenedants a tubs nous. S'afegeixen els anticossos corresponents (aproximadament 1 µg d'anticòs) i s'incuba tota la nit a 4°C. Com a control negatiu nosaltres sempre immunoprecipitem una mostra sense anticòs, de manera que tot el que baixa és soroll de fons.

Al matí següent s'afegeixen 2 µg ssDNA i 60 µL protA-sefarosa i s'incuba 2,5h a 4°C en agitació. En aquest punt, la protA segresta els anticossos que hi ha a l'extracte, molts dels quals estaran units a la seva proteïna que, a la vegada, estarà unida a d'altres proteïnes i/o al DNA. Així doncs, cal fer una sèrie de rentats per a eliminar les proteïnes i DNA que no s'hi hagin unit. En primer lloc, doncs, se centrifuguen les mostres 2' a 3000 rpm i es descarta el sobrenedant i el pellet es renta amb 1mL de TSE 1 durant 10 minuts a 4°C. Se centrifuguen les mostres i es fa un segon rentat amb 1mL de TSE 2 durant 10 minuts. Es realitza un tercer rentat de 10' a 4°C amb buffer III. Finalment, es fan 3 rentats amb TE (es pot fer a T^a ambient).

El DNA s'elueix de les boletes de sefarsa mitjançant un tampó ric en detergent i en sal i vortexant. Així doncs, cada mostra s'elueix 3 cops amb 100 µL de buffer d'elució i amb 1 minut de vòrtex. S'ajunten les tres elucions i es posen a descrosslinkar 6 hores a 65°C. S'ha de tenir en compte que també s'han de descrosslinkar 10 µL (un 10%) d'extracte crosslinkat, sonicat i centrifugat, ja que aquesta és la mostra que s'utilitzarà com a input de les PCRs (control de l'extracció de DNA i de la PCR).

Un cop descrosslinkades, les mostres es purifiquen per columneta mitjançant un kit de purificació de DNA de gel i de PCR d'Amersham (segons protocol adjunt) i s'elueixen en 50 µL d'H₂O. El ChIP es comproba mitjançant amplificació de les regions enriquides per PCR; per a les PCRs, nosaltres fem dil·lucions 1/5 i 1/25 tant de l'input com de les mostres immunoprecipitades, i les realitzem amb 2 µL de cada dil·lució en un volum final de 25 µL.

TSE1	TSE2	buffer III	buffer d'elució
2 mM EDTA	2 mM EDTA	0,25 M LiCl	1% SDS
0,1% SDS	0,1% SDS	1% NP40	0,1 M NaHCO ₃
1% tritó	1% tritó	1% Deoxycholate sòdic	
150 mM NaCl	500 mM NaCl	1 mM EDTA	
20 mM Tris pH 8.0	20 mM Tris pH 8.0	10 mM Tris pH 8.0	

3.2.4.4. Hipersensibilitats a DNasaI

L'assaig d'hipersensibilitat a DNasaI ens permet identificar regions en què els nucleosomes presenten un posicionament preferencial, és a dir, que es localitzen sobre determinades regions mentre en deixen d'altres lliures. Aquesta tècnica es fonamenta en que la DNasaI (endodesoxiribonucleasa) és capaç de digerir el DNA que no es troba protegit pels nucleosomes; digestions parcials de la nucleasa permetran l'obtenció de fragments de diferents tamanys, que correran formant un *smear* en un gel d'agarosa, i que podran ser visualitzats mitjançant la hibridació amb sondes marcades radiactivament (figura 3.3).

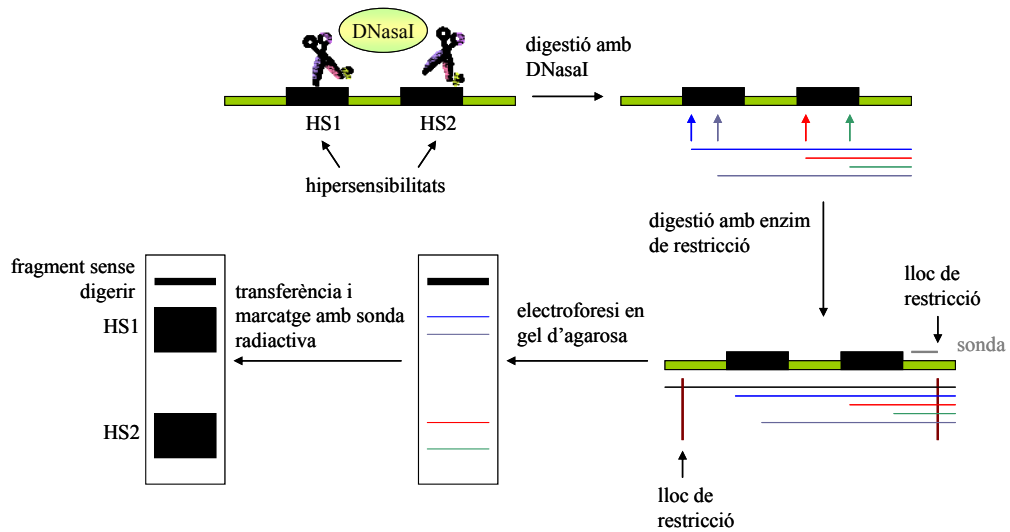


Figura 3.3. Representació de l'assaig d'hipersensibilitats a DNasaI. El fet que les mostres es digereixin amb un enzim de restricció després de la DNasaI permet que s'obtinguin fragments d'un tamany definit, de manera que tots els fragments digerits parcialment fan tamanyos similars en ésser separats pel seu pes molecular.

◆ Extracció de nuclis i digestió amb DNasaI

Els assajos de DNasaI també han estat realitzats a partir d'embrions i de larves en estadi III, de manera que també s'han utilitzat protocols diferents en cada cas.

a) Assaig de DNasaI a partir d'embrions

Partim de 200 μL d'embrions decorionats i rentats amb PBS-tritó 0,1%. Fem una extracció de nuclis (veure apartat 3.2.4.3: ChIPs a partir d'embrions per a immunoprecipitar histones) i els rentem amb 1 mL de buffer ENB. Els centrifuguem 5' a 5000 rpm i els resuspenem en 1,9 mL de buffer DNasaI. Fem 7 alíquotes de 250 μL d'extracte de nuclis i afegim la DNasaI (prèviament dil·luïda en buffer DNasaI). Afegim concentracions creixents de la nucleasa: 0U, 0'03U, 0'1U, 0'3U, 1U, 3U i 10U, fem un vòrtex lleuger i incubem cada mostra 3' en gel. Aturem la reacció amb 5 μL d'EDTA 0,5 M (captura els bivalents i inhibeix les nucleases).

buffer DNasaI

60 mM KCl
 15 mM NaCl
 15 mM Tris HCl pH 7.5
 3 mM MgCl₂
 0,05 mM CaCl₂
 0,5 mM DTT
 0,25 M sacarosa

b) Assaig de DNasaI a partir de larves en estadi III

Partim de 140 larves en estadi III congelades a -20°C. Fem una extracció de nuclis (veure apartat 3.2.4.3: ChIPs a partir de larves per a immunoprecipitar histones) i rentem els nuclis amb 1 mL de buffer TDK. Es resuspenen en 1,9 mL de buffer DNasaI i s'afegeixen diferents quantitats de la nucleasa: 0U, 0'5U, 1U, 2U, 5U, 10U i 20U. S'incuben les mostres 3' en gel i s'atura la reacció amb 5 µL d'EDTA 0,5M.

buffer TDK

60 mM KCl
 15 mM Tris HCl pH 7.5
 0,5 mM DTT

♦ **Extracció de DNA, digestió amb enzims de restricció i Southern Blot**

Un cop acabat l'assaig DNasaI, realitzem l'extracció de DNA: afegim a cada mostra 10 µL d'SDS 10% i 2 µL de proteïnasa K 20 mg/mL i les incubem durant 3 hores a 50°C. Es purifica el DNA mitjançant dues extraccions amb fenol:cloroform i una amb cloroform, i es precipita amb Acetat Sòdic 0'3M, acrilamida com a *carrier* i 3 volums d'etanol fred. Es fan dos rentats amb etanol al 70% i es resuspèn el pellet en 50 µL d'aigua.

Es digereix cada mostra amb l'enzim de restricció corresponent durant 1 hora a 37°C; s'afegeixen 20 µg d'RNasaA i s'incuba 30' més. Es torna a precipitar el DNA i es carrega en un gel 1xTBE i 0,7-1% agarosa.

Un cop corregut, es transfereix el gel a una membrana de nylon, que hibridem amb una sonda específica de la nostra regió. Revelem l'assaig amb el Phosphorimager (veure apartat 3.2.4.2).

3.2.4.5. *Chromosome Conformation Capture*

La tècnica del *Chromosome Conformation Capture* (3C) va ser desenvolupada per Dekker i col·laboradors (Dekker *et al.*, 2002) i permet determinar si fragments que es troben molt lluny a la seqüència es troben molt a prop en el context del nucli cel·lular (veure apartat 4.4.4.1 dels resultats).

Per a l'assaig de 3C cal fer una mostra crosslinkada i una sense crosslinkar (control negatiu o de lligació aleatòria). Nosaltres hem fet servir el mateix protocol que van desenvolupar Dekker *et al.* però amb algunes variacions.

Així doncs, donat que la mostra no crosslinkada és més susceptible a la manipulació i es perd al llarg del procés, partim de dos cops i mig més de cèl·lules que per a la mostra crosslinkada. Partim d'aproximadament $6 \cdot 10^6$ cèl·lules per a les mostres crosslinkades i d' $1,5 \cdot 10^7$ cèl·lules per a les mostres no crosslinkades. Centrifuguem 2' a 1500 rpm i resuspenem les cèl·lules en 4,5 mL de PBS. Es crosslinka una de les mostres amb un 1% final de formaldehid, i s'incuben 10 minuts a 4°C en agitació.

Parem el crosslinking afegint glicina a concentració final 0,125M i incubant 10' a 4°C. Se centrifuguen les cèl·lules i es resuspenen en 1 mL de solució hipotònica. S'incuben en gel 10'. A partir d'aquest punt les mostres sempre han d'estar en gel. La lisis es completa mitjançant disrupció mecànica amb un Dounce i 10 homogeneitzacions amb l'èmbol S. Se centrifuguen els nuclis 5' a 5000 rpm i es renten amb 0,4 mL del buffer 1x de l'enzim de restricció corresponent (en el nostre cas hem fet servir l'enzim *EcoRI* amb el buffer de Fermentas). Es passen els nuclis a un eppendorf de 0,5 mL i es tornen a centrifugar.

Es resuspenen en 160 µL del buffer de restricció i s'afegeix SDS a concentració final 0,2 %. S'incuben els nuclis 30' a 37°C amb agitació i s'afegeix Tritó X-100 a concentració final 1% (per a segrestar l'SDS). S'incuben 30' més a 37°C amb agitació. Es digereix cada mostra amb 160 U de l'enzim de restricció ON a 37°C (*EcoRI*).

Al dia següent s'atura la reacció afegint SDS a concentració final 2% i incubant 30' a 65°C. La mostra es dil·lueix en 8 mL de buffer de reacció de lligació i s'afegeixen 100U de T4 DNA lligasa. S'incuba la lligació 4,5 hores a 18°C i 30' a temperatura ambient. Per a descrosslinkar s'afegeix a cada mostra 100 µg de proteïna K i s'incuba ON a 65°C.

Al matí següent, s'afegeixen 50 µg d'RNAsaA i s'incuben les mostres 30' a 37°C. S'extreu la mostra 2 cops amb fenol:cloroform, 1 cop amb cloroform i es precipita (en còrex)

amb 3 volums d'etanol, acrilamidaa i NaAc. Es fan dos rentats amb EtOH 70% (un de 5 mL en còrex i un d'1 mL en eppendorf) i es resuspèn la mostra en 100 µL de TE (1x).

A la mostra sense crosslinkar se li ha d'afegir una mescla de fragments de DNA lligats que corresponguin a les bandes que es volen amplificar després per PCR. D'aquesta manera es comproba l'eficiència de l'amplificació en cada cas, per a evitar falsos negatius i positius.

Es comproba el resultat de l'assaig mitjançant PCR utilitzant oligos que es troben molt lluny a la seqüència, de manera que només amplifiquin si s'ha produït la lligació entre fragments molt allunyats en la seqüència però a prop en el nucli cel·lular.

solució hipotònica	tampó de lligació
10 mM Tris HCl pH 8.0	1% Tritó
10 mM NaCl	50 mM Tris HCl pH 7.5
0,2 % NP40	10 mM MgCl ₂
PMSF 2 µL/mL	10 mM DTT
Aprotinina 2 µL/mL	0,1 mg/mL BSA
Leupeptina 1 µL/mL	1 mM ATP
	100 U T4 DNA lligasa

3.2.5. Tècniques d'anàlisi d'RNA

3.2.5.1. Extracció d'RNA

Les extraccions d'RNA d'embrions utilitzades en aquest treball van ser realitzades per l'Elisabet Costa Cros a partir d'embrions *white* de *Drosophila* i mitjançant el kit d'extracció RNeasy Mini Kit de Qiagen®.

Els extractes d'RNA de cèl·lules S2 han estat realitzats mitjançant el kit UltraspecTMRNA, de Biotecx. Partim de $4\text{-}5 \cdot 10^7$ cèl·lules, que centrifuguem i resuspenem en 1,5 mL d'Ultraspec. Es pipeteja diversos cops per a afavorir la lisi i es deixen les mostres 5' en gel per a completar la dissociació dels complexos nucleoprotèics.

En aquest punt es poden guardar a -70°C . Per a seguir amb l'extracció, afegim 0,2 volums de cloroform i fem vòrtex durant 15". Tornem a deixar les mostres 5' en gel i les centrifuguem 10' a 14000 rpm en fred.

Després de la centrifugació s'observen dues fases a la mostra: una fase orgànica (inferior), en què hi ha el DNA i les proteïnes, i una fase aquosa (superior), en què hi ha

l'RNA. Així doncs, passem la fase aquosa a un eppendorf nou amb molt de compte de no arrastrar interfase (on també hi ha DNA).

S'afegeix un volum d'isopropanol i s'incuben les mostres 10' més en gel. Se centrifuguen 20' a 14000 rpm en fred. Es renta el pellet amb 1 mL d'etanol 70% fred i se centrifuga 10' a 14000 rpm. Es descarta el sobrenedant i es deixa assecar el pellet. Es resuspèn en 50 µL d'aigua ultrapura. Es poden deixar les mostres 10' a 65°C per a facilitar la solubilització.

Per a conèixer la concentració de l'RNA, fem una dil·lució 1/100 de la mostra i llegim l'absorvència a 260 nm a l'espectofotòmetre; obtenim la [RNA] segons la següent relació:

$$[\text{RNA}] \text{ mg/mL} = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times 4.$$

3.2.5.2. RT-PCRs

Tots els assajos d'RT-PCR que es mostren en aquest treball han estat duts a terme mitjançant el Kit OneStep RT-PCR de Qiagen®.

La tècnica d'RT-PCR permet realitzar amplificacions d'RNAs específics. Per a que això pugui tenir lloc, cal que l'RNA sigui retrotranscrit a cDNA, que després serà amplificat per PCR convencional. Aquesta retrotranscripció és duta a terme per una DNapolimerasa/RNAdependent: la retrotranscriptasa o transcriptasa reversa, que utilitza la cadena d'RNA com a motlle per a generar una cadena complementària de DNA.

Per a que la transcriptasa reversa pugui afegir dNTPs, cal que hi hagi uns encebadors units a la cadena d'RNA que es vol amplificar. Per a les RTs, s'utilitzen diferents tipus d'encebadors o *primers*: l'oligo-dT, que és un *primer* format només per residus timina i que s'uneix a tots els RNAs que presenten una cua poliA, o *primers* específics que s'uneixen a l'RNA que es vol amplificar. En aquest treball hem utilitzat sempre oligonucleòtids que hibriden específicament amb l'RNA que es vol analitzar.

D'altra banda, l'enzim que hem utilitzat en els nostres assajos d'RT-PCR presenta una funció dual: per una banda, mostra l'activitat retrotranscriptasa, i per l'altra, presenta una activitat DNapolimerasa/DNAdependent (DNA polimerasa convencional). Aquestes dues activitats no són solapants, de manera que quan l'enzim actua com a transcriptasa reversa, no ho fa com a DNapolimerasa, i quan actua com a DNapolimerasa, no presenta activitat

retrotranscriptasa. La temperatura òptima de retrotranscripció és de 50°C, i és aconsellable mantenir les mostres en gel fins el moment de començar la RT, per a evitar *annealings* i amplifcacions inespecífics. La retrotranscriptasa s'inactiva durant 15' a 95°C, moment en què s'activa la DNAPolimerasa/DNAdependent.

Finalment, en els assajos realitzats, sempre s'han utilitzat quantitats creixents d'RNA (de 0,05 ng a 5 ng d'RNA pels extractes embrionaris i de 5 a 500 ng pels extractes cel·lulars) i s'ha realitzat un control de contaminació de DNA genòmic (en que no s'amplifica per RT, sinó que només s'amplifica per PCR).

A la figura 3.4, es mostren les condicions en les que s'han realitzat els experiments.

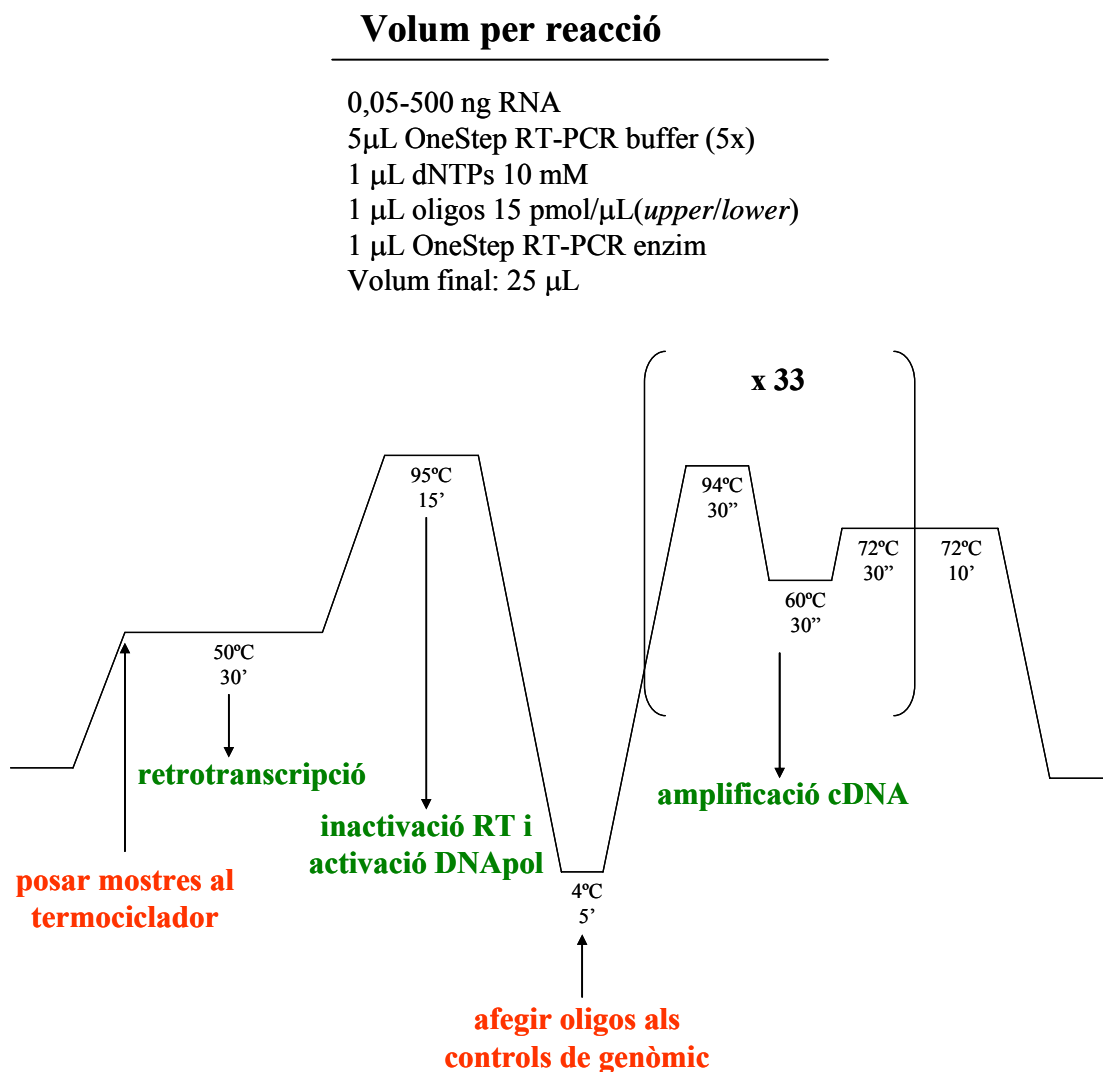


Figura 3.4. A dalt, reactius de la reacció d'RT-PCR. A baix, temperatures i cicles de les RTs realitzades en aquest treball.

3.2.6. Tècniques d'anàlisi de proteïnes

3.2.6.1. Extracció de proteïnes d'embrions i larves de *Drosophila*

Per a fer extraccions de proteïnes partim de 50 µL d'embrions o de 6 larves en estadi III. Afegim a la mostra 300 µL de PLB amb 2-mercaptoetanol 1,5 M final i la disgreguem amb l'ajut d'un homogenitzador per a eppendorf. S'escalfa la mostra 45'' a 95°C i es fa un pols de centrifuga. Es torna a homogenitzar i es repeteix tot el procés tres cops. Se centrifuga la mostra 3' a 14000 rpm i se separa la meitat de l'extracte. L'altre meitat es torna a homogenitzar seguint el mateix procés d'abans 3-4 cops. S'ajunten els dos extractes i es torna a centrifugar 3' a 14000 rpm. Es recupera el sobrenedant, i se sonica 5' al 30% d'amplitud d'un sonicador Branson.

PLB (5x)

0,125 M Tris pH 6.8
22% glicerol
5% SDS
blau de bromofenol (punta d'espàtula)

3.2.6.2. Electroforesi en gel d'acrilamida (SDS-PAGE)

L'electroforesi en gel d'acrilamida s'utilitza per a separar proteïnes segons el seu pes molecular. Aquesta separació es realitza en condicions desnaturalitzants amb SDS i a través d'una matriu de poliacrilamida (PAGE) segons el mètode que va descriure Laemmli (Laemmli, 1970).

Aquests gels es componen de dues parts: una part apil·ladora i una part separadora. En aquest treball sempre hem utilitzat gels amb un 5% acrilamida a la part apil·ladora i un 10% acrilamida a la part separadora.

Abans de carregar els gels, a les mostres se'ls ha d'afegir tampó de càrrega de proteïnes (PLB) amb 2-mercaptoetanol (1,5 M final) i s'han de bullir 5 minuts a 95°C. En aquestes condicions, les proteïnes es troben carregades negativament, i són separades mitjançant electroforesi en tampó Laemmli (1x). Com a marcador molecular hem fet servir el SeeBlue Prestained Standard (Invitrogen).

gel apil·lador (5% AA)

375 µL Tris HCl pH 6.8 1M
 30 µL SDS 10%
 375 µL acrilamida 40%
 12 µL PSA 10% (persulfat d'amoni)
 12 µL TEMED (tetrametil-etilendiamino de Roche)
 Volum final: 3 mL

gel separador (10% AA)

1,5 mL Tris HCl pH 8.7 1,5M
 60 µL SDS 10%
 1,5 mL acrilamida 40%
 36 µL PSA 10%
 18 µL TEMED
 Volum final: 6 mL

Laemmli (10x)

1% SDS
 2 M glicina
 250 mM Tris Base
 pH 8.3

3.2.6.3. Tinció dels gels d'acrilamida amb Comassie

Un cop corregut el gel d'acrilamida, les bandes de les proteïnes es poden visualitzar mitjançant tinció amb Comassie. Per a realitzar aquesta tinció, el gel s'equilibra prèviament amb àcid acètic 10% durant 5'. Després, s'incuba 20' a temperatura ambient amb solució de Comassie, i s'acaba eliminant l'excés de tint amb una segona incubació amb àcid acètic 10%.

solució de Comassie

0,5 mg/mL Comassie Brilliant Blue G-250
 40% etanol
 10% àcid acètic

3.2.6.4. Western Blot

Un altre mètode d'anàlisi de proteïnes és el Western Blot (WB). Aquesta tècnica permet identificar una proteïna específicament d'un extracte i, fins i tot, quantificar-la. Consisteix en la separació de les proteïnes mitjançant electroforesis en gel d'acrilamida i en la seva transferència a una membrana de nitrocel·lulosa, que serà posteriorment incubada amb un anticòs específic que reconegui la proteïna que es vol identificar. Aquests anticossos són després reconeguts per uns anticossos secundaris, que es troben conjugats amb peroxidasa, que permetrà la detecció.

Així doncs, per a detectar les proteïnes per WB, se separen en un gel d'acrilamida i es transfereixen segons l'esquema de la figura 3.5, tenint en compte que les proteïnes aniran cap el pol positiu.



Figura 3.5. Esquema de la transferència de proteïnes.

Es transfereix durant 2 hores a 4°C a 80V en buffer de transferència. Un cop transferida, la membrana es bloqueja amb una solució amb llet amb pols (solució de bloqueig) durant 2h. Abans de la incubació amb l'anticòs primari, es fan tres rentats de 10' amb PBS-tween 0,1%. S'incuba la membrana amb l'anticòs primari durant una hora i mitja i es fan tres rentats més de 10 minuts amb PBS-tween 0,1%. S'incuba durant 1 hora amb l'anticòs secundari (conjugat amb la peroxidasa) i es torna a rentar 3 cops amb PBS-tween 0,1%.

Per a revelar, s'incuba la membrana 1' amb 1 mL de luminol amb 10 µL d'enhancer (àcid p-hidroxi-cumarínic 1 mg/mL en DMSO). S'assecar la membrana i s'exposa 5' a un film d'autoradiografia Curix RP2 Plus (Agfa). Es revela el film en un Hyperprocessor (Amersham).

tampó de transferència	solució de bloqueig	luminol
12 g Tris Base 12 g glicina 20 mL SDS 10% 800 mL metanol Volum final: 4 L	5 g llet en pols 100 mL PBS 100 µL tween-20 Azida sòdica 0.01%	50 mg luminol sòdic 200 mL Tris HCl pH8.7 0,1 M 62 µL H ₂ O ₂ 30%

3.2.6.5. Purificació d'anticòs per afinitat

Els anticossos de GAGA utilitzats en els assajos d'immunoprecipitació de cromatina i Western Blot van ser purificats per afinitat mitjançant columnes de reïna de Níquel. La proteïna GAGA utilitzada per a la purificació va ésser sobreexpressada per la Gemma Moyà Pallejà.

Per a la purificació, es dial·litzen 500 µL de GAGA en buffer D per a treure l'imidazol en que s'havia eluït. Es deixa tota la nit dial·litzant a 4°C. A l'endemà, es guarda una alíquota de 5 µL de proteïna dial·litzada per a mirar en un gel (1). S'equilibra la columna amb 10 mL de buffer D i es passa la proteïna dial·litzada per la columna. Es guarda l'elució i es miren 10 µL al gel (2). Es renta la columna amb 10 mL de buffer D i s'equilibra amb 10 mL de buffer Abs. Es guarda una alíquota de 10 µL del rentat per a mirar al gel (3).

Es treu una alíquota d'1 µL d'Ab αGAGA per a mirar al gel (4) i es carreguen 0,8-1 mL de reïna de Níquel (Ni-NTA Agarosa de Qiagen) ja preparada en una columna. Es passa l'αGAGA (1,5 mL) per la columna i es guarda l'eluït [mirar 10 µL al gel (5)]. Es renta amb 10 mL de buffer Abs i un segon cop amb 10 mL de buffer Abs però NaCl 2M. Es guarda una alíquota de 10 µL del rentat per a mirar al gel (6) i s'elueix amb MgCl₂ 4M

Es passen primer 600 µL de MgCl₂ i es guarda com a E1. Es passa després 1 mL de MgCl₂ i es guarda com a E2 (els anticossos solen eluir en aquest punt). Es dial·litzen les elucions E1 i E2 en PBS (2 canvis d'1 hora i 1 ON a 4°C).

Al dia següent, es treu una alíquota de 10 µL de cada elució per a mirar al gel (7 i 8). S'afegeix azida sòdica (1/1000) i BSA (1mg/ml final) a cada elució i es guarda a 4°C.

Es fa un gel del 10% d'acrilamida i es miren totes les alíquotes guardades durant tot el procés (figura 3.6) mitjançant tinció amb Comassie.

buffer D	buffer Abs
20 mM Hepes pH 7.9	150 mM NaCl
20% glicerol	50 mM Tris HCl pH7.4
0,2 mM EDTA	
0,1 mM PMSF	
0,5 mM DTT	

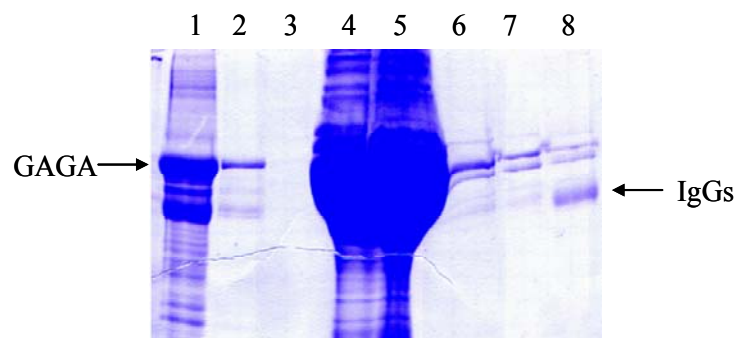


Figura 3.6. Gel d'acrilamida tenyit amb Comassie de les alíquotes extretes durant el procés de purificació d'anticòs α GAGA per afinitat.

4. RESULTATS

4.1. Identificació i anàlisi de noves regions reguladores del Complex Bitòrax

4.1.1. L'element Fab-7 del BX-C és hipersensible

EL Fab-7 és l'element regulador més ben estudiat del Complex Bitòrax de *Drosophila melanogaster* i separa els dominis iab-6 i iab-7 del BX-C. Si bé quan es va identificar aquest element regulador es va veure que presentava activitats d'element boundary i d'element PRE (Karch *et al.*, 1985), avui en dia se sap que aquestes dues activitats es troben separades en dues regions adjacents, l'element boundary Fab-7 i l'element iab7PRE, de manera que quan parlem de l'element Fab-7 ens referirem només a la seva activitat boundary. Així doncs, el Fab-7 no permet que les proteïnes que modulen l'estructura d'un domini s'extenguin a l'adjacent, de manera que actua de barrera entre diferents estructures de la cromatina (Mihaly *et al.*, 1997).

S'ha vist que el Fab-7 mostra llocs hipersensibles a la digestió amb DNasaI i a la nucleasa micrococcal; aquestes nucleases digereixen les regions de DNA que no contacten amb els nucleosomes, suggerint que el Fab-7 correspon a una regió reguladora lliure de nucleosomes. Assajos de digestió amb DNasaI, que es mostren a la figura 4.1 i que han estat

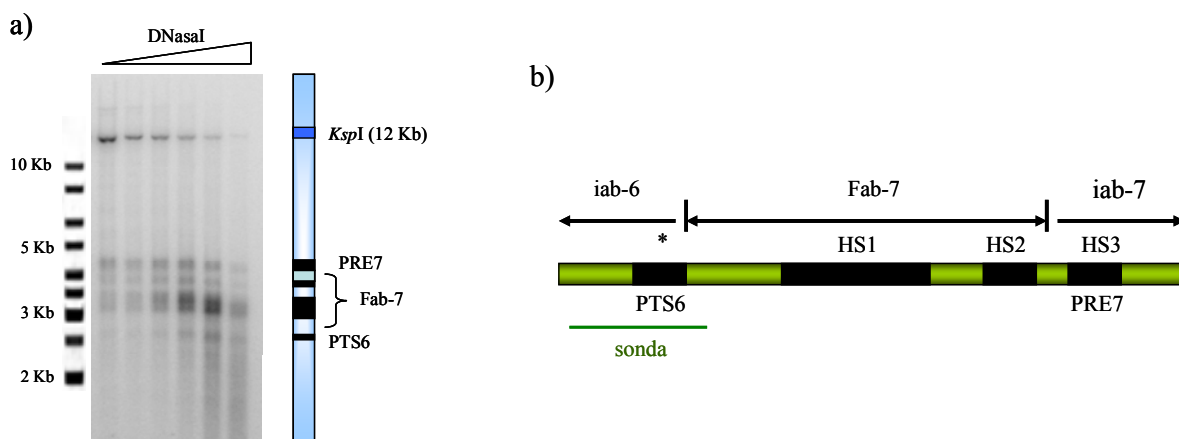


Figura 4.1. a) Llocs hipersensibles de la regió del Fab-7. Nuclis d'embrions 0-24 h de *Drosophila* s'han digerit amb concentracions creixents de DNasaI; s'ha extret el DNA i les mostres s'han digerit amb l'enzim *KspI*, que allibera un fragment de 12 Kb que inclou tota la regió del Fab-7. Les mostres es corren en un gel d'agarosa i es transfereixen a una membrana de nylon, que s'hibrida amb una sonda específica marcada radiactivament. En el gel s'observen els diferents llocs hipersensibles a la digestió amb DNasaI. b) Esquema de les regions hipersensibles de l'element Fab-7 del BX-C. La hipersensibilitat que correspon al PTS6 no sempre es veu als assajos de DNasaI, de manera que s'ha dit que podria tractar-se d'un lloc minoritari que no sempre sigui hipersensible. En verd s'indica la sonda emprada en l'assaig d'hipersensibilitats de la figura (a), generada mitjançant digestió del plasmidi pBS/iab7 amb *PstI*.

realitzats també per d'altres grups (Karch *et al.*, 1994) han permès la identificació de quatre llocs hipersensibles a la regió del Fab-7.

El boundary Fab-7 presenta dues regions hipersensibles majoritàries: l'HS1 i l'HS2. L'HS1 és la hipersensibilitat més llarga i conté sis llocs consens d'unió de la proteïna GAGA organitzats en tres parells (S. Schweinsberg *et al.*, 2004). Com hem vist, l'iab7PRE, que es troba adjacent a l'element boundary, també presenta una regió lliure de nucleosomes, que s'ha anomenat HS3 (Mishra *et al.*, 2001). La regió que es troba a 3' del Fab-7 també presenta un lloc hipersensible minoritari; aquesta hipersensibilitat, però, no sempre és detectable, de manera que s'ha suggerit que podria tractar-se d'un lloc minoritari que no sempre sigui hipersensible (Karch *et al.*, 1994). Aquest lloc es localitza sobre una regió que s'ha descrit com a *Promoter Targeting Sequence* (Chen *et al.*, 2005).

4.1.2. Hipersensibilitats a DNasaI al domini iab-6

El Fab-7 no és l'únic element regulador hipersensible identificat al BX-C. També el Fab-8 i l'MCP mostren un patró d'hipersensibilitats a la digestió amb nucleases (Barges *et al.*, 2000; Karch *et al.*, 1994). S'ha descrit que d'altres regions reguladores de l'expressió gènica, com promotors i enhancers, també presenten llocs hipersensibles, suggerint que per a

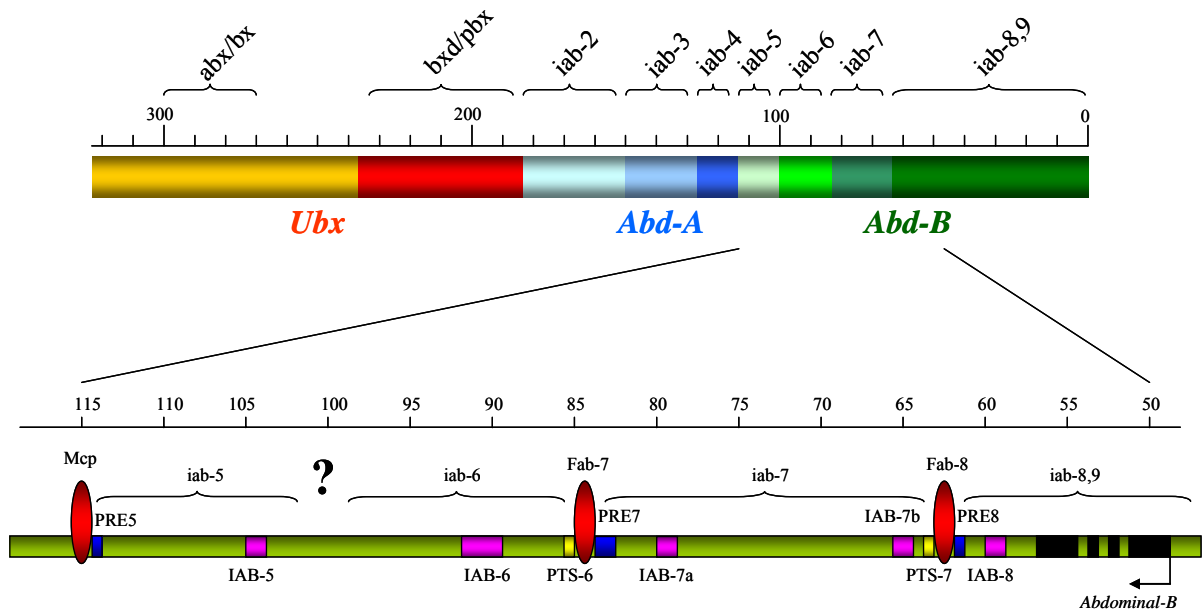


Figura 4.2. A dalt, estructura del BX-C i de les regions reguladores dels tres gens homeòtics que en formen part. El regle indica la numeració en bases des de l'inici de la regió. A baix, ampliació dels dominis reguladores de l'Abd-B. Vam centrar el nostre anàlisi a la regió que separa els dominis iab-5 i iab-6.

que aquestes regions puguin actuar com a moduladors de l'expressió cal que presentin llocs lliures de nucleosomes. S'ha pensat que aquests llocs lliures de nucleosomes poden permetre l'accessibilitat de la maquinària de transcripció o el recrutament de cofactors o de proteïnes implicades en activació o repressió i que, alhora, la localització d'un nucleosoma sobre una determinada seqüència en pot conduir l'emascament o l'accessibilitat.

Així doncs, amb l'objectiu de descriure noves regions reguladores al domini 3'*cis*-regulador de l'*Abd-B*, vam pensar que podríem realitzar un primer crivellatge de la regió mitjançant assajos d'hipersensibilitat a DNasaI.

Vam centrar la nostra anàlisi en la regió compresa entre els dominis iab-5 i iab-6; com hem vist, s'han descrit elements boundary i de manteniment separant tots els dominis reguladors de l'*Abd-B*, excepte entre l'iab-5 i l'iab-6, de manera que vam realitzar experiments d'hipersensibilitat a DNasaI al voltant d'aquesta regió (figura 4.2).

En primer lloc, vam fer un primer *screening* de llocs hipersensibles entre les regions 91.000 i 103.000 del BX-C. Vam realitzar un assaig de DNasaI a nuclis d'embrions 0-16h i vam digerir l'extracte amb *KpnI*. Vam córrer les mostres en un gel 1% agarosa i el vam transferir a una membrana de nylon. Vam hibridar la membrana amb una sonda de l'extrem proximal de la regió obtinguda per PCR (sonda 1 de la figura 4.3.a).

Com es pot veure a la figura 4.3.b, hi ha diverses regions que presenten hipersensibilitats a DNasaI, que hem indicat amb asteriscs. La hipersensibilitat inferior sembla presentar un doblet, mentre la superior sembla ser una hipersensibilitat senzilla. Per a mapar amb més precisió els llocs hipersensibles identificats, vam realitzar assajos acotant més les regions identificades amb enzims de restricció. Ajudant-nos dels marcadors moleculars, per tal d'acotar les hipersensibilitats inferiors vam decidir digerir les mostres de l'assaig de DNasaI amb *PstI* i *SacI* (figura 4.3.c). Per a determinar exactament la posició de les hipersensibilitats, juntament amb les mostres de l'assaig de DNasaI, vam córrer una mostra de genòmic digerida amb els enzims *PstI* i *ScaI*, que donava un fragment d'1,5 Kb.

D'aquesta manera, vam poder confirmar l'existència de dos llocs hipersensibles: un de majoritari, més distal, i un de minoritari, més proximal. A més, sembla que podria aparèixer un tercer lloc hipersensible més distal, tot i que semblaria tractar-se d'un lloc minoritari. La mostra digerida *PstI/ScaI* ens va indicar que el lloc de restricció *ScaI* es trobava entre les dues hipersensibilitats més intenses, de manera que tota la regió devia situar-se entre el 96.100 i el 97.000 del BX-C.

4. Resultats

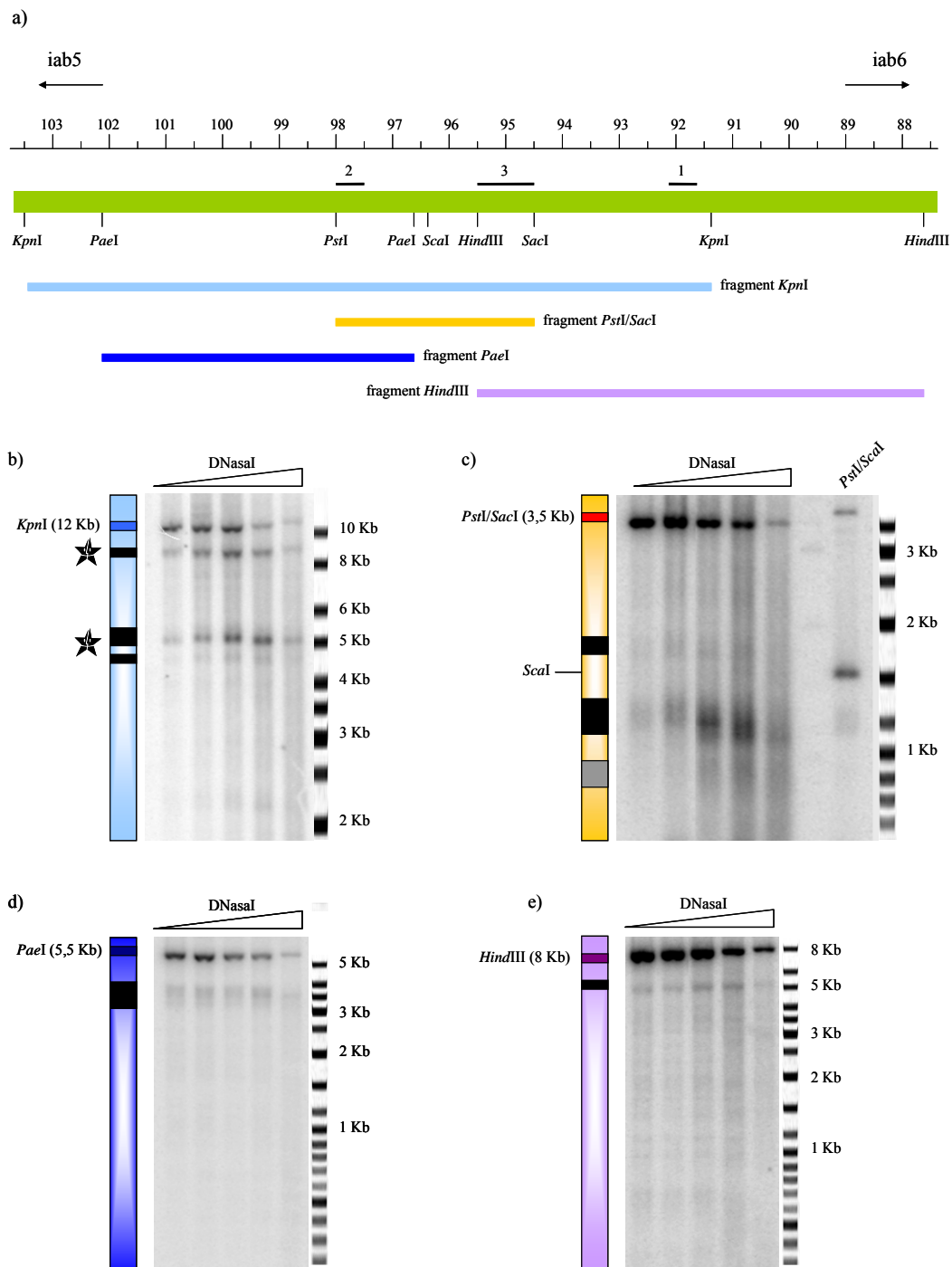


Figura 4.3. a) Esquema de la regió que se situa entre els dominis iab-5 i iab-6; s'indiquen els llocs de restricció que s'han emprat en els assajos d'hipersensibilitat a DNaseI. També s'indiquen els quatre fragments en que s'han digerit les diferents mostres, i les sondes amb que s'han hibridat els fragments (indicades com a 1, 2 i 3). b) Hipersensibilitats a DNaseI del fragment *KpnI*, hibridat amb la sonda 1 (obtinguda per PCR amb els primers IAB6U i IAB6L). S'hi observa un lloc hipersensible a la part superior i un doblet a la part inferior, indicats amb asteriscs. c) Hipersensibilitats a DNaseI del fragment *PstI/SacI*, hibridat amb la sonda 2 (obtinguda per PCR amb els primers 98U i 98L). Es confirma el doblet observat a la figura anterior i sembla que podria haver-hi una tercera hipersensibilitat molt dèbil por sota de la majoritària (indicada en gris). *ScaI* es troba entre les dues hipersensibilitats. d) Hipersensibilitats a DNaseI del fragment *PaeI*, hibridat també amb la sonda 2. S'hi observa una hipersensibilitat que cobreix una regió de 300 bp aproximadament. e) Hipersensibilitats a DNaseI del fragment *HindIII* hibridat amb la sonda 3 (obtinguda per digestió del pBS/iab6 amb *HindIII/SacI*). La hipersensibilitat que s'hi observa podria correspondre a la regió descrita com a IAB6 recentment (Cleard *et al.*, 2006).

D'altra banda, vam realitzar un altre assaig per a confirmar la presència d'un lloc hipersensible més distal (hipersensibilitat superior de la figura 4.3.b), de manera que vam realitzar un altre assaig de DNaseI i vam digerir els extractes de genòmic amb l'enzim *PaeI* (figura 4.3.a i d). També en aquest cas es va confirmar la presència d'un lloc lliure de nucleosomes no descrit amb anterioritat. Ajudant-nos dels marcadors de pes molecular, vam determinar que aquesta hipersensibilitat es devia trobar al voltant del 100.500 del BX-C.

Aquestes dues regions hipersensibles no han estat descrites abans, i no se'n coneix la funció. Hi ha un element regulador, però, que s'ha descrit recentment i que es troba al domini *iab-6*: l'iniciador IAB-6. Aquesta regió s'ha identificat al voltant del 90.000 del BX-C i s'ha definit com una nova regió de recrutament de les proteïnes encarregades de la iniciació de la regulació de l'*Abd-B* (els productes dels gens *gap* i *pair-rule*) (Mihaly *et al.*, 2006). No s'ha descrit, però, si aquesta regió comprèn un lloc lliure de nucleosomes. Donat que el primer fragment analitzat (*KpnI*) deixava fora aquest element, vam decidir realitzar un nou assaig d'hipersensibilitats sobre aquesta regió (figura 4.3.e).

D'aquesta manera, vam observar la presència d'un lloc hipersensible al voltant del 90.000 del BX-C, on s'ha identificat aquest element iniciador, suggerint que també els iniciadors de l'*Abd-B* mostren hipersensibilitats, i que l'*screening* d'hipersensibilitats a l'hora d'identificar possibles noves regions reguladores en aquest *locus* és viable.

Així doncs, vam identificar la presència de tres regions hipersensibles a l'*iab-6*, dues de les quals no han estat descrites funcionalment. Si bé, una anàlisi de seqüència ens va indicar que la regió entre el 94.300 i el 98.300 era rica en llocs d'unió per a proteïnes involucrades en la regulació dels gens homeòtics, com GAGA, Zeste, Pleiohomeotic i DSP1 (annex 1), suggerint que pot jugar un paper en la regulació de l'expressió del gen *Abd-B*. En segon lloc, doncs, i amb l'objectiu de caracteritzar aquests possibles elements reguladors, vam decidir analitzar-ne la funció mitjançant la generació d'individus transgènics que continguessin còpies ectòpiques de les regions hipersensibles del domini *iab-6*.

4.1.3. Caracterització de les noves regions hipersensibles

4.1.3.1. Expressió del gen reporter *white* sota el control de diferents regions reguladores

Per tal d'analitzar la possible funció *in vivo* de les noves regions hipersensibles identificades vam decidir emprar un model amb el gen reporter *miniwhite* sota el control del seu propi enhancer; aquest sistema s'ha utilitzat per a l'estudi de regions reguladores, com boundaries i PREs (figura 4.4) (Barges *et al.*, 2000; Gruzdeva *et al.*, 2005; Hagstrom *et al.*, 1996; S. E. Schweinsberg *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1999b). En aquest sistema, l'expressió del gen reporter *white* es troba sota el control del seu promotor mínim i del seu enhancer, que es troba situat *upstream* del promotor. Així doncs, l'enhancer activaria el promotor del *white* i promouria una forta expressió del gen reporter. La localització d'un element regulador entre l'enhancer i el promotor pot provocar que l'expressió del gen es vegi alterada de diferents maneres.

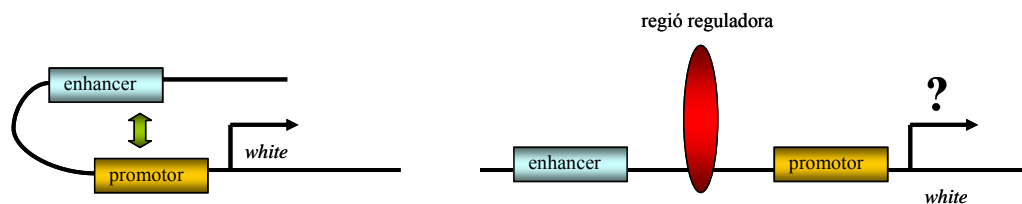


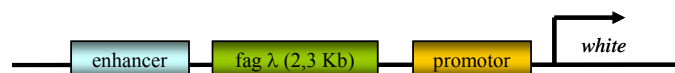
Figura 4.4. El promotor mínim del gen *white* es troba sota el control del seu propi enhancer, promovent una forta expressió del gen reporter que es tradueix en una pigmentació vermella dels ulls dels individus adults. La localització d'un fragment de DNA entre enhancer i promotor pot provocar una alteració en l'expressió del gen *white*, que s'observarà fenotípicament als adults.

Tots aquests efectes de l'expressió del gen reporter els podem detectar mitjançant la inserció d'aquestes construccions en mosques mutants per al gen *white*, que no presenten pigmentació dels ulls i, per tant, són blancs. A les mosques transgèniques, el gen reporter *white* s'expressa en més o menys intensitat depenent de les regions reguladores que el controlin, i això es tradueix en diferents pigmentacions dels ulls dels individus adults, des del blanc fins el vermell brillant.

♦ **L'element espaiador lambda entre l'enhancer i el promotor del *white* no altera l'expressió del gen reporter**

En primer lloc, vam voler analitzar si, al model escollit, l'expressió del gen reporter no es veia alterada en augmentar la distància entre l'enhancer i el promotor. Així doncs, com a control, vam clonar entre les dues regions reguladores un fragment inert de 2,3 Kb del fag lambda; vam anomenar aquesta construcció "lambda" (figura 4.5).

En introduir aquesta construcció en mosques amb un fons mutant per al gen *white* endogen s'observa una forta pigmentació vermella dels ulls tant a mascles com a femelles; en homozigosi la pigmentació encara és més intensa i les mosques tenen els ulls d'un vermell brillant molt fort. Així doncs, la inserció d'un element espaiador entre l'enhancer i el promotor del *white* no afecta l'expressió del gen reporter, provocant una forta pigmentació dels ulls dels individus transgènics adults.



línia lambda-4.1 (II)

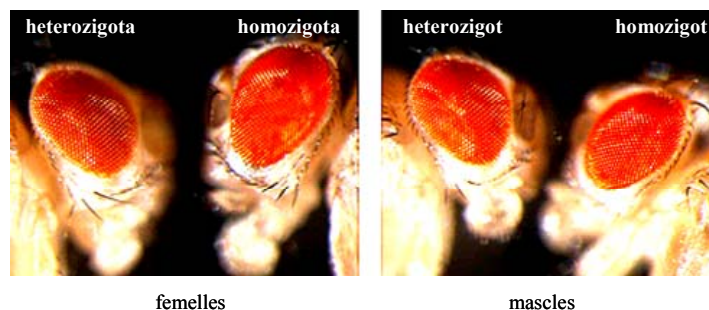


Figura 4.5. A dalt, esquema de la construcció EnhW/lambda. A baix, mosques d'una de les línies obtingudes, amb el transgèn insertat al cromosoma II. La inserció d'un element espaiador entre l'enhancer i el promotor del *white* no interfereix en el contacte entre ambdós ni afecta l'expressió del gen reporter.

♦ **Els elements Fab-7 i iab7PRE promouen silenciament i PSS**

Per tal de caracteritzar la possible funció de les noves regions hipersensibles mitjançant aquest model vam estudiar l'efecte promogut per la inserció de diferents regions reguladores ja descrites a la bibliografia, com el boundary Fab-7 i l'element de manteniment iab7PRE, entre el promotor i l'enhancer del gen *white*. La generació de mosques

4. Resultats

transgèniques amb aquests elements reguladors ectòpics, a més, ens permetrà estudiar en profunditat la funció d'aquestes regions i la implicació de diferents proteïnes en la seva regulació.

D'aquesta manera, vam clonar la regió del boundary del Fab-7 juntament amb l'element de manteniment adjacent, l'*iab7PRE*, entre l'enhancer i el promotor del gen del *miniwhite*, de manera que poguéssim estudiar la contribució del silenciament promogut per tots dos elements reguladors i dels factors que n'alteren l'activitat. Vam anomenar a aquesta

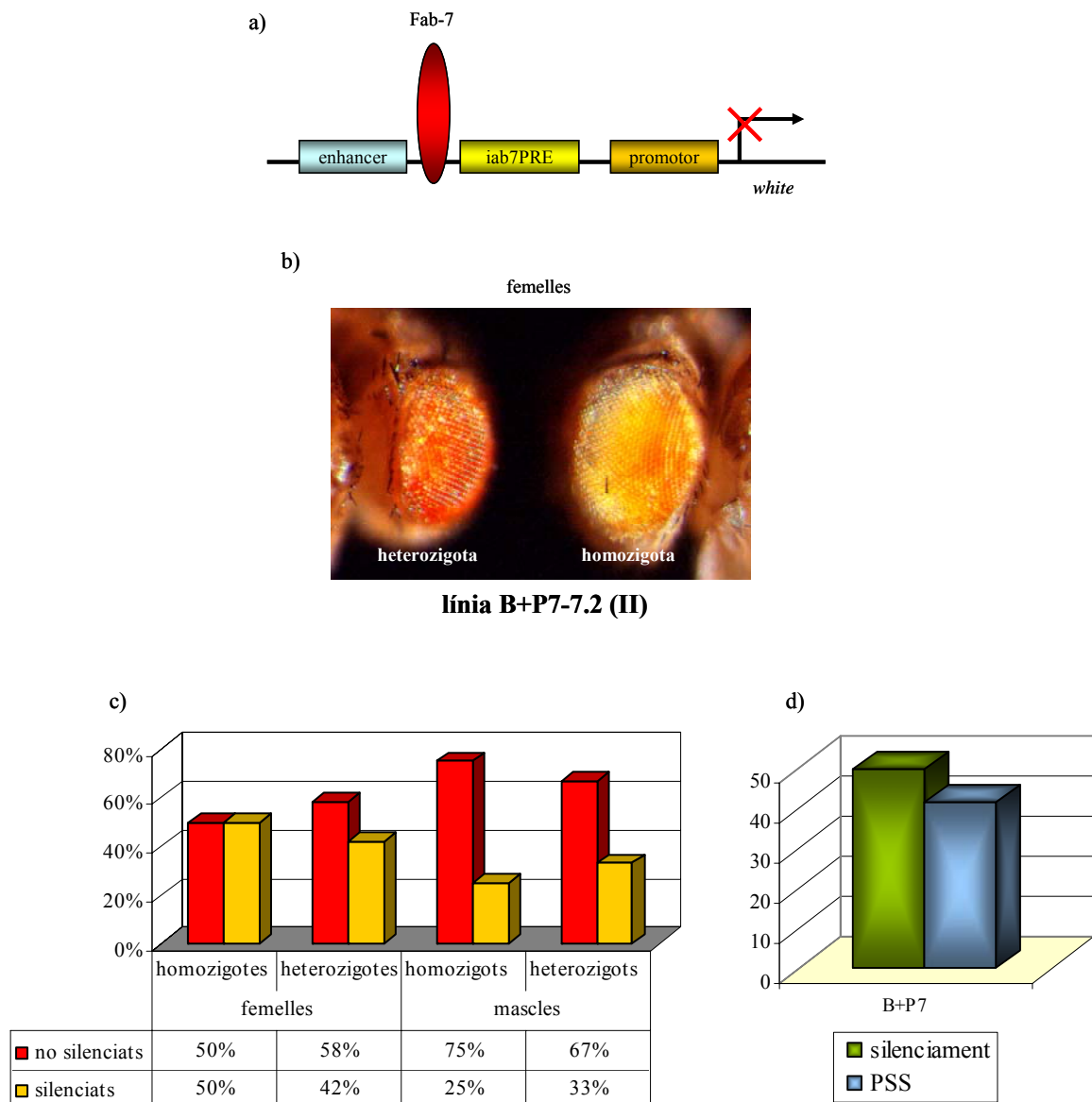


Figura 4.6. a) Esquema de la construcció B+P7. b) Femelles de la línia 7.2 de la construcció B+P7 (cromosoma II). La femella homozigota presenta menys pigmentació que la femella heterozigota, és a dir, que es produeix *Pairing-Sensitive Silencing* (PSS). c) Distribució del color d'ulls dels individus adults de les 12 línies B+P7 segons si mostren o no silenciament del *white*. d) Silenciament i PSS observat a la construcció B+P7. Com es pot veure, mostren silenciament un 50% de les línies, i un 42% mostren *Pairing-Sensitive Silencing*.

construcció “B+P7” (figura 4.6.a). Així doncs, vam analitzar l’efecte fenotípic de la inserció d’aquesta construcció en mosques *white* a través de la pigmentació dels ulls de mascles i femelles adults tant en homozigosi com en heterozigosi.

A la figura 4.6.b es troben representades dues femelles de la línia 7.2 de la construcció B+P7; com es pot veure, la femella homozigota presenta una pigmentació als ulls més clara que la femella heterozigota. A les figures 4.6.c i 4.6.d hem resumit els resultats observats a les 12 línies independents obtingudes. D’aquesta manera, el 42% de les línies presenten silenciament en heterozigosi. Aquest silenciament pot ser degut o al recrutament de proteïnes del Pc-G a l’element de manteniment del transgèn, o bé a l’activitat *enhancer-blocking* del Fab-7.

En segon lloc, hem vist que els individus homozigots tenen els ulls més clars que els heterozigots i, fins i tot, variegats. Aquest fenomen, anomenat *Pairing-Sensitive Silencing* (PSS), és típic dels *Polycomb Response Elements*, que indueixen un silenciament depenent de proteïnes del grup Pc. Aquests elements PRE poden contactar amb les seves còpies homòlogues i promoure un potenciament del silenciament, de manera que en presència de dues còpies del PRE l’expressió dels gens que controlen és molt més baixa que quan només n’hi ha un. El fet que aquests elements puguin conduir una expressió variegada es deu a que el silenciament induït per Pc té lloc mitjançant un procés d’heterocromatinització arbitrària, és a dir, que no es dona a totes les cèl·lules, traduint-se en un fenotip d’expressió clonal.

◆ El boundary Fab-7 bloqueja el contacte entre l’enhancer i el promotor del gen reporter

D’altra banda, vam clonar l’element boundary Fab-7 sol entre l’enhancer i el promotor del *miniwhite* i vam analitzar la seva activitat mitjançant la pigmentació dels ulls dels individus adults (hem anomenat “Fab-7” a aquesta construcció) (figura 4.7.a). Vam analitzar la pigmentació dels ulls de les 18 línies obtingudes, tant en homozigosi com en heterozigosi, i a mascles i femelles.

A la figura 4.7.b es mostren dues línies independents de la construcció Fab-7; la línia 2.1 té el transgèn insertat al cromosoma II, i la línia 8.1, al cromosoma X. Les femelles heterozigotes de la línia Fab7-8.1 tenen els ulls grocs, mentre les femelles homozigotes i els mascles els tenen taronges. La línia Fab7-2.1 no mostra un silenciament tant fort com

4. Resultats

l'anterior, ja que els individus heterozigots presenten els ulls taronges, i els homozigots, vermells (els mascles sempre més foscos que les femelles). A la figura 4.7.c hem resumit els resultats obtinguts a les 18 línies del Fab-7. Com es pot veure, el 50% de les femelles heterozigotes tenen els ulls taronges, i l'altre 50% els tenen vermells, suggerint que la inserció de l'element Fab-7 entre l'enhancer i el promotor del *white* altera l'expressió del gen

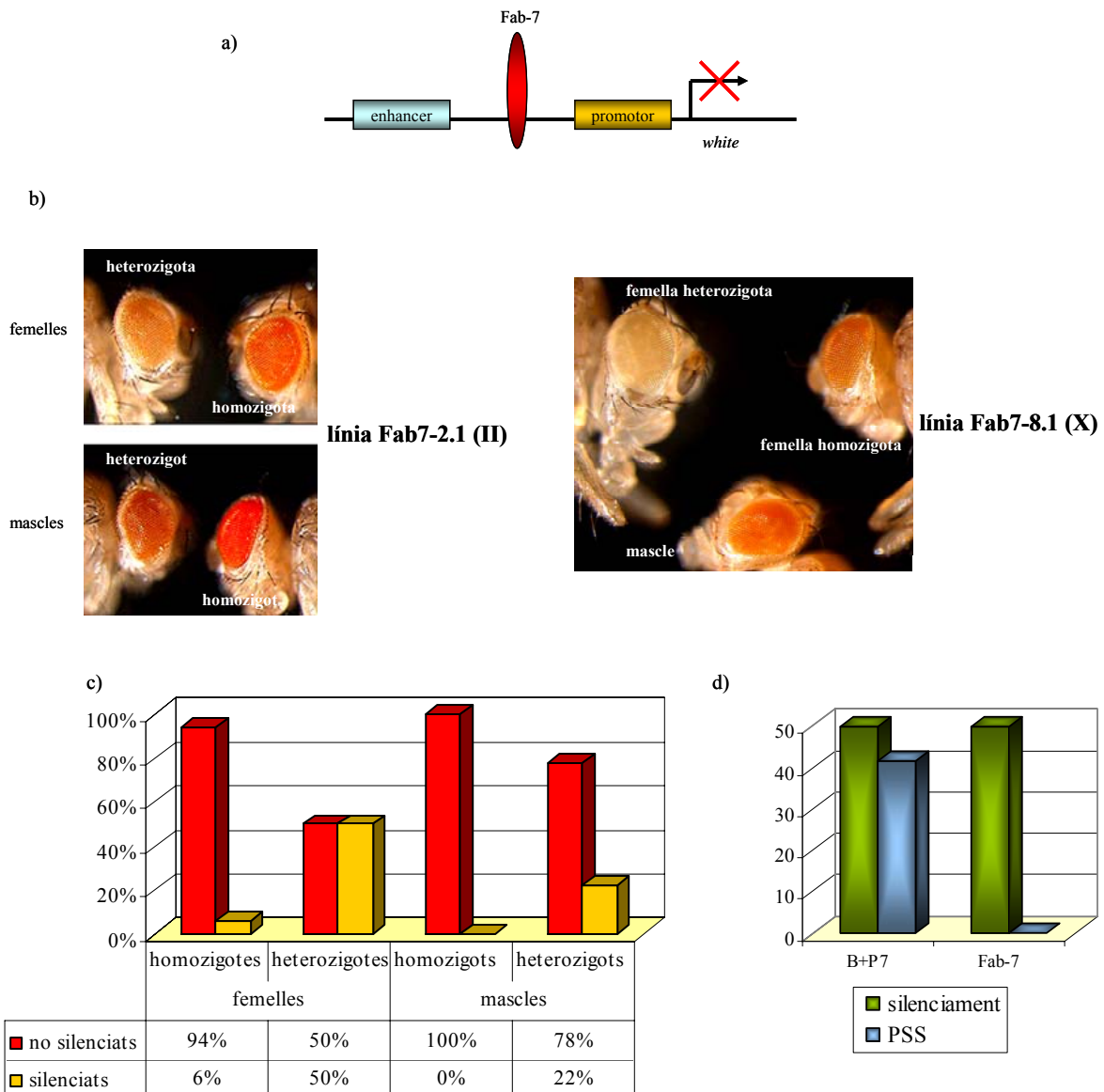


Figura 4.7. a) Esquema de la construcció Fab-7, en que l'element boundary Fab-7 s'ha clonat entre l'enhancer i el promotor del gen reporter *white*. b) Ulls de dues línies diferents de la construcció Fab-7. Entre parèntesis està indicat el cromosoma en que s'ha insertat el transgèn en cada línia. Totes dues línies mostren silenciament de l'expressió del gen reporter. En totes dues, els individus heterozigots tenen els ulls més clars que els homozigots. c) Distribució de la pigmentació dels ulls de les 18 línies transgèniques Fab-7. d) Silenciament i PSS de les construccions B+P7 i Fab-7. Totes dues construccions presenten silenciament a un 50% de les línies obtingudes, mentre només s'observa PSS en presència de l'element de manteniment.

reporter. Si bé, aquest assaig no ens permet distingir si el silenciament promogut per l'element Fab-7 és degut a un bloqueig de la interacció entre la maquinària de transcripció i el promotor, o és degut a un impacte directe del contacte entre les dues regions reguladores, però prèviament s'havia descrit que es deu a la seva capacitat d'actuar com a *enhancer-blocking*, una de les propietats dels insulators (S. E. Schweinsberg *et al.*, 2004).

El fet que només el 50% de les línies presentin silenciament pot ser degut a que l'element regulador no funcioni correctament en totes les línies. De fet, s'ha vist que determinats enhancers del BX-C fora de context activen l'expressió de gens reporters de forma inespecífica de teixit; així doncs, és possible que l'activitat boundary depengui també parcialment del context (Maeda *et al.*, 2006). D'altra banda, ja s'havia vist que l'activitat del Fab-7 depèn del lloc d'inserció, essent només funcional en un 50% del total de les línies (Hagstrom *et al.*, 1996). Els nostres resultats, doncs, concorden amb els publicats anteriorment.

Com es pot veure a la figura 4.7.b, a totes dues línies, els individus homozigots semblen expressar el gen *white* en un nivell més alt que els heterozigots, i això es tradueix en una pigmentació de l'ull més intensa, suggerint que l'expressió del gen reporter en aquestes línies és aditiva. Així doncs, l'element boundary Fab-7 no és capaç de promoure l'activitat de PSS, mentre que, com hem vist, en presència de l'*iab7PRE*, sí que es produeix aquest silenciament per aparellament.

4.1.3.2. Les proteïnes dels grups Pc i Trx alteren l'activitat dels elements ectòpics

Amb l'objectiu de confirmar la funcionalitat dels elements reguladors ectòpics i d'estudiar la regulació de la seva activitat dependent de proteïnes dels grups Pc i Trx, vam decidir introduir aquestes construccions en individus que presentessin un fons mutant per a diferents proteïnes. Així doncs, en primer lloc vam realitzar creuaments entre la línia B+P7-7.2 i diferents mutants de proteïnes dels grups Pc i Trx (figura 4.8).

Els mutants de la proteïna Pc (mutants Pc^3) es troben en heterozigosi, donat que en homozigosi no són viables, de manera que només presenten una deficiència parcial de la quantitat de proteïna. Tot i això, sembla que la manca d'aquesta proteïna promou una supressió de la variegació i un augment de la pigmentació de l'ull, suggerint que la falta de Pc promou una desrepressió de la regió i un augment de l'expressió del gen reporter; d'altra

banda, sembla que una deficiència en la quantitat de BRAMA (*brm2*), que és una proteïna del Trx-G i que també es pot trobar només en heterozigosi, també promou una supressió de la variegació, però en aquest cas la pigmentació de l'ull és més feble que la del transgènic salvatge, suggerint que la falta de BRAMA pot potenciar el silenciament mediat per Pc.



Figura 4.8. Fenotip de femelles homozigotes de la línia B+P7-7.2 salvatges (a l'esquerra) i amb diferents mutacions. La falta de Polycomb (foto central) provoca una desrepressió del gen reporter, mentre la mutació de BRAMA (a la dreta), proteïna del Trx-G, induïx una disminució de la pigmentació.

Tots aquests resultats indiquen que l'activitat de l'element B+P7 ectòpic depèn de les proteïnes involucrades en el manteniment de l'expressió dels gens homeòtics al llarg del desenvolupament, Pc-G i Trx-G, suggerint que està funcionant correctament.

De la mateixa manera, i donat que no es coneixen les proteïnes implicades en l'activitat silenciadora del Fab-7, també vam voler determinar si el silenciament promogut per l'element boundary Fab-7 ectòpic depenia de proteïnes del Pc-G. Així doncs, vam realitzar creuaments de les línies Fab-7 2.1, 8.1 i 12.6 amb mosques que presentaven una deleció de la proteïna Polycomb (*Pc³*). Vam escollir aquestes línies perquè expressaven nivells molt diferents del gen reporter i això podria ser degut a que l'element Fab-7 ectòpic estés funcionant de forma diferent.

	Fab-7 2.1	Fab-7 8.1	Fab-7 12.6
<i>Pc³</i>	+	-	+

Taula 4.1. Efecte fenotípic de la falta de la proteïna Polycomb de tres línies transgèniques del Fab-7. El signe + indica un lleuger augment de la pigmentació dels ulls, mentre el signe - indica que no es produeix cap efecte.

Així doncs, vam analitzar el color d'ulls dels individus heterozigots pel transgèn Fab-7 en el fons mutant Pc^3 (taula 4.1). Com es pot veure, la línia Fab7-8.1 no presenta canvis en disminuir la quantitat de Pc del sistema, mentre que les femelles heterozigotes de la línia 2.1 amb la deleció Pc^3 semblen tenir els ulls més foscos que les salvatges, suggerint que la falta de Pc podria alterar l'activitat *enhancer-blocking* del Fab-7 i disminuir el silenciament. La línia Fab7-12.6 també sembla tenir els ulls més foscos en el fons mutant, però l'efecte és molt més subtil que a la línia Fab7-2.1, suggerint que l'expressió no es veu molt alterada per la falta d'aquestes proteïnes. Si bé no s'ha suggerit prèviament cap implicació de Polycomb en la regulació dels elements boundary, aquests resultats semblen indicar una possible implicació d'aquesta proteïna en el funcionament del Fab-7 tot i que els efectes fenotípics observats són molt dèbils.

Així doncs, la falta de proteïnes dels grups Pc i Trx afecta el silenciament promogut pels elements Fab-7 i *iab7PRE* ectòpics; aquests resultats ens poden ajudar a la caracterització de noves regions reguladores i indiquen, en primer lloc, que els elements ectòpics són funcionals i, en segon lloc, que el bloqueig del contacte entre l'enhancer i el promotor del gen reporter pot dependre també de Polycomb.

4.1.3.3. Construccions transgèniques del domini *iab-6*: un nou element PRE

Un cop establert el model d'estudi, vam decidir generar mosques transgèniques insertant les diferents regions hipersensibles que havíem identificat al domini *iab-6* del BX-C entre l'enhancer i el promotor del gen reporter *white*, de manera que poguéssim identificar noves regions reguladores en aquest domini mitjançant la seva implicació en la regulació de l'expressió gènica.

◆ La construcció *iab6HS*

a) La construcció *iab6HS* presenta silenciament i PSS

La regió hipersensible central observada al domini *iab-6* (entre el 96.100 i el 97.000 del BX-C) presenta dues hipersensibilitats molt intenses (HS1 i HS2) i una de minoritària. Aquesta distribució és similar a l'observada a la regió de l'element boundary Fab-7; com hem

4. Resultats

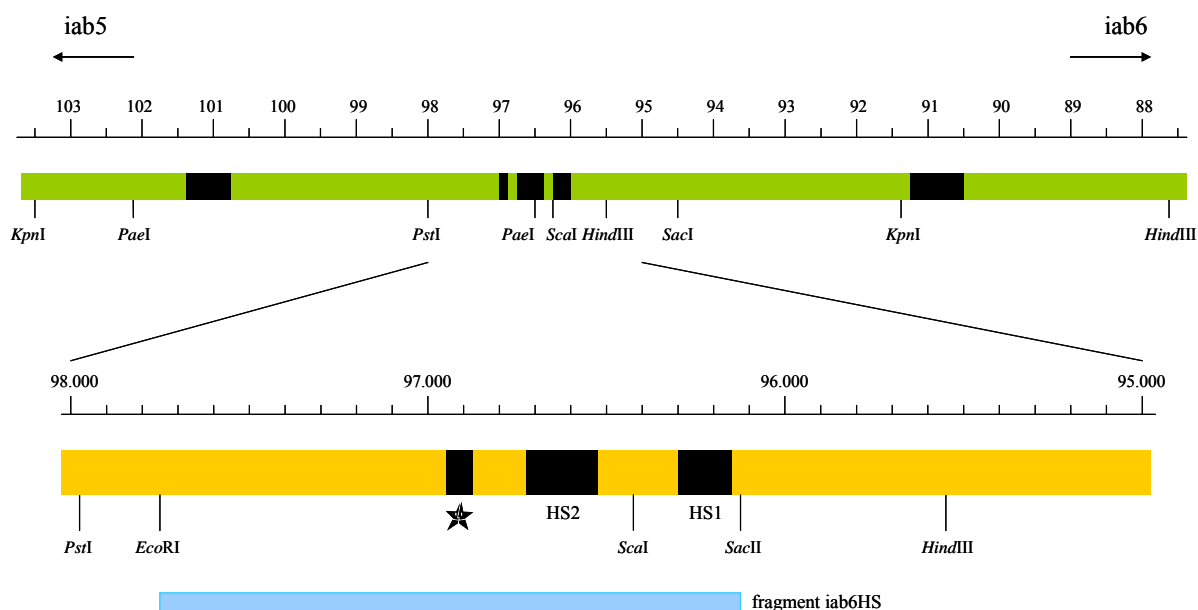


Figura 4.9. Posició de les diferents regions hipersensibles identificades a l'iab-6. A sota, ampliació de la regió central, que presenta tres hipersensibilitats, tot i que la més distal, indicada amb un asterisc, no sempre és observable. En blau s'indica el fragment utilitzat per a la construcció transgènica iab6HS; l'iab6HS és un fragment d'1,6 Kb que abarca les tres hipersensibilitats.

vist, el Fab-7 conté dos llocs hipersensibles (HS) flanquejats per dos llocs més que corresponen a l'iab7PRE i al PTS6.

Així doncs, vam decidir generar construccions en que el fragment iab6HS (que abarca les tres hipersensibilitats centrals de l'iab-6) (figura 4.9) es localitzés entre l'enhancer i el promotor del gen *white* (figura 4.10.a). De la mateixa manera que vam fer pel Fab-7, vam analitzar l'efecte provocat per la localització de la regió iab6HS entre els dos elements reguladors del gen reporter mitjançant l'observació del fenotip dels adults en presència d'una i de dues còpies del transgèn (figures 4.10.b i c).

Vam observar que la inserció d'aquesta regió promou una disminució de la pigmentació dels ulls en heterozigosi, mostrant, en alguns casos, una expressió variegada de la pigmentació; aquest silenciament dels individus transgènics iab6HS en heterozigosi és molt similar al que havíem observat per als individus Fab-7 i B+P7 (el 40% de les 15 línies independents de l'iab6HS mostren silenciament, mentre a les línies B+P7 i Fab-7 se n'observa en un 50%).

D'altra banda, vam veure que, en homozigosi, 5 de les 13 línies independents presentaven una pigmentació als ulls més clara que en heterozigosi; aquest resultat suggereix que aquestes línies mostren silenciament degut a l'aparellament (*Pairing-Sensitive Silencing*);

també el PSS és molt similar a l'observat als individus B+P7 (un 40% aproximadament en totes dues construccions). Aquestes observacions indicaven que la construcció iab6HS s'estava comportant com un *Polycomb Response Element*, però no ens permetia distingir si podia incloure d'altres elements reguladors com, per exemple, un boundary, ja que la construcció B+P7, que presenta les dues activitats, mostra un fenotip equivalent.

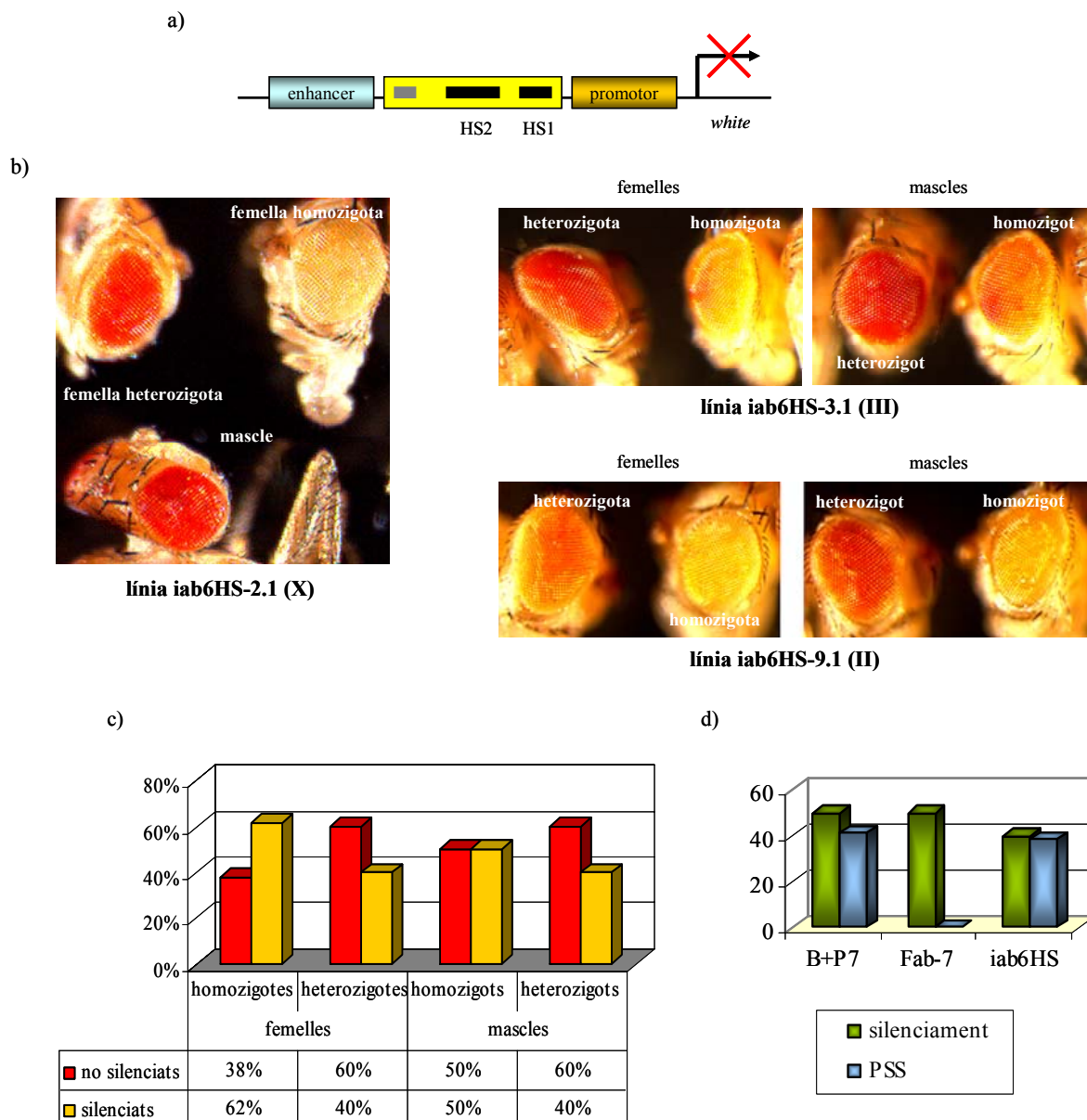


Figura 4.10. a) Estructura de la construcció iab6HS, en que les tres hipersensibilitats identificades al voltant del 96.500 del BX-C se situen entre l'enhancer i el promotor del *white*. b) Fenotip de tres línies independents de la construcció iab6HS. Entre parèntesi s'indica el cromosoma en que s'ha insertat el transgèn en cada cas. Les tres línies presenten *Pairing-Sensitive Silencing*. c) Resum del fenotip observat a les 15 línies independents obtingudes, tant en homozigosi com en heterozigosi. d) Silenciament i PSS observat a la construcció iab6HS comparant-la amb els observats a transgènics B+P7 i Fab-7. Tant el silenciament com el PSS són molt similars als observats per a la construcció B+P7.

b) L'activitat de la construcció iab6HS depèn de proteïnes del Pc-G

En primer lloc, per a confirmar que la construcció iab6HS podia contenir un element PRE vam realitzar creuaments entre algunes de les línies d'aquesta construcció i mosques mutants per a diferents proteïnes del Grup Pc; vam analitzar l'expressió del gen reporter *white* en diferents fons mutants en homozigosi i en heterozigosi, per tal de determinar l'efecte en el silenciament i el PSS.

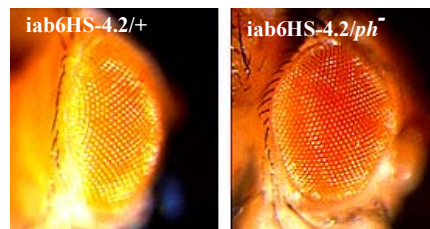


Figura 4.11. Ulls de femelles heterozigotes de la línia iab6HS-4.2 salvatge i *ph*⁻. El silenciament en heterozigosi es veu alterat en el fons mutant de Polyhomeotic.

Vam observar que l'activitat de l'element transgènic en diferents fons mutants es veia significativament alterada. La línia iab6HS-4.2, per exemple, que té el transgèn insertat al cromosoma X, presenta una forta disminució del silenciament en heterozigosi quan se situa en un fons mutant heterozigot per a la proteïna Polyhomeotic (*ph*⁻) (figura 4.11); de la mateixa manera, la línia 3.1, en homozigosi, presenta una forta disminució del PSS en un fons mutant heterozigot per a la proteïna Posterior Sex Combs (*psc*⁻), fins el punt que les femelles homozigotes per al transgèn i *psc*⁻ presenten una pigmentació als ulls propera a la dels individus heterozigots (figura 4.12).



Figura 4.12. Ulls de femelles de la línia iab6HS-3.1 heterozigota (esquerra), i homozigotes salvatge (fotografia central) i *psc*⁻ (dreta). En el fons mutant per a Posterior Sex Combs el PSS disminueix fins el punt que les mosques mostren un fenotip proper al dels individus heterozigots.

Sembla, doncs, que el silenciament i el PSS promogut per la regió iab6HS ectòpica es veu alterada en fons mutants per a proteïnes del Pc-G, suggerint que aquesta regió presenta activitat de *Polycomb Response Element*. Vam anomenar aquesta nova regió reguladora iab6PRE.

◆ Construccions amb fragments de l'iab6PRE: l'HS2 és suficient per a l'activitat de l'iab6PRE

Com hem dit, el silenciament en heterozigosi promogut per la construcció iab6HS és equivalent a l'observat en les construccions Fab-7 i B+P7. El silenciament mediat per l'element Fab-7, però, es deu a l'activitat *enhancer-blocking* del boundary, mentre el silenciament observat als transgènics B+P7 pot ser degut bé a l'activitat *enhancer-blocking* del boundary, bé a l'activitat del PRE, encarregat de reclutar les proteïnes del Pc-G.

De la mateixa manera, no podem saber si el silenciament dels transgènics iab6HS es deu només a l'activitat d'un element PRE o si també presenta activitat boundary. Així doncs, amb l'objectiu de separar aquestes dues possibles activitats i de determinar el mecanisme que promou el silenciament del transgèn iab6HS, vam decidir testar la capacitat silenciadora o bloquejadora de diferents fragments d'aquesta regió (figura 4.13).

En primer lloc, doncs, vam generar construccions transgèniques amb les

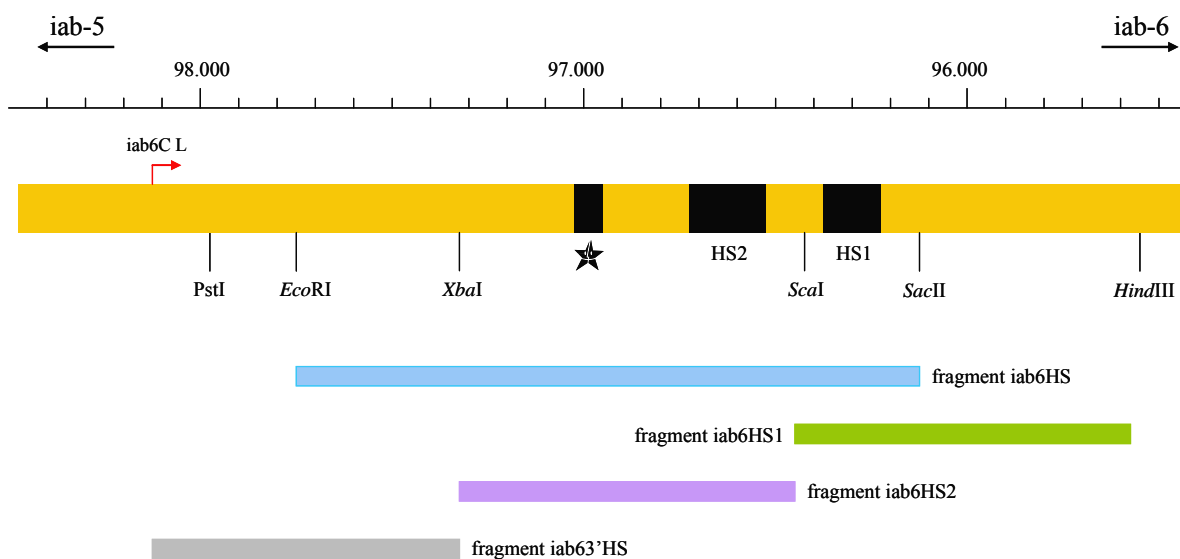


Figura 4.13. Hipersensibilitats centrals de l'iab-6. S'indiquen els diferents fragments testats en construccions transgèniques.

4. Resultats

hipersensibilitats HS1 i HS2 per separat (vam anomenar a aquestes construccions “iab6HS1” i “iab6HS2”, respectivament). A la figura 4.14.a es mostren dues línies independents de la construcció iab6HS2. En el cas de la línia iab6HS2-9.2, els individus homozigots presenten els ulls blancs, suggerint que l'aparellament en homozigosi reprimeix totalment el transgèn. Sembla, doncs, que aquest fragment és suficient per a l'activitat silenciadora de l'iab6PRE. A la figura 4.14.b es troben resumits els resultats observats a les diferents construccions transgèniques generades. Com es pot veure, la construcció iab6HS2 mostra silenciament en heterozigosi en un 49% de les línies obtingudes, i PSS en un 44% de les línies. Aquests resultats són molt similars als observats per a la construcció iab6HS. D'altra banda, el fragment HS1, que inclou la hipersensibilitat proximal de l'iab-6, no provoca silenciament del gen reporter, donat que només una de les 18 línies independents obtingudes mostra una pigmentació dèbil de l'ull, probablement degut al lloc d'inserció del transgèn. En aquesta construcció tampoc s'observa PSS; aquests resultats suggereixen que aquest fragment no és suficient per a l'activitat PRE observada a l'iab6HS i que no presenta cap activitat silenciadora.

En segon lloc, i donat que cap de les construccions anteriors ens va permetre identificar cap element amb activitat *enhancer-blocking*, vam decidir realitzar una última construcció transgènica amb un fragment adjacent a l'iab6PRE. Ja hem vist que el boundary

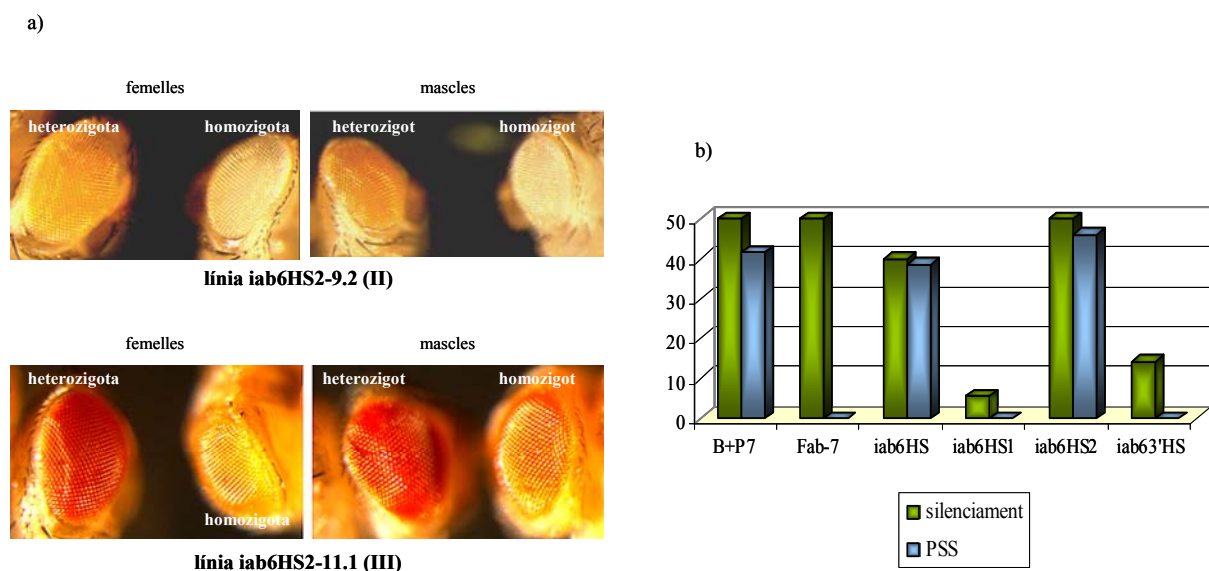


Figura 4.14. a) Ulls de mosques de dues línies de la construcció iab6HS2. b) Silenciament i PSS observats a les construccions Fab-7, B+P7, iab6HS, iab6HS1, iab6HS2 i iab63'HS. El fragment iab6HS2 és suficient per a l'activitat PRE, mentre els fragments iab6HS1 i iab63'HS no presenten cap activitat silenciadora.

Fab-7 delimita al seu extrem proximal amb l'iab7PRE; de la mateixa manera, el Fab-8 delimita pel seu extrem 5' amb l'iab8PRE. Així doncs, i tot i que no hi havíem identificat cap lloc hipersensible, vam testar la capacitat silenciadora del fragment localitzat a 3' de l'iab6PRE (vam anomenar aquesta construcció "iab63'HS"). Tampoc en aquest cas, però, vam observar cap activitat *enhancer-blocking*, ja que només una de les 7 línies obtingudes presentava un fenotip de silenciament (figura 4.14.b).

Així doncs, hem caracteritzat un nou element de manteniment a la regió 96.100-97.000 del BX-C: l'iab6PRE. Si bé, no hem pogut aïllar cap fragment que només presenti activitat silenciadora, de manera que no hem pogut identificar cap element boundary a la regió. Així doncs, donat que s'ha suggerit l'existència d'un element frontabdominal que separi els dominis iab-5 i iab-6 (Cleard *et al.*, 2006), o bé aquest element es troba emmascarat a la regió de l'HS2 i no l'hem pogut aïllar, degut a l'activitat silenciadora del PRE, o bé no es troba en aquesta regió de l'iab6. Si bé, els tamanys dels fragments de l'iab6 testats, suggereixen que en aquesta regió només es troba l'element iab6PRE, i que el Fab-6, en cas d'existir, es troba en una altra regió.

4.2. Estructura de la cromatina del Complex Bitòrax

4.2.1. Les regions reguladores del BX-C es troben hipacetil·lades i hipermetil·lades a embrions de *Drosophila*

Fins ara, hem vist que diferents elements reguladors del BX-C (boundaries, PREs i iniciadors) presenten un patró característic d'hipersensibilitats a DNasaI. D'altra banda, vam voler realitzar una anàlisi de l'estat de la cromatina de tot el *locus* del gen *Abdominal-B* a diferents nivells. Amb aquest objectiu, en primer lloc, ens vam preguntar quin patró de modificacions de les histones presentaven els diferents elements reguladors de l'expressió d'aquest gen. S'ha vist que alguns element boundary, per exemple, presenten un nivell elevat d'acetil·lació de les histones (Burgess-Beusse *et al.*, 2002). D'altra banda, també s'ha descrit que a cèl·lules en què s'expressa l'*Abd-B*, tot el *locus* es troba hipometil·lat a la lisina 27 de la histona H3 (marca que, com hem vist, és típica de regions silenciades per Pc) (Schwartz *et al.*, 2006).

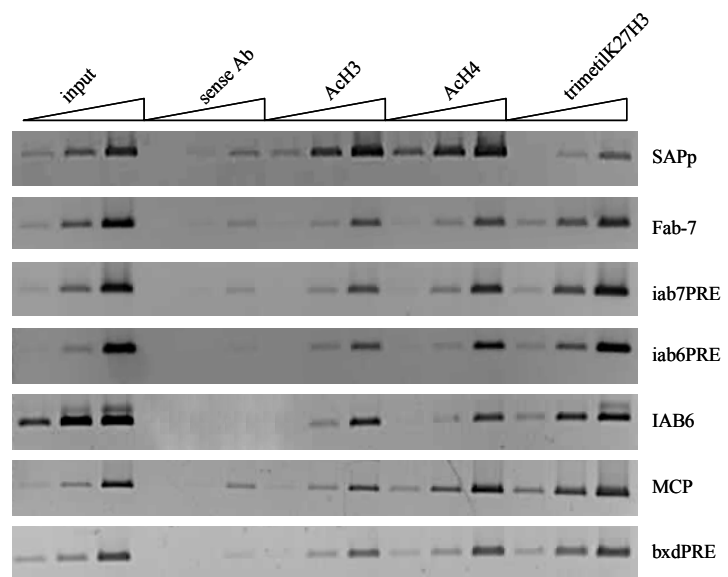
Així doncs, vam realitzar assajos d'immunoprecipitacions de cromatina (ChIPs) d'embrions 0-24 h de *Drosophila melanogaster* per tal d'analitzar el patró de modificacions que presenten les cues de les histones de diferents regions del BX-C. Vam realitzar les immunoprecipitacions amb diferents anticossos específics de lisines modificades: vam emprar l' α -acetilH3, que reconeix les lisines K9 i K14 acetil·lades de l'H3, l' α -acetilH4, que reconeix les lisines K5, K8, K12 i K16 acetil·lades de la histona H4 i l' α -trimetilH3K27, que reconeix específicament la lisina 27 de la histona H3 trimetil·lada.

Com a input de l'assaig vam utilitzar un 10% del total de l'extracte immunoprecipitat; com a control negatiu es va immunoprecipitar una mostra sense anticòs, de manera que només obtinguéssim DNA de forma inespecífica. Els resultats es van analitzar mitjançant PCR (*polymerase chain reaction*). Considerem que hi ha enriquiment si s'observa una diferència significativa de la nostra regió immunoprecipitada amb l'anticòs específic respecte el control negatiu. Utilitzem com a control de la tècnica el promotor del gen *bin1*, que codifica per a la proteïna dSAP18, regió que es troba molt activa a embrions de *Drosophila* i que tindrà un patró de modificacions de zones actives (com es veu a la figura 4.15, la regió

de dSAP18 es troba fortament acetil·lada a les histones H3 i H4, mentre el nivell de trimetil·lació de l'H3K27 és similar al del control negatiu).

Vam observar que totes les regions reguladores de l'*Abd-B* presentaven el mateix patró de modificacions: hipoacetil·lació de les cues de l'H3 i de l'H4 i hipermetil·lació de la lisina 27 de la histona H3. En tots els casos, el nivell de trimetil·lació era comparable al senyal obtingut en l'amplificació de la concentració més elevada de l'input, mentre l'acetil·lació, especialment de l'H3, es corresponia al segon punt de l'input, que representa un 20% del total. A més d'elements boundary i PREs vam analitzar les modificacions de l'iniciador de l'*iab-6*, identificat recentment al laboratori del Dr. Karch, donat que aquest sembla ser un element que només deu ser actiu a l'inici del desenvolupament. Aquesta regió també presentava un patró d'hipoacetil·lació similar a l'observat a la resta de regions. Finalment, vam comprovar l'estat de la cromatina d'una regió que no formava part del *locus* de l'*Abd-B*, sinó que es corresponia a una regió reguladora del *locus* de l'*Ultrabithorax*: el BXD. Tampoc en aquest cas vam veure cap diferència en el patró d'acetil·lació i metil·lació de les cues de les histones.

Figura 4.15. ChIPs realitzats amb anticossos que reconeixen les histones H3 i H4 acetil·lades, i l'H3 trimetil·lada a la lisina 27. La regió de dSAP18 presenta un patró de regió activa. D'altra banda, totes les regions reguladores del Complex Bitòrax analitzades semblen presentar el mateix patró d'hipoacetil·lació de les histones H3 i H4 i d'hipermetil·lació de la lisina 27 de la histona H3, marques de regions reprimides.



Tots aquests resultats suggereixen que no només l'*Abd-B*, sinó potser tota la regió del BX-C, presenta un estat hipoacetil·lat de les histones H3 i H4 i hipermetil·lat de l'H3K27. Val a dir que aquest és un estat general de l'embrió, és a dir, la suma de tots els estats que

podem trobar al llarg de l'eix antero-posterior de l'organisme i al llarg de tot el desenvolupament embrionari de *Drosophila*, de manera que no podem detectar diferències del patró de modificacions en diferents moments o en diferents segments de l'embrió.

4.2.2. Les hipersensibilitats a DNasaI són molt estables, però depenen de la funcionalitat de l'element regulador

4.2.2.1. Les hipersensibilitats del Fab-7 i l'iab6PRE s'estableixen a estadis primerencs i es mantenen al llarg del desenvolupament de la mosca

Al llarg d'aquest treball hem vist que diferents elements reguladors de l'*Abd-B* presenten llocs hipersensibles a la digestió amb DNasaI. Hem dit que les regions hipersensibles són llocs lliures de nucleosomes, ja sigui perquè s'han localitzat preferencialment a les regions adjacents a aquests elements reguladors en ensamblar-se durant la replicació, ja sigui perquè s'han desplaçat un cop ensamblats.

Així doncs, per a continuar la caracterització de l'estructura de la cromatina del BX-C, ens vam plantejar si el posicionament particular dels nucleosomes en aquestes regions es podia detectar al llarg de tot el desenvolupament de la mosca, o només es produïa en determinats moments. D'aquesta manera, vam decidir analitzar el patró d'hipersensibilitats d'aquests elements reguladors al llarg del desenvolupament embrionari i larvari de *Drosophila* mitjançant assajos de digestió amb DNasaI.

En primer lloc, doncs, vam analitzar el patró d'hipersensibilitats a estadis primerencs del desenvolupament embrionari de dues regions reguladores: la regió del Fab-7, i la regió iab6PRE. Vam realitzar assajos d'hipersensibilitats a DNasaI a embrions 0-4h (figura 4.16.a); en aquests embrions l'expressió dels gens homeòtics es troba sota el control dels activadors i els repressors dels gens gap i pair-rule, que són recrutats als elements iniciadors i que conduiran, més endavant, el recrutament de les proteïnes dels grups Pc o Trx a cada domini. Com es pot observar, tot i que la detecció és molt dèbil, en tots dos casos es distingeix clarament la hipersensibilitat majoritària. En el cas del Fab-7, també es poden observar els llocs corresponents a l'iab7PRE i al PTS6. Pel que fa a l'iab6PRE, la tècnica no és prou sensible com per a determinar la presència dels altres dos llocs hipersensibles identificats. No

obstant, podem concloure que les hipersensibilitats, o bé s'estableixen en moments molt primerencs del desenvolupament embrionari, o bé hi són presents durant tota la vida de l'organisme.

Per tant, vam voler saber si aquests llocs es mantenen en un estat accessible a estadis més tardans, en que els patrons d'expressió dels gens homeòtics ja es troben definitivament establerts; d'aquesta manera, vam realitzar assajos d'hipersensibilitat a la nucleasa a larves en estadi III del desenvolupament (figura 4.16.b). Com es pot veure, també en aquest cas es poden distingir els llocs hipersensibles majoritaris de les dues regions analitzades. Aquests resultats suggereixen que el posicionament dels nucleosomes a les regions reguladores del

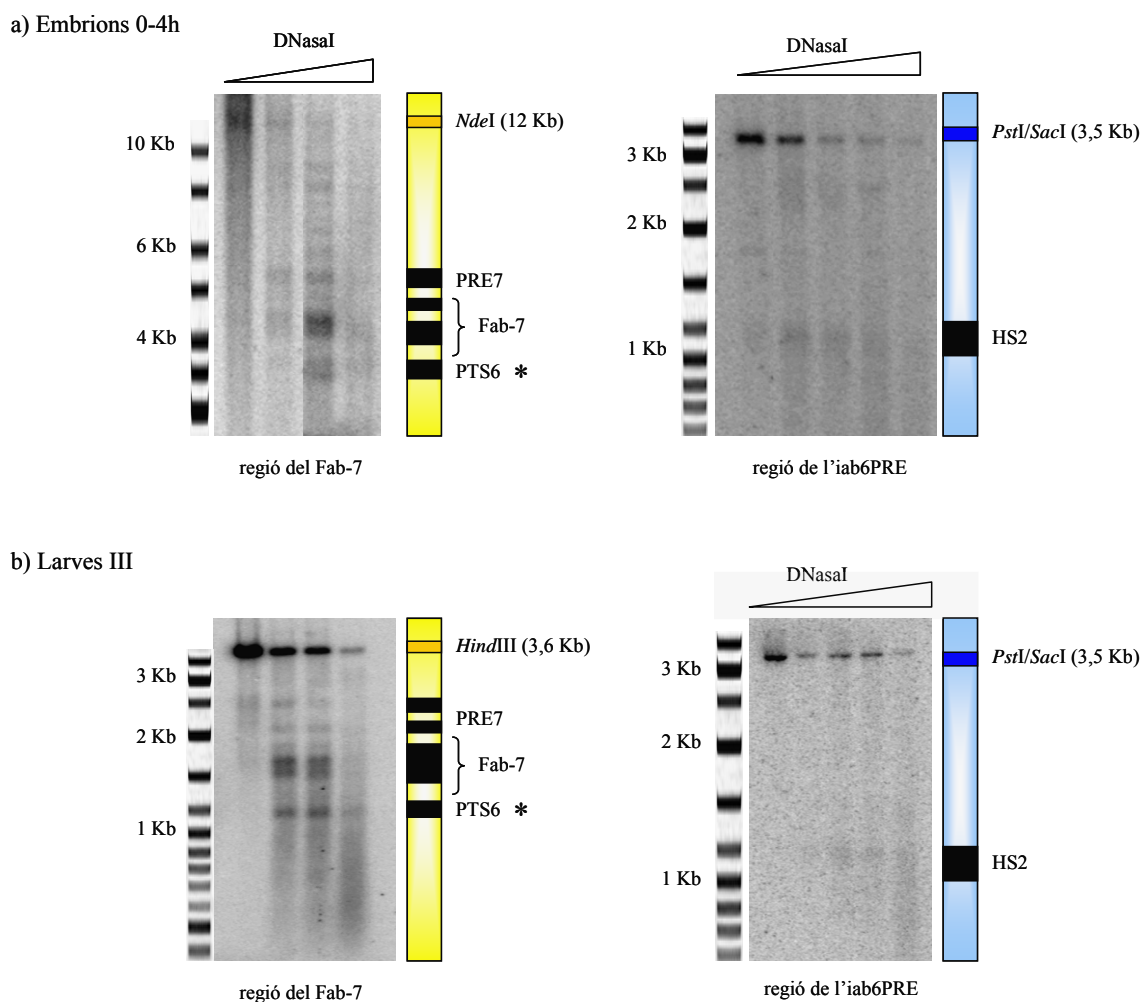


Figura 4.16. a) Assajos d'hipersensibilitats a DNasaI a embrions 0-4h de la regió del Fab-7 i de l'iab6PRE. En tots dos casos s'observen els llocs hipersensibles majoritaris, i a la regió del Fab-7 també s'hi poden detectar els llocs corresponents a l'iab7PRE i al PTS6. b) Assajos d'hipersensibilitats a DNasaI a larves en estadi de desenvolupament III del Fab-7 i l'iab6PRE. A la regió del Fab-7 s'observa el patró característic de quatre llocs hipersensibles, mentre a l'iab6PRE només s'hi distingeix el lloc HS2.

BX-C és molt important a l'hora de permetre el correcte funcionament d'aquests elements i, en conseqüència, la correcta expressió dels gens homeòtics.

4.2.2.2. L'IAB6 només és hipersensible en estadis primerencs del desenvolupament

Fins el moment, totes les regions hipersensibles a DNasaI estudiades s'han pogut identificar en diferents moments del desenvolupament, des d'estadis primerencs, en què encara no s'ha establert l'estat definitiu de la cromatina, fins a larva III, en què el patró d'expressió dels gens homeòtics ja es troba mantingut per les proteïnes dels grups Pc i Trx.

Així doncs, sembla que aquests llocs accessibles o lliures de nucleosomes són molt estables al llarg del desenvolupament. Val a dir, que els elements estudiats fins el moment són imprescindibles per al manteniment de determinats estats de la cromatina, tant actius com reprimits. Per aquest motiu, vam decidir estudiar l'accessibilitat a nucleases d'un element no implicat en el manteniment de l'estructura de la cromatina, sinó només en l'establiment del patró inicial: l'IAB6. S'ha descrit que aquest element només és funcional a la fase d'iniciació del desenvolupament, o sigui, durant l'establiment dels estadis actius i reprimits de la cromatina (Cleard *et al.*, 2006). Donat que ja havíem determinat l'existència d'aquest lloc lliure de nucleosomes a embrions, vam decidir mirar si també el podíem trobar a larves en estadi III del desenvolupament, en què, en principi, no és funcional.

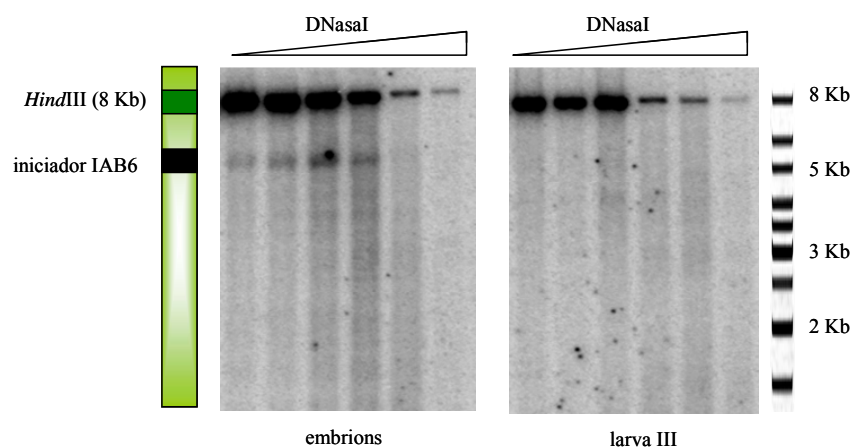


Figura 4.17. Hipersensibilitats a DNasaI de l'iniciador IAB6. A embrions, en què l'IAB6 recruta factors encarregats de l'activació o repressió de l'*Abd-B*, l'iniciador mostra accessibilitat a la nucleasa; d'altra banda, a larva III, en què el patró d'expressió del gen es manté mitjançant les proteïnes dels grups Pc i Trx, aquest lloc no es pot detectar.

Com es pot veure a la figura 4.17, a larva III no sembla que l'IAB6 presenti la hipersensibilitat que hem observat a embrions. Aquest resultat suggereix que aquest element es manté en un estat accessible als primers estadis del desenvolupament, probablement degut a que ha de ser reconegut pels productes dels gens *gap* i *pair-rule* durant la fase d'iniciació per a establir estats activats o reprimits del gen a cada segment, però que, un cop ha finalitzat la fase d'iniciació i comença la fase de manteniment, no cal que aquest element es mantingui en un estat accessible al recrutament dels activadors o repressors i aquesta hipersensibilitat es dilueix al llarg de les divisions mitòtiques fins que no es pot detectar mitjançant aquest assaig.

4.2.2.3. La regió del Fab-7 també és hipersensible en còpies ectòpiques

D'altra banda, ens vam preguntar si aquestes hipersensibilitats també es donaven en elements ectòpics funcionalment actius fora del context del Complex Bitòrax. Amb aquest objectiu vam decidir realitzar assajos d'hipersensibilitat a la nucleasa d'una línia de mosques que presentaven una còpia ectòpica de tota la regió del Fab-7. Aquesta línia va ser cedida pel laboratori del Dr. Renato Paro i s'anomena 5F24.

Les mosques 5F24, que presenten el transgèn 5F24 inserat al cromosoma X, expressen els gens *βgal* i *white* sota el control de tota la regió del Fab-7 (que inclou l'element boundary Fab-7, l'*iab7PRE* i el *PTS6*) (figura 4.18.a) (Zink *et al.*, 1995). En aquestes mosques, els gens reporter *βgal* i *white* mostren PSS, fins el punt que les femelles homozigotes tenen els ulls blancs com si fossin *white*.

El transgèn 5F24 es troba inserat a prop del gen *scalloped* (*sd*), que controla el desenvolupament de l'ala de la mosca. S'ha vist que el silenciament mediat per l'element regulador del transgèn en homozigosi condueix a la repressió del gen *sd*, de manera que les mosques 5F24 presenten unes ales deformes, i que aquesta repressió depèn de les proteïnes del Pc-G (Bantignies *et al.*, 2003). Per tant, en aquest transgèn l'element regulador és funcional, presenta PSS i respon a Pc i Trx.

Així doncs, vam realitzar experiments d'hipersensibilitat a DNaseI per a determinar si l'element Fab-7 també és hipersensible quan es troba en una còpia ectòpica funcional. Per a identificar específicament les hipersensibilitats que es corresponen a l'element ectòpic i no al

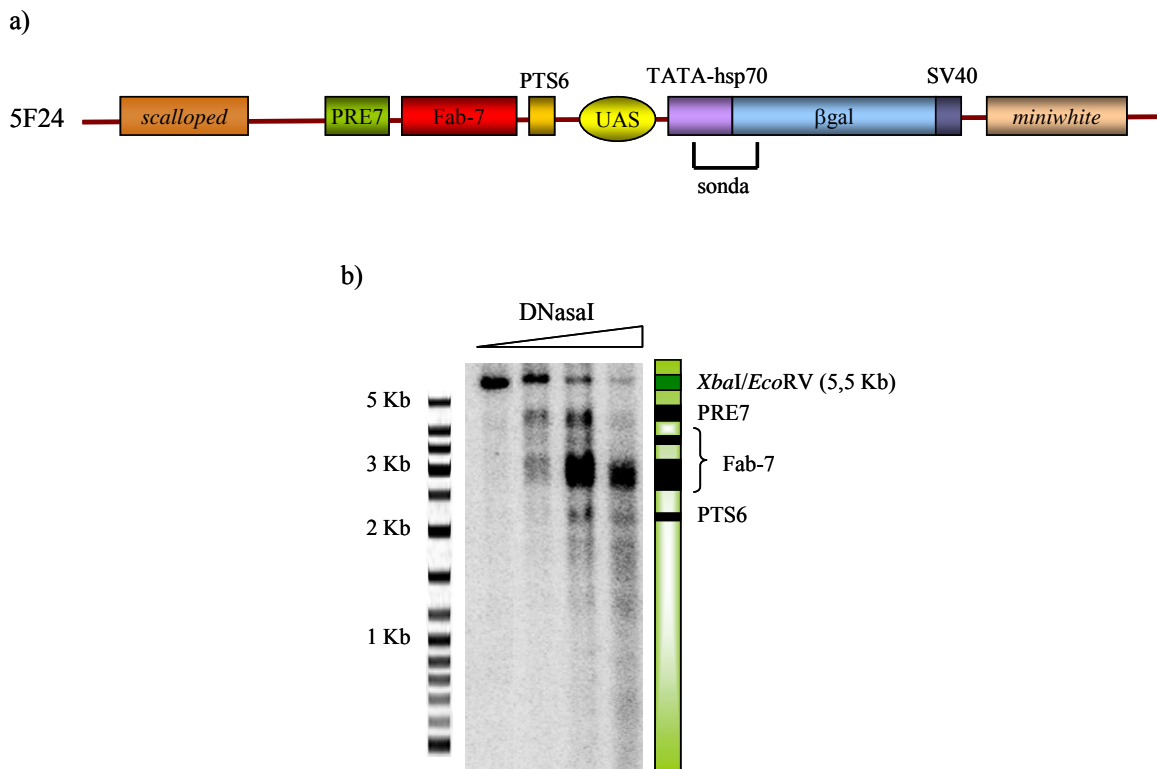


Figura 4.18. a) Esquema de la línia transgènica 5F24. La regió del Fab-7 es localitza *upstream* dels gens reporter, i es troba amb el PRE a la regió distal. b) Hipersensibilitats de la regió del Fab-7 ectòpica. La membrana s'ha hibridat amb la sonda indicada a la figura (a), que va ser generada mitjançant PCR amb els primers hspTATAU i LACZL. L'element ectòpic presenta el mateix patró d'hipersensibilitats que l'endogen.

Fab-7 endogen vam revelar la membrana amb una sonda que hibridava amb una regió adjacent al gen *βgal*, que només es troba al transgèn.

Com es pot veure a la figura 4.18.b, el patró d'hipersensibilitats detectat en aquest element ectòpic és molt similar al descrit a la regió del Fab-7 endògena. Aquest resultat indica que la deposició o l'espaiament dels nucleosomes d'aquesta regió reguladora no depèn del context del BX-C. Si bé, és possible que aquest posicionament dels nucleosomes sigui conduït pel recrutament de complexes del Pc-G o del Trx-G a l'element de manteniment del transgèn, ja que s'ha vist que alguns d'aquests complexes presenten activitats remodeladores de la cromatina i implicades en l'ensamblatge i l'espaiament dels nucleosomes (Klymenko *et al.*, 2006; Narlikar *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2007).

4.2.2.4. Les hipersensibilitats no depenen de la presència d'elements de manteniment

Com hem vist, molts dels complexos del Trx-G s'han identificat com a complexos responsables de la remodelació de la cromatina ATP-dependent i presenten activitats implicades en el desplaçament, l'ensamblatge i el desensamblatge dels nucleosomes (Grimaud *et al.*, 2006b). D'altra banda, també s'ha identificat un complex que presenta activitat remodeladora de la cromatina i que podria jugar un paper en el silenciament promogut per Pc a través del seu recrutament als PREs mediat per Pho: el complex Pho-RC (Klymenko *et al.*, 2006).

Donat els resultats observats, ens vam preguntar si l'establiment dels llocs lliures de nucleosomes depenia del recrutament de proteïnes dels grups Pc i/o Trx als elements de manteniment. D'aquesta manera, vam realitzar assajos d'hipersensibilitat a DNasaI de l'element Fab-7 ectòpic d'embrions transgènics de les línies 2.1 i 8.1 de la construcció Fab-7, que no presenten l'element de manteniment adjacent (figura 4.19).

En aquest cas, per tal d'hibridar la regió del Fab-7 ectòpic específicament vam emprar un fragment del promotor del *miniwhite* marcat radiactivament.

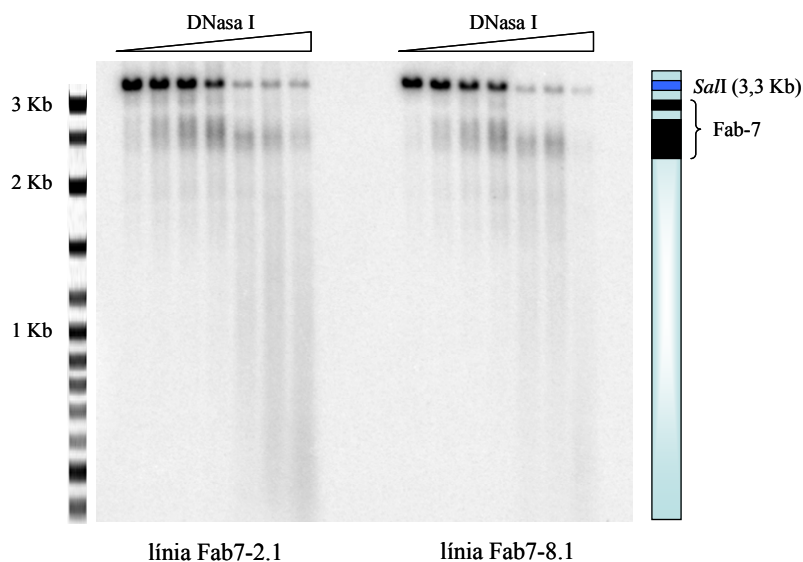


Figura 4.19. Hipersensibilitats a DNasaI de les regions Fab-7 ectòpiques de les línies 2.1 i 8.1 de la construcció Fab-7 en homozigosi. Totes dues línies mostren els dos llocs lliures de nucleosomes que corresponen al Fab-7.

A la figura 4.19 es pot veure com totes dues línies semblen presentar hipersensibilitats a la DNasaI. En tots dos casos s'observen els dos llocs hipersensibles que corresponen al Fab-7. Aquest experiment ens suggereix que la presència de llocs hipersensibles no depèn ni del context ni dels elements de manteniment adjacents. Així doncs, sembla que l'establiment d'aquestes regions lliures de nucleosomes no depèn del recrutament de proteïnes dels grups Pc ni Trx als elements de manteniment; aquesta observació recolza el fet que les hipersensibilitats s'hi trobin des de l'inici del desenvolupament.

4.2.2.5. La cromatina és accessible a la DNasaI quan es troba en un estat totalment silenciàt

Finalment, ens vam preguntar si els llocs hipersensibles eren observables en estadis de la cromatina totalment silenciats en què, en principi, les proteïnes del Pc-G haurien de cobrir tota la regió i, com s'ha suggerit, compactar-la (Ebert *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2004). D'aquesta manera, vam realitzar assajos d'hipersensibilitats a DNasaI d'embrions de la línia iab6HS2-9.2 (línia que presenta un silenciament molt fort en homozigosi) i vam comparar les hipersensibilitats de l'element ectòpic entre individus homozigots (en què el transgèn es troba totalment silenciàt) i heterozigots (que expressen parcialment el transgèn) (figura 4.20).

Així doncs, vam observar que els llocs hipersensibles eren detectables tant en embrions heterozigots com homozigots, indicant que, tot i que els individus homozigots presenten un silenciament molt fort del transgèn degut a l'aparellament entre els elements PREs, la nucleasa és igualment accessible a la cromatina, de manera que el silenciament degut a l'aparellament dels elements PRE no deu promoure la formació d'estructures compactes de la cromatina.

Tots els resultats obtinguts indiquen que la presència de llocs lliures de nucleosomes a les regions reguladores és molt estable, i que es poden formar independentment del context. De la mateixa manera, aquestes regions hipersensibles a la digestió amb DNasaI no depenen de l'estat transcripcional de la cromatina ni de la presència d'elements de manteniment que promoguin el recrutament de complexos dels grups Pc i/o Trx, que podrien conduir a una remodelació de la cromatina.

Si bé, l'accessibilitat de la nucleasa sí que es veu alterada en l'element iniciador IAB6 en estadis tardans del desenvolupament larvari, suggerint que el fet que aquests regions siguin lliures de nucleosomes pot ésser necessari per a la funcionalitat de l'element regulador.

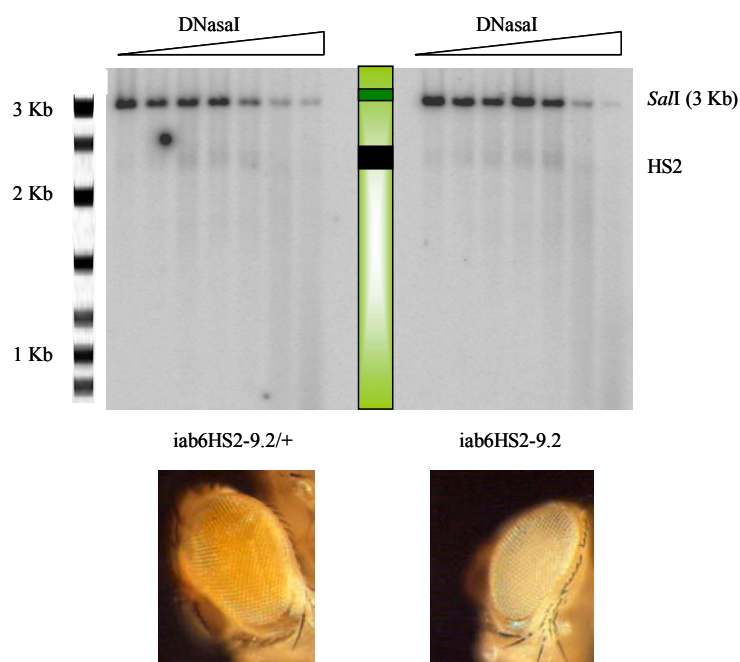


Figura 4.20. Hipersensibilitats a DNaseI de l'element *iab6PRE* ectòpic d'embrions heterozigots (esquerra) i homozigots (dreta) de la línia *iab6HS2-9.2*. En tots dos casos l'element ectòpic mostra la hipersensibilitat HS2. El fet que en homozigosi les mosques no presentin pigmentació als ulls indica que la repressió del transgèn conduïda pel PRE és molt forta; no obstant, la regió és accessible a la digestió de la DNaseI.

4.2.3. Les diferents regions reguladores contacten entre elles al nucli de cèl·lules en cultiu

El genoma s'organitza al nucli cel·lular formant estructures tridimensionals que permeten i/o potencien el contacte entre regions reguladores de l'expressió gènica (Bode *et al.*, 2003). S'ha vist que els enhancers són capaços de contactar amb els seus promotors tant en *cis* com en *trans*, i que la regulació d'aquests contactes permet la correcta expressió del gen en un moment o teixit determinat (Dean, 2006; Dorsett, 1999; Li *et al.*, 2006; Sipos *et al.*, 1998).

S'ha suggerit que els contactes entre enhancer i promotor es podrien veure afavorits per la formació de dominis de cromatina intranuclears. Aquests dominis es trobarien separats entre ells mitjançant elements boundary o insulator (Bode *et al.*, 2003). Recentment, s'ha suggerit que els boundaries podrien jugar també un paper estructural en l'organització de la cromatina nuclear. S'ha vist que els insulators del retrotransposó *gypsy*, per exemple, presenten llocs d'ancorament a la membrana nuclear (MAR) i a l'*scaffold* (SAR) del cromosoma. Els insulators podrien ser, doncs, no només una barrera entre diferents regions de cromatina, sino que també podrien establir una estructura de la cromatina nuclear que potenciés uns o altres contactes per a induir determinats estats transcripcionals (Capelson *et al.*, 2004). Els boundaries descrits al BX-C no presenten llocs MAR o SAR, però també s'ha suggerit que formessin estructures tridimensionals de la cromatina mitjançant la interacció amb d'altres elements boundary i la formació de *loops* (Cleard *et al.*, 2006).

Finalment, també s'han descrit interaccions entre elements PRE/TRE, els quals podrien contactar a través dels Pc *bodies* (estructures nuclears formades per proteïnes del Pc-G que podrien representar dominis de repressió) per tal d'establir dominis silenciats de la cromatin (Bantignies *et al.*, 2003).

Així doncs, i amb l'objectiu d'aprofundir en els diferents mecanismes implicats en la regulació de l'*Abd-B*, ens vam proposar analitzar els possibles contactes entre regions reguladores del BX-C a cèl·lules S2 de *Drosophila melanogaster*.

4.4.3.1. Chromosome Conformation Capture

Amb l'objectiu d'estudiar l'estructura de la cromatina nuclear vam utilitzar una tècnica desenvolupada recentment: el *Chromosome Conformation Capture* (3C) (Dekker *et al.*, 2002). Aquesta tècnica consisteix en fixar la cromatina del nucli cel·lular i determinar quines regions de DNA contacten entre elles (figura 4.21).

L'estructura de la cromatina es fixa mitjançant un tractament amb formaldehid, que crosslinka els contactes proteïna-proteïna i proteïna-DNA que s'estiguin produint en el moment de la fixació. En l'estructura tridimensional del nucli, molts elements es trobaran molt a prop aleàtoriament, donada l'elevada difusió de partícules en aquest orgànul: aquests elements es fixaran a l'atzar a cada cèl·lula. D'altra banda, hi haurà regions de DNA que contactin sovint amb d'altres regions que controlen (per exemple, els enhancers hauran de

contactar amb els promotors per tal d'activar-los), o amb els que presenten una regulació coordinada; aquestes regions es trobaran freqüentment juntes al context nuclear, i s'hi fixaran freqüentment. En un *pool* de cromatina crosslinkada, hi haurà molts fragments de DNA crosslinkats amb d'altres regions de forma aleatòria, però hi haurà un fort enriquiment d'elements fixats a regions de DNA amb les que contactin al nucli de forma específica.

L'objectiu de l'assaig de 3C és determinar quines seqüències de DNA es troben freqüentment a prop al nucli cel·lular. Així doncs, el *pool* de cromatina crosslinkada es digereix amb un enzim de restricció, i el DNA digerit es lliga en un volum de reacció gran, que afavorirà les lligacions intramoleculares front les intermoleculares. D'aquesta manera, les regions que hagin estat crosslinkades amb més freqüència, també es lligaran amb més freqüència.

Per a detectar les regions que s'han lligat, la cromatina es descrosslinka i s'analitzen els fragments obtinguts mitjançant PCR. Si en una reacció de PCR s'utilitzen oligos que es troben molt llunyans a la seqüència de DNA, només amplificaran aquells fragments que s'hagin crosslinkat, digerit i lligat amb certa freqüència. Tots els fragments que s'hagin lligat

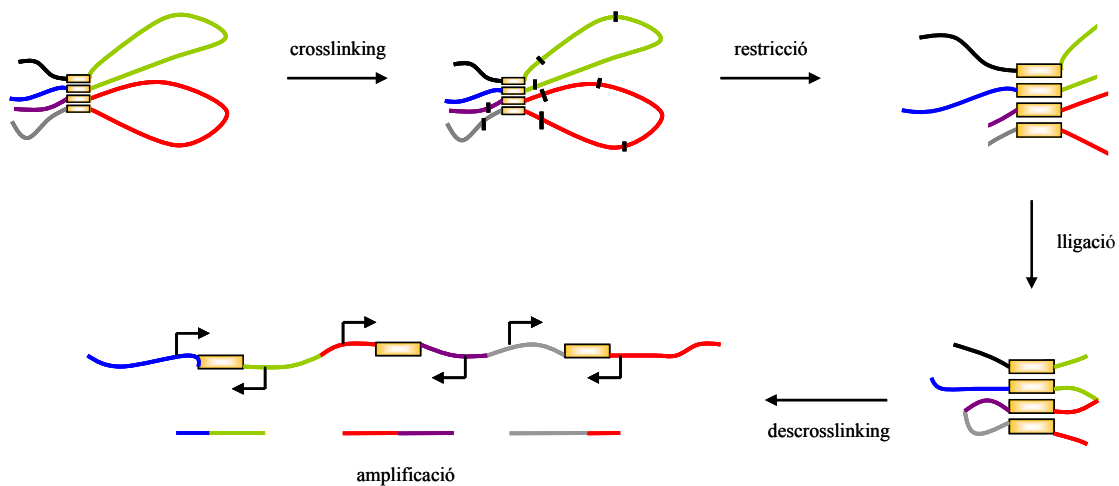


Figura 4.21. Assaig de 3C. La cromatina nuclear és crosslinkada, de manera que totes les regions que es troben a prop al nucli cel·lular es fixen. Els nuclis es digereixen amb un enzim de restricció i es lliguen en condicions molt diluïdes, que afavoreixen les lligacions intramoleculares. En descrosslinkar la cromatina, s'obtenen unes fibres de cromatina híbrides, en que seqüències que es troben molt llunyanes al genoma, estan molt a prop. Utilitzant oligos que hibriden en aquestes seqüències allunyades, es poden amplificar fragments que només es detectaran si aquestes seqüències es troben a prop al nucli cel·lular amb certa freqüència.

per atzar seran més difícils de detectar mitjançant PCR, ja que es trobaran en menys freqüència que tots aquells que es trobin sovint a prop en el context del nucli cel·lular.

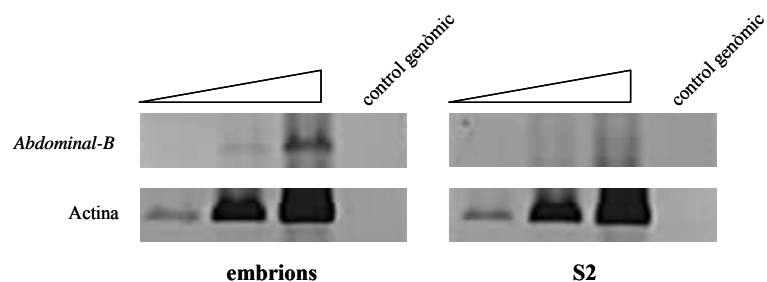
4.2.3.2. Les nostres cèl·lules S2 no expressen l'*Abd-B*

Donat que l'assaig de 3C depèn de la probabilitat de que les diferents regions contactin entre sí en el nucli, vam decidir realitzar els experiments en un sistema que no presentés variabilitat d'estats de la cromatina del BX-C. D'aquesta manera, vam realitzar els experiments amb la línia cel·lular de *Drosophila* S2.

En primer lloc, vam voler determinar si aquesta línia cel·lular embrionària expressava el gen *Abd-B*, ja que els contactes que es formin en un estat transcripcionalment actiu seran molt diferents als que tinguin lloc en un estat silenciàt.

Així doncs, vam realitzar RT-PCRs d'extractes d'RNA de la línia S2 de *Drosophila* (figura 4.22) i vam observar que la nostra línia cel·lular no expressava el gen homeòtic *Abd-B*, suggerint que la cromatina d'aquesta regió es podria trobar en un estat tancat.

Figura 4.22. RT-PCRs de l'*Abdominal-B*. Hem utilitzat com a control la regió de l'actina. Sembla que a la línia S2 el gen *Abd-B* no s'expressa, o ho fa a nivells no detectables per RT-PCR.



4.2.3.3. Les regions reguladores contacten entre sí i amb el promotor de l'*Abd-B*

Per a estudiar els possibles contactes entre les diferents regions de l'*Abd-B* vam digerir la cromatina crosslinkada amb l'enzim *EcoRI*, que presentava una diana de restricció a prop de totes les regions reguladores a analitzar. En segon lloc, vam dissenyar oligonucleòtids que es trobessin a prop de les dianes de restricció, de manera que els fragments a amplificar no superessin 1 Kb de longitud. (figura 4.23.a). L'amplificació dels fragments híbrids no només depèn de la freqüència amb que aquests fragments es trobin presents a la mostra, sinó que també depèn de l'eficiència de la reacció d'amplificació.

D'aquesta manera, fragments poc representats a la mostra poden ser més eficients a l'hora d'amplificar-se per PCR que fragments més representats, de manera que alguns fragments podrien no ser detectats alhora que es podrien obtenir falsos positius. Per aquest motiu, vam realitzar controls amb mostres que contenien quantitats equimolars dels diferents fragments lligats, de manera que només s'han analitzat els fragments que amplificaven quantitats equivalents als controls (figura 4.23.b, gel inferior).

Així doncs, hem analitzat els possibles contactes que es poden establir entre el promotor del gen *Abd-B* i les regions reguladores iab6PRE i IAB6. Com es pot veure als carrils 1 i 4 del gel superior de la figura 4.23.b, sí s'observa amplificació del fragment híbrid corresponent a la lligació entre les regions *Abd-Bp* i iab6PRE, suggerint que aquestes regions sovint es troben a prop en el context del nucli cel·lular; en canvi, no sembla que aquest contacte es produeixi entre el promotor del gen homeòtic i l'iniciador de l'iab-6: l'IAB6, tot i que, com es pot veure als controls de PCR del gel inferior, tots dos fragments semblen ser igualment efectius a l'hora d'amplificar-se.

L'element iab6PRE, però, no només sembla contactar amb el promotor de l'*Abd-B*, sinó que també sembla trobar-se a prop d'altres regions reguladores del BX-C. D'aquesta manera, doncs, també s'observa amplificació dels fragments corresponents a la lligació entre l'iab6PRE i els elements de manteniment MCP i bxdPRE. No sembla tampoc en aquest cas que l'iniciador IAB6 contacti amb cap d'aquests elements.

Donat els resultats observats podem concloure que, en un sistema en que no s'expressa el gen *Abd-B*, l'iab6PRE sembla contactar amb el promotor del gen i amb d'altres elements de manteniment; aquestes observacions suggereixen que aquests contactes podrien participar en la regulació de l'*Abd-B*. El fet que els diferents PREs semblin trobar-se a prop entre ells pot indicar que el recrutament d'aquestes proteïnes de manteniment permet l'acostament entre elements reguladors, bé per a potenciar el silenciament, bé per a promoure la formació de regions de silenciament al nucli cel·lular.

Cal remarcar que l'iab6PRE no sembla interaccionar només amb les regions reguladores encarregades de la regulació de l'expressió de l'*Abd-B*, sinó que sembla que també contacta amb un element de manteniment del *locus* de l'*Ultrabithorax*: el bxdPRE, tot i que la distància entre ambdues seqüències sigui superior a les 100 Kb. Aquest resultat suggereix que la regulació de l'expressió dels diferents gens homeòtics podria estar interrelacionada.

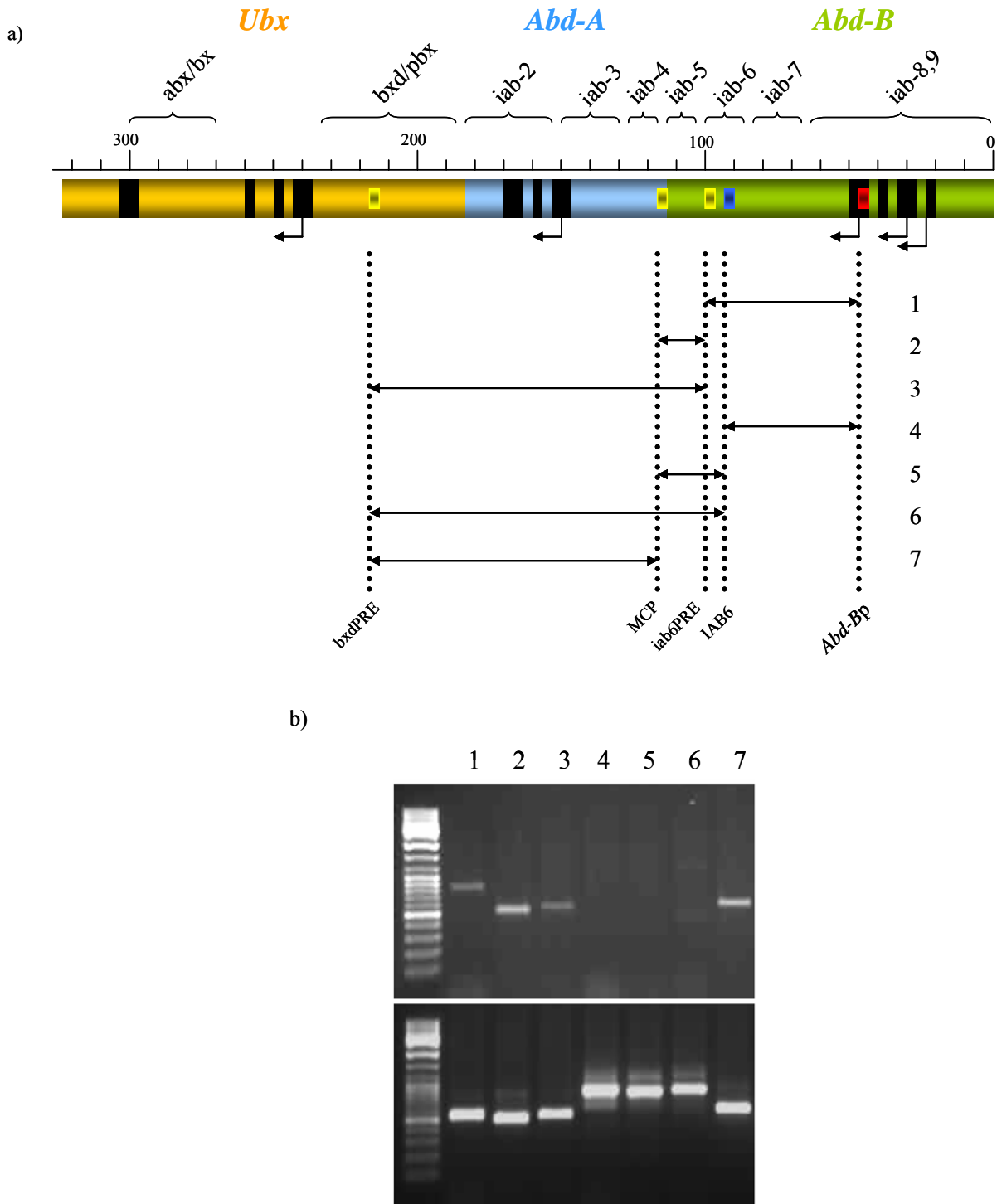


Figura 4.23. a) Estructura del BX-C. Les fletxes representen els inicis de transcripció dels tres gens homeòtics. Els quadrats interiors indiquen les regions reguladores on hibriden els diferents primers utilitzats en les amplificacions. A la part inferior s'indiquen els diferents fragments amplificats i els carrils als que corresponen. b) Al gel superior es veuen els fragments amplificats obtinguts en l'assaig de 3C. La regió iab6PRE contacta amb el promotor de l'*Abd-B* i amb d'altres regions reguladores, com l'MCP i el bxdPRE. En canvi, l'iniciador IAB6, que es troba a tan sols 5 Kb de l'iab6PRE, no sembla contactar amb cap d'aquestes regions donat que no s'observa amplificació. Al gel inferior es poden veure els fragments obtinguts de l'amplificació control realitzada a partir de la lligació de quantitats equimolars de cada regió. Com es pot veure, tots els fragments semblen amplificar amb una eficiència similar.

En canvi, els elements iab6PRE i IAB6, que es troben només a 5 Kb de distància, sembla que presenten diferents localitzacions al nucli cel·lular. De fet, sembla que l'element iniciador no es troba a prop de cap de les regions reguladores analitzades. Aquest resultat sembla recolzar la formació d'estructures tridimensionals al nucli, com *loops* de DNA, en que les regions reguladores (els PREs del BX-C en aquest cas) contacten entre elles i es localitzen en un domini nuclear de regulació, mentre les regions no reguladores es mantenen fora del domini.

4.3. Participació de dSAP18 i GAGA en la regulació de l'Abdominal-B

4.3.1. dSAP18 està implicat en el silenciament del Fab-7 però no n'altera la cromatina

Mitjançant un crivellatge de doble híbrid, es va veure que la proteïna dSAP18 (*Sin-3 associated polypeptid*) interaccionava amb el domini POZ de GAGA. S'ha descrit que, a mamífers, SAP18 forma part dels complexos de desacetil·lases d'histones que contenen Sin-3. D'altra banda, s'ha vist que dSAP18 es troba sobre la regió del BX-C a cromosomes politènics de *Drosophila melanogaster* i s'ha suggerit que es troba implicada en la regulació de l'expressió del gen *Abd-B*, ja que la falta de dSAP18 sembla potenciar la transformació homeòtica A6 a A5. Aquesta transformació es pot associar amb una falta de funció de l'element boundary Fab-7; s'ha vist que dSAP18 es troba associat i modula la funcionalitat d'aquest element en còpies ectòpiques (Canudas *et al.*, 2005; Espinas *et al.*, 2000).

Així doncs, amb l'objectiu d'aprofundir en la possible funció de dSAP18 en l'activitat de l'element boundary Fab-7 vam analitzar diferents aspectes de l'estat de la cromatina en absència de la proteïna. Per aquest motiu, vam utilitzar mosques que presentaven les deficiències *Df(3R)sbd⁴⁵* i *bin1*, que són delecions del cromosoma III que afecten el gen *bin1* (que codifica per a la proteïna dSAP18) i que són letals en homozigosi però són viables en doble heterozigosi, de manera que podem obtenir individus sense res de proteïna.

4.3.1.1. La falta de dSAP18 altera el silenciament promogut pels elements Fab-7 i iab7PRE ectòpics

En primer lloc, vam analitzar l'efecte de la falta de dSAP18 al silenciament promogut per l'element boundary Fab-7 i l'element de manteniment iab7PRE. Amb aquest objectiu vam realitzar creuaments per tal d'obtenir mosques transgèniques de la línia 7.2 de la construcció B+P7 amb un fons mutant per a la proteïna dSAP18 (figura 4.24). Com es pot veure, la falta de dSAP18 sembla que promou la desrepressió del transgèn quan aquest es

troba en homozigosi, ja que s'observa una disminució de la variegació i un lleuger augment de la pigmentació de l'ull. Aquest efecte és molt similar a l'observat en mutar la proteïna Polycomb, suggerint que dSAP18 pot estar jugant un paper en el silenciament promogut per les regions reguladores Fab-7 i iab7PRE.

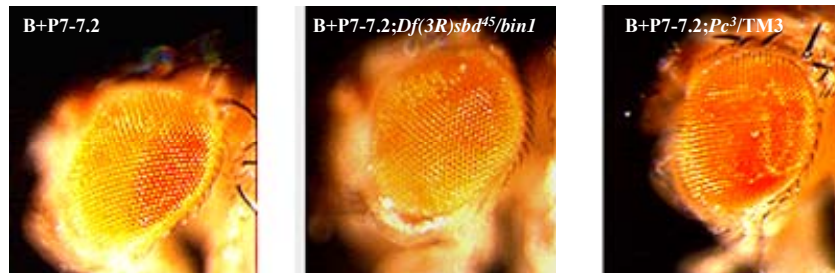


Figura 4.24. Mosques femelles homozigotes de la línia B+P7-7.2. A l'esquerra es troba representada una femella salvatge. La falta de dSAP18 (al centre) sembla induir desrepressió del transgèn, ja que es perd variegació i s'observa un lleuger enfosquiment del color de l'ull. Aquest efecte és similar al que s'observa en un fons mutant de Polycomb (a la dreta).

Aquest resultat concorda amb resultats obtinguts prèviament utilitzant la línia 5F24 (Canudas *et al.*, 2005). Aquesta construcció, com hem vist, presenta l'element Fab-7 insertat al costat del gen *scalloped*, que es veu fortament reprimat per la presència de l'element transgènic, generant un fenotip d'ales aberrants (Bantignies *et al.*, 2003). S'ha vist que la mutació de la proteïna dSAP18 en el fons 5F24 produeix una desrepressió de la regió, de manera que es recupera el fenotip normal de les ales (Canudas *et al.*, 2005). A més, en aquests individus, l'aparellament dels elements PRE ectòpics condueix al silenciament del gen reporter *white*, que també es veu alterat en el fons mutant per a dSAP18.

Així doncs, aquestes observacions suggereixen una implicació de dSAP18 en el silenciament dels gens homeòtics; aquest silenciament podria tenir lloc mitjançant la seva participació en complexos repressors de la transcripció gènica (Zhang *et al.*, 1997).

D'altra banda, ja que s'ha proposat que dSAP18 podria estar implicada en el funcionament de l'element boundary Fab-7 (Canudas *et al.*, 2005), també vam realitzar creuaments per a obtenir mosques transgèniques amb la construcció Fab-7 en un fons mutant per a aquesta proteïna (taula 4.2). En aquest cas, l'efecte observat a la pigmentació dels ulls és molt lleuger, i només és observable en una de les tres línies analitzades.

Aquest resultat podria indicar una implicació de dSAP18 en el silenciament promogut per l'element boundary Fab-7, però el fet que el silenciament observat a la línia Fab7-8.1 (que és la línia que mostra una pigmentació més clara dels ulls, cosa que en principi ens

podria suggerir una millor activitat *enhancer-blocking* de l'element boundary) no es vegi alterat en disminuir la quantitat de Pc ni dSAP18, ens indica que, o bé l'activitat bloquejadora del Fab-7 no depèn d'aquestes proteïnes o bé el silenciament observat en aquesta línia és degut al lloc d'inserció del transgèn. Així doncs, cal un estudi més acurat per a poder determinar la implicació de dSAP18 en la regulació de l'activitat *enhancer-blocking* del Fab-7.

	Fab-7 2.1	Fab-7 8.1	Fab-7 12.6
<i>Pc</i> ³	+	-	+
<i>Df(3R)sbd^{H5}/bin1</i>	-	-	+

Taula 4.2. Resultats observats en situar el transgèn Fab-7 en un fons mutant per a Polycomb i per a dSAP18. El signe + indica un lleuger enfosquiment, i el signe - indica que no s'observa cap efecte a la pigmentació. La falta de dSAP18 promou un lleuger enfosquiment dels ulls de les femelles de la línia 12.6, i no genera cap fenotip en les línies 2.1 i 8.1, mentre que en el fons mutant de Pc, s'observa un enfosquiment de la pigmentació a les línies 2.1 i 12.6.

4.3.1.2. La falta de dSAP18 no altera l'acetil·lació de les histones del Fab-7 ni les hipersensibilitats a DNasaI

Com hem vist, tant la regió del Fab-7 com la de l'*iab7PRE* es troben hipoacetil·lades a embrions de *Drosophila*. Prèviament s'ha vist que mSAP18, l'homòleg de mamífers de dSAP18, es troba als complexos de desacetil·lases d'histones Sin3/HDAC1 (Zhang *et al.*, 1997). A *Drosophila* també s'ha descrit una interacció funcional entre ambdues proteïnes en la regulació de l'expressió de l'*Abd-B* (Canudas *et al.*, 2005).

En segon lloc, doncs, i amb l'objectiu de determinar si dSAP18 estava actuant conjuntament amb les desacetil·lases d'histones en la regulació de l'activitat del Fab-7, vam realitzar ChIPs amb anticossos que reconeixen les histones H3 i H4 acetil·lades a embrions de *Drosophila* salvatges i deficientes per a la proteïna dSAP18 (figura 4.25.a). Sembla, però, que la falta de dSAP18 no altera el patró d'acetil·lacions de les histones H3 i H4, ja que també en absència d'aquesta proteïna s'observa hipoacetil·lació d'aquestes histones.

Finalment, donat que dSAP18 interacciona amb GAGA, i que s'ha descrit una implicació de GAGA amb complexos remodeladors de la cromatina (Shimoyama *et al.*, 2003; Tsukiyama *et al.*, 1995b) vam analitzar si dSAP18 estava implicada en l'espaiament o l'ensamblatge dels nucleosomes a la regió del Fab-7.

Així doncs, vam realitzar assajos d'hipersensibilitats a DNasaI amb mosques mutants *Df(3R)sbd⁴⁵/bin1* (figura 4.25.b) sobre la regió del Fab-7 endògena i sobre una regió ectòpica, assajos pels quals vam utilitzar embrions transgènics 5F24, en que la falta de dSAP18 promou una alteració del silenciament conduït per l'element *iab7PRE* ectòpic (Canudas *et al.*, 2005). En cap dels dos casos sembla, però, que l'absència de dSAP18 a *Drosophila* afecti ni l'ensamblatge ni la posició dels nucleosomes, ja que el patró d'hipersensibilitats és idèntic a l'observat prèviament.

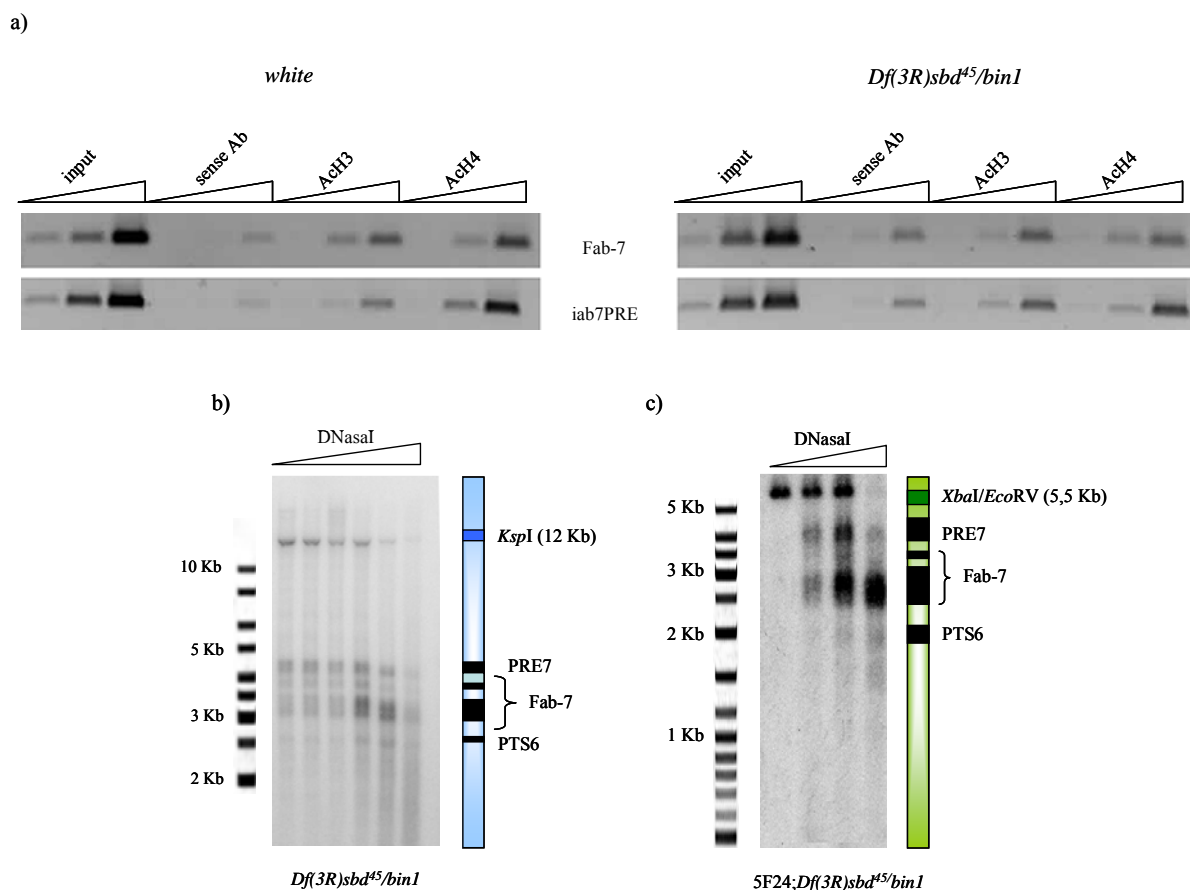


Figura 4.25. a) ChIPs amb anticossos que reconeixen les histones H3 i H4 acetil·lades a embrions *white* i *Df(3R)sbd⁴⁵/bin1* de *Drosophila*. La falta de dSAP18 no sembla afectar el patró de modificacions de les cues de les histones. b) Hipersensibilitats a DNasaI a embrions de *Drosophila* mutants per a dSAP18. També en aquest cas sembla que l'absència de dSAP18 no altera l'estructura de la cromatina. c) Hipersensibilitats a DNasaI de l'element ectòpic Fab-7 d'embrions 5F24, en absència de dSAP18. Tampoc a un element ectòpic sembla que la falta de dSAP18 afecti la posició dels nucleosomes.

Aquests resultats suggereixen que el paper que juga dSAP18 en la regulació de l'expressió de l'*Abd-B* no deu estar relacionat amb la deposició dels nucleosomes o amb el patró d'acetil·lació de les histones H3 i H4 a la regió del Fab-7.

4.3.2. GAGA i la regulació del Complex Bitòrax

La proteïna GAGA es va classificar originalment com a membre del grup Trithorax degut a l'observació de que al·lels mutants per *trl* mostraven transformacions homeòtiques de dominis posteriors a anteriors (Biggin *et al.*, 1988; Farkas *et al.*, 1994). Posteriorment s'ha suggerit que GAGA podria participar en la regulació dels gens homeòtics mitjançant el recrutament de complexos dels grups Pc i Trx als elements de manteniment del BX-C, donat que els seus llocs d'unió al DNA són imprescindibles per a que es doni el silenciament mediat per Pc (Busturia *et al.*, 2001; Horard *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2001).

D'altra banda, s'ha suggerit que aquesta proteïna podria estar implicada en el contacte entre diferents regions reguladores i que podria conduir l'activació d'un promotor pel seu enhancer (Lehmann, 2004). Finalment, GAGA també s'ha relacionat amb l'activitat *enhancer-blocking* dels elements boundary del BX-C; d'aquesta manera, s'ha vist que els elements boundary contenen llocs d'unió d'aquesta proteïna, i que la seva mutació condueix a una disminució de l'activitat bloquejadora de l'element (Belozerov *et al.*, 2003; Melnikova *et al.*, 2004; Mihaly *et al.*, 1997; Ohtsuki *et al.*, 1998; S. Schweinsberg *et al.*, 2004).

Si bé s'ha estudiat àmpliament la implicació de GAGA en la regulació de l'expressió dels gens homeòtics, els mecanismes pels quals té lloc aquesta regulació encara no es coneixen. Donat que GAGA interacciona amb complexos remodeladors de la cromatina (Shimajima *et al.*, 2003; Tsukiyama *et al.*, 1995b) vam proposar-nos estudiar el paper de GAGA en la remodelació de la cromatina de les regions reguladores encarregades del control de l'expressió de l'*Abd-B*.

4.3.2.1. GAGA es troba sobre algunes regions reguladores del BX-C

Amb l'objectiu d'analitzar el paper que juga GAGA en la regulació del gen *Abdominal-B* vam decidir, en primer lloc, fer un estudi de la presència de GAGA sobre les diferents regions reguladores que controlen l'expressió del gen homeòtic.

Així doncs, vam realitzar assajos d'immunoprecipitació de cromatina amb embrions 0-24h de *Drosophila* amb un anticòs que reconeix les dues isoformes del factor de transcripció (de 519 i 581 aminoàcids) (figura 4.26). Vam veure que el Fab-7 no és l'única regió boundary en que GAGA es diposita, sinó que el boundary Fab-8 també sembla reclutar aquesta proteïna, tot i que en menys quantitat que el Fab-7. Pel que fa els elements de manteniment, també s'observa un enriquiment de la regió de l'iab7PRE i MCP, tot i que el senyal obtingut a la regió de l'MCP és molt feble. No hem pogut, però, observar un enriquiment de la regió iab6PRE en els extractes immunoprecipitats.

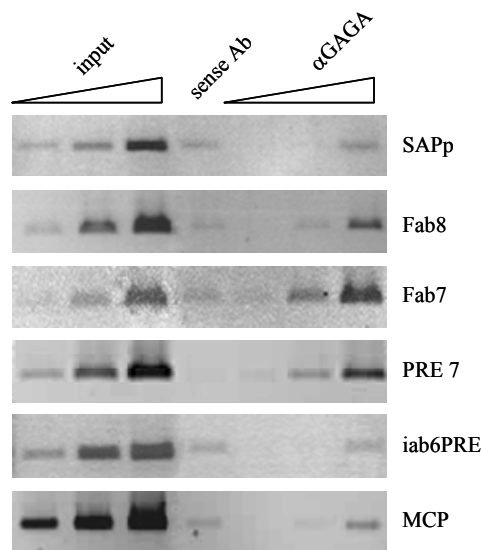


Figura 4.26. ChIPs d'embrions de *Drosophila* immunoprecipitats amb un anticòs específic de GAGA. Hem observat enriquiment de les regions boundary Fab-7 i Fab-8 i, en menor proporció, dels elements iab7PRE i MCP. No hem pogut detectar enriquiment de la nova regió iab6PRE.

El fet que GAGA es localitzi sobre diferents elements reguladors de l'expressió de l'*Abd-B* pot indicar que aquesta proteïna està implicada en les diferents activitats promogudes per aquests elements, ja siguin boundary, *enhancer-blocking*, o silenciament dependent de Pc.

4.3.2.2. La disminució de GAGA indueix una desrepressió de l'element iab7PRE ectòpic

S'ha vist que GAGA és important per a promoure el silenciament conduït pels elements de manteniment MCP i iab7PRE en construccions transgèniques (Busturia *et al.*,

2001; Hagstrom *et al.*, 1997; Mishra *et al.*, 2001), però també s'ha descrit que la mutació de *trl*, que codifica per GAGA, pot provocar un potenciament del silenciament conduït per l'element *iab7PRE* ectòpic (Cavalli *et al.*, 1999). Així doncs, vam decidir estudiar l'efecte en el silenciament d'una disminució de la quantitat de GAGA a individus amb els elements *iab7PRE* i *Fab-7* ectòpics. Vam analitzar el fenotip de mosques transgèniques B+P7 en un fons mutant per a la proteïna GAGA. Per a realitzar els creuaments vam utilitzar les mosques *trl*⁶⁷ (que presenten una deleció al gen *trl* i que és letal en homozigosi) i la línia 7.2 de la construcció B+P7 (figura 4.27).

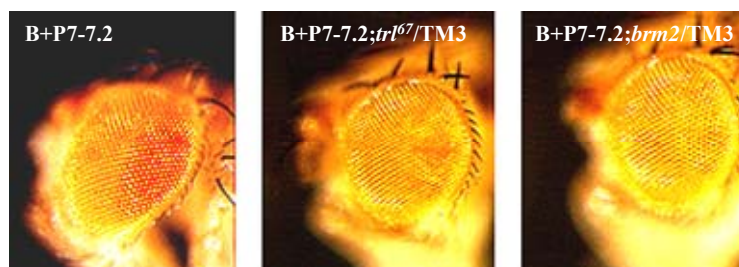


Figura 4.27. Femelles homozigotes de la línia B+P7-7.2: salvatge a l'esquerra, mutant *trl*⁶⁷ al centre, i mutant *brm* a la dreta. La falta de GAGA promou una homogeneització i una disminució de la pigmentació de l'ull.

Com es pot veure, la mutació *trl*⁶⁷, en heterozigosi, promou una disminució de la pigmentació de l'ull a les femelles B+P7-7.2. Aquest fenotip és similar a l'observat en individus mutants per a proteïnes del Trx-G, com BRAMA, i recolza la integració de GAGA com a membre del Trx-G (Farkas *et al.*, 1994; Lehmann, 2004). Aquest resultat suggereix que GAGA està implicada tant en el silenciament promogut pel Pc-G com en l'activació conduïda per proteïnes del Trx-G.

D'altra banda, per tal d'estudiar la implicació de GAGA en la regulació de l'activitat *enhancer-blocking* del *Fab-7* vam situar les línies *Fab7- 2.1*, *8.1* i *12.6* en un fons mutant *trl*⁶⁷. Vam observar que, tot i que com indiquen els assajos de ChIP GAGA es troba unida al *Fab-7* a embrions de *Drosophila*, la disminució de GAGA deguda a la mutació *trl*⁶⁷ en heterozigosi no altera l'expressió del gen reporter de cap de les línies transgèniques analitzades, de manera que no sembla afectar el silenciament promogut pel *Fab-7* en cap d'aquestes línies.

4.3.2.3. Eliminació de GAGA mitjançant RNAi

Com hem vist, GAGA és una proteïna d'herència materna i és essencial per a la mosca des de l'inici del desenvolupament (Farkas *et al.*, 1994), de manera que no és possible disposar d'individus homozigots per a cap de les mutacions generades per a aquesta proteïna. Aquest fet dificulta molt l'estudi *in vivo* del paper que juga en el control dels elements reguladors com el Fab-7 o els elements de manteniment. Per aquest motiu, vam decidir generar mosques transgèniques que expressessin un RNA d'interferència de GAGA a diferents moments del desenvolupament o a determinats teixits.

El mecanisme d'RNA d'interferència (RNAi) es coneix des de fa poc temps i consisteix en un sistema de regulació de l'expressió gènica basat en la degradació dels RNAs

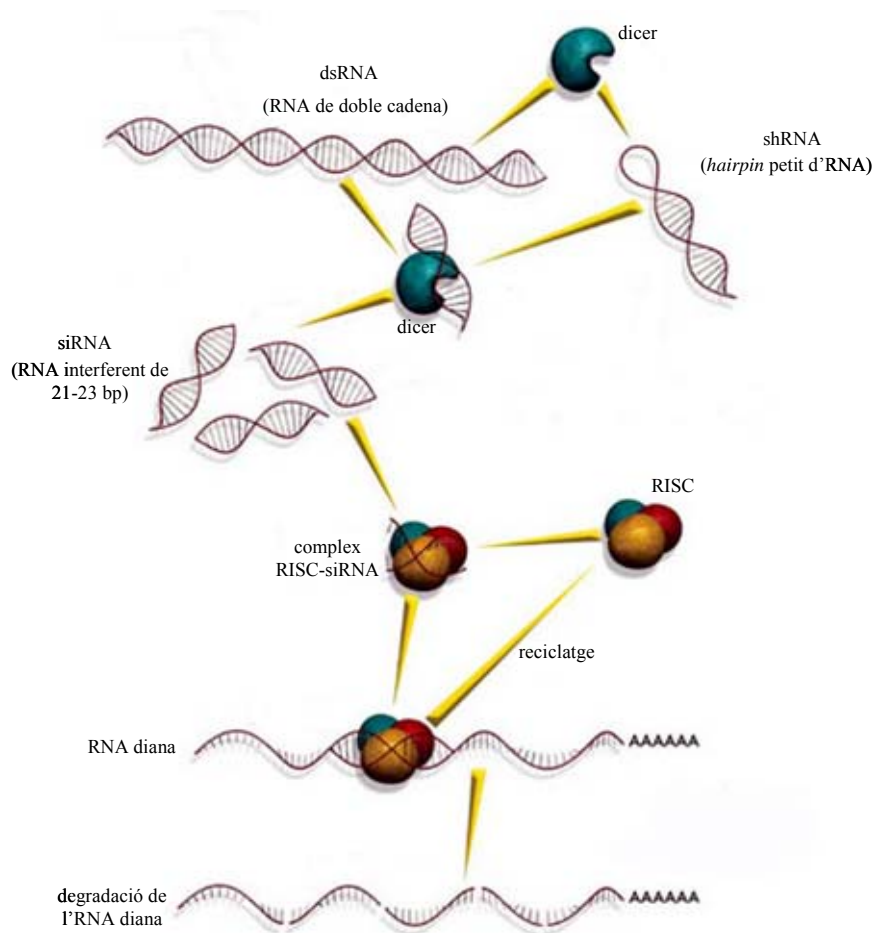


Figura 4.28. Sistema d'RNA d'interferència. Es genera un RNA llarg de doble cadena amb una seqüència antiparal·lela. Aquest RNA és processat de manera que es generen petits RNAs interferents (21-23 parells de bases). Aquests siRNAs interaccionen amb el complex RISC i promouen la degradació específica d'un RNA missatger.

missatgers mediada per petits RNAs interferents (siRNAs) homòlegs al missatger que s'ha de degradar. D'aquesta manera, l'RNA missatger no es tradueix i no es produeix proteïna (Kavi *et al.*, 2005) (figura 4.28).

El sistema que hem utilitzat consisteix en l'expressió de dues seqüències antiparal·leles, homòlogues entre elles i a l'RNA missatger de GAGA, que s'expressen sota el control d'uns llocs d'unió UAS: hem anomenat aquesta construcció UAS-RNAiGAGA. Aquests llocs UAS recruta la proteïna GAL4, que és un activador que permet que es transcriu el transgèn. En aquest cas, s'expressa una seqüència que forma un *hairpin* que és processat per la maquinària de l'RNAi endògena i que condueix a l'alliberament de siRNAs (*small interfering RNAs*). Aquests siRNAs s'uneixen específicament a l'mRNA de GAGA i el porten cap a la degradació (figura 4.29).

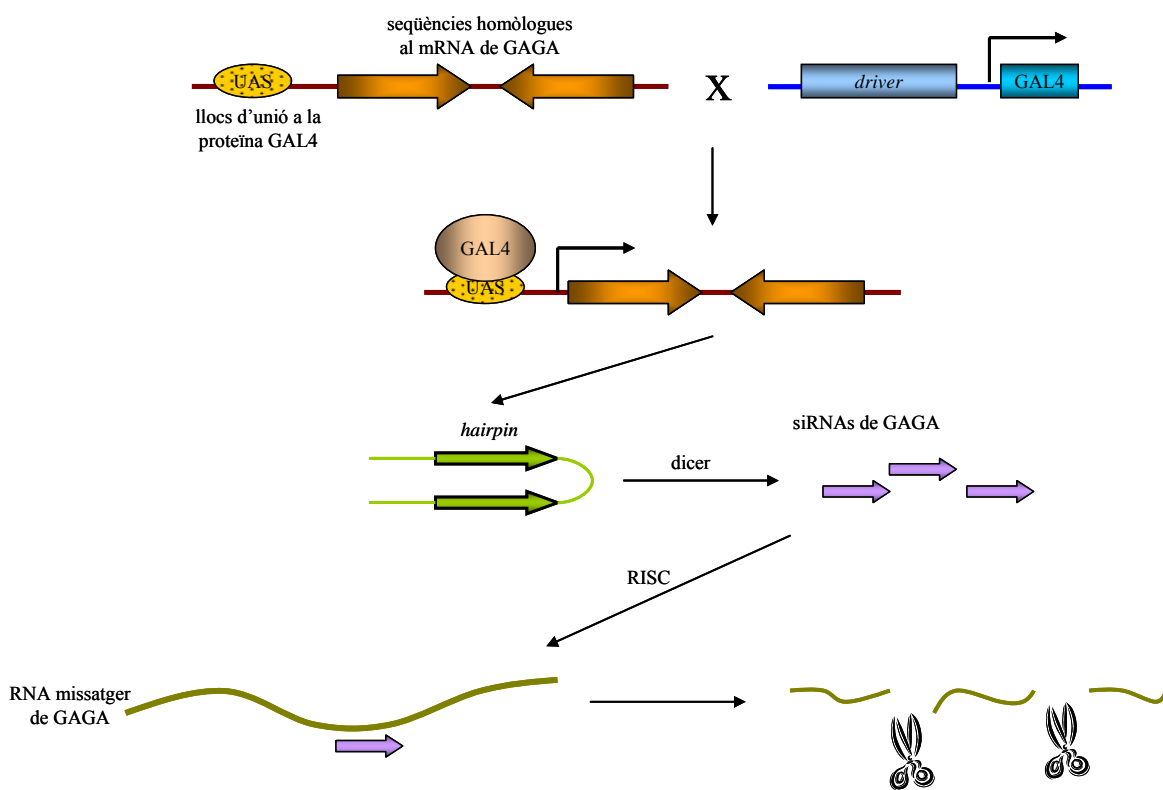


Figura 4.29. Vam generar una construcció en que dues seqüències antiparal·leles i homòlogues als mRNAs que codifiquen per a les dues isoformes de GAGA s'expressen sota el control dels llocs d'unió de la proteïna GAL4 i vam generar mosques transgèniques amb aquesta construcció. En creuar aquestes mosques amb unes altres que expressen la proteïna GAL4 sota el control de diferents drivers, induïbles o constitutius, s'obtenen individus que transcriuen el transgèn. El transcrit genera un *hairpin* que és processat mitjançant la proteïna dicer, i els siRNAs resultants, amb l'ajut del complex RISC, interaccionen específicament amb els mRNAs de GAGA i en promouen la degradació.

Així doncs, es van generar mosques transgèniques amb aquesta construcció per tal d'obtenir individus en que poguéssim conduir la degradació dels mRNAs que tradueixen les dues isoformes de GAGA. Vam obtenir dues línies transgèniques independents: la UAS-RNAiGAGA4.2 (cromosoma II) i la UAS-RNAiGAGA7.2 (cromosoma III).

Com hem dit, l'expressió de l'RNAi es troba sota el control d'uns llocs UAS, que recrecuten la proteïna GAL4; aquesta proteïna es pot expressar sota el control de diferents promotors, generals o induïbles. Aquests elements que permeten l'expressió dirigida d'un transgèn s'anomenen drivers.

D'aquesta manera, per tal d'obtenir individus que expressessin l'RNAi de GAGA en diferents condicions, vam realitzar creuaments entre les dues línies UAS-RNAiGAGA i diferents drivers (taula 4.3).

	driver	cromosoma	línia amb la que s'ha creuat
drivers generals	nulloGAL4	II	UAS-RNAiGAGA7.2
	actinaGAL4	II	UAS-RNAiGAGA4.2
	daughterlessGAL4	III	UAS-RNAiGAGA4.2
	69BGAL4	III	UAS-RNAiGAGA4.2
drivers induïbles	heat-shockGAL4	III	UAS-RNAiGAGA7.2, UAS-RNAiGAGA4.2
	actGAL4/tubGAL80		UAS-RNAiGAGA4.2
	tubGAL80/daGAL4		UAS-RNAiGAGA4.2

Taula 4.3. Drivers generals i induïbles utilitzats en aquest treball. El driver tubulinaGAL80 condueix l'expressió de la proteïna GAL80, que inhibeix l'activitat de GAL4, de manera que s'ha fet servir combinat amb els drivers actinaGAL4 i daughterlessGAL4. En aquest treball hem fet servir línies amb el driver GAL80 inserat al cromosoma II i al cromosoma III.

Els individus obtinguts van ser estudiats des de diferents enfocis: en primer lloc, vam observar si es produïen transformacions homeòtiques als adults. S'ha vist que els individus que arriben a adult i que tenen l'al·lel mutant hipomorf de GAGA *trl^{l3C}* en homozigosi mostren la transformació homeòtica del segment abdominal 6 al segment A5 (Farkas *et al.*, 1994). La transformació abdominal A6 a A5 es pot identificar fenotípicament, ja que els mascles mutants presenten pèls al segment A6, característica típica del segment A5, mentre els mascles salvatges no mostren aquest fenotip.

La transformació abdominal A6 a A5 suggereix una desregulació de l'expressió del gen *Abd-B* al segment A6, de manera que el gen homeòtic s'expressa en aquest parasegment com si fós l'A5; tot això indica que el domini *iab-6*, que controla l'expressió de l'*Abd-B* al

segment A6, es troba en un estat reprimat en aquest segment, de manera que el gen homeòtic s'expressa sota el control dels elements reguladors de l'iab-5. Aquesta desregulació pot associar-se a una falta de funció dels elements reguladors del domini iab-6, o a un mal funcionament de l'element boundary Fab-7, ja que la deleció del Fab-7 pot induir que les proteïnes del Pc-G recrutades al PRE7 s'extenguin al llarg de l'iab-6, provocant-ne el silenciament.

En segon lloc, vam realitzar anàlisis per Western Blot per tal de correlacionar els fenotips observats als adults amb disminucions de la quantitat de GAGA. Finalment, amb l'objectiu de determinar si la falta de GAGA promovia la desregulació de l'*Abd-B* al segment A6 a través de canvis a l'estructura de la cromatina de les regions reguladores de l'iab7/iab6, vam realitzar anàlisis d'hipersensibilitats a DNasaI.

◆ La línia UAS-RNAiGAGA7.2 sota el control de nulloGAL4

En primer lloc, vam realitzar creuaments entre la línia UAS-RNAiGAGA7.2 i individus amb el driver nulloGAL4 (sembla que aquest promotor podria conduir una expressió ubíqua de GAL4 des dels inicis del desenvolupament). Els creuaments es van incubar a 30°C, temperatura òptima per a l'activitat de la proteïna GAL4. Aquests individus no mostren cap problema en el desenvolupament, i són totalment viables i fèrtils, de manera que en vam generar un stock: nulloGAL4;UAS-RNAiGAGA7.2.

Tot i que els mascles adults no mostraven transformació homeòtica A6 a A5, es van realitzar extractes protèics dels embrions que expressaven l'RNAi de GAGA i d'embrions control (només amb el transgèn UAS-RNAiGAGA7.2), per tal de determinar si es produïa una baixada de la quantitat de la proteïna; vam realitzar els assajos de Western Blot amb un anticòs α GAGA purificat per afinitat (figura 4.30.a). Com a control de càrrega es va revelar la membrana del WB amb l'anticòs de la tubulina, proteïna que no es troba regulada per GAGA.

Comparant els dos extractes embrionaris, vam observar una disminució significativa de GAGA, sobretot de la isoforma de 519 aminoàcids, ja que és la més abundant a embrions. Aquesta disminució no és tan evident si els creuaments s'incuben a 25°C, suggerint que l'activitat del GAL4 influeix en l'expressió dels siRNAs. Val a dir que hem observat que l'eliminació de GAGA deguda a l'expressió dels siRNAs sota el control de nulloGAL4 es

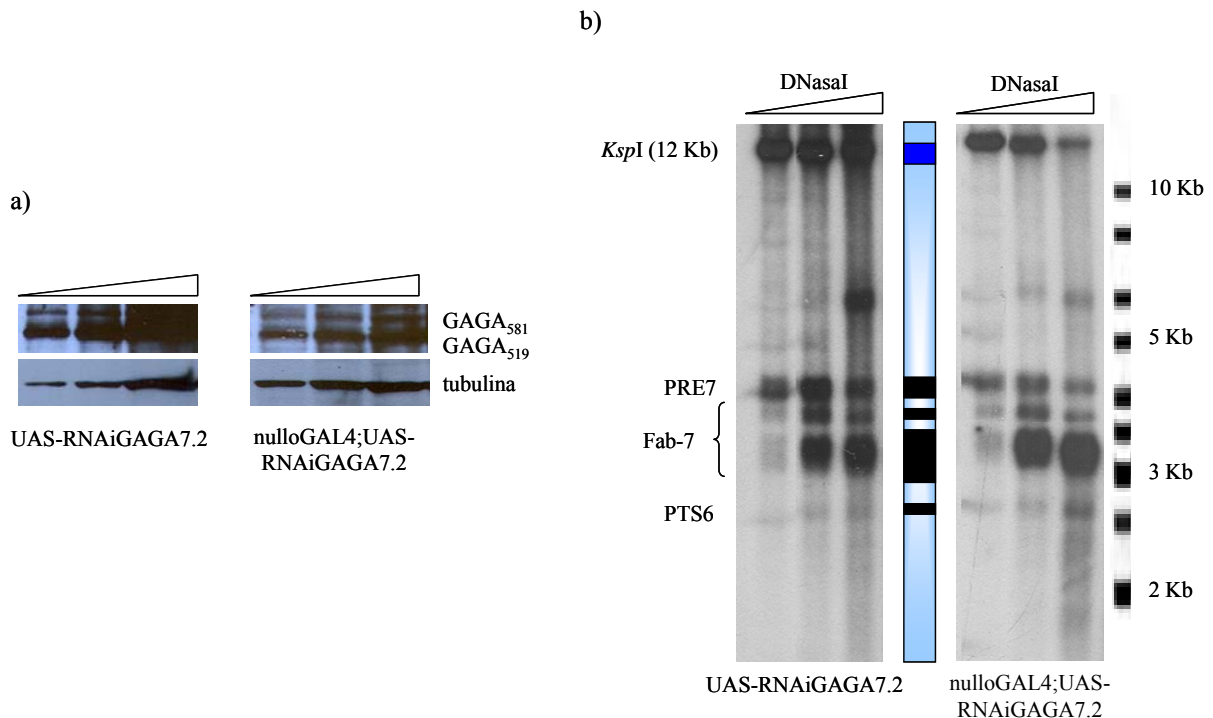


Figura 4.30. a) WB de GAGA i de tubulina d'extractes proteïcs d'embrions control (esquerra) i embrions que expressen l'RNAi de GAGA (dreta) incubats a 30°C. Els embrions nulloGAL4;UAS-RNAiGAGA7.2 presenten una notable baixada de la quantitat de GAGA, comparant-los amb els control. b) Hipersensibilitats a DNaseI del Fab-7 i l'iab7PRE d'embrions control i embrions nulloGAL4;UAS-RNAiGAGA7.2. No s'observa cap diferència en el patró d'hipersensibilitats entre totes dues mostres.

produeix de forma variable, suggerint que l'efecte de l'RNAi no és molt constant en aquests individus.

Tot i aquesta variabilitat vam decidir analitzar l'estat de la cromatina del Fab-7 d'aquests individus. Així doncs, vam realitzar assajos d'hipersensibilitat a DNaseI en embrions nulloGAL4;UAS-RNAiGAGA7.2 i en embrions control, per tal de determinar si el patró de posicionament de nucleosomes del Fab-7 canviava amb la disminució de GAGA (figura 4.30.b).

Tampoc en aquest cas s'observa una variació en el patró d'hipersensibilitats de la regió del Fab-7; aquest fet pot voler indicar bé que GAGA no actua sobre l'activitat del Fab-7 a nivell de posicionament de nucleosomes, bé que la baixada de la quantitat de proteïna no és suficient per a observar un efecte a l'estructura de la cromatina.

◆ La línia UAS-RNAiGAGA4.2 sota el control de drivers generals

Paral·lelament a les nostres anàlisis, mitjançant immunotinció de diferents teixits, el Dr. Jordi Bernués va observar que la línia UAS-RNAiGAGA4.2 semblava promoure una disminució de la quantitat de GAGA més intensa que la línia UAS-RNAiGAGA7.2, de manera que vam decidir realitzar nous assajos amb aquests individus.

a) Drivers actinaGAL4 i daughterlessGAL4

D'aquesta manera, en primer lloc vam realitzar creuaments entre la línia UAS-RNAiGAGA4.2 i mosques que expressaven la proteïna GAL4 sota el control dels drivers actinaGAL4 (actGAL4) i daughterlessGAL4 (daGAL4), que condueixen l'expressió de la proteïna GAL4 de forma ubíqua i des de l'inici del desenvolupament embrionari.

Vam observar que, en tots dos casos i tant a 25°C com a 18°C, la letalitat era molt elevada. De fet, els individus actGAL4/UAS-RNAiGAGA4.2 mostraven una letalitat del 100% (cap individu arribava a adult), mentre la línia UAS-RNAiGAGA4.2/+;daGAL4/+ presentava una letalitat del 95-98%. Vam observar, però, que els mascles d'aquesta línia que arribaven a eclosionar mostraven pèls al segment abdominal A6, suggerint que s'estava produint la transformació homeòtica A6 a A5 deguda a una disminució de la quantitat de GAGA.

b) Driver 69BGAL4

Si bé semblava que en aquestes mosques el sistema d'RNAi estava funcionant correctament, l'elevada mortalitat observada impossibilitava l'anàlisi en profunditat d'aquests individus, de manera que vam decidir realitzar creuaments de la línia UAS-RNAiGAGA4.2 amb un altre driver general que podria començar a expressar-se una mica més tard: el driver 69BGAL4 (aquest driver sembla expressar-se preferentment a teixits ectodèrmics).

En primer lloc vam observar que, si bé els individus resultants (UAS-RNAiGAGA4.2/+; 69BGAL4/+) eren 100% viables, no podíem mantenir-ne un stock, degut a que les femelles eren estèrils. En segon lloc, vam analitzar el fenotip dels adults que

expressaven l'RNAi i vam observar que els mascles UAS-RNAiGAGA4.2/+;69BGAL4/+ mostraven pèls al segment abdominal A6, suggerint que, novament, presentaven la transformació homeòtica A6 a A5 (figura 4.31.a). Vam realitzar una anàlisi estadística i vam observar que la mitjana de pèls en aquest segment és d'aproximadament 3 pèls per individu (figura 4.31.b), amb una distribució molt àmplia que va des dels 0 fins els 11 pèls. Val a dir que vam observar aquest fenotip a individus crescuts a 25°C, temperatura no òptima per a la proteïna GAL4, de manera que aquesta transformació es podria veure potenciada en realitzar els experiments a 30°C.

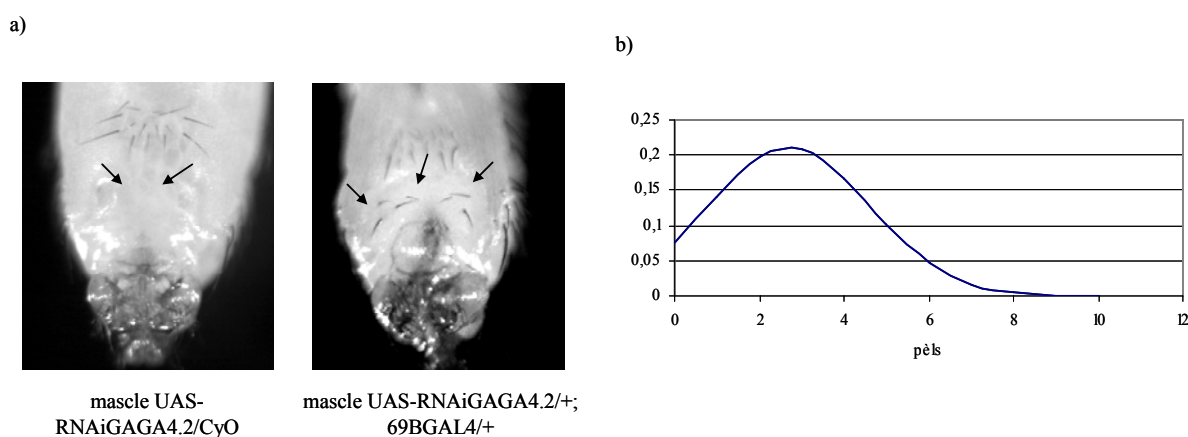


Figura 4.31. a) Abdòmens de dos mascles adults. A l'esquerra, un mascle control UAS-RNAiGAGA4.2/CyO, que no presenta cap pèl al segment A6; a la dreta, un mascle que expressa l'RNAi de GAGA i que mostra diversos pèls al segment A6, suggerint que presenta la transformació A6 a A5. b) Distribució dels pèls observats en 195 mascles UAS-RNAiGAGA4.2/+;69BGAL4/+. La mitjana és de 3 pèls per mascle, i la distribució va de 0 a 11 pèls.

Aquest resultat semblava indicar que, en aquests individus, l'*Abd-B* no s'estava expressant correctament al segment A6, probablement degut a la devallada de GAGA induïda per l'expressió de l'RNAi. Per a confirmar que el fenotip observat era degut a la falta de GAGA, vam realitzar assajos de Western Blot amb extractes proteïcs d'embrions control i embrions UAS-RNAiGAGA4.2/+;69BGAL4/+ incubats també a 25°C (figura 4.32.a). Sorprenentment, tot i la transformació homeòtica observada als mascles que expressaven l'RNAi de GAGA, els assajos de WB semblaven indicar que la quantitat de GAGA als embrions UAS-RNAiGAGA4.2/+;69BGAL4/+ era molt similar a la que presentaven els embrions control.

Donat que aquests resultats no explicaven el clar efecte fenotípic que havíem observat, vam decidir comprobar si la quantitat de GAGA disminuïa a estadis més tardans del desenvolupament, ja que GAGA és una proteïna d'expressió materna i la degradació de

4. Resultats

l'RNA a través del mecanisme d'RNA d'interferència només disminueix la quantitat de proteïna que es tradueix, però no promou la degradació de la que ja s'hi troba present. D'aquesta manera, vam realitzar assajos de WB amb larves en estadi III (just abans de pupar) crescudes a 25°C (figura 4.32.b).

En primer lloc cal remarcar que, mentre a embrions la isoforma més abundant és GAGA₅₁₉ i que en electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS aquesta proteïna corre com a dos doblets (probablement degut a que presenta diferents modificacions postraduccionals) (Benyajati *et al.*, 1997; Bonet *et al.*, 2005), a larves, les dues isoformes de GAGA semblen ser igualment abundants, i el patró de bandes no és tan clar, ja que els doblets sempre es veuen com una banda ampla, potser degut a que el patró de modificacions és més complex que a embrions.

Així doncs, com es pot veure a la figura 4.32.b, en aquest cas sí que s'observa una devallada significativa de la quantitat de proteïna, tant de la isoforma de 519 aminoàcids com

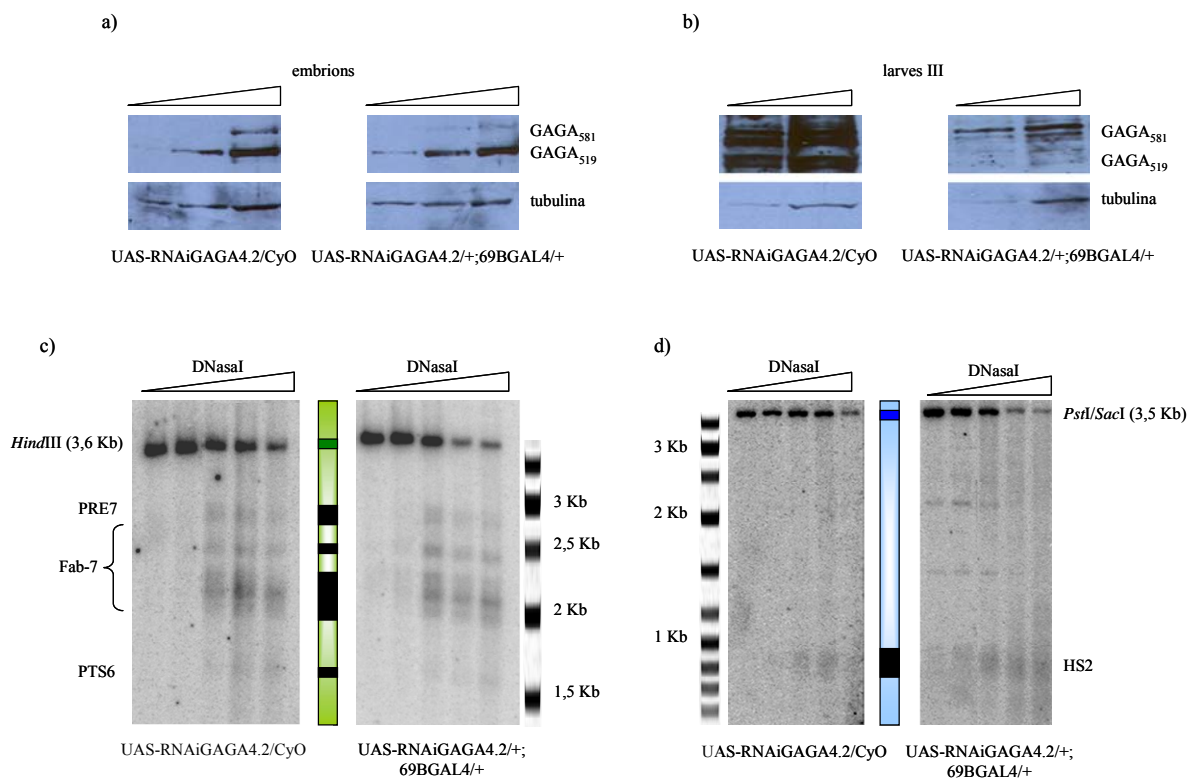


Figura 4.32. a) WB de GAGA i de tubulina d'extractes proteïcs d'embrions 0-24h control (esquerra) i UAS-RNAiGAGA4.2/+;69BGAL4/+ (dreta) a 25°C. No s'observa cap variació en la quantitat de GAGA en els embrions que expressen l'RNAi. b) WB de GAGA i tubulina d'extractes proteïcs de larves en estadi III control i interferides. En aquest cas sí s'observa una devallada significativa de les dues isoformes de GAGA. c) Hipersensibilitats a DNaseI de la regió del Fab-7 de larves control i larves que expressen l'RNAi de GAGA. Tot i la falta de GAGA, tampoc s'observa un canvi en el posicionament de nucleosomes. d) Hipersensibilitats a DNaseI de la regió de l'iab6PRE a larves control i larves interferides. Tampoc el patró d'hipersensibilitats sembla veure's alterat en absència de GAGA.

de la isoforma de 581. Aquest resultat suggereix que la transformació homeòtica del segment A6 a A5 podria ser deguda a la falta de GAGA en estadis més avançats del desenvolupament, tot i que s'havia descrit que la funció de GAGA en la regulació dels gens homeòtics era només necessària durant el desenvolupament embrionari (Bejarano *et al.*, 2004).

Donat que en aquest cas sí semblava que hi havia una disminució significativa de la quantitat de GAGA, vam decidir fer un assaig d'hipersensibilitats a DNasaI del Fab-7 amb larves en estadi III. Vam utilitzar larves UAS-RNAiGAGA4.2/CyO com a control i larves UAS-RNAiGAGA4.2/+;69BGAL4/+ (figura 4.32.c). Tampoc en aquest cas vam observar un canvi en el patró d'hipersensibilitats del Fab-7 en absència de GAGA.

D'altra banda vam pensar que, donat que no hem detectat cap canvi en el patró d'hipersensibilitats a la nucleasa a la regió reguladora del Fab-7 tot i la forta transformació abdominal observada, aquesta transformació podria ser deguda a un efecte de la falta de funció d'aquesta proteïna sobre l'element de manteniment iab6PRE al segment A6, de manera que l'absència de GAGA alterés l'estructura d'aquest element i no permetés el correcte recrutament de les proteïnes del Trx-G. D'aquesta manera, i tot i que no hem pogut identificar la presència de GAGA sobre l'element iab6PRE, vam realitzar assajos d'hipersensibilitats a DNasaI de la regió iab6PRE en les mosques que expressaven l'RNAi de GAGA i en individus control (figura 4.32.d).

Tampoc en aquest cas vam observar diferències en el patró de posicionament dels nucleosomes. Com es pot veure a la figura 4.32.d, a larva III sembla que només es distingeix clarament el lloc HS2 de l'iab6PRE, la hipersensibilitat majoritària, però tampoc sembla que el patró d'hipersensibilitats a DNasaI de l'iab6PRE es vegi modificat per la falta de GAGA, indicant que aquesta proteïna deu estar actuant a un altre nivell de la regulació.

D'altra banda, i donat que no havíem pogut identificar cap canvi en el posicionament dels nucleosomes a les regions del Fab-7 i de l'iab6PRE en disminuir la quantitat de GAGA, vam realitzar assajos d'immunoprecipitació de cromatina amb anticossos que reconeixen específicament les cues de les histones modificades (reconeixen l'acetil·lació de les histones H3 i H4) de larves en estadi III control i larves UAS-RNAiGAGA4.2/+;69BGAL4/+ per tal de determinar si l'efecte fenotípic observat era degut a un canvi en el patró de modificacions de les histones a les regions reguladores de l'*Abd-B*. Tampoc vam veure, però, cap diferència en el patró de modificacions entre les dues mostres, suggerint que, o bé el canvi conduït per la disminució de GAGA es dona només als dominis abdominals de l'organisme i la tècnica

no és prou sensible com per a identificar les diferències, o bé GAGA no està implicada en la modificació d'aquests residus.

Tots els resultats observats indiquen que les mosques que expressen l'RNAi de GAGA sota el control del driver 69BGAL4 condueixen a una disminució significativa de la proteïna que promou el fenotip de transformació homeòtica A6 a A5. Si bé, no hem pogut determinar si aquest fenotip és conseqüència d'un canvi a l'estructura de la cromatina als dominis reguladors de l'expressió de l'*Abd-B*.

◆ L'RNAi de GAGA sota el control de drivers induïbles

Amb l'objectiu d'analitzar la implicació de GAGA en la regulació dels gens homeòtics al llarg del desenvolupament de *Drosophila*, i per tal de confirmar l'observació de que la transformació homeòtica del segment A6 a A5 és deguda a la falta de GAGA a estadis tardans del desenvolupament, vam generar mosques en que l'expressió de l'RNAi de GAGA es trobés sota el control d'un driver induïble.

a) Driver heat-shockGAL4

En primer lloc, vam situar l'RNAi sota el control del driver heat-shockGAL4 (hsGAL4), que s'activa com a resposta a altes temperatures. A *Drosophila*, els drivers de heat-shock es troben plenament actius a 37°C, de manera que vam exposar els individus a aquesta temperatura períodes de 30 minuts a una hora. Vam realitzar assajos tant a embrions com a larves, i amb exposicions puntuals i continuades.

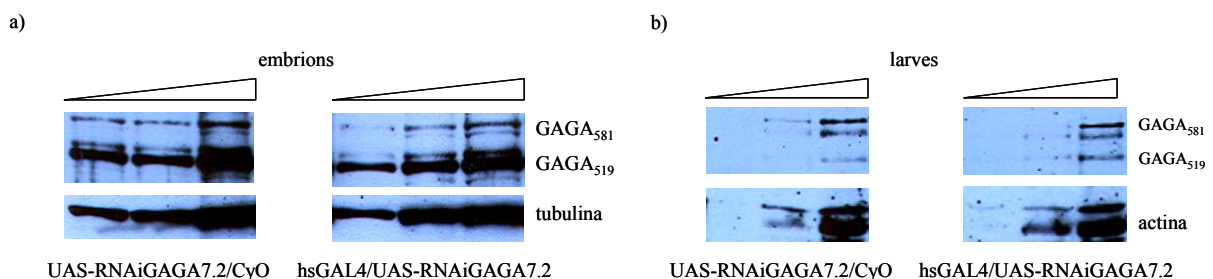


Figura 4.33. a) WB de GAGA i tubulina a embrions control i amb l'RNAi de GAGA sota el control del driver hsGAL4. Vam exposar embrions 0-4h a un hs de 30 minuts a 37°C, i els vam recollir 24h després de la posta. No sembla que hi hagi una baixada en la quantitat de GAGA. b) WB de GAGA i actina a larves en estadi III. En aquest cas, les larves van ser sotmeses a un hs d'1h cada 24h, i van ser recollides a l'estadi III. Tampoc en aquest cas sembla que hi hagi cap canvi en la quantitat de GAGA.

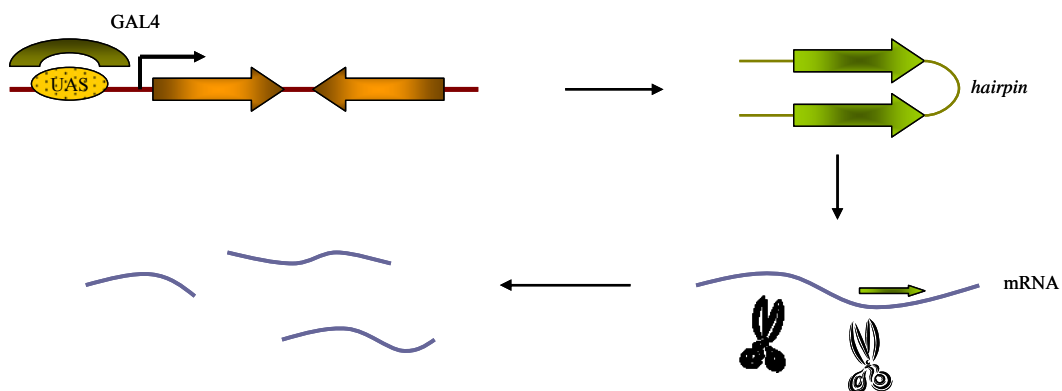
A la figura 4.33 s'exemplifiquen alguns resultats obtinguts amb la línia UAS-RNAiGAGA7.2 (vam obtenir resultats similars amb la línia UAS-RNAiGAGA4.2).

En cap dels assajos realitzats vam observar una baixada de la quantitat de GAGA, suggerint que el sistema no funcionava per a disminuir la quantitat de la proteïna. En cap cas vam observar, tampoc, un efecte fenotípic degut a l'expressió de l'RNAi de GAGA.

b) Driver tubulinaGAL80 amb actGAL4 i daGAL4

En segon lloc vam intentar expressar l'RNA interferent de GAGA sota el control d'un sistema induïble una mica més complex. Hem dit que la proteïna GAL4 és la responsable de l'activació de la transcripció de l'RNAi; aquesta proteïna pot ser inhibida per una altra proteïna que s'anomena GAL80. Hem utilitzat un mutant termosensible de la proteïna GAL80, actiu a 18°C i a 25°C i inactiu a 30°C (McGuire *et al.*, 2004). Així doncs, a 25°C i, per tant, en presència de GAL80, GAL4 no pot ser recrutada pels llocs d'unió UAS del transgèn i no activa la transcripció. A 30°C, però, GAL80 no pot inhibir el recrutament de GAL4 als seus llocs d'unió i el transgèn es transcriu (figura 4.34). La proteïna GAL80 es

a) 30°C



b) 25°C

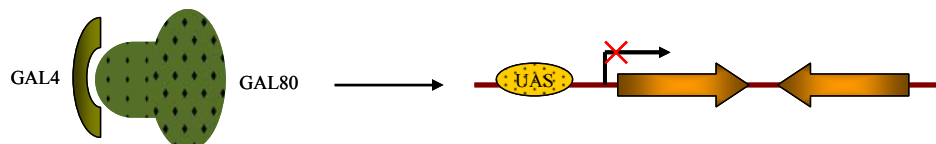


Figura 4.34. a) Funcionament de la proteïna GAL4 a 30°C. A aquesta temperatura, GAL4 s'uneix als llocs UAS i promou l'expressió del transgèn. b) A 25°C, la proteïna GAL80 és funcionalment activa i inhibeix l'activació promoguda per GAL4, de manera que no es transcriu l'RNAi.

troba sota el control del promotor de la tubulina (tub), que s'expressa de forma ubíqua i durant tot el desenvolupament. Aquesta expressió permet que la inducció pugui tenir lloc en qualsevol moment del desenvolupament.

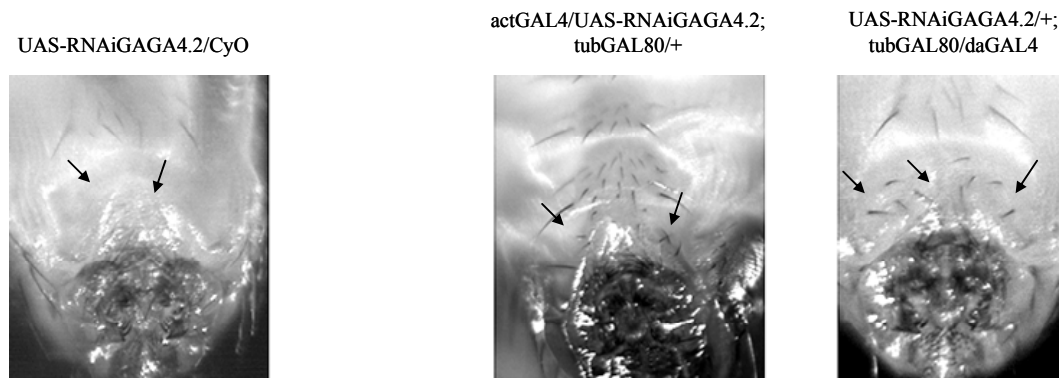
D'altra banda, ja hem vist que l'expressió del GAL4 pot trobar-se sota el control de diversos drivers. Per a realitzar els assajos induïbles vam escollir els drivers actina (act) i daughterless (da), que també són d'expressió ubíqua i que hem vist que donaven una elevada letalitat en combinació amb la línia UAS-RNAiGAGA4.2.

Així doncs, vam realitzar creuaments per a obtenir individus en què l'RNAi es trobés sota el control dels diferents elements del sistema induïble. En tots dos casos (actGAL4 i daGAL4) vam realitzar els creuaments amb una línia que presentava el driver tubGAL80 inserat al cromosoma III. La descendència, entre la que es trobaven individus en què s'expressava l'RNAi i individus que no l'expressaven (control), es va incubar a 30°C. Vam observar que es produïa una letalitat generalitzada (dels individus control i els interferents) que ens va suggerir que la presència de tantes insercions afectava la viabilitat de les mosques a 30°C. Per això vam incubar els individus a 25°C i els vam induir a 30°C a diferents moments del desenvolupament (embrió, larva I, larva II, larva III i pupa). Després de la inducció vam tornar a incubar les postes a 25°C.

Així doncs, vam analitzar el fenotip dels mascles adults i vam observar que els individus actGAL4/UAS-RNAiGAGA4.2;tubGAL80/+ i UAS-RNAiGAGA4.2/+; tubGAL80/daGAL4 que s'havien sotmès a la inducció a larva II i larva III mostraven molts pèls al segment A6, mentre que els mascles control (sense GAL4) no en tenien (figura 4.35.a). En canvi, als mascles que havíem induït a embrió, larva I i pupa vam veure que la quantitat de pèls al segment A6 era molt inferior, suggerint que la transformació era més forta quan s'expressava l'RNAi a larva II i III.

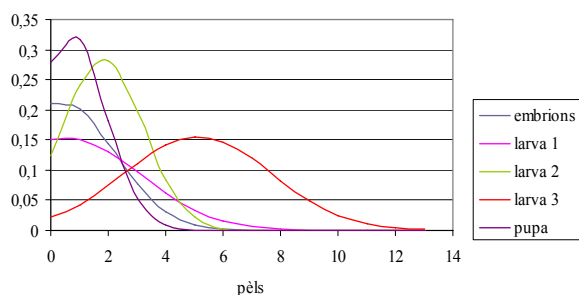
Com es pot veure a les figures 4.35.b i c, la mitjana de pèls observats quan s'indueix l'RNAi a larva III és superior a 5 (tant amb el driver actina com amb el driver daughterless). A larva II i, sobretot, a pupes aquesta mitjana ja es veu significativament reduïda i, quan s'indueix el sistema a embrions i larva I, la transformació és pràcticament insignificant. Val a dir que la distribució del nombre de pèls en induir el sistema a larva III és molt ample, suggerint que, tot i que la transformació és significativa, la intensitat amb la que es produeix aquesta transformació és variable, ja que podem trobar individus que presenten des de 0 pèls fins a 13.

a)



b)

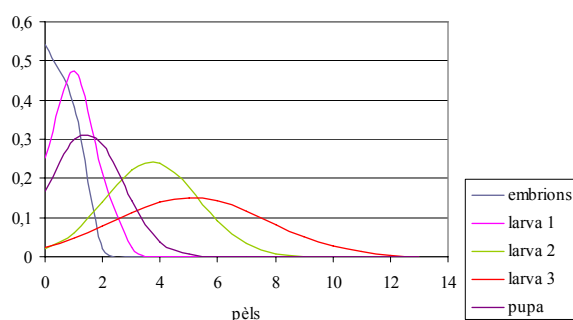
UAS-RNAiGAGA4.2/actGAL4;tubGAL80



UAS-RNAiGAGA4.2/ actGAL4;tubGAL80	mitjana	desviació estàndard
embrions	0,3333	1,8647
larva 1	0,5000	2,5879
larva 2	1,8000	1,4035
larva 3	5,1154	2,5664
pupa	0,6842	1,2154

c)

UAS-RNAiGAGA4.2/+;tubGAL80/daGAL4



UAS-RNAiGAGA4.2/+; tubGAL80/daGAL4	mitjana	desviació estàndard
embrions	0,3667	0,6149
larva 1	0,9429	0,8382
larva 2	3,7105	1,6425
larva 3	5,0741	2,6447
pupa	1,4204	1,2590

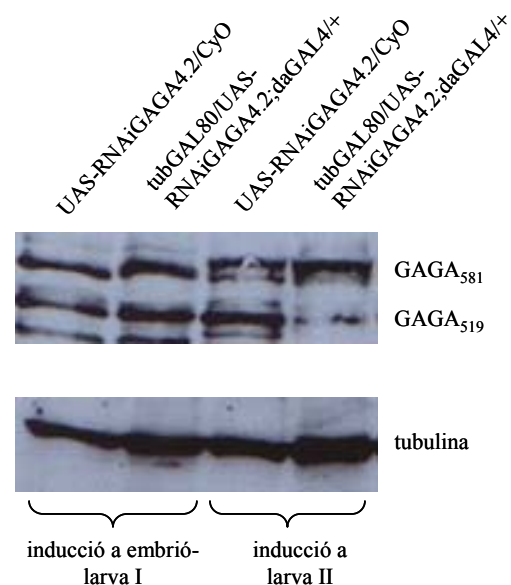
Figura 4.35. a) Abdòmens d'un mascle control i dos mascles interferits amb els drivers actGAL4 i daGAL4 sota el control de tubGAL80. Tots dos drivers condueixen a la transformació homeòtica A6 a A5 quan s'indueix el sistema a estadis tardans del desenvolupament larvari. b) Distribució dels pèls observats a mascles adults actGAL4/UAS-RNAiGAGA4.2; tubGAL80/+ als que s'ha induït l'expressió de l'RNAi a diferents moments del desenvolupament; la llegenda indica el moment de la inducció de l'RNAi; al quadre s'indiquen també la mitjana de pèls per individu i la desviació estàndard en cada cas. Sembla que la transformació és més forta quan la inducció té lloc a larva II i larva III. c) Distribució dels pèls observats a mascles UAS-RNAiGAGA4.2/+;tubGAL80/daGAL4; també s'indiquen les mitjanes i les desviacions estàndard en cada cas. Com en el cas anterior, el nombre de pèls observat és més gran quan es produeix la inducció a larva II i larva III.

Hem vist que la inducció de l'expressió de l'RNAi de GAGA provoca una transformació homeòtica A6 a A5 molt forta; per a confirmar que el fenotip observat era causat per una baixada de la quantitat de GAGA vam realitzar anàlisis de WB de la quantitat total de proteïna en individus interferents sota el control dels drivers tubGAL80 i daGAL4. Si bé, amb els individus anteriors no podíem realitzar aquests assajos, ja que només el 50% de les mosques adultes obtingudes presentaven tots els elements necessaris per a l'expressió induïble de l'RNAi de GAGA, de manera que vam realitzar nous creuaments per a obtenir individus en què el 100% dels fills tinguessin els tres elements. Amb aquest objectiu vam utilitzar una línia en què el driver tubGAL80 es trobava insertat al cromosoma II, i vam obtenir individus tubGAL80/UAS-RNAiGAGA4.2;daGAL4/+.

Vam comprobar que aquests individus també mostraven la transformació homeòtica A6 a A5 i vam realitzar-ne extractes protèics induint l'expressió de l'RNAi a diferents moments del desenvolupament.

Així doncs, vam créixer les mosques a 25°C i vam sotmetre les postes, novament, a períodes de 24h a 30°C. Vam observar que, en recollir les larves o pupes just després de la inducció, no s'observava cap disminució significativa de la quantitat de GAGA. Ja que el sistema d'RNA d'interferència no promou la degradació de la proteïna, si no que condueix a la degradació de l'RNA missatger i no permet que se'n tradueixi més, per a que s'observi una devallada de la quantitat de proteïna s'ha de deixar que el sistema degradi la proteïna que hi havia abans de la inducció. Així doncs, i donat que no es coneix la vida mitjana *in vivo* de GAGA, vam fer una incubació de 48h a 25°C després de la inducció a 30 °C.

Figura 4.36. WB d'extractes protèics de larves i pupes control i UAS-RNAiGAGA4.2/tubGAL80; daGAL4/+ induïdes 24h a 30°C. La inducció de l'expressió de l'RNAi de GAGA a embrió-larva I no sembla provocar una baixada de la quantitat de la proteïna. La inducció a larva II sembla que condueix a una disminució de la isoforma GAGA₅₁₉.



Vam fer extractes de proteïnes de larves i pupes, segons l'estadi en què s'hagués fet la inducció (figura 4.36). Vam veure que la disminució de GAGA en induir el sistema a embrions i larva I era poc significativa, suggerint que o bé el sistema no funcionava en estadis primerencs del desenvolupament, o bé *trl* no s'estava transcrivint en aquests estadis, de manera que l'expressió de l'RNAi de GAGA no promovia la degradació de cap mRNA. En canvi, la inducció de l'RNAi a larva II sí que semblava conduir una baixada significativa de la quantitat de GAGA, especialment de la isoforma de 519 aminoàcids.

Així doncs, tots aquests resultats indiquen que la transformació homeòtica del segment abdominal A6 a A5 és deguda a una disminució de la quantitat de GAGA a estadis tardans del desenvolupament larvari, i confirmen els resultats obtinguts amb els individus UAS-RNAiGAGA4.2/+;69BGAL4/+. Si bé, el fet que no haguem observat cap variació en la quantitat de la proteïna en induir l'expressió de l'RNAi a estadis primerencs del desenvolupament no ens permet determinar si GAGA es troba implicada en la regulació de l'*Abd-B* a l'inici del desenvolupament.

5. DISCUSSIÓ

5.1. Identificació de noves regions reguladores de l'*Abd-B*

En aquest treball ens hem proposat aprofundir en l'estudi de la regulació de l'estructura de la cromatina durant el desenvolupament de la mosca de la fruita i la seva implicació en la modulació de l'expressió gènica. Amb aquest objectiu, hem escollit com a model el Complex Bitòrax de *Drosophila melanogaster*. El BX-C està format per tres gens homeòtics: l'*Ubx*, l'*Abd-A* i l'*Abd-B*, que controlen el desenvolupament al llarg de l'eix antero-posterior de la mosca. L'expressió d'aquests gens homeòtics es troba acuradament regulada per uns dominis que controlen l'expressió específica de cada gen en cada segment de l'embrió (Beachy *et al.*, 1985; Celniker *et al.*, 1990; Karch *et al.*, 1990; Macias *et al.*, 1990; White *et al.*, 1985). El fet que determinats gens s'agrupin al genoma formant *clusters* no és molt freqüent, però ha estat àmpliament estudiat per tal d'aprofundir en els mecanismes i els elements de regulació de l'expressió dels gens que en formen part (Chung *et al.*, 1993; Tolhuis *et al.*, 2002).

Nosaltres hem volgut centrar la nostra atenció en la regulació del gen *Abdominal-B*, que s'expressa formant un gradient entre els segments 10 i 14 de la mosca, essent la seva expressió més elevada als segments més posteriors. La correcta expressió de l'*Abd-B* depèn de 4 dominis reguladors que se situen a 3' de l'inici de transcripció (Estrada *et al.*, 2002). Aquests dominis reguladors presenten colinearitat amb el segment que controlen, és a dir, que a la seqüència genòmica es troben en el mateix ordre que els segments abdominals de la mosca, i estan formats per diferents elements que mostren una activitat coordinada a l'hora de controlar l'expressió del gen a cada segment (figura 5.1) (McGinnis *et al.*, 1992).

En primer lloc, l'expressió de l'*Abd-B* a cada segment està sota el control d'un enhancer específic que promou la transcripció del gen en un determinat nivell al segment que regula. Aquests enhancers s'han anomenat elements iniciadors, i són els encarregats de reclutar els productes dels gens gap i pair-rule, que condueixen l'establiment d'un estat actiu o reprimit de la cromatina a cada domini. Així doncs, aquests elements iniciadors són els encarregats de l'establiment de determinats estats de la cromatina (Maeda *et al.*, 2006).

L'expressió dels gap i els pair-rule és transitòria, de manera que per a que els estats establerts pels iniciadors es mantinguin, cal que algú reconegui de forma específica l'estat obert o tancat de la cromatina i el mantingui d'aquesta manera durant la resta del desenvolupament embrionari i larvari. Aquestes proteïnes de manteniment s'han classificat

com a pertanyents al Grup Polycomb (manteniment d'estats silenciatos de la cromatina) o al Grup Trithorax (manteniment dels estats actius).

El mecanisme mitjançant el qual aquestes proteïnes indueixen el manteniment d'uns o altres estats a través de les divisions cel·lulars no es coneix, però sembla dependre, en qualsevol cas, de la formació de complexes capaços d'interaccionar amb el DNA. Els llocs encarregats del recrutament de les proteïnes dels grups Pc i Trx s'han anomenat elements de manteniment (PREs/TREs: *Polycomb and Trithorax Response Elements*). Trobem elements de manteniment a tots els dominis reguladors de l'*Abd-B* (Busturia *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2006; Mihaly *et al.*, 1998; Orlando *et al.*, 1998; Sengupta *et al.*, 2004).

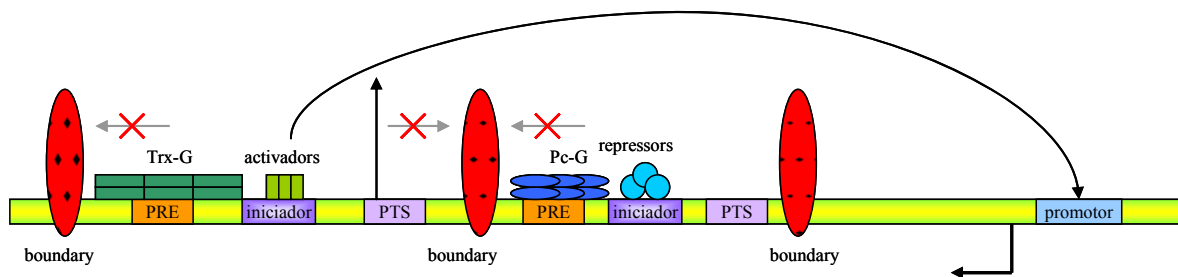


Figura 5.1. Els dominis reguladors de l'expressió de l'*Abd-B* funcionen de forma independent. Un element iniciador que recruta proteïnes activadores és capaç d'activar l'expressió del gen que regula; quan aquestes proteïnes decauen, l'expressió que han promogut es manté al llarg de les divisions cel·lulars gràcies a les proteïnes del Trx-G. Aquesta activació pot tenir lloc fins i tot a través d'elements boundary gràcies a unes regions anomenades PTSs, que permeten que els iniciadors sobrepassin els insulators. Els dominis on l'iniciador ha conduït el recrutament de proteïnes repressores es mantenen en un estat reprimat gràcies al recrutament de proteïnes del Pc-G. Els elements boundary eviten que les proteïnes encarregades del manteniment d'un estat activat o reprimat de la cromatina s'extenguin d'un domini a l'adjacent, de manera que permeten una regulació independent de cada domini.

D'altra banda, s'ha vist que per a que els diferents dominis reguladors funcionin de manera independent i les proteïnes d'un no s'extenguin pels adjacents, cal que es trobin separats per uns elements que actuïn com a barrera. Aquests elements reguladors s'han anomenat boundaries, i se n'han descrit diversos al llarg de tot el BX-C (Barges *et al.*, 2000; Belozarov *et al.*, 2003; Mihaly *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1999a). La funció del boundary és separar diferents dominis de cromatina, de manera que els confereix identitat i autonomia. Els boundaries del BX-C presenten també activitat *enhancer-blocking*.

5.1.1. L'*iab6*PRE: un nou element de manteniment

Si bé s'han identificat diferents elements reguladors de l'expressió gènica de l'*Abd-B* a tots els dominis 3' *cis*-reguladors d'aquest *locus*, el que roman més desconegut fins el

moment és l'iab-6. Recentment s'ha descrit un element iniciador al domini iab-6, que condueix l'expressió del gen homeòtic al segment abdominal A6. Aquest element mostra certa activitat com a element de manteniment, però sembla que no és suficient per a que l'expressió sigui la correcta al llarg de tot el desenvolupament de l'organisme (Mihaly *et al.*, 2006).

Així doncs, amb l'objectiu d'identificar possibles noves regions reguladores, i donat que tots els elements reguladors descrits al BX-C mostren llocs hipersensibles, vam realitzar un assaig d'hipersensibilitats a DNaseI que cobria una regió de 12 Kb entre l'iab-5 i l'iab-6 i vam identificar la presència de dues regions hipersensibles. Si bé, aquest experiment no ens permetia saber si aquestes noves regions es corresponien a elements reguladors de l'*Abd-B*, de manera que vam decidir testar la seva activitat mitjançant còpies ectòpiques en individus transgènics.

Vam utilitzar un model en què l'element a estudiar se situa entre l'enhancer i el promotor que controlen l'expressió d'un gen reporter, en el nostre cas el *white*, de manera que si l'element promou alguna activitat reguladora de l'expressió gènica, aquesta es pot detectar fenotípicament mitjançant l'observació de la pigmentació dels ulls dels individus adults. Aquest model permet la identificació tant d'elements de manteniment com d'elements boundary.

En primer lloc, però, vam decidir generar construccions amb els elements Fab-7+iab7PRE i Fab-7 entre l'enhancer i el promotor del *white*, ja que d'aquesta manera, no només disposaríem d'una eina per a poder realitzar estudis de la regulació de l'element Fab-7, sinó que, a més, aquestes construccions ens permetrien conèixer les activitats de silenciament i de *Pairing-Sensitive Silencing* que presenten dos elements reguladors ja caracteritzats, de manera que representarien un model amb què comparar les possibles activitats promogudes per les noves regions identificades.

D'aquesta manera vam determinar que la nova regió hipersensible que es localitza al 96.000 del BX-C es tracta d'un nou element PRE, que vam anomenar iab6PRE. Hem vist que aquest element no només condueix el silenciament del gen reporter sinó que també mostra *Pairing Sensitive Silencing*, i que aquestes dues activitats depenen de proteïnes del Pc-G. El fet que aquest element PRE mostri hipersensibilitats a la digestió amb DNaseI suggereix que, com la resta d'elements reguladors descrits al BX-C, es correspon a una regió lliure de

nucleosomes, probablement per a promoure el reconeixement de les proteïnes implicades en el manteniment.

Aquests resultats expliquen que determinats mutants en què l'iniciador IAB6 es manté intacte però s'ha deletat una regió de gairebé 11 Kb entre els dominis iab-5 i iab-6 que inclou l'element de manteniment que hem identificat, l'iab6PRE, no només presenten una manca d'expressió de l'*Abd-B* al segment A5, que es transforma en A4, sinó que també mostren una alteració a l'expressió del gen al segment A6. S'ha vist que, mentre a embrions l'expressió de l'*Abd-B* al parasegment 11 sembla normal, a adults sembla que es produeix una transformació parcial de l'A6 a l'A5. S'havia suggerit que, probablement, el fet que l'expressió no es mantingués al llarg del desenvolupament larvari podia ser degut a la deleció, en aquests mutants, d'un enhancer d'expressió específica de teixits de l'adult (Mihaly *et al.*, 2006). Donat els resultats que hem obtingut, nosaltres proposem una altra possibilitat. La deleció que presenten els mutants descrits per aquest grup inclouen la regió que nosaltres hem identificat com a l'element de manteniment iab6PRE. La deleció d'aquesta regió en els mutants provocaria que l'expressió del gen homeòtic promoguda per l'IAB6 a l'embrió no es pogués mantenir al llarg del desenvolupament, induint la transformació homeòtica observada als adults.

5.1.2. Existeix el Fab-6 ?

Com hem dit, els diferents dominis reguladors contenen nombrosos elements encarregats de promoure diferents activitats que, en conjunt, controlen l'expressió de l'*Abd-B* de forma específica als diferents segments abdominals de *Drosophila*. A l'iab-6, que havia estat el domini on s'havien identificat menys elements reguladors fins el moment, s'hi han descrit ja un element iniciador i un element de manteniment. Però com és possible que aquest domini es mantingui de forma independent i autònoma respecte els dominis adjacents, i que no es trobi influenciat per les proteïnes que els regulen? Hem vist que els elements que s'encarreguen de conferir identitat i independència als diferents dominis del BX-C són els elements boundary o Frontabdominals. El Fab-7 és l'encarregat de separar els dominis iab-6 i iab-7, de manera que no permet que les proteïnes que s'estableixen a l'iab-7 s'extenguin fins a l'iab-6 (Mihaly *et al.*, 1997). No s'ha identificat, però, cap element Fab que separi els dominis iab-5 i iab-6.

Donada l'estructura repetitiva i modular que hem observat al llarg de tota la regió 3' cis-reguladora de l'*Abd-B*, vam pensar que aquest element boundary havia d'existir, i que no s'hauria de trobar molt lluny de l'element iab6PRE. Com hem vist, tant el Fab-7 com el Fab-8 delimiten al seu extrem proximal amb els elements de manteniment iab7PRE i iab8PRE, respectivament (Barges *et al.*, 2000; Mihaly *et al.*, 1997). El patró d'hipersensibilitats observat a les regions reguladores del Fab-8 i Fab-7 presenta un lloc lliure de nucleosomes majoritari envoltat d'uns altres de minoritaris. En totes dues regions la hipersensibilitat majoritària correspon a l'element boundary que, a més, pot presentar més llocs accessibles a la nucleasa.

Donada l'organització observada en aquests elements i, ja que havíem vist un patró similar a la regió que havíem identificat com a iab6PRE, ens vam proposar determinar si aquesta regió estava formada per un boundary i un PRE o només per un PRE. Així doncs vam pensar que, si aquesta regió es comportava de la mateixa manera que les dues regions boundary identificades anteriorment, el Fab-6 es podria localitzar sobre la regió hipersensible majoritària, mentre l'element PRE se situaria a 3', probablement a sobre de la hipersensibilitat minoritària. Tot i que ja havíem generat transgènics en que tota la regió hipersensible es localitzava entre l'enhancer i el promotor del *miniwhite*, els resultats obtinguts no ens permetien saber si aquesta regió presentava una o les dues activitats ja que, com hem vist, els transgènics que contenen l'element boundary Fab-7 i l'iab7PRE entre l'enhancer i el promotor del gen reporter mostren silenciament i PSS equivalents als observats als individus iab6HS. Per tant, per tal d'identificar un element boundary cal aïllar-lo de l'element de manteniment, de manera que només presenti silenciament i no PSS, tal i com s'observa amb el Fab-7.

Per a comprobar aquesta hipòtesi vam generar mosques transgèniques en què vam intercanviar els diferents llocs hipersensibles entre l'enhancer i el promotor del gen reporter. No obstant, el que vam observar va ser que, mentre la hipersensibilitat majoritària semblava conservar tota l'activitat de l'element PRE, la regió que incloïa la hipersensibilitat minoritària no semblava mostrar cap activitat. D'aquesta manera vam determinar que la hipersensibilitat majoritària HS2 de l'iab6PRE és suficient per a promoure el silenciament i el PSS dependent de les proteïnes del Pc-G, però no sabem si aquest fragment presenta activitat *enhancer-blocking*. No obstant, tot i que el model utilitzat no ens permet distingir si silenciament del gen reporter és degut a l'activitat *enhancer-blocking* d'un boundary o al

silenciament pel recrutament de proteïnes del Pc-G al PRE, el tamany dels fragments analitzats sembla indicar que aquesta regió podria correspondre només a un element de manteniment.

Per a acabar d'analitzar tota la regió, vam decidir testar la seqüència que es troba a 3' d'aquest lloc HS2 entre el promotor i l'enhancer del gen reporter. Així doncs, vam generar mosques transgèniques amb un fragment de 900 bp que es troba a 3' de l'HS2, però novament no vam observar activitat silenciadora, suggerint que el Fab-6 tampoc es troba en aquesta regió de l'iab-6.

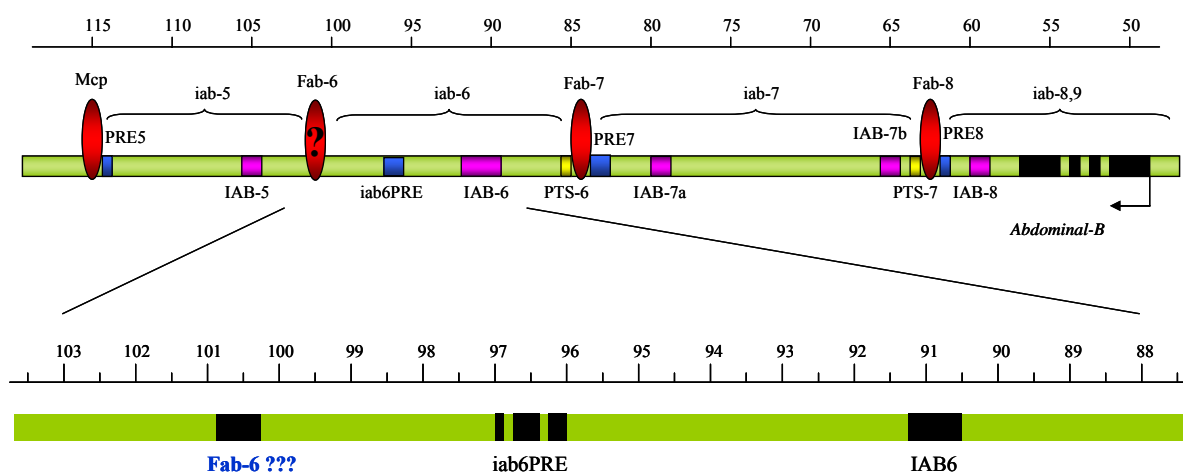


Figura 5.2. A dalt, *locus* de l'*Abd-B*. S'indiquen les regions reguladores conegudes i el nou element iab6PRE. També s'indica, amb un interrogant, la localització del possible element boundary Fab-6. A baix, ampliació de la regió compresa entre els dominis iab-5 i iab-6. S'hi indiquen les tres regions hipersensibles identificades.

Però la pregunta de si existeix aquest element boundary que separa l'iab-5 de l'iab-6 roman sense resposta. No obstant, mitjançant el crivellatge que havíem fet per a identificar noves regions hipersensibles al domini iab-6 havíem identificat un lloc lliure de nucleosomes que es localitzava, aproximadament, al 101.000 del BX-C, o sigui, a unes 4 Kb a 3' de l'iab6PRE. Tot i que aquesta regió no es troba immediatament adjacent a l'element de manteniment, podria tractar-se del Fab-6. Aquesta regió mostra una hipersensibilitat molt gran, comparable al lloc majoritari del Fab-7 i el fet que aquest lloc HS es trobi equidistant dels elements frontabdominals adjacents (es troba a 13 Kb de l'MCP i a 14 Kb del Fab-7) també podria indicar que l'element Fab-6 es localitza en aquesta regió (figura 5.2). Actualment estem realitzant assajos amb construccions transgèniques per tal de caracteritzar la possible funció d'aquesta regió hipersensible.

5.2. Estructura de la cromatina de l'*Abd-B*

5.2.1. El BX-C està hipoacetil·lat

Amb l'objectiu d'estudiar l'estructura de la cromatina del Complex Bitòrax de *Drosophila*, en primer lloc vam decidir analitzar el patró de modificacions que presenten les histones H3 i H4. Aquestes dues histones no són les úniques que presenten modificacions covalents que permeten determinar si la cromatina es troba en un estat activat o reprimat, però són les histones més ben estudiades i a les que s'han identificat més modificacions (Strahl *et al.*, 2000).

La hiperacetil·lació dels residus lisina de les cues d'aquestes histones s'ha associat àmpliament amb estats activats de la cromatina, mentre la hipoacetil·lació sembla anar lligada a estats reprimats. Pel que fa a la metil·lació, es una modificació que s'ha associat tant a activació com a repressió, segons el residu que afecti i el nombre de modificacions que presenti (Grunstein, 1997).

Recentment, s'ha descrit que a cèl·lules en què el gen *Ubx* no s'expressa, tot el *locus* es troba altament trimetil·lat a les lisines 9 i 27 de la histona H3 i a la lisina 20 de l'H4, marques que s'han relacionat amb estats reprimats de la cromatina (Kahn *et al.*, 2006; Papp *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2006), mentre a cèl·lules en què el gen es troba actiu, aquestes marques disminueixen molt. També s'ha vist que, quan el gen es troba actiu, es detecta un enriquiment de l'H3K4 trimetil·lada al promotor i de l'H4K20 monometil·lada a tota la regió, indicant que aquestes modificacions no permeten que es produeixi el silenciament mediat per Pc-G (Papp *et al.*, 2006), i que l'activació de la transcripció en construccions transgèniques promou la hiperacetil·lació de la histona H4 als elements reguladors Fab-7 i iab7PRE ectòpics (Cavalli *et al.*, 1999).

De la mateixa manera, nosaltres hem vist que totes les regions reguladores analitzades, tant al *locus* de l'*Abd-B* com a l'*Ubx*, mostren un patró d'hipoacetil·lació de les histones H3 i H4 i d'hipermetil·lació de la lisina 27 de la histona H3 (la trimetil·lació de la K27 de l'H3 és 5 cops més abundant que l'acetil·lació).

Cal remarcar, en primer lloc, que aquest patró de modificacions representa un estat general de la cromatina de l'organisme; així doncs, donat que les diferents regions

reguladores deuen actuar de forma diferent al llarg de l'eix antero-posterior de l'embrió, i també al llarg del desenvolupament, és possible que aquests elements presentin diferències en el patró de modificacions, però que aquestes quedin emmascarades en realitzar els experiments amb els organismes sencers.

Si bé, aquests resultats suggereixen que, a nivell general a l'embrió, el *locus* de l'*Abd-B* presenta una estructura de la cromatina reprimida, cosa que concorda amb el patró d'expressió del gen homeòtic (es troba silenciada a tota la regió anterior de l'embrió, i només s'expressa dels parasegments 10 a 14) (Estrada *et al.*, 2002). Si bé el patró de modificacions de les histones del *locus* de l'*Abd-B* no havia estat descrit prèviament, cal dir que aquests resultats concorden amb el patró descrit anteriorment a l'*Ubx* (quan el gen no s'expressa predominen les modificacions indicadores de repressió) (Kahn *et al.*, 2006; Papp *et al.*, 2006). Així doncs, aquests resultats ens suggereixen que el *locus* de l'*Abd-B* es troba hipocetil·lat i hipermetil·lat a l'H3K27 a totes les cèl·lules de l'embrió on el gen no s'expressa però que es podria trobar acetil·lat a les histones H3 i H4 a les cèl·lules a les que el gen es troba actiu.

D'altra banda, en el nostre treball ens hem centrat en l'estudi de les modificacions de les regions reguladores; si bé, recentment s'ha descrit que aquestes regions són les que mostren un patró més dèbil de modificacions, probablement degut a que són regions en general lliures de nucleosomes i, per tant, que presenten menys residus detectables (Kahn *et al.*, 2006). Tot i que el patró d'hipermetil·lació de l'H3K27 és clar, caldria comparar aquests resultats amb les modificacions de regions del mateix *locus* no descrites com a reguladores de l'expressió del gen, i amb immunoprecipitacions amb anticossos de les histones, modificades o no, per a determinar quin percentatge s'hi troben modificades.

Finalment, cal dir que la trimetil·lació de la lisina 27 de l'H3 es troba àmpliament associada al recrutament de Polycomb. El cromodomini de Pc, del complex PRC1, és capaç de reconèixer específicament la trimetilH3K27, promovent el recrutament del complex a la regió i, per tant, l'establiment d'un estat silenciada (L. Wang *et al.*, 2004). No obstant, també s'ha vist que, mentre la marca de trimetil·lació de la K27 de l'H3 es troba al llarg de tota la regió de l'*Ubx* quan el gen no s'està expressant, les proteïnes Pc, PSC i E(Z) es troben només a sobre dels elements PRE del *locus*, indicant que la trimetil·lació de l'H3K27 no és la responsable del recrutament de Pc (Kahn *et al.*, 2006). S'ha suggerit que els complexos repressors podrien ésser recrutats als llocs PREs per proteïnes com GAGA, PSQ, Zeste i Pho

i que, llavors, podrien promoure la formació d'estructures tridimensionals de la cromatina que induïssin la metil·lació no només dels elements PREs sinó també de les regions adjacents; aquesta hipermetil·lació de la regió promouria una major estabilitat dels complexos repressors (Kahn *et al.*, 2006).

5.2.2. Els llocs hipersensibles són molt estables

Amb l'objectiu d'estudiar l'estructura de la cromatina del BX-C al llarg del desenvolupament, al llarg d'aquesta memòria també hem analitzat l'accessibilitat de la cromatina a la digestió amb DNasaI de diferents regions i a diferents moments del desenvolupament. Hem vist que els llocs lliures de nucleosomes identificats a la regió del Fab-7/iab7PRE i a l'iab6PRE mitjançant l'assaig de DNasaI, es poden detectar des d'estadis molt primerencs del desenvolupament embrionari fins a estadis de larva III, al final de desenvolupament larvari. Aquests llocs hipersensibles a la nucleasa no només hi són presents quan l'element regulador es troba en el context del Complex Bitòrax, sinó que també s'hi pot identificar el mateix patró quan l'element es troba en una construcció transgènica.

En segon lloc, també hem vist que les hipersensibilitats que presenta l'element boundary Fab-7 no es veuen alterades en les construccions transgèniques Fab-7, generades amb aquest element situat entre l'enhancer i el promotor del *miniwhite* en absència de l'element de manteniment adjacent (iab7PRE). Les dues línies independents analitzades, tot i mostrar una expressió del gen reporter molt diferent, presenten els dos llocs hipersensibles que corresponen al Fab-7. Aquest resultat ens suggereix que, tot i que el posicionament dels nucleosomes a la cromatina és, en general, aleatori (Kornberg *et al.*, 1999), la seqüència del Fab-7 condueix a la formació de llocs lliures de nucleosomes independentment de la presència d'un element PRE, de manera que es generen espais accessibles per a les proteïnes implicades en el funcionament de l'element boundary, així com per a la DNasaI. D'aquesta manera, sembla que el posicionament dels nucleosomes sobre aquesta seqüència deu dependre del recrutament específic de proteïnes relacionades amb el funcionament del boundary als primers estadis del desenvolupament, que no permeten que els nucleosomes s'ensamblin sobre determinades seqüències diana o que potencien que n'emmaskin d'altres.

Finalment, s'ha indicat que la repressió mediada per Pc redueix l'accessibilitat del DNA a processos com la transcripció i la recombinació (Fitzgerald *et al.*, 2001). Així doncs, vam pensar que, donat que l'element iab6PRE ectòpic mostra *Pairing-Sensitive Silencing*, cosa que suggereix que la regió es podria trobar en un estat tancat, aquest element hauria de mostrar una disminució de l'accessibilitat a la DNasaI quan es trobés en homozigosi. Si bé, els nostres resultats indiquen que l'element regulador iab6PRE ectòpic és igualment accessible a la digestió amb DNasaI en homozigosi com en heterozigosi. No sembla, doncs, que el silenciament conduït per les proteïnes del Pc-G promogui estats molt tancats i inaccessible de la cromatina, com s'ha suggerit a través del procés d'heterocromatinització (Ebert *et al.*, 2006).

Tots aquests resultats suggereixen que les hipersensibilitats dels elements reguladors són molt estables; el fet que els elements reguladors siguin regions lliures de nucleosomes pot ser molt important per al correcte funcionament d'aquests elements, responent a la necessitat de mantenir-se accessible a la interacció amb complexos proteïcs activadors o repressors.

5.2.3. La hipersensibilitat de l'IAB6 no es manté al llarg del desenvolupament

No obstant, hem identificat una regió que no presenta un patró tan estable de posicionament dels nucleosomes: l'element iniciador de l'iab-6, l'IAB6, caracteritzat recentment al laboratori del Dr. Karch (Mihaly *et al.*, 2006). Si bé aquest element mostra un lloc hipersensible a embrions, aquest lloc desapareix a estadis del desenvolupament més tardans i, a larva III, ja no es pot detectar.

El fet que només haguem pogut detectar aquest canvi a l'IAB6 i no a la resta d'elements analitzats podria ser degut a que aquest element només és necessari i funcionalment actiu als inicis del desenvolupament embrionari, ja que és l'encarregat de reclutar els productes dels gens gap i pair-rule i d'iniciar la transcripció de l'*Abd-B* al segment A6 (Mihaly *et al.*, 2006). Cap a les 6 hores després de la posta, però, aquestes proteïnes comencen a decaure i, com hem vist, el manteniment de l'estat activat de la cromatina que han establert es dona a través del reclutament de les proteïnes del Trx-G als

elements de manteniment. Sembla, doncs, que aquest element ja no jugaria cap paper en la regulació més tardana de l'expressió del gen homeòtic.

D'aquesta manera la nostra hipòtesi és que, a l'inici del desenvolupament, l'IAB6 s'hauria de mantenir en un estat accessible per a ésser reconegut per les *gap* i les *pair-rule*, de manera que algunes proteïnes no permetrien la deposició dels nucleosomes i es conduiria la formació d'un lloc HS; d'altra banda, en avançar l'embriogènesi i, sobretot, durant el desenvolupament larvari aquesta regió ja no caldria que es trobés accessible, i aquestes proteïnes es degradarien o, simplement, deixarien d'interaccionar amb l'iniciador, de manera que a cada replicació els nucleosomes es podrien depositar a qualsevol lloc, i la hipersensibilitat s'aniria diluint en el conjunt cel·lular fins que fós indetectable.

5.2.4. Les regions reguladores del BX-C contacten entre sí a cèl·lules S2

El fet que les regions reguladores dels gens del BX-C es trobin tan lluny al genoma ha suggerit la formació d'estructures tridimensionals al nucli cel·lular, de manera que promoguin o evitin la formació de contactes entre elements reguladors amb la finalitat de regular l'expressió de l'*Abd-B* (Cleard *et al.*, 2006; Sipos *et al.*, 1998). Aquestes estructures tindrien lloc a través de contactes entre elements reguladors que promourien la formació de *loops*, de manera que les regions reguladores s'acostessin o s'allunyessin al nucli cel·lular.

Que les regions reguladores contacten entre elles al nucli és un fet. Només cal recordar la interacció entre enhancer i promotor (Dean, 2006) o el fenomen del *Pairing-Sensitive Silencing*, en què l'aparellament dels elements PREs promou el potenciament del silenciament dependent de Pc (Bantignies *et al.*, 2003). També s'ha vist que determinats insulators, com el *gypsy*, poden interaccionar entre ells i amb elements de la matriu nuclear i de l'*scaffold* a través de les regions S/MAR, de manera que també poden jugar un paper important en l'organització espacial de la cromatina nuclear (Capelson *et al.*, 2004).

Als insulators descrits al BX-C també se'ls ha suggerit una funció estructural. Recentment, s'ha vist que l'element boundary Fab-7 podria contactar amb el promotor de l'*Abd-B* a teixits on el gen no s'expressa a embrions de *Drosophila*, tot i que aquestes regions es trobin separades fins a 40 Kb (Cleard *et al.*, 2006). També s'ha vist que la proteïna dSAP18, que sembla estar implicada en l'activitat silenciadora del Fab-7, es troba a la matriu

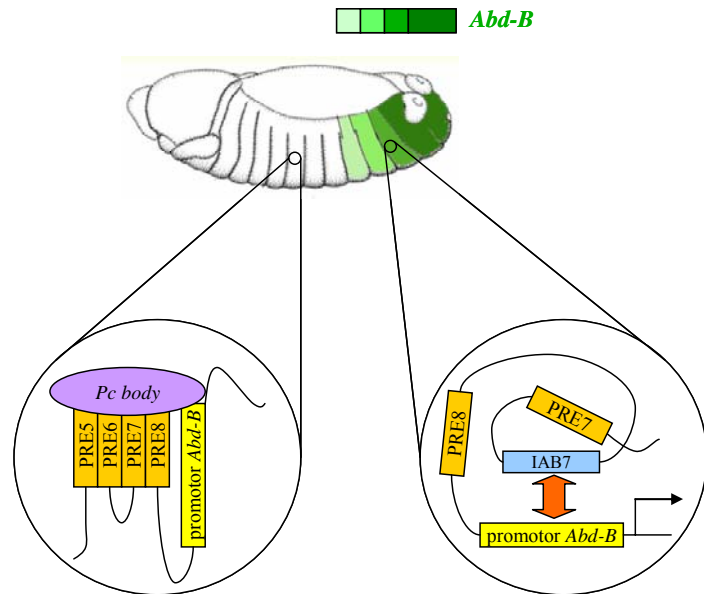
nuclear (Canudas *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006) i que la desacetil·lasa d'histones RPD3 es pot ancorar a la matriu nuclear a través dels receptors de membrana, cosa que és necessària per a que es doni la repressió (Heinzel *et al.*, 1997).

Així doncs, en una primera aproximació en cèl·lules en cultiu on el gen *Abd-B* no s'expressa, vam decidir analitzar la capacitat de l'element iab6PRE d'interaccionar amb d'altres regions reguladores del BX-C, així com amb el promotor de l'*Abd-B*. Els nostres resultats suggereixen que, en un sistema reprimint, alguns elements de manteniment del Complex es troben molt a prop al nucli cel·lular, i també molt a prop del promotor del gen, tot i que es poden trobar fins a 70 Kb de distància en la seqüència. El fet que en aquest sistema l'element iniciador IAB6, que es localitza a només 5 Kb de l'iab6PRE, no contacti amb cap dels elements analitzats ens suggereix també que el Complex s'organitza mitjançant una estructura formada per *loops*, en què els elements de contacte serien les regions de manteniment. D'altra banda, la interacció observada entre l'iab6PRE i el bxdPRE, que regula l'expressió de l'*Ubx*, sembla indicar que les regions reguladores de l'expressió dels diferents gens homeòtics també contacten entre elles, suggerint que l'expressió dels gens homeòtics del BX-C pot estar interconectada.

El mecanisme pel qual aquests elements reguladors contacten entre ells no es coneix, però podria tenir lloc a través de les interaccions dels elements de manteniment del BX-C amb els *Pc bodies*, que representarien les regions d'ancorament d'aquests elements. Els *Pc bodies* són agrupacions de proteïnes del Pc-G al nucli cel·lular, i s'ha postulat que podrien conduir a la formació de dominis de repressió al nucli (Saurin *et al.*, 1998). S'ha vist que la interacció entre regions reguladores del Complex Bitòrax depèn de Pc, suggerint que té lloc a través d'aquestes proteïnes (Bantignies *et al.*, 2003).

Així doncs proposem un model en què, en un estat reprimint, les regions de manteniment que es localitzen als dominis que controlen l'expressió dels gens homeòtics als diferents segments de l'embrió, contacten entre elles i amb els promotors dels gens, i que aquests contactes podrien tenir lloc a través de les interaccions promogudes pels *Pc bodies*, de manera que permetrien la propagació de les proteïnes del Pc-G i, per tant, del senyal de silenciament. Aquestes interaccions suposarien la formació de *loops*, induint que d'altres regions reguladores, com els iniciadors o els enhancers específics de teixit, quedessin allunyades dels promotors i no en permetessin l'activació (figura 5.3).

Figura 5.3. Proponem un model en què la regulació de l'expressió de l'*Abd-B* depèn del contacte entre els elements reguladors dels dominis *iab-5* a *iab-8*. A cèl·lules en què no s'expressa el gen, els diferents elements PRE contacten entre ells i amb el promotor de l'*Abd-B*, de manera que és reprimint a través del contacte amb els *Pc bodies*. D'altra banda, a cèl·lules en què aquest gen s'està expressant, aquests elements reguladors no contactarien amb el promotor, i, fins i tot, es promouria un acostament entre els enhancers i el promotor.



D'altra banda, en un teixit en què els gens homeòtics s'expressin, els elements iniciadors interaccionarien amb els promotors implicant els contactes amb els elements PREs, de manera que no es permetés que les proteïnes del Pc-G silenciessin el gen. També és possible que en un estat activat, els elements de manteniment contactin entre ells a través de la interacció de proteïnes del Trx-G i que, o bé aquestes proteïnes no permetin el contacte amb el promotor, o bé promoguin la interacció però indueixin un senyal d'activació, de manera que el gen s'expressi en aquest teixit.

En qualsevol cas, els resultats obtinguts recolzen la hipòtesi de que el BX-C presenta una organització tridimensional al nucli cel·lular, i que aquesta organització jugaria un paper molt important a l'hora de conduir l'expressió acurada dels gens homeòtics, imprescindible per al correcte desenvolupament de l'organisme.

5.3. Regulació de l'activitat dels elements reguladors del BX-C

D'altra banda, ens havíem proposat estudiar la implicació de diferents proteïnes en la regulació del funcionament dels diferents elements reguladors del BX-C. Així com s'ha vist que l'activitat insulator del Fab-8 depèn de la proteïna CTCF, que participa en l'activitat de tots els insulators de mamífer identificats fins ara (Moon *et al.*, 2005), les proteïnes que són responsables de l'activitat de l'element Fab-7 no han estat descrites, però s'ha vist que els llocs d'interacció GAGAG podrien ser imprescindibles per al seu correcte funcionament (S. Schweinsberg *et al.*, 2004). S'han descrit, però dues proteïnes capaces d'interaccionar amb la seqüència GAGAG: Pipsqueak i GAGA (Granok *et al.*, 1995; Lehmann *et al.*, 1998). S'ha vist que GAGA és capaç d'interaccionar *in vivo* i *in vitro* amb el Fab-7 (Canudas *et al.*, 2005; Strutt *et al.*, 1997) i s'ha suggerit que aquestes dues proteïnes podrien actuar conjuntament a l'hora de regular l'expressió gènica (Schwendemann *et al.*, 2002).

5.3.1. GAGA i la regulació del Complex Bitòrax

GAGA es va classificar en origen com a membre del Grup Trithorax (Lehmann, 2004). Les proteïnes del Trx-G són les encarregades del manteniment d'estats activats de la cromatina, a través de la seva interacció amb els TREs (Marx, 2005). S'ha vist, però, que GAGA també pot interaccionar amb complexos del Pc-G i promoure'n el recrutament als PREs (Horard *et al.*, 2000; Mahmoudi *et al.*, 2003). El fet que en un fons mutant *trl* es produeixi una potenciació del silenciament de la construcció B+P7 similar a l'observada en mutar proteïnes del Trx-G, com BRM, recolza la classificació original de GAGA com a membre del Trx-G, i concorda amb resultats publicats prèviament, en què la mutació de *trl* promou el silenciament conduït per les proteïnes del Pc-G a l'element ectòpic de la línia transgènica 5F24 (Cavalli *et al.*, 1999), però contradiu d'altres resultats en què la mutació de *trl* indueix una desrepressió dels elements de manteniment (MCP i iab7PRE) transgènics (Busturia *et al.*, 2001; Hagstrom *et al.*, 1997; Horard *et al.*, 2000). Aquest resultat indica una col·laboració de GAGA tant amb els complexos del Trx-G com amb els del Pc-G.

D'altra banda, en absència de l'element de manteniment, no hem vist que la falta de GAGA alteri el silenciament promogut pel boundary Fab-7 ectòpic. Tot i aquesta observació, GAGA és la millor candidata per a modular l'activitat boundary del Fab-7, ja que s'ha descrit que els llocs d'interacció GAGAG d'aquest element són imprescindibles per al seu funcionament, que l'activitat *enhancer-blocking* del Fab-7 es veu alterada per mutacions al gen *trl* (S. Schweinsberg *et al.*, 2004) i que GAGA és capaç de modular l'activitat boundary d'altres elements, com el promotor d'*even-skipped* (Ohtsuki *et al.*, 1998) i l'SF1 de l'ANT-C (Belozarov *et al.*, 2003). Val a dir, que els llocs GAGAG no són suficients per a que tingui lloc l'activitat *enhancer-blocking*, de manera que aquesta activitat deu dependre d'altres proteïnes encara no identificades (S. Schweinsberg *et al.*, 2004).

5.3.1.1. L'RNAi de GAGA promou la transformació A6 a A5

Donat que els mutants de GAGA només són viables en heterozigosi i presenten una disminució de la quantitat de la proteïna molt lleugera, vam decidir generar mosques transgèniques que expressessin petits RNAs interferents que conduïssin a la degradació de l'RNA missatger de les dues isoformes de GAGA. D'aquesta manera, preteníem eliminar la proteïna en un moment i/o teixit determinat, per tal d'estudiar la seva funció al llarg del desenvolupament i a determinades regions de l'organisme.

El que vam observar va ser que, sota el control de diversos drivers, l'RNAi de GAGA induïa la transformació homeòtica A6 a A5, observada anteriorment a mutants homozigots de l'al·lel *trl*^{13C} (Farkas *et al.*, 1994). Aquesta transformació es pot detectar fenotípicament a través de l'aparició de pèls al segment abdominal A6, on, en un estat normal, no n'hi ha. Aquests pèls, que sí són presents a l'A5, són la conseqüència de que l'*Abd-B* s'expressi al segment A6 com si es tractés de l'A5, o sigui sota el control de l'*iab-5*.

La pèrdua de funció observada en l'expressió de l'*Abd-B* al segment A6 és deguda a una repressió ectòpica del domini *iab-6* al segment A6, on s'hauria de trobar actiu per a activar l'expressió del gen; l'expressió de l'*Abd-B* queda sota el control de l'*iab-5* i el gen s'expressa com al segment A5, de manera que es produeix la transformació abdominal A6 a A5. Així doncs, sembla que la disminució de la quantitat de GAGA induiria la repressió del domini *iab-6* al segment A6. Que aquest domini es trobi ectòpicament reprimat pot ésser degut bé a un defecte en el manteniment de l'estat activat del domini mediat per les proteïnes

del Trx-G, o bé a una falta de funció del boundary Fab-7, que no actuaria com a barrera separadora dels dominis iab-6 i iab-7, i que permetria una expansió de les proteïnes represores que recobreixen l'iab-7 al segment A6 cap al domini iab-6. Així doncs, sembla que GAGA podria estar jugant un paper en l'activitat d'algun dels elements reguladors d'aquesta regió, ja sigui a través de la seva activitat com a factor de transcripció, o mitjançant la inducció de la remodelació de la cromatina de la regió.

D'altra banda, quan vam voler determinar fins a quin punt disminuïa la quantitat de GAGA a les mosques interferides, vam observar que aquestes mosques mostraven el mateix nivell de proteïna durant el desenvolupament embrionari que les mosques control, mentre que sí es veia una forta disminució a estadis tardans del desenvolupament larvari. Aquests resultats es van confirmar mitjançant la utilització d'un sistema induïble de l'expressió de l'RNAi. En aquests individus, es va observar que, en induir l'expressió de l'RNA interferent de GAGA a estadis tardans del desenvolupament larvari (larva II o larva III) la transformació homeòtica era molt forta. Aquesta transformació era molt lleugera o inexistent en induir el sistema en estadi d'embrió o de larva I, als que tampoc vam observar una forta disminució de la quantitat de proteïna.

Anteriorment, s'havia suggerit que l'activitat de GAGA com a regulador dels gens homeòtics podria ser important només durant el desenvolupament embrionari, ja que no s'havia observat cap fenotip d'alteració de l'expressió d'aquests gens a larves mitjançant clons nulls per *trl* (Bejarano *et al.*, 2004). Els nostres resultats semblen indicar que la falta de GAGA a larves altera l'expressió de l'*Abd-B* al segment abdominal A6 i suggereixen que el manteniment dels estats activats i reprimits que es promou durant el desenvolupament embrionari (un cop els productes dels gens gap i pair-rule comencen a desaparèixer), no és inalterable.

El fet que, un cop ja establerts tots els patrons d'activació i repressió dels diferents dominis reguladors del BX-C i mantinguts mitjançant les proteïnes dels grups Pc i Trx, la devallada de GAGA pugui alterar tot el sistema no implica només un paper important de GAGA en el manteniment de l'estat activat de l'iab-6 al segment A6, sinó que també suggereix que les proteïnes del Trx-G que s'hi han establert poden ser substituïdes per les del Pc-G. Si bé durant molt de temps s'ha pensat que els patrons d'activació i repressió establerts per les proteïnes dels grups Pc i Trx era inalterable, aquesta no és la primera vegada que se suggereix una activitat més dinàmica d'aquestes proteïnes. De fet, s'ha vist que la

localització de les proteïnes Polycomb i Polyhomeotic canvia al llarg del desenvolupament de *Drosophila* (Negre *et al.*, 2006) i s'ha descrit que la inducció de la transcripció d'un gen reporter que es troba flanquejat per dues regions Fab-7/iab7PRE condueix al desplaçament de les proteïnes del Pc-G del transgèn i a l'establiment d'un estat activat de la cromatina, que va acompanyat d'una hiperacetil·lació de la histona H4 (Cavalli *et al.*, 1999). Finalment, recentment s'ha proposat que el manteniment de les estructures inactives de la cromatina podria ser alterat mitjançant la inducció de la transcripció, de manera que el domini transcrit passa a ser actiu i funcional (Sanchez-Elsner *et al.*, 2006).

5.3.1.2. La transformació homeòtica no es deu a un canvi de les hipersensibilitats ni del patró de modificacions de les histones

Una característica molt interessant de la proteïna GAGA és la seva interacció amb els complexos NURF i FACT. Aquests dos complexos s'han relacionat amb una activitat de desplaçament del nucleosoma. En primer lloc, sembla que NURF, que és un complex remodelador de la cromatina ATP-dependent, conjuntament amb GAGA indueix el desplaçament dels nucleosomes del promotor de l'*hsp70 in vitro* (Tsukiyama *et al.*, 1995b). En segon lloc, s'ha descrit que GAGA també col·labora amb el complex dFACT per a conduir el desplaçament dels nucleosomes d'una mostra de cromatina reconstituïda (Shimojima *et al.*, 2003).

Aquestes observacions i el fet que els elements reguladors del gen homeòtic presenten llocs lliures de nucleosomes, semblen indicar que el factor de transcripció podria estar implicat en la regulació de l'*Abd-B* a través de la seva activitat remodeladora de la cromatina. De fet, s'ha suggerit que la funció activadora de la transcripció gènica que mostra GAGA també podria ser deguda a aquesta activitat remodeladora, ja que, mitjançant el desplaçament dels nucleosomes, podria promoure la formació d'estats de la cromatina oberts i accessibles a les proteïnes encarregades de reclutar la maquinària de transcripció (Granok *et al.*, 1995; Wilkins *et al.*, 1997).

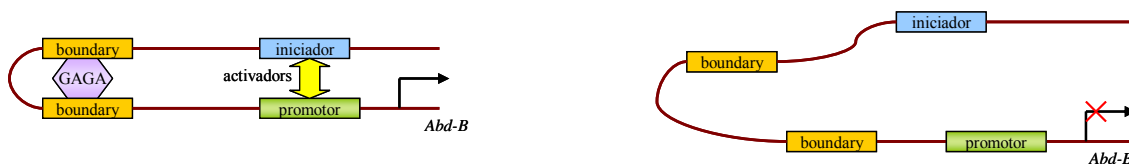
Així doncs, vam decidir estudiar el possible efecte de GAGA sobre els llocs lliures de nucleosomes dels elements Fab-7 i iab7PRE i sobre la nova regió descrita, l'iab6PRE. Donat que GAGA promou el desplaçament dels nucleosomes vam pensar que, en absència d'aquesta proteïna, potser no es podien generar aquests llocs hipersensibles, de manera que

s'emmascaressin seqüències de DNA susceptibles de ser reconegudes per d'altres proteïnes que permetessin l'activitat dels elements reguladors. Però tampoc en aquest cas vam observar canvis als patrons d'hipersensibilitats dels diferents elements reguladors entre larves salvatges i larves que expressaven l'RNAi de GAGA, a les que havíem observat una disminució de la quantitat de la proteïna i el fenotip de transformació homeòtica A6 a A5.

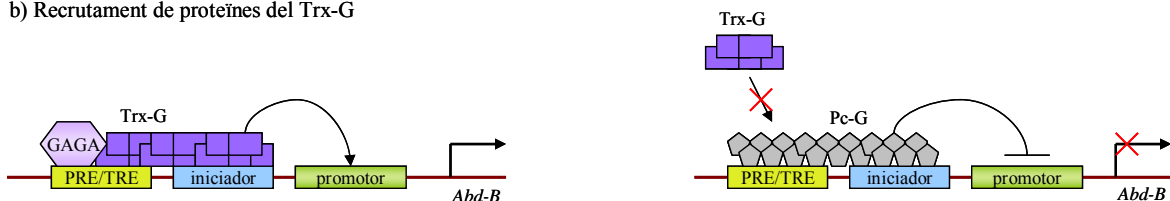
Aquests resultats suggereixen diferents possibilitats. En primer lloc, la disminució de la quantitat de GAGA pot no ser suficient per a promoure un efecte en el posicionament dels nucleosomes a totes les cèl·lules de l'organisme; això implicaria una transformació parcial del segment A6 a A5 però no permetria la detecció d'un canvi en el patró d'hipersensibilitats mitjançant assajos de digestió amb DNasaI.

En segon lloc, és possible que el paper que estigui jugant GAGA en la regulació de l'*Abd-B* no impliqui la remodelació de la cromatina. S'ha suggerit que l'activitat dels

a) Acostament de les regions reguladores mediat per GAGA



b) Recrutament de proteïnes del Trx-G



c) Participació en el mecanisme de transcripció

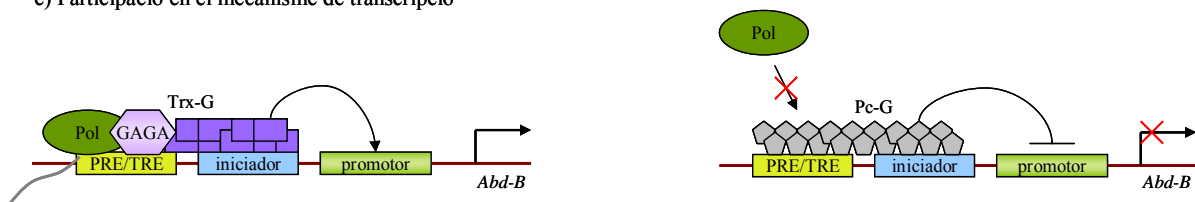


Figura 5.4. Models proposats per a la funció de GAGA en el control de l'activitat dels elements reguladors de l'*Abd-B* (a l'esquerra en presència de GAGA i a la dreta en absència de la proteïna). a) GAGA podria estar implicada en l'acostament de regions reguladores i, l'estructura de la cromatina que promou, podria conduir l'activació de l'expressió gènica. b) GAGA també podria participar en el reclutament de les proteïnes del Trx-G als elements de manteniment. Sense GAGA, les proteïnes del Trx-G no podrien ser reclutades i, en el seu lloc, es dipositarien les proteïnes del Pc-G. c) Finalment, GAGA podria jugar un paper en la iniciació o l'elongació de la transcripció de les regions reguladores, de manera que també es promogué l'expressió de l'*Abd-B*.

elements insulator podria dependre del contacte entre diferents elements reguladors i, fins i tot, de la localització cel·lular (figura 5.4.a) (Bell *et al.*, 1999); de fet, s'ha descrit que el Fab-7 és capaç d'interaccionar amb el promotor de l'*Abd-B* a cèl·lules en que el gen està reprimat (Cleard *et al.*, 2006), i nosaltres hem vist que a cèl·lules en que l'*Abd-B* es troba inactiu diversos elements de manteniment contacten amb el promotor. A més, s'ha suggerit que GAGA podria participar en el contacte entre enhancer i promotor a llargues distàncies mitjançant la seva oligomerització a través del domini POZ, promovent així la formació de *loops* intranuclears (Mahmoudi *et al.*, 2002). És possible, doncs, que GAGA estigui implicada en els mecanismes de contacte entre diferents elements reguladors de manera que, en absència de la proteïna, les regions reguladores no realitzin els contactes adequats i es permeti l'extensió de les proteïnes repressores d'un segment a l'adjacent.

D'altra banda, és possible que la funció de GAGA en el manteniment dels diferents estats de la cromatina al llarg del desenvolupament de *Drosophila* estigui relacionada amb l'estabilitat del manteniment dels complexos dels grups Pc i Trx a sobre de la cromatina o, potser, amb la renovació d'aquests complexos (figura 5.4.b). D'aquesta manera, si les proteïnes del Trx-G necessitessin renovar-se contínuament per a promoure un estat contínuament activat del domini *iab-6* i aquesta renovació depengués del recrutament mediat per GAGA, en disminuir la quantitat de GAGA a l'estadi de larva II no es permetria el recrutament de les proteïnes del Trx-G a l'*iab-6* i aquest podria acabar recrutant les proteïnes del Pc-G, que el reprimirien conduint a una falta de funció que es traduiria en una manca de l'expressió de l'*Abd-B* al segment abdominal A6, i a la transformació a A5.

Finalment, la falta de GAGA, que també juga un paper molt important en el procés de transcripció (Lehmann, 2004), podria conduir a una menor taxa de transcripció de les regions reguladores del BX-C, de manera que els complexos del Trx-G no serien recrutats (Sanchez-Elsner *et al.*, 2006) i es podria induir el canvi d'un estat activat de la cromatina a un de reprimat (figura 5.4.c).

6. CONCLUSIONS

1. Mitjançant un assaig d'hipersensibilitats a DNasaI que cobreix part dels dominis iab-5 i iab-6 del Complex Bitòrax de *Drosophila melanogaster*, hem identificat dues noves regions hipersensibles. La regió més proximal a l'inici de transcripció es troba al 96.500 del BX-C i està formada per dos llocs hipersensibles, un de minoritari proximal (HS1) i un de majoritari més distal (HS2). La segona regió es troba al 100.500 del BX-C i està formada per una única hipersensibilitat majoritària. Vam identificar, també, una tercera regió hipersensible al domini iab-6, que es troba al 91.000 del BX-C i que es correspon al recentment descrit element iniciador IAB6.

2. Mosques transgèniques amb la regió hipersensible proximal del domini iab-6 entre el promotor i l'enhancer del gen *miniwhite* mostren silenciament de l'expressió del gen reporter en heterozigosi i *Pairing-Sensitive Silencing* en homozigosi. El silenciament i el PSS obtinguts són equivalents als observats a mosques transgèniques en què els elements Fab-7 i iab7PRE es troben entre l'enhancer i el promotor del gen reporter. L'activitat promoguda per aquesta regió depèn de proteïnes del Grup Polycomb, indicant que es tracta d'un nou element de manteniment, que vam anomenar iab6PRE.

3. Mosques transgèniques que contenen les regions hipersensibles HS1 i HS2 identificades a l'iab6PRE han indicat que la regió HS2 és suficient per a promoure el silenciament i el PSS, mentre les regions adjacents no mostren cap activitat.

4. El *locus* de l'*Abd-B* es troba, en general a embrions de *Drosophila*, hipoacetil·lat a les histones H3 i H4 i hipermetil·lat a la lisina 27 de la histona H3, marques que s'han relacionat amb estats reprimits de la cromatina associats a Polycomb.

5. Les hipersensibilitats dels elements Fab-7, iab7PRE i iab6PRE són molt estables i es poden detectar al llarg de tot el desenvolupament de l'organisme. Aquests llocs lliures de nucleosomes també hi són presents quan els elements se situen en construccions transgèniques i, fins i tot, quan el gen reporter es troba totalment silenciats. En canvi, la hipersensibilitat que correspon a l'element iniciador IAB6 només es pot detectar durant el desenvolupament embrionari i no en estadis tardans del desenvolupament larvari, suggerint que aquests llocs lliures de nucleosomes no són necessaris quan l'element regulador ja no és funcional.

6. Mutants que no expressen la proteïna dSAP18 mostren una disminució del silenciament promogut pels elements Fab-7 i iab7PRE en còpies ectòpiques; aquesta desrepressió del transgèn és similar a l'observada en individus mutants per Polycomb. Si bé,

la falta de dSAP18 no condueix a cap canvi en el patró d'hipersensibilitats a DNasaI ni de modificacions de les histones als elements reguladors analitzats, endògens ni ectòpics.

7. Mitjançant assajos d'immunoprecipitació de cromatina, hem vist que GAGA s'associa als elements reguladors Fab-8, Fab-7 i iab7PRE. Individus mutants de *trl* en heterozigosi mostren un potenciament del PSS conduït per l'element iab7PRE en còpies ectòpiques, suggerint que GAGA actua conjuntament amb les proteïnes del Trx-G en la regulació d'aquest element.

8. Les mosques que expressen l'RNAi de GAGA presenten la transformació homeòtica A6 a A5, indicativa d'una desregulació del gen *Abd-B* al domini iab-6. La transformació homeòtica abdominal és deguda a una disminució de la quantitat de GAGA a estadis tardans del desenvolupament larvari.

9. Si bé, tot i la disminució de la quantitat de GAGA, no hem observat cap canvi en el patró de modificacions de les histones ni de les hipersensibilitats a DNasaI dels elements Fab-7, iab7PRE ni iab6PRE.

7. BIBLIOGRAFIA

- E. D. Andrulis, A. M. Neiman, D. C. Zappulla and R. Sternglanz** (1998) Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature*. 394:592-5
- M. Angulo, M. Corominas and F. Serras** (2004) Activation and repression activities of ash2 in *Drosophila* wing imaginal discs. *Development*. 131:4943-53
- G. Arents and E. N. Moudrianakis** (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:11170-4
- J. A. Armstrong, O. Papoulas, G. Daubresse, A. S. Sperling, J. T. Lis, M. P. Scott and J. W. Tamkun** (2002) The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *Embo J*. 21:5245-54
- P. Badenhorst, M. Voas, I. Rebay and C. Wu** (2002) Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev*. 16:3186-98
- E. Bae, V. C. Calhoun, M. Levine, E. B. Lewis and R. A. Drewell** (2002) Characterization of the intergenic RNA profile at abdominal-A and Abdominal-B in the *Drosophila* bithorax complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:16847-52
- F. Bantignies, R. H. Goodman and S. M. Smolik** (2000) Functional interaction between the coactivator *Drosophila* CREB-binding protein and ASH1, a member of the trithorax group of chromatin modifiers. *Mol Cell Biol*. 20:9317-30
- F. Bantignies, C. Grimaud, S. Lavrov, M. Gabut and G. Cavalli** (2003) Inheritance of Polycomb-dependent chromosomal interactions in *Drosophila*. *Genes Dev*. 17:2406-20
- S. Barges, J. Mihaly, M. Galloni, K. Hagstrom, M. Muller, G. Shanower, P. Schedl, H. Gyurkovics and F. Karch** (2000) The Fab-8 boundary defines the distal limit of the bithorax complex iab-7 domain and insulates iab-7 from initiation elements and a PRE in the adjacent iab-8 domain. *Development*. 127:779-90
- P. A. Beachy, S. L. Helfand and D. S. Hogness** (1985) Segmental distribution of bithorax complex proteins during *Drosophila* development. *Nature*. 313:545-51
- R. W. Beeman** (1987) A homeotic gene cluster in the red flour beetle. *Nature*. 327:247-249
- C. Beisel, A. Imhof, J. Greene, E. Kremmer and F. Sauer** (2002) Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature*. 419:857-62
- F. Bejarano and A. Busturia** (2004) Function of the Trithorax-like gene during *Drosophila* development. *Dev Biol*. 268:327-41
- A. C. Bell and G. Felsenfeld** (1999) Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Genet Dev*. 9:191-8
- V. E. Belozerov, P. Majumder, P. Shen and H. N. Cai** (2003) A novel boundary element may facilitate independent gene regulation in the Antennapedia complex of *Drosophila*. *Embo J*. 22:3113-21
- W. Bender and D. P. Fitzgerald** (2002) Transcription activates repressed domains in the *Drosophila* bithorax complex. *Development*. 129:4923-30
- C. Benyajati, L. Mueller, N. Xu, M. Pappano, J. Gao, M. Mosammamarast, D. Conklin, H. Granok, C. Craig and S. Elgin** (1997) Multiple isoforms of GAGA factor, a critical component of chromatin structure. *Nucleic Acids Res*. 25:3345-53
- M. D. Biggin and R. Tjian** (1988) Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. *Cell*. 53:699-711
- J. Bode, S. Goetze, H. Heng, S. A. Krawetz and C. Benham** (2003) From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics. *Chromosome Res*. 11:435-45
- C. Bonet, I. Fernandez, X. Aran, J. Bernues, E. Giralt and F. Azorin** (2005) The GAGA protein of *Drosophila* is phosphorylated by CK2. *J Mol Biol*. 351:562-72

- K. Bouazoune and A. Brehm** (2006) ATP-dependent chromatin remodeling complexes in *Drosophila*. *Chromosome Res.* 14:433-49
- M. Braunstein, R. E. Sobel, C. D. Allis, B. M. Turner and J. R. Broach** (1996) Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol Cell Biol.* 16:4349-56
- B. Burgess-Beusse, C. Farrell, M. Gaszner, M. Litt, V. Mutskov, F. Recillas-Targa, M. Simpson, A. West and G. Felsenfeld** (2002) The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 Suppl 4:16433-7
- A. Busturia and M. Bienz** (1993) Silencers in abdominal-B, a homeotic *Drosophila* gene. *Embo J.* 12:1415-25
- A. Busturia, A. Lloyd, F. Bejarano, M. Zavortink, H. Xin and S. Sakonju** (2001) The MCP silencer of the *Drosophila* Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression. *Development.* 128:2163-73
- A. Busturia, C. D. Wightman and S. Sakonju** (1997) A silencer is required for maintenance of transcriptional repression throughout *Drosophila* development. *Development.* 124:4343-50
- M. Buszczak and A. C. Spradling** (2006) Searching chromatin for stem cell identity. *Cell.* 125:233-6
- S. Canudas, S. Perez, L. Fanti, S. Pimpinelli, N. Singh, S. D. Hanes, F. Azorin and M. L. Espinas** (2005) dSAP18 and dHDAC1 contribute to the functional regulation of the *Drosophila* Fab-7 element. *Nucleic Acids Res.* 33:4857-64
- R. Cao, L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. S. Jones and Y. Zhang** (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.* 298:1039-43
- M. Capelson and V. G. Corces** (2004) Boundary elements and nuclear organization. *Biol Cell.* 96:617-29
- M. Capelson and V. G. Corces** (2005) The ubiquitin ligase dTopors directs the nuclear organization of a chromatin insulator. *Mol Cell.* 20:105-16
- M. Carmo-Fonseca** (2002) The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation. *Cell.* 108:513-21
- G. Cavalli and R. Paro** (1998) The *Drosophila* Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell.* 93:505-18
- G. Cavalli and R. Paro** (1999) Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. *Science.* 286:955-8
- S. E. Celniker, S. Sharma, D. J. Keelan and E. B. Lewis** (1990) The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: cis-regulation in the Abdominal-B domain. *Embo J.* 9:4277-86
- Q. Chen, L. Lin, S. Smith, Q. Lin and J. Zhou** (2005) Multiple Promoter Targeting Sequences exist in Abdominal-B to regulate long-range gene activation. *Dev Biol.* 286:629-36
- J. H. Chung, M. Whiteley and G. Felsenfeld** (1993) A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell.* 74:505-14
- C. R. Clapier, G. Langst, D. F. Corona, P. B. Becker and K. P. Nightingale** (2001) Critical role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI. *Mol Cell Biol.* 21:875-83
- F. Cleard, Y. Moshkin, F. Karch and R. K. Maeda** (2006) Probing long-distance regulatory interactions in the *Drosophila melanogaster* bithorax complex using Dam identification. *Nat Genet.* 38:931-5

- D. Cmarko, P. J. Verschure, T. E. Martin, M. E. Dahmus, S. Krause, X. D. Fu, R. van Driel and S. Fakan** (1999) Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol Biol Cell*. 10:211-23
- D. Cmarko, P. J. Verschure, A. P. Otte, R. van Driel and S. Fakan** (2003) Polycomb group gene silencing proteins are concentrated in the perichromatin compartment of the mammalian nucleus. *J Cell Sci*. 116:335-43
- R. T. Collins and J. E. Treisman** (2000) Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of wingless target genes. *Genes Dev*. 14:3140-52
- E. Costa, S. Canudas, I. Garcia-Bassets, S. Perez, I. Fernandez, E. Giralt, F. Azorin and M. L. Espinas** (2006) Drosophila dSAP18 is a nuclear protein that associates with chromosomes and the nuclear matrix, and interacts with pinin, a protein factor involved in RNA splicing. *Chromosome Res*. 14:515-26
- T. Cremer and C. Cremer** (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*. 2:292-301
- B. Czermin, R. Melfi, D. McCabe, V. Seitz, A. Imhof and V. Pirrotta** (2002) Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell*. 111:185-96
- X. de la Cruz, S. Lois, S. Sanchez-Molina and M. A. Martinez-Balbas** (2005) Do protein motifs read the histone code? *Bioessays*. 27:164-75
- A. Dean** (2006) On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends Genet*. 22:38-45
- J. Dejardin, A. Rappailles, O. Cuvier, C. Grimaud, M. Decoville, D. Locker and G. Cavalli** (2005) Recruitment of Drosophila Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. *Nature*. 434:533-8
- J. Dekker, K. Rippe, M. Dekker and N. Kleckner** (2002) Capturing chromosome conformation. *Science*. 295:1306-11
- G. I. Dellino, Y. B. Schwartz, G. Farkas, D. McCabe, S. C. Elgin and V. Pirrotta** (2004) Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol Cell*. 13:887-93
- R. Denell** (1994) Discovery and genetic definition of the Drosophila Antennapedia complex. *Genetics*. 138:549-52
- D. Dorsett** (1993) Distance-independent inactivation of an enhancer by the suppressor of Hairy-wing DNA-binding protein of Drosophila. *Genetics*. 134:1135-44
- D. Dorsett** (1999) Distant liaisons: long-range enhancer-promoter interactions in Drosophila. *Curr Opin Genet Dev*. 9:505-14
- R. A. Drewell, E. Bae, J. Burr and E. B. Lewis** (2002) Transcription defines the embryonic domains of cis-regulatory activity at the Drosophila bithorax complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:16853-8
- I. Duncan and G. Montgomery** (2002) E. B. Lewis and the bithorax complex: part II. From cis-trans test to the genetic control of development. *Genetics*. 161:1-10
- I. W. Duncan** (2002) Transvection effects in Drosophila. *Annu Rev Genet*. 36:521-56
- A. Ebert, S. Lein, G. Schotta and G. Reuter** (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in Drosophila. *Chromosome Res*. 14:377-92
- A. Ebert, G. Schotta, S. Lein, S. Kubicek, V. Krauss, T. Jenuwein and G. Reuter** (2004) Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in Drosophila. *Genes Dev*. 18:2973-83
- J. A. Eisen, K. S. Sweder and P. C. Hanawalt** (1995) Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res*. 23:2715-23

- L. K. Elfring, C. Daniel, O. Papoulas, R. Deuring, M. Sarte, S. Moseley, S. J. Beek, W. R. Waldrip, G. Daubresse, A. DePace, J. A. Kennison and J. W. Tamkun** (1998) Genetic analysis of brahma: the Drosophila homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics*. 148:251-65
- S. Ercan and R. T. Simpson** (2004) Global chromatin structure of 45,000 base pairs of chromosome III in a- and alpha-cell yeast and during mating-type switching. *Mol Cell Biol*. 24:10026-35
- M. L. Espinas, S. Canudas, L. Fanti, S. Pimpinelli, J. Casanova and F. Azorin** (2000) The GAGA factor of Drosophila interacts with SAP18, a Sin3-associated polypeptide. *EMBO Rep*. 1:253-9
- M. L. Espinas, E. Jimenez-Garcia, A. Vaquero, S. Canudas, J. Bernues and F. Azorin** (1999) The N-terminal POZ domain of GAGA mediates the formation of oligomers that bind DNA with high affinity and specificity. *J Biol Chem*. 274:16461-9
- B. Estrada, F. Casares, A. Busturia and E. Sanchez-Herrero** (2002) Genetic and molecular characterization of a novel iab-8 regulatory domain in the Abdominal-B gene of Drosophila melanogaster. *Development*. 129:5195-204
- G. Farkas, J. Gausz, M. Galloni, G. Reuter, H. Gyurkovics and F. Karch** (1994) The Trithorax-like gene encodes the Drosophila GAGA factor. *Nature*. 371:806-8
- M. Faucheux, J. Y. Roignant, S. Netter, J. Charollais, C. Antoniewski and L. Theodore** (2003) batman Interacts with polycomb and trithorax group genes and encodes a BTB/POZ protein that is included in a complex containing GAGA factor. *Mol Cell Biol*. 23:1181-95
- R. Festenstein and D. Kioussis** (2000) Locus control regions and epigenetic chromatin modifiers. *Curr Opin Genet Dev*. 10:199-203
- D. P. Fitzgerald and W. Bender** (2001) Polycomb group repression reduces DNA accessibility. *Mol Cell Biol*. 21:6585-97
- C. Francastel, D. Schubeler, D. I. Martin and M. Groudine** (2000) Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1:137-43
- N. J. Francis and R. E. Kingston** (2001) Mechanisms of transcriptional memory. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:409-21
- N. J. Francis, R. E. Kingston and C. L. Woodcock** (2004) Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science*. 306:1574-7
- C. Fritsch, D. Beuchle and J. Muller** (2003) Molecular and genetic analysis of the Polycomb group gene Sex combs extra/Ring in Drosophila. *Mech Dev*. 120:949-54
- M. Galloni, H. Gyurkovics, P. Schedl and F. Karch** (1993) The bluetail transposon: evidence for independent cis-regulatory domains and domain boundaries in the bithorax complex. *Embo J*. 12:1087-97
- D. A. Gdula, R. Sandaltzopoulos, T. Tsukiyama, V. Ossipow and C. Wu** (1998) Inorganic pyrophosphatase is a component of the Drosophila nucleosome remodeling factor complex. *Genes Dev*. 12:3206-16
- T. I. Gerasimova, K. Byrd and V. G. Corces** (2000) A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA. *Mol Cell*. 6:1025-35
- T. I. Gerasimova and V. G. Corces** (1996) Boundary and insulator elements in chromosomes. *Curr Opin Genet Dev*. 6:185-92
- P. K. Geyer and I. Clark** (2002) Protecting against promiscuity: the regulatory role of insulators. *Cell Mol Life Sci*. 59:2112-27
- H. Granok, B. A. Leibovitch, C. D. Shaffer and S. C. Elgin** (1995) Chromatin. Ga-ga over GAGA factor. *Curr Biol*. 5:238-41

- A. J. Greenberg and P. Schedl** (2001) GAGA factor isoforms have distinct but overlapping functions in vivo. *Mol Cell Biol.* 21:8565-74
- C. Grimaud, F. Bantignies, M. Pal-Bhadra, P. Ghana, U. Bhadra and G. Cavalli** (2006a) RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell.* 124:957-71
- C. Grimaud, N. Negre and G. Cavalli** (2006b) From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res.* 14:363-75
- T. Grune, J. Brzeski, A. Eberharter, C. R. Clapier, D. F. Corona, P. B. Becker and C. W. Muller** (2003) Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol Cell.* 12:449-60
- M. Grunstein** (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 389:349-52
- N. Gruzdeva, O. Kyrchanova, A. Parshikov, A. Kullyev and P. Georgiev** (2005) The Mcp element from the bithorax complex contains an insulator that is capable of pairwise interactions and can facilitate enhancer-promoter communication. *Mol Cell Biol.* 25:3682-9
- K. Hagstrom, M. Muller and P. Schedl** (1996) Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the Drosophila bithorax complex. *Genes Dev.* 10:3202-15
- K. Hagstrom, M. Muller and P. Schedl** (1997) A Polycomb and GAGA dependent silencer adjoins the Fab-7 boundary in the Drosophila bithorax complex. *Genetics.* 146:1365-80
- M. Han and M. Grunstein** (1988) Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell.* 55:1137-45
- J. Harborth, J. Wang, C. Gueth-Hallonet, K. Weber and M. Osborn** (1999) Self assembly of NuMA: multiarm oligomers as structural units of a nuclear lattice. *Embo J.* 18:1689-700
- C. M. Hart and U. K. Laemmli** (1998) Facilitation of chromatin dynamics by SARs. *Curr Opin Genet Dev.* 8:519-25
- A. H. Hassan, P. Prochasson, K. E. Neely, S. C. Galasinski, M. Chandy, M. J. Carrozza and J. L. Workman** (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell.* 111:369-79
- T. Heinzl, R. M. Lavinsky, T. M. Mullen, M. Soderstrom, C. D. Laherty, J. Torchia, W. M. Yang, G. Brard, S. D. Ngo, J. R. Davie, E. Seto, R. N. Eisenman, D. W. Rose, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld** (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature.* 387:43-8
- M. J. Hendzel, Y. Wei, M. A. Mancini, A. Van Hooser, T. Ranalli, B. R. Brinkley, D. P. Bazett-Jones and C. D. Allis** (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma.* 106:348-60
- Y. Ho, F. Elefant, N. Cooke and S. Liebhaber** (2002) A defined locus control region determinant links chromatin domain acetylation with long-range gene activation. *Mol Cell.* 9:291-302
- I. Hogga and F. Karch** (2002) Transcription through the iab-7 cis-regulatory domain of the bithorax complex interferes with maintenance of Polycomb-mediated silencing. *Development.* 129:4915-22
- I. Hogga, J. Mihaly, S. Barges and F. Karch** (2001) Replacement of Fab-7 by the gypsy or scs insulator disrupts long-distance regulatory interactions in the Abd-B gene of the bithorax complex. *Mol Cell.* 8:1145-51

- G. P. Holmquist and T. Ashley** (2006) Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Res.* 114:96-125
- B. Horard, C. Tatout, S. Poux and V. Pirrotta** (2000) Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol Cell Biol.* 20:3187-97
- D. H. Huang and Y. L. Chang** (2004) Isolation and characterization of CHRASCH, a polycomb-containing silencing complex. *Methods Enzymol.* 377:267-82
- T. Jenuwein and C. D. Allis** (2001) Translating the histone code. *Science.* 293:1074-80
- T. G. Kahn, Y. B. Schwartz, G. I. Dellino and V. Pirrotta** (2006) Polycomb complexes and the propagation of the methylation mark at the *Drosophila* *ubx* gene. *J Biol Chem.* 281:29064-75
- F. Karch, W. Bender and B. Weiffenbach** (1990) *abdA* expression in *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 4:1573-87
- F. Karch, M. Galloni, L. Sipos, J. Gausz, H. Gyurkovics and P. Schedl** (1994) *Mcp* and *Fab-7*: molecular analysis of putative boundaries of cis-regulatory domains in the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 22:3138-46
- F. Karch, B. Weiffenbach, M. Peifer, W. Bender, I. Duncan, S. Celniker, M. Crosby and E. B. Lewis** (1985) The abdominal region of the bithorax complex. *Cell.* 43:81-96
- S. R. Kassabov, N. M. Henry, M. Zofall, T. Tsukiyama and B. Bartholomew** (2002) High-resolution mapping of changes in histone-DNA contacts of nucleosomes remodeled by ISW2. *Mol Cell Biol.* 22:7524-34
- S. R. Kassabov, B. Zhang, J. Persinger and B. Bartholomew** (2003) SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome. *Mol Cell.* 11:391-403
- J. A. Kassis** (2002) Pairing-sensitive silencing, polycomb group response elements, and transposon homing in *Drosophila*. *Adv Genet.* 46:421-38
- T. C. Kaufman, R. Lewis and B. Wakimoto** (1980) Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: the homeotic gene complex in polytene interval 84A-B. *Genetics.* 94:115-133
- T. C. Kaufman, M. A. Seeger and G. Olsen** (1990) Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet.* 27:309-62
- H. H. Kavi, H. R. Fernandez, W. Xie and J. A. Birchler** (2005) RNA silencing in *Drosophila*. *FEBS Lett.* 579:5940-9
- J. Kehle, D. Beuchle, S. Treuheit, B. Christen, J. A. Kennison, M. Bienz and J. Muller** (1998) dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science.* 282:1897-900
- C. S. Ketel, E. F. Andersen, M. L. Vargas, J. Suh, S. Strome and J. A. Simon** (2005) Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes. *Mol Cell Biol.* 25:6857-68
- T. Klymenko and J. Muller** (2004) The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins. *EMBO Rep.* 5:373-7
- T. Klymenko, B. Papp, W. Fischle, T. Kocher, M. Schelder, C. Fritsch, B. Wild, M. Wilm and J. Muller** (2006) A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev.* 20:1110-22
- R. D. Kornberg and Y. Lorch** (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell.* 98:285-94
- A. Kosoy, S. Pagans, M. L. Espinas, F. Azorin and J. Bernues** (2002) GAGA factor down-regulates its own promoter. *J Biol Chem.* 277:42280-8

- J. E. Krebs and M. Dunaway** (1998) The scs and scs' insulator elements impart a cis requirement on enhancer-promoter interactions. *Mol Cell*. 1:301-8
- E. J. Kuhn and P. K. Geyer** (2003) Genomic insulators: connecting properties to mechanism. *Curr Opin Cell Biol*. 15:259-65
- P. S. Kunwar, M. Starz-Gaiano, R. J. Bainton, U. Heberlein and R. Lehmann** (2003) Tre1, a G protein-coupled receptor directs transepithelial migration of Drosophila germ cells. *PLoS Biol*. 1:E80
- A. Kuzmichev, K. Nishioka, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. Reinberg** (2002) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev*. 16:2893-905
- U. K. Laemmli** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5
- U. K. Laemmli, E. Kas, L. Poljak and Y. Adachi** (1992) Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr Opin Genet Dev*. 2:275-85
- P. A. Lawrence and G. Struhl** (1996) Morphogens, compartments, and pattern: lessons from drosophila? *Cell*. 85:951-61
- M. Lehmann** (2004) Anything else but GAGA: a nonhistone protein complex reshapes chromatin structure. *Trends Genet*. 20:15-22
- M. Lehmann, T. Siegmund, K. G. Lintermann and G. Korge** (1998) The pipsqueak protein of Drosophila melanogaster binds to GAGA sequences through a novel DNA-binding domain. *J Biol Chem*. 273:28504-9
- E. B. Lewis** (1978) A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature*. 276:565-70
- Q. Li, G. Barkess and H. Qian** (2006) Chromatin looping and the probability of transcription. *Trends Genet*. 22:197-202
- Q. Li, K. R. Peterson, X. Fang and G. Stamatoyannopoulos** (2002) Locus control regions. *Blood*. 100:3077-86
- Q. Lin, Q. Chen, L. Lin and J. Zhou** (2004) The Promoter Targeting Sequence mediates epigenetically heritable transcription memory. *Genes Dev*. 18:2639-51
- Q. Lin, D. Wu and J. Zhou** (2003) The promoter targeting sequence facilitates and restricts a distant enhancer to a single promoter in the Drosophila embryo. *Development*. 130:519-26
- K. G. Lintermann, G. E. Roth, K. King-Jones, G. Korge and M. Lehmann** (1998) Comparison of the GAGA factor genes of Drosophila melanogaster and Drosophila virilis reveals high conservation of GAGA factor structure beyond the BTB/POZ and DNA-binding domains. *Dev Genes Evol*. 208:447-56
- Y. Lorch, M. Zhang and R. D. Kornberg** (1999) Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell*. 96:389-92
- A. Loyola, G. LeRoy, Y. H. Wang and D. Reinberg** (2001) Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev*. 15:2837-51
- M. E. Luderus, A. de Graaf, E. Mattia, J. L. den Blaauwen, M. A. Grande, L. de Jong and R. van Driel** (1992) Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell*. 70:949-59
- K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond** (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 389:251-60
- A. H. Lund and M. van Lohuizen** (2004) Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 16:239-46

- A. Lusser and J. T. Kadonaga** (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays*. 25:1192-200
- A. Macias, J. Casanova and G. Morata** (1990) Expression and regulation of the abd-A gene of Drosophila. *Development*. 110:1197-207
- R. K. Maeda and F. Karch** (2006) The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development*. 133:1413-22
- T. Mahmoudi, K. R. Katsani and C. P. Verrijzer** (2002) GAGA can mediate enhancer function in trans by linking two separate DNA molecules. *Embo J*. 21:1775-81
- T. Mahmoudi, L. M. Zuijderduijn, A. Mohd-Sarip and C. P. Verrijzer** (2003) GAGA facilitates binding of Pleiohomeotic to a chromatinized Polycomb response element. *Nucleic Acids Res*. 31:4147-56
- N. L. Mahy, P. E. Perry and W. A. Bickmore** (2002) Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *J Cell Biol*. 159:753-63
- C. H. Martin, C. A. Mayeda, C. A. Davis, C. L. Ericsson, J. D. Knafels, D. R. Mathog, S. E. Celniker, E. B. Lewis and M. J. Palazzolo** (1995) Complete sequence of the bithorax complex of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:8398-402
- M. A. Martinez-Balbas, T. Tsukiyama, D. Gdula and C. Wu** (1998) Drosophila NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:132-7
- J. Marx** (2005) Developmental biology. Combing over the Polycomb group proteins. *Science*. 308:624-6
- W. McGinnis and R. Krumlauf** (1992) Homeobox genes and axial patterning. *Cell*. 68:283-302
- W. McGinnis, M. S. Levine, E. Hafen, A. Kuroiwa and W. J. Gehring** (1984) A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the Drosophila Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*. 308:428-33
- S. E. McGuire, Z. Mao and R. L. Davis** (2004) Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in Drosophila. *Sci STKE*. 2004:pl6
- P. C. Megee, B. A. Morgan, B. A. Mittman and M. M. Smith** (1990) Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation. *Science*. 247:841-5
- J. Mellor** (2006a) Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet*. 22:320-9
- J. Mellor** (2006b) It takes a PHD to read the histone code. *Cell*. 126:22-4
- L. Melnikova, F. Juge, N. Gruzdeva, A. Mazur, G. Cavalli and P. Georgiev** (2004) Interaction between the GAGA factor and Mod(mdg4) proteins promotes insulator bypass in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:14806-11
- J. Mihaly, S. Barges, L. Sipos, R. Maeda, F. Cleard, I. Hogga, W. Bender, H. Gyurkovics and F. Karch** (2006) Dissecting the regulatory landscape of the Abd-B gene of the bithorax complex. *Development*. 133:2983-93
- J. Mihaly, I. Hogga, S. Barges, M. Galloni, R. K. Mishra, K. Hagstrom, M. Muller, P. Schedl, L. Sipos, J. Gausz, H. Gyurkovics and F. Karch** (1998) Chromatin domain boundaries in the Bithorax complex. *Cell Mol Life Sci*. 54:60-70
- J. Mihaly, I. Hogga, J. Gausz, H. Gyurkovics and F. Karch** (1997) In situ dissection of the Fab-7 region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb-response element. *Development*. 124:1809-20
- R. K. Mishra, J. Mihaly, S. Barges, A. Spierer, F. Karch, K. Hagstrom, S. E. Schweinsberg and P. Schedl** (2001) The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol Cell Biol*. 21:1311-8

- A. Mohd-Sarip, F. Venturini, G. E. Chalkley and C. P. Verrijzer** (2002) Pleiohomeotic can link polycomb to DNA and mediate transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* 22:7473-83
- L. Mohrmann, K. Langenberg, J. Krijgsveld, A. J. Kal, A. J. Heck and C. P. Verrijzer** (2004) Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related Drosophila chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol.* 24:3077-88
- H. Moon, G. Filippova, D. Loukinov, E. Pugacheva, Q. Chen, S. T. Smith, A. Munhall, B. Grewe, M. Bartkuhn, R. Arnold, L. J. Burke, R. Renkawitz-Pohl, R. Ohlsson, J. Zhou, R. Renkawitz and V. Lobanenko** (2005) CTCF is conserved from Drosophila to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *EMBO Rep.* 6:165-70
- J. R. Morris, J. L. Chen, P. K. Geyer and C. T. Wu** (1998) Two modes of transvection: enhancer action in trans and bypass of a chromatin insulator in cis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10740-5
- J. Muller, C. M. Hart, N. J. Francis, M. L. Vargas, A. Sengupta, B. Wild, E. L. Miller, M. B. O'Connor, R. E. Kingston and J. A. Simon** (2002) Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell.* 111:197-208
- G. J. Narlikar, H. Y. Fan and R. E. Kingston** (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell.* 108:475-87
- N. Negre, J. Hennetin, L. V. Sun, S. Lavrov, M. Bellis, K. P. White and G. Cavalli** (2006) Chromosomal distribution of PcG proteins during Drosophila development. *PLoS Biol.* 4:e170
- Memorial University of Newfoundland Department of Biology.**
- J. Ng, C. M. Hart, K. Morgan and J. A. Simon** (2000) A Drosophila ESC-E(Z) protein complex is distinct from other polycomb group complexes and contains covalently modified ESC. *Mol Cell Biol.* 20:3069-78
- S. J. Nowak and V. G. Corces** (2000) Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes Dev.* 14:3003-13
- L. P. O'Neill and B. M. Turner** (1995) Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner. *Embo J.* 14:3946-57
- S. Ohtsuki and M. Levine** (1998) GAGA mediates the enhancer blocking activity of the eve promoter in the Drosophila embryo. *Genes Dev.* 12:3325-30
- B. Oliver, M. Parisi and D. Clark** (2002) Gene expression neighborhoods. *J Biol.* 1:4
- V. Orlando, E. P. Jane, V. Chinwalla, P. J. Harte and R. Paro** (1998) Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early Drosophila embryogenesis. *Embo J.* 17:5141-50
- V. Orlando and R. Paro** (1995) Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. *Curr Opin Genet Dev.* 5:174-9
- G. Orphanides, G. LeRoy, C. H. Chang, D. S. Luse and D. Reinberg** (1998) FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell.* 92:105-16
- C. Y. Pai, E. P. Lei, D. Ghosh and V. G. Corces** (2004) The centrosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator. *Mol Cell.* 16:737-48
- O. Papoulas, S. J. Beek, S. L. Moseley, C. M. McCallum, M. Sarte, A. Shearn and J. W. Tamkun** (1998) The Drosophila trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development.* 125:3955-66
- B. Papp and J. Muller** (2006) Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxB and PcG proteins. *Genes Dev.* 20:2041-54
- A. Peel** (2004) The evolution of arthropod segmentation mechanisms. *Bioessays.* 26:1108-16
- A. H. Peters, S. Kubicek, K. Mechtler, R. J. O'Sullivan, A. A. Derijck, L. Perez-Burgos, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai, J. H. Martens and T. Jenuwein**

- (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell*. 12:1577-89
- S. Petruk, Y. Sedkov, K. M. Riley, J. Hodgson, F. Schweisguth, S. Hirose, J. B. Jaynes, H. W. Brock and A. Mazo** (2006) Transcription of bxd noncoding RNAs promoted by trithorax represses Ubx in cis by transcriptional interference. *Cell*. 127:1209-21
- S. Petruk, Y. Sedkov, S. Smith, S. Tillib, V. Kraevski, T. Nakamura, E. Canaani, C. M. Croce and A. Mazo** (2001) Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science*. 294:1331-4
- V. Pirrotta, C. S. Chan, D. McCabe and S. Qian** (1995) Distinct parasegmental and imaginal enhancers and the establishment of the expression pattern of the Ubx gene. *Genetics*. 141:1439-50
- V. Pirrotta, H. Steller and M. P. Bozzetti** (1985) Multiple upstream regulatory elements control the expression of the Drosophila white gene. *Embo J*. 4:3501-8
- J. C. Politz, R. A. Tuft, T. Pederson and R. H. Singer** (1999) Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr Biol*. 9:285-91
- V. Ramakrishnan** (1997) Histone H1 and chromatin higher-order structure. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 7:215-30
- G. Rank, M. Prestel and R. Paro** (2002) Transcription through intergenic chromosomal memory elements of the Drosophila bithorax complex correlates with an epigenetic switch. *Mol Cell Biol*. 22:8026-34
- J. Salvaing, A. Lopez, A. Boivin, J. S. Deutsch and F. Peronnet** (2003) The Drosophila Corto protein interacts with Polycomb-group proteins and the GAGA factor. *Nucleic Acids Res*. 31:2873-82
- J. Sambrook and D. Russell** (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- T. Sanchez-Elsner, D. Gou, E. Kremmer and F. Sauer** (2006) Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit Drosophila Ash1 to Ultrabithorax. *Science*. 311:1118-23
- E. Sanchez-Herrero** (1991) Control of the expression of the bithorax complex genes abdominal-A and abdominal-B by cis-regulatory regions in Drosophila embryos. *Development*. 111:437-49
- E. Sanchez-Herrero, I. Vernos, R. Marco and G. Morata** (1985) Genetic organization of Drosophila bithorax complex. *Nature*. 313:108-13
- B. Sanson** (2001) Generating patterns from fields of cells. Examples from Drosophila segmentation. *EMBO Rep*. 2:1083-8
- A. J. Saurin, Z. Shao, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and R. E. Kingston** (2001) A Drosophila Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature*. 412:655-60
- A. J. Saurin, C. Shiels, J. Williamson, D. P. Satijn, A. P. Otte, D. Sheer and P. S. Freemont** (1998) The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J Cell Biol*. 142:887-98
- S. Schmitt, M. Prestel and R. Paro** (2005) Intergenic transcription through a polycomb group response element counteracts silencing. *Genes Dev*. 19:697-708
- Y. B. Schwartz, T. G. Kahn, D. A. Nix, X. Y. Li, R. Bourgon, M. Biggin and V. Pirrotta** (2006) Genome-wide analysis of Polycomb targets in Drosophila melanogaster. *Nat Genet*. 38:700-5
- Y. B. Schwartz and V. Pirrotta** (2007) Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet*. 8:9-22
- S. E. Schweinsberg and P. Schedl** (2004) Developmental modulation of Fab-7 boundary function. *Development*. 131:4743-9

- S. Schweinsberg, K. Hagstrom, D. Gohl, P. Schedl, R. P. Kumar, R. Mishra and F. Karch** (2004) The enhancer-blocking activity of the Fab-7 boundary from the *Drosophila* bithorax complex requires GAGA-factor-binding sites. *Genetics*. 168:1371-84
- A. Schwendemann and M. Lehmann** (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
- C. Schwerk, J. Prasad, K. Degenhardt, H. Erdjument-Bromage, E. White, P. Tempst, V. J. Kidd, J. L. Manley, J. M. Lahti and D. Reinberg** (2003) ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis. *Mol Cell Biol*. 23:2981-90
- A. K. Sengupta, A. Kuhrs and J. Muller** (2004) General transcriptional silencing by a Polycomb response element in *Drosophila*. *Development*. 131:1959-65
- G. A. Shanower, M. Muller, J. L. Blanton, V. Honti, H. Gyurkovics and P. Schedl** (2005) Characterization of the grappa gene, the *Drosophila* histone H3 lysine 79 methyltransferase. *Genetics*. 169:173-84
- Z. Shao, F. Raible, R. Mollaaghababa, J. R. Guyon, C. T. Wu, W. Bender and R. E. Kingston** (1999) Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell*. 98:37-46
- X. Shen, G. Mizuguchi, A. Hamiche and C. Wu** (2000) A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*. 406:541-4
- Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstone, P. A. Cole, R. A. Casero and Y. Shi** (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 119:941-53
- M. J. Shimell, A. J. Peterson, J. Burr, J. A. Simon and M. B. O'Connor** (2000) Functional analysis of repressor binding sites in the *iab-2* regulatory region of the abdominal-A homeotic gene. *Dev Biol*. 218:38-52
- T. Shimojima, M. Okada, T. Nakayama, H. Ueda, K. Okawa, A. Iwamatsu, H. Handa and S. Hirose** (2003) *Drosophila* FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor. *Genes Dev*. 17:1605-16
- M. Shogren-Knaak, H. Ishii, J. M. Sun, M. J. Pazin, J. R. Davie and C. L. Peterson** (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*. 311:844-7
- J. Simon, A. Chiang, W. Bender, M. J. Shimell and M. O'Connor** (1993) Elements of the *Drosophila* bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products. *Dev Biol*. 158:131-44
- N. Singh, W. Zhu and S. D. Hanes** (2005) Sap18 is required for the maternal gene bicoid to direct anterior patterning in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 278:242-54
- L. Sipos, J. Mihaly, F. Karch, P. Schedl, J. Gausz and H. Gyurkovics** (1998) Transvection in the *Drosophila* Abd-B domain: extensive upstream sequences are involved in anchoring distant cis-regulatory regions to the promoter. *Genetics*. 149:1031-50
- S. T. Smith, S. Petruk, Y. Sedkov, E. Cho, S. Tillib, E. Canaani and A. Mazo** (2004) Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. *Nat Cell Biol*. 6:162-7
- W. C. Soeller, C. E. Oh and T. B. Kornberg** (1993) Isolation of cDNAs encoding the *Drosophila* GAGA transcription factor. *Mol Cell Biol*. 13:7961-70
- D. L. Spector** (2001) Nuclear domains. *J Cell Sci*. 114:2891-3
- P. T. Spellman and G. M. Rubin** (2002) Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome. *J Biol*. 1:5
- B. D. Strahl and C. D. Allis** (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-5

- H. Strutt, G. Cavalli and R. Paro** (1997) Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. *Embo J.* 16:3621-32
- W. Sullivan, M Ashburner and R. S. Hawley** (2000) *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- F. Tie, T. Furuyama, J. Prasad-Sinha, E. Jane and P. J. Harte** (2001) The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. *Development.* 128:275-86
- S. Tillib, S. Petruk, Y. Sedkov, A. Kuzin, M. Fujioka, T. Goto and A. Mazo** (1999) Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol Cell Biol.* 19:5189-202
- B. Tolhuis, R. J. Palstra, E. Splinter, F. Grosveld and W. de Laat** (2002) Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell.* 10:1453-65
- T. Tsukiyama, C. Daniel, J. Tamkun and C. Wu** (1995a) ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell.* 83:1021-6
- T. Tsukiyama and C. Wu** (1995b) Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell.* 83:1011-20
- B. M. Turner, A. J. Birley and J. Lavender** (1992) Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell.* 69:375-84
- J. van der Vlag and A. P. Otte** (1999) Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet.* 23:474-8
- R. van Driel, P. F. Fransz and P. J. Verschure** (2003) The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci.* 116:4067-75
- A. Vaquero, M. L. Espinas, F. Azorin and J. Bernues** (2000) Functional mapping of the GAGA factor assigns its transcriptional activity to the C-terminal glutamine-rich domain. *J Biol Chem.* 275:19461-8
- J. Vazquez, M. Muller, V. Pirrotta and J. W. Sedat** (2006) The Mcp element mediates stable long-range chromosome-chromosome interactions in *Drosophila*. *Mol Biol Cell.* 17:2158-65
- A. Verreault, P. D. Kaufman, R. Kobayashi and B. Stillman** (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell.* 87:95-104
- A. E. Visser, F. Jaunin, S. Fakan and J. A. Aten** (2000) High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J Cell Sci.* 113 (Pt 14):2585-93
- L. L. Wallrath and S. C. Elgin** (1995) Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev.* 9:1263-77
- K. M. Wan, J. A. Nickerson, G. Krockmalnic and S. Penman** (1999) The nuclear matrix prepared by amine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:933-8
- L. Wang, J. L. Brown, R. Cao, Y. Zhang, J. A. Kassis and R. S. Jones** (2004) Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell.* 14:637-46
- L. Wang, L. Ding, C. A. Jones and R. S. Jones** (2002) *Drosophila* Enhancer of zeste protein interacts with dSAP18. *Gene.* 285:119-25
- Y. Wang, W. Zhang, Y. Jin, J. Johansen and K. M. Johansen** (2001) The JIL-1 tandem kinase mediates histone H3 phosphorylation and is required for maintenance of chromatin structure in *Drosophila*. *Cell.* 105:433-43

-
- Y. Wei, L. Yu, J. Bowen, M. A. Gorovsky and C. D. Allis** (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*. 97:99-109
- R. A. White and M. Wilcox** (1985) Distribution of Ultrabithorax proteins in *Drosophila*. *Embo J.* 4:2035-2043
- R. C. Wilkins and J. T. Lis** (1997) Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock gene regulation. *Nucleic Acids Res.* 25:3963-8
- H. Xiao, R. Sandaltzopoulos, H. M. Wang, A. Hamiche, R. Ranallo, K. M. Lee, D. Fu and C. Wu** (2001) Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions. *Mol Cell.* 8:531-43
- Y. Zhang, R. Iratni, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. Reinberg** (1997) Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell.* 89:357-64
- I. F. Zhimulev, E. S. Belyaeva, V. F. Semeshin, D. E. Koryakov, S. A. Demakov, O. V. Demakova, G. V. Pokholkova and E. N. Andreyeva** (2004) Polytene chromosomes: 70 years of genetic research. *Int Rev Cytol.* 241:203-75
- J. Zhou, H. Ashe, C. Burks and M. Levine** (1999a) Characterization of the transvection mediating region of the abdominal-B locus in *Drosophila*. *Development.* 126:3057-65
- J. Zhou, S. Barolo, P. Szymanski and M. Levine** (1996) The Fab-7 element of the bithorax complex attenuates enhancer-promoter interactions in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 10:3195-201
- J. Zhou and M. Levine** (1999b) A novel cis-regulatory element, the PTS, mediates an anti-insulator activity in the *Drosophila* embryo. *Cell.* 99:567-75
- D. Zink and R. Paro** (1995) *Drosophila* Polycomb-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a trans-activator to its target DNA. *Embo J.* 14:5660-71

8. ANNEX

En aquest annex s'indica la seqüència del segment iab-6 amplificada amb els primers iab6CU i iab6CL i clonada al pTOPO-TA. En vermell s'indiquen les seqüències d'unió per a la proteïna GAGA, en blau els llocs de Zeste, en verd els llocs de DSP1 i en negre els llocs de Pleihometric.

```

94321 tttagtagta ttaataccta tttagttgat ctacaacttc ttcactgtg ccactgcctt
94381 gcaaaattcg ggaagccag ctaaagtcag tcacgatttc gaactaatga ggaatacacg
94441 taattacatg cggttacgca atataagtaa tttggcttga ggtcagctc agctcatggg
94501 attgtggagc tgccattcaa ggaatcaatg ccctgagaca aaccagaaa tttataaac
94561 acgcaagtgc acggaagtaa attatcccgt cagtcaatta tgtatgttag ttcgccagg
94621 aaggaacccc tccctttttg ccccacactc gcattctcac ttaagaccg acctggactt
94681 ggtctggttg ttgggatcgg ggattggggc ggatgtcttg agacgccaca taaatacctc
94741 gtttattctg cccacttttc gtctgtgtgc gaagtctcgg ttctgtcttc attaaacgcc
94801 tgccacactc gcttcaattg gttgctttat ttgtggctgc aatttgccag cctttttgtc
94861 tttttaatta aatgttttcc tcttcatttt ggtcctacct gcacagtcat cgatgccatt
94921 gccaaaccta attaaacggt cccagatcgc tttcgaagga gtgaacttag ccggcatatt
94981 gtttactttg gcgaaaatga aaataataaa acttttagttg gaacaggtgg aaatagataa
95041 ggcagcaata agacttcaaa agttatagca gaaataaaac ttaacttacg gagaagatgg
95101 tgaaagttct attgaaacca gagaaaattg tgtgttattt ggcgaaacag ttttagtcta
95161 atagtttttt acactccat ttaagtgaaa tgaactaatg cctggaatta aattgtacat
95221 gtattgtatt taaaatata tattatattt tagcagctgc acatatgtag cttaaacgta
95281 atcgaacact aacttttagc acatttttga gaggagggtt ggcaaacag caatttggct
95341 agccatgtct gaaaggctct aaataataaa tgaaattacg tctgcaccag gcaattcat
95401 gtaagtgcc ctgcttcttc agagtagcgg aatatgtata gatagataga tgttcatttg
95461 aaattttaat cagcgttccg tgctgcaagc tccaattgcg cgggcaaat gaattaattt
95521 gactaatttc tcagatacat ttgcatggaa caagcttctc cacggtcttt tggctctccg
95581 gaccgccttg attacattaa agatgcgcaa ttgaaaagc cactgagtt tgcaaaagca
95641 gtcctgctgt gaaatggtaa gggttgcca atgaatgcc acttggcgta agggttcggc
95701 actggcttca ttaagtgcc gaaggtgctg ccaatttggga actgccaaac aaccttgggg
95761 tctttcttca cctgttttgg tgctttccgg atgggggatt agataaagag tttcgccca
95821 agtgaaatat ttataatttg ggagcagaga atgaaatga aattttctat ccgccactga
95881 aacattaaac atttctgttg aaatatcata aaaattgttg aatataattt tacttaaacg
95941 ggccagcgtt attacgttgt cagtgttcaa acacacttag aaatttctaa gtcttactct
96001 tagaaaacat tttttttcga gtgcatttg tttccctgtt ttctcttttc gctatttoga
96061 aatttttgag ggaatttctt ttctgtcttc gcctttgatt tatttgcctc agaattcga
96121 aggcgcggcg taattaaaca accaaagccc agcagcatct acatctacag gggatcagca
96181 tcaacaaaag tcgaatcagc tacgaaccgt aaacaaactt ttgccggctc gcccgctgga
96241 agtggcgctg ggggtgggtga gggcagccat aaacagctgc acaccgaacg ggttcaagt
96301 gaatgaagaa gctatttctga catatgcaca gggagaaatc gatttcaact tacttatgtt
96361 taatatttta aatgttttcc caatgatgat taaaaaagta gtacttghta gaatcctact
96421 taatcaccta actttgtatt gttattatgt ctcacaaaaca atatatctta tगतattatg
96481 tttagacaac catacttagc attgaggtat taaaatcttt caaaaatatt tatatatatt
96541 ttatttttgag aaataataat aattatttga caaattttac tgtttttcca agtggattca
96601 aattccgtta ggtgccaaaga tagcccttcc gaaatcgaat cgaaaactca cgtagcagcc
96661 acagtggcgg caagtaaagt agcaaccact atggcagctc ggctctgtct cccttctctc
96721 gaccctgtg cgcagtctgc atccccgtcg cactcatgct tacacacgca cacacaggta
96781 gggcgactcc tgatgcggcg gccatgaaa gtggcggcca ttccccctcc ctccctctcc
96841 cacagaaaaca atccaatcga gaactgaact gcgcacagca gaagaaaaaa aaagaacaaa
96901 acgaatatcc cgctcactca cgtaacctaa aattgagttg agcctgaatc gaggcaaaaa
96961 tctgttcttg tcggaattaa atttatatgc taggctggga cacatggaac cagcaccctc
97021 cccctcttt ttgtgacct cgcacaccga gtagataaat gtgtaaaaaa ctgaaatttg
97081 tttgggtctc aactgcatac aattgtgttt gtttgtgact caccatagag caccacattg
97141 ggtctattat ttttgtacga ctatatcgt gctggggcac atttatttac atttttaat
97201 gcaccaata agaaaacaa agcgcacaaa agttttcttc tcatttttat tttgagcgc
97261 tggtttattt gtttttaagt gggcacaact ttgccaccag atatttatca aaaggaactt
97321 gtgtttgtct agattttatg gacctaatat tttaaagatt aatttttatt tatggggcaa
97381 caatatcttg ttcaaaaaat tgcagtagtc ttgtggcata ataatttgcc ttgcaaaaac
97441 tataatttaa tttaactctc atttccattc actgctccca gaatatttgt ggcatttctc
97501 cccacaaaaa accatgaaat atgagtgatg accctcgttg cagggacaat taacttgcgg
97561 tgctgcatcg taatgttcgc caatctgtga gtagggaaga ttcagattag aatgggtgctc

```

```

97621 ataatggggg gggggggggc aggggttcga gcggtgaact cagattacag gactcccca
97681 aacgatatgc tcgcatagaa atggctacat ttcggggcaa tccaagttg tctctggtta
97741 tatggccaga attccgcgca gcccgtaggg agtgcgcaa ctgtttgaaa aattcatatt
97801 atttgtaagt agttgcgggc acaaaactatg aactatgagc caccegggcc acgcectctg
97861 cgtcgcaagt agaaattgtg tggcttagtg cgcacaaaa actttgggga gcaatcgagg
97921 aaccttatca ggcggattta tgccaaatga tggcagattg ccaagctcca gctacaaaac
97981 tgcagggata gatacggatt caaatggcaa cgactgcgaa tgctgggctt ggcaacatgt
98041 tttttagtgt gtctgtctcc ccaattcctt ttcttttattt ttccccattt ttctgttttt
98101 tctcggttgt tttttacaat ttttctgga gtataatggc tagaaaaagt tgtgccatac
98161 ccgtgactct gaaaatgtgg acattggtag tggttagtga tataaatgaa tgaaattgaa
98221 aatgttcaat ggatttctat ttgatttaaa atattattca aaaatatttg ataccaacaa
98281 aattttattg aagtgcctgta atgattgaat gataattcca ttaaagtaca tttattttct

```