

Caracterització funcional del factor GAGA de *Drosophila melanogaster*

Marta Blanch Lozano

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

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

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

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Programa de Doctorat de Biomedicina.
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
Bienni 2003-2005

**Caracterització funcional del factor GAGA
de *Drosophila melanogaster***

Memòria presentada per

Marta Blanch Lozano

Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció del Dr. Jordi Bernués Martínez
a l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC)

El Director

El Tutor

Dr. Jordi Bernués Martínez

Dr. Albert Boronat Margosa

L'autora

Marta Blanch Lozano

Barcelona, Octubre 2010

ÍNDIX GENERAL

A.1 INTRODUCCIÓ	1
A.1. La transcripció	3
A.1.1. Elements del promotor basal (<i>core promoter</i>) dels gens transcrits per l'RNA Polimerasa II	4
A.1.2. El complex de Preiniciació (PIC).....	6
A.1.2.A. L'RNA Polimerasa II	6
A.1.2.B. Els factors generals de transcripció (GTFs).....	8
A.1.2.B.1. TFIIA	8
A.1.2.B.2. TFIIB	9
A.1.2.B.3. TFIIF.....	9
A.1.2.B.4. TFIIE.....	10
A.1.2.B.5. TFIIH	10
A.1.2.B.6. TFIID	11
A.1.2.B.6.1. TBP	11
A.1.2.B.6.2. TAFs.....	12
A.1.2.B.6.3. Variants de TBP i dels TAFs.....	14
A.1.2.B.6.4. Estructura i estabilitat de TFIID	15
A.1.2.B.6.5. Funcions de TFIID.....	16
A.1.2.C. Formació del PIC.....	18
A.1.2.C.1. Model seqüencial de formació del PIC.....	18
A.1.2.C.2. Model d'holoenzim.....	19
A.1.3. Factors activadors, repressors i cofactors.....	23
A.1.3.A. Cofactors de tipus pont	24
A.1.3.B. Cofactors enzimàtics.....	25
A.1.4. Fases del procés de transcripció.....	19
A.2. TAF4/dTAF110	27
A.2.1. Estructura del gen dTAF4	27
A.2.2. Dominis estructurals de dTAF4.....	28
A.2.3. Funcions de TAF4.....	30
A.3. dTAF3/ dTAF_{II}155/ BIP2	32
A.3.1. Estructura gen dTAF3	32
A.3.2. Dominis estructurals de dTAF3	33
A.3.3. Expressió de mRNA i proteïna de TAF3	34
A.3.4. Interaccions de dTAF3	35
A.4. GAGA	36
A.4.1. Expressió de la proteïna GAGA.....	36
A.4.2. Un sol gen, <i>Trithorax-like</i> , i diverses proteïnes GAGA	37
A.4.3. Modificacions posttraduccionals de GAGA	39
A.4.4. Autoregulació del gen <i>Trl</i>	40
A.4.5. GAGA, una proteïna altament conservada	42
A.4.6. Dominis estructurals de GAGA	44
A.4.6.A. Domini POZ/BTB	45

Índex General

A.4.6.B. Domini d'unió a DNA (DBD)	47
A.4.6.C. Regió X.....	49
A.4.6.D. Domini Q	50
A.4.7. Funcions de GAGA.....	51
A.4.7.A. GAGA com a factor activador de la transcripció.....	51
A.4.7.B. GAGA com a remodelador de cromatina	52
A.4.7.C. GAGA com a proteïna dels grups Trithorax i Polycomb.....	53
A.4.7.D. GAGA als <i>insulators</i>	56
B. OBJECTIUS	59
C. MATERIALS I MÈTODES	63
C.1. Materials	65
C.1.1. Soques bacterianes d' <i>Escherichia coli</i>	65
C.1.2. Línies cel·lulars eucariotes.....	65
C.1.3. Plasmidis	65
C.1.3.A. Plasmidis de clonatge	65
C.1.3.B. Plasmidis per a l'expressió de proteïnes a bacteris	66
C.1.3.C. Plasmidis per a l'expressió de proteïnes a cèl·lules eucariotes	67
C.1.3.D. Plasmidis reporter	69
C.1.4. Oligonucleòtids.....	70
C.1.5. Anticossos.....	71
C.1.6. Soques de <i>Drosophila melanogaster</i>	73
C.2. Mètodes	74
C.2.1. Mètodes de manipulació de DNA plasmídic	74
C.2.1.A. Tècniques de DNA recombinant	74
C.2.1.B. Preparació de soques bacterianes competents	74
C.2.1.C. Procés de transformació	75
C.2.1.D. Minipreparació de DNA.....	75
C.2.1.E. Maxipreparació de DNA	76
C.2.1.F. Electroforesi de DNA en gel d'agarosa	76
C.2.2. Mètodes de treball amb cèl·lules en cultiu	77
C.2.2.A. Manteniment de cultius cel·lulars de <i>Drosophila</i>	77
C.2.2.B. Manteniment de la línia cel·lular HeLa	77
C.2.2.C. Congelació de cèl·lules	78
C.2.2.D. Descongelació de cèl·lules	78
C.2.2.E. Comptatge de cèl·lules	78
C.2.2.F. Transfecció pel mètode del fosfat càlcic	79
C.2.2.G. Preparació d'extractes per a assajos d'activitat luciferasa i β -galactosidasa	80
C.2.2.H. Assaig d'activitat luciferasa	80
C.2.2.I. Assaig d'activitat β -galactosidasa	81
C.2.2.J. Anàlisi del cicle cel·lular	81
C.2.2.K. Tractament de cèl·lules en cultiu amb l'inhibidor de proteosoma MG132	82
C.2.3. Tècniques d'anàlisi de DNA	82
C.2.3.A. Reacció en cadena de la Polimerasa (PCR)	82
C.2.3.B. Mutagènesi dirigida.....	83
C.2.4. Tècniques de manipulació i anàlisi d'RNA.....	84
C.2.4.A. Extracció i purificació d'RNA total.....	84
C.2.4.B. Reacció en cadena de la Polimerasa amb transcripció reversa (RT-PCR)	86
C.2.5. Tècniques per a l'estudi de proteïnes	87

C.2.5.A. Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	87
C.2.5.B. Tinció amb blau de Coomassie	88
C.2.5.C. Transferència de proteïnes (<i>Western blot</i>)	89
C.2.5.D. Rentat de membranes de <i>western blot (stripping)</i>	90
C.2.5.E. Tinció amb solució roig de Ponceau	91
C.2.5.F. Expressió de proteïnes fusionades a una cua d'histidines	91
C.2.5.F.1. Proves d'expressió a petita escala	91
C.2.5.F.2. Expressió a gran escala de proteïnes fusionades a una cua d'histidines	92
C.2.5.G. Purificació de proteïnes fusionades a una cua d'histidines a partir de la fracció soluble.....	93
C.2.5.H. Assaig d'interacció proteïna-proteïna in vitro. <i>GST-pulldown</i>	93
C.2.5.H.1. Preparació d'extractes per a la realització de <i>pulldowns</i>	94
C.2.5.H.2. Expressió i purificació de proteïnes fusionades a GST	94
C.2.5.H.3. Unió de proteïnes fusionades a GST a la reïna <i>Glutathione Sepharose 4B</i>	95
C.2.5.H.4. Elució de proteïnes fusionades a GST de la reïna <i>Glutathione Sepharose 4B</i>	95
C.2.5.H.5. Assaig <i>GST-Pulldown</i>	96
C.2.5.I. Assaig d'interacció proteïna-proteïna <i>in vivo</i> , coimmunoprecipitació de proteïnes	97
C.2.5.J. Obtenció d'anticossos	99
C.2.5.K. Purificació d'anticossos per afinitat.....	100
C.2.5.L. Immunolocalització de proteïnes mitjançant immunofluorescència indirecta.....	100
C.2.5.L.1. Immunolocalització a cèl·lules S2.....	100
C.2.5.L.2. Immunolocalització a cèl·lules HeLa	101
C.2.4.L.3. Immunolocalització a cromosomes politènics	102
C.2.4.L.4. Immunolocalitzacions a embrions de <i>Drosophila</i>	103
C.2.4.L.5. Immunolocalitzacions de discos imaginals de larves	105
C.3. Sistema d'expressió ectòpica a <i>Drosophila</i>	105
C.4. Assajos de <i>microarray</i>	106
C.4.1. Condicions experimentals dels diferents assajos de <i>microarray</i>	106
C.4.1.A. Condicions experimentals del <i>microarray</i> de sobreexpressió	106
C.4.1.B. Condicions experimentals del <i>microarray</i> de falta de funció.....	108
C.4.2. Anàlisi estadística dels <i>microarrays</i>	109
C.4.3. Anàlisi dels processos biològics	110
C.4.4. Comparativa dels gens dels <i>microarrays</i> amb els gens positius en ChIP-on-Chip de GAGA.....	111
D. RESULTATS	113
D.1. Relació de GAGA amb la maquinària general de transcripció	115
D.1.1. Distribució de GAGA respecte la maquinària general de transcripció.....	115
D.1.1.A. GAGA col·localitza àmpliament amb l'RNA Polimerasa II	116
D.1.1.B. Elevada col·localització de GAGA amb components de TFIID.....	118
D.1.2. Interaccions de GAGA amb la maquinària basal de transcripció.....	120
D.1.2.A. GAGA interacciona amb TAF3	120
D.1.2.B. La interacció de Ttk69 amb TAF3 suggereix un model per a l'efecte repressor de Ttk69 sobre GAGA	122
D.1.2.C. GAGA interacciona amb TAF4	123
D.1.3. Conseqüències funcionals de la interacció de GAGA amb els TAFs. Assajos transcripcionals a cèl·lules S2	124
D.1.3.A. Assajos transcripcionals de sobreexpressió de GAGA i TAF3 no mostren coactivació	125

Índex General

D.1.3.B. Assajos transcripcionals de sobreexpressió de GAGA i TAF4 no mostren coactivació	127
D.1.3.C. Mutació de possibles seqüències d'interacció de GAGA amb TAF4 indiquen que TAF4 pot ser important per l'activació de GAGA	129
D.1.3.C.1. Mutacions de residus no essencials en el motiu LxxLL no afecten la capacitat activadora de GAGA	130
D.1.3.C.2. Mutacions de residus essencials en el motiu LxxLL afecten la capacitat activadora de GAGA a cèl·lules S2.....	134
D.1.3.C.3. Mutacions de residus essencials en el motiu LxxLL en un sistema heteròleg també afecten la capacitat activadora de GAGA	140
D.2. Revaluació de l'activitat de GAGA sobre gens diana coneguts	143
D.2.1. La sobreexpressió de GAGA no altera el patró d'expressió d' <i>engrailed</i> , <i>even skipped</i> ni <i>Ultrabithorax</i>	143
D.2.2. La depleció de GAGA a discos imaginals no afecta l'expressió de gens diana coneguts	150
D.3. Cerca de nous gens diana per a GAGA. <i>Microarrays</i> de sobreexpressió i de falta de funció.....	153
D.3.1. Experiments preliminars al <i>microarray</i> de sobreexpressió	154
D.3.1.A. Condicions experimentals i controls pel correcte funcionament del <i>microarray</i>	154
D.3.1.B. Efectes fenotípics llarg termini deguts la sobreexpressió de GAGA.....	160
D.3.2. Experiments preliminars al <i>microarray</i> de falta de funció	162
D.3.2.A. Condicions experimentals i controls pel correcte funcionament del <i>microarray</i>	162
D.3.2.B. Efectes fenotípics a llarg termini deguts a reducció de GAGA	165
D.3.3. Resultats dels <i>microarrays</i>	168
D.3.3.A. Resultats del <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉	168
D.3.3.B. Resultats del <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₈₁	174
D.3.3.C. Resultats del <i>microarray</i> de falta de funció	179
D.3.4. Comprovació d'alguns gens dels <i>microarrays</i>	186
E. DISCUSSIÓ	191
E.1. Distribució de GAGA respecte la maquinària general de transcripció	193
E.2. Interaccions de GAGA amb la maquinària general de transcripció	196
E.2.1. Interacció de GAGA amb TAF3 i TAF4 i implicació biològica d'aquestes interaccions	196
E.2.2. Interacció de TAF3 amb GAGA i Ttk69. Una possible explicació del mecanisme de regulació de l'activació d' <i>even skipped stripe 2</i>	204
E.3. Revaluació de l'activitat de GAGA sobre gens diana coneguts.....	206
E.4. Cerca de nous gens diana per a GAGA. <i>Microarrays</i> de sobreexpressió i de falta de funció a disc imaginal d'ala de larves de tercer estadi.....	208
E.4.1. Disseny experimental dels <i>microarrays</i>	209
E.4.2. Observacions generals dels resultats dels <i>microarrays</i>	211
E.4.3. Creuament de dades dels <i>microarrays</i> amb dades de CHIP-on-Chip.....	214
E.4.4. Comparació dels <i>microarrays</i> de sobreexpressió de les dues isoformes de GAGA a disc imaginal d'ala i comparació d'aquests amb el de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ a cèl·lules S2	217
E.4.5. Comparativa del <i>microarray</i> de falta de funció amb els de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ i GAGA ₅₈₁ a disc imaginal d'ala i comparativa entre <i>microarrays</i> de falta de funció a discos i cèl·lules S2	219
E.4.6. Funcions biològiques importants en els gens diferencialment expressats el <i>microarray</i> de falta de funció.....	220
F. BIBLIOGRAFIA	229

F. CONCLUSIONS	223
G. ANNEX.....	243
H.1. Taules de gens activats en l'experiment de <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ a disc imaginal d'ala de larves en tercer estadi	244
H.2. Anàlisi de cicle cel·lular a cèl·lules que sobreexpressen GAGA.....	253

ÍNDIX DE FIGURES

Figura A.1. Model del complex TFIIID.	16
Figura A.2. Model seqüencial de la formació del PIC.	18
Figura A.3. Model holoenzim de la formació del PIC.	19
Figura A.4. Patrons de modificació de les histones associades a la pausa i escapament de la pausa de l'RNA polimerasa II.	21
Figura A.5. Esquema del procés de pausa de la polimerasa PrPP (Promoter-proximal pausing) i escapament cap a una elongació productiva.	23
Figura A.6. Esquema dels cofactors generals.	25
Figura A.7. Representació del gen, els transcrits i les seqüències codificants de dTAF4.	27
Figura A.8. Dominis estructurals de TAF4 a humans i a <i>Drosophila</i> .	28
Figura A.9. Dominis conservats d'ETO i la seva relació amb TAF4.	29
Figura A.10. Estructura del gen <i>dTAF3(bip2)</i> i de la seva proteïna.	33
Figura A.11. Estructura dels transcrits que donen lloc a les dues isoformes GAGA ₅₁₉ i GAGA ₅₈₁ .	38
Figura A.12. Seqüència del promotor de <i>Trl</i> .	41
Figura A.13. Immunolocalitzacions que mostren la repressió de <i>Trl</i> deguda a la sobreexpressió de GAGA <i>in vivo</i> .	42
Figura A.14. Comparació de les seqüències aminoacídiques de les proteïnes GAGA de <i>D. melanogaster</i> i <i>D. virilis</i> .	43
Figura A.15. Dominis estructurals de les proteïnes GAGA ₅₁₉ i GAGA ₅₈₁ .	44
Figura A.16. Esquema del domini d'unió a DNA de GAGA (DBD).	48
Figura A.17. Esquema dels aminoàcids del domini mínim d'unió a DNA.	48
Figura A.18. Regió reguladora del complex <i>Bithorax</i> .	54
Figura A.19. Representació esquemàtica dels dominis reguladors del gen <i>Abd-B</i> .	55
Figura C.1. Esquema de la quadrícula d'una cambra de <i>Neubauer</i> .	79
Figura C.2. Reactius i condicions estàndard d'una reacció de PCR.	83
Figura C.3. Reactius i condicions de PCR per fer mutagènesi dirigida.	84
Figura C.4. Reactius i condicions per una reacció d'RT-PCR.	87

Índex de figures

Figura C.5. Esquema de muntatge dels diferents elements per la transferència de proteïnes.	89
Figura C.6. Esquema de funcionament del sistema d'expressió UAS-GAL4.	107
Figura C.7. Esquema de funcionament del sistema GAL4-GAL80 ^{ts} .	107
Figura C.8. Esquema general de les diferents etapes per obtenir les mostres dels <i>microarrays</i> de sobreexpressió.	108
Figura C.9. Esquema general de les diferents etapes per obtenir les mostres dels <i>microarrays</i> de falta de funció.	109
Figura D.1. Col·localització de GAGA amb l'RNA polimerasa II a cromosomes politènics.	116
Figura D.2. Col·localització de GAGA amb l'RNA polimerasa II en larves que sobreexpressen GAGA sota el control del <i>driver</i> <i>llo</i> -GAL4 a cromosomes politènics.	117
Figura D.3. Col·localització de GAGA amb diferents formes fosforilades de l'RNA polimerasa II a cromosomes politènics.	118
Figura D.4. Col·localització de GAGA amb diferents TAFs a cromosomes politènics.	119
Figura D.5. <i>Western blot</i> de l'assaig de coimmunoprecipitació de TAF3-HA i GAGA.	121
Figura D.6. <i>Western-blot</i> i tinció de Ponceau de l'assaig de pull-down per veure la interacció de GAGA amb TAF3.	122
Figura D.7. <i>Western-blot</i> i tinció de Ponceau de l'assaig de <i>pull-down</i> per veure la interacció de TAF3 amb Ttk69.	123
Figura D.8. <i>Western blot</i> de l'assaig de coimmunoprecipitació de TAF4-HA i GAGA.	124
Figura D.9. Assajos de transfecció transitòria a cèl·lules S2 amb els promotors <i>eve</i> i <i>skl</i> per mirar la possible coactivació de TAF3.	125
Figura D.10. Immunolocalitzacions i <i>western blot</i> per detectar TAF3-HA sobreexpressat.	126
Figura D.11. Assajos de transfecció transitòria a cèl·lules S2 amb els promotors <i>eve</i> i <i>skl</i> per mirar la possible coactivació de TAF4.	127
Figura D.12. Immunolocalitzacions i <i>western blot</i> per detectar TAF4-HA sobreexpressat.	128
Figura D.13. Esquema de les diferents mutacions puntuals realitzades en els dos motius del tipus LxxLL identificats al POZ de GAGA.	129
Figura D.14. Esquema dels diferents residus no essencials mutats a GAGA en les seqüències del tipus LxxLL.	130
Figura D.15. Assajos de transfecció transitòria a cèl·lules S2 amb els promotors <i>eve</i> i <i>hsp70</i> , sobreexpressant GAGA i els mutants L60E, D61N i E84Q, no essencials en el motiu LxxLL.	131

Figura D.16. Assajos de transfecció transitòria a cèl·lules S2 del promotor <i>Trl</i> sobreexpressant GAGA i els mutants L60E, D61N i E84Q, no essencials en el motiu LxxLL.	132
Figura D.17. Immunolocalitzacions i <i>western blot</i> per detectar els nivells de proteïna dels mutants no essencials del motiu LxxLL.	133
Figura D.18. Esquema dels diferents residus essencials mutats a GAGA en les seqüències del tipus LxxLL.	134
Figura D.19. Assajos de transfecció transitòria a cèl·lules S2 amb els promotors <i>eve</i> , <i>hsp70</i> i <i>Trl</i> sobreexpressant GAGA i els mutants GAGAL87E i GAGAL87A.	135
Figura D.20. Assajos de transfecció transitòria a cèl·lules S2 amb els promotors <i>eve</i> , <i>hsp70</i> i <i>Trl</i> , sobreexpressant GAGA i els mutants GAGAL87D i GAGAL87I.	137
Figura D.21. Immunolocalitzacions i <i>western blot</i> per detectar els nivells de proteïna de diferents mutants sobre el residu L87, essencial en del motiu LxxLL.	138
Figura D.22. <i>Western blot</i> d'extractes de cèl·lules S2 transfectades transitòriament amb GAGAwT i GAGAL87A i tractades amb l'inhibidor de proteosoma MG132.	139
Figura D.23. Immunolocalitzacions i <i>western blot</i> per detectar els nivells de proteïna del mutant GAGAL87D a HeLa.	140
Figura D.24. Assaig de transfecció transitòria a cèl·lules HeLa amb el promotor <i>eve</i> , sobreexpressant GAGA i GAGAL87D.	141
Figura D.26. <i>Western blot</i> de l'assaig de coimmunoprecipitació de TAF4-HA amb les construccions GAGA, GAGA- Δ POZ i GAGA- Δ Q a cèl·lules HeLa.	142
Figura D.27. Immunolocalitzacions d'individus control a embrions i discos imaginals per tal de veure els patrons d'expressió salvatges d' <i>en</i> .	144
Figura D.28. Immunolocalitzacions d'embrions i discos imaginals de larves en estadi 3 que sobreexpressen GAGA per veure els efectes de la sobreexpressió de GAGA sobre <i>en</i> .	145
Figura D.29. Immunolocalitzacions d'embrions i discos imaginals d'ala d'individus control per tal de veure els patrons salvatges d' <i>Ubx</i> .	146
Figura D.30. Immunolocalitzacions d'embrions i discos imaginals de larves en tercer estadi que sobreexpressen GAGA per veure els efectes de la sobreexpressió de GAGA sobre <i>Ubx</i> .	147
Figura D.31. Immunolocalitzacions d'embrions i discos imaginals d'ala d'individus control per tal de veure els patrons salvatges d' <i>eve</i> .	148
Figura D.32. Immunolocalitzacions d'embrions i discos imaginals de larves en estadi 3 que sobreexpressen GAGA per veure els efectes de la sobreexpressió de GAGA sobre <i>eve</i> .	149

Índex de figures

Figura D.33. Immunolocalitzacions de discos imaginals de larves en estadi 3 que expressen un <i>hairpin</i> RNAiGAGA, per veure els efectes de la depleció dels nivells de GAGA sobre <i>en</i> .	151
Figura D.34. Immunolocalitzacions de discos imaginals de larves en estadi 3 que expressen un <i>hairpin</i> RNAiGAGA, per veure els efectes de la depleció de GAGA sobre <i>Ubx</i> .	152
Figura D.35. Immunolocalitzacions per posar a punt el sistema de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ amb el sistema GAL4-GAL80 ^{ts} .	156
Figura D.36. Immunolocalitzacions que corroboren el funcionament del sistema GAL4-GAL80 ^{ts} per la sobreexpressió de GAGA ₅₈₁ i GFP.	157
Figura D.37. RT-PCRs d'RNA total extret de disc imaginal d'ala de larva 3 de discos que sobreexpressen GAGA ₅₁₉ i GAGA ₅₈₁ després de 13 hores d'inducció a 29°C.	159
Figura D.38. Estudi de la viabilitat dels creuaments del <i>microarray</i> de sobreexpressió, després de 13 hores d'inducció a 29°C.	161
Figura D.39. <i>Western blot</i> per veure la depleció de GAGA.	163
Figura D.40. RT-PCRs per veure la depleció de GAGA.	164
Figura D.41. Anàlisi de la transformació homeòtica del segment abdominal A6 en A5.	165
Figura D.42. Fenotips associats a la reducció de GAGA en les ales d'individus adults.	167
Figura D.43. Gràfic circular que representa els gens diferencialment expressats en el <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ .	168
Figura D.44. Representació de les agrupacions (clústers) de diferents funcions biològiques dels gens activats en l'experiment de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ .	171
Figura D.45. Gràfic circular que representa els gens diferencialment expressats en el <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₈₁ .	174
Figura D.46. Representació esquemàtica de la proporció de gens activats i reprimits significativament, en el <i>microarray</i> de falta de funció.	179
Figura D.47. Agrupació dels gens activats a l'experiment d'RNAi segons la seva funció biològica.	181
Figura D.48. Immunolocalitzacions per comprovar l'expressió de <i>skl</i> deguda a la sobreexpressió de GAGA.	187
Figura D.49. RT-PCRs per comprovar l'expressió de <i>skl</i> al sobreexpressar GAGA. RT-PCRs d'RNA total extret de 25 discos imaginals d'ala de larva en tercer estadi.	188
Figura D.50. Assaig de transfecció transitòria a cèl·lules S2 per comprovar l'activitat del promotor de <i>skl</i> en resposta a GAGA.	189

Figura E.1. Diagrama de Venn que mostra les relacions entre els gens associats amb NELF, els associats amb GAGA i aquells amb <i>stalled</i> pol II o polimerasa encallada.	194
Figura E.2. Model del dímer format pel POZ de GAGA.	201
Figura E.3. Comparació de la seqüència aminoacídica dels dominis POZ de GAGA, Mod(mdg4) i TTK69.	202
Figura E.4. Residus conservats estructuralment en el domini POZ de diverses proteïnes.	203
Figura E.5. Representació del possible model de repressió de Ttk69 sobre el promotor <i>even skipped</i> stripe 2 activat per GAGA.	205
Figura E.6. Representació esquemàtica de la regió gènica de <i>Trl</i> i dels seus possibles transcrits.	210
Figura E.7. Representació de la situació en el genoma del clúster de la família de gens GstE.	221
Figura H.1. Anàlisi de la distribució del cicle cel·lular de cèl·lules que sobreexpressen GAGA.	253

ÍNDEX DE TAULES

Taula A.1. Resum dels diferents factors generals de transcripció a humans.	8
Taula A.2. Nomenclatura dels TAFs involucrats en la transcripció de l'RNA polimerasa II.	13
Taula C.1. Relació dels oligonucleòtids utilitzats en aquest treball.	70
Taula C.2. Relació dels anticossos primaris utilitzats en aquest treball.	71
Taula C.3. Relació dels anticossos secundaris utilitzats en aquest treball.	72
Taula C.4. Soques de mosques emprades per als creuaments realitzats en aquest treball.	73
Taula C.5. Creuaments utilitzats en els <i>microarrays</i> de sobreexpressió.	107
Taula C.6. Creuaments utilitzats en el <i>microarray</i> de falta de funció.	108
Taula D.1. Resum de resultats de predicció de canvi d'aminoàcids en el residu L87 de GAGA, sobre el model estructural del POZ.	136
Taula D.2. Llistat amb els 25 gens estadísticament més significatius que s'activen en l'experiment de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ respecte el de sobreexpressió de GFP.	170
Taula D.3. Llistat de gens reprimits significativament en l'experiment de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ respecte el de sobreexpressió de GFP.	172
Taula D.4. Informació de la única categoria funcional obtinguda dels gens reprimits en l'experiment de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ utilitzant l'eina <i>Functional annotation chart</i> del programa DAVID.	172
Taula D.5. Informació dels gens reprimits en el <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ que tenen funció coneguda.	173
Taula D.6. Llistat de gens activats significativament en el <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₈₁ respecte el de sobreexpressió de GFP.	175
Taula D.7. Informació dels gens activats en el <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₈₁ que tenen funció coneguda.	176
Taula D.8. Llistat de gens reprimits significativament en el <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₈₁ respecte el de sobreexpressió de GFP.	177
Taula D.9. Informació dels gens reprimits en el <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₈₁ que tenen funció coneguda.	178
Taula D.10. Llistat de gens activats significativament en l'experiment de <i>microarray</i> de falta de funció.	180

Índex de taules

Taula D.11. Informació dels gens activats en el <i>microarray</i> de falta de funció que tenen funció coneguda.	182
Taula D.12. Llistat de gens reprimits significativament en l'experiment de <i>microarray</i> de falta de funció.	184
Taula D.13. Taula del resultat obtingut el programa DAVID amb la funció <i>Functional annotation chart</i> pels gens reprimits en el <i>microarray</i> de falta de funció.	185
Taula D.13. Taula del resultat obtingut el programa DAVID amb la funció <i>Functional annotation chart</i> pels gens reprimits en el <i>microarray</i> de falta de funció.	185
Taula D.14. Informació dels reprimits en el <i>microarray</i> de falta de funció que tenen funció coneguda.	185
Taula E.1. Llistat de gens activats i reprimits en el <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ que són positius en els ChIp-on-Chip de GAGA a S2 i a embrions.	215
Taula E.2. Llistat de gens activats i reprimits en el <i>microarray</i> de sobreexpressió de GAGA ₅₈₁ i en el <i>microarray</i> de falta de funció que són positius en els ChIp-on-Chip de GAGA a S2 i a embrions.	216
Taula E.3. Llistat de gens coincidents entre els <i>microarrays</i> de sobreexpressió de les dues isoformes de GAGA a disc imaginal d'ala i comparació d'aquests amb el de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ a cèl·lules S2.	217
Taula E.4. Llistat de gens coincidents entre els <i>microarrays</i> de falta de funció (RNAi GAGA) i els de sobreexpressió de GAGA ₅₁₉ i GAGA ₅₈₁ , a discos imaginals. Comparació entre els <i>microarrays</i> de falta de funció a disc imaginal i a cèl·lules S2.	220

ABREVIATURES

<i>abd-A / Abd-B</i>	<i>abdominal-A / Abdominal-B</i>
ACF	<i>ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor</i>
<i>Act</i>	<i>Actina</i>
<i>Ant</i>	<i>Antennapedia</i>
ATP	Adenosina trifosfat
BAB	Bric à Brac
Ban	<i>Batman</i>
BIP2	Bric à brac Interacting Protein 2, també coneguda com a dTAF _{II} 155 o dTAF3
BR	<i>Basic Region</i> , regió bàsica
BRE	<i>TFIIB recognition element</i>
BRF	<i>TFIIB related factor</i>
BSA	Albúmina Sèrica Bovina
BTB/POZ	<i>broad complex tramtrack bric-a-brac/poxvirus and Zinc finger</i>
BX-C	<i>Bithorax complex</i>
CDK	<i>Cycline-dependent kinase</i>
cDNA	DNA complementari
CHD	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding</i>
ChIP	<i>Chromatin immunoprecipitation</i>
CHRAC	<i>Chromatin remodeling and assembly complex</i>
CMV	citomegalovirus
CNS o SNC	Sistema nerviós central
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CTD	domini C-terminal de la subunitat major de l'RNA Pol II
CTR	<i>C terminal domain</i> , regió C terminal
Da	Dalton
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DBD	<i>DNA binding domain</i> , domini d'unió a DNA
DCE	<i>Downstream Core Element</i>
dMi-2	<i>antigen recognized by the patient Mitchell autoimmune antibodies 2</i>
DMSO	dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
dNTPs	desoxiribonucleòtids trifosfat
DPE	<i>Downstream Promoter Element</i>
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>
DRE	<i>DNA-replication-related Element</i>
DREF	<i>DRE binding Factor</i>
DSIF	<i>DRB (5,6-dichloro-1-h-D-ribofuranosylbenzimidazole) sensitivity-inducing factor</i>
dsRNA	<i>double strand RNA</i> , RNA de doble cadena
E(var)	<i>Enhancers of variegation</i>
E74	<i>Ecdysone-induced protein 74EF</i>
EMSA	assajos de mobilitat electroforètica

Abreviatures

<i>en</i>	<i>engrailed</i>
ETO	<i>eight twenty-one</i>
<i>eve</i>	<i>even skipped</i>
Fab	<i>Front abdominal</i>
FACT	<i>facilitates chromatin transcription</i>
FBS	sèrum fetal boví
<i>ftz</i>	<i>fushi tarazu</i>
g	força relativa de centrifugació, també RCF
GBP	complex GAGA-Batman-Psq
GEFs	<i>General Elongation Factors</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GST	Glutatió S-Transferasa
GTFs	<i>General Transcription Factors</i> , factors generals de transcripció
h	hores
H4, H3, H2B, H2A	histones
HAT	<i>Histone Acetyltransferase</i>
HDACs	<i>histone deacetylases complexes</i> , complexos desacetilases d'histones
HSE	<i>Heat shock element</i>
HSF	<i>Heat shock factor</i>
<i>hsp</i>	<i>heat shock protein</i>
iab	<i>infraabdominal</i>
Inr	Iniciador
IP	Immunoprecipitació
IPTG	Isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside
ISWI	<i>Imitation switch</i>
KDa	KiloDaltons
Kpb	Kiloparells de bases
<i>Kr</i>	<i>Krüppel</i>
LB	Luria-Bertani
<i>lio</i>	<i>linotte</i>
<i>lolal</i>	<i>lolalike</i>
min	minuts
Mod(mdg4)	<i>Modifier of mdg4</i>
mRNA	RNA missatger
mRNP	Ribonucleoproteïna missatgera
MTE	<i>Motif Ten Element</i>
NAD	Nicotina-adenosina dinucleòtid
NC	<i>Negative cofactor</i> , cofactor negatiu
ncRNAs	RNAs no codificants de proteïnes
NELF	<i>Negative Elongation Factor</i>
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i> , senyal de localització nuclear
NURF	<i>Nucleosome Remodeling Factor</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , pauta oberta de lectura
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida
pb	parells de bases

PC	<i>Polycomb</i>
PC1-PC4	<i>Positive cofactors 1-4, cofactors positius</i>
PCAF	<i>p300/CBP associated factor</i>
PcG	<i>Polycomb group</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction, Reacció en Cadena de la Polimerasa</i>
PEV	<i>Position Effect Variegation</i>
PH	<i>Polyhomeotic</i>
PHD	<i>Plant Homeo Domain-finger</i>
Pho	<i>Pleiomorphic</i>
PIC	<i>Pre-initiation complex, complex de preiniciació</i>
PLB	<i>Protein Loading Buffer</i>
Pol	<i>Polimerasa</i>
PRC	<i>Polycomb repressive complex</i>
<i>prd</i>	<i>paired</i>
PREs	<i>Polycomb Response Elements</i>
PrPP	<i>Promoter-Proximal Pausing</i>
Psq	<i>Pipsqueak</i>
<i>ptc</i>	<i>patched</i>
P-TEFb	<i>Positive Transcription Elongation Factor b</i>
RAP30 i 74	<i>RNA Polymerase II - associated protein 30 i 74</i>
RAR	<i>Retinol acid receptor</i>
RMN o NMR	<i>Ressonància Magnètica Nuclear</i>
RNA	<i>Àcid ribonucleic</i>
RNAi	<i>RNA d'interferència</i>
RPB1-12	<i>RNA Polimerasa B 1-12</i>
rpm	<i>revolucions per minut</i>
rRNA	<i>RNA ribosòmic</i>
RT	<i>retrotranscripció</i>
SAGA	<i>Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa</i>
SAP18	<i>Sin3-associated polypeptide 18KDa</i>
SDS	<i>sodium dodecil sulfat</i>
Ser	<i>Serina</i>
siRNA	<i>RNA d'interferència petit</i>
<i>skl</i>	<i>sickle</i>
SLIK	<i>SAGA-like complex</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA, RNA nuclear petit</i>
SRBs	<i>Supressors of RNA Polymerase B mutations</i>
STAGA	<i>acetilasa Spt3-TAF9-GCN5L</i>
Su(var)	<i>Suppressors of variegation</i>
SWI/SNF	<i>switch mating type/sucrose non-fermenting</i>
TAFH	<i>TAF homology</i>
TAFs	<i>TBP-Associated factors</i>
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TFII	<i>Transcription Factor II, factor de transcripció de l'RNA Pol II</i>
TFTC	<i>TBP-free TAF-containing complex</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>

Abreviatures

Thr	Treonina
TLF	<i>TBP-like factor</i>
TLP	<i>TBP-like protein</i>
TREs	<i>Trithorax Response Elements</i>
TRFs	<i>TBP-related factors</i>
Trl	<i>Trithorax-like</i>
tRNA	RNA de transferència
TRP	<i>TBP-related protein</i>
TrxG	<i>Trithorax group</i>
TSS	<i>Transcription Start Site</i> , lloc d'inici de la transcripció
TTK69	Tramtrack 69
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
Ubx	<i>Ultrabithorax</i>
USA	<i>Upstream Stimulatory Activity</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> , regió no traduïda
vaRNA	RNA associat a virus
XCPE	<i>X core promoter element</i>

A.1 INTRODUCCIÓ

A.1. La transcripció

L'expressió dels gens eucariotes és regulada d'una manera elaborada, ordenada i complexa per assegurar que gens específics s'expressin o deixin d'expressar-se de manera correcta a nivell temporal i espacial segons els requeriments de cicle cel·lular, els factors ambientals i els requeriments de cada teixit.

La transcripció és una de les etapes de l'expressió gènica on la informació continguda en l'àcid desoxiribonucleic, DNA, és copiada a àcid ribonucleic, RNA, mitjançant un enzim amb múltiples subunitats anomenat RNA polimerasa. El procés de transcripció és un procés complex i altament regulat. En organismes simples, tant en procariotes, com en arquea, només hi ha una polimerasa, mentre que en eucariotes s'han identificat quatre RNA polimerases diferents (RNA polimerases I, II, III i IV). L'RNA polimerasa bacteriana i l'RNA polimerasa II dels eucariotes presenten similituds en l'estructura, en les posicions relatives de les subunitats, el plegament de les subunitats i la posició relativa dels determinants funcionals. Aquestes similituds estructurals són paral·leles a les similituds amb els mecanismes que utilitzen per unir-se al DNA. Això indica que les RNA polimerases estan conservades al llarg de l'evolució degut a que realitzen una funció de gran importància (Ebright 2000).

En organismes eucariotes, l'RNA polimerasa I consta de 14 subunitats, es localitza al nuclèol i és l'encarregada de transcriure els RNA ribosòmics (rRNA) 18S i 28S. L'RNA polimerasa II té 12 subunitats, es troba en el nucleoplasma i s'encarrega de sintetitzar els RNA missatgers (mRNA) i alguns RNA nuclears petits (snRNA). L'RNA polimerasa III també es troba al nucleoplasma, té 17 subunitats diferents i sintetitza els RNA ribosòmics 5S (rRNA), els RNA de transferència (tRNA) i molts RNA petits com els RNA d'adenovirus (VA RNAs), U6, etc. La quarta polimerasa eucariòtica, RNA polimerasa IV s'ha identificat només en plantes, on facilita la producció dels RNA d'interferència petits (siRNA).

A.1.1. Elements del promotor basal (*core promoter*) dels gens transcrits per l'RNA Polimerasa II

Centrant-nos en els gens transcrits per l'RNA polimerasa II, cal parlar de les seqüències característiques dels promotors reconegudes per la polimerasa II (pol II). Existeixen diferents elements del promotor que són seqüències de DNA necessàries per la funció del promotor, per un correcte muntatge i una bona orientació del complex de pre-iniciació, també anomenat PIC (*Pre-Initiation Complex*) (veure apartat A.1.2). El promotor basal o *core promoter* és la zona del promotor que conté les seqüències que dirigeixen el reclutament de l'RNA Pol II a l'inici de transcripció. Aquest promotor basal es pot estendre uns 35 pb per sobre i/o per sota de l'inici de transcripció. Els elements del *core* constitueixen llocs de reconeixement per factors involucrats en la formació del PIC. Aquests elements són diversos i es poden presentar en forma de diferents combinacions a l'hora de formar el promotor basal.

Caixa TATA: va ser el primer element de promotor basal identificat en gens eucariotes. És un element ric en A/T situat aproximadament entre -25 i -30 nucleòtids per sobre de l'inici de transcripció (+1), en humans. Existeixen diverses seqüències tipus TATA i la seqüència consens és TATAAA. La seqüència és reconeguda per la proteïna d'unió a la caixa TATA anomenada TBP (*TATA binding protein*). La proteïna TBP en alguns organismes, com a llevat, es pot aïllar sola, mentre que en altres organismes, pot formar part d'un complex multiproteic. A *Drosophila* i humans TBP és una subunitat present en el complex TFIID que nuclea la formació del PIC. A part de TBP, algunes de les proteïnes anomenades TRFs (TBP-related factors) també es poden unir a la caixa TATA (Smale et al. 2003; Juven-Gershon et al. 2008). Inicialment es pensava que la caixa TATA era un element característic i comú a la majoria de promotors RNA polimerasa II però actualment se sap que no és un element tant freqüent com es pensava.

Iniciador (Inr): l'element iniciador de l'anglès *initiator*, Inr, conté una seqüència rica en pirimidines al voltant de l'inici de transcripció. La seva seqüència consens a mamífers és YYANWYY, i a *Drosophila* TCA(G/T)TY on Y és pirimidina, A està situada al +1 de transcripció, N és qualsevol nucleòtid i W és A o T (Smale et al. 2003). L'Inr és capaç de dirigir un acurat inici de transcripció ja sigui sol, acompanyat de la caixa TATA o d'altres elements del promotor *core*. Es pot trobar el cas en que la caixa TATA i l'element Inr estiguin presents en el mateix promotor i aleshores poden actuar de manera sinèrgica. Els components TAF1/TAF2 de TFIID, estan implicats en el reconeixement de la seqüència de l'Inr (Chalkley et al. 1999).

Element distal del promotor (DPE): és l'element situat entre els nucleòtids +28 i +32 per sota de l'inici de transcripció i d'aquí ve el seu nom *downstream promoter element*, DPE. La seva seqüència consens és (A/G)G(A/T)CGTG (R és A o G i W és A o T) i es troba en un elevat nombre de promotors de *Drosophila* sense caixa TATA (Burke et al. 1996; Burke et al. 1997; Kutach et al. 2000). L'element DPE, normalment, funciona juntament amb l'element Inr, i l'espai entre els dos elements és crític per una òptima transcripció (Juven-Gershon et al. 2008). S'ha vist que els components del TFIID, TAF6 i TAF9 de *Drosophila* s'uneixen a aquest element DPE i que el complex dimèric TAF6/TAF9 d'humans té especificitat d'unió per aquest element en assajos de retard (Burke et al. 1997; Shao et al. 2005).

BRE: el seu nom ve de *TFIIB recognition element*, BRE. Existeixen dos elements, **BRE^u** i **BRE^d**, per sobre i per sota de l'inici de transcripció respectivament. Aquests dos elements són reconeguts per TFIIB a través de contactes amb el promotor. **BRE^u** té una seqüència consens (G/C)(G/C)(G/A)CGCC i és capaç de contactar amb TFIIB. Aquesta interacció pot donar-se independentment de la unió de TBP i ajuda a orientar la direccionalitat del PIC (Lagrange et al. 1998). **BRE^d** té una seqüència consens (G/A)T(T/G/A)(T/G)(G/T)(T/G)(T/G) i sembla ser TBP dependent (Deng et al. 2005).

Altres elements: el *Downstream core element* (DCE) té tres subelements discontinus: S_I, S_{II} i S_{III} amb seqüències consens CTTC,CTGT i AGC, respectivament que van del +6 fins al +34, per sota de l'inici de transcripció. Sembla que la presència de DCE i DPE és mútuament exclouent. S'ha vist que el TAF1 de TFIID és capaç d'unir-se al DCE. (Lee et al. 2005).

El *motif ten element*, MTE, es troba situat entre els nucleòtids +18 i +25 per sota de l'inici de transcripció. S'ha identificat a *Drosophila* i la seva seqüència consens és C(G/C)A(A/G)C(G/C)(G/C)AACG(G/C) i normalment funciona junt amb l'element Inr per incrementar la transcripció de l'RNA polimerasa II amb o sense la presència de TATA i/o DPE i de manera Inr-dependent (Lim et al. 2004).

La llista d'elements que s'han descrit fins ara segueix ampliant-se tot i que alguns s'han identificat a promotors vírics i a eucariotes, només s'han trobat en humans, com per exemple els *X core promoter element 1* i *2* (XPE1 i XPE2) (Tokusumi et al. 2007; Juven-Gershon et al. 2008; Anish et al. 2009).

A.1.2. El complex de Preiniciació (PIC)

La iniciació de la transcripció per produir mRNA en eucariotes està altament regulada. Necessita, pas a pas, la formació d'un elaborat complex multiproteic. El PIC està format pels factors generals de la transcripció GTFs (*general transcription factors*), diferents coactivadors i l'RNA polimerasa II.

A.1.2.A. L'RNA Polimerasa II

L' RNA polimerasa II és el complex multiproteic responsable de la transcripció de gens que codifiquen proteïnes i també d'alguns gens que no codifiquen per proteïnes. Les polimerases de llevat i d'humans tenen totes dues 12 subunitats anomenades RPB, que van de la RPB1 fins a RPB12, i presenten elevada conservació de seqüència, arquitectura i funcionalitat entre els diferents organismes (Cramer et al. 2008). De les 12 subunitats, cinc (RPB5, 6, 8, 10 i 12) estan compartides entre les polimerases I II i III, mentre que unes altres 4 subunitats (RPB1,2, 3 i 11) tenen els seus homòlegs de seqüència en Pol I i Pol III. Només les subunitats RPB4, 7, 9 i el domini C-terminal (anomenat CTD, *carboxi terminal domain*) de RPB1, són exclusives de la Polimerasa II.

Un tret essencial dels complexos de la polimerasa II associats a la transcripció i processament de l'mRNA és la presència del CTD a RPB1. El CTD és un domini que conté repeticions en tàndem d'un heptapèptid altament conservat. L'heptapèptid està format per la seqüència Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (YSPTSPS) que en humans es repeteix 52 cops, en *Drosophila* 42 i de 26 a 29 cops en llevats, depenent de les espècies (Thomas et al. 2006).

El CTD pot estar fosforilat i, depenent del seu grau de fosforilació, existeixen dues formes majoritàries de la polimerasa II en humans: pol IIO i IIA (Kershnar et al. 1998). La forma IIA està hipofosforilada i està implicada en l'ensamblatge del PIC i en l'inici de transcripció (Lu et al. 1991; Serizawa et al. 1993; Dahmus 1996). La forma IIO, involucrada en l'elongació i la terminació del transcrit, té una elevada fosforilació del CTD principalment a les serines dels residus 2 i 5 (YSPTSPS) que estan subjectes a un cicle de fosforilació i desfosforilació durant el procés de transcripció. La fosforilació de la serina 5, efectuada per la Cdk7 de TFIIH, es dona majoritàriament a les zones pròximes al promotor i decreix al llarg de l'elongació, mentre que la fosforilació a la serina 2, duta a terme per p-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*), es dona després de la fosforilació de la serina 5, i augmenta al llarg de l'elongació (Cho et al. 2001).

L'activitat de l'RNA pol II està regulada al llarg del cicle cel·lular i els canvis depenen de la fosforilació del CTD. Es poden observar canvis globals en la fosforilació del CTD en resposta a senyals de factors de transcripció, mitògens i agents que danyen el DNA. Aquestes observacions suggereixen que la fosforilació reversible del CTD pot jugar un paper important a l'hora de lligar la regulació del cicle cel·lular amb canvis coordinats en la transcripció (Oelgeschlager 2002).

El CTD també es pot glicosilar a través de la unió covalent d'un monosacàrid, N-acetilglucosamina (GlcNAc) al cantó de la cadena del grup hidroxil de les serines o treonines de l'heptapèptid (Kelly et al. 1993). La glicosilació només es troba a la forma IIA de la polimerasa i sembla ser mútuament excloent amb la fosforilació del CTD (Comer et al. 2001). La fosforilació de les Ser/Thr bloqueja estèricament l'accessibilitat de la kinasa al CTD i això regula l'activitat de la polimerasa durant els primers estadis del procés de transcripció.

La ubiquitinació és la tercera modificació posttraduccional característica de la pol II. La ubiquitinació de la pol II ocorre a nivells baixos sota condicions normals de creixement i es pot detectar ràpidament quan les cèl·lules estan sota condicions d'estrés, especialment, sota els efectes d'agents que danyen el DNA o quan hi ha bloqueig de la maquinària independentment del dany de DNA. Quan la polimerasa II s'ubiquitina, les proteïnes involucrades en la reparació del DNA, NER, *nucleotide excision repair*, són reclutades en els llocs on hi ha el dany per tal de reparar els errors.

A.1.2.B. Els factors generals de transcripció (GTFs)

L'RNA polimerasa II necessita factors addicionals per dur a terme el procés de transcripció i aquests són els anomenats factors generals de transcripció (GTFs). Dins els factors generals de transcripció podem trobar: TFIIA, B, D, E, F i H (veure taula A.1). Aquests factors generals de transcripció (GTF) ajuden la polimerasa en l'inici de transcripció i alguns d'ells en el procés d'elongació de l'RNA. L'RNA polimerasa II junt amb aquests factors formen el que s'anomena maquinària general de transcripció. La taula A.1 resumeix la composició de les diferents subunitats i les funcions dels diferents GTFs. Posteriorment tornarem a parlar dels GTFs en l'apartat A.1.2.C quan parlem de l'ensamblatge del PIC.

Introducció

Factor	Composició proteica	Funció
TFIIA	p35(a), p19(b) i p12(g)	Antirepressor; estabilitzador del complex TBP-TATA; coactivador
TFIIB	p33	Selecció del lloc d'inici; estabilitzador del complex TBP-TATA; reclutador de Pol II/TFIIF
TFIID	TBP i TAFs (TAF1-TAF14)	Factor d'unió al core del promotor Coactivador Proteïna Kinasa Activació-Ubiquitina/activitat conjugadora Acetiltransferasa d'histones
TFIIE	p56(a) i p34(b)	Reclutador de TFIIH Facilitador de la formació d'un inici competent per Pol II Participa amb el procés <i>promoter clearance</i>
TFIIF	RAP30 i RAP74	Uneix Pol III i facilita el reclutament de Pol II al promotor Recluta TFIIE i TFIIH Funciona amb TFIIB i Pol II en la selecció del lloc d'inici Facilita l'escapament de Pol II del promotor per l'elongació Incrementa l'eficiència de l'elongació de Pol II
TFIIH	p89/XPB, p80/XPD, p62, p52, p44, p40/CDK7, p38/CiclinaH, p34, p32/MAT1 i p8/TFB5	Activitat ATPasa per l'inici de transcripció i <i>promoter clearance</i> Activitat helicasa per obrir el promotor Transcripció acoblada a la reparació de nucleòtids Activitat Kinasa per la fosforilació del CTD de Pol II Activitat E3 ubiquitina lligasa
Pol II	RPB1-RPB12	Inici de la transcripció, elongació i terminació Reclutament dels enzims que introdueixen el CAP a l'mRNA Transcripció acoblada al reclutament dels factors d'splicing i processadors de 3' Fosforilació de CTD, glicosilació i ubiquitinació

Taula A.1. Resum dels diferents factors generals de transcripció a humans. A la taula es troben resumides les composicions dels diferents GTFs i les seves funcions (Adaptació de Thomas et al. 2006).

A.1.2.B.1. TFIIA

TFIIA funciona principalment com un antirepressor que contraresta les activitats dels inhibidors presents en fraccions crues, implicant un desplaçament de factors que estan units a DNA de forma específica o inespecífica. TFIIA incrementa l'afinitat de TBP o TFIID pel DNA, potenciant la formació del complex de pre-iniciació (Buratowski et al. 1989; Lee et al. 1992; Imbalzano et al. 1994). Interacciona directament amb TBP per la superfície oposada a TFIIB, i amb la seqüència de DNA immediatament per sobre de la caixa TATA (Geiger et al. 1996; Lagrange et al. 1996).

TFIIA, a més d'antirepressor, pot actuar com a coactivador per estimular la transcripció potenciant la formació del PIC en una etapa posterior a la unió de TFIID al DNA, estimulants les funcions de TFIIE i TFIIF i especialment en absència de TAFs potencia l'activació depenent de TBP (Wu et al. 1998; Wu et al. 1998; Langelier et al. 2001).

A.1.2.B.2. TFIIB

TFIIB està conservat al llarg de varies espècies, presenta conservació aminoacídica i estructural amb el TFIIB dels arqueas i, també, amb el factor accessori BRF (*TFIIB related factor*) de la Pol III (Orphanides et al. 1996).

Un cop TBP o TFIID s'uneixen al promotor en presència o absència de TFIIA, TFIIB és el següent GTF que entra a formar part del PIC. La unió de TFIIB al promotor unit a TBP fa que el complex ternari TBP-TFIIB-DNA sigui molt estable (Orphanides et al. 1996). TFIIB té capacitat d'interacció amb diferents elements de la maquinària basal, té llocs d'interacció per TFIID, RNA Pol II i TFIIF, i té un paper important a l'hora de reclutar pol II/TFIIF al promotor (Ha et al. 1993). Cal també destacar el seu paper d'especificació del lloc d'inici de transcripció (TSS, *transcriptional start site*) (Pinto et al. 1992; Orphanides et al. 1996; Fairley et al. 2002). TFIIB és capaç d'interaccionar amb molts factors activadors transcripcionals que podrien modular la seva capacitat d'unir-se al promotor estimulant la transcripció (Deng et al. 2007).

A.1.2.B.3. TFIIF

TFIIF s'associa fortament a l'RNA polimerasa II a través de les seves subunitats RAP30 i RAP74 (*RNA Polymerase II associated protein*) i aquesta unió facilita el reclutament de la polimerasa al complex TFIID-TFIIB-TFIIA, prèviament unit al promotor (Flores et al. 1991). TFIIF també serveix com a factor estabilitzador que incrementa l'afinitat de l'RNA polimerasa II pel complex TBP-TFIIB-promotor, aportant contactes addicionals DNA-proteïna i induint canvis en la topologia del DNA del promotor que provoquen que el DNA embolcalli l'RNA pol II (Robert et al. 1998). Un cop la pol II ha sigut reclutada per TFIIF, aquest TFIIF es necessita per reclutar TFIIE i TFIIH (Orphanides et al. 1996).

TFIIF participa juntament amb l'RNA pol II i TFIIB en la selecció del TSS (Ghazy et al. 2004) degut a la estreta proximitat de TFIIB i TFIIF al centre actiu de l'RNA polimerasa II (Bushnell et al. 2004; Cramer 2004; Freire-Picos et al. 2005). També està implicat en facilitar l'escapament de la polimerasa II del promotor (*promoter clearance o promoter escape*) (Yan et al. 1999). Quan la polimerasa II es para durant la síntesi d'RNA, TFIIF actua, junt amb el factor elongador TFIIIS que estimula l'activitat de la polimerasa II, trencant l'RNA naixent, per tal de superar el bloqueig de la transcripció (Zhang et al. 2004). A més, TFIIF incrementa l'especificitat i l'eficiència de la transcripció de la polimerasa II prevenint iniciacions espúries a través de la inhibició i/o reversió de la unió de la polimerasa II a seqüències no promotores (Orphanides et al. 1996).

Introducció

A.1.2.B.4. TFIIE

Després de la formació de TFIID-TFIIB-RNA polimerasa II/TFIIF-promotor, el pas següent és el reclutament de TFIIE i TFIIH. La zona N-terminal de la subunitat TFIIE α interacciona amb TFIIE β i amb l'RNA polimerasa II. La zona C-terminal està involucrada amb la interacció amb TFIIH, per facilitar l'entrada de TFIIH al PIC (Ohkuma et al. 1995; Kuldell et al. 1997).

TFIIE és reclutat al promotor, a través de la interacció directa amb activadors transcripcionals generals-específics. Un cop ha estat reclutat, TFIIE interacciona directament amb TFIIF, TFIIB, l'RNA polimerasa II i el DNA del promotor. Una de les seves funcions bàsiques és la d'ajudar a reclutar TFIIH i regular la seva activitat (Maxon et al. 1994; Okamoto et al. 1998; Watanabe et al. 2003). TFIIE pot estimular les activitats ATPasa, CTD Kinasa i DNA helicasa de TFIIH per facilitar la formació d'un complex d'iniciació competent per l'RNA pol II (Ohkuma et al. 1994; Ohkuma et al. 1995). TFIIE, junt amb TFIIH, és essencial per obrir el DNA (*promoter melting*), pel procés del *promoter clearance* i la transició del pas d'iniciació al pas d'elongació (Holstege et al. 1996). TFIIE com TFIIH són necessaris per obrir el DNA i, tots dos elements, no són imprescindibles per a la transcripció d'un DNA prèviament obert.

A.1.2.B.5. TFIIH

TFIIH és reclutat a la regió promotora a través de la seva associació amb TFIIE. TFIIH té tres activitats enzimàtiques necessàries durant la transcripció: activitat ATPasa DNA-dependent per l'obertura del promotor i per la formació del primer enllaç fosfodiéster (Conaway et al. 1989; Roy et al. 1994; Dvir et al. 1996; Holstege et al. 1996), activitat helicasa ATP-dependent essencial pel procés de *promoter clearance* que està implicada en la reparació del dany del DNA (Schaeffer et al. 1993; Serizawa et al. 1993; Drapkin et al. 1994; Thomas et al. 2006) i activitat CTD quinasa que s'encarrega de la fosforilació de la serina 5 del CTD de l'RNA polimerasa II i està involucrada en el *promoter clearance* (Lu et al. 1992; Serizawa et al. 1992). La fosforilació del CTD regula la transició de l'inici de transcripció a l'elongació. L'RNA polimerasa II entra al PIC en forma d'RNA pol IIA hipofosforilada i escapa del promotor, com a pol IIO hiperfosforilada (Dahmus 1996). TFIIH també està implicat en la resposta NER (*Nucleotide Excision Repair*) quan hi ha dany del DNA (Schaeffer et al. 1993; Drapkin et al. 1994; Giglia-Mari et al. 2004; Coin et al. 2006).

A.1.2.B.6. TFIID

TFIID és un complex multiproteic que està format per la proteïna TBP i per un conjunt de factors associats a TBP anomenats TAFs (TBP associated factors). TFIID és un dels primers GTF que s'uneix al promotor *core* i dirigeix l'ensamblatge d'altres factors generals de la transcripció en la formació del PIC, permetent la unió de l'RNA polimerasa II i l'activació de la transcripció. TBP i alguns TAFs tenen la capacitat d'unir-se a diferents elements del promotor *core* i d'aquesta manera s'atribueix a TFIID el qualificatiu de complex de reconeixement del promotor *core*. La proteïna TBP contacta la caixa TATA i permet el reconeixement per part de TFIID dels promotors amb caixa TATA. La interacció entre alguns TAFs i elements del promotor com per exemple Inr, DPE i DCE confereix a TFIID la capacitat de reconèixer els promotors que no tenen TATA. A part de la unió dels elements al promotor *core* i de la formació del PIC, aquest complex de TBP-TAFs també té una funció coactivadora, transmetent senyals des dels activadors específics de seqüència a altres components de la maquinària basal i una activitat enzimàtica capaç de modificar posttraduccionalment cromatina i proteïnes involucrades en el control de la transcripció (Thomas et al. 2006).

A.1.2.B.6.1. TBP

La proteïna TBP va ser trobada inicialment com a un polipèptid aïllat en *S. cerevisiae* i com a part del complex TFIID en *Drosophila* i humans (Buratowski et al. 1988; Hoey et al. 1990; Burley 1996). TBP no és troba únicament a TFIID, també s'ha trobat TBP com a component de diferents complexos que contribueixen a la iniciació de la transcripció de les RNA polimerases I i III (Hernandez 1993; Goodrich et al. 1994) essent els TAFs els que confereixen l'especificitat a cada polimerasa.

TBP té un domini C-terminal filogenèticament conservat entre diferents espècies que reconeix la seqüència de la caixa TATA per unir-se al DNA i un domini N-terminal divergent, de llargada variable i que no és necessari en algunes soques de llevat (Burley 1996).

TFIIB i TFIIA interaccionen amb el DNA i amb TBP. TFIIB i TFIIA poden unir el complex TBP-DNA simultàniament i establir el complex de manera sinèrgica. A més, TFIIB contribueix a la direccionalitat de la transcripció, forma un pont entre TBP i l'RNA pol II i especifica l'inici de transcripció.

Per prevenir transcripcions espúries en seqüències no promotores, hi ha diversos mecanismes que prevenen la formació del complex TBP-TATA allà on no és necessari. TBP forma homodímers que fan que sigui inactiva a l'hora d'unir-se al DNA. Només la forma monomèrica de TBP és capaç d'unir-se a DNA. TBP també està subjecta a la regulació negativa de TAF1 (Kokubo et al. 1993). La zona N-terminal de TAF1 és capaç de contactar amb TBP i bloquejar el reconeixement de la caixa TATA i també és capaç de contactar amb la zona que

Introducció

interacciona amb TFIIA, i competir també amb TFIIA que facilita la formació del complex TBP-TATA (Kokubo et al. 1998).

TBP també forma un complex TFIID-like anomenat B-TFIID, format per TBP i per un factor anomenat BTAF1 (Timmers et al. 1992). La zona N-terminal de BTAF1 pot unir-se a la zona còncava de TBP de manera reversible i evitar la unió de TBP al DNA i també la unió de TAF1 (Pereira et al. 2001). La zona C-terminal de BTAF1 té activitat enzimàtica i permet la dissociació de TBP-TATA d'una forma ATP dependent (Chicca et al. 1998). Aquesta activitat translocadora de TBP permet treure TBP de seqüències no promotores incrementant així la unió de TBP als elements TATA funcionals dels promotors.

Un tercer factor que interacciona amb TBP i és capaç de regular la unió de TBP al promotor és el cofactor negatiu NC2, conservat en eucariotes i essencial per la viabilitat en llevats. NC2 evita la unió de TFIIA i TFIIB al complex TBP-TATA i apart de tenir una activitat repressora en promotors amb caixa TATA, té activitat coactivadora en promotors sense caixa TATA (Willy et al. 2000).

A.1.2.B.6.2. TAFs

Després de l'aïllament de TBP, es va veure que el complex TFIID, parcialment purificat de cèl·lules de *Drosophila* i d'humans, generava un extens *footprint* sobre el DNA dels promotors, mentre que la proteïna recombinant TBP generava un *footprint* molt més reduït. TBP recombinant era capaç de dirigir la transcripció basal *in vitro* però incapaç, en general, de poder activar la transcripció, tal i com podia fer-ho TFIID parcialment purificat (Peterson et al. 1990). Totes aquestes observacions van suggerir que TBP no podia funcionar tota sola i que havia de formar part d'un complex junt amb altres proteïnes. Utilitzant anticossos contra TBP es van purificar proteïnes de *Drosophila* i de cèl·lules humanes que es van designar com a proteïnes associades a TBP, TAFs (*TBP-associated factors*) (Dymlacht et al. 1991; Tanese et al. 1991).

El conjunt de TAFs està altament conservat entre diferents espècies eucariotes. Inicialment, els TAFs es van anomenar per la seva massa molecular i com que en cada espècie la massa molecular dels TAFs era variable, hi havia una gran quantitat de noms que generaven una nomenclatura complexa i desordenada. Degut a aquesta gran complexitat de nomenclatura es va crear una nova nomenclatura que ha permès unificar i simplificar els noms dels diferents TAFs i que facilita la comparació d'aquests entre les diferents espècies (veure taula A.2) (Tora 2002).

Molts dels TAFs, presents en TFIID, contenen dominis de tipus *histone fold* que contribueixen al reconeixement dels elements del promotor *core* i a mantenir la integritat del complex TFIID. El domini *histone fold* consisteix en una hèlix α , anomenada α_2 , flanquejada a cada cantó per un *loop* a l'atzar L1 o L2 i una hèlix α curta, α_1 o α_3 . Com a exemple, el domini

estaria organitzat de la següent manera, α_1 -L1- α_2 -L2- α_3 . Hi ha molts TAFs als que s'han identificat dominis de tipus *histone fold*, TAF3, TAF4, TAF4b, TAF6, TAF8-13, i quatre d'aquests, TAF6, TAF9, TAF12 i TAF4/TAF4b, presenten similitud de seqüència amb les histones del *core*, H4, H3, H2B i H2A respectivament.

Nom nou	<i>H.sapiens</i> (hs)	<i>D.melanogaster</i> (dm)	<i>C.elegans</i> (ce)		<i>S.cerevisiae</i> (sc)	<i>S.pombe</i> (sp)
			Nom anterior	Nom actual		
TAF1	TAF _{II} 250	TAF _{II} 230	<i>taf-1</i> (W04A8.7)	<i>taf-1</i>	Taf145/130	TAF _{II} 111
TAF2	TAF _{II} 150	TAF _{II} 150	<i>taf-2</i> (Y37F11B.4)	<i>taf-2</i>	Taf150 or TSM1	(T38673)
TAF3	TAF _{II} 140	TAF _{II} 155 or BIP2	(C11G6.1)	<i>taf-3</i>	Taf47	
TAF4	TAF _{II} 130/135	TAF _{II} 110	<i>taf-5</i> (R119.6)	<i>taf-4</i>	Taf48 or MPT1	(T50183)
TAF4b	TAF _{II} 105					
TAF5	TAF _{II} 100	TAF _{II} 80	<i>taf-4</i> (F30F8.8)	<i>taf-5</i>	Taf90	TAF _{II} 72
TAF5b						TAF _{II} 73
TAF5L	PAF65 β	Cannonball				
TAF6	TAF _{II} 80	TAF _{II} 60	<i>taf-3.1</i> (W09B6.2)	<i>taf-6.1</i>	Taf60	(CAA20756)
TAF6L	PAF65 α	(AAF52013)	<i>taf-3.2</i> (Y37E11AL.8)	<i>taf-6.2</i>		
TAF7	TAF _{II} 55	(AAF54162)	<i>taf-8.1</i> (F54F7.1)	<i>taf-7.1</i>	Taf67	TAF _{II} 62/PTR6
TAF7L	TAF2Q		<i>taf-8.2</i> (Y111B2A.16)	<i>taf-7.2</i>		
TAF8	(BAB71460)	Prodos	(ZK1320.12)	<i>taf-8</i>	Taf65	(T40895)
TAF9	TAF _{II} 32/31	TAF _{II} 40	<i>taf-10</i> (T12D8.7)	<i>taf-9</i>	Taf17	(S62536)
TAF9L	TAF _{II} 31L (AAC09711)					
TAF10	TAF _{II} 30	TAF _{II} 24	<i>taf-11</i> (K03B4.3)	<i>taf-10</i>	Taf25	(T39928)
TAF10b		TAF _{II} 16				
TAF11	TAF _{II} 28	TAF _{II} 30 β	<i>taf-7.1</i> (F48D6.1)	<i>taf-11.1</i>	Taf40	(CAA93543)
TAF11L			<i>taf-7.2</i> (K10D3.3)	<i>taf-11.2</i>		
TAF12	TAF _{II} 20/15	TAF _{II} 30 α	<i>taf-9</i> (Y56A4.3)	<i>taf-12</i>	Taf61/68	(T37702)
TAF13	TAF _{II} 18	(AAF53875)	<i>taf-6</i> (C14A4.10)	<i>taf-13</i>	Taf19 or FUN81	(CAA19300)
TAF14					Taf30	
TAF15	TAF _{II} 68					
<i>B-TFIID</i>						
BTAF1	TAF _{II} 170/TAF-172	Hel89B	(F15D4.1)	<i>btaf-1</i>	Mot1	(T40642)

Taula A.2. Nomenclatura dels TAFs involucrats en la transcripció de l'RNA polimerasa II (Tora 2002).

Alguns TAFs que componen TFIID també estan presents en diferents complexos com: *TBP-free TAF_{II}-containing complex* (TFTC), els complexos TFTC-relacionats *PCAF/GCN5*, Spt-Ada-Gcn5 acetiltransferasa (SAGA), el complex *SAGA-like* (SLIK), Spt3-TAF9-GCN5L acetilasa (STAGA) i el *polycomb repressive complex* (PRC1). Aquests complexos, que no tenen TBP i tenen TAFs, estan involucrats en diferents aspectes de la transcripció dependent de l'RNA polimerasa II. Excepte PRC1, que està involucrat en silenciament, la resta estan principalment implicats en activació de la transcripció degut a la seva activitat HAT inherent a cada complex (Thomas et al. 2006).

Modificacions posttraduccionals dels TAFs

Se sap que alguns TAFs es mantenen associats a TBP durant la divisió cel·lular i estan sotmesos a fosforilació. Utilitzant una aproximació quantitativa d'espectrometria de masses s'han detectat algunes fosforilacions específiques de G2/M en alguns TAFs com TAF1, TAF4 i TAF7 i a TAF3 es detecta una desfosforilació específica de G1/S. La fosforilació en el TAF4, en el pas de G2/M, es dona a la serina S543. La fosforilació de la serina S427 de TAF3 es troba disminuïda en la transició G1/S i està localitzada en una zona on ja s'han mapat altres llocs de fosforilació. Tots els llocs de fosforilació de TAF3 que es coneixen estan entre S183 i T501 en la

Introducció

unió entre el *histone fold* i el *PHD* (veure apartat A.4.2). Possiblement, aquesta zona d'unió està involucrada en la comunicació entre el *histone fold* situat a N-terminal, que es necessita per l'ensamblatge amb TFIID, i el PHD, situat a C-terminal, i involucrat amb el reconeixement de nucleosomes modificats H3K4me3. Actualment, no se sap si la resta de fosforilacions de TAF3 estan regulades de forma semblant en la transició G1/S. Aquestes fosforilacions específiques dels TAFs poden estar involucrades en la regulació de les activitats dels complexos proteics de TBP durant el cicle cel·lular. Algunes d'aquestes fosforilacions es troben en zones altament conservades des d'humans a mosques o cucs (TAF3 S183 i S427 i TAF6 S653) o des d'humans a llevat (TAF1 T876; TAF6 S532; TAF7 S159) i altres només conservades d'humans a ratolí (TAF4 S543 i TAF1D S40, S137 i S234), suggerint que les fosforilacions estan involucrades en funcions importants de regulació d'aquestes proteïnes (Pijnappel et al. 2009).

A.1.2.B.6.3. Variants de TBP i dels TAFs

Alguns components de TFIID, incloent TBP i TAFs, tenen proteïnes de tipus paràleg (proteïnes codificades per gens diferents però pertanyents a la mateixa família), que sovint s'expressen en teixits concrets i de manera específica de desenvolupament. Les proteïnes variants de TBP, els factors anomenats TBP-related factors (TRFs) i les variants dels TAFs, juguen un paper important en la transcripció dependent de pol II. S'han identificat 4 TBP-related factors (TRFs) a eucariotes TRF1, TRF2, TRF3 i TRF4:

TRF1 només s'ha identificat en cèl·lules neuronals i germinals de *Drosophila* (Crowley et al. 1993). Presenta un 63% d'homologia amb TBP, a la zona C terminal, que manté la majoria de residus conservats importants per les interaccions amb la caixa TATA i amb els factors que interaccionen directament amb TBP, TFIIA i TFIIB. TRF1, a *Drosophila*, s'associa amb el TAF de la polimerasa III anomenat BRF i substitueix TBP en la transcripció de dels gens tRNA, U6 i snRNA, per part de la Pol III (Takada et al. 2000).

TRF2, també s'ha anomenat TBP-related protein (TRP), TBP-like factor (TLF), i TBP-like protein (TLP). Aquest paràleg de TBP s'ha identificat en gran nombre d'espècies com *C. elegans*, *Drosophila* i diferents vertebrats (Dantonel et al. 1999). TRF2 presenta un 60% d'homologia de seqüència i un 40% d'identitat a la zona C-terminal de TBP. Reconeix un element de seqüència diferent de la caixa TATA però els aminoàcids responsables de la interacció amb TFIIA i TFIIB no estan alterats, de manera que pot unir-s'hi igual de bé que TBP (Berk 2000). Sembla que TRF2 juga un paper important en la regulació transcripcional durant l'espermatogènesi, quan són crítics els nivells elevats de transcripció.

TRF3 és únic a vertebrats, presenta un 93% d'identitat de seqüència amb la zona C-terminal de TBP (Persengiev et al. 2003) i TRF4 és l'únic que es troba en el genoma de paràsits unicel·lulars humans com el *Trypanosoma brucei* (Ruan et al. 2004).

Els paràlegs dels TAFs són components de TFIID que estan presents subestequiomètricament respecte altres TAFs. Aquests TAFs com TAF4b, TAF5L i TAF7L sovint es troben en teixits específics i confereixen a TFIID la capacitat de funcionar en un entorn especialitzat. TAF4b va ser descrit per primer cop en limfòcits diferenciats de tipus β (Dikstein et al. 1996) posteriorment també s'ha vist que TAF4b funciona específicament a les gònades tant masculines com femenines (Freiman et al. 2001; Falender et al. 2005; Falender et al. 2005), mentre que TAF5L i TAF7L estan involucrats només en la gametogènesi masculina (Hiller et al. 2001; Pointud et al. 2003). El descobriment de complexos TFIID, que contenen TAFs específics de cèl·lules i teixits concrets, indica la diversificació de TFIID com a complex co-activador d'una gran importància durant el procés de desenvolupament.

A.1.2.B.6.4. Estructura i estabilitat de TFIID

Models de reconstrucció per microscòpia electrònica de baixa resolució indiquen que TFIID té una arquitectura trilobulada en forma de ferradura. Aquesta estructura presenta una cavitat central, conservada de llevat a humans, amb la TBP situada al mig dels tres lòbuls (A, B, C), per on podria interaccionar amb TFIIA i TFIIB (Andel et al. 1999; Brand et al. 1999).

Encara que inicialment l'estabilitat i formació del complex TFIID es van atribuir a TAF1 i de forma accessòria a TAF5 (Weinzierl et al. 1993; Leurent et al. 2004), estudis posteriors emprant RNAi per reduir els nivells de components específics de TFIID en cèl·lules S2 de *Drosophila* indiquen que és TAF4 el que juga un paper més important. El domini C-terminal de TAF4 (CTR) on hi ha el domini *histone fold* (veure apartat A.3.2.B) és necessari i suficient per nuclear l'ensamblatge de l'holo TFIID en absència de TAF4 endogen. Aquests experiments també revelen que TAF5, TAF6, TAF9 i TAF12 estan implicats en el manteniment de l'estabilitat del complex, mentre que TBP, TAF1, TAF2 i TAF11 només hi contribueixen marginalment. Es proposa doncs que l'holo-TFIID té un nucli estable que conté TAF4, TAF5, TAF6, TAF9 i TAF12 i com a subunitats perifèriques TAF1, TAF2, TAF11 i TBP (veure figura A.1) (Wright et al. 2006).

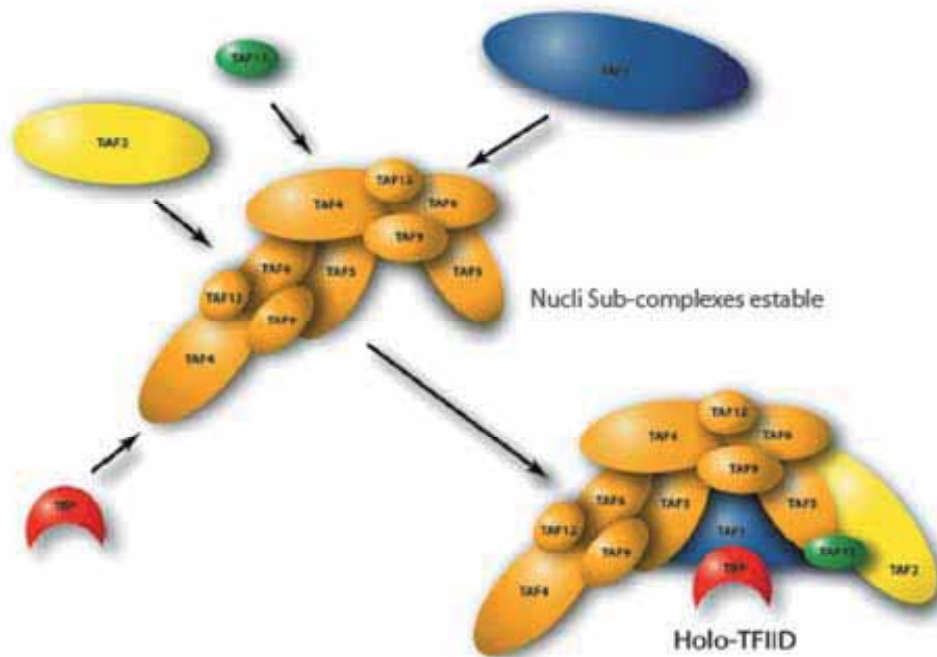


Figura A.1. Model del complex TFIID. TFIID està format per un nucli estable format per TAF4, TAF5, TAF6, TAF9 i TAF12 que es complementa amb TBP, TAF1, TAF2 i TAF11. Estudis funcionals indiquen que TAF1 i TAF4 tenen un paper important en la transcripció de promotors sense TATA que contingui DPE, mentre que si no hi ha DPE la transcripció no depèn tant d'aquestes subunitats (Wright et al. 2006).

A.1.2.B.6.5. Funcions de TFIID

Reconeixement dels diferents elements del promotor core

TFIID és el responsable de la nucleació del PIC al promotor. La interacció entre TFIID i el promotor *core* és duta a terme gràcies a la unió de les diferents subunitats específiques als diferents elements del promotor (Verrijzer et al. 1996). Com que TBP està involucrada en la transcripció de les altres polimerases, les interaccions específiques ajuden a TFIID a distingir diferents elements dels promotors, per dirigir correctament la polimerasa II en la transcripció dels seus gens diana. L'associació de TBP amb els TAFs a TFIID, no solament ajuda a TBP a sobrepassar les barreres de la cromatina, sinó que a més incrementa el reconeixement del promotor *core* per part de TFIID. Els TAFs estableixen TFIID al promotor a través de contactes addicionals als de TBP amb el DNA. TFIID pot contactar amb diferents elements del promotor propers a l'inici de transcripció com ara Inr a través de TAF1/TAF2, DPE a través de TAF6/TAF9 i DCE a través de TAF1 (veure apartat A.2.1). Aquests contactes de TFIID amb el promotor són particularment importants en els promotors que no tenen caixa TATA, on es necessiten els TAFs per a la seva transcripció.

Activitat enzimàtica de TFIID

En humans, *Drosophila* i llevat, TAF1 funciona com una histona acetiltransferasa (HAT) capaç d'acetilar les histones H3 i H4 *in vitro* (Mizzen et al. 1996). El TAF1 de *Drosophila* també s'ha vist que pot funcionar com a quinasa, fosforilant la histona H2B (Maile et al. 2004) i també com enzim d'ubiquitinació-activació/conjugació de tipus histona específic a través de la monoubiquitinació de la histona linker H1 tant *in vitro* com *in vivo* (Pham et al. 2000). Totes aquestes activitats modificadores d'histones de TAF1 suggereixen que TFIID pot ser necessari per la transcripció de cromatina (Wu et al. 1999). A part d'actuar sobre histones, TAF1, també com a entitat independent de TFIID, pot modificar covalentment altres factors generals de transcripció i cofactors. Pot acetilar TFIIE β , fosforilar RAP74 i la subunitat β de TFIIA i també pot ubiquitinar TAF5 així com també s'ubiquitina a si mateix (Thomas et al. 2006).

Activitat coactivadora de TFIID

Durant la caracterització dels TAFs, es va veure que molts activadors transcripcionals podien interaccionar amb TAFs específics (Burley et al. 1996; Verrijzer et al. 1996). Diferents dominis d'un activador poden interaccionar amb diversos TAFs, suggerint que TFIID pot modular la funció de l'activador a través de múltiples interaccions, incrementant la unió de l'activador i afavorint l'estabilització de TFIID al promotor (Chiang et al. 1995). Així doncs, els activadors poden incrementar la seva taxa de transcripció estabilitzant la unió de la maquinària de transcripció al promotor (Ptashne et al. 1997). Els mateixos TAFs també poden interaccionar amb altres TAFs (Lavigne et al. 1996). Aquestes interaccions TAF-activador i TAF-TAF indiquen que els activadors també poden reclutar TFIID al promotor per tal d'ajudar a la formació del PIC (Burley et al. 1996; Verrijzer et al. 1996; Albright et al. 2000; Naar et al. 2001). Tanmateix, els TAFs no són absolutament necessaris per a la transcripció dependent de pol II. A llevat, es va trobar que hi havia gens que es podien transcriure en absència de TAFs. Estudis *in vitro* corroboren el fet que els TAFs no són universalment necessaris i que la transcripció es pot donar en la seva absència. Així, TBP en absència de TAFs, però en presència d'altres GTFs i el cofactor general PC4, pot activar la transcripció en un promotor amb caixa TATA (Fondell et al. 1999).

A.1.2.C. Formació del PIC

Existeixen dos models de formació del PIC. Un model de muntatge seqüencial i un segon model d'holoenzim. Encara no es coneix del cert si la polimerasa II existeix a la cèl·lula com a complex holoenzim o bé si la cèl·lula recluta la polimerasa, com una entitat independent, dins el procés seqüencial de formació del PIC. Existeixen evidències a favor dels dos models i encara ara no s'ha descartat cap de les dues opcions. Podria ser que depenent de les molècules de senyalització específiques en el context de cada promotor es fes servir un cas o l'altre, en resposta a diferents estímuls.

A.1.2.C.1. Model seqüencial de formació del PIC

Els estudis inicials de transcripció *in vitro* a partir de fraccions cromatogràfiques de cèl·lules HeLa indicaven que la formació del PIC podia donar-se de manera seqüencial (Fire et al. 1984). Posteriorment, es va veure que hi havia una organització jeràrquica per a l'ensamblatge dels factors generals de transcripció (GTF) al promotor i se'n va fer un model, tot i que alguns GTFs com TFIID i TFIIF encara no es coneixien (Buratowski et al. 1989). A partir del coneixement de TFIIF i TFIID es pot exposar que la via d'ensamblatge seqüencial dels factors en el PIC és la següent: TFIID reconeix els elements del promotor *core* i s'hi uneix. Seguidament, l'entrada de TFIIA i TFIIB ajuda a establir el TFIID unit al promotor seguit del reclutament de RNA pol II/TFIIF. Després de la formació d'un complex estable TFIID-TFIIA-TFIIB-polII/TFIIF, hi ha el posterior reclutament de TFIIE i finalment l'entrada de TFIIH (veure figura A.2) (Thomas et al. 2006).

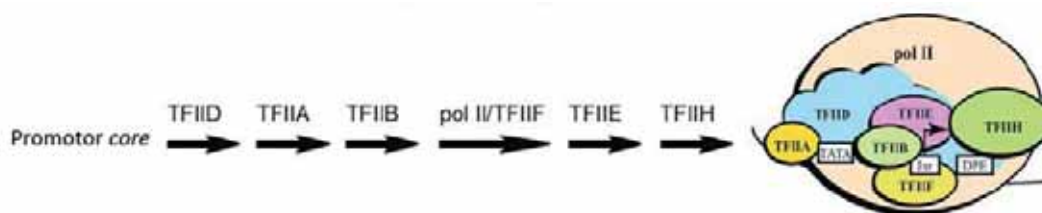


Figura A.2. Model seqüencial de la formació del PIC. Hi ha un reclutament seqüencial i ordenat dels diferents components generals de la maquinària transcripcional (Thomas et al. 2006).

A.1.2.C.2. Model d'holoenzim

Diversos laboratoris van veure que l'RNA polimerasa II podia ser purificada com un holoenzim preensamblat en un complex que contindria pol II i SRBs (*supressors of RNA polymerase B mutations*), alguns GTFs i algunes proteïnes involucrades en la remodelació de cromatina, la reparació del DNA i el processament de l'RNA. La composició de l'holoenzim pol II varia segons els mètodes de purificació de diferents laboratoris però, en les diferents purificacions, no es troba ni TFIIA ni TFIID. Es suggereix doncs que TFIID seria el factor central d'unió al promotor que facilitaria l'entrada de l'holoenzim Pol II a la regió promotora. Aquest model s'assimila al de procariotes, on un factor dissociable σ recluta el *core* de l'RNA polimerasa ($\alpha_2\beta\beta'$) a la regió promotora per la formació del PIC (veure figura A.3) (Orphanides et al. 1996; Thomas et al. 2006).

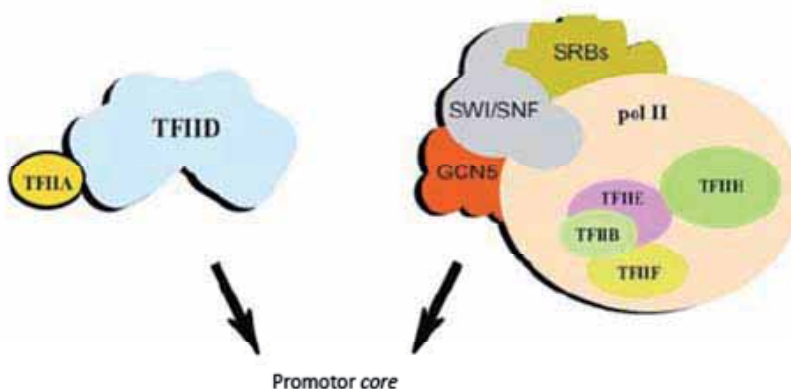


Figura A.3. Model holoenzim de la formació del PIC. Es d'un model de dos components, per una banda hi ha un holoenzim de l'RNA polimerasa II preformat i per l'altra, TFIID que és qui recluta l'holoenzim al promotor (Thomas et al. 2006).

A.1.4. Fases del procés de transcripció

Les tres fases principals conegudes en el procés de transcripció són: la iniciació, l'elongació i la terminació i cada una d'aquestes fases estan sotmeses a una regulació exhaustiva.

Primerament abans d'iniciar la transcripció es necessita el reclutament per part de la maquinària de transcripció de factors remodeladors de la cromatina, els enzims modificadors d'histones i la maquinària de remodelació de la cromatina dependent d'ATP. Seguidament es munta el complex de pre-iniciació (PIC) sobre la regió promotora. Els GTFs posicionen l'RNA Polimerasa II prop del lloc d'inici de transcripció, dicten el lloc precís de la iniciació i l'RNA Polimerasa II realitza la síntesi del primer enllaç fosfodiéster de la cadena d'RNA naixent que és quan es considera iniciada la transcripció.

Introducció

A partir que es situa el primer enllaç fosfodiéster comença la primera fase de l'elongació. La polimerasa necessita escapar de les unions que l'ancoren al promotor per a poder continuar elongant. Aquest procés que permet trencar els forts contactes de la polimerasa amb els elements del promotor s'anomena escapament del promotor o *promoter clearance*. L'estat de fosforilació del CTD de la subunitat major de l'RNA Pol II és important en aquest punt perquè defineix la transició d'iniciació a elongació. L'RNA Polimerasa II entra al promotor hipofosforilada (IIA) i la polimerasa elongant es troba en forma hiperfosforilada (IIO) (Dahmus 1996). Després del procés d'escapament del promotor, en els primers estadis d'elongació, es fosforila el CTD de la polimerasa a la serina 5. Aquesta fosforilació, efectuada per la Cdk7 de TFIIF, es dona majoritàriament a les zones pròximes al promotor i decreix al llarg de l'elongació (Cho et al. 2001).

Un cop iniciada l'elongació, en certs casos, l'RNA Pol II és ràpidament subjecta a una pausa en el procés d'elongació que es coneix com pausa de la polimerasa en el promotor proximal o PrPP (*promoter-proximal pausing*). Durant aquest procés la Polimerasa II es pausa i només es dona lloc a una elongació productiva després d'una estimulació amb els senyals adequats. Aquest pas constitueix un important pas de regulació de l'elongació en la transcripció i funciona com a punt de control abans de donar lloc a l'elongació productiva. Inicialment, aquesta fase d'aturada en la transcripció es va descriure en els gens *heat shock* (Rougvie et al. 1988). Aquests gens en un estat de no inducció contenen l'RNA Polimerasa II aturada pròxima al promotor entre les posicions +20 i +40 i la transcripció només continua en condicions d'inducció. Actualment, se sap que el fenomen PrPP és un mecanisme més comú del que es pensava inicialment. S'ha vist que és un mecanisme de regulació i control de l'expressió gènica estès en molts altres gens que permet un estat de la maquinària en espera per poder donar una activació ràpida de la transcripció en resposta a diferents estímuls (Wu et al. 2008).

Muse i col·laboradors han realitzat CHIP-on-Chip per detectar la polimerasa II pausada en tot el genoma de *Drosophila*. Entre els gens on s'uneix la polimerasa II es troben els gens que tenen unida la polimerasa al llarg de tot el gen, incloent la regió codificant i els gens que contenen la polimerasa unida a la regió promotora i a nivells molt baixos o inexistents a la resta del gen. Aquests gens que tenen la polimerasa pausada a la regió proximal presenten una baixa o nul·la expressió, mentre que els gens que tenen la polimerasa uniformement unida presenten uns bons nivells d'expressió. Un altre fet interessant va ser quan es va veure per anàlisi de Gene Ontology que entre els gens amb l'RNA polimerasa pausada es trobaven enriquits gens de desenvolupament, gens de resposta a estímuls involucrats en diferenciació cel·lular, senyalització cel·lula-cèl·lula i vies de resposta immune (Muse et al. 2007).

El procés de pausa està mediat per certs factors com DSIF (*DRB (5,6-dichloro-1-h-D-ribofuranosylbenzimidazole) sensitivity-inducing factor*) que consta dels factors d'elongació Spt4 i Spt5, presents des de llevats fins a humans. Un altre factor és, NELF (*Negative Elongation Factor*) que està format per quatre subunitats (A, B, C/D i E) i està conservat entre humans i *Drosophila*, però no està present a *C. elegans*, *S. cerevisiae* o *A. thaliana* (Saunders et al. 2006). Assajos de CHIP van permetre veure que DSIF i NELF col·localitzen amb la polimerasa pausada en regions proximals dels promotors de *heat shock* no induïts (Yamaguchi et al. 2002; Wu et al. 2003). Posteriorment experiments de ChIP-on-Chip de NELF a cèl·lules S2 van permetre detectar-lo en gens amb la polimerasa pausada i es va veure que disminuint els nivells de NELF amb RNA d'interferència disminuïen significativament els nivells de polimerasa aturada (Lee et al. 2008). L'enzim del *capping* s'associa amb la serina 5 fosforilada del CTD de la polimerasa i amb Spt5. A l'RNA naixent se li posa el cap durant l'elongació a través del lloc de pausa de la polimerasa. El cap de l'mRNA es forma per l'adició d'una guanosina metilada en l'extrem 5' de l'RNA a través de l'acció de l'enzim del *capping* i d'una RNA (guanina-7) metiltransferasa. El procés de pausa de la polimerasa pot facilitar la correcta col·locació del cap a l'RNA i un correcte RNA amb cap, podria ser un prerrequisit per escapar de la pausa.

La pausa de la polimerasa es pot associar amb marques actives de modificació de les histones com la trimetilació de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) i l'acetilació de la histona H3 a les lisines 9 i 14 (H3K9ac and H3K14ac). Per donar lloc a l'elongació productiva es necessiten altres modificacions (Guenther et al. 2007). Els gens amb trimetilació de la lisina 36 de la histona H3 (H3K36me3) i dimetilació de la lisina 79 de la histona H3 (H3K79me2) poden procedir a una elongació i produir un transcrit madur (veure figura A.4) (Wu et al. 2008).

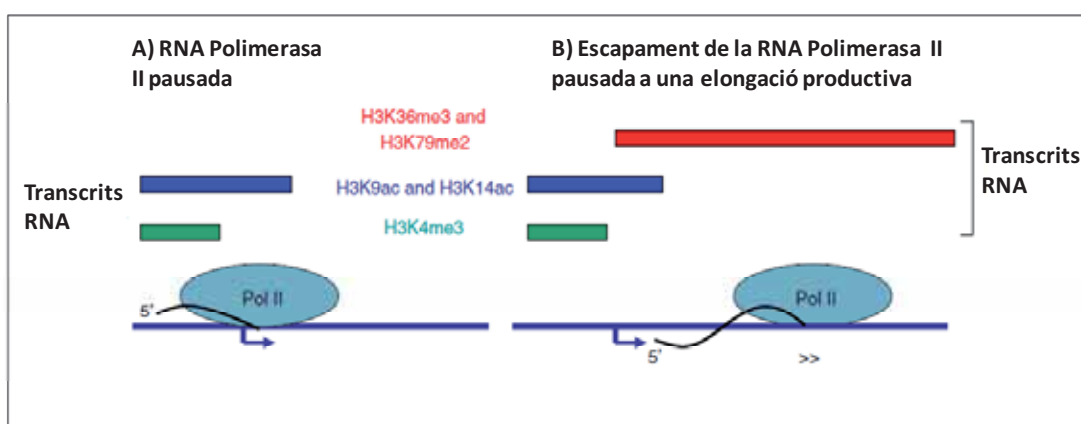


Figura A.4. Patrons de modificació de les histones associades a la pausa i escapament de la pausa de l'RNA polimerasa II. Modificacions típiques dels gens amb polimerasa pausada A) i després de la pausa B). Els senyals de parada de la polimerasa s'associen a marques actives de modificació de les histones (H3K4me3) i (H3K9ac, H3K14ac) [16]. Per continuar elongant cal que a més de les marques indicades anteriorment hi hagi unes modificacions addicionals de les histones com (H3K36me3) i (H3K79me2). Les barres de color indiquen la localització de les modificacions de les histones en els transcrits (Adaptat de Wu et al. 2008).

Introducció

Per escapar de la pausa i procedir a una elongació efectiva es necessiten abolir els efectes negatius de NELF i DSIF. Entre els factors que aboleixen el PrPP provocat per NELF i DSIF es troben el complex P-TEFb, TFIIS i TFIIF. El complex P-TEFb consta de la CDK9 (*Cyclin-dependent-Kinase 9*) i la Ciclina T. La CDK9 és la responsable de la fosforilació de la Serina 2 del CTD de la subunitat major de l'RNA Pol II, de NELF i DSIF. Així, aquesta fosforilació possibilita la dissociació de NELF del complex de transcripció i converteix a DSIF en un factor positiu de l'elongació (Peterlin et al. 2006). TFIIS ajuda la polimerasa II a escapar de les regions properes al promotor per dur a terme una transcripció de tot el gen. Les polimerases aturades tenen tendència a tornar a recular de manera que l'extrem 3' OH queda mal alineat amb el lloc actiu de la polimerasa. TFIIS estimula l'activitat intrínseca de trencament d'RNA de la polimerasa II per tal de generar un nou 3' OH aliniat amb el lloc actiu (Adelman et al. 2005). Un cop la polimerasa II escapa de l'aturada, NELF es dissocia del complex d'elongació mentre que DSIF, TFIIS i P-TEFb segueixen la polimerasa II al llarg del gen. TFIIF, ELL i elongina estimulen l'activitat d'elongació de la polimerasa i estan associades amb el complex d'elongació (veure figura A.5) (Saunders et al. 2006).

La terminació és un procés encara ara desconegut, existeixen diferents models per explicar diferents hipòtesis de terminació. El que si que se sap és que l'mRNA és poliadenilat i s'allibera. Un cop s'arriba al senyal de terminació, el CTD de l'RNA Pol II es desfosforila completament per la fosfatasa Fcp1 i la polimerasa pot ser reciclada per altres cicles de transcripció. (Koch et al. 2008).

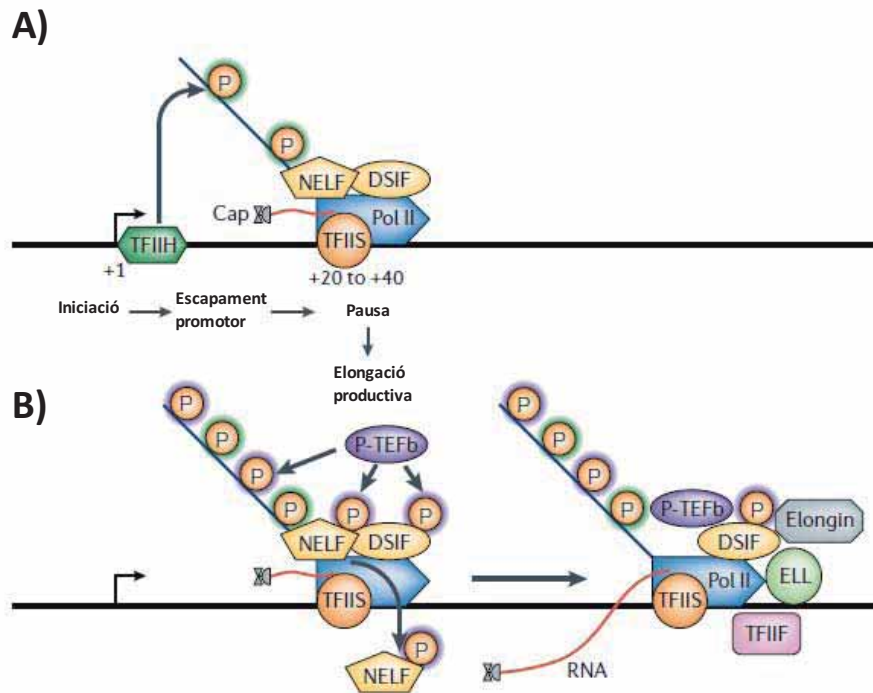


Figura A.5. Esquema del procés de pausa de la polimerasa PrPP (*Promoter-proximal pausing*) i escapament cap a una elongació productiva. **A)** TFIIF fosforila la serina 5 del CTD de l'RNA Polimerasa II, abans de l'aturada de la polimerasa. Els factors DSIF i NELF estan implicats en la pausa de la polimerasa a la regió proximal del promotor i TFIIS també s'associa amb la polimerasa pausada. A l'RNA nascent se li afegeix el cap durant aquest primer moment d'elongació. Els enzims implicats en el *capping* de l'RNA nascent s'associen amb el CTD fosforilat a la serina 5 i amb Spt5. **B)** Per donar lloc a l'elongació productiva P-TEFb fosforila DSIF, NELF i la serina 2 del CTD de la polimerasa II. TFIIS facilita l'alliberament de la Pol II de la pausa ajudant a l'escapament dels complexos retrasats, NELF es dissocia del complex de transcripció i DSIF, TFIIS i P-TEFb segueixen la Polimerasa II al llarg del gen. TFIIF, ELL i elongina estimulen l'activitat d'elongació de la polimerasa i estan associats amb el complex d'elongació. (Adaptat de Saunders et al.2006).

A.1.3. Factors activadors, repressors i cofactors

En general els factors de transcripció són proteïnes d'unió específica a seqüències de DNA que serveixen com elements activadors i/o repressors de la transcripció. Els factors de transcripció s'uneixen a seqüències promotores de gens o a zones reguladores allunyades (*enhancers* i silenciadors) per modular els patrons específics de l'expressió gènica necessaris per respondre a senyals particulars.

Tanmateix, els factors de transcripció no són capaços de potenciar, per si sols la transcripció. Influències positives i negatives sobre l'expressió gènica han de ser analitzades i interpretades per tal de sintetitzar correctament l'mRNA. L'estret control de l'expressió gènica depèn de complexos coreguladors o cofactors que responen a senyals cel·lulars específics. Aquests complexos integren els senyals activadors i els fan arribar a la maquinària basal. Existeixen dos tipus de cofactors, els cofactors de tipus pont o adaptadors i els cofactors amb activitat enzimàtica capaços de remodelar cromatina.

A.1.3.A. Cofactors de tipus pont

Els cofactors generals inclouen els TAFs del complex TFIID, el complex *Mediator*, freqüentment associat al CTD, i els components derivats d'USA (*Upstream Stimulatory Activity*), que inclouen els cofactors positius PC1-PC4 i el cofactor negatiu NC1 (veure figura A.6). Aquests cofactors són reclutats pels factors de transcripció i serveixen de pont entre els factors de transcripció i els components de la maquinària basal. En presència d'activadors poden estimular la transcripció i són capaços de reprimir la transcripció quan els activadors no hi són presents.

El primer grup important de coactivadors és el dels TAFs del complex TFIID i és necessari per a l'activació en gran nombre de promotors (Naar et al. 2001). Per contra, els TAFs no són necessaris per a la transcripció a nivell basal. Els TAFs actuen com a adaptadors que fan de pont entre els activadors específics de seqüència i la maquinària de transcripció (Naar et al. 2001) si bé que la forma en que es trasllada aquest efecte pont a un augment en la taxa de transcripció encara no està gaire clara.

El *Mediator* representa el segon grup més important de cofactors generals. Interacciona amb activadors i directament amb l'RNA polimerasa II. El complex *Mediator* està altament conservat entre diferents espècies i és capaç d'estimular la transcripció basal i la transcripció dependent d'activador. És capaç d'actuar sense la presència dels TAFs i també és essencial per a la regulació negativa. A part de la funció coactivadora el complex *Mediator* també té activitat enzimàtica que contribueix a les funcions transcripcionals, incloent una possible estimulació de l'activitat quinasa de TFIIH sobre el CTD de l'RNA polimerasa II (Kim et al. 1994).

Tot i que tant els TAFs de TFIID, com el complex *Mediator* són diana de diferents activadors, molts promotors necessiten els dos tipus de coactivadors, *in vitro*. Això suggereix que aquests dos complexos coactivadors no són redundants i que deuen realitzar funcions no solapants a l'hora de regular la transcripció. Experiments *in vitro* indiquen que aquests dos complexos coactivadors podrien interaccionar entre ells (Johnson et al. 2002; Johnson et al. 2003).

Els cofactors USA inclouen els cofactors positius PC1, PC2, PC3 i PC4 i el cofactor negatiu NC1 (Kaiser et al. 1996). Cada cofactor té un efecte dual actuant com a coactivador i com a repressor inhibint la transcripció basal en absència d'activador.

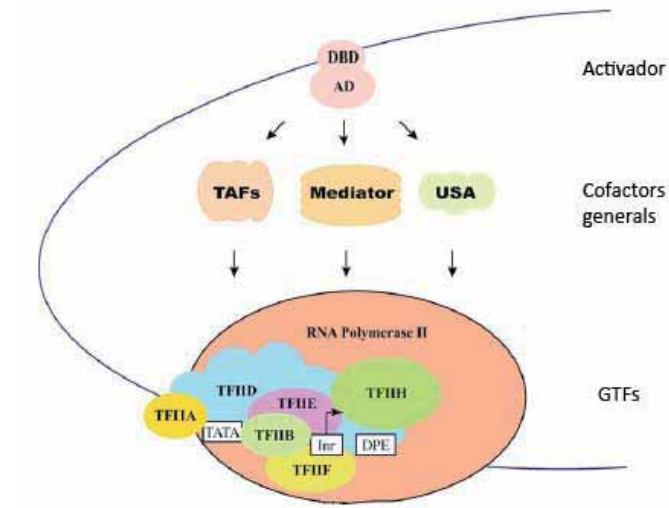


Figura A.6. Esquema dels cofactors generals. Serveixen com a pont entre els activadors i la maquinària general de transcripció.

A.1.3.B. Cofactors enzimàtics

Existeixen també altres cofactors que estan implicats en la transcripció d'estructures de cromatina. Els remodeladors de cromatina permeten incrementar l'accessibilitat de TBP a les seves seqüències d'unió gràcies a que alteren la cromatina al voltant de la caixa TATA (Martinez-Campa et al. 2004). Entre els remodeladors de cromatina trobem els que remodelen l'estructura de la cromatina de forma no covalent usant l'energia de la hidròlisi d'ATP per alterar els contactes histona-DNA (Narlikar et al. 2002), i els remodeladors que reconfiguren l'estructura dels nucleosomes, modificant covalentment les cues de les histones per reduir les interaccions proteïna-DNA (Fischle et al. 2003).

El grup de remodeladors dependents d'ATP es troben en tots els organismes eucariotes. Alteren la cromatina, fan que els nucleosomes puguin moure's i lliscar i això fa que hi hagi canvis en l'accessibilitat del DNA pels factors de transcripció. A *Drosophila*, dins aquest grup hi trobem:

- La família SWI2/SNF2 (*switch mating type/sucrose non-fermenting2*) on hi ha proteïnes relacionades que comparteixen un domini bromo com per exemple el complex *Brahma*.
- La família CHD (*chromodomain-helicase-DNA-binding*) on els membres de la família tenen domini cromo. Dins aquesta família es troben *dCHD1*, *dCH32*, *dMi-2* (*antigen recognized by the patient Mitchell autoimmune antibodies 2*) i *Kismet*.
- La família ISWI (*imitation switch*) on les proteïnes comparteixen un domini SANT. Dins aquesta família es troben tres complexos remodeladors àmpliament coneguts: NURF (*nucleosome remodeling factor*), ACF (*ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor*) i CHRAC (*chromatin remodeling and assembly complex*) (Bouazoune et al. 2006).

Introducció

Les modificacions posttraduccionals de les cues de les histones distorsionen l'estructures dels nucleosomes alterant les interaccions DNA-histones, són necessàries pel reconeixement de diferents factors i afecten les estructures d'ordre superior de la cromatina. Existeixen diferents tipus de modificacions covalents de les cues de les histones: acetilacions, fosforilacions i metilacions són les més estudiades però se'n troben d'altres com la sumoïlació, la ubiquitinació i la ADP-ribosilació. Es va veure que existien diferents complexos capaços de posar i treure grups a la regió N-terminal de les histones. A partir de l'observació de les múltiples combinacions de modificacions i del conjunt de complexos capaços d'interaccionar i modificar aquestes cues de les histones es va proposar l'existència de l'anomenat codi de les histones. Aquest codi consistiria en un llenguatge en forma de modificacions posttraduccionals capaces de ser reconegudes per diferents complexos que modificarien tant l'estructura de la cromatina com l'expressió gènica (Strahl et al. 2000).

L'acetilació i la desacetilació són dues modificacions molt estudiades que es duen a terme pels complexos acetiladors HAT (*histone acetyltransferase*) i HDAC (*histone deacetylase*), respectivament. En general, l'acetilació està relacionada amb activació i la desacetilació amb repressió. Dins els complexos HAT podem trobar SAGA (*Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase*) (Brown et al. 2000) i ATAC (Suganuma et al. 2008), i dins el grup HDAC els complexos tipus Sin3 (*SWI-independent*) i els tipus Mi-2/NuRD (*Nucleosome remodeling deacetylase*) (Knoepfler et al. 1999).

La metilació permet introduir un grup metil a les arginines o a les lisines. Un mateix residu lisina pot estar mono, di o trimetilat i la metilació pot promoure tant estats reprimits com activats de la cromatina. Un exemple de metil transferasa d'histones (HMT) a *Drosophila* és Su(var)3-9. La metilació juga un paper molt important en la formació d'heterocromatina i en el silenciament gènica i Su(var)3-9 és la principal reguladora del PEV (Ebert et al. 2004). Inicialment es pensava que la metilació era una modificació molt estable fins que es van trobar les demetilases d'histones (HDM) (Shi et al. 2004).

La fosforilació és una modificació coneguda i també es pot relacionar amb regulació gènica. S'ha vist que la fosforilació de la histona H3 es correlaciona amb loci transcripcionalment actius (Nowak et al. 2000).

A.2. TAF4/dTAF110

TAF4 es va identificar com un dels components del complex TFIID aïllat d'extractes d'embrions de *Drosophila* (Hoey et al. 1993). Paral·lelament, el seu cDNA es va obtenir d'una llibreria de *Drosophila* i s'observà que codificava una proteïna de 110 kDa. Per això, inicialment, a *Drosophila* es va anomenar dTAF_{II}110, i en humans hTAF_{II}130 o hTAF_{II}135. Posteriorment, la nomenclatura unificada l'ha anomenat genèricament TAF4 (Tora 2002). TAF4 és un TAF conservat evolutivament que s'expressa de manera ubiqua i que està sempre present en TFIID i també en TFTC (*TBP-free TAFII complex*). S'ha vist que TAF4 és essencial en llevat, juga un paper important en els embrions de *C.elegans* (Sanders et al. 2000; Walker et al. 2001), i també és de gran importància en *Drosophila* i humans.

A.2.1. Estructura del gen dTAF4

A *Drosophila*, TAF4 es troba en el cromosoma 3L (posició 3L: 16106323..16114468). En el mapa citogenètic es troba en la posició 72D7-72D8. Hi ha 6 transcrits i 6 polièptids anotats (veure figura A.7).

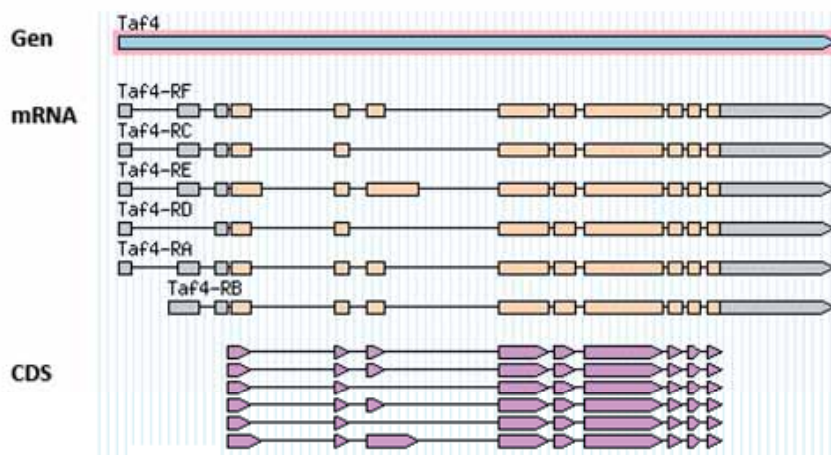


Figura A.7. Representació del gen, els transcrits i les seqüències codificants de dTAF4 (Adaptat de *Flybase*).

A.2.2 Dominis estructurals de dTAF4

La proteïna TAF4, així com els seus homòlegs, s'estructura en dominis (Figura A.8). A la zona C-terminal presenta un domini similar a la histona H2A anomenat domini *histone fold*. Només els homòlegs de TAF4 de metazous contenen una zona N-terminal extensa. La zona N-terminal dels metazous té dues regions on s'hi uneixen factors de transcripció, una regió rica en glutamines (Q-rich) i un domini TAFH (TAF-Homology) a la zona central de la proteïna.

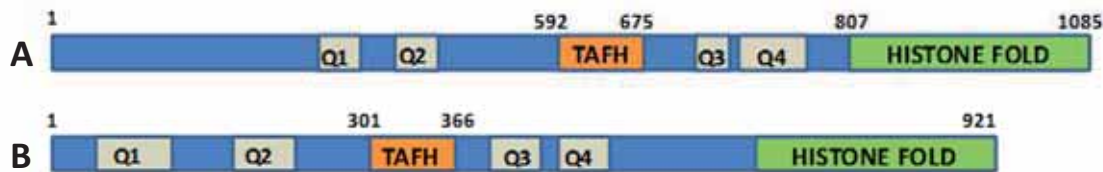


Figura A.8. Dominis estructurals de TAF4 a humans i a *Drosophila*. **A)** Dominis estructurals d'una isoforma del TAF4 humà. (Wang et al. 2007). **B)** Dominis estructurals d'una de les isoformes de TAF4 de *Drosophila* (Wright et al. 2009). Les regions més conservades entre metazous contenen el domini TAFH i el domini *histone fold*. Els llevats només tenen a la zona C-terminal, el *histone fold*.

Regió rica en Glutamines: la regió rica en glutamines de TAF4 va ser un dels primers dominis coactivadors definits a TFIID (Hoey et al. 1993). Les zones riques amb glutamines de TAF4 permeten la unió d'activadors transcripcionals. En diferents organismes, s'ha trobat que TAF4 interacciona amb gran nombre d'activadors com Sp1 (Hoey et al. 1993; Gill et al. 1994; Saluja et al. 1998), CREB (*cAMP response element binding protein*) (Ferreri et al. 1994; Saluja et al. 1998; Felinski et al. 1999) i RAR (*retinoic acid receptor*), també conegut com a receptor de la vitamina D (Mengus et al. 1997).

Domini TAFH: la proteïna *eight twenty-one* (ETO) està implicada entre el 12-15% de les leucèmies humanes com a part d'una fusió gènica amb RUNX1, també anomenat AML1. La proteïna ETO conté 4 dominis NHR conservats que tenen elevada homologia amb *nervy*, un gen present a mosca (veure figura A.9). Donat que el domini NHR1 està estretament relacionat en seqüència amb els homòlegs de TAF4 d'humans i de *Drosophila*, també s'anomena ETO-TAFH (*TAF Homology*) (Wei et al. 2007). El domini TAFH present en els TAFs de metazous va ser definit, inicialment, basant-se amb la similitud de seqüència amb la família de proteïnes (ETO) 8;21 (Tanese et al. 1996). En la regió central de la proteïna TAF4 humana, es troba un domini de tipus TAFH, semblant al domini TAFH de la proteïna ETO (veure figura A.9).

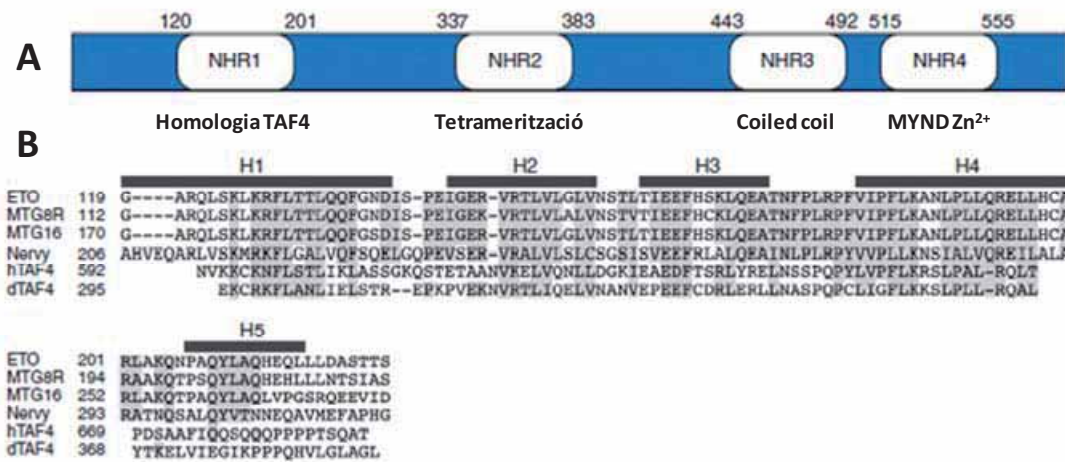


Figura A.9. Dominis conservats d'ETO i la seva relació amb TAF4. **A)** Dominis conservats d'ETO. NHR1 és el domini ETO d'homologia amb TAF4. NHR2 és un domini de tetramerització, NHR3 un motiu *coiled coil* i NHR4 és un dit de zinc binuclear. **B)** Alineaments de seqüència dels diferents dominis TAFH de proteïnes de la família ETO i comparacions de seqüència amb *nervy*, TAF4 de *Drosophila* i TAF4 humana (Wei et al. 2007).

L'estructura per NMR del domini TAFH de la proteïna ETO (ETO-TAFH) identifica una butxaca hidrofòbica com a plataforma d'unió per proteïnes que tenen motius del tipus LxxLL (Plevin et al. 2006). S'ha resolt, també, l'estructura cristal·logràfica del domini TAFH del TAF4 humà. Aquest domini forma 5 hèlix compactes amb una butxaca hidrofòbica que permet crear una superfície idònia per la unió de pèptids (Wang et al. 2007). Per tant, a través d'aquest domini, TAF4 pot contactar amb diferents factors de transcripció i actuar com a plataforma que pot intercanviar proteïnes co-reguladores pel control de la transcripció (Wei et al. 2007). Basant-se en l'estructura cristal·logràfica del domini TAFH del TAF4 humà i de la similitud d'estructura amb el domini de tipus ETO-TAFH, que uneix proteïnes amb el motiu LxxLL, Wang i col·laboradors van utilitzar la tècnica de *phage display* per aïllar seqüències capaces d'unir-se al domini TAFH del TAF4 humà. La majoria de seqüències trobades tenen una elevada proporció de residus hidrofòbics que recorden la seqüència específica d'unió de ETO-TAFH (LxxLL), la diferència és que el domini hTAF4-TAFH té preferència per un domini una mica més llarg. Va ser possible trobar molts candidats d'unió a hTAF4 de proteïnes que contenen seqüències del tipus LLxxL(L/M/F) i LLxx(I/L)L (Wang et al. 2007).

Els dominis TAFH són una mica diferents entre espècies. La prolina, P669, només existeix en TAF4 i TAF4b de vertebrats i permet la formació de la hèlix número 5. En invertebrats com l'erició de mar, *C.elegans* i *Drosophila*, aquesta prolina no existeix. A part d'aquest canvi, existeixen altres canvis en altres residus hidrofòbics que creen diferències entre els diferents dominis TAFH. Això, pot reflectir canvis en les proteïnes d'unió dins la família TAF4-TAFH, per tal de tenir una fina regulació de la resposta transcripcional pels activadors. Sembla que el domini TAFH ha evolucionat en resposta als diferents programes de desenvolupament i es

Introducció

suggereix que els dominis TAF4-TAFH dels invertebrats siguin més similars al domini ETO-TAFH que no pas al hTAF4-TAFH. (Wang et al. 2007).

Aquest domini és capaç d'interaccionar amb gran nombre de factors de transcripció *in vitro* i se li han atribuït principalment funcions coactivadores, tot i que encara ara no se'n coneix del tot el seu paper concret.

Domini *Histone fold*: és la regió més conservada evolutivament de la proteïna. Aquest domini va ser definit per primer cop com a domini estructural comú a les quatre histones del *core* i permet la formació de parelles heterodimèriques entre histones (Arents et al. 1991). Anàlisis de seqüència indiquen que diferents TAFs conservats a llevat, *Drosophila* i vertebrats contenen aquest domini que té similitud a les histones H2A, H3 i H4. Aquest domini està relacionat amb la heterodimerització de diferents TAFs que poden formar parelles de tipus *histone-like*. El domini *histone fold* de TAF4 es troba situat a C-terminal i té elevada similitud amb la Histona H2A. Aquesta regió està involucrada principalment en l'estabilitat estructural de TFIID i en el manteniment de la seva integritat (Wright et al. 2006). TAF12 és la parella de tipus *histone like* de TAF4, amb la que heteromeritza a través d'aquest domini (Gangloff et al. 2000).

A.2.3. Funcions de TAF4

Funció estabilitzadora

És de gran importància la funció estabilitzadora, integradora i nucleadora de TAF4 en el complex TFIID. La presència de la regió C-terminal CTR (*C-terminal region*) de TAF4, zona on hi ha el domini *histone fold*, és necessària i suficient per la nucleació de l'holo-TFIID (Wright et al. 2006).

Funció coactivadora

La zona N-terminal de TAF4, només present en metazous, conté el domini ric en Glutamines (Q-rich) i el domini TAFH que estan involucrats en el paper coactivador de TAF4, permeten la unió amb factors de transcripció i d'aquesta manera fan de pont entre els activadors i la maquinària basal. S'ha vist que TAF4 funciona com a coactivador de Sp1, CREB i RAR (*retinoic acid receptor*), a través del seu domini ric en glutamines. Tanmateix, algun treball indica que TAF4 no és un coactivador essencial per Sp1 (Mengus et al. 2005). A *Drosophila* s'han fet experiments que assignen l'efecte coactivador de TAF4 al seu domini TAFH. S'ha vist que tant en cèl·lules en cultiu, com en discs imaginals de larva, el domini TAFH de TAF4 de *Drosophila* és necessari per l'activació del gen diana *naked cuticle (nkd)* de la via de Wingless. Aquest domini TAFH, similar a ETO-TAFH, interacciona directament amb Pygopus, un factor de transcripció necessari per la via de wingless (Wright et al. 2009).

Proliferació i viabilitat cel·lular

Treballs realitzats amb fibroblasts de ratolí que no tenen TAF4, (*taf4*^{-/-}), mostren que la manca de TAF4 no produeix apoptosi ni aturada de cicle cel·lular, suggerint que TAF4 no és essencial per la viabilitat cel·lular ni per la progressió del cicle (Mengus et al. 2005). Tot i que TAF4 és considerat important per l'estabilitat de TFIID (Gangloff et al. 2000), els fibroblasts que no tenen TAF4, presenten un TFIID intacte. Això, segurament, és degut a la presència de TAF4b, que substitueix TAF4 en la seva absència per tal de mantenir l'estabilitat de TFIID i la viabilitat cel·lular (Mengus et al. 2005). Aquests fibroblasts sense TAF4 presenten una morfologia alterada i tenen un creixement autocrí independent de sèrum que correlaciona amb la inducció de l'expressió de factors mitòtics i activadors del factor de transformació del creixement TGFβ (*transforming growth factor*). Els fibroblasts defectius per TAF4 tenen un feedback regulador positiu dels senyals del factor transformador de creixement TGFβ, que és el que porta a aquest creixement autocrí independent de sèrum (Mengus et al. 2005). TAF4 regula negativament la via de TGFβ per competició amb el seu paràleg TAF4b. Un equilibri competitiu entre TAF4 i TAF4b regula l'expressió dels gens que controlen la viabilitat i la proliferació cel·lular. TAF4 també regula negativament la via d'estrés induïda per la via de les quinases a través d'interaccions amb ATF7, un factor membre de la família ATF/CREB (Davidson et al. 2005).

TAF4 és un important regulador de proliferació de queratinòcits i té activitat supressora de tumors de tipus autònom cel·lular i no autònom cel·lular a ratolí (Fadloun et al. 2007). TAF4 també ha estat implicat en neurodegeneració i malalties neurodegeneratives degut a les interaccions proteïna-proteïna entre TAF4 i les repeticions dels nucleòtids CAG que codifiquen per cues de poliglutamina (poli Q), en factors com la Huntingtina (Shimohata et al. 2000). S'ha suggerit que aquestes interaccions causarien aberracions en les accions de CREB i Sp1 que podrien contribuir a la malaltia de Huntington. A més, TAF4 col·localitza amb RanBPM en precursors mitòtics neuronals del desenvolupament del sistema nerviós central (CNS) *in vivo* i *in vitro* i interaccionen en un assaig de dos híbrids i per coimmunoprecipitació. TAF4 interacciona amb RanBPM en la regulació de la neuritogènesi en CNS (Brunkhorst et al. 2005).

Formació del mesoderm a *Drosophila*

A *Drosophila*, els gradients de morfògens especifiquen els eixos primaris de l'embrió i inicien la formació de les estructures i teixits al llarg d'aquests eixos corporals. El patró dorso-ventral en l'embrió de *Drosophila* s'inicia pel gradient del morfògen Dorsal. Els factors de transcripció Dorsal i Twist inicien la diferenciació del mesoderm en *Drosophila* activant l'expressió de diferents gens clau i TFIID permet l'activació transcripcional de Dorsal i Twist. S'ha vist que Dorsal interacciona amb TAF4 i TAF6, i Twist, interacciona amb TAF4. Aquestes interaccions de TAF4 amb Dorsal i Twist són necessàries per l'activació dels gens que determinen el mesoderm en l'embrió de la mosca (Pham et al. 1999).

A.3. dTAF3/ dTAF_{II}155/ BIP2

BIP2 (Bric à brac Interacting Protein 2)/ dTAF_{II}155 (*Drosophila* TATA-box Associated Factor 155) o dTAF3, (Tora 2002), és una proteïna de *Drosophila melanogaster* que va ser identificada i caracteritzada per primera vegada a partir d'un assaig de dos híbrids a llevat. Va ser trobada a partir d'una regió que contenia el domini BTB/POZ del factor de transcripció Bric à Brac 1. (Pointud et al. 2001). Comparacions de seqüència, coimmunoprecipitacions i assajos de dos híbrids a llevat van permetre veure que BIP2 era una proteïna homòloga amb γ TAF_{II}47 de llevat. A través de la cerca en bases de dades es va trobar que compartia elevada similitud de seqüència amb el seu homòleg humà hTAF_{II}140. Mitjançant assajos de dos híbrids, es va veure que BIP2 formava una parella selectiva *histone-like* amb dTAF_{II}24 de *Drosophila* (dTAF10). Això va indicar que BIP2 podia ser considerat a partir d'aquell moment un nou dTAF_{II} de *Drosophila* del complex TFIID (Gangloff et al. 2001) i es va reanomenar la proteïna com a dTAF_{II}155. Assumint que BIP2/dTAF_{II}155 era un component de TFIID, la interacció BIP2 amb BAB1 i BAB2 mostrava una relació directa dels factors de transcripció que tenen domini BTB/POZ amb la maquinària de transcripció basal. Amb la unificació de la nomenclatura va passar a anomenar-se dTAF3 (Tora 2002).

dTAF3 també podria formar part del complex TBP-free TAF-containing complex (TFTC) acetiltransferasa d'histones. S'ha vist que l'homòleg de dTAF3 a humans coimmunoprecipita amb GCN5 (PCAF), l'acetiltransferasa de TFTC (Gangloff et al. 2001) i a més se sap que el domini PHD de TAF3 està involucrat en la lectura del codi de les histones (Vermeulen et al. 2007). Per tant, dTAF3 podria, igual que el seu homòleg humà, formar part d'aquest complex TFTC.

A.3.1. Estructura gen *dTAF3*

El gen *dTAF3* (*Bip2*) té unes 6,5kb, conté 6 introns i 7 exons (veure figura A.10). Mitjançant hibridació *in situ* a cromosomes politènics es localitza el gen al cromosoma 4. La seva posició en el mapa citogenètic és 102C1-102C1 i la seva seqüència de localització és 4C:480,508..487,450 [-]. L'extrem 5'UTR s'estén 118pb per sobre del codó d'inici ATG, l'extrem 3'UTR s'estén 139pb després del codó STOP i té una senyal AATAAA de poliadenilació.

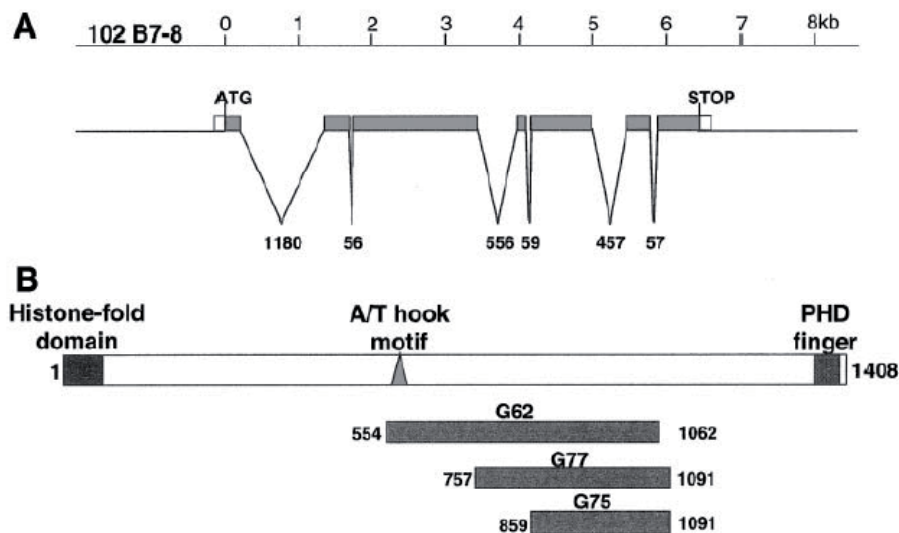


Figura A.10. Estructura del gen *dTAF3(bip2)* i de la seva proteïna. **A)** El gen *bip2* conté 7 exons i 6 introns en un fragment genòmic de 6,5kb. Els requadres grisos indiquen la seqüència codificant i els requadres buits indiquen regions no traduïdes. Les mides dels introns estan indicades en parells de bases. **B)** La proteïna TAF3 conté diversos dominis involucrats en la regulació transcripcional a través de la cromatina, el domini Histone-Fold, el motiu A/T Hook, i el dit de zinc PHD. Estan representades les posicions relatives dels tres grups de cDNAs de TAF3 identificats en un assaig de dos híbrids (Pointud et al. 2001).

A.3.2. Dominis estructurals de dTAF3

dTAF3 codifica una proteïna de 1406 aminoàcids amb un pes molecular predit de 155 kDa i un punt isoelèctric de 9,35. La proteïna consta de diferents dominis (veure figura A.10) :

Histone fold: a través d'aquest domini situat a N-terminal de la proteïna (aminoàcids 1 al 75) interacciona amb dTAF10 (dTAF_{II}24), que és la seva parella *histone like*. La formació d'aquest dímer TAF3-TAF10 està conservada de llevats fins a humans (Gangloff et al. 2001; Pointud et al. 2001). *Drosophila* té dos gens paràlegs del TAF10 humà: dTAF10 (dTAF_{II}24) i dTAF10b (dTAF_{II}16). dTAF3 interacciona amb dTAF10 però no interacciona amb dTAF10b.

PHD (Plant Homeo Domain-finger) o LAP (Leukemia-Associated-Protein domain) : el domini PHD es troba a C-terminal de la proteïna, de l'aminoàcid 1342 al 1392 (Pointud et al. 2001). Forma part d'una classe atípica de dits de zinc amb una estructura C₄-H-C₃ que es troba en gran nombre de proteïnes diferents. Inicialment, es va trobar que aquest domini s'assemblava molt a l' homeodomini d'algunes proteïnes de plantes com HAT3.1 i HOX¹A i d'aquí va venir el seu nom. Com que el domini funcional d'aquest motiu és pertorbat en translocacions cromosòmiques associades a leucèmia també es va anomenar domini LAP (Aasland et al. 1995; Saha et al. 1995). Aquests dits de zinc estan involucrats en la unió a DNA i/o d'unió proteïna-proteïna (Linder et al. 2000). Aquest domini és el que permet TAF3 interaccionar específicament amb la lisina 4 trimetilada de la histona H3. El domini PHD es

Introducció

troba en gran nombre de complexos remodeladors de cromatina i és el domini que utilitza TAF3 per unir-se a la marca d'activació de la trimetilació de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) d'una manera selectiva. Per espectroscòpia RMN hi ha resolta una estructura del PHD de TAF3 amb un pèptid H3K4me3 (van Ingen et al. 2008). TAF3 pot unir-se a la modificació tant en pèptids que contenen la histona H3 trimetilada en la lisina 4 com en nucleosomes amb aquesta marca epigenètica. Així doncs, mitjançant el domini PHD de TAF3, TFIID pot unir-se a aquesta modificació i facilitar el reclutament i estabilitzar el PIC de l'RNA polimerasa II. També cal remarcar que TAF3 pot actuar de coactivador transcripcional a través del seu domini PHD (Vermeulen et al. 2007).

A/T Hook: sembla que BIP2 pot tenir un motiu *A/T hook* entre els aminoàcids 574 i 586 (Pointud et al. 2001). *A/T hook* és un motiu petit d'unió a DNA, normalment associat a dominis funcionals que s'han trobat en proteïnes de la cromatina i en proteïnes d'unió a DNA com són els dominis *histone fold*, homeodominis i dits de zinc. Sembla que és un motiu auxiliar que coopera amb altres activitats d'unió a DNA i facilita canvis en l'estructura del DNA (Aravind et al. 1998).

A.3.3. Expressió de mRNA i proteïna de TAF3

Mitjançant experiments de *Northern blot* es detecta un sol transcrit de 4,5 kb al llarg de tot el desenvolupament, tant en mascles com en femelles. La generació d'un anticòs contra la proteïna TAF3 fa que es detecti una sola banda d'uns 160 kDa d'acord amb la mida de 155 kDa predita per a la proteïna. Igual que en el cas de l'mRNA, la proteïna es troba present al llarg de tot el desenvolupament de *Drosophila*. La proteïna és sempre nuclear i en cromosomes politènics es troba en gran mesura en interbandes i en *puffs*, que són llocs transcripcionalment actius. Una part d'aquestes bandes col·localitza amb BAB2 (Pointud et al. 2001).

dTAF3 és un gen que presenta efecte matern. Mitjançant *microarrays* de cèl·lules polars (*pole cells*) d'embrions de *Drosophila* en estadi blastodèrmic, es veu que hi ha molts gens corresponents a la categoria de reguladors de transcripció expressats predominantment en les cèl·lules polars. Se sap que les *pole cells* són transcripcionalment inactives i per tant, aquests transcrits detectats en elevat nombre tenen origen matern. Experiments d'hibridació *in situ* en embrions revelen que entre els transcrits detectats, alguns es troben enriquits en el plasma germinal i, entre aquests, es troben components dels complexos d'iniciació de la transcripció entre els quals hi ha dTAF3. El transcrit de *dTAF3*, d'aport matern, es troba enriquit al plasma germinal i les cèl·lules polars i es necessita per l'expressió de *vas* i *nos* a les cèl·lules polars (Yatsu et al. 2008).

A.3.4. Interaccions de *dTAF3*

Bric à Brac (BAB): *dTAF3* interacciona amb Bric à Brac (d'aquí ve el seu nom BIP2, de *Bric à Brac interaction protein 2*). Bric à brac 1 (BAB1) i Bric à brac 2 (BAB2) són dues proteïnes nuclears necessàries pel patró de desenvolupament al llarg de l'eix proximo-distal de pota i antena, per la morfogènesi dels ovaris adults i el control dels caràcters de dimorfisme sexual a la mosca. Amb assajos de doble híbrid es va veure que, el domini POZ/BTB de BIP2 era necessari i suficient per a la seva interacció amb BAB1 i BAB2. Mitjançant deleccions de la proteïna es va veure que BIP2G75, una regió que va de l'aminoàcid 859 al 1091, era la regió mínima d'interacció de BIP2 amb BAB1 i BAB2. (Pointud et al. 2001).

GAGA: en un assaig de dos híbrids massiu, es va veure que GAGA i *dTAF3* podien interaccionar (Giot et al. 2003). Posteriorment la interacció *in vitro* de GAGA amb *dTAF3* es detectà amb assajos de 2 híbrids i d'experiments de GST *pull-down*, i la interacció es mapà en els primers 245 aminoàcids de la zona N-terminal de GAGA (els nostres resultats no diuen el mateix, veure resultats). La zona implicada de la interacció a *dTAF3* es troba entre els aminoàcids 612-1073. Immunoprecipitacions amb extractes nuclears de cèl·lules S2 i amb extractes larvaris, indiquen una possible interacció *in vivo* de GAGA i *dTAF3*. Estudis bioquímics i genètics suggereixen que TAF3 pot ser la molècula que permet l'activitat transcripcional del gen *Ultrabithorax (Ubx)* duta a terme per GAGA (Chopra et al. 2008).

Antennapedia: a partir d'un sistema de dos híbrids es veu que la regió de *dTAF3* compresa entre els aminoàcids 853-1088 interacciona *in vitro* amb la regió YPWM d'*Antennapedia (Antp)*. Mitjançant assajos de *pull-down* i coimmunoprecipitació es corrobora aquesta interacció tant *in vitro* com *in vivo*. *Antp* és un gen homeòtic en el qual el motiu YPWM i l'especificitat d'unió a DNA de l'homeodomini són necessaris per la transformació d'ull a ala. Utilitzant assajos de guany i pèrdua de funció s'observa que TAF3 interacciona genèticament amb *Antp* promovent el desenvolupament d'una ala dorsal ectòpica. TAF3 connecta *Antp* a la maquinària general de transcripció realitzant una funció coactivadora (Prince et al. 2008).

p53: mitjançant assajos de dos híbrids, s'ha vist que TAF3 interacciona amb el domini C-terminal de *p53*. Els aminoàcids de TAF3 responsables d'aquesta interacció, són els situats a la regió central de TAF3, entre els aminoàcids 738 i 924. *dTAF3* pot interaccionar també amb la *p53* humana, suggerint que els aminoàcids on s'uneix TAF3 estan conservats. Aquesta interacció TAF3-*p53* està evolutivament conservada. La sobreexpressió de *mTAF3* inhibeix l'activació transcripcional de *p53* en línies de cèl·lules humanes i disminueix també els nivells de la mateixa *p53*. TAF3 seria un regulador transcripcional negatiu de *p53* evolutivament conservat (Berezki et al. 2008).

A.4. GAGA

La proteïna GAGA de *Drosophila melanogaster* és una proteïna essencial a *Drosophila*, té un ampli espectre de funcions i està involucrada en diferents nivells de regulació de l'expressió gènica.

GAGA va ser descoberta en l'estudi de l'estructura del promotor d'*engrailed* (*en*) (Soeller et al. 1988). Es va veure, per assajos de *footprint* amb DNAsa I, que hi havia diverses regions riques en d(GA)_n protegides en aquest promotor. Es va demostrar que l'activitat responsable de la protecció de les seqüències riques en GAGAG modulava la transcripció *in vitro* d'*en*. Posteriorment, amb la cerca dels factors de transcripció capaços d'activar el promotor d'*Ubx* en extractes d'embrions, es purificà el factor responsable de la unió a seqüències riques en d(GA)_n a la zona promotora (Biggin et al. 1988). Aquest factor purificat, d'uns 67kD, que s'uneix a seqüències de tipus GAGAG i que és capaç d'activar el promotor *Ubx* selectivament *in vitro*, és el que s'anomena factor GAGA.

Posteriorment, es va trobar que el factor GAGA s'unia a les seqüències d(GA)_n presents en diferents promotors com en el cas d'*Antennapedia* (*Antp*) (promotor P2) (Perkins et al. 1988), *H3*, *H4*, *hsp26* i *hsp70* (Gilmour et al. 1989). A partir de l'estudi de la presència de seqüències riques en GA en els promotors es va veure que aquestes seqüències són necessàries pel correcte funcionament dels diferents promotors que les contenen, com per exemple, en els casos dels promotors *ecdysone-inducible E74* (Thummel 1989), *Actina 5C* (Chung et al. 1990), *even-skipped* (*eve*) (Read et al. 1990) i *Krüppel* (*Kr*) (Kerrigan et al. 1991).

En altres organismes, s'ha vist que hi ha seqüències GAGA en els promotors d'alguns dels seus gens i proteïnes que s'hi uneixen. Tot i que durant molts anys semblava que la proteïna GAGA, com a tal, només es trobava en insectes, molt recentment s'ha trobat el seu possible homòleg a vertebrats (Matharu et al. 2010).

A.4.1. Expressió de la proteïna GAGA

GAGA és una proteïna estrictament nuclear i ubiqua (Soeller et al. 1993) que es troba associada tant a eucromatina com a heterocromatina. En cromosomes politènics de glàndules salivals, es localitza en els braços dels cromosomes en un gran nombre de bandes d'eucromatina (Tsukiyama et al. 1994; Benyajati et al. 1997). Sorprenentment, també es troba associada a regions específiques d'heterocromatina durant la divisió cel·lular, a través de la interacció directa amb regions de DNA repetitiu ric en GA/CT (Raff et al. 1994; Kellum et al. 1995; Platero et al. 1998). La proteïna passa de trobar-se a l'eucromatina, durant la interfase, a

unir-se a les repeticions d(GA)_n heterocromàtiques de l'heterocromatina pericentromèrica durant la mitosi i torna a eucromatina un cop completada (Platero et al. 1998).

A.4.2. Un sol gen, *Trithorax-like*, i diverses proteïnes GAGA

El gen *Trithorax like* (*Trl*) codifica la proteïna GAGA de *Drosophila melanogaster* (Farkas et al. 1994). Està situat en el braç esquerre del cromosoma 3 (3L), la seva posició en el mapa citogenètic és 70F4-70F4 i la seva seqüència de localització és 3L:14,741,029..14,754,149 [-]. És un gen de còpia única (Soeller et al. 1993) i presenta efecte matern (acumulació de mRNA durant l'oogènesi) (Soeller et al. 1993; Bhat et al. 1996). Les mares aporten aquest mRNA de *Trl* als oòcits, i això indica que, GAGA és necessària en els primers estadis del desenvolupament. *Trl* es necessita pel correcte funcionament dels gens homeòtics i és un modificador del *position effect variegation* (PEV). El PEV és un fenomen de variegació causat per la inactivació d'un gen en algunes cèl·lules a través d'una juxtaposició anormal amb l'heterocromatina. Arran d'això hi ha una expressió variegada entre cèl·lules d'un mateix teixit degudes a diferències en els nivells d'expressió d'aquests gens situats dins o a prop de zones heterocromàtiques.

Inicialment, es va classificar *Trl* com un gen del grup *Trithorax* a partir de l'estudi de diferents mutants de *Trl* que comporten alteració de l'expressió de diferents gens homeòtics (Farkas et al. 1994). Els Mutants nuls per *Trl*, *Trl*^{R67} i *Trl*^{R85} es van generar per una excisió imprecisa d'un element P i la deleció del DNA d'una part de la unitat transcripcional de *Trl*, essent l'excisió més extensiva en el mutant *Trl*^{R85} (Farkas et al. 1994). Els mutants homozigots per *Trl*^{R85} no aconsegueixen desenvolupar-se més enllà del tercer estadi larvari, indicant, per tant, que el gen *Trl* és essencial pel desenvolupament. Aquests mutants nuls de GAGA poden sobreviure fins a larva 3 en absència de *Trl* zigòtic gràcies a l'efecte matern (Bhat et al. 1996) i presenten defectes en l'expressió d'alguns gens homeòtics, però no una afectació generalitzada de tots els homeòtics. Experiments amb clons cel·lulars de pèrdua de funció sobre els mutants *Trl*^{R85} demostren que GAGA és essencial durant l'embriogènesi per l'activació dels gens homeòtics però és dispensable durant el desenvolupament larvari a nivell de disc imaginal (Bejarano et al. 2004).

L'estudi del mutant *Trl*^{13C} que té un element P en el primer intró de *Trl*, ha mostrat que els homozigots *Trl*^{13C} són mosques amb una baixa viabilitat i són els únics mutants que poden arribar a adults. Presenten el fenotip d'ull rugós i tenen una fertilitat molt reduïda, els pocs embrions que ponen no poden progressar correctament (Farkas et al. 1994). Els embrions de mares *Trl*^{13C} tenen defectes en les divisions cel·lulars embrionàries tals com asincronia, problemes de condensació, segregació i fragmentació cromosòmica. Les mosques doble

Introducció

heterozigotes Trl^{13C} ; Ubx^{130} presenten uns halteris molt grossos, indicatius de l'alteració de l'expressió del gen homeòtic Ubx . Addicionalment, els mascles homozigots per Trl^{13C} que arriben a adults presenten una transformació homeòtica del segment abdominal A6 en el segment abdominal A5; apareixen pèls en el segment abdominal A6 indicatius de la pèrdua parcial de la funció d'*Abdominal B* (*Abd-B*). (Farkas et al. 1994). En altres gens, com els *pair-rule*, s'ha vist que també hi ha alteracions degut a la manca de GAGA. Els embrions de mosques heterozigotes per Trl^{13C} perden total o parcialment les bandes corresponents a *ftz* (*fushi tarazu*), i en el cas d'*en* també hi ha anormalitats en el patró d'expressió (Bhat et al. 1996). S'ha vist que Trl^{13C} és un *enhancer* dominant de PEV que promou l'heterocromatització. L'elevat nombre de fenotips associats als diferents mutants de *Trl* i la multitud de bandes que es troben a cromosomes politènics, suggereixen que la llista de gens regulada per GAGA podria ser considerable.

Inicialment, la purificació de GAGA per fraccionament bioquímic o per cromatografia d'afinitat mostrava la detecció de diferents polipèptids en gels SDS-PAGE amb patrons lleugerament diferents, depenent de la preparació dels extractes (Biggin et al. 1988; Soeller et al. 1993). Posteriorment, es va veure que *Trl* codifica dues isoformes majoritàries de 519 i 581 aminoàcids, $GAGA_{519}$ i $GAGA_{581}$ respectivament (veure figura A.11), que es generen per *splicing* alternatiu (Benyajati et al. 1997). La seqüència de la proteïna $GAGA_{519}$ resulta del processament de 4 exons que estan separats per tres introns de 2,2 kb, 118pb i 160pb. La seqüència de la proteïna $GAGA_{581}$ deriva de l'ús d'un lloc de processament alternatiu situat dins el quart exó de $GAGA_{519}$. Els transcrits d'ambdues classes comparteixen els 3 primers exons i la porció 5' del quart exó (Figura A.11) (Lintermann et al. 1998).

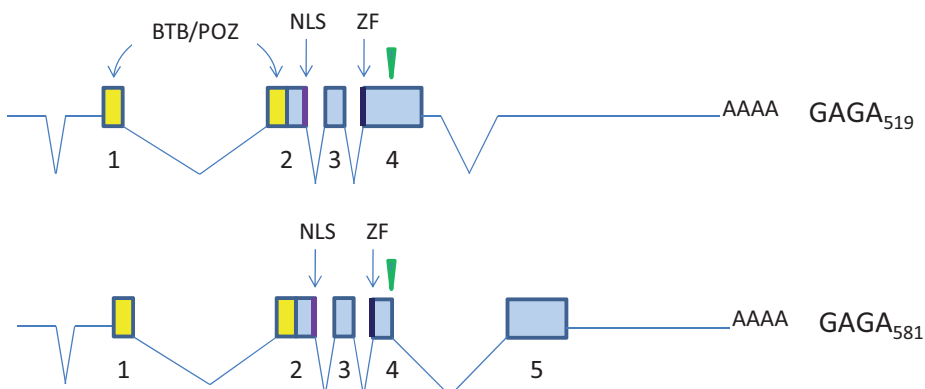


Figura A.11. Estructura dels transcrits que donen lloc a les dues isoformes $GAGA_{519}$ i $GAGA_{581}$. En groc es marquen els exons que codifiquen pel domini BTB/POZ. La línia lila indica el senyal de localització nuclear (NLS) i en blau fosc el dit de Zinc (ZF). Els números indiquen els diferents exons, i la fletxa verda indica el lloc de processament alternatiu que diferencia les dues isoformes. Adaptat de Lintermann et al. 1998.

Les dues isoformes que es generen difereixen en la llargada del seu domini C-terminal. Les dues isoformes poden formar complexos homomèrics i heteromèrics que s'uneixen específicament a seqüències GAGA *in vitro*. Només GAGA₅₁₉ presenta efecte matern i s'acumula durant les 6 primeres hores de l'embriogènesi. Posteriorment, GAGA₅₈₁ comença a acumular-se fins que a les 12 hores s'equiparen i estan presents de manera similar al llarg del desenvolupament. Les dues isoformes col·localitzen extensivament a les bandes eucromàtiques en cromosomes politènics i funcionen de manera similar en assajos de transfecció a cèl·lules en cultiu i en experiments *in vitro* de remodelació de cromatina (Benyajati et al. 1997).

Anàlisis fenotípiques de mosques transgèniques amb els cDNAs de les dues isoformes en fons mutants per *Trl*, indiquen que tenen funcions àmpliament solapades però no idèntiques. Els mutants homozigots nuls per *Trl* poden rescatar parcialment el fenotip de letalitat amb 4 còpies de GAGA₅₁₉ o GAGA₅₈₁, essent més efectiva en la isoforma GAGA₅₈₁. Hi ha fenotips que es poden recuperar amb una de les dues isoformes però no amb l'altra. GAGA₅₁₉ aconsegueix rescatar la transformació homeòtica del segment abdominal A6 en A5 que s'observa en mascles *Trl*^{13C}, pot recuperar el defecte de la baixa deposició d'ous de les mares homozigotes *Trl*^{13C} i pot rescatar parcialment la letalitat d'efecte matern d'aquests ous, mentre que GAGA₅₈₁ no és capaç de fer-ho. Per altra banda, els embrions *Trl*^{13C} que tenen problemes de divisió nuclear durant l'estadi de sincici blastodèrmic poden ser recuperats per GAGA₅₈₁ i dividir-se correctament en els embrions. La meitat d'aquests embrions, però, no progressen més enllà de larva 3, indicant que GAGA₅₁₉ és necessària i que GAGA₅₈₁ no pot equiparar-ne totes les funcions (Greenberg et al. 2001).

A.4.3. Modificacions posttraduccional de GAGA

A part de les dues isoformes majoritàries, GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁, en els gels electroforètics d'extractes de cèl·lules i embrions s'observen altres bandes (Biggin et al. 1988; Soeller et al. 1993). Aquestes bandes es poden atribuir a formes de GAGA modificades posttraduccionalment. Les modificacions posttraduccional són el conjunt de processos que modifiquen les proteïnes un cop s'ha finalitzat la seva síntesi, amb l'objectiu de contribuir al seu correcte plegament, a la seva activació, a la regulació de la seva activitat o localització dins la cèl·lula. Fins al moment, s'ha vist que GAGA pot estar O-Glicosilada (Jackson et al. 1988), fosforilada (Bonet et al. 2005) i acetilada (Aran et al. 2010).

S'ha vist que GAGA, igual com molts altres factors de transcripció, pot portar residus del tipus (GlcNAc). Es suggereix que la glicosilació té una funció important en el mecanisme i/o la regulació de l'activació transcripcional de proteïnes d'unió a seqüències de DNA específiques (Jackson et al. 1988).

Introducció

GAGA₅₁₉ és fosforilada *in vitro* per la quinasa CK2 a les serines S388 i en menor grau a la serina S378, aquestes dues serines formen part de la regió del domini d'unió a DNA (DBD). Aquesta modificació només s'ha identificat a GAGA₅₁₉ ja que les serines S378 i S388 no es troben a GAGA₅₈₁ i tampoc no existeix una seqüència consens per CK2 a la regió C terminal del dit de zinc de GAGA₅₈₁. Així doncs, la fosforilació per CK2 no és una propietat compartida per les dues isoformes i podria contribuir a la regulació diferencial de les dues isoformes. La fosforilació en aquesta regió modula la interacció reduint l'afinitat d'unió amb el DNA. La regió on es dona la fosforilació per CK2 és la regió on GAGA interacciona amb NURF i SSRP1 del complex FACT, ambdós, complexos remodeladors de cromatina (veure apartat A.5.7.B) (Bonet et al. 2005).

S'han mapat dues lisines, K325 i K373, a les regions bàsiques BR1 i BR3 del domini d'unió a DNA (veure apartat A.5.7.B) que poden ser acetilades per PCAF *in vitro*. S'observa que quan estan acetilades hi ha una reducció de l'afinitat d'unió de GAGA al DNA. Aquestes dues lisines estan molt conservades al llarg de les diferents espècies del gènere *Drosophila* i en tant que la seva mutació a glutamines, ja sigui per separat o en combinació no afecta la unió amb el DNA, s'ha suggerit que aquestes dues lisines no serien estrictament necessàries per la unió al DNA però sí per a la regulació de la interacció (Aran et al.2010).

A.4.4. Autoregulació del gen *Trl*

GAGA es coneix àmpliament com a activador transcripcional. L'únic cas descrit fins al moment en que GAGA actua com a factor repressor és en l'autoregulació del seu propi promotor. Assajos de *footprint* amb DNAsa I indiquen que el promotor de *Trl* té un elevat nombre de llocs d'unió per GAGA, suggerint un possible paper regulador de GAGA sobre el seu propi promotor. Experiments d'immunoprecipitació de cromatina CHIP (*Chromatin Immunoprecipitation*), confirmen que GAGA s'uneix a aquestes seqüències al llarg d'una regió de 1,4 kbp del promotor (veure figura A.12) (Kosoy et al. 2002).

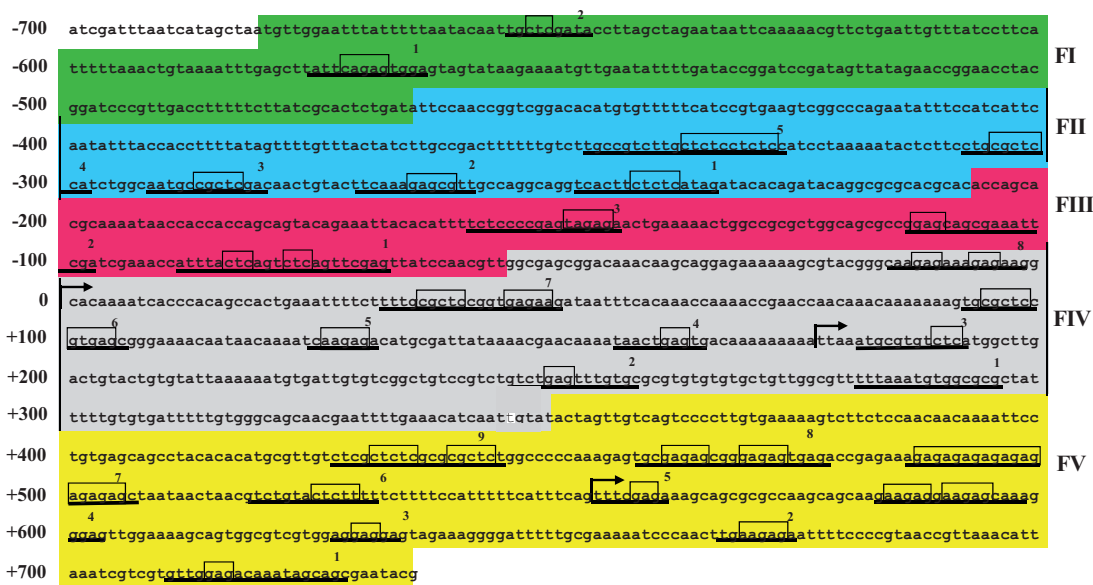


Figura A.12. Seqüència del promotor de *Trl*. Per l'estudi del promotor es va subdividir el promotor en 5 regions (FI-FV) marcades amb diferents colors. Les regions on s'uneix GAGA i es generen proteccions en el footprint de DNasa I estan subratllades i les seqüències GAGA dins les zones protegides estan enquadrades. Les fletxes indiquen tres llocs d'inici de la transcripció. (Kosoy et al. 2002).

Mitjançant transfecció transitòria a cèl·lules S2, la sobreexpressió tant de GAGA₅₁₉ com de GAGA₅₈₁ pot inhibir l'expressió del promotor de *Trl* de manera dosi dependent. A més, experiments de depleció de GAGA amb RNAi indiquen que GAGA limita l'expressió de *Trl* a cèl·lules S2. Fent deletions de la proteïna s'observa que els dominis POZ i Q de GAGA no són necessaris per la repressió. En canvi, la mutació puntual His361P, que altera el dit de zinc del domini d'unió a DNA (DBD), aboleix la capacitat de GAGA per unir-se al DNA i reprimir *Trl* indicant que la repressió depèn de la seva interacció amb el DNA (Kosoy et al. 2002).

Posteriorment, es va corroborar que, *in vivo*, GAGA també regula negativament el seu propi promotor gràcies a un sistema de retroalimentació negativa. Per entendre la repressió *in vivo* es van generar línies transgèniques del promotor de *Trl* fusionat a GFP i, utilitzant el sistema UASGAL4, es va sobreexpressar GAGA o un *hairpin* d'RNAi utilitzant diferents *drivers* GAL4. Tant a embrions com a discs imaginals de larva, en el domini on es sobreexpressa GAGA, es pot veure una davallada del senyal de GFP (veure figura A.13). Aquesta repressió apareix al llarg del desenvolupament de forma ubiqüa i de forma dependent de dosi. *In vivo*, la sobreexpressió de GAGA amb el domini Q deletionat, reprimeix correctament i, en canvi, la sobreexpressió d'una construcció amb la mutació puntual His361P al DBD no aconsegueix reprimir, tal i com ja s'havia vist anteriorment a cèl·lules. Per tant, la repressió té lloc *in vivo* a través de la interacció amb el DNA. Anàlogament, la reducció dels nivells de GAGA amb RNAi

Introducció

produeix una estimulació de la transcripció de *Trl*, just en els dominis on es redueix GAGA (Bernues et al. 2007).

L'expressió del gen *Trl* està altament regulada i és la pròpia GAGA la que manté l'expressió dins uns certs límits. L'alteració dels nivells de proteïna GAGA, tant per augment com per reducció, genera fenotips i defectes morfològics no relacionats entre si i posteriors a la regulació dels gens homeòtics. Els fenotips més severs apareixen amb la sobreexpressió de la proteïna, suggerint l'existència d'un llindar superior que no s'hauria de superar per tal d'evitar efectes deleteris. En aquest sentit l'autoregulació negativa de *Trl* podria jugar un paper determinant. La regulació de *Trl* és complexa i necessària per mantenir GAGA dins una homeòstasi cel·lular capaç d'evitar la desregulació del sistema. Actualment encara no es coneix el mecanisme pel qual GAGA és capaç de regular el seu propi promotor (Bernues et al. 2007).

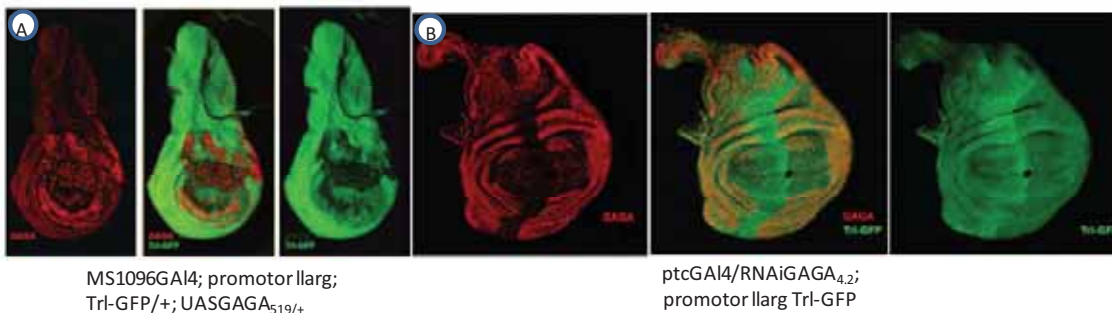


Figura A.13. Immunolocalitzacions que mostren la repressió de *Trl* deguda a la sobreexpressió de GAGA *in vivo*. Imatges obtingudes amb un microscopi confocal Leica TSC SP5. Discos imaginals d'ala de larva en tercer estadi tenyits amb α -GAGA (vermell) i α -GFP (verd). **A)** Disc imaginal d'ala de larva amb la construcció que porta el promotor llarg *Trl*-GFP i que sobreexpressa GAGA₅₁₉ sota el *driver MS1096*-GAL4. Allà on es sobreexpressa GAGA, es redueix l'expressió de GFP, indicant que GAGA *in vivo* reprimeix el seu propi promotor. **B)** Disc imaginal d'ala amb la construcció del promotor llarg *Trl*-GFP i que sobreexpressa l'RNAi contra GAGA, sota el control del *driver ptc*-GAL4. A la banda d'expressió de *ptc* hi ha una baixada de l'expressió de GAGA deguda a l'RNAi i un augment de l'expressió del promotor fusionat a GFP (Bernues et al. 2007).

A.4.5. GAGA, una proteïna altament conservada

S'ha vist que la proteïna GAGA està present al llarg de tot el gènere *Drosophila*. *D. melanogaster* s'allunya de *D. virilis* uns 60 milions d'anys en l'evolució (Beverley et al. 1984) i estudis comparatius d'ambdues espècies indiquen que el gen *Trl* està altament conservat entre elles (veure figura A.14) (Lintermann et al. 1998). Mitjançant hibridació *in situ* en cromosomes politènics de *D. virilis* es pot veure que el gen es localitza en el cromosoma 3, en la posició 36ED (Lintermann et al. 1998). S'infereix, mitjançant estudis de reordenació de gens, que el gen *Trl* de *D. melanogaster* i el de *D. virilis* estan localitzats en segments cromosòmics homòlegs (Neufeld et al. 1991; Kress 1993). Per tant, la localització física d'ambdós gens en les dues espècies també està altament conservada. D'altra banda, GAGA de *D. melanogaster* es troba a

l'heterocromatina pericentromèrica dels cromosomes mitòtics però no a *D. virilis* que no té DNA repetitiu ric en (GA/CT)_n en aquestes regions (Raff et al. 1994).

L'anàlisi genòmica dels gens *Trl* de les dues espècies revela una elevada correspondència de les seves estructures d'exons i introns. Les fronteres entre els exons codificants i els introns estan situades, exactament, a les mateixes posicions i els introns són de mida similar. A més, els patrons d'expressió dels transcrits específics d'isoforma són molt similars entre les dues espècies i, durant el desenvolupament, les seves abundàncies relatives s'assemblen molt als perfils d'expressió dels transcrits de GAGA (Lintermann et al. 1998). Es generen, també a *D. virilis*, dues proteïnes majoritàries semblants a les de *D. melanogaster*, la isoforma A que té 556 aminoàcids i un 76% d'identitat a GAGA₅₁₉ i la isoforma B que té 590 aminoàcids i un 85% d'identitat a GAGA₅₈₁. Tots els dominis tenen una considerable conservació sent al domini Q on es poden observar zones amb certa conservació però no de forma tant exhaustiva (veure figura A.14).

A



B

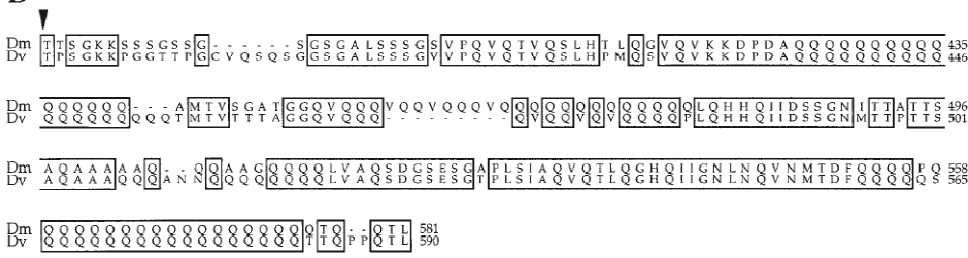


Figura A.14. Comparació de les seqüències aminoacídiques de les proteïnes GAGA de *D. melanogaster* i *D. virilis*. **(A)** Comparació entre GAGA₅₁₉ de *D. melanogaster* i la isoforma A de GAGA de *D. virilis*. **(B)** Comparació entre GAGA₅₈₁ de *D. melanogaster*, i GAGA isoforma B de *D. virilis*. Els triangles negres indiquen les posicions dels introns. Les zones amb residus idèntics estan emmarcades amb un requadre i el domini BTB/POZ, la possible NLS, el dit de Zinc i les regions bàsiques (BR1, BR2 i BR3) estan remarcats en negre. Els guions són gaps introduïts per a maximitzar l'alineament (Lintermann et al. 1998).

Introducció

Mitjançant transfeccions transitòries, s'ha vist que GAGA₅₁₉ de *D.melanogaster* i la corresponent isoforma a *D.virilis* són funcionalment equivalents pel que fa al mecanisme de repressió. Tant el factor GAGA de *D. melanogaster*, com el de *D. virilis* reprimeixen el promotor de *Trl* de les dues espècies, i ho fan tant a cèl·lules S2 de *D.melanogaster* com a cèl·lules WR DV1 de *D.virilis* (Piñeyro, D. Tesi doctoral 2009).

L'existència d'homòlegs de GAGA en altres organismes ha estat suggerida per la presència de seqüències GAGA implicades en la regulació en els promotors d'alguns dels seus gens. Aquestes seqüències es troben en diferents promotors de plantes com en la soja o el tabac (Frustaci et al. 1995; Sangwan et al. 2002; Santi et al. 2003) i animals com l'eriçó de mar (Melfi et al. 2000), la rata (Volpi et al. 2002), el ratolí (Bevilacqua et al. 2000), i fins i tot en humans (Kim et al. 2002; Volpi et al. 2002). Tanmateix, fins fa molt poc no s'havien trobat homòlegs de GAGA en altres organismes lluny dels insectes. Recentment però s'ha trobat el possible homòleg de GAGA a vertebrats. S'ha identificat c-Krox/Th-POK com a l'homòleg de GAGA en base a la semblança de seqüència i anàlisi comparativa d'estructura. La proteïna GAGA de vertebrats mostra una elevada similitud en la zona BTB i també a la zona del dit de zinc. L'anàlisi estructural del dit de zinc, *in silico*, indica que l'homòleg de GAGA a vertebrats té preferència per llocs GAGA, igual que ho fa la proteïna a *Drosophila*. S'han fet estudis d'immunoreactivitat creuada i immunoprecipitació que indiquen que les dues proteïnes estan conservades i que comparteixen un elevat grau de similitud estructural. *In vitro*, mitjançant assajos de mobilitat electroforètica (EMSA) s'ha vist que la GAGA de vertebrats és capaç d'unir-se a llocs rics en GA. Finalment, experiments de CHIP confirmen que la GAGA de vertebrats és capaç d'unir-se a zones de DNA riques en seqüències GAGA presents als clústers de gens hox (Matharu et al. 2010).

A.4.6. Dominis estructurals de GAGA

A partir de l'aïllament del cDNA de GAGA (Soeller et al. 1993), es va veure que GAGA constava de 519 aminoàcids, que tenia un domini BTB/POZ de 120 aminoàcids i un dit de zinc simple Cys₂-His₂ seguit d'un domini C-terminal Q, ric en glutamines (veure figura A.15) (Bardwell et al. 1994; Zollman et al. 1994).

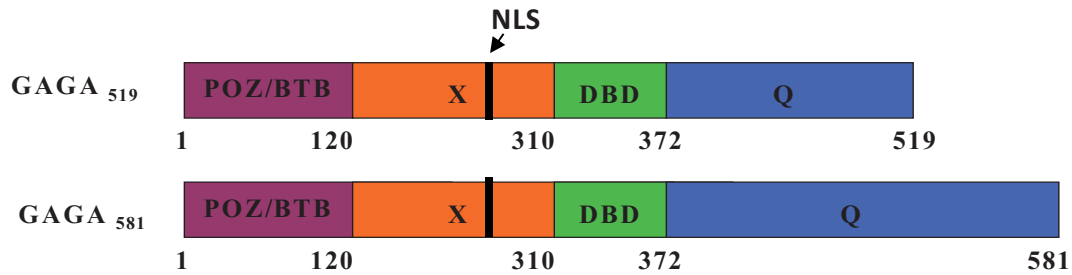


Figura A.15. Dominis estructurals de les proteïnes GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁. Es poden observar els dominis POZ/BTB, la regió X, el DBD i el domini Q. La fletxa indica un possible senyal de localització nuclear (NLS).

A.4.6.A. Domini POZ/BTB

Els primers dominis POZ (*Poxivirus and Zinc finger*) es van identificar per primer cop en proteïnes *poxivirus* (Upton et al. 1986). A *Drosophila*, el mateix tipus de domini es va anomenar també BTB (Broad-Complex, Tramtrack i Bric à Brac), ja que era comú en aquestes tres proteïnes (Godt et al. 1993). Aquest és un domini altament conservat evolutivament, des d'organismes virals fins als humans. Es troba en proteïnes amb elevat nombre de funcions diferents entre les quals es troben factors de transcripció, tant activadors com repressors. La majoria de les proteïnes amb dominis POZ es poden classificar en dos grups: el dels que presenten dit de zinc C₂-H₂ i un segon grup que de proteïnes que no s'uneixen a DNA, tenen similitud de seqüència i tenen un domini repetitiu carboxiterminal de funció no coneguda que inclou proteïnes de *poxivirus*, la proteïna *kelch* de *Drosophila* i T16H12.6 de *Caenorhabditis elegans*. La resta de proteïnes amb domini POZ no estarien incloses en cap d'aquests 2 grups (Bardwell et al. 1994; Albagli et al. 1995).

Normalment, el domini POZ està situat a la zona N-terminal de les proteïnes. La majoria de residus conservats dins aquest domini tenen caràcter hidrofòbic que facilita les interaccions proteïna-proteïna tant homomèriques com heteromèriques (Bardwell et al. 1994; Zollman et al. 1994; Albagli et al. 1995).

A GAGA el domini POZ comprèn els aminoàcids 1 a 120 i pot formar interaccions homomèriques entre isoformes iguals i heteromèriques entre les isoformes GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁ (Benyajati et al. 1997). *In vivo*, les seqüències GAGA es troben en els promotors dels gens agrupades formant *clusters*. GAGA pot unir-se simultàniament a elles de tal manera que l'oligomerització incrementa la seva afinitat i especificitat d'unió a promotors amb múltiples llocs GAGA. La transcripció dependent de GAGA depèn fortament del nombre de llocs GAGA presents al promotor (Espinàs et al. 1999; Katsani et al. 1999). Assajos de transcripció *in vitro* han demostrat que els oligòmers de GAGA són transcripcionalment actius i que, tot i que el domini POZ és prescindible per l'activació, es necessita per assolir la màxima activitat (Espinàs et al. 1999). Mitjançant microscòpia electrònica, s'ha observat que la unió dels oligòmers de

Introducció

GAGA genera una curvatura en el DNA. Això suggereix un possible paper de l'oligomerització a l'hora de permetre la comunicació entre elements molt allunyats en la seqüència (Katsani et al. 1999). De fet, s'ha descrit que GAGA facilita l'activació en trans entre *enhancers* distals i promotors, actuant com a proteïna pont que permet la comunicació. Aquesta funció depèn del domini POZ (Mahmoudi et al. 2002).

Gràcies a aquest domini, GAGA pot heteromeritzar amb altres proteïnes com ara Tramtrack, Pipsqueak, Batman (lola like) i Mod(mdg4).

Tramtrack 69 (Ttk 69): forma homodímers amb sí mateixa i pot interaccionar amb GAGA. Experiments d'immunoprecipitació indiquen que les dues proteïnes interaccionen a través dels seus dominis POZ (Bardwell et al. 1994; Pagans et al. 2002). Tramtrack reprimeix l'activació del promotor *eve* mediada per GAGA. (Pagans et al. 2002).

Pipsqueak (Psq): és una proteïna nuclear que conté domini BTB/POZ i és un important regulador del desenvolupament a *Drosophila*. Psq i GAGA presenten dominis d'unió a DNA molt diferents però, curiosament, s'uneixen al mateix tipus de seqüència (GA)_n, tot i que Psq requereix, *in vitro*, seqüències més llargues. Igual que en el cas de GAGA, la unió de Psq al DNA és específica de seqüència i és inhibida per la presència del domini BTB/POZ (Lehmann et al. 1998). Psq i GAGA s'ha vist que interaccionen a través del domini BTB/POZ en assajos de coimmunoprecipitació i *pull-down*. Les dues proteïnes tenen funcions altament relacionades, però que no idèntiques, ja que tots dos gens són essencials per a la mosca. Interaccions genètiques indiquen que GAGA i Psq actuen juntes en l'activació i silenciament dels homeòtics i els mutants de Psq presenten fenotips molt semblants als dels mutants de GAGA. La perfecta col·localització de les dues proteïnes en cromosomes politènics i mitòtics indica que totes dues podrien actuar juntes en gran nombre de loci (Schwendemann et al. 2002).

Batman (Ban) o lola like (Lolal): és una proteïna de 127 aminoàcids, 90 dels quals corresponen a un domini POZ. A través d'assajos de dos híbrids, *pull-down* i coimmunoprecipitació en extractes larvaris, s'ha descrit que GAGA és capaç d'interaccionar amb Ban essent el domini POZ de GAGA necessari però no suficient per aquesta interacció. Ban i GAGA col·localitzen a la perfecció en cromosomes politènics i, igual que en el cas de Psq, Ban també col·labora amb la regulació dels gens homeòtics (Faucheux et al. 2003; Mishra et al. 2003). De manera simplement especulativa, semblaria que Ban podria participar en la interacció de GAGA i Psq i els complexos PcG fent d'adaptador pel complex GAGA-Ban-Psq (GBP) (Lehmann 2004).

Mod(mdg4) (*modifier of mdg4*): la interacció genètica entre els mutants de *Trl* i *mod(mdg4)* i una col·localització parcial en cromosomes politènics suggeria, ja de bon principi, que les dues proteïnes podien interaccionar (Gerasimova et al. 1998). El gen *mod(mdg4)* igual que *Trl*, és *enhancer* de PEV. Mod(mdg4) també té domini POZ. El domini POZ de GAGA es pot substituir pel de Mod(mgd4) i la proteïna continua essent funcional en assajos de transfecció (Read et al. 2000) Experiments de coimunoprecipitació en cèl·lules S2 verifiquen la interacció entre GAGA i Mod(mdg4) i assajos de *pull-down* indiquen que la interacció és dóna a través dels domini POZ i Q de GAGA (Melnikova et al. 2004).

Entre les proteïnes que no tenen domini POZ però que interaccionen amb el domini POZ de GAGA es troben: SAP18, Corto i dTAF3/TAFII155.

dSAP18 (*Sin3-associated polypeptide 18KDa*): és un polipèptid associat al complex corepressor Sin3-HDAC. En assajos de *pull-down*, es veu que els 245 primers aminoàcids de GAGA, que formen part del domini POZ/BTB, i una petita part de la regió X, són necessaris i suficients per a la interacció amb dSAP18. A cromosomes politènics GAGA i dSAP18 col·localitzen en llocs discrets. Un exemple de lloc d'interacció és el complex bithorax (*BX-C*), on GAGA s'uneix a alguns llocs PRE. A través del reclutament del complex Sin3-HDAC, GAGA podria contribuir a la regulació de l'expressió dels homeòtics (Espinass et al. 2000).

Corto: el gen *corto* interacciona genèticament amb *Trl*. Experiments de *pull-down* i de dos híbrids mostren que la part N-terminal de Corto interacciona amb GAGA a través del domini POZ de GAGA. Existeix una petita col·localització a politènics d'ambdues proteïnes. Corto interacciona amb altres proteïnes PcG i podria servir de mediador per reclutar els complexos PcG (Salvaing et al. 2003).

dTAF3: és un dels TAFs del complex TFIID. En un assaig de dos híbrids massiu es va trobar que TAF3 i GAGA podien interaccionar *in vitro*. Posteriorment, la interacció entre GAGA i dTAF3 es localitza entre els aminoàcids 859 i 1091 de dTAF3 (veure apartat A.3.4) (Chopra et al. 2008).

A.4.6.B. Domini d'unió a DNA (DBD)

El domini d'unió a DNA o DBD (*DNA binding domain*) inclou els residus que van de l'aminoàcid 310 fins al 391. És un domini format per un dit de zinc Cys₂-His₂ flanquejat per 3 regions bàsiques anomenades BR1, BR2 i BR3.

Mitjançant assajos EMSA es va veure que un fragment de 82 aminoàcids, entre els residus 310 i 391, era suficient per la unió específica d'alta afinitat a seqüències GAGAGAG i és el que es considerà el domini d'unió a DNA. Aquest fragment consta de 2 regions bàsiques BR1 i

Introducció

BR2 situada a N-terminal, el dit de Zinc i una tercera regió bàsica BR3 a C-terminal del dit de zinc que no és estrictament imprescindible (veure figura A.16).

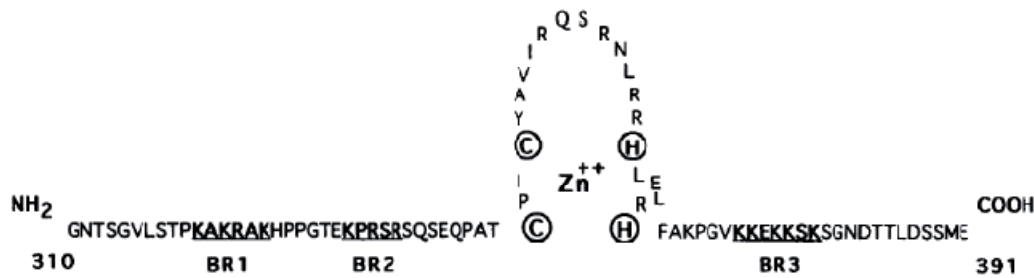


Figura A.16. Esquema del domini d'unió a DNA de GAGA (DBD). El dit de zinc es troba a la zona central i les dues cisteïnes i dues histidines que en formen part estan encerclades. Les tres regions bàsiques BR1, BR2 i BR3 que flanquegen dit de zinc, estan subratllades i en negreta. (Pedone et al. 1996).

Per ressonància magnètica nuclear (RMN) es va determinar l'estructura del complex entre el fragment mínim del DBD de GAGA (aminoàcids 310-372) i un oligonucleòtid de seqüència consens GAGAG (Omichinski et al. 1997). A la figura A.17, es poden veure definides les estructures secundàries del dit de zinc i s'observa que el dit de zinc s'uneix al solc major i reconeix les tres primeres bases GAG de la seqüència, de manera similar a com ho fan altres dits de zinc clàssics. A diferència dels dits de zinc que requereixen repeticions en tàndem, amb un mínim de dues repeticions per aconseguir una unió d'alta afinitat amb el DNA, el DBD de GAGA utilitza un sol el dit de zinc complementat amb dues regions bàsiques, BR1 i BR2 que ajuden a establir el complex. BR2 forma una hèlix que interacciona en el solc major reconeixent la última G de la seqüència consens, GAGAG i BR1 embolcalla el DNA pel solc menor i reconeix la A situada en la quarta posició dels nucleòtids de la seqüència, GAGAG (Omichinski et al. 1997).

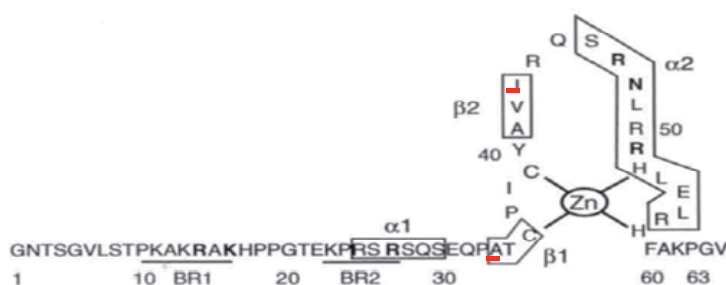


Figura A.17. Esquema dels aminoàcids del domini mínim d'unió a DNA. Les regions bàsiques BR1 i BR2 estan subratllades i les estructures secundàries enquadrades (Omichinski et al. 1997). En vermell hi ha marcats els dos aminoàcids diferencials de la resta de dits de zinc segons Dhanasekaran i col·laboradors (Dhanasekaran et al. 2007).

La seqüència consens mínima d'unió definida per Omichinski i col·laboradors (Omichinski et al. 1997) és una seqüència de 5 parells de bases, GAGAG però posteriorment es va demostrar que el trinucleòtid GAG era una seqüència suficient per unir GAGA *in vitro* (Wilkins et al. 1998). Assajos a nivell genòmic emprant *microarrays* (van Steensel et al. 2001), veuen que GAGA *in vivo* s'uneix a llocs eucromàtics rics en (GA)_n i que el trinucleòtid GAG no és suficient per la unió *in vivo*, a diferència del que s'havia vist *in vitro*, i confirmen que el pentanucleòtid GAGAG és el més habitual entre les seves seqüències d'unió (Sun et al. 2003; van Steensel et al. 2003). A nivell global s'observa que GAGA s'uneix preferentment a zones reguladores per sobre l'inici de transcripció (*upstream*), més que a les zones per sota (*downstream*). Es troba unida a les regions intròniques que presenten llocs GAGA que formen agrupacions, però es troba exclosa de les regions exòniques, malgrat presentin llocs GAGA propers en l'espai.

També cal remarcar interaccions de GAGA amb els complexos remodeladors de cromatina NURF (*Nucleosome Remodeling Factor*) i FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*) a través d'aquest domini.

Experiments de coimmunoprecipitació en extractes nuclears d'embrions indiquen que GAGA interacciona amb la subunitat NURF301 del complex NURF. Experiments amb diferents formes truncades de les isoformes de GAGA mostren que la regió d'interacció amb NURF és a la regió del dit de zinc i regions que el flanquegen, que inclouen les regions bàsiques i també la regió X (Xiao et al. 2001).

FACT és un heterodímer format per dsPT16 i dSSRP1 que s'associa amb GAGA, pot unir nucleosomes i facilita la remodelació. A través de *pull-down* es veu que GAGA interacciona amb la subunitat dssRP1 del complex FACT. La interacció es dona a través del DBD, pel dit de zinc i les regions adjacents. (Shimojima et al. 2003).

Aquestes unions de GAGA amb complexos remodeladors de cromatina són consistents amb la prèvia informació que el domini POZ/BTB i el domini Q no són necessaris per a l'activitat de remodelació de cromatina en extractes embrionaris (Agianian et al. 1999).

A.4.6.C. Regió X

La regió X, situada entre el domini POZ/BTB i el DBD, és una regió de funció i estructura encara desconegudes. En aquesta regió es troba un possible senyal de localització nuclear (NLS) de seqüència RKRKPRVKK entre els aminoàcids 209 i 217 (veure figura A.15) (Dingwall et al. 1991; Lintermann et al. 1998). En treballs no publicats s'ha observat que l'únic domini fusionat a GFP que li confereix localització nuclear en cèl·lules S2 transfectades transitòriament és el domini X i de fet, una delecció de la part N-terminal del domini X que inclou el possible NLS (GAGAΔ245) fa que la proteïna perdi la seva localització nuclear (Regué, L. i Bernués, J.). Se sap

Introducció

que aquesta regió participa, junt amb el domini DBD, en la interacció dels factors remodeladors de cromatina NURF (Xiao et al. 2001) i FACT (Shimajima et al. 2003) (veure apartat A.5.7.B). La zona de la regió X més propera al POZ/BTB interacciona, junt amb el domini POZ, amb la proteïna SAP18, un polipèptid associat al complex Sin3-HDAC (Espinàs et al. 2000).

Comparacions de seqüència entre dues espècies altament distanciades en l'evolució com són *Drosophila melanogaster* i *Drosophila virilis* indiquen una altíssima conservació dels aminoàcids d'aquesta regió. Hi ha una completa conservació al llarg d'uns 69 aminoàcids, especialment a la zona de la regió X més propera al domini POZ (Lintermann et al. 1998). Això indica, per tant, que si aquesta regió està tant conservada, ha de tenir una funció important que encara ara és desconeguda.

A.4.6.D. Domini Q

El domini Q es troba situat a la zona C-terminal de la proteïna. És un domini ric en glutamines i és la regió que diferencia les dues isoformes, essent més llarg i abundant en glutamines en la isoforma 581 (Benyajati et al. 1997).

Al domini Q se li atribueixen diferents propietats; pot unir tot sol DNA de cadena senzilla, tot i que ho fa amb menys afinitat que la proteïna sencera, produeix distorsió del DNA i pot formar tetràmers en solució (Wilkins et al. 1999). S'ha vist, a més, que Q és el domini responsable de la formació *in vitro* de fibres amb característiques amiloides amb capacitat d'unir-se als colorants Congo-Red i Tioflavina-T. Construccions sense el domini Q perden la capacitat de generar fibres però mantenen la capacitat de remodelar cromatina *in vitro* indicant que el domini Q no és necessari per l'activitat de remodelar cromatina (Agianian et al. 1999). Però el domini Q sí que resulta imprescindible per a l'activació de la transcripció. De fet, s'observa que el domini Q presenta una estructura modular *in vitro* i que pot actuar de forma independent de la resta de la proteïna. La deleció d'aquest domini aboleix la capacitat d'activar tant *in vitro* com *in vivo* (Vaquero et al. 2000).

A.4.7. Funcions de GAGA

A.4.7.A. GAGA com a factor activador de la transcripció

Els primers estudis de transcripció *in vitro* amb els promotors d'*en* i *Ubx* van demostrar que GAGA s'unia específicament a seqüències (GA)_n en aquests promotors i que era important per la seva transcripció (Biggin et al. 1988; Soeller et al. 1988; Thummel 1989; Chung et al. 1990; Read et al. 1990). Posteriorment, estudiant l'activació de *Kr* i *Ubx*, es suggeriria que l'activació no era deguda a una acció de GAGA com a activador transcripcional sinó com a factor antirepressor en certs extractes embrionaris (Kerrigan et al. 1991). Més tard, es va identificar la histona H1 com el repressor implicat. GAGA i altres activadors com Sp1 i Gal4-VP16 podien contrarestar els efectes repressors d'H1. D'aquesta manera, es van definir els conceptes d'activació i antirepressió com a dos fenòmens independents (Croston et al. 1991). L'antirepressió es va definir com a un fenomen general i comú a molts activadors transcripcionals que necessita, essencialment, el domini d'unió a DNA per alterar el complex H1-DNA, però que també requereix el domini activador (Croston et al. 1992). El fet que a GAGA també se li van atribuir funcions de remodelador de cromatina semblava reforçar la idea que GAGA funcionés com a antirepressor més que no pas com a activador real però, posteriorment, es va veure que l'activitat transcripcional de GAGA no necessàriament anava acompanyada d'una reorganització nucleosomal, sinó que les dues eren activitats independents. Això, va permetre separar les funcions activadores i antirepressores de GAGA (Pile et al. 2000).

GAGA com a activador transcripcional és capaç d'activar gràcies al seu domini Q ric en glutamines. Delecions del domini Q aboleixen l'activitat transcripcional de GAGA, tant *in vitro* com *in vivo*, de manera que la capacitat activadora de GAGA s'atribueix a aquest domini (Vaquero et al. 2000). Assajos de transcripció *in vitro* i assajos *in vivo* de transfecció transitòria proposen que GAGA actuaria estabilitzant el complex de preiniciació i promovent la reiniciació de la transcripció. La formació del PIC a priori abans d'afegir GAGA fa que no hi hagi activació i per tant, suggereix que GAGA es necessita inicialment en la formació dels complexos activats. L'estimulació de la transcripció per part de GAGA pot ser atribuïda a l'estabilització d'aquest complex de preiniciació. Totes aquestes propietats depenen del domini Q (Vaquero et al. 2008).

El domini Q és capaç d'activar amb l'ajut imprescindible d'un domini d'unió a DNA, ja sigui del domini DBD de GAGA en una situació natural o del domini GAL4DBD en construccions quimèriques (Vaquero et al. 2000). El domini POZ no és imprescindible per l'activació, però l'oligomerització de la proteïna a través d'ell, permet augmentar l'afinitat d'unió a DNA i genera un efecte cooperatiu que potencia l'efecte activador de GAGA, assignat al domini Q. L'oligomerització, a través del domini POZ, permet la interacció de regions promotores amb els

seus *enhancers* allunyats físicament en l'espai, arribant a permetre d'aquesta manera, fenòmens d'activació en trans entre dues construccions transfectades (Mahmoudi et al. 2002).

A.4.7.B. GAGA com a remodelador de cromatina

Durant l'estudi dels gens *heat shock*, *hsp70* i *hsp26*, es va veure que GAGA estava relacionada amb processos de remodelació de cromatina. Després de la inducció per xoc tèrmic, el factor HSF (*Heat shock factor*) trimeritza, es fosforila i s'uneix als promotors a les seves seqüències diana, els HSE (*Heat shock element*). HSF interacciona directament amb TBP i aquests dos factors s'uneixen cooperativament en els promotors *heat shock*, *in vitro*. Tot i que HSF és el responsable directe de l'activació dels gens de *heat shock*, GAGA sembla que estableix la unió de HSF amb el DNA (Mason et al. 1997).

Mitjançant experiments de *cross-linking* DNA-proteïna en cèl·lules S2 es va veure que en els promotors dels gens *heat shock* sense induir ja hi havia unida l'RNA Polimerasa II (Gilmour et al. 1986). Assajos de *run-on* van permetre veure que, en cèl·lules no induïdes, la polimerasa II s'unia, sintetitzava uns 25 nucleòtids i es quedava pausada sense poder avançar a l'espera de l'estímul de *heat shock* per continuar elongant. Aquesta situació de la polimerasa pausada sobre els promotors no induïts genera un estat del promotor "en espera" en el que la maquinària està preparada per poder continuar ràpidament la transcripció tot just hi hagi l'estímul de *heat shock*. Coincident amb la unió de HSF als HSE, la polimerasa escapa de l'estat pausat i procedeix a una elongació productiva. La detecció del complex post-iniciació de l'RNA polimerasa sobre la regió promotora del gen inactiu s'anomena PrPP (*promoter-proximal pausing*) i indica un control de la transcripció abans que comenci l'elongació (Rougvie et al. 1988). El fet que la polimerasa s'aturi just abans de l'elongació, sembla que podria ser una fase més, necessària per la transcripció de molts gens. GAGA, juntament amb altres factors, sembla estar estretament implicada en aquest procés (Lee et al. 2008). Així, estudis en el promotor d'*hsp70* mostren que mutacions en els llocs GAGA redueixen els nivells de polimerasa pausada (Lee et al. 1992). En el promotor *hsp26* es va veure que GAGA estava implicada en l'establiment i manteniment de llocs hipersensibles a la digestió amb DNAsa I generant una zona lliure de nucleosomes per deixar accessibles els HSE (Lu et al. 1993). La unió de GAGA sobre l'estructura reconstituïda *in vitro* de cromatina dels promotors *hsp70* i *hsp26* produïa una interrupció i una reorganització dels nucleosomes adjacents depenent d'ATP (Tsukiyama et al. 1994). Aquesta remodelació de nucleosomes en els promotors dels gens *heat shock* és necessària perquè l'RNA polimerasa II, el complex TFIID i HSF tinguin accés al promotor *in vivo* (Shopland et al. 1995; Weber et al. 1997). El responsable de la hidròlisi d'ATP en aquest fenomen remodelador de cromatina és el complex NURF (Tsukiyama et al. 1995) amb el que GAGA interacciona a través de la subunitat NURF301 (Xiao et al. 2001). L'efecte remodelador de nucleosomes de GAGA

també s'ha observat en el promotor de *ftz* i dóna lloc a una activació de la transcripció (Okada et al. 1998). GAGA i ISWI (la subunitat amb activitat ATPasa de NURF i altres complexos remodeladors) col·localitzen parcialment a bandes eucromàtiques en cromosomes politènics suggerint que l'acció combinada dels dos factors podria ser important en un cert nombre de gens, tot i que no semblen una parella obligatòria (Deuring et al. 2000).

Tot i que l'associació de GAGA amb els gens *heat shock* està restringida al promotor abans de la inducció, un cop induïda s'estén al llarg del gen coincidint amb la localització de l'RNA Pol II. Això suggereix que el paper de GAGA com a remodelador de la cromatina pot ser important també durant la fase d'elongació (O'Brien et al. 1995).

GAGA també s'ha vist que facilita la remodelació de cromatina mitjançant la seva interacció amb el complex remodelador de cromatina FACT a les regions reguladores d'*Ubx* i *Abd-B* (Shimajima et al. 2003).

Consistent amb una funció de remodelador de cromatina, GAGA també és un modificador de PEV (Farkas et al. 1994). El fet que GAGA es trobi unida als satèl·lits de l'heterocromatina centromèrica durant la mitosi ha suggerit podria ser necessària pel correcte empaquetament d'aquestes repeticions en els cromosomes mitòtics. (Platero et al. 1998). D'altra banda, els mutants de GAGA presenten defectes en la condensació i segregació cromosòmica (Bhat et al. 1996).

A.4.7.C. GAGA com a proteïna dels grups Trithorax i Polycomb

Durant el desenvolupament, la identitat dels segments dels metazous ve determinada per l'expressió dels gens homeòtics (*Hox*) (McGinnis et al. 1992). L'expressió dels gens homeòtics comença durant l'embriogènesi gràcies a l'acció dels gens *gap* i *pair rule*. Però, els productes dels gens de segmentació només estan presents durant l'embriogènesi i tanmateix l'expressió dels homeòtics es manté després de l'acció inicial dels diferents factors de transcripció. L'estat actiu o inactiu és memoritzat a través de l'estructura de la cromatina i és transmès a les cèl·lules filles al llarg de les divisions cel·lulars. Tot i que els mecanismes d'aquesta expressió epigenètica encara no estan clars, hi ha estudis genètics que identifiquen diversos gens en aquest procés (Kennison 1995) que es poden classificar en dos grups: el grup de gens *trithorax* (*trxG*), que són els principals responsables del manteniment de l'estat actiu i el grup de gens *Polycomb* (*PcG*), que són els responsables de mantenir l'estat inactiu. Aquests gens estan conservats evolutivament entre *Drosophila* i els vertebrats. Les proteïnes del grup Polycomb interaccionen amb el DNA mitjançant seqüències anomenades PREs (*Polycomb Response Elements*) i les proteïnes del grup trithorax s'uneixen a regions anomenades TRES (*Trithorax Response Elements*). Aquesta nomenclatura pot ser una mica difosa perquè en

Introducció

moltes ocasions les proteïnes TrxG i PcG comparteixen llocs d'unió de manera que les seqüències d'unió serien tant PREs com TREs (Chinwalla et al. 1995; Francis et al. 2001).

GAGA, inicialment, es va classificar com una proteïna TrxG a partir de l'estudi de mutants de *Trl* que afectaven l'expressió d'alguns gens homeòtics (Farkas et al. 1994). GAGA actua positivament sobre l'expressió de certs gens homeòtics, mantenint una estructura oberta de cromatina en diverses regions reguladores i activant l'expressió d'alguns d'ells. El complex *bithorax* (*BX-C*) comprèn una regió cis-reguladora de més de 300 kb i tres gens homeòtics, *Ubx*, *abd-A* i *Abd-B* (veure figura A.18) que són els responsables de les identitats dels parasegments 5-14 que formen la meitat posterior del tòrax i l'abdomen de la mosca. L'expressió precisa d'aquests gens en els seus parasegments és crucial per la generació d'una mosca amb una segmentació correcta. La seva desregulació genera transformacions d'uns segments en uns altres. Inicialment, la regulació de *BX-C* ve donada per gens *gap* i *pair rule* i, posteriorment, el manteniment ve donat per les proteïnes dels grups PcG i TrxG.

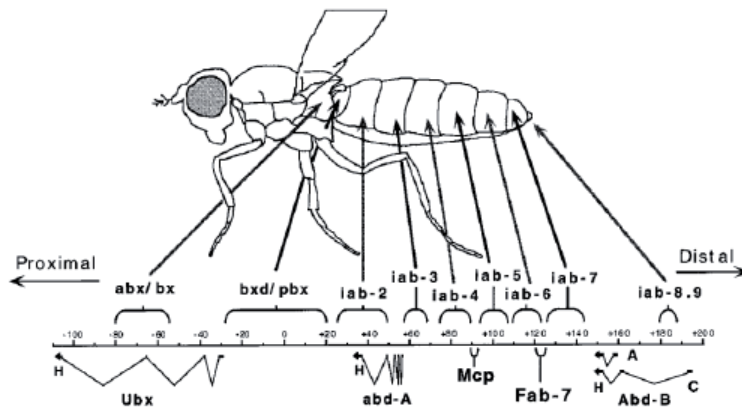


Figura A.18. Regió reguladora del complex *Bithorax*. Aquesta regió està formada pels gens *Ubx*, *abd-A* i *Abd-B*, i pels els dominis que regulen (Mihaly et al. 1998).

GAGA pot unir-se constitutivament a alguns PRE del complex *bithorax* (*BX-C*) que tenen seqüències d'unió de GAGA. Aquests PREs de *BX-C* s'ha vist que tenen una funcionalitat dual i poden comportar-se com a PREs i com a TREs. La col-localització propera de llocs GAGA amb llocs d'unió de Polycomb (Pc) indica que les dues proteïnes poden estar presents en les mateixes regions reguladores. Malgrat això, hi ha una gran diferència de distribució entre les dues proteïnes, Pc s'expandeix varies quilobases al voltant de les seqüències PRE per estabilitzar els complexos mentre que GAGA s'uneix estrictament als PREs a través de les seves seqüències consens. GAGA i Pc podrien ocupar els mateixos llocs bé perquè GAGA estigui unida constitutivament a llocs que serien necessaris per l'activació de *trxG* i funcionarien també com a TRE o bé perquè GAGA junt amb Pc participaria del silenciament de *PcG* (Strutt et al. 1997).

L'expressió del gen *Abd-B* es dona en parasegments (PS), i del parasegment 10 al 13 està regulat a través de diferents dominis reguladors. La regió reguladora d'*Abd-B* està doncs dividida en quatre dominis reguladors anomenats infraabdominals (*iab*). Els diferents dominis estan separats entre ells per les regions Frontabdominals (*Fab*), que són elements *boundary*, que defineixen i aïllen els diferents dominis. Una regió molt estudiada és la regió del *Fab-7* que es troba entre *iab-6* i *iab-7* i conté un element *boundary* i un element silenciador (veure figura A.19).

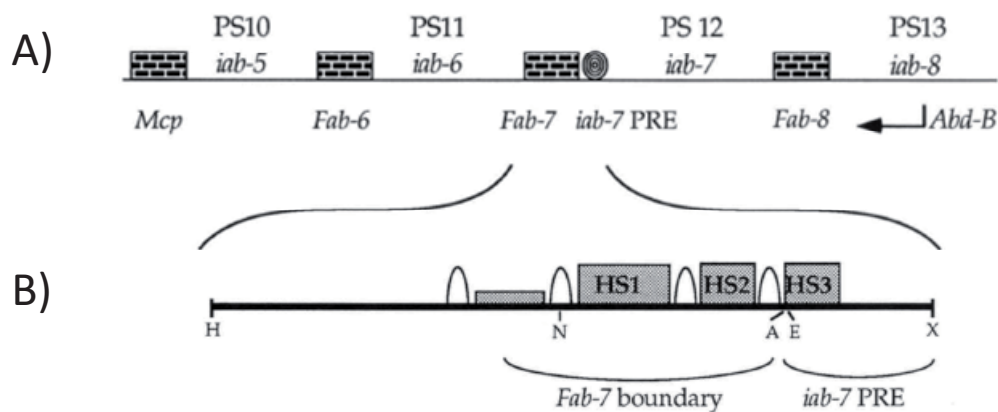


Figura A.19. Representació esquemàtica dels dominis reguladors del gen *Abd-B*. **A)** Els parasegments (PS) venen regulats pels dominis reguladors infraabdominals que van de *iab5* a *iab8*. Els elements *boundary* estan representats amb el dibuix d'un mur. La regió del *Fab7* es troba entre *iab6* i *iab7* i conté un element *boundary* i un element silenciador representat amb un cercle. **B)** Esquema ampliació de la regió del *Fab7* amb l'element *boundary* i l'element PRE silenciador. També hi ha marcades les regions hipersensibles a nucleasa (HSE) i els mig òvals representen els llocs d'unió dels nucleosomes. (Hagstrom et al. 1997).

Llocs GAGA presents a la regió hipersensible a nucleasa HS3, suggereixen que GAGA pot influenciar el funcionament del PRE de *iab-7* doncs les mutacions de *Trl* disminueixen el seu silenciament. GAGA és necessària per a la formació del lloc hipersensible a nucleasa, és a dir, per a la formació d'una estructura oberta de cromatina que permeti l'entrada de proteïnes PcG i el silenciament d'aquesta regió (Hagstrom et al. 1997; Mishra et al. 2001). Estudis en altres regions reguladores del gen *Abd-B* indiquen que el silenciament per PcG també depèn de GAGA. Així, a l'element silenciador MCP d'*Abd-B*, que també actua com un PRE i és necessari pel silenciament al llarg del desenvolupament, hi ha regions d'unió per Pho (Pleiohomeotic) i per GAGA que s'uneixen en aquests llocs *in vitro* i són essencials pel silenciament *in vivo* (Busturia et al. 2001). GAGA també reconeix els seus llocs d'unió al PRE de *bithoraxoid* (*bxd*) de la regió reguladora d'*Ubx* i permet el silenciament dependent de PcG (Horard et al. 2000). *Psq* també s'uneix a les mateixes seqüències d'aquest PRE (Hodgson et al. 2001).

Introducció

Mitjançant experiments d'immunoprecipitació s'ha trobat que GAGA pot formar part tant de complexos TrxG com PcG i que la unió dels complexos a alguns PRE depèn de GAGA (Poux et al. 2002).

La interacció de GAGA amb SAP18, proteïna que interacciona amb el complex Sin3-HDAC (Espinàs et al. 2000), així com la presència de GAGA, la desacetilasa dRPD3/HDAC1 i proteïnes PcG en un complex silenciador (Poux et al. 2001) van fer pensar que la col·laboració entre GAGA i PcG per la repressió d'alguns loci podria venir també determinada per un reclutament de desacetilases. Posteriorment, es va descriure una col·localització a cromosomes politènics de GAGA amb SAP18 i RPD3, a la regió del *Fab-7* del complex *bithorax* (*BX-C*). Mutants de *Trl*, *dsap18* i *drpd3/hdac1* afecten el silenciament de *Fab-7* i, a més, immunoprecipitacions de cromatina a embrions mostren una hipoacetilació de les histones H3 i H4 a *Fab-7*. Tots aquests resultats indiquen que GAGA, SAP18 i dRPD3/HDAC1 participen en el funcionament d'aquest element regulador (Canudas et al. 2005).

Mitjançant ChIP-on-Chip s'ha observat que GAGA col·localitza parcialment només amb Pc i Ph, suggerint que GAGA no és un component necessari als PREs (Negre et al. 2006).

A.4.7.D. GAGA als *insulators*

Els *insulators* són elements reguladors que estableixen dominis independents d'activitat transcripcional en els genomes eucariotes. Els *insulators* tenen una activitat (*enhancer-blocking*) que bloqueja la comunicació entre *enhancers* o silenciadors i promotors, de manera que aïllen la regió on es troben de les regions adjacents. Una segona activitat dels *insulators* és la que protegeix dels efectes positius i negatius de la cromatina propera a un gen. Aquesta activitat pot protegir els transgens d'efectes de posició actuant com una barrera per evitar l'expansió dels efectes repressius de l'heterocromatina (*barrier activity*). Mutacions en gens *trxG* incrementen els efectes dels *insulators* en *enhancers* adjacents i mutacions en PC tenen l'efecte contrari. Aquestes alteracions es correlacionen amb canvis en el patró de localització nuclear dels components dels *insulators*. Es va suggerir que, les proteïnes TrxG i PcG podien regular la funció *insulator* establint dominis d'elevat ordre d'organització de cromatina necessaris per l'ensamblatge d'*insulators* funcionals a la matriu nuclear (Gerasimova et al. 1998). GAGA participa en la regulació d'alguns gens actuant com a *insulator*. Així, GAGA és responsable del bloqueig de la comunicació entre un *enhancer* i el promotor d'*eve*, suggerint un paper de GAGA en la funció de l'element *insulator* d'aquest promotor. GAGA sembla que estabilitza les interaccions entre promotor i *enhancer* (Ohtsuki et al. 1998).

GAGA també és necessària pel funcionament de la funció *insulator* de *Fab-7* però no suficient per una total activitat *enhancer-blocking*. L'activitat *enhancer-blocking* endògena de *Fab-7* es redueix en mutacions de *Trl* (Schweinsberg et al. 2004).

L'*insulator* SF1 del complex ANT-C separa dos gens que es transcriuen de manera divergent, *ftz* i *Sex combs reduced* (*Scr*). SF1 conté un *cluster* de llocs GAGA conservats necessaris per bloquejar l'enhancer distal de *ftz* i així evitar l'activació del promotor *Scr*. L'activitat d'aquest *insulator* SF1 es veu disminuïda en fons mutants per *Trl* (Belozarov et al. 2003).

GAGA pot interaccionar tant *in vitro* com *in vivo* amb Mod(mdg4) que és un component necessari pel funcionament de l'*insulator* Su(Hw) (*Suppressor of hairy wing*). S'ha observat que si es col·loquen llocs GAGA entre un *enhancer* i l'*insulator* Su(Hw), es neutralitzen els efectes de l'activitat *enhancer-blocking* de l'*insulator*. Aquesta neutralització necessita de l'activitat de Mod(mdg4) i de GAGA. Es proposa que es podria formar un *loop* entre l'element que uneix GAGA i el que uneix Mod(mdg4), de manera que la interacció entre aquests dos elements cancel·laria l'activitat d'*enhancer blocking* de l'*insulator* Su(Hw) i restabliria la comunicació entre l'*enhancer* i el gen (Melnikova et al. 2004).

La interacció GAGA-FACT facilita la remodelació de cromatina i contribueix al manteniment dels gens homeòtics (Shimajima et al. 2003) dirigint la substitució de la histona H3 metilada en la lisina 9 per la variant H3.3 que es dona en certes regions *insulator*. Es pensa que d'aquesta manera es poden evitar els efectes de l'escampament de l'heterocromatina i per tant bloquejar l'expansió de l'heterocromatina a regions adjacents (Nakayama et al. 2007).

B. OBJECTIUS

En aquest treball ens vam proposar els següents objectius:

- 1) Intentar trobar relacions de la proteïna GAGA amb la maquinària general de transcripció per tal de poder conèixer els seus possibles mecanismes d'activació.
- 2) Reavaluar el paper de GAGA sobre gens diana prèviament descrits amb diferents aproximacions i en diferents contextos.
- 3) Realitzar un estudi funcional de les proteïnes GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁ mitjançant *microarrays* a disc imaginal.

C. MATERIALS I MÈTODES

C.1. Materials

C.1.1. Soques bacterianes d'*Escherichia coli*

Soques per a l'amplificació de plasmidis

DH5 α : *deoR endA1 gyrA96 hsdR17 (r_k-m_k+)* *recA1 relA1 supE44 thi-1* F'[traD36 proAB⁺ *lacI^q lac Z* Δ M15].

HB101: F⁻*supE44 hsdS20 (r_B- m_B-)* *recA13 ara14 proA2 lacY1 galk2 rpsL20 xyl-5 mtl-1*

Soca per a l'expressió de proteïnes

BL21 (DE3): B F⁻*dcm ompT hsdS (r_B-m_B) gal λ* (DE3). Derivada de la soca BL21. Conté una còpia cromosòmica del gen per la T7 RNA polimerasa.

C.1.2. Línies cel·lulars eucariotes

S2 (SL2): línia cel·lular derivada d'un cultiu primari d'embrions de *Drosophila melanogaster* en estadis tardans (20-24 hores) (Schneider 1972). Són cèl·lules d'aspecte esfèric que creixen tant enganxades a la superfície del recipient en que es troben com en suspensió.

HeLa: línia cel·lular d'origen humà, procedent de cèl·lules de carcinoma de cèrvix humà, cultivades inicialment per George O. Gey (Scherer et al. 1953). Tenen aspecte de cèl·lules epidèrmiques i creixen enganxades a la superfície del recipient on es troben, formant una monocapa.

C.1.3. Plasmidis

C.1.3.A. Plasmidis de clonatge

pBluescript II SK + (pBS SK+) (Stratagene): utilitzat com a pas intermedi de clonatge.

pBluescribe M13 (Stratagene): utilitzat com a pas intermedi de clonatge.

pBS SK+ BIP2: conté el cDNA de TAF3 (BIP2) Cedit amablement pel Dr. Jean-Louis Couderc.

pOT2-TAF4cDNA(Drosophila Genomics Resource): conté el cDNA de TAF4.

pBS SK+ BIP2G77: conté una part del cDNA de TAF3 (BIP2), un fragment que codifica de l'aminoàcid 757 fins al 1091 de la proteïna. Vam dissenyar 2 encebadors per tal de poder copiar el tros desitjat de BIP2 mitjançant PCR a partir del plasmidi pActppaBIP2FL. Un encebador, U-BIP2G77, es va dissenyar incloent una diana XbaI i un ATG. El segon encebador, L-BIP2G77 es va dissenyar amb un STOP i una diana HindIII. Vam fer PCR a partir de pActppaBIP2FL, es va purificar la banda amplificada i es va tallar la banda amb XbaI i HindIII. Vam obrir el vector pBS SK+ amb XbaI i HindIII. Seguidament es van lligar insert i plasmidi.

C.1.3.B. Plasmidis per a l'expressió de proteïnes a bacteris

pGEX-KG (Amersham-Pharmacia-Biotech): permet l'expressió a bacteris de proteïnes fusionades pel seu extrem N-terminal a la Glutació S-Transferasa (GST). També permet l'expressió de la pròpia GST.

pGEX-KG-GAGA₅₁₉: conté el cDNA de GAGA₅₁₉ fusionat en fase amb el cDNA de GST a N-terminal. Realitzat per la Dra. M^a Lluïsa Espinàs.

pGEX-KG-GAGA₅₁₉ΔQ: conté el cDNA de GAGA₅₁₉ sense el domini Q fusionat en fase amb el cDNA de GST a N-terminal. Vam digerir el plasmidi pet14bGAGA₅₁₉ amb NdeI al que vam fer rom i EcoRV per alliberar el tros del cDNA de GAGA sense el domini Q. Per una altra banda vam obrir el plasmidi pGEX-KG amb XhoI, vam fer els extrems roms i hi vam lligar el tros de cDNA de GAGA sense el domini Q.

pGEX-KG-X-BD: conté un petit tros del domini X i el domini d'unió a DNA (BD) del cDNA de GAGA. Vam digerir el plasmidi pET14bGAGA₅₁₉ amb BamHI i EcoRV, alliberant així el fragment de cDNA de GAGA₅₁₉ corresponent a un tros del domini X i el DNA BD. Per una altra banda vam obrir el plasmidi pGEX-KG amb BamHI i SmaI i vam fer SmaI rom. Vam lligar el tros de cDNA de GAGA al plasmidi pGEX-KG obert.

pGEX-KG-TTK69: conté el cDNA de TTK69 amb el cDNA de GST a N-terminal. Realitzat per la Dra. Sara Pagans (Tesi Doctoral, 2002).

pGEX-KG-POZTTK69: conté el cDNA corresponent al domini POZ de TTK69 amb el cDNA de GST a N-terminal. Vam digerir el plasmidi pGEX-KG-TTK69 amb EcoRI i Bpu1102I, alliberant així tot el cDNA de TTK69, a excepció de la seqüència que correspon al seu domini POZ. Finalment, vam relligar el plasmidi.

pET28a (Novagen): permet l'obtenció de proteïnes fusionades a una cua de 6 histidines en posició N-terminal.

pET28a BIP2G77: conté part del cDNA de TAF3 (BIP2), de l'aminoàcid 757 fins al 1091. fusionat al *tag* des 6 histidines (6 xHis) que es troba a N terminal. Vam tallar el plasmidi pBS SK+BIP2G77 amb XbaI, vam fer extrems roms i vam tallar amb XhoI per extreure el fragment. Al mateix temps vam tallar el vector pET28a amb HindIII, vam fer extrems roms i vam tallar amb XhoI. Finalment vam lligar insert i vector (extrems rom-Xho).

pET14b (Novagen): permet l'obtenció de proteïnes fusionades a una cua de 6 histidines en posició N-terminal.

pET14b-GAGA₅₁₉: conté el cDNA de GAGA519. Realitzat pel Dr. Emilio Jiménez (Tesi Doctoral, 1998).

pET14b-GAGA-DBD: conté el cDNA corresponent al DBD de GAGA, de l'aminoàcid 310 al 391. Realitzat pel Dr. Emilio Jiménez (Tesi Doctoral, 1998).

C.1.3.C. Plasmidis per a l'expressió de proteïnes a cèl·lules eucariotes

pCMV-β-gal (Stratagene): conté el cDNA de la β-galactosidasa sota el control del promotor de Citomegalovirus (CMV). Utilitzat com a control per a normalitzar els valors luciferasa obtinguts a les transfeccions transitòries.

pActppa: plasmidi d'expressió a cèl·lules de *Drosophila* que conté la regió promotora del gen Actina 5C de *Drosophila melanogaster*. Cedit pel Dr. Gerardo Jiménez.

pActppa-GAGA519: conté el cDNA corresponent a la isoforma GAGA₅₁₉ de *Drosophila melanogaster*. Generat pel Dr. Àlex Vaquero (Tesi Doctoral, 2000).

pActppaGAGA-L60E, pActppa-GAGA-D61N, pActppa-GAGA-E84Q, pActppa-GAGA-L87A pActppa-GAGA-L87E, pActppa-GAGA-L87D, pActppa-GAGA-L87I: totes les construccions contenen el cDNA corresponent a la isoforma GAGA₅₁₉ amb una mutació que genera un canvi de aminoàcid. Hem fet servir el kit de mutagènesi dirigida "*Quick Change[®] II Site directed mutagenesis kit*" (Agilent Technologies) per introduir la mutació corresponent (segons indica el nom de a cada construcció) al plasmidi pActppaGAGA. Els oligonucleòtids utilitats per introduir la mutació estan especificats en l'apartat C.1.4.

pActppa-BIP2: conté el cDNA corresponent a TAF3 (BIP2). Vam tallar la construcció pBS SK+BIP2FL amb NotI i Asp718 i fem els extrems roms. Per altra banda vam tallar el vector pActppa amb Asp718 i vam fer extrems roms. Finalment vam lligar vector i insert i posteriorment vam triar aquells clons que contenen la seqüència en la orientació correcta.

Materials i mètodes

pActppa-TAF4: a partir de la construcció pOT2-TAF4cDNA digerim per Sca I i Bgl II, per treure el cDNA de TAF4. Vam obrir el plasmidi pActppa amb els enzims EcoR V i BamH I. Finalment vam lligar vector i insert tenint en compte que Sca I i EcoRV són roms i Bam HI i BglII són cohesius compatibles.

pAc5.1/V5-His (A) (Invitrogen): plasmidi d'expressió a cèl·lules de *Drosophila*. Conté promotor de *Drosophila* Actina 5C (Ac5) que permet una elevada expressió constitutiva de gens d'interès en cèl·lules de *Drosophila* S2. El plasmidi conté a C-terminal un pèptid amb l'epítot V5 i un tag d'histidines (6xHis) per la detecció i purificació de la proteïna d'interès.

pAc5.1-BIP2FL-HA: conté el cDNA corresponent a TAF3 (BIP2) fusionat al *tag* HA. Generat pel Dr. Jordi Bernués.

pAc5.1-TAF4-HA: conté el cDNA corresponent a TAF4, fusionat al *tag* HA Generat pel Dr. Jordi Bernués a partir del constructe pActppaTAF4.

pcDNA3 (Invitrogen): conté el promotor de CMV. Utilitzat per expressar proteïnes a la línia de cèl·lules HeLa.

pcDNA3-GAGA₅₁₉: dissenyat per a expressar GAGA₅₁₉ sota el control del promotor CMV. Generat pel Dr. David Piñeyro (Tesi Doctoral, 2009).

pcDNA3-GAGA519ΔPOZ: dissenyat per a expressar, sota el control del promotor CMV, GAGA₅₁₉ sense els primers 122 aminoàcids a N-terminal, corresponents al domini POZ. Realitzat pel Dr. Jordi Bernués.

pcDNA3-GAGAΔQ: dissenyat per a expressar GAGA₅₁₉ sense el seu domini Q, sota el control del promotor CMV. Generat per David Piñeyro (Tesi Doctoral, 2009).

pcDNA3GAGAL87D: conté el cDNA de GAGA amb un aminoàcid mutat. Hi ha una substitució de la leucina 87 (L87) per àcid aspàrtic (D). Vam substituir un fragment de GAGA del vector pActppa-GAGA-L87D que contenia la mutació i el vam substituir pel mateix fragment salvatge de pcDNA3. Vam partir de la construcció pActppa-GAGA-L87D, vam tallar per EcoRI i BstEII per obtenir un fragment que contenia la mutació puntual. Per altra banda vam tallar el vector pcDNA3-GAGA també usant EcoRI i BstEII i vam purificar el vector, descartant l'insert. Finalment vam lligar l'insert EcoRI-BstEIII que contenia la mutació amb el vector pcDNA3 obert.

pcDNA3-TAF4 HA: conté el cDNA de TAF4 fusionat al *tag* HA. Està dissenyat per a expressar TAF4 HA sota el control del promotor CMV. Generat pel Dr. Jordi Bernués.

C.1.3.D. Plasmidis reporter

pGL3-Basic (Promega): conté el cDNA de la luciferasa de la cuca de llum (*Photinus pyralis*) com a gen *reporter*.

pGL3-eve: conté 1824 pb de la regió promotora de la banda 2 del gen *even skipped* (*eve stripe 2*) de *Drosophila melanogaster*. Generat per la Dra. Sara Pagans (Tesi Doctoral, 2002).

pGL3-Trl : conté el promotor de *Trl* de *Drosophila melanogaster* (prenent com a +1 l'inici de transcripció més distal): de -3470 a +737. Generat per la Dra. Ana Kosoy (Tesi Doctoral, 2002).

pGL3-skl: : conté un fragment de 676 pb (de -581 a + 95) del promotor de *skl* de *Drosophila melanogaster*. Generat pel Dr. Jordi Bernués.

pGL3-hsp70: conté un fragment que inclou dos promotors hsp70 de *Drosophila melanogaster* (453 pb cada un col·locats en sentit contrari). Generat pel Dr. Jordi Bernués.

C.1.4. Oligonucleòtids

Per a la realització d'aquest treball s'han utilitzat diferents oligonucleòtids sintetitzats per SIGMA que s'han fet servir com a encebadors per a PCR i RT-PCR. A la taula C.1 es mostren els noms de tots els oligonucleòtids emprats, la seva seqüència i els experiments on s'han fet servir.

Nom de l'oligonucleòtid	Seqüència de 5' a 3'	Experiment on s'ha utilitzat
U-BIP2G77	ACTGGTCTAGATGGCATGGGGAATCAC	Clonatge pBS SK+ BIP2G77
L-BIP2G77	CTTTTCTAAGCTTTTTTTGTCAATTC	Clonatge pBS SK+ BIP2G77
L60E-Upper	TCCCCCTTTCTGGAGGACTTGCTAAAGAATAC	Clonatge pActppaGAGAL60E
L60E-Lower	GTATTCTTTAGCAAGTCTCCAGAAAGGGGGA	Clonatge pActppaGAGAL60E
E84Q-Upper	CGATCTGCAGGCGCTGCTGGAGTTTGTG	Clonatge pActppaGAGAE84Q
E84Q-Lower	CACAACTCCAGCAGCGCTGCAGATCG	Clonatge pActppaGAGAE84Q
D61N-Upper	CTTCTGCTGAACCTTGCTAAAGAATACACCATGC	Clonatge pActppaGAGAD61N
D61N-Lower	GCATGGTGTATTCTTTAGCAAGTTCAGCAGAAAG	Clonatge pActppaGAGAD61N
L87E-Upper	CGATCTGGAGGCGCTGGAGGAGTTTGTGTACCG	Clonatge pActppaGAGAL87E
L87E-Lower	CGGTACACAAACTCTCCAGCGCTCCAGATCG	Clonatge pActppaGAGAL87E
L87A-Upper	CGATCTGGAGGCGCTGGCGGAGTTTGTGTAC	Clonatge pActppaGAGAL87A
L87A-Lower	GTACACAAACTCCGCCAGCGCTCCAGATCG	Clonatge pActppaGAGAL87A
L87D-Upper	CGATCTGGAGGCGCTGGACGAGTTTGTGTACCG	Clonatge pActppaGAGAL87D
L87D-Lower	CGGTACACAAACTCGTCCAGCGCTCCAGATCG	Clonatge pActppaGAGAL87D
L87I-Upper	CGATCTGGAGGCGCTGATCGAGTTTGTGTACC	Clonatge pActppaGAGAL87I
L87I-Lower	GGTACACAAACTCGATCAGCGCTCCAGATCG	Clonatge pActppaGAGAL87I
GAGA Up 365	TTACCAAGGACGACTACACC	RT-PCR
GAGA Low 780	GATCGGTGTGGATGATAGC	RT-PCR
GAGA ₅₈₁ Low 119	CCGGATCCTTCTTGACTTGC	RT-PCR
SkI Upper 220	ACTTTGAAGGACCTCCGTCTG	RT-PCR
SkI Lower 690	TATCACATTTGCGCTTATCC	RT-PCR
U6 up	GCTTCGGCAGAACATATAC	RT-PCR
U6 Lower wt	AATGTGGAACGCTTCACG	RT-PCR

Taula C.1. Relació dels oligonucleòtids utilitzats en aquest treball. Estan indicats els noms dels oligonucleòtids, les seqüències de 5' a 3' i l'experiment on s'han fet servir.

C.1.5. Anticossos

En aquest treball s'han utilitzat diferents anticossos. Tots els anticossos primaris i secundaris emprats s'indiquen a les taules C.2 i C.3, respectivament.

Anticòs primari	Característiques	Fabricant	Experiment en que s'ha utilitzat i dilució emprada
α -tubulina	Anticòs monoclonal de ratolí. Reconeix específicament la proteïna β -tubulina.	Chemicon International (Ref. MAB3408)	Western blot 1:10000 Immunoprecipitació: 2 μ g/ml
α - β -galactosidasa	Anticòs monoclonal de ratolí. Reconeix la proteïna β -galactosidasa d' <i>E.coli</i>	Promega (Ref: Z3781)	Western blot 1: 5000
α -His	Anticòs monoclonal de ratolí . Reconeix el tag His ₆ .	Amersham Biosciences (Ref: 27-4710-01)	Western blot 1:3000
α -HA	Anticòs monoclonal de rata (clon 3F10). Reconeix el pèptid HA de seqüència [YPYDVPDYA] de la proteïna humana hemaglutinina	Roche (Ref: 1867 423)	Western blot : 1:500
α -HA conjugat a agarosa	Anticòs monoclonal de ratolí (clon HA-7) contra el pèptid HA de l'hemaglutinina humana conjugat a agarosa	Sigma (Ref: A2095)	Immunoprecipitació: 2 μ g/ml
α -GAGA (rata)	Anticòs policlonal de rata. Reconeix totes les isoformes de GAGA de <i>Drosophila melanogaster</i> , així com les seves formes truncades	Generat en aquest treball	Western blot 1:2000 Immunolocalització 1:100
α -GAGA (conill)	Anticòs policlonal de conill. Reconeix totes les isoformes de GAGA de <i>Drosophila melanogaster</i> , així com les seves formes truncades	Generat al nostre laboratori	Western blot 1:4000 Immunolocalització: 1:600
α -TAF3 o BIP2	Anticòs policlonal de conill. Reconeix la proteïna TAF3 (BIP2) de <i>Drosophila melanogaster</i>	Generat en aquest treball	Western blot 1:5000 Immunolocalització 1:2000
α -TAF4 (3E12)	Anticòs monoclonal de conill. Reconeix la proteïna TAF4 de <i>Drosophila melanogaster</i>	Cedit pel Dr. Kevin Wright, Berkeley University of California	Western 1:100 Immunolocalització 1:20
α -TAF1 (30H9)	Anticòs monoclonal de conill. Reconeix la proteïna TAF1 de <i>Drosophila melanogaster</i>	Cedit pel Dr. Kevin Wright, Berkeley University of California	Immunolocalització 1:20
α -TBP (3C3)	Anticòs monoclonal de conill. Reconeix la proteïna TBP de <i>Drosophila melanogaster</i>	Cedit pel Dr. Kevin Wright, Berkeley University of California	Immunolocalització 1:20
α -RNA Polimerasa II (8WG16)	Anticòs monoclonal de ratolí. Reconeix les repeticions YSPTSPS del CTD de la RNA polimerasa II	Abcam (Ref: ab817)	Immunolocalització 1:20
α -RNA Polimerasa II phosphoser2 (H5)	Anticòs monoclonal de ratolí (H5). Reconeix la forma de la RNA polimerasa II fosforilada a la serina 2	Abcam (Ref: ab24758)	Immunolocalització 1:20
α -RNA Polimerasa II phosphoser 5 (H14)	Anticòs monoclonal de ratolí (H14). Reconeix la forma de la RNA polimerasa II fosforilada a la serina 5	Abcam (Ref: ab24759)	Immunolocalització 1:20
α -eve	Anticòs policlonal de conill. Reconeix proteïna even-skipped de <i>Drosophila melanogaster</i>	Cedit pel Dr. Manfred Frasch. The Mount Sinai Medical Center of New York	Immunolocalització 1:3000
α -en/inv (4D9)	Anticòs monoclonal de ratolí . Reconeix les proteïnes engrailed/invected de <i>Drosophila melanogaster</i>	Developmental Studies Hybridoma Bank (DHSB)	Immunolocalització 1:10
α -UBX (FP3.38)	Anticòs monoclonal de ratolí . Reconeix la proteïna Ultrabithorax de <i>Drosophila melanogaster</i>	Cedit per Dr. Rob White, Univesrity of Cambridge	Immunolocalització 1:10
α -skl	Anticòs policlonal de conill. Reconeix la proteïna sickle de <i>Drosophila melanogaster</i>	Cedit pel Dr E. Alnemri, Kimmel Cancer Institute. Philadelphia, USA	Immunolocalització: 1:600

Taula C.2. Relació dels anticossos primaris utilitzats en aquest treball. S'indica el nom de cada anticòs, les seves característiques, el fabricant o procedència de l'anticòs, el tipus d'experiment on s'han utilitzat i la dilució emprada a cada tipus d'experiment.

Materials i mètodes

Anticòs secundari	Característiques	Fabricant	Experiment en que s'ha utilitzat i dilució emprada
α -conill-HRP	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a la peroxidasa de rave (horseradish peroxidase, HRP)	Amersham Biosciences (Ref. NA 934)	Western blot 1:10000
α -rata-HRP	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de rata. Està conjugat a la peroxidasa de rave (horseradish peroxidase, HRP)	Jackson ImmunoResearch (Ref. 712-035-150)	Western blot 1:10000
α -ratolí-HRP	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de ratolí. Està conjugat a la peroxidasa de rave (horseradish peroxidase, HRP)	Jackson ImmunoResearch (Ref. 715-035-150)	Western blot 1:10000
α -conill-Cy2	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy2	Jackson ImmunoResearch (Ref. 111-225-144)	Immunolocalització 1:400
α -conill-Cy3	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy3	Jackson ImmunoResearch (Ref. 111-165-144)	Immunolocalització 1:400
α -conill-Cy5	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy5	Jackson ImmunoResearch (Ref. 111-175-143)	Immunolocalització 1:400
α -rata-Cy2	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy2	Jackson ImmunoResearch (Ref. 112-225-143)	Immunolocalització 1:400
α -rata-Cy3	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy3	Jackson ImmunoResearch (Ref. 112-165-143)	Immunolocalització 1:400
α -rata-Cy5	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy5	Jackson ImmunoResearch (Ref. 112-175-143)	Immunolocalització 1:400
α -ratolí-Cy2	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy2	Jackson ImmunoResearch (Ref. 115 225 146)	Immunolocalització 1:400
α -ratolí-Cy3	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy3	Jackson ImmunoResearch (Ref. 115 165 146)	Immunolocalització 1:400
α -ratolí-Cy5	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy5	Jackson ImmunoResearch (Ref. 115 175 146)	Immunolocalització 1:400

Taula C.3. Relació dels anticossos secundaris utilitzats en aquest treball. S'indica el nom de cada anticòs, les seves característiques, el fabricant o procedència de l'anticòs, el tipus d'experiment on s'han utilitzat i la dilució emprada a cada tipus d'experiment.

C.1.6. Soques de *Drosophila melanogaster*

En aquest treball s'han utilitzat diferents soques de *Drosophila melanogaster*. A la taula C.4 s'indiquen els diferents tipus de soca de mosca utilitzats, el cromosoma on es troba la construcció i les característiques de cada soca.

Soca	Cromosoma	Característiques
<i>lio</i> GAL4	II	Expressa Gal4 sota el control del promotor del gen <i>linotte</i>
<i>ptc</i> GAL4	II	Expressa Gal4 sota el control del promotor del gen <i>patched</i>
<i>prd</i> GAL4/TM3	III	Expressa Gal4 sota el control del promotor del gen <i>paired</i>
<i>dpp</i> GAL4/TM6B	III	Expressa Gal4 sota el control del promotor del gen <i>decapentaplegic</i>
<i>MS1096</i> GAL4	X	Expressa Gal4 sota el control del promotor MS1096
<i>Actina</i> GAL4/TM6B	III	Expressa Gal4 sota el control del promotor del gen <i>actina</i>
<i>69B</i> GAL4	III	Expressa Gal4 sota el control del promotor del gen 69B
<i>Tub</i> GAL80 ^{ts}	II,III	Expressa la proteïna GAL80 termosensible sota el control del promotor de <i>tubulina</i>
UAS-GAGA ₅₁₉	II,III	Expressa GAGA ₅₁₉ sota el control de llocs d'unió de Gal4
UAS-GAGA ₅₈₁	II,III	Expressa GAGA ₅₈₁ sota el control de llocs d'unió de Gal4
UAS-GFP	III	Expressa GFP sota el control de llocs d'unió de Gal4
UAS-RNAiGAGA	II, III	Expressa un hairpin per generar RNAi de GAGA sota el control de llocs d'unió de GAL4
UAS-RNAiGFP	II,III	Expressa un hairpin per generar RNAi de GFP sota el control de llocs d'unió de GAL4

Taula C.4. Soques de mosques emprades per als creuaments realitzats en aquest treball. S'indiquen el cromosoma i les característiques principals.

C.2. Mètodes

C.2.1. Mètodes de manipulació de DNA plasmídic

C.2.1.A. Tècniques de DNA recombinant

Per a l'obtenció dels clonatges realitzats en aquest treball s'han seguit les tècniques bàsiques de Biologia Molecular descrites per J.Sambrook (Sambrook et al 1989).

C.2.1.B. Preparació de soques bacterianes competents

La competència artificial d'una soca bacteriana és induïda al laboratori on les cèl·lules són convertides en permeables de forma passiva a través de condicions que normalment no ocorren a la natura. Les cèl·lules es refreden en presència de cations divalents Ca^{2+} (CaCl_2) que preparen les membranes cel·lulars per ser permeables al DNA plasmídic.

Es prepara un precultiu de 4 ml de medi LB, s'inocula amb bacteris procedents d'un glicerinat i es deixa tota la nit a 37°C amb agitació. En un *erlenmeyer* amb 200 ml de medi LB, s'afegeixen els 4 ml del precultiu i es deixa amb agitació a 37°C fins que la densitat òptica arriba a $\text{D.O}_{600} = 0,3$. Es refreda el cultiu en gel durant uns 20 min. Es reparteix el volum del cultiu en tubs de 50 ml i es centrifuga a 4°C durant 20 min a 2500 rpm. Es descarta el sobrenedant, es ressuspèn el sediment cel·lular amb 100 ml de CaCl_2 50 mM prèviament autoclavat i es deixa en gel 20 min. Es centrifuguen els tubs a 4°C, 20 min a 2500 rpm. Es descarta el sobrenedant i es ressuspenen les cèl·lules en 16 ml de CaCl_2 50 mM (15% glicerol) prèviament autoclavat. Es fan alíquotes de 250 µl en tubs de 1,5 ml i es guarden a -80°C (cal treballar en les màximes condicions d'esterilitat durant tot el protocol).

Medi LB (Luria-Bertani)

10 g/l triptona

5 g/l extracte de llevat

10 g/l NaCl

1 mM NaOH

C.2.1.C. Procés de transformació

La transformació de bacteris competents es refereix a un canvi genètic estable produït a l'incorporar DNA nu en bacteris competents (bacteris amb capacitat per incorporar DNA exogen).

S'afegeixen 1-20 µl de DNA plasmídic (generalment procedent d'una lligació) a 100 µl de cèl·lules competents i es deixa el tub durant 20 min en gel. Seguidament, es fa un xoc tèrmic de 2 min a 42°C en un bany d'aigua. Es recuperen les cèl·lules del xoc tèrmic afegint 300 µl de medi LB fresc sense antibiòtic i incubant el tub durant 30 min a 37°C (temps que tarden els bacteris a produir la resistència a l'antibiòtic). Finalment, utilitzant les màximes condicions d'esterilitat, amb una nansa de *Digralsky* es sembren 100 µl de la transformació en plaques de Petri que contenen, medi LB, 15 g/l d'agar i l'antibiòtic adient. S'incuben les plaques tota la nit en una estufa a 37°C per permetre el creixement de les colònies de bacteris.

C.2.1.D. Minipreparació de DNA

El DNA plasmídic present en els bacteris s'aïlla mitjançant un mètode ràpid i senzill anomenat "minipreparació alcalina ràpida". Consisteix en la lisi alcalina dels bacteris, la precipitació de DNA genòmic juntament amb les restes cel·lulars i finalment la precipitació del DNA plasmídic d'interès que no sedimenta amb el DNA genòmic. Per l'extracció de DNA bacterià s'inocula una colònia aïllada de bacteris transformats amb el plasmidi d'interès en un tub amb 4 ml de medi LB amb l'antibiòtic adequat. S'incuba el tub tota la nit a 37°C amb agitació constant. El dia següent, es passa 1 ml del cultiu a un tub d'1,5 ml i es centrifuga a 9000 rpm durant 1 min. Es descarta el sobrenedant amb una pipeta *Pasteur* i es ressuspèn el sediment en 100 µl de GTE vortexant. S'afegeixen 200 µl de solució de lisi al sediment, s'inverteix el tub 2 o 3 cops i es deixa en gel 5 min. S'afegeixen 150 µl d'acetat sòdic 3M pH 5.0, s'inverteix el tub 2 o 3 cops i es deixa en gel 5 min. Es centrifuga el tub 5 min a 14000 rpm i es passa el sobrenedant a un tub nou. S'afegeixen 450 µl de fenol/cloroform, es vortexa i es centrifuga 2 min a 14000 rpm. En aquest punt, dins el tub es generen dues fases. Es recupera la fase superior corresponent a la fase aquosa, on hi ha el DNA plasmídic, i s'afegeix 1 ml d'etanol absolut fred. S'inverteix el tub 2 o 3 cops i es centrifuga 5 min a 14000 rpm. Seguidament, es treu el sobrenedant i es renta el sediment amb 300 µl d'etanol 70% fred, centrifugant 3 min a 14000 rpm. Es descarta el sobrenedant i es deixa eixugar el sediment a 37°C. Finalment es ressuspèn el sediment en 50 µl de TE amb 1 µg d'RNAsaA i es deixa digerint amb l'RNAsaA durant 15 min a 37°C.

GTE	Solució de lisi	TE
50 mM glucosa	0,2 N NaOH	10 mM Tris HCl pH 8.0
10 mM EDTA	1% SDS	1 mM EDTA
25 mM Tris HCl pH 8.0		

C.2.1.E. Maxipreparació de DNA

Les maxipreparacions de DNA permeten obtenir DNA plasmídic de gran puresa en grans quantitats.

S'inoculen 500 ml de medi LB amb l'antibiòtic adient amb un precultiu de 6-10 hores de la soca bacteriana transformada amb el plasmidi que es vol amplificar. S'incuba tota la nit a 37°C en agitació constant. Es recull el cultiu en pots de 250 ml i es centrifuguen en una centrífuga Beckman® a 6000 g, 10 min. Es descarta el medi i es procedeix a l'extracció i purificació del DNA plasmídic amb el kit "*Plasmid Maxi Kit*" (Qiagen®), segons les instruccions del fabricant. El protocol del kit està basat amb el protocol de lisi alcalina, seguit de la unió del plasmidi a reïnes de bescanvi aniònic Qiagen®, sota condicions apropiades de sals i pH. L'RNA, les proteïnes i les impureses de baix pes molecular són eliminades mitjançant rentats amb un medi salí. El DNA plasmídic s'elueix en un tampó ric en sals i posteriorment es concentra i se n'elimina la sal mitjançant precipitació amb isopropanol i rentant posteriorment amb etanol 70%.

Després de realitzar els passos indicats pel fabricant del kit, un cop el DNA ja ha estat precipitat i rentat amb etanol de 70% es deixa assecar el sediment i es ressuspen en 500 µl d'aigua MilliQ. Per conèixer la concentració del DNA obtingut, cal diluir la mostra (normalment es dilueix 1:100) i llegir l'absorbància a 260 nm en un espectrofotòmetre *UV-1603* (Shimadzu). Es calcula la concentració de DNA segons la següent relació: $[DNA] = 50 \mu\text{g} / \text{ml} \times A_{260} \times \text{factor de dilució}$. Per comprovar la integritat i puresa del DNA es realitza una electroforesi de DNA.

C.2.1.F. Electroforesi de DNA en gel d'agarosa

L'electroforesi en gel d'agarosa permet separar, identificar i purificar DNA. Quan s'aplica un voltatge als extrems d'un gel, es genera un camp elèctric, la intensitat del qual ve donada per la longitud del gel i la diferència de potencial entre els extrems. Les molècules de DNA exposades al camp elèctric, migren cap a l'ànode o pol positiu, degut a la càrrega negativa dels grups fosfat del DNA.

Per a fer el gel, es pesa l'agarosa, es dilueix amb TBE 1X dins un erlenmeyer i es dissol en un microones. L'agarosa dissolta, s'aboca a la safata d'electroforesi i es col·loca la pinta per fer el pous del gel. Quan l'agarosa està solidificada, es treu la pinta i es posa la safata amb el gel dins la cubeta d'electroforesi plena amb tampó TBE 1X. Es col·loca la mostra de DNA amb

solució Orange G dins els pous del gel i en un dels pous es situa un marcador de pes molecular que permet identificar la mida de les bandes de DNA de les mostres. Es fa córrer el gel a 100 V i quan es considera que el DNA ha avançat prou, es posa el gel dins una solució de bromur d'etidi (BrEt) 0,5 µg/ml dissolt en aigua durant 15 min en agitació. Es renta el gel durant 15 min en aigua destil·lada. Per detectar el DNA cal observar el gel sota un transil·luminador de llum ultraviolat (UV). El bromur d'etidi és un agent intercalant de DNA que permet marcar els àcids nucleics i quan s'exposa a llum UV, emet llum vermella-ataronjada que s'intensifica unes 20 vegades després d'haver-se unit al DNA.

<u>TBE (10X)</u>	<u>Solució Orange G</u>
90 mM Tris base	50 % glicerol
24 mM EDTA	20 mM EDTA
0,8 M àcid bòric	0,02 % Orange G (Sigma)

C.2.2. Mètodes de treball amb cèl·lules en cultiu

C.2.2.A. Manteniment de cultius cel·lulars de *Drosophila*

La línia cel·lular de *Drosophila* S2 es manté en medi Schneider (*Schneider's insect Medium*, Sigma) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (FBS, GIBCO[®]) inactivat prèviament 30 min a 56 °C, i un 1% de penicil·lina/estreptomicina (GIBCO[®]). Les cèl·lules es mantenen en flascons de cultiu Corning[®] de 25cm² a una densitat entre 1-8·10⁶ cèl·lules/ml, en una estufa a 25°C i sense font de CO₂. Dos cops per setmana, es passa 1 ml de cèl·lules d'un flascó crescut, a un altre flascó de cultiu, amb 4 ml de medi nou (dilució 1:5). No és necessari tripsinitzar les cèl·lules S2, ja que aquestes són semiadherents i es desenganxen fàcilment amb la pipeta.

C.2.2.B. Manteniment de la línia cel·lular HeLa

La línia cel·lular HeLa es manté en medi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO[®]) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (FBS, GIBCO[®]) i un 1% de penicil·lina/estreptomicina (GIBCO[®]), en una estufa a 37°C en atmosfera humida, amb un 5% de CO₂. Aquestes cèl·lules creixen adherides a la superfície del flascó de cultiu en forma de monocapa, es mantenen fins que arriben a un 70-80% de confluència, moment en el qual es tripsinitzen i es passen a un flascó nou diluint-les 1:10 en medi nou. Per tripsinitzar-les, s'aspira el medi de cultiu amb una pipeta *Pasteur* de vidre connectada a una bomba de buit eliminant així les cèl·lules en suspensió (mortes), es fa un rentat de les cèl·lules amb PBS 1X estèril, s'aspira el PBS 1X i s'afegeix tripsina-EDTA (esterilitzada per filtració) afegint el volum necessari

Materials i mètodes

per a cobrir les cèl·lules. Es deixa actuar la tripsina-EDTA 2 min a 37°C perquè desenganxi les cèl·lules. Finalment, s'afegeixen de 10 a 20 volums medi per a neutralitzar la tripsina i es passa el volum necessari de cèl·lules a un flascó amb medi nou.

PBS 1X	TD (500 ml)	Tripsina-EDTA (20 ml)
124 mM NaCl	17,125 ml NaCl 4M	18,6 ml TD
17 mM Na ₂ HPO ₄	625 µl KCl 4M	1 ml Tripsina 0,5 %
8 mM NaH ₂ PO ₄	0,087 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,4 ml EDTA 25 mM
pH 7.3	10 ml Tis-HCl 1M	
	pH 7.4	

C.2.2.C. Congelació de cèl·lules

Es recullen les cèl·lules d'un flascó de 175 cm² creixent en fase exponencial i es centrifuguen 5 min a 200 g en un tub de 15 ml. S'elimina el sobrenedant i es renta 2 cops el precipitat amb PBS 1X estèril. Es descarta el sobrenedant i es ressuspenen les cèl·lules en 900 µl d'FBS, GIBCO[®]. Es posen les cèl·lules en un criotub i s'afegeixen, gota a gota, 100 µl de DMSO (Dimetilsulfòxid). El procés de congelació de les cèl·lules ha de ser un procés gradual. El primer pas és posar el criotub a -20 °C de 2-4 hores, seguidament cal passar el criotub al congelador a -80°C i deixar-lo tota la nit. Finalment, es guarda el criotub en un tanc amb nitrogen líquid.

C.2.2.D. Descongelació de cèl·lules

Es descongela ràpidament un criotub amb cèl·lules procedent del tanc de nitrogen líquid. Es passen les cèl·lules a un tub de 15 ml que conté 5 ml de medi de cultiu. Es centrifuga el tub 5 min a 200 g, es descarta el sobrenedant i es realitza un segon rentat amb medi nou. Finalment, es ressuspenen les cèl·lules en 5 ml de medi de cultiu nou, es passen a un flascó de cultiu de 25 cm² i es deixa el flascó a l'estufa.

C.2.2.E. Comptatge de cèl·lules

Per comptar cèl·lules s'utilitza una cambra de *Neubauer* BLAUBRAND[®], adaptada al microscopi de camp clar o al de contrast de fases. A la cambra de *Neubauer* hi ha 2 quadrícules iguals, cada quadrícula és un quadrat de 3 x 3 mm, amb una separació entre dos línies consecutives de 0.25 mm (veure figura C.1). Així doncs, l'àrea enfosquida i marcada L de la figura C.1, està dividida amb 16 quadrats i aquesta àrea correspon a 1 mm². La depressió central del cobreobjectes està enfonsada 0.1 mm respecte la superfície, de manera que quan es cobreix amb un cobreobjectes, aquest dista de la superfície marcada 0.1 mm, i el volum comprès entre la superfície L i el cobreobjectes és de 0.1 mm³, és a dir, 1 x 10⁻⁴ ml.

Per fer el comptatge cel·lular, cal posar 10 μl de cèl·lules a la quadrícula de la cambra de *Neubauer*. Es compten les cèl·lules de cada zona enfocada L, quadrícula de 4 x 4 (16 quadrats) i es fa el promig de totes les zones L. Per conèixer la concentració de cèl·lules, s'ha de multiplicar la mitjana del nombre obtingut de cèl·lules que hi ha en un quadrat 4 x 4 (16 quadrats) per 10^4 . S'obté, d'aquesta manera, el nombre de cèl·lules per mil·lilitre de medi.

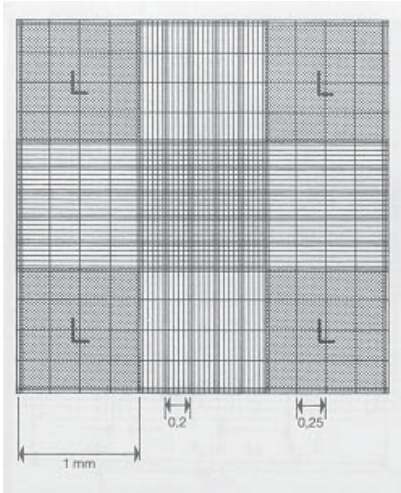


Figura C.1. Esquema de la quadrícula d'una cambra de *Neubauer*

C.2.2.F. Transfecció pel mètode del fosfat càlcic

El mètode de transfecció amb fosfat càlcic facilita l'entrada de DNA a les cèl·lules mitjançant la formació de precipitats de DNA-fosfat.

A partir de flascons de cultiu de 175 cm^2 , es desenganxen les cèl·lules i es compten utilitzant una cambra de *Neubauer*. Per a cada transfecció s'inoculen $3 \cdot 10^6$ cèl·lules per placa de cultiu de 60 mm^2 (Corning [®]) en un volum final de 5 ml i s'incuben 24 hores a 25°C. Es transfecta sempre un total de 20 μg de DNA per placa. El DNA que es transfecta ha de ser DNA obtingut a partir de maxipreparacions amb el kit de Qiagen [®], per tal que sigui un DNA el més pur possible. Es posen els microlitres necessaris de cada plasmidi que cal transfectar (un total de 20 μg) en un volum final de 50 μl . Com que cada transfecció es fa per duplicat, les barreges s'escalen a 2,5 transfeccions. Es col·loquen les quantitats adequades de cada plasmidi, afegint, si fa falta, plasmidis buits per arribar als 20 μg de DNA, i s'ajusta el volum a 125 μl (50 μl x 2,5 transfeccions) amb H_2O estèril. A la barreja de plasmidis i aigua s'afegeix 1 ml de CaCl_2 0,25 M (esterilitzat per filtració). S'afegeix aquesta barreja gota a gota a un tub de 15 ml mentre es vortexa el tub de 15 ml, al qual prèviament se li ha afegit 1 ml de HeBs 2X (esterilitzat per filtració). Es produeixen d'aquesta manera uns petits precipitats d'aspecte blanquinós. S'incuben els precipitats 35 min a 25°C i un cop passat el temps, es ressuspenen els precipitats pipetejant diverses vegades. S'afegeixen 850 μl d'aquesta barreja a cada placa, gota a gota i

Materials i mètodes

procurant escampar-ho homogèniament. Posteriorment, es deixen les plaques a 25°C. Per a les transfeccions transitòries, generalment, s'incuben les plaques 48 hores a 25°C.

Hebs 2x: 250 mM NaCl, 9 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 10 mM D-Glucosa, 50 mM HEPES, pH 7.1

C.2.2.G. Preparació d'extractes per a assajos d'activitat luciferasa i β -galactosidasa

Per obtenir els extractes pels assajos luciferasa i β -galactosidasa, un cop passat el temps necessari després de la transfecció (generalment 48 hores), es recullen les cèl·lules i es centrifuguen en tubs de 15 ml a 400 g. Es renten els sediments cel·lulars dos cops ressuspenent-los en 5 ml de PBS 1X i es centrifuguen a 400 g. Després del segon rentat es ressuspenen el sediments cel·lulars amb 1 ml de PBS 1X, es passa el volum a tubs de 1,5 ml i es centrifuguen els tubs 5 min a 400 g. Seguidament, es ressuspenen els sediments cel·lulars en 250 μ l del tampó de lisi del kit " *β -Gal reporter gene assay*" (Boehringer-Manheim) i s'incuben els tubs 30 min a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, es centrifuguen els lisats 5 min a 14000 rpm. Es transfereixen els sobrenedants a tubs de 1,5 ml i es mantenen en gel per continuar amb els assajos d'activitat luciferasa i β -galactosidasa.

C.2.2.H. Assaig d'activitat luciferasa

L'enzim luciferasa catalitza una reacció on usant ATP i Mg²⁺ com a co-substrats, la luciferina és oxidada a oxoluciferina. Aquesta reacció produeix llum i la detecció d'aquesta llum és un molt bon molt indicador de la quantitat d'enzim luciferasa dels extractes.

Per a realitzar l'assaig luciferasa, s'afegeixen 25 μ l de reactiu luciferasa diluït 1:2 del kit "*Luciferase assay*" (Promega) en tubs de poliestirè de 3 ml. Sempre cal atemperar el reactiu, protegint-lo de la llum, uns 15-30 min abans de realitzar l'assaig. S'afegeixen 15 μ l de cada extracte (provinents de la lisi amb el tampó de lisi del kit " *β -Gal reporter gene assay*", Promega) i es mesura la seva activitat luciferasa en un luminòmetre *Sirius* (Berthold). Per a reduir els errors deguts al pipeteig, cal realitzar la medició de cada mostra per duplicat, tenint en compte després la mitjana d'aquests valors.

C.2.2.I. Assaig d'activitat β -galactosidasa

S'afegeixen 100 μ l de reactiu substrat del kit " *β -Gal reporter Gene Assay*" (Promega) en tubs de poliestirè de 3 ml. A continuació s'afegeixen 50 μ l de cada extracte, es cobreixen els tubs amb Parafilm[®] per evitar l'evaporació i s'incuben els tubs 1 hora a temperatura ambient. Finalment, s'afegeixen 50 μ l del reactiu d'iniciació del kit i es mesura l'activitat β -galactosidasa en un luminòmetre *Sirius* (Berthold). Per a reduir els errors deguts al pipeteig, cal realitzar la medició de cada mostra per duplicat, tenint en compte després la mitjana d'aquests valors.

C.2.2.J. Anàlisi del cicle cel·lular

Per fer l'anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux, primerament cal fixar les cèl·lules amb etanol i seguidament marcar-les amb iodur de propidi. La tinció amb iodur de propidi proporciona informació sobre el contingut de DNA i permet distingir i quantificar, mitjançant la utilització d'un citòmetre de flux, la distribució de cèl·lules al llarg de les diferents fases del cicle cel·lular.

Fixació de cèl·lules amb etanol: es prepararen 4,5 ml d'etanol al 70% en tubs de 5 ml i es deixen en gel perquè estiguin els tubs freds. Es recullen 10^6 - 10^7 cèl·lules en un tub amb 5 ml de PBS 1X. Es centrifuguen les cèl·lules 5 min a unes 200 g. Es ressuspèn el sediment cel·lular amb 0,5 ml de PBS 1X amb una pipeta *Pasteur* i es barregen amb l'etanol 70% fred. Es mantenen les cèl·lules en contacte amb el fixador un mínim de 2 hores.(nosaltres vam deixar fixant durant tota la nit).

Marcatge amb iodur de propidi: es centrifuguen les cèl·lules amb l'etanol 70% durant 5 min a 200 g. Es decanta l'etanol i les cèl·lules es ressuspèn en 5 ml de PBS 1X. S'espera 1 min i es centrifuguen els tubs 5 min a 200 g. Es ressuspèn el sediment amb 1 ml de solució IP/tritó/RNasa i es deixen els tubs 15 min a 37°C, o bé 30 min a temperatura ambient.

Solució IP/Tritó/RNAsa

10 ml 0,1% Tritó X-100 (Sigma[®])

200 μ l Iodur propidi (Molecular Probes[®]) 1mg/ml dissolt en H₂O

2 mg RNAsa A, DNAsa free (Sigma[®])

Anàlisi de les mostres en el citòmetre de flux: les nostres mostres van ser analitzades mitjançant la utilització d'un citòmetre de flux *Coulter Epics-XL* dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Es va fer servir el làser argó blau (488 nm, 15 mW) i es va detectar la fluorescència a 665-685 nm.

C.2.2.K. Tractament de cèl·lules en cultiu amb l'inhibidor de proteosoma MG132

El tractament amb l'inhibidor del proteosoma MG132 permet aturar el procés de degradació proteosòmica i veure incrementats els nivells de proteïna si estava essent degradada pel complex de degradació. En aquest treball, per aplicar l'inhibidor, primer s'han transfectat les cèl·lules amb la construcció d'interès. A les 39 hores de transfecció s'ha afegit MG132 (Sigma) diluït amb DMSO a una concentració 10 μ M final a les plaques d'interès i s'ha afegit la mateixa quantitat equivalent de DMSO a les plaques control, ja que el DMSO per si sol té efectes indesitjats. Nou hores més tard s'han recollit les cèl·lules i s'han lisat per fer *western blot* per veure si apareixen canvis en la mostra tractada amb l'inhibidor.

C.2.3. Tècniques d'anàlisi de DNA

C.2.3.A. Reacció en cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) de l'anglès *Polymerase Chain Reaction* és una tècnica que té per objectiu obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment de DNA, partint d'una quantitat mínima. Aquesta tècnica es fonamenta en la propietat natural de la DNA-polimerasa per replicar fragments de DNA. Consisteix en un procés cíclic de desnaturalització del DNA i d'amplificació de les dues cadenes resultants, de manera que a cada cicle d'amplificació el nombre de cadenes de DNA es duplica. Actualment s'utilitzen polimerases termostables, encarregades de la replicació del DNA d'organismes adaptats a altes temperatures que mostren una activitat òptima a elevades temperatures, característica imprescindible per assegurar l'especificitat de la reacció.

La DNA polimerasa és capaç de sintetitzar DNA bicatenari a partir de DNA monocatenari, que serveix com a motllo. Per a que l'amplificació tingui lloc, cal que petits fragments de DNA monocatenari anomenats encebadors o oligonucleòtids, s'uneixin als extrems de la seqüència que es vol amplificar. Cada encebador és complementari a una de les cadenes de DNA i a partir de la unió dels encebadors es pot començar a sintetitzar la nova cadena sobre la cadena motllo. Per a que aquests encebadors s'uneixin de forma específica es realitza un aparellament (*annealing*) a una temperatura elevada, de manera que s'eviten les unions inespecífiques. Un cop els encebadors s'han unit a la seva seqüència complementària, la polimerasa pot començar el procés d'amplificació, que és dependent d'ATP i Mg^{2+} , 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 temperatura de la mostra. S'ha de tenir en

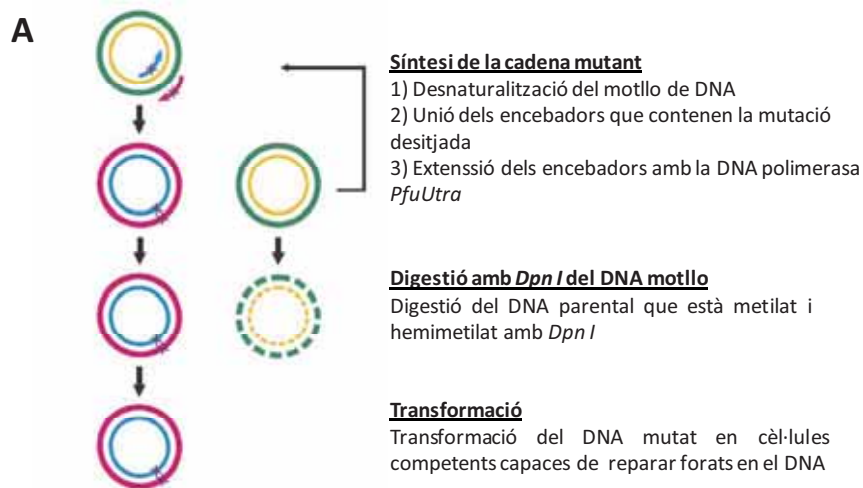
compte que per a cada parell d'encebadors s'ha d'ajustar la temperatura d'aparellament o *annealing* i que variar aquesta temperatura, així com la concentració de MgCl₂ a la reacció pot fer variar la seva especificitat i eficiència. A la figura C.2 es poden veure els reactius i els diferents passos de temperatura del termociclador d'una reacció estàndard.

A <u>Reactius</u>	B <u>Cicles PCR</u>	
Mostra de DNA (uns 2 ng)	2' a 95°C (pas inicial o <i>hot start</i>)	
Tampó de reacció (1X)		
2 mM MgCl ₂	1' a 95°C (desnaturalització)	} x 30 cicles
0,4 mM dNTPs	1' a 55°C (aparellament encebadors o <i>annealing</i>)	
0,5 pmol/μl Encebador <i>upper</i>	1' a 72°C (amplificació)	
0,5 pmol/μl Encebador <i>lower</i>		
0,05 U/μl DNA polimerasa	10' a 72°C (amplificació final)	
	∞ a 4 °C	

Figura C.2. Reactius i condicions estàndard d'una reacció de PCR. **A)** Reactius necessaris per la reacció de PCR. **B)** Descripció dels diferents passos d'una reacció de PCR estàndard.

C.2.3.B. Mutagènesi dirigida

Per a realitzar mutacions puntuals dirigides s'ha utilitzat el kit "*QuickChange*® II *Site-Directed Mutagenesis Kit*" (Agilent Technologies). En el procediment de mutagènesi es parteix d'un plasmidi amb la construcció d'interès que es vol mutar i dos encebadors dissenyats seguint les indicacions del comercial que contenen la seqüència mutada. Els encebadors són complementaris a ambdues cadenes oposades del vector i s'estenen, amb la DNA polimerasa *PfuUltra HF* mitjançant PCR (veure figura C.3). L'extensió dels encebadors genera un plasmidi que conté la mutació i que no queda del tot tancat quedant osques o *nicks*. Un cop s'ha acabat l'amplificació del DNA contenint les mutacions, el següent pas és eliminar el DNA parental amb l'endonucleasa *DpnI* específica per DNA metilat i hemimetilat. S'afegeix als tubs de PCR 1 μl d'enzim *DpnI* (10 U/μl) i es deixa digerint 1 hora a temperatura ambient. *Dpn I* elimina el DNA parental de manera que només queda el DNA mutat. Posteriorment, es transforma el plasmidi mutat, amb cèl·lules competents que reparen els *nicks* que presenta el plasmidi. A partir d'aquest punt, s'obtenen colònies que presenten el DNA mutat, es fan minipreparacions i s'analitza el DNA amb un seqüenciador automàtic per comprovar que realment la soca contingui la mutació. Veure un esquema sencer de tot el procés, els reactius i els passos de la reacció de PCR a la figura C.3.



B

Reacció PCR

5 µl de tampó de reacció 10 X
 X µl (5-50 ng) de plasmidi parental (motllo)
 X µl (125 ng) encebador 1
 X µl (125 ng) encebador 2
 1 µl dNTPs barreja
 ddH₂O per un volum final de 50 µl

C

Segment	Cicles	Temperatura	Temps
1	1	95°C	30 segons
2	12-18	95°C	30 segons
		55°C	1 minut
		68°C	1 minut / Kb de plasmidi

Figura C.3. Reactius i condicions de PCR per fer mutagènesi dirigida. **A)** Reactius necessaris per la reacció de PCR. **B)** Descripció dels diferents passos d'una reacció per generar una mutació.

C.2.4. Tècniques de manipulació i anàlisi d'RNA

C.2.4.A. Extracció i purificació d'RNA total

Per a realitzar una extracció d'RNA total de discos imaginals de larva en el tercer estadi s'ha utilitzat un protocol que combina la utilització de Trizol[®] per l'extracció d'RNA, el Kit d'extracció d'RNA RNeasy mini KIT Qiagen[®] per la purificació d'aquest RNA i una precipitació final de l'RNA per eliminar impureses que s'arrastren de les columnes del kit i així deixar l'RNA el més net possible.

Dissecció dels discos imaginals: s'agafen les larves en estadi 3, es posen en PBS 1X i es disseccionen 25-30 discos imaginals d'ala. Els discos que es van traient s'afegeixen en un tub d'1,5 ml amb 20 µl de medi Schneider en gel per tal de preservar els discos de la degradació. Un cop es tenen tots els discos recollits s'ha d'intentar treure tot el líquid del tub per deixar els discos el més secs possible. Després d'aquest pas es pot aturar el protocol i es poden guardar els discos congelats. Per congelar-los es submergeix el tub en nitrogen líquid per fer una congelació ràpida i posteriorment es guarda a -80°C. El fet de guardar els discos permet acumular diferents mostres per després poder fer totes les extraccions d'RNA de cop.

Extracció d'RNA total: s'afegeixen 500 µl de Trizol[®] en el tub amb els discos imaginals (si els discos estan congelats a -80°C cal deixar el tub en gel fins que es descongelin abans d'afegir el Trizol[®]). S'homogeneïtza uns 10 cops amb un homogeneïtzador per a tubs *eppendorf* i es deixa el tub 5 min a temperatura ambient. S'afegeixen 100µl de cloroform, es vortexa 10 segons i es deixa reposar el tub 5 min a temperatura ambient. Es centrifuga a 4°C durant 15 min a 13000 rpm. S'agafa la fase aquosa superior i es passa a un tub nou de 1,5 ml (es treuen uns 170 µl de fase aquosa, no s'ha d'apurar al màxim la fase). Es reserva el tub en gel.

Purificació d'RNA amb el Kit RNAeasy mini Kit Qiagen[®]: dins el tub que tenim reservat en gel, s'afegeixen 3,5 volums referents al que s'ha agafat de fase aquosa de solució RLT (tampó de lisi) del Kit i es vortexa (si s'ha tret 170 µl de fase aquosa caldrà afegir 595 µl de solució RLT). Seguidament s'afegeixen 2,5 volums referents a la fase aquosa d'etanol absolut i es vortexa (si s'ha tret 170 µl de fase aquosa caldrà afegir 425 µl d'etanol). Es preparen les columnes del kit i s'afegeixen 600 µl (màxim volum que accepta la columna) de la barreja del tub a la columna. Es centrifuga durant 30 segons a 13000 rpm i es repeteix el procés tants cops com sigui necessari fins que tot el volum de la barreja del tub hagi passat per la columna. Es renta 3 vegades la columna amb 500 µl de solució RPE (solució per rentar l'RNA en les columnes) . Entre rentat i rentat s'ha de centrifugar 30 segons a 13000 rpm. S'asseca la columna centrifugant 2 min a 13000 rpm i finalment s'elueix la columna amb 30 µl d'aigua MilliQ.

Fase de precipitació: s'afegeixen 70 µl d'aigua MilliQ als 30 µl que s'han eluït per tenir un volum final de 100 µl. S'afegeixen 10 µl d'acetat sòdic 3 M, 300 µl d'etanol 100%, es vortexa i es deixa tota la nit a -20°C per facilitar la precipitació de l'RNA. L'endemà es centrifuga a 4°C durant una hora a 13000 rpm. Es treu l'etanol i es renta el precipitat amb 300 µl d'etanol 70%. Es centrifuga 15 min a 13000 rpm, es treu l'etanol i es deixa assecar el precipitat a temperatura ambient. Finalment, es ressuspèn amb 12 µl d'aigua MilliQ i es comprova la qualitat de l'RNA utilitzant els aparells Nanodrop[™] i Bioanalyzer.

C.2.4.B. Reacció en cadena de la Polimerasa amb transcripció reversa (RT-PCR)

La reacció en cadena de polimerasa amb amb transcripció reversa (RT-PCR, de l'anglès *Reverse transcription polymerase chain reaction*) és una variant de la PCR que permet realitzar amplificacions d'RNAs específics. En la RT-PCR, l'RNA es retrotranscriu a DNA complementari (cDNA) gràcies a un enzim DNA polimerasa/RNA-dependent, la retrotranscriptasa o transcriptasa reversa, que utilitza la cadena d'RNA com a motlle per a generar la cadena complementària de DNA. Aquest DNA resultant, s'amplifica posteriorment mitjançant PCR convencional. Perquè 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 RT-PCRs, s'utilitzen diferents tipus d'encebadors: l'oligo-dT (format només per residus timina i que s'uneix a tots els RNAs que presenten cua poliA), o encebadors específics, que s'uneixen a l'RNA que es vol amplificar.

En aquest treball per realitzar les RT-PCR s'ha utilitzat el Kit "*OneStep RT-PCR*" (Qiagen®). El kit subministra un enzim que presenta una funció dual: té tant activitat retrotranscriptasa com activitat DNA polimerasa/DNA-dependent (DNA polimerasa convencional). Aquestes dues activitats es fan servir de manera seqüencial, és a dir, primer s'utilitza la seva activitat retrotranscriptasa, després la retrotranscriptasa s'inactiva durant 15 min a 95°C i s'activa la seva activitat DNA polimerasa convencional. La temperatura òptima de retrotranscripció és de 50°C, per això és aconsellable mantenir les mostres en gel fins el moment de començar la RT, per a evitar unions i amplificacions inespecífiques.

En aquest treball s'han utilitzat encebadors específics, que amplifiquen tres transcrits diferents: U6, un gen transcrit per l'RNA Polimerasa III que codifica per un snRNA, utilitzat com a control, ja que no hauria de veure alterada la seva quantitat d'mRNA; i encebadors per *Trl*, i *skl*, els gens d'interès. Per a cada experiment s'ha realitzat un control de contaminació de DNA genòmic. En els tubs control s'han afegit els encebadors després del pas de retrotranscripció i abans que comenci la PCR convencional. En aquests tubs control, com que inicialment no hi ha encebadors no es produeix el cDNA i només hi pot haver amplificació en el pas de PCR si la mostra conté contaminants de DNA genòmic.

Els reactius necessaris per la realització de la RT-PCR, les parelles d'encebadors utilitzats i l'esquema del procés estan descrits a la figura C.4.

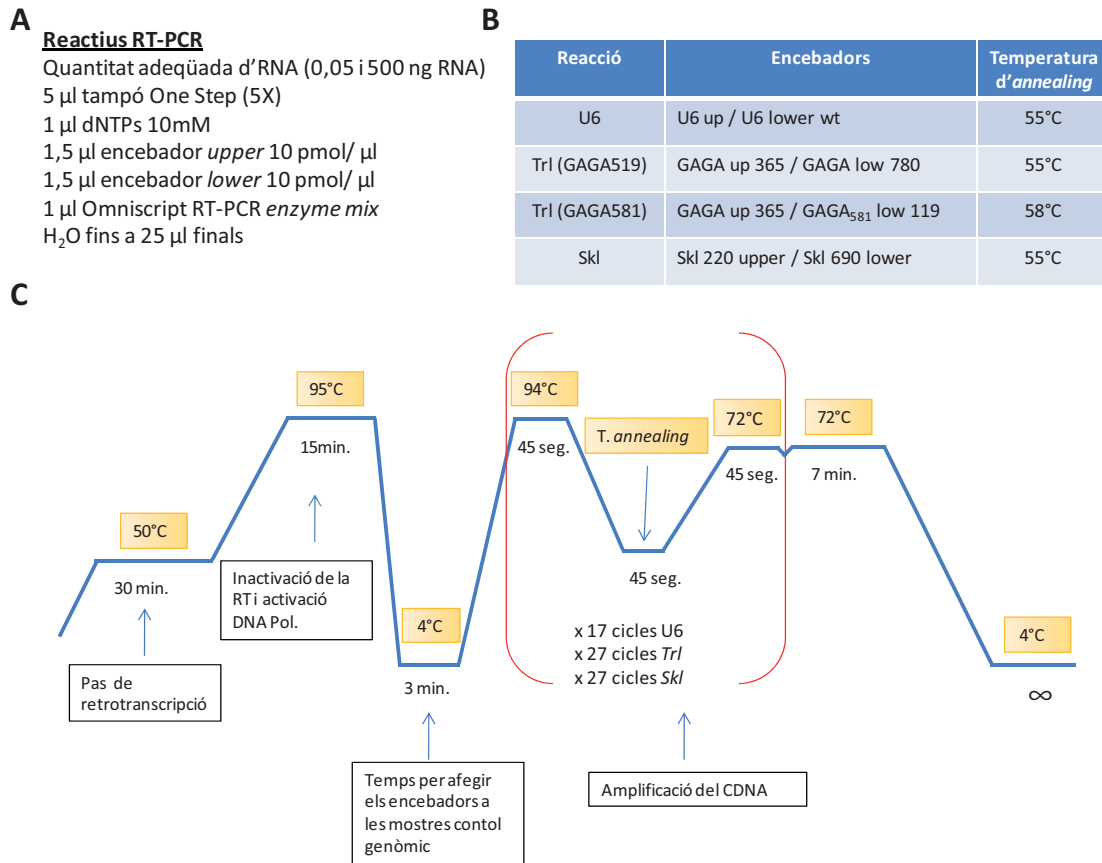


Figura C.4. Reactius i condicions per una reacció d'RT-PCR. **A)** Reactius necessaris per la reacció de RT-PCR. **B)** Descripció de les diferents parelles d'encebadors utilitzats. **C)** Esquema del procés RT-PCR.

C.2.5. Tècniques per a l'estudi de proteïnes

C.2.5.A. Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

L'electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) és una tècnica que permet separar proteïnes segons el seu pes molecular. L'SDS és un detergent que desnatura les proteïnes i les cobreix amb càrregues negatives, eliminant així els possibles efectes de la càrrega intrínseca de cada proteïna. En un camp elèctric, totes les proteïnes migren cap al pol positiu i cada una es separa en funció del seu pes molecular.

Els gels de poliacrilamida-SDS estan formats per dues fases: la fase superior o gel apilador i la fase inferior o gel separador. Cada fase presenta un pH i un percentatge d'acrilamida diferent. La fase apiladora permet apilar les proteïnes de les mostres abans de la separació i el gel separador és el que separa les proteïnes segons el seu pes molecular. Tots els gels d'aquest treball han estat realitzats amb un percentatge del 4% pel gel apilador i un

Materials i mètodes

percentatge variable entre el 8% i el 12% de gel separador segons la mida de la proteïna d'interès.

Solució gel apilador (4%)

4 % acrilamida: bisacrilamida 29:1 (40%)
0,125 M Tris-HCl pH 6,8
0,1 % SDS
6 µl de persulfat amònic (PSA) 10%/ml solució
3 µl TEMED/ml solució

Solució gel separador (10%)

10 % acrilamida: bisacrilamida 29:1 (40%)
0,125 M Tris-HCl pH 8,7
0,1 % SDS
6 µl de persulfat amònic (PSA) 10% /ml solució
3 µl TEMED/ml solució

Es munta el sistema de vidres, separadors pines i gomes *Miniprotean* (Bio-Rad). Posteriorment es prepara la solució pel gel separador al percentatge necessari per separar les proteïnes d'interès. S'afegeix la solució del gel separador entre els dos vidres, i s'afegeix isopropanol per facilitar la polimerització de l'acrilamida. Es deixa un temps fins que el gel separador polimeritzi. Un cop solidificat, es treu l'isopropanol, i es renta amb aigua MilliQ. S'afegeix la solució del gel apilador, es col·loca la pinta per formar els pous i carregar les mostres en el gel. Un cop polimeritzat el gel apilador, es retira la pinta i es munten els vidres en una cubeta d'electroforesi vertical amb tampó Laemmli 1X. A les mostres se'ls afegeix tampó de càrrega desnaturant de proteïnes PLB 5X (*Protein Loading Buffer*) i β-mercaptoetanol (1,5 M final), s'escalfen els tubs 5 min a 95°C i immediatament es carreguen les mostres en els pous. L'electroforesi es fa a 25 mA, i voltatge il·limitat, utilitzant com a tampó Laemmli 1X. Un cop migrades les proteïnes, es descarta el gel apilador i el gel separador es tenyeix amb solució de Coomassie o es transfereix a una membrana de nitrocel·lulosa per a dur a terme un assaig de *western blot*.

Laemli 1X

0,1 % SDS
200 mM Glicina
25 mM Tris base
pH 8,3-8,5

PLB 5X

125 mM Tris-HCl pH 6,8
21,75 % glicerol
5 % SDS
0,25 % blau de bromofenol

C.2.5.B. Tinció amb blau de Coomassie

Per a la tinció amb blau de Coomassie, després de córrer les mostres en el gel de poliacrilamida-SDS, el gel separador s'incuba uns 20 min en la solució de tinció CBB. El CBB (*Coomassie Brilliant Blue*) és el colorant per proteïnes més popular, és de tipus aniònic, i s'uneix a proteïnes de forma inespecífica. La seva estructura és predominantment no polar, pel que habitualment, s'usa en dissolució amb etanol i àcid acètic. Les proteïnes del gel es fixen gràcies a l'àcid acètic i al mateix temps es tenyeixen. Passats els 20 min, el colorant en excés que s'incorpora en el gel es pot eliminar destenyint amb una solució d'àcid acètic al 10%. Les proteïnes es detecten com a bandes blaves sobre un fons clar.

Solució CCB per tenyir el gel

0,05 % Coomassie Brilliant Blue
40 % etanol
10 % acid acètic

Solució per destenyir el gel

10 % acid acètic

C.2.5.C. Transferència de proteïnes (*Western blot*)

La tècnica de *western blot* permet la detecció de proteïnes presents en un gel de poliacrilamida-SDS transferit a una membrana de nitrocel·lulosa mitjançant l'ús d'anticossos específics. Un cop s'ha fet l'electroforesi SDS-PAGE, es transfereix el gel a una membrana de nitrocel·lulosa *Optitran* (Schleicher & Schuell). Per fer la transferència cal muntar els diferents elements de la transferència seguint un ordre concret tal i com es mostra en l'esquema de la figura C.5 tenint en compte que les proteïnes avancen cap al pol positiu. El pas de transferència es realitza en una cubeta amb tampó de transferència i aplicant un voltatge de 80 V durant 3 hores a 4°C amb agitació constant.

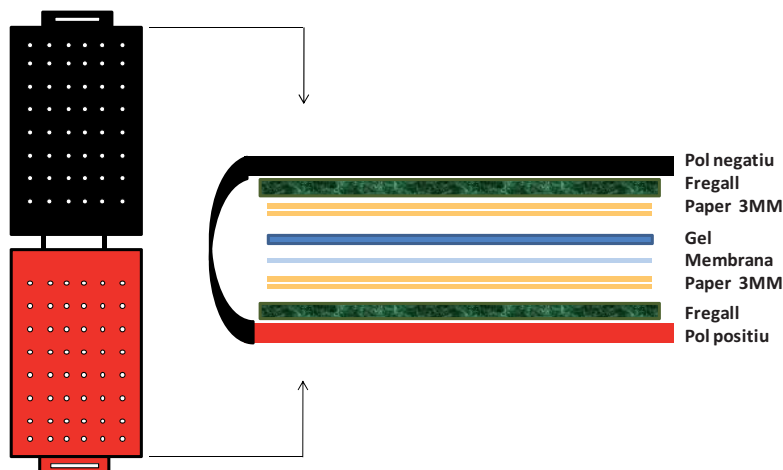


Figura C.5. Esquema de muntatge dels diferents elements per la transferència de proteïnes.

Un cop finalitzada la transferència, s'incuba la membrana des d'una hora a tota la nit amb solució de bloqueig per tal d'evitar la unió inespecífica dels anticossos a la membrana. Posteriorment, es fa un rentat de 5 min amb PBST i s'incuba amb l'anticòs primari diluït en PBST, a la concentració requerida per cada anticòs durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació constant. Seguidament, es fan 3 rentats de 5 min amb PBST i s'incuba la membrana amb l'anticòs secundari diluït amb PBST a la concentració adequada durant 1 hora, a temperatura ambient i en agitació constant. Finalment, es fan 5 rentats de 5 min amb PBST i es procedeix a la detecció del senyal mitjançant quimioluminescència.

Materials i mètodes

Per a la detecció de l'anticòs secundari conjugat a la peroxidasa de rave (HRP) es barregen 10 ml de solució de Luminol amb 10 µl de solució *Enhancer*, s'apliquen sobre la membrana i s'incuben 1 min. Finalment, s'asseca la membrana i s'exposa amb una pel·lícula fotogràfica *Curix RP2* (Agfa) el temps adient per obtenir un senyal òptim i es revela en una màquina de revelat automàtic *Hyperprocessor* (Amersham).

Tampó de transferència

25 mM Tris-base

40 mM Glicina

0,05 % SDS

20 % Metanol

Solució de bloqueig

PBS 1X

5 % llet desnatada en pols

0,05 % SDS

0,1 % Tween 20

0,01 % azida sòdica

PBST

PBS 1X

0,1 % Tween 20

Luminol

0,1 M Tris HCl pH 8,6

1,25 mM Luminol sòdic

2,7 mM H₂O₂

Enhancer

0,1 % Àcid p-cumàric (Sigma) en DMSO

C.2.5.D. Rentat de membranes de *western blot* (*stripping*)

Per tal de poder revelar més d'un cop, amb diferents anticossos, una mateixa membrana de *western blot* que ja ha estat revelada anteriorment, cal eliminar els anticossos primaris i secundaris que es troben units a la membrana. Aquest procés s'anomena *stripping*. Per fer el rentat de la membrana, es situa la membrana dins un recipient que tanqui bé, es cobreix la membrana en solució *stripping*, es tapa el recipient i s'incuba dins un bany d'aigua a 50°C durant 30 min. Es descarta la solució d'*stripping* i es fan dos rentats de la membrana amb PBST. Després dels rentats, la membrana està a punt per començar de nou el protocol de *western blot* amb una altra combinació d'anticossos.

Solució *stripping*

100 mM β-mercaptoetanol

2 % SDS

62,5 mM Tris pH 6.7

C.2.5.E. Tinció amb solució roig de Ponceau

És un mètode de tinció de membranes de *western blot* ràpid inespecífic i reversible per localitzar les bandes de les proteïnes transferides a la membrana de nitrocel·lulosa abans de seguir amb la immunodetecció de les proteïnes a la membrana. La tinció amb vermell Ponceau produeix una tinció de bandes de color vermell-rosat. És una tinció que s'uneix de manera feble i no té efectes deleteris en la membrana. La membrana s'incuba durant 15 min en agitació amb Ponceau diluït 1:5 amb aigua i posteriorment es destenyeix la membrana amb aigua destil·lada fins que el fons queda net i les bandes queden contrastades. Finalment la tinció es pot eliminar totalment i continuar amb el procés d'immunodetecció de les proteïnes.

C.2.5.F. Expressió de proteïnes fusionades a una cua d'histidines

Per expressar proteïnes fusionades a cues d'histidina es clona la proteïna en vectors de tipus pET. El sistema pET és un potent sistema desenvolupat pel clonatge i l'expressió de proteïnes recombinants en *E.coli*. Les proteïnes es clonen sota el control de senyals de transcripció i traducció de l'RNA polimerasa del bacteriòfag T7. L'expressió s'indueix generant una font de T7 polimerasa en la cèl·lula hoste i el sistema té l'avantatge de mantenir els gens transcripcionalment silenciosos fins que s'inicia l'estat d'inducció. El plasmidi tipus pET es transforma a les soques BL21 (DE3) que contenen una còpia cromosomal del gen de la T7 RNA polimerasa sota el promotor *lacUV5*, induïble amb IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Quan s'afegeix IPTG a la cèl·lula, aquest desplaça el repressor *lac*, la T7 polimerasa s'expressa i comença a transcriure el gen que s'ha clonat i aquest després es tradueix produint gran quantitat de la proteïna d'interès.

En el nostre treball s'ha expressat un fragment de la proteïna TAF3 al que hem anomenat BIP2G77 fusionat al una cua d'histidines per tal de fer anticossos contra TAF3 i també per sobreexpressar la proteïna i fer assajos de *pulldown*. El constructe que s'ha sobreexpressat és el pET28a BIP2G77His.

C.2.5.F.1. Proves d'expressió a petita escala

Es transforma la soca BL21 (DE3) amb el plasmidi corresponent. S'inoculen 2 tubs amb 4 ml de medi LB contenint l'antibiòtic adequat amb colònies independents i es creixen a 37°C en agitació fins que els tubs arriben a una densitat òptica (DO) entre 0,6 i 0,8. (es treuen 500 μ l de cada tub per mirar-los posteriorment en un gel SDS-PAGE). S'indueix un dels tubs amb IPTG 1 mM, entre 2 i 4 hores, en agitació a 37°C i a l'altre tub també es deixa el mateix temps a 37°C agitant però no se li afegeix IPTG (tub control sense induir). Un cop acabada la inducció, es

Materials i mètodes

centrifuguen les cèl·lules a 6000 g 10 min a 4°C. Es descarta el sobrenedant i el sediment cel·lular es ressuspen amb 500 µl de solució de lisi. Seguidament es sonica la mostra utilitzant un sonicador *Digital Sonifier*[®] (Branson), fent 3 cicles de 10 segons amb intervals de 10 segons de descans, i una amplitud del 40%. Després es centrifuga el lisat 15 min a 10000 rpm a 4°C i el sobrenedant es guarda per fer SDS-PAGE. A continuació es posen 20 µl de cada mostra en tubs d'1,5 ml. En els tubs amb les mostres s'afegeixen 5 µl de tampó de càrrega PLB 5X (1-2 X final), 10% β-mercaptoetanol a cada tub. Es bullen els tubs 5 min a 95°C i es carreguen les mostres en un gel SDS-PAGE. Posteriorment es tenyeix el gel amb solució de coomasie, per veure si hi ha hagut sobreexpressió de la proteïna després de la inducció amb IPTG.

Solució de lisi: 0,1 M NaCl, 20 % glicerol, 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1 mM EDTA pH 8.0, 0,1 % Nonidet P40 (IGEPAL), 1 mM PMSF, 0,5 mM DTT.

C.2.5.F.2. Expressió a gran escala de proteïnes fusionades a una cua d'histidines

Un cop les proves d'inducció a petita escala funcionen i es veu que hi ha una sobreexpressió de la proteïna es pot passar a fer una expressió a gran escala. Es transforma la soca BL21(DE3) amb el plasmidi corresponent. El dia següent s'inoculen 3 tubs amb colònies independents i es creixen O/N a 37°C en agitació. Posteriorment s'inoculen els tres tubs en un erlenmeyer de 2 litres amb 500 ml de medi LB. Es fan créixer els bacteris en agitació a 37°C fins que arriben a una densitat òptica (DO) entre 0,6 i 0,8. (en aquest punt es treuen 500 µl per analitzar després en un gel). S'indueix l'expressió del plasmidi amb IPTG 1 mM, entre 2 i 4 hores, en agitació a 37°C. Un cop acabada la inducció, es treuen uns altres 500 µl per carregar en un gel control i la resta es centrifuga a 6000 g 10 min a 4°C. Es descarta el sobrenedant i el sediment cel·lular es ressuspen amb 10 ml de solució de lisi. Seguidament es sonica la mostra utilitzant un sonicador *Digital Sonifier*[®] (Branson), fent 3 cicles de 10 segons amb intervals de 10 segons de descans, al 40% d'amplitud. Després es centrifuga el lisat a 35000 rpm a 4°C, amb el rotor SW41 en una centrífuga Beckman 1 hora per separar la fase soluble de la insoluble. Es situa el sobrenedant a un tub nou i es guarda també el sediment.

Per analitzar si la proteïna d'interès és soluble o insoluble, es carreguen 20 µl de la fracció soluble i una mica de sediment (agafat amb una punta groga i ressuspen en 400 µl de tampó de càrrega) i s'analitzen en un gel SDS-PAGE junt amb 20 µl dels controls abans i després d'induir. El gel SDS-PAGE es tenyeix amb solució de Coomassie per veure com ha funcionat la sobreexpressió i si la proteïna és soluble o insoluble. En el nostre cas, la proteïna va resultar soluble. Es poden fer alíquotes del sobrenedant que conté la proteïna soluble i es poden guardar a -80°C per la posterior utilització dels extractes de proteïna sobreexpressada per

utilitzar per fer *pulldowns* o bé per fer purificació de la proteïna. Si la proteïna hagués sigut insoluble, s'hagués hagut de fer un protocol per solubilitzar al màxim la proteïna amb una solució amb clorur de guanidina.

C.2.5.G. Purificació de proteïnes fusionades a una cua d'histidines a partir de la fracció soluble

La utilització d'una proteïna fusionada a una cua d'histidines permet la purificació de la proteïna mitjançant una columna d'afinitat amb una columna de níquel, Ni²⁺, el qual interacciona amb els grups imidazol de les histidines fent que aquestes quedin retingudes a la columna.

S'agafen 0,5 ml de la reïna "*Ni-NTA Agarose*" (Qiagen®) i es posen dins una columna *Econocolumn* (Bio-Rad). S'equilibra la reïna amb 10 ml de tampó de lisi. Aquest pas i els posteriors es realitzen amb l'ajut d'una bomba peristàltica *LKB Pump P-1* (Pharmacia) a una velocitat entre 6 i 8 de la posició 1. Es fa passar fins a 3 cops els 10 ml de la mostra corresponent a la fracció soluble que s'ha sobreexpressat. Es recull aquesta primera fracció anomenada *Flow Through* (FT). Posteriorment es fan 2 rentats. El primer rentat amb tampó de lisi (Fracció R1) i el segon amb 5 ml de tampó D (fracció R2). Finalment s'elueix la proteïna per competició amb imidazol en un procés de 2 passos. Primer es fa una preelució amb 3 ml de tampó D, 20 mM Imidazol, recollint fraccions d' 1ml (PE1, PE2, PE3). Aquest primer pas serveix per eliminar contaminants que s'uneixen a la reïna amb menor afinitat que la cua d'histidines. Després s'elueix amb 10 ml de tampó D 100 mM Imidazol recollint també fraccions d'1 ml (E1-E10). Seguidament es comprova el funcionament de la cromatografia analitzant 20 µl de cada una de les fraccions en un gel SDS-PAGE i es tenyeix el gel amb solució de Coomassie. Es fa una tria de les elucions que més interessin, es congelen amb neu carbònica i es guarden a -80°C.

Tampó D: 0,1 M KCl, 20 % Glicerol, 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 0,2 mM EDTA pH 8.0, 0,05 % Nonidet P40 (IGEPAL), 0,1 mM PMSF, 0,5 mM DTT.

C.2.5.H. Assaig d'interacció proteïna-proteïna in vitro. GST-pulldown

L'assaig de GST-pulldown permet analitzar la interacció entre dues proteïnes en condicions *in vitro*. El mètode consisteix en immobilitzar una proteïna a una reïna, generant una columna d'afinitat específica. Després d'incubar la reïna amb un extracte proteic, s'analitzen les proteïnes retingudes a la reïna degut a la interacció específica amb la proteïna immobilitzada.

Materials i mètodes

La detecció de les proteïnes que interaccionen específicament amb la columna es pot fer mitjançant *western blot* o marcant radioactivament la proteïna i detectant-la mitjançant autoradiografia.

C.2.5.H.1. Preparació d'extractes per a la realització de *pulldowns*

En el nostre cas, hem fet servir extractes de proteïna fusionada a cues d'histidina sobreexpressada a bacteris de la soca BL21(DE) (veure apartat C.2.5.G). Per la realització de *pulldowns* també es pot partir d'un extracte proteic de proteïnes sobreexpressades en cultius cel·lulars.

C.2.5.H.2. Expressió i purificació de proteïnes fusionades a GST

Per a l'obtenció de les proteïnes de fusió d'interès es van fer servir vectors d'expressió pGEX-KG (Amersham-Pharmacia-Biotech), els quals estan dissenyats per a la producció de grans quantitats de proteïna sota el control del promotor *tag*, induïble per IPTG. En tots els casos les proteïnes de fusió es van expressar en la soca d'*E. coli* BL21(DE3).

Per expressar proteïnes fusionades a GST, es transforma la soca BL21(DE3) amb el plasmidi corresponent. El dia següent s'inoculen 3 tubs amb colònies independents i es creixen O/N a 37°C en agitació. Posteriorment s'inoculen els tres tubs en un erlenmeyer de 2 litres amb 500 ml de medi LB. Es fan créixer els bacteris en agitació a 37°C fins que arriben a una densitat òptica (DO) entre 0,6 i 0,8. S'indueix l'expressió del plasmidi amb IPTG 1 mM, entre 2 i 4 hores, en agitació a 37°C. Un cop acabada la inducció, es centrifuguen les cèl·lules a 6000 g, 10 min a 4°C. Es descarta el sobrenedant i el sediment cel·lular es ressuspend amb 10 ml de NETN, 1 mM PMSF, 10 µg/µl Leupeptina. Seguidament es sonica la mostra utilitzant un sonicador *Digital Sonifier*[®] (Branson), fent 3 cicles de 10 segons amb intervals de 10 segons de descans, al 40% d'amplitud. Després es centrifuga el lisat 15 min a 10000 rpm a 4°C, en una centrífuga Beckman. Es guarda el sobrenedant en un tub de 50 ml en gel i el sediment cel·lular es ressuspend en 5 ml de NETN, 2% Sarkosyl, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptina. Es sonica amb les mateixes condicions de sonicació i es torna a centrifugar a 10000 rpm 15 min a 4°C, en una centrífuga Beckman. Finalment, el sobrenedant obtingut s'ajunta amb l'anterior sobrenedant que teníem guardat en un tub en gel. El tub amb els dos sobrenedants ajuntats, constitueixen l'extracte proteic bacterià, es poden guardar a -80°C o bé seguir amb el protocol per unir l'extracte a una reïna de *Glutathione Sepharose 4B*.

NETN

20 mM Tris pH 8

100 mM NaCl

1 mM EDTA

0,5 % Nonidet P40 (IGEPAL)

C.2.5.H.3. Unió de proteïnes fusionades a GST a la reïna *Glutathione Sepharose 4B*

Es descongelen els extractes proteics dels bacteris BL21(DE3) induïts i es centrifuguen 10 min a 10000 rpm i 4°C, en una centrífuga Beckman. Al acabar es recupera el sobrenedant.

Per preparar la reïna *Glutathione Sepharose 4B* s'afegeix 1 ml de la reïna en una *Econocolumn* (Biorad) i s'equilibra amb 10 ml de tampó NETN. Tot el procediment es realitza a 4°C amb l'ajuda d'una bomba peristàltica *LKB Pump P-1* (Pharmacia) a velocitat 6-8 de la posició 1. Es col·loca tot el volum possible de l'extracte proteic a l'*Econocolumn* amb la reïna, ressuspenent la reïna. Es passa el contingut a un tub de 50 ml i s'utilitza la resta d'extracte proteic per acabar de ressuspendre la reïna de l'*Econocolumn*, ajuntant-lo al tub de 50 ml. El tub es deixa donant voltes en una roda durant 30 min, així les proteïnes de fusió poden unir-se a la reïna. Passat el temps, es torna a posar el contingut del tub a l'*Econocolumn*, deixant que es filtri el tampó. Es fan dos rentats de la reïna amb NETN-0,7 M NaCl (fet afegint NaCl al tampó NETN, fins a una concentració final de 0,7 M) deixant que es filtri. Finalment, s'afegeix el volum necessari de NETN a l'*Econocolum* per evitar que la reïna s'assequi, i es pot guardar a 4°C.

C.2.5.H.4. Elució de proteïnes fusionades a GST de la reïna *Glutathione Sepharose 4B*

Per conservar les proteïnes fusionades a GST purificades a -80°C cal eluir-les de la reïna. Per a dur a terme l'elució (sempre a 4°C), es realitza un rentat de l'*Econocolumn* omplint-la de tampó TST, 5 mM DTT i deixant que es filtri el líquid. Es ressuspen la reïna amb un volum de tampó TST, 5 mM DTT, 20 mM GSH (Glutatió) reduït i es vortexa breument. Es deixa la mostra 2 min en gel, es vortexa 1 min, es torna a deixar en gel 2 min i finalment, es vortexa enèrgicament. Es deixa filtrar el líquid recuperant l'eluit, que contindrà les proteïnes fusionades a GST, en tubs de 1,5 ml. Es ressuspen altre cop la reïna amb tampó TST + 1 mM DTT + 10 mM GSH, es vortexa i es deixa filtrar recuperant l'eluit en tubs 1,5 ml. Es repeteix aquest últim pas 2 vegades més. Així, finalment s'obtenen 4 fraccions eluïdes. Es comprova la concentració de proteïna recuperada a cada fracció carregant una alíquota de cada una en un gel SDS-PAGE i fent una tinció amb solució de Coomassie. Es descarten les fraccions eluïdes menys

Materials i mètodes

concentrades. I amb les fraccions eluïdes més concentrades es procedeix a la seva dialització. S'ajunten totes les fraccions en una membrana de diàlisi *Spectra/Por* (Spectrum Laboratories, Inc) i es col·loca la membrana en un vas de precipitats amb 1 litre de tampó de diàlisi. Es deixa en agitació a 4°C durant 1 hora. Passat el temps, es canvia la membrana a un vas de precipitats amb tampó de diàlisi nou i es deixa una altra hora a 4°C en agitació. Aquest procés es repeteix una última vegada i finalment, es recupera el contingut de la membrana en tubs 1,5 ml. Es fa un gel SDS-PAGE que posteriorment es tenyeix amb Coomassie es carreguen diferents dilucions de les mostres dialitzades fins aconseguir equiparar les concentracions de les diferents proteïnes fusionades a GST, a fi d'utilitzar la mateixa quantitat de cada una per l'assaig de GST-Pulldown.

<u>TST</u>	<u>Tampó de diàlisi</u>
50 mM Tris pH 8	20 mM HEPES
150 mM NaCl	20 % glicerol
0,1 % Tritó X-100	0,2 mM EDTA
	0,1 mM NaCl
	0,1 mM PMSF
	1 mM DTT

C.2.5.H.5. Assaig GST-Pulldown

Es col·loquen 20 µl de la reïna *Glutathione Sepharose 4B* en tubs de 1,5 ml. S'afegeixen 480 µl de tampó D a cada tub i es deixa rodant 1 min a una roda per barrejar bé la reïna amb el tampó. Es centrifuga 1 min a 3000 rpm. Es descarta el sobrenedant i es repeteix aquest rentat amb tampó D. A partir d'aquest punt, tot l'experiment s'ha de realitzar a 4°C. Es treu el sobrenedant de la reïna i s'afegeixen 20 µl de la proteïna fusionada a GST adient. S'afegeixen 460 µl de tampó D a cada tub i s'incuba 1 hora a una roda perquè les proteïnes fusionades a GST s'uneixin a la reïna. Passat aquest temps, es centrifuguen les mostres a 3000 rpm 1 min i es descarta el sobrenedant. Seguidament es realitzen tres rentats amb 480 µl de tampó D, a cada rentat es deixen els tubs 5 min agitant a la roda i es centrifuguen a 3000 rpm 1 min. Es treu l'últim sobrenedant i s'afegeixen 20 µl de l'extracte de proteïnes i 460 µl de tampó D. Es deixen els tubs agitant 2 hores a la roda. Llavors, es centrifuguen els tubs a 3000 rpm 1 min, es descarta el sobrenedant i es realitzen 6 rentats de 5 min amb 480 µl de tampó D, centrifugant a 3000 rpm 1 min i descartant els sobrenedants. Finalment, es ressuspen cada tub amb la reïna en 20 µl de tampó de càrrega de proteïnes PLB 5X (1-2X final) i β-mercaptoetanol (1,5 M final), es vortexen, s'escalfen a 95°C durant 5 min, es centrifuguen a 3000 rpm 1 min per a baixar la reïna i es carreguen els 20 µl de cada sobrenedant en un gel SDS-PAGE. Finalment, per *western blot* amb anticossos específics, es detecten quines proteïnes fusionades a GST han retingut la proteïna d'interès.

Tampó D

0,1 M KCl
20 % glicerol
20 mM HEPES KOH pH 7,9
0,2 mM EDTA pH 8
0,05 % Nonidet P40 (IGEPAL)
0,1 mM PMSF
0,5 mM DTT

C.2.5.I. Assaig d'interacció proteïna-proteïna *in vivo*, coimmunoprecipitació de proteïnes

La immunoprecipitació és la tècnica que permet la precipitació d'una proteïna d'un extracte cel·lular gràcies a l'ús d'un anticòs que s'hi uneix específicament. Sovint, si no es té un anticòs específic contra la proteïna, es fusiona la proteïna a un *tag* per tal de poder immunoprecipitar la proteïna utilitzant l'anticòs contra el *tag* que té unit. En els experiments de coimmunoprecipitació el que es fa és immunoprecipitar una proteïna per aïllar-la d'un extracte cel·lular. Si la proteïna que s'ha immunoprecipitat està unida a una altra, en l'extracte immunoprecipitat es pot detectar la segona proteïna amb el seu anticòs específic mitjançant *western blot*.

Els experiments de coimmunoprecipitació d'aquest treball s'han realitzat a partir d'extractes totals de cèl·lules S2 o cèl·lules HeLa cotransfectades amb plasmidis d'expressió de les proteïnes que s'ha volgut veure una possible interacció.

Per realitzar una coimmunoprecipitació, es transfecten 10 plaques, 5 es cotransfecten amb els plasmidis d'expressió de les proteïnes d'interès i les altres 5 plaquetes es transfecten amb un plasmidi irrellevant pUC19. Les plaquetes amb el plasmidi irrellevant permeten tenir un extracte sense les proteïnes d'interès sobreexpressades (control negatiu). Passades 48 hores es recullen les cèl·lules transfectades amb les proteïnes d'interès en un tub de 50 ml i les cèl·lules transfectades amb el plasmidi irrellevant, en un altre tub de 50 ml. A partir d'aquí, es realitzaran els mateixos passos, tant pel tub amb les construccions d'interès com pel tub amb el plasmidi irrellevant. Es centrifuguen les cèl·lules a 100 g i es fan 3 rentats del sediment de cèl·lules amb PBS1X. Després de l'últim rentat es ressuspèn el sediment amb 1ml de Buffer IP amb una pipeta. Es passa el volum a un tub de 1,5 ml i es deixa el tub 30 min en gel. Passats els 30 min es lisen les cèl·lules utilitzant un homogeneïtzador de vidre *Dounce* de 2 ml (èmbol B). S'han de fer unes 25-30 passades de l'èmbol per assegurar que es trenquin les membranes cel·lulars de les cèl·lules.

En aquest punt es pot fer un pas opcional per a proteïnes que no s'extreuen bé a baixa concentració de sal. La lisi s'ha fet amb solució IP a 150 mM NaCl. En aquest pas s'afegeix sal

Materials i mètodes

fins a 200 o 300 mM final de NaCl i es deixa 30 min a 4°C rodant a la roda per tal que hi hagi una bona extracció de les proteïnes que no s'extreuen a baixa força iònica.

Es centrifuga a 4°C. el lisat durant 15 min 14000 rpm. Es recull el sobrenedant que es el nostre extracte proteic, i es posa en un tub d'1,5 ml nou. En aquest punt, cal separar el que serà l'INPUT. Es treuen 20 µl de l'extracte, es posen en un tub nou, s'afegeixen 5 µl de PLB/ β -mercaptoetanol i es guarda el tub al congelador a -20°C.

Es separa l'extracte obtingut en 2 tubs d'1,5 ml (500 µl aprox a cada tub). Un serveix per fer la immunoprecipitació amb l'anticòs d'interès i l'altre per fer la immunoprecipitació amb un anticòs irrellevant (control negatiu). S'afegeixen a cada tub amb l'extracte 20 µl de Proteïna G-Agarosa (*Protein G PLUS-Agarose Immunoprecipitation reagent*, Santa Cruz), i es deixa incubant 1 hora a 4°C rodant a la roda (aquest pas s'anomena PRE-WASHING i permet eliminar el soroll de fons i la brutícia). Es centrifuga a 3000 rpm durant 2 min, es recull el sobrenedant i es passa a un tub nou. S'afegeix l'anticòs corresponent a cada tub i es deixa amb l'anticòs tota la nit rodant a 4°C. En aquest punt l'anticòs s'uneix a la proteïna d'interès. L'endemà s'afegeixen 30 µl de proteïna G-agarosa que s'enganxa als anticòsos i permet la precipitació de la nostra proteïna. Es deixa incubant l'extracte amb la proteïna G-agarosa 2 hores a 4°C perquè aquesta s'uneixi a l'anticòs que està unit a la proteïna d'interès. Seguidament es passen a fer els rentats per eliminar les unions inespecífiques. Després de l'últim rentat, es centrifuga a 3000 rpm durant 2 min, es llença el sobrenedant, es ressuspenen suaument les boletes de proteïna G amb 500 µl de buffer IP i es deixa rodant 5 min a 4°C. Es repeteix el procés de rentat 4 cops més. Després de l'últim rentat, es treu tot el sobrenedant, s'afegeixen 20 µl de PLB/ -mercaptoetanol. Es bullen les boletes de proteïna G-agarosa a 95°C durant 1 min i es centrifuguen els tubs 2 min a 3000 rpm. Es carrega el sobrenedant dels tubs (vigilar no agafar boletes de proteïna G-agarosa) en un gel SDS-PAGE per fer un *western blot*. El *western blot* es pot revelar contra la proteïna que s'ha immunoprecipitat per veure si l'anticòs ha precipitat la proteïna correctament i també contra alguna altra proteïna per veure si ha coimmunoprecipitat junt amb la proteïna que s'ha immunoprecipitat, indicant així que ambdues estan interaccionant.

IP

50 mM Tris pH8

150 mM NaCl

5 mM EDTA

0.5 % Nonidet P-40 o IGEPAL

0.1 mM PMSF

10 µg/µl Leupeptina

10 µg/µl Aprotinina

C.2.5.J. Obtenció d'anticossos

Per a la obtenció d'anticossos policlonals cal expressar la proteïna sencera o bé la part de la proteïna més antigènica i diferent a altres proteïnes a cèl·lules *E. coli*.

En aquest treball s'han obtingut dos anticossos policlonals. Un anticòs policlonal de rata contra la proteïna sencera de GAGA (α -GAGA rata), a partir de la sobreexpressió de la construcció pET14bGAGA. El segon anticòs que s'ha preparat és un anticòs policlonal de conill α -TAF3 (BIP2), realitzat contra un fragment de TAF3 (BIP2) al que hem anomenat BIP2G77 (de l'aminoàcid 757 al 1091), mitjançant la sobreexpressió i purificació de la proteïna fusionada a histidines a partir de la construcció pET28aBIP2G77.

Un cop la proteïna d'interès s'ha expressat a *E. coli* i s'ha purificat, es fa un gel de poliacrilamida en el que la proteïna es carrega en un sol pou ample. Un cop acabada l'electroforesi el gel es renta 3 o 4 cops amb aigua i seguidament es tenyeix amb una solució de Coomassie 0,05 % en aigua durant 10 min en agitació. Es renta el gel 3 o 4 vegades amb aigua. La banda de la proteïna d'interès es retalla i es tritura en trossos el més petits possible amb una ganiveta. Es fa passar l'acrilamida trossegada per una xeringa de 2 ml i es posa l'acrilamida dins un tub de 1,5 ml. Per tal que l'acrilamida quedi el més fina possible, es forada la part inferior del tub i es situa aquest tub dins un altre tub de 1,5 ml. Un tub dins l'altre es centrifuguen a 14000 rpm. Es repeteix aquest procés dos vegades, disminuint cada cop la mida del forat de la base del tub. Finalment es ressuspèn la mostra amb un volum de PBS 1x i es vortexa. Cal que quedi una solució viscosa però que es pugui agafar amb la pipeta.

Les immunitzacions a conills i rates van ser realitzades per la Dra Eva Prats i el personal del servei d'estabulari CID-CSIC (Barcelona). La primera immunització es va fer amb l'antigen (barreja PBS 1X i l'acrilamida amb la proteïna) i d'Adjuvant de Freund complet (Sigma) v/v. La resta de recordatoris amb intervals de 15 dies es van realitzar amb adjuvant de Freund incomplet (Sigma) v/v. L'adjuvant de Freund és una emulsió d'oli mineral i aigua preparada amb olis no metabolitzables que protegeix l'immunogen d'una degradació accelerada. L'adjuvant complet es diferencia de l'incomplet per la presència bacteri *Mycobacterium tuberculosis* mort que fa generar una resposta immune primària més forta.

Un cop el servei de l'estabulari fa entrega de la sang extreta dels animals immunitzats cal processar-la. Primer es deixa reposar durant un parell d'hores a temperatura ambient. Posteriorment es centrifuga a 2000 rpm durant 10 min a 4°C i es recull la fase superior corresponent al sèrum. S'afegeix azida sòdica a una concentració final de 0,02%, s'aliquota, es congelen els tubs amb neu carbònica i es guarden a -80°C.

C.2.5.K. Purificació d'anticossos per afinitat

Per aconseguir anticossos purificats per afinitat es purifica el sèrum obtingut de la immunització. Per la purificació cal unir l'antigen utilitzat a un suport sòlid sobre el que seran retinguts els anticossos específics que posteriorment es poden eluir.

En aquest treball s'ha purificat per afinitat l'anticòs α -TAF3 (Bip2) de conill. El nostre antigen era la proteïna sobreexpressada BIP2G77His. S'uneix la proteïna de fusió recombinant purificada Bip2G77 a la reïna *Ni-NTA* (Qiagen). Es renta la columna amb 10 ml de tampó B, es passen 2 ml de sèrum. Seguidament es fan 2 rentats amb 10 ml de tampó B i un tercer rentat amb tampó C. Finalment s'elueix amb una solució $MgCl_2$ 4M. Es fa un *western blot* per veure si la purificació ha funcionat.

Tampó B

150 mM NaCl

50 mM Tris-HCl pH 7,4

Tampó C

2M NaCl

50 mM Tris-HCl pH 7,4

C.2.5.L. Immunolocalització de proteïnes mitjançant immunofluorescència indirecta

La immunofluorescència indirecta és una tècnica que utilitza dos tipus d'anticossos diferents: els primaris, que són anticossos específics que s'uneixen a l'antigen diana, i els secundaris conjugats a un fluoròfor que reconeixen la regió invariable de l'anticòs primari i s'hi uneixen. Com que els anticossos secundaris estan units a un fluoròfor, aquest emet llum al ser excitat a una longitud d'ona concreta i permet situar la proteïna marcada específicament per l'anticòs primari amb un microscopi de fluorescència.

En aquest treball s'han realitzat immunolocalitzacions de proteïnes en diferents cultius cel·lulars i diferents tipus de teixit. En aquest apartat es presenten els diferents protocols específics que s'han utilitzat per cada tipus d'immunolocalització.

C.2.5.L.1. Immunolocalització a cèl·lules S2

Com que les cèl·lules S2 són semiadherents, per fer immunolocalitzacions, cal fixar-les sobre un cobreobjectes tractat amb concanavalina-A, una lectina procedent de la mongeta *Canvalia ensiformis* que facilita la immobilització.

En primer lloc, es netegen cobreobjectes rodons amb etanol absolut i es deixen assecar. Llavors es tracten afegint 50 μ l de concanavalina-A (0,5 mg/ml) (Sigma) durant 15 min. Es retira l'excés de solució, es deixa assecar la concanavalina-A (aproximadament 1 hora dins la campana de flux) i es col·loquen els cobreobjectes dins els pous de plaques de cultius de 6 pous

de 35 mm de diàmetre cada un (Corning). S'afegeix 1 ml de medi Schneider suplementat per pou i seguidament s'afegeixen $1-5 \cdot 10^5$ cèl·lules a analitzar. Les cèl·lules s'incuben 1-2 hores a temperatura ambient, per a que s'hi enganxin. Un cop adherides, es descarta el medi amb una pipeta *Pasteur* i es fa un rentat de cada pou amb 1 ml de PBS 1X amb agitació durant 10 min. A continuació es treu el PBS 1X, i es fixen les cèl·lules afegint 200 μ l de paraformaldehid 4% (diluint en PBS) i incubant 15 min a temperatura ambient sense agitació. Seguidament, es treu el paraformaldehid i es renta cada pou amb 1 ml de PBS 1X en agitació 15 min. Es fan dos rentats més amb 1 ml de solució de bloqueig, 10 min en agitació. Tot seguit, es treu el líquid i es posen 200-300 μ l de la dilució corresponent de l'anticòs primari en solució de bloqueig. S'incuba 1 hora a temperatura ambient en agitació, i després tota la nit a 4°C també en agitació. Al dia següent es fan tres rentats amb 1 ml de solució de bloqueig, 10 min en agitació. Després, es treu la solució i s'afegeixen 300 μ l d'una dilució 1:400 en solució de bloqueig de l'anticòs secundari corresponent. S'incuba 1 hora a temperatura ambient en agitació. Posteriorment, es renta dues vegades amb 1 ml de PBS-Tritó (PBS 1X; 0,1% Tritó-X100), 10 min en agitació. I seguidament es fan dos rentats més amb 1 ml de PBS 1X, 10 min en agitació. Per acabar, es munten els cobreobjectes en portaobjectes, afegint 3-5 μ l de solució DAPI-Mowiol. Les mostres s'han analitzat per microscòpia confocal (microscopis Leica TCS SPE i Leica TCS SP5).

Solució bloqueig per cèl·lules **Solució DAPI-Mowiol**

PBS 1X

0,1 % Tritó X-100

1 g/l BSA

100 μ l DAPI 2 ng/ μ l

900 μ l antiFADE-Mowiol (Calbiochem-Novabiochem)

C.2.5.L.2. Immunolocalització a cèl·lules HeLa

En el protocol per les immunolocalitzacions a cèl·lules HeLa, es cultiven les cèl·lules en un flascó unit a un portaobjectes, Slideflasks (Nunc), per tal de tenir les cèl·lules crescudes adherides directament al portaobjectes on es realitza posteriorment la immunolocalització. Un cop les cèl·lules estan crescudes, s'elimina el medi de cultiu, es renta un cop amb PBS 1X. A continuació es treu el PBS 1X, i es fixen les cèl·lules afegint 1 ml de paraformaldehid 4% (diluint en PBS) dins el flascó Slideflasks (Nunc), incubant 15 min a temperatura ambient sense agitació. Seguidament, es treu el paraformaldehid i es fan 3 rentats de 5 min en agitació a temperatura ambient amb 1 ml de PBS 1X. Es fan dos rentats més amb 1 ml de solució de bloqueig, 10 min en agitació. Tot seguit, es treu el líquid i es desenganxa el portaobjectes del flascó per treballar, a partir d'aquest punt, amb el portaobjectes sol. Damunt el portaobjectes es posen 100 μ l de la dilució corresponent de l'anticòs primari en solució de bloqueig, es cobreix amb un cobreobjectes i es situa la preparació dins una cambra humida. S'incuba 1 hora a temperatura ambient sense agitació i després tota la nit a 4°C també sense agitació. Al dia següent es treu el

Materials i mètodes

cobreobjectes, i es fan dos rentats de 10 min en una cubeta portaobjectes amb solució de bloqueig, en agitació. Després, es treuen els portaobjectes de la cubeta i sobre el portaobjectes s'afegeixen 100 µl d'una dilució 1:400 en solució de bloqueig de l'anticòs secundari corresponent, es posa un cobreobjectes, es situa la preparació dins la cambra humida i s'incuba 1 hora a temperatura ambient sense agitació. Posteriorment, es treu el cobreobjectes, es posa el portaobjectes i es fan 2 rentats dins la cubeta portaobjectes amb PBS-Tritó (PBS 1X; 0,1% Tritó-X100), 10 min en agitació. Seguidament es fan dos rentats més amb PBS 1X, 10 min en agitació. Per acabar, es munten els cobreobjectes en portaobjectes, afegint 10-15 µl de solució DAPI-Mowiol, per cobrir tot el portaobjectes. Les mostres s'han analitzat per microscòpia confocal (microscopis Leica TCS SPE i Leica TCS SP5).

Solució bloqueig per cèl·lules **Solució DAPI-Mowiol**

PBS 1X

0,1 % Tritó X-100

1 g/l BSA

100µl DAPI 2 ng/µl

900 µl antiFADE-Mowiol (Calbiochem-Novabiochem)

C.2.4.L.3. Immunolocalització a cromosomes politènics

Per a realitzar immunolocalitzacions en cromosomes politènics cal disseccionar glàndules salivals de larva en el tercer estadi, crescudes amb llevat en pols dins els tubs perquè siguin larves grans amb glàndules salivals grosses, i preparar cromosomes politènics.

S'agafen larves en tercer estadi, s'extreuen les glàndules salivals en medi Cohen-Gotchell i s'hi incuben durant 8-10 min (mai més de 10 min). Es deixen les glàndules el més netes possibles, intentant eliminar al màxim el teixit adipós que les envolta. Seguidament les glàndules es fixen 2 min amb solució fixadora 1 i seguidament amb solució fixadora 2 durant 3 min. Sobre un cobreobjectes siliconitzat net es posen 20 µl de solució fixadora 2 i a sobre es col·loquen les glàndules salivals. Es neteja un portaobjectes amb etanol i es posa el portaobjectes sobre el cobreobjectes fins que queda en contacte amb la gota que conté les glàndules. Es gira el portaobjectes unit al cobreobjectes deixant a la part superior el cobreobjectes. A continuació, amb una agulla emmanegada es fan copets secs damunt el cobreobjectes per tal de trencar els nuclis de les glàndules i així deixar lliures els cromosomes politènics. Seguidament es pressiona el cobreobjectes amb força utilitzant el dit polze i intentant que el cobreobjectes no es mogui. Aquest pas s'anomena *squash* i pretén estendre al màxim els cromosomes politènics. Finalment, es submergeix la preparació en nitrogen líquid i quan està congelada, es treu el cobreobjectes i es submergeix la preparació dins una cubeta de portaobjectes amb PBS 1X.

Medi Cohen-Gotchell

25 mM Na-glicerol 3 fosfat
10 mM KH₂PO₄
30 mM KCl
10 mM MgCl₂
3 mM CaCl₂
160 mM Sacarosa
0,5 % Nonidet P-40 o IGEPAL

Solució fixadora 1

PBS 1X
2 % formaldehid (37 %)

Solució fixadora 2

45 % àcid acètic
2 % formaldehid (37 %)

Per la immunolocalització es fan 3 rentats de 5 min amb PBS 1X, 0,05% Tween 20 en agitació dins la cubeta de portaobjectes. Seguidament es treuen les preparacions de la cubeta de portaobjectes i es bloquegen les preparacions 2 cops durant 20 min posant 30 µl de solució de bloqueig damunt els cromosomes politènics, es tapa amb un cobreobjectes i es posen les preparacions dins una cambra humida per tal que les preparacions no s'assequin. Després es dilueix l'anticòs primari a la concentració adient amb solució de bloqueig i es deixa tota la nit a 4°C sense agitació. El dia següent es fan tres rentats de 5 min en agitació a la cubeta portaobjectes amb PBS 1X, 0,05% Tween 20. Després de l'últim rentat s'incuben les preparacions dins la cambra humida amb 30 µl d'anticòs secundari diluït 1:400 en solució de bloqueig. Seguidament, es fan 3 rentats de 5 min en agitació a la cubeta de portaobjectes amb PBS 1X, 0,05 % Tween 20 i un rentat final de 5 min amb PBS 1X. Per acabar, es munten les preparacions amb una barreja de DAPI-Mowiol i s'analitzen per microscòpia confocal.

Solució bloqueig politènics

PBS 1X
0,05 % Tween 20
1 % BSA

C.2.4.L.4. Immunolocalitzacions a embrions de *Drosophila*

Per fer immunolocalització d'embrions de *Drosophila*, primerament cal recollir els embrions. Per això, es preparen nius amb plaques de posta per tal de recollir els embrions de l'estadi desitjat. Seguidament es decorionen durant 2-3 min amb hipoclorit sòdic diluït al 2% amb H₂O sobre la placa de posta. Es passen els embrions amb l'hipoclorit a través d'un embut de vidre fritat connectat a una bomba de buit que té una membrana molt fina per retenir els embrions. Es embrions ja decorionats es renten amb PBS 1X / 0,1% Tritó-X100, es recullen amb un pinzell i es passen a un vial de vidre que conté 2 ml de PEM, 2 ml d'heptà i 250 µl de formaldehid. S'incuben durant 20 min en agitació constant. Els embrions queden retinguts a la interfase. S'elimina la fase aquosa inferior amb una pipeta, s'afegeixen 2 ml de metanol i es vortexa durant 20 segons. Amb una pipeta *Pasteur* es recullen els embrions que queden al fons

Materials i mètodes

del vial, que són els ous que han estat fecundats i han perdut la membrana vitel·lina, i es transfereixen a un tub d'1,5 ml amb metanol. Es renten 3 vegades amb metanol i es guarden un mínim de 12 hores a 4°C abans de seguir amb el protocol.

PEM

0,1 M PIPES pH 6,9

1 mM EGTA

2 mM MgSO₄

Per a la immunolocalització es renten els embrions ràpidament 3 cops amb PBS 1X, 0,3 % Tritó-X100, per eliminar el metanol. Seguidament els embrions es bloquegen els embrions fent 3 incubacions de 10 min agitant-se a la roda amb solució de bloqueig per embrions S'incuben tota la nit a 4°C en agitació constant a la roda amb 600 µl d'anticòs primari, diluït en solució de bloqueig a la dilució corresponent segons l'anticòs.

L'endemà, es renten ràpidament 3 cops amb la solució de bloqueig, i es fan 4 rentats de 10 min a la roda a temperatura ambient, amb la mateixa solució. Tot seguit, s'incuben 2 hores a temperatura ambient agitant-se a la roda amb l'anticòs o anticossos secundaris, diluïts 1:400 en solució de bloqueig, protegits de la llum. Els anticossos secundaris estan conjugats a un fluorocrom i són fotosensibles. Acabada la incubació, els embrions es renten ràpidament 3 cops amb PBS 1X, 0,3% Tritó-X100. Seguidament, es fan 4 rentats de 10 min amb la solució de bloqueig i un rentat final de 10 min amb PBS 1X. Per tenyir el DNA s'incuben els embrions en 500 µl de PBS 1X + 5 µl de DAPI (2 ng/µl), 15 min a temperatura ambient, agitant-se a la roda. Per últim, es renten 3 cops durant 5 min amb PBS 1X, 0,3 % Tritó-X100, i es munten els embrions sobre un portaobjectes en medi de muntatge antiFADE Mowiol (Calbiochem-Novabiochem). Les mostres s'analitzen per microscòpia confocal. En el nostre cas vam fer servir els microscopis Leica TCS SPE i Leica TCS SP5.

Solució bloqueig per embrions

PBS 1X

0,3 % Tritó X-100

2 % BSA

C.2.4.L.5. Immunolocalitzacions de discos imaginals de larves

Es col·loquen les larves, en PBS 1X fred i es parteixen per la meitat. La meitat posterior es descarta i la meitat anterior es gira amb les pinces de dissecció deixant en contacte els òrgans interns amb el medi. Es posen un màxim de 12 larves partides i girades en un tub de 0,5 ml i es fixen amb paraformaldehid 4% (diluït en PBS 1X) 15 min en agitació en una roda a temperatura ambient. Es fan 3 rentats ràpids amb PBS 1X, 0,3 % Tritó X-100, i després es deixen en PBS 1X, 0,3% Tritó X-100 durant 20 min en agitació a la roda. Seguidament, es bloquegen els teixits durant 10 min amb solució de bloqueig (PBS 1X, 0,3% Tritó-X100, 2% BSA), agitant-se a la roda, es treu la solució de bloqueig i es torna a posar solució de bloqueig nova (es fan 3 bloquejos). Tot seguit, s'incuben els teixits tota la nit a 4°C en agitació a la roda, amb 600 µl d'anticòs primari, diluït en solució de bloqueig. Al dia següent, es renten ràpidament 3 cops amb la solució de bloqueig, i es fan 4 rentats de 10 min en agitació a la roda, amb la mateixa solució. Tot seguit, s'incuben 2 hores a temperatura ambient amb l'anticòs o anticossos secundaris, diluïts 1:600 en solució de bloqueig, protegits de la llum. Acabada la incubació, es renten els teixits ràpidament 3 cops amb PBS 1X, 0,3% Tritó-X100. Seguidament, es fan 4 rentats de 10 min girant a la roda amb la solució de bloqueig. Es fa un rentat de 10 min amb PBS 1X. Per fer la tinció amb DAPI, s'incuben els teixits en 500 µl de PBS 1X + 5 µl de DAPI (2 ng/µl) durant 15 min a temperatura ambient, agitant-se a la roda. Finalment, es fan 3 rentats de 5 min amb PBS 1X; 0,3% Tritó-X100, es disseccionen els teixits recollint els discos imaginals d'ala, halteri i potes, i es munten en antiFADE Mowiol (Calbiochem-Novabiochem). Les mostres s'han analitzat utilitzant microscòpia confocal (microscopis Leica TCS SPE i Leica TCS SP5).

C.3. Sistema d'expressió ectòpica a *Drosophila*

Per expressar proteïnes i *hairpins* d'RNAi ectòpicament a *Drosophila* s'utilitza el sistema de d'expressió UAS-GAL4. Aquest sistema consisteix en el creuament de dues mosques que porten diferents construccions. La presència de les dues construccions a la descendència permet l'expressió del gen d'interès. Una mosca parental conté el cDNA de GAL4 que codifica la proteïna activadora GAL4 de llevat, sota el control d'un *driver* o controlador. Els *drivers* o controladors consisteixen en la regió promotora de gens amb patró d'expressió conegut que permeten saber on s'expressarà GAL4 i permetrà l'expressió del transgèn. L'altra mosca parental porta una construcció amb el gen d'interès que es vol expressar, sota el control d'una regió promotora per GAL4 amb seqüències UAS, que permeten la unió de GAL4 (*Upstream Activation Sequence*). En la F1, les mosques contenen les dues construccions, l'activador GAL4, s'expressa en els teixits on el *driver* és actiu, s'uneix a les seqüències UAS i permet l'expressió del gen d'interès (veure figura C.6).

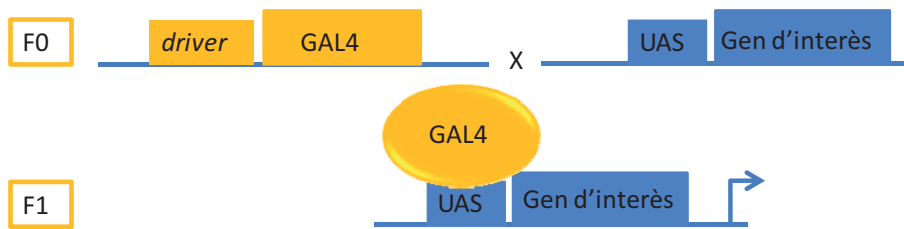


Figura C.6. Esquema de funcionament del sistema d'expressió UAS-GAL4. El creuament d'una mosca que conté la seqüència que codifica GAL4 sota el control d'un *driver* o controlador i d'una altra mosca que conté el gen d'interès sota una regió promotora per GAL4 que conté seqüències UAS. En la F1, la presència de les dues construccions fa que GAL4 s'expressi en els teixits on *driver* és actiu, s'uneixi a les seqüències UAS i permeti l'expressió del gen d'interès.

C.4. Assajos de *microarray*

C.4.1. Condicions experimentals dels diferents assajos de *microarray*

C.4.1.A Condicions experimentals del *microarray* de sobreexpressió

Hem dissenyat tres tipus de *microarrays* per a la realització dels experiments de sobreexpressió: un per a sobreexpressar $GAGA_{519}$, un altre per a sobreexpressar $GAGA_{581}$ i finalment un de sobreexpressió de GFP com a control. Per evitar tenir efectes indesitjats fruit de la sobreexpressió, hem utilitzat un sistema per expressar els transgens que és induïble en el temps i en l'espai. Aquest sistema consisteix en l'ús combinat del sistema UAS-GAL4 (explicat en l'apartat C.3) i un mutant termosensible de GAL80 ($GAL80^{ts}$), que és un repressor de l'activitat transcripcional de GAL4. $GAL80^{ts}$ a 18°C s'uneix a GAL4 i l'inactiva, però a 30°C $GAL80^{ts}$ canvia de conformació, no pot interaccionar amb GAL4 i no el reprimeix. Per tant, GAL4 queda lliure per poder unir-se als llocs UAS i donar lloc a l'expressió del transgèn (veure figura C.7). Així, el sistema permet expressar el transgèn quan es desitja, al realitzar el canvi de temperatura, i s'expressa allà on es vol segons el *driver* per GAL4 que s'utilitza. En els nostres experiments, $GAL80^{ts}$, s'expressa sota el control del promotor *Tubulina* i GAL4 sota el control del *driver Actina*, *Act-GAL4*.

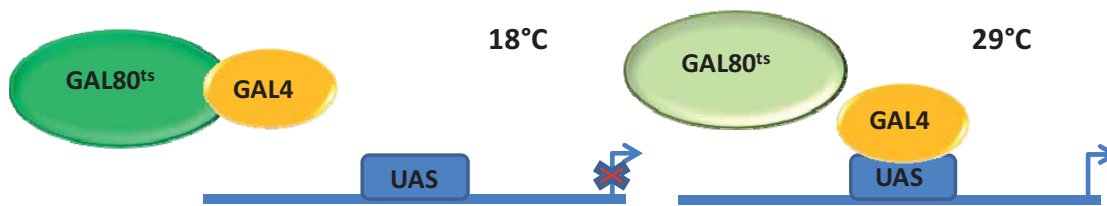


Figura C.7. Esquema de funcionament del sistema GAL4-GAL80^{ts}.

A la taula C.5 es poden observar els diferents creuaments utilitzats per a la realització dels diferents *microarrays* de sobreexpressió. De cada creuament s'obtenen mosques que no sobreexpressen el transgèn, i per tant, són controls negatius i mosques que sí que expressen el transgèn. Les mosques que no expressen els transgens es diferencien de les que sí que els expressen perquè contenen el cromosoma balancejador *TM6B* que porta associat un marcador *tubby*. El marcador *tubby* fa que fenotípicament les larves siguin més petites i es puguin distingir fàcilment. Hem utilitzat les larves *tubby* com a control negatiu de sobreexpressió a l'hora de fer les proves per posar a punt els sistema de sobreexpressió. Per fer els *microarrays* no hem utilitzat les larves *tubby* com a control perquè la presència del cromosoma balancejador *TM6B* fa que siguin larves amb un fons genètic diferent que les que no el tenen i per tant, podrien observar diferències en el *microarray*.

GAGA ₅₁₉	♀ <i>ActinaGAL4/TM6B</i> x ♂ <i>TubulinaGAL80</i> ; UASGAGA ₅₁₉ 17.5
GAGA ₅₈₁	♀ <i>ActinaGAL4/TM6B</i> x ♂ <i>TubulinaGAL80</i> ; UASGAGA ₅₈₁ 22.1
Control Negatiu	♀ <i>ActinaGAL4/TM6B</i> x ♂ <i>TubulinaGAL80</i> ; UASGFP

Taula C.5. Creuaments utilitzats en els *microarrays* de sobreexpressió.

Així doncs, per fer els assajos de *microarray* de sobreexpressió, hem utilitzat com a control les larves de tercer estadi (no *tubby*) que contenen el transgèn però que no l'expressen (sense induir). Per altra banda, hem agafat les larves de tercer estadi (no *tubby*) després d'induir els tubs dels creuaments 13 hores a 29°C. Aquestes larves induïdes, expressen el transgèn.

A partir de les larves control (no *tubby*, no induïdes) i de les larves que sobreexpressen (no *tubby*, induïdes), hem agafat 25 discos de larva 3 per extreure'n l'RNA total. L'extracció d'RNA total s'ha realitzat seguint el protocol de l'apartat C.4.4.A. Seguidament, s'ha comprovat la qualitat de l'RNA total obtingut utilitzant els aparells *Nanodrop 2000* i *Bioanalyzer 2100*. Posteriorment les mostres, per duplicat, han sigut processades a la unitat de Genòmica

Materials i mètodes

funcional, de l'IRB (Institut de Recerca Biomèdica), sota la direcció del Dr. Herbert Auer, on s'han hibridat amb *arrays* del tipus "*Drosophila Genome 2.0 Array*", d'Affymetrix. A la figura C.8 hi ha representat un esquema amb els diferents passos per obtenir les mostres dels *microarrays* de sobreexpressió.

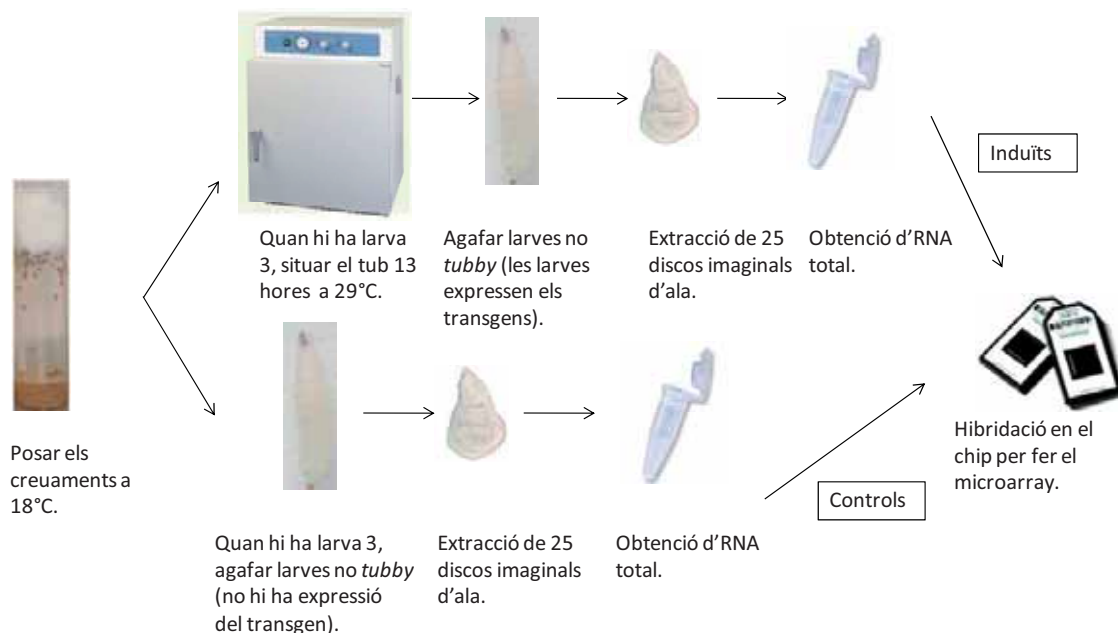


Figura C.8. Esquema general de les diferents etapes per obtenir les mostres dels *microarrays* de sobreexpressió. Aquests passos s'han fet pels diferents creuaments per sobreexpressar $GAGA_{519}$, $GAGA_{581}$ i GFP. A partir dels tres tipus de creuament s'ha obtingut una mostra control (no induïda) i una mostra induïda.

C.4.1.B. Condicions experimentals del *microarray* de falta de funció

Pel *microarray* de falta de funció hem expressat, a disc imaginal d'ala, un *hairpin* RNAiGAGA i un *hairpin* control RNAiGFP sota el control del *driver* 69-GAL4. A la taula C.6, es poden observar els dos tipus de creuaments realitzats.

GAGA	♀ $69BGAL4$ x ♂ UASRNAi GAGA 9.1 ; +
Control Negatiu	♀ $69BGAL4$ x ♂ UASRNAi GFP 62.1 ; +

Taula C.6. Creuaments utilitzats en el *microarray* de falta de funció.

Per la realització d'aquest tipus de *microarray*, hem posat a 25°C els creuaments indicats a la taula C.6. Passats els dies, hem recollit larves de tercer estadi i hem extret 25 discos de cada

condició (RNAiGAGA i RNAiGFP) per obtenir RNA total. L'extracció d'RNA s'ha fet segons el protocol detallat en l'apartat C.2.4.A. Seguidament, hem comprovat que aquest RNA total obtingut fos un RNA de qualitat utilitzant els aparells *Nanodrop 2000* i *Bioanalyzer 2100*. Posteriorment les mostres, per duplicat, han sigut processades a la unitat de Genòmica funcional, de l'IRB (Institut de Recerca Biomèdica), sota la direcció del Dr. Herbert Auer, on s'han hibridat amb *arrays* del tipus "*Drosophila Genome 2.0 Array*", d'Affymetrix. A la figura C.5 es troba l'esquema pel procés d'obtenció de les mostres pel *microarray* de falta de funció.

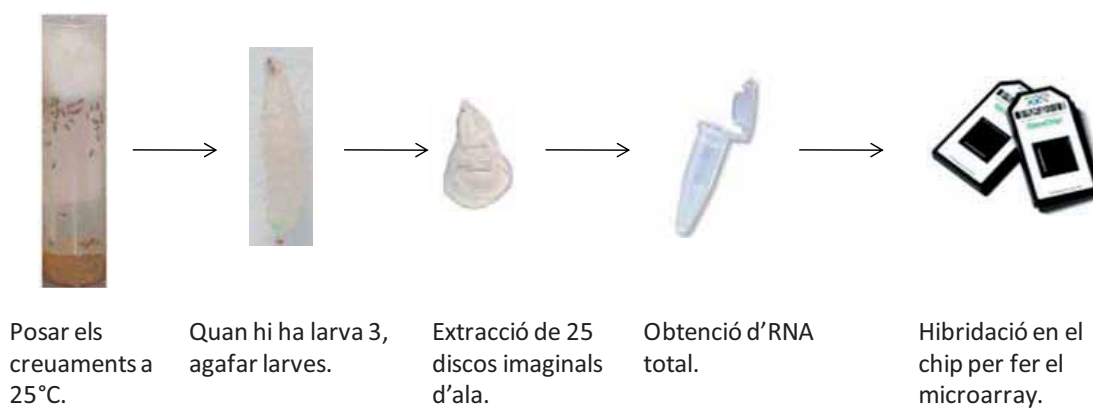


Figura C.9. Esquema general de les diferents etapes per obtenir les mostres dels *microarrays* de falta de funció. Els diferents creuaments s'han situat a 25°C, des de l'inici. Quan en el tub hi ha hagut larva 3, s'han agafat les larves de cada condició (RNAiGAGA i RNAiGFP, control) per extreure 25 discos i fer l'extracció d'RNA total.

C.4.2. Anàlisi estadística dels *microarrays*

L'anàlisi estadística de les dades obtingudes dels experiments de *microarray*, van ser realitzades pel Dr. David Rossell, i Evarist Planet de la unitat de Bioinformàtica i Bioestadística de l'IRB (Institut de recerca Biomèdica), ubicat al PCB (Parc Científic de Barcelona). La informació sobre l'expressió gènica que es va obtenir es va normalitzar via RMA (Irizarry et al. 2003), tal com està implementat a la funció *justRMA* del *software* Bioconductor (Gautier et al. 2004; Gentleman et al. 2004). Per a la comparació dels resultats de mostres no induïdes (control) i induïdes de cada experiment es van realitzar tests estadístics *t-test* moderats (Smyth 2004), tal com estan implementats a la llibreria *limma* de Bioconductor. Seguidament, es va calcular la probabilitat de que cada gen estigués diferencialment expressat (comparant no induït i induït) per ajust a una densitat *t* parcial semi-paramètrica (Rossell et al. 2008), i es va obtenir un llistat de gens diferencialment expressats controlant el "Bayesian FDR" (*False Discovery Rate*) per sota del 5% (Müller et al. 2004).

C.4.3. Anàlisi dels processos biològics

L'anàlisi dels processos biològics del llistat de gens diferencialment expressats (*Gene Ontology*) es va dur a terme utilitzant el *software* DAVID (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*), disponible *on line* a l'adreça següent: (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). Aquest programa permet agrupar els gens diferencialment expressats en categories funcionals i permet tenir una idea dels diferents processos biològics en que estan implicats els gens del llistat.

El programa DAVID només analitza els gens dels que es coneix informació (empírica o inferida per homologia de seqüència) i pot agrupar els gens en diferents categories funcionals. S'introdueixen les identifications de les diferents sondes d'interès dels *microarrays* i el programa principalment proporciona anàlisis d'enriquiment de termes GO (*Gene Ontology*) per remarcar els GO més rellevants associats a un llistat de gens, gràcies a un algoritme analític d'enriquiment. Sobre les diferents sondes introduïdes en el programa DAVID s'analitzen les categories funcionals per entendre el significat biològic que es pot trobar darrere del llistat de gens i d'aquesta manera, permet veure en quines funcions participen els gens de la llista.

Hi ha diferents tipus d'anàlisi dins el programa DAVID. Nosaltres en aquest treball hem fet servir les funcions *Functional Annotation Chart* i *Functional Annotation Clustering*.

En la *Functional Annotation Chart* s'anoten les diferents categories funcionals on els gens de la llista es poden agrupar. Tots els resultats han de passar diferents llindars. A cada categoria se li assigna un valor p modificat o EASE Score que és un valor p modificat respecte el test *Fisher exact*. Aquest valor indica la probabilitat que es doni l'agrupament dels gens, respecte el que es podria donar per atzar. Com més petit és el p valor, més significatiu és el grup. Per evitar contar gens duplicats, si hi ha més d'una sonda per gen, l'estadístic modificat valor p (EASE Score), es calcula en base a la identificació de gens ID del programa DAVID on s'eliminen gens redundants. Per defecte, en la *Functional Annotation Chart*, les categories funcionals han de tenir una probabilitat màxima (*ease score*) $\leq 0,1$ i hi ha d'haver un mínim de dos gens per establir un grup de categoria funcional.

La funció *Functional Annotation Clustering*, genera grups de gens amb anotacions funcionals similars (clústers) seguint la hipòtesi que les anotacions funcionals similars han de contenir gens similars. A cada clúster se li assigna un valor anomenat *enrichment score*. L'*enrichment score* és la mitjana geomètrica, del valor p (EASE Score) de les funcions biològiques dins un clúster expressat en escala -log. És una estimació de quant enriquida està la llista de gens en una agrupació de funcions biològiques concretes, respecte del que es podria donar per atzar. Aquest valor *enrichment score* és el que permet ordenar els diferents clústers segons la seva significació biològica; com més alt és l'*enrichment score*, més significatiu és el

grup. Els clústers amb major *enrichment score* són els que contenen grups d'anotacions funcionals amb un menor valor p i per tant, més significatius.

C.4.4. Comparativa dels gens dels *microarrays* amb els gens positius en ChIP-on-Chip de GAGA

Per anar més enllà de l'anàlisi de les nostres dades de *microarrays* vam voler comparar els gens diferencialment expressats amb dades de ChIP-on-Chip de GAGA presents a la bibliografia. Existeixen dos treballs que presenten ChIP-on-Chip de GAGA, un fet a cèl·lules S2 (Lee et al. 2008) i l'altre fet a embrions (Schuettengruber et al. 2009). Els membres de la unitat de bioinformàtica i bioestadística de l'IRB van processar les dades d'ambdós ChIP-on-Chip per fer el màxim de semblants els formats de les dades dels dos experiments i així poder fer l'anàlisi comparatiu dels dos ChIP-on-Chip.

Per a processar les dades del ChIP-on-Chip realitzat a cèl·lules S2 per Lee i col·laboradors, es va partir del fitxer amb les dades crues (CEL files) públicament disponibles (Lee et al. 2008), que van ser, generades per aquests autors a partir de "GeneChip® Drosophila Tiling 1.0R Arrays", d'Affymetrix. Les dades crues es van processar amb el software MAT (Johnson et al. 2006) per tal d'obtenir els valors de les intensitats del ChIP-on-Chip.

Per al ChIP-on-ChIP d'embrions (Schuettengruber et al. 2009) no hi havia les dades crues accessibles *on line*, només les dades pre-processades i per tant, no es va poder fer servir el programa MAT. Per poder fer el màxim de semblants els dos formats de dades, amb el ChIP-on-Chip d'embrions es va treballar amb les intensitats pre-processades i les seves posicions, de manera que el procés s'assemblés el màxim possible al format MAT (van fer servir criteris semblants als que té per defecte el MAT). En el ChIP-on-Chip d'embrions es van eliminar pics solitaris. Qualsevol pic que estigués lluny (>300 bases com al MAT) de qualsevol altre quedava eliminat. Els pics, que estaven a prop (<300 bases) els van ajuntar en un sol pic i es va afegir la informació del gen més proper. Si el pic queia en un gen, se li assignava aquest gen. Si queia a dos gens alhora se li assignaven tots dos. Si queia al promotor i no queia a cap altre gen també s'assignava, i també s'assignava en cas de que el promotor coincidia amb un altre gen.

Un cop es van tenir les dades dels dos ChIP-on-Chip amb un format similar es va fer un llistat en format excel dels gens amb pic assignat per cada ChIP-on-Chip, per tal de poder comparar els gens positius comuns entre els dos experiments i també per poder veure quins gens dels nostres *microarrays* també eren positius en els ChIP-on-Chip.

D. RESULTATS

D.1. Relació de GAGA amb la maquinària general de transcripció

Una de les principals funcions de GAGA és la de factor activador de la transcripció. La seva capacitat activadora ve donada pel domini Q, ric en glutamines, que permet l'activació (Vaquero et al. 2008). Aquesta capacitat està potenciada per la capacitat d'oligomerització del domini POZ, que permet posar en contacte promotors amb *enhancers* allunyats. El paper de GAGA com activador transcripcional està ben documentat però encara ara no es coneixen els mecanismes pels quals és capaç de dur a terme aquesta activació. Assajos de transcripció *in vitro* suggereixen que GAGA podria activar mitjançant l'estabilització del PIC, gràcies a la presència del seu domini Q, que per si sol ja és capaç d'ajudar a la formació del PIC (Vaquero et al. 2008). Un dels nostres objectius ha sigut intentar trobar alguna relació de GAGA amb la maquinària transcripcional per aconseguir tenir més indicis del seu mecanisme d'activació.

D.1.1. Distribució de GAGA respecte la maquinària general de transcripció

Per valorar la importància del paper de GAGA en l'activació transcripcional, vam voler veure la seva distribució respecte la maquinària general de transcripció. Resultats anteriors situen GAGA a les bandes eucromàtiques dels cromosomes politènics (Tsukiyama et al. 1994; Benyajati et al. 1997). Aquestes bandes corresponen a zones transcripcionalment actives on la cromatina es troba més accessible, i per tant, zones on també es pot trobar la maquinària general de transcripció. Per aquesta raó, vam voler mirar la col·localització de GAGA amb l'RNA polimerasa II i diferents TAFs del complex TFIID, en cromosomes politènics. La visió global de la col·localització amb la maquinària transcripcional pot donar una idea de com de general és l'associació de GAGA a aquests elements i així estimar la transcendència de GAGA en la funció activadora.

Resultats

D.1.1.A. GAGA col·localitza àmpliament amb l'RNA Polimerasa II

Coimmunolocalitzacions de GAGA i de l'RNA polimerasa II, en cromosomes politènics de larves control (*white*⁻), indiquen que les dues proteïnes no presenten un patró amb solapament general, però sí una elevada col·localització en gran nombre de bandes. Això suggereix que GAGA no sempre està associada a la polimerasa, tot i que en molts *loci* ambdues coincideixen (les bandes on hi ha una clara col·localització de les dues proteïnes estan marcades amb punts, veure figura D.1).

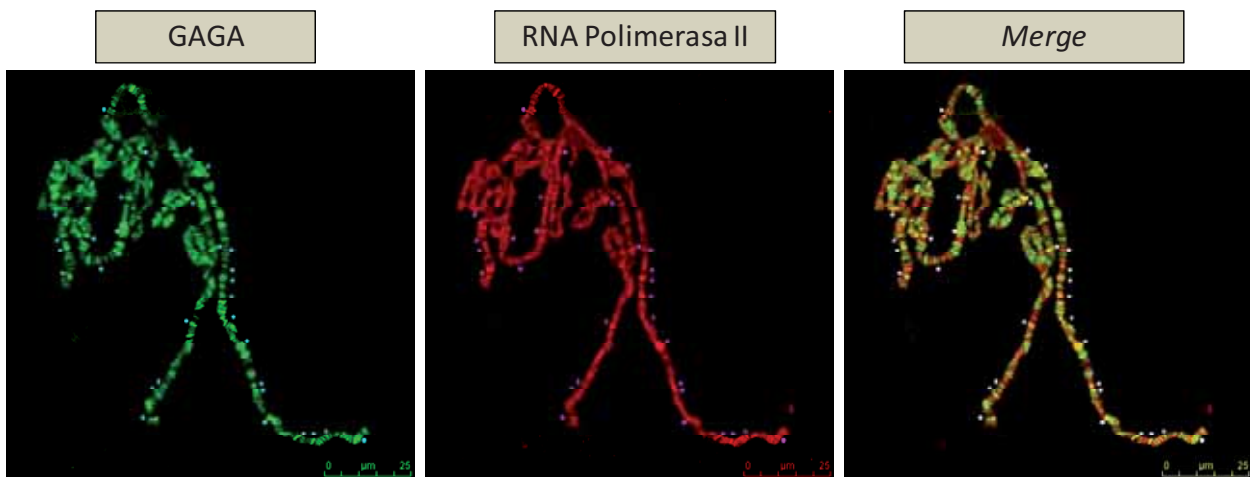


Figura D.1. Col·localització de GAGA amb l'RNA polimerasa II a cromosomes politènics. Projecció màxima d'imatges obtingudes al microscopi confocal Leica SPE d'immunolocalitzacions realitzades a cromosomes politènics de larves control (*white*⁻). A l'esquerra de la imatge s'observa el senyal dels cromosomes tenyits amb α -GAGA (verd), al centre amb α -CTD de l'RNA polimerasa II (vermell) i a la dreta la combinació dels dos senyals anteriors (*merge*). Les bandes on GAGA i l'RNA polimerasa II col·localitzen clarament, estan marcades amb punts.

Com que GAGA és capaç d'activar diferents promotors de forma dosi-dependent (tant *in vitro*, com *in vivo*), promovent la seva transcripció, vam decidir comprovar si variava la distribució GAGA-RNA polimerasa II sobreexpressant GAGA a glàndules salivals, utilitzant el sistema UAS-GAL4 descrit a l'apartat C.3 de Materials i mètodes. Les mateixes coimmunolocalitzacions de GAGA i RNA polimerasa II es van realitzar amb larves que sobreexpressaven GAGA₅₁₉ en glàndules salivals, gràcies al *driver* *lio*-GAL4 (veure figura D.2). Les mosques amb genotip: *w*⁻; *lio*GAL4/*Cyo*; UASGAGA₅₁₉/*TM3*; +/+, presenten unes glàndules salivals molt petites i arrugades degut als efectes deleteris de la sobreexpressió de GAGA. Molts dels politènics de les diferents preparacions, apareixen fragmentats i prims, indicant una major fragilitat aportada per un excés de GAGA a les glàndules. Tanmateix, aquesta sobreexpressió no augmenta el nombre de *loci* ocupats ni s'observa cap altra alteració en la distribució de GAGA. Tampoc s'aprecia una major col·localització de GAGA amb l'RNA polimerasa II.

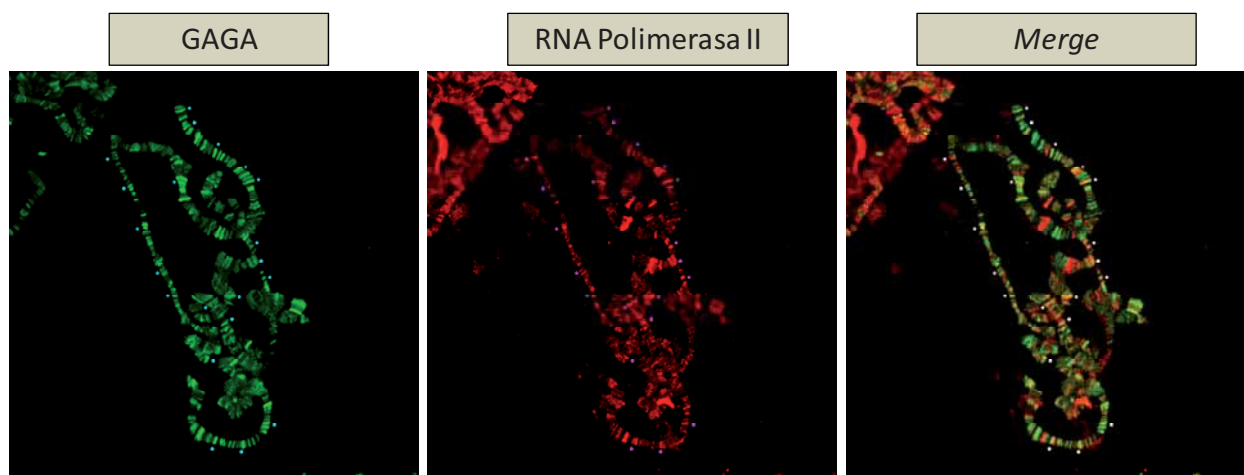


Figura D.2. Col·localització de GAGA amb l'RNA polimerasa II en larves que sobreexpressen GAGA sota el control del *driver lio-GAL4* a cromosomes politènics. Projecció màxima d'imatges obtingudes al microscopi confocal Leica SPE d'immunolocalitzacions realitzades a cromosomes politènics. A l'esquerra de la imatge, s'observa el senyal dels cromosomes tenyits amb α -GAGA (verd), al centre la tinció amb α -RNA polimerasa II (vermell) i a la dreta es troba combinació dels dos senyals verd i vermell (*merge*). Les bandes on hi ha col·localització de GAGA amb l'RNA polimerasa II estan marcades amb punts.

Se sap que l'RNA polimerasa II està altament regulada i que el CTD està sotmès a diferents estats de fosforilació (veure apartat A.1.2.A). L'RNA polimerasa II és reclutada per a la formació del PIC i abans de l'inici de transcripció es troba en forma hipofosforilada, anomenada forma IIA. Quan s'inicia la transcripció, la polimerasa passa a estar en forma fosforilada (forma IIO). Inicialment, hi ha una fosforilació a la serina 5, en aquest estat, l'RNA polimerasa només pot progressar entre 20 i 40 pb i s'anomena polimerasa pausada o *stalled polymerase*. Per a que la transcripció progressi i la polimerasa continuï elongant, es necessita una segona fosforilació del CTD a la serina 2.

Després d'observar la relació de GAGA amb la polimerasa II i de veure que totes dues comparteixen gran nombre de llocs d'unió, vam voler veure com es trobava GAGA respecte les diferents formes fosforilades de la polimerasa II. La idea era veure si GAGA es trobava enriquida en zones on la polimerasa es troba pausada, i per tant amb el CTD fosforilat a la serina 5, o bé en zones transcripcionalment actives on la polimerasa es troba en fase elongant i amb el CTD fosforilat la serina 2. Es van utilitzar anticossos específics contra la polimerasa modificada a la serina 5 i contra la polimerasa modificada a la serina 2 (veure figura D.3). En els nostres resultats no s'observa cap preferència clara de GAGA per alguna de les dues formes fosforilades de la polimerasa.

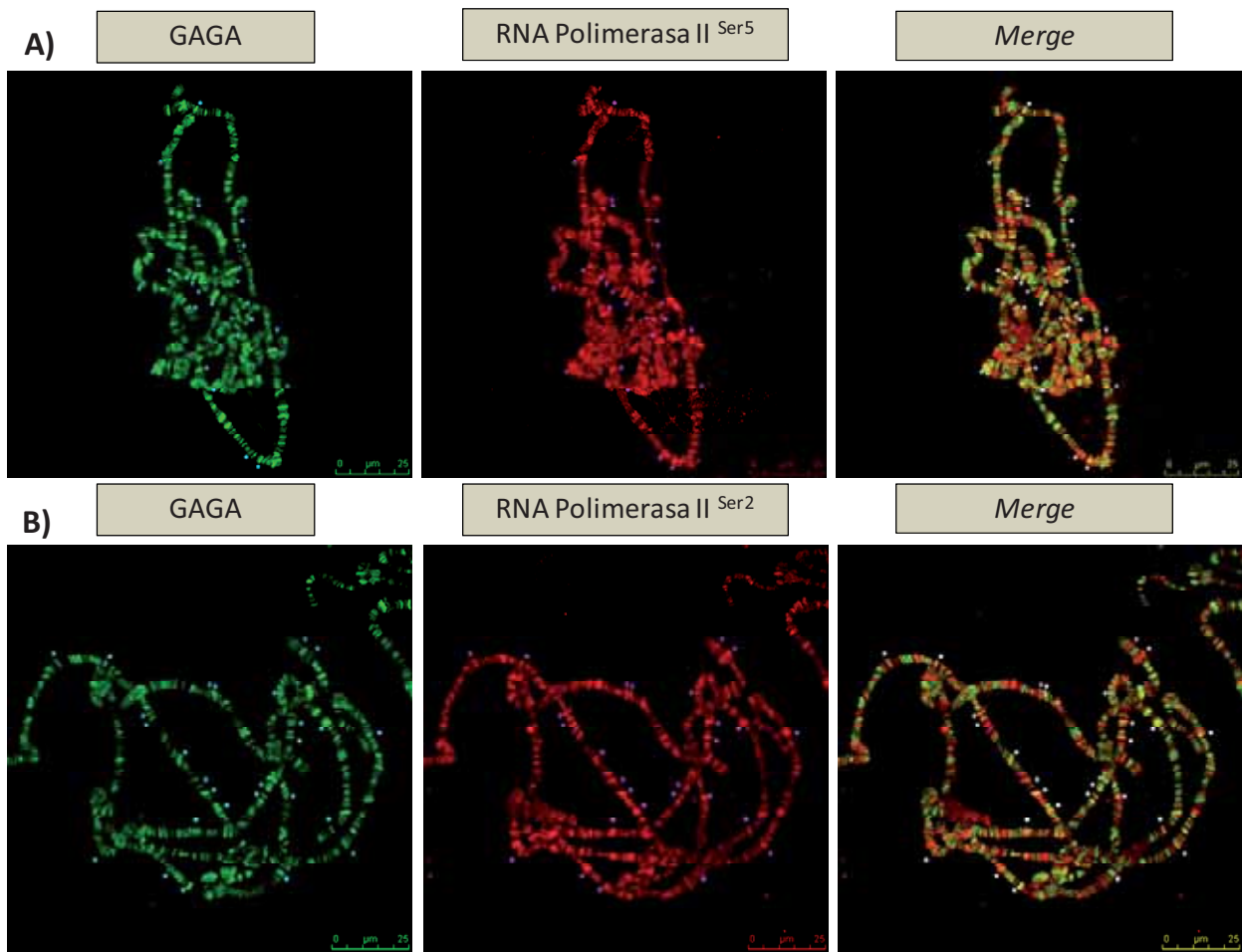


Figura D.3. Col·localització de GAGA amb diferents formes fosforilades de l'RNA polimerasa II a cromosomes politènics. Projecció màxima d'imatges obtingudes al microscopi confocal Leica SPE d'immunolocalitzacions realitzades a cromosomes politènics de larves control (*white*⁻). A les figures **A** i **B**, a l'esquerra de la imatge, trobem el senyal dels cromosomes tenyits amb α -GAGA (verd), al centre de la figura **A** la tinció amb l'anticòs α -RNA polimerasa II fosforilada a la serina 5 (vermell) i al centre a la figura **B** amb α -RNA polimerasa II fosforilada a la serina 2 (vermell). A la dreta de les dues figures **A** i **B** es troba combinació dels dos senyals verd i vermell (*merge*). Les bandes on hi ha col·localització de GAGA amb les RNA polimerasa II fosforilades estan marcades amb punts.

D.1.1.B. Elevada col·localització de GAGA amb components de TFIID

A més d'analitzar la relació de GAGA amb la polimerasa II, també vam voler estudiar la col·localització de GAGA amb altres components de la maquinària general de transcripció. Vam realitzar coimmunolocalitzacions amb TAF1, TAF3 i TAF4, components de TFIID. Els resultats mostren el mateix patró que s'obté amb l'RNA polimerasa II, un patró de bandes que col·localitzen amb GAGA en molts punts, però no d'una forma total, corroborant que GAGA s'associa als mateixos llocs que la maquinària general en un elevat nombre de *loci* (veure figura D.4).

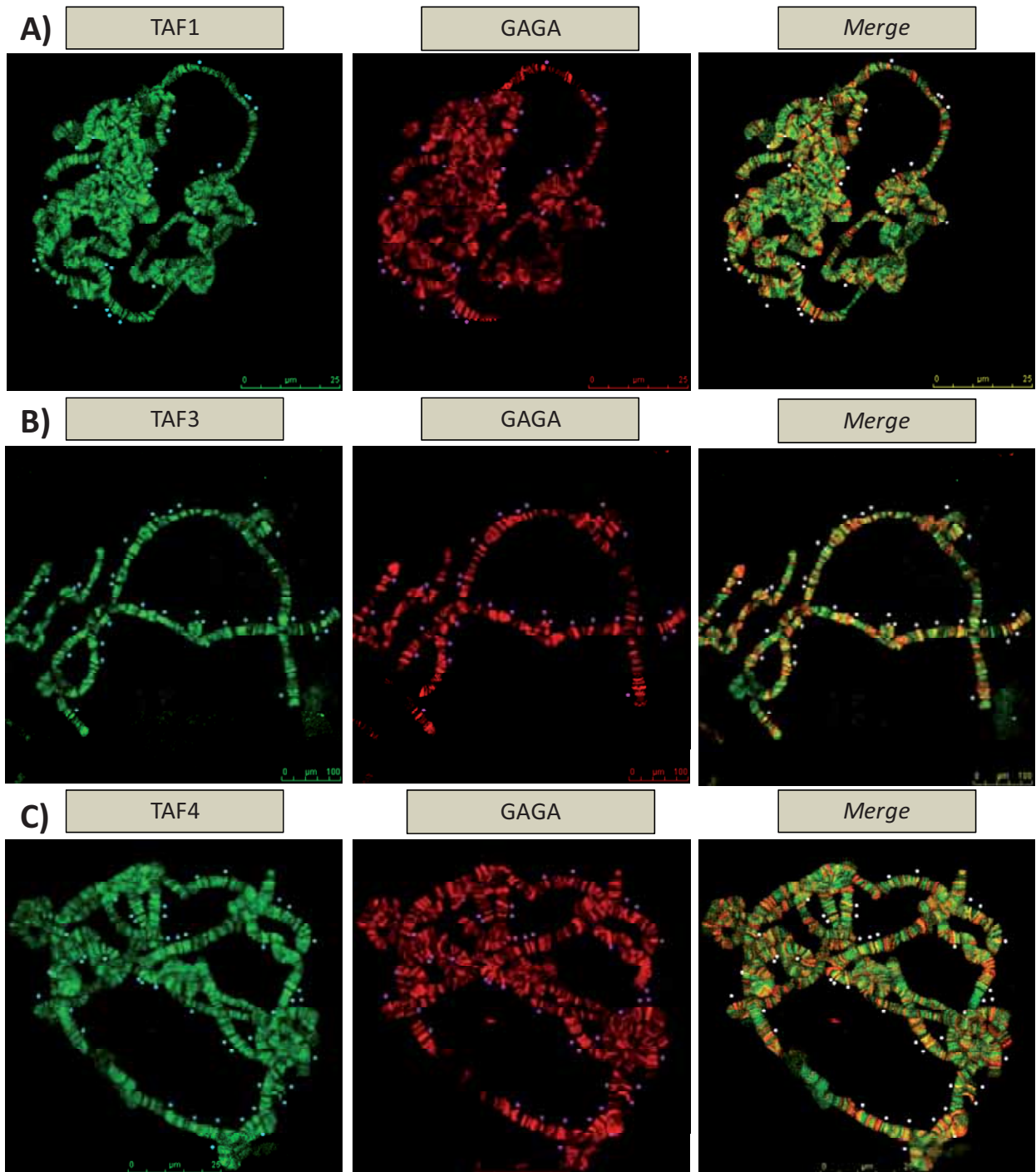


Figura D.4. Col·localització de GAGA amb diferents TAFs a cromosomes politènics. Projectió màxima d'imatges obtingudes al microscopi confocal Leica SPE d'immunolocalitzacions realitzades a cromosomes politènics de larves control (*white⁻*). A la part esquerra de les figures **A**, **B** i **C** s'observa el senyal dels cromosomes tenyits amb α -GAGA (verd), al centre de la figura **A** la tinció amb α -TAF1(vermell), a la figura **B** amb α -TAF3 i a la figura **C** amb α -TAF4 (vermell). A la dreta de les figures **A**, **B** i **C** es troba la combinació dels dos senyals verd i vermell (*merge*). Les bandes on hi ha col·localització de GAGA amb els diferents TAFs estan marcades amb punts.

D.1.2. Interaccions de GAGA amb la maquinària basal de transcripció

Un cop vam veure que a cromosomes politènics hi havia una bona correlació entre la localització de GAGA, l'RNA polimerasa i diferents components de TFIID, vam voler anar més enllà per intentar cercar interaccions de GAGA amb la maquinària transcripcional. En un estudi de dos híbrids massiu es va veure que GAGA és capaç d'interaccionar a llevat amb dos TAFs components de TFIID, TAF3 i TAF4 (Giot et al. 2003). Aquests resultats donaven la primera indicació d'una possible interacció directa de GAGA amb TFIID. Un dels nostres objectius ha sigut comprovar si realment GAGA és capaç d'interaccionar amb aquests dos TAFs de manera directa i, d'aquesta manera, corroborar el possible contacte de GAGA amb la maquinària general de transcripció.

D.1.2.A. GAGA interacciona amb TAF3

Per poder corroborar els resultats de l'assaig de dos híbrids massiu, on es veu que GAGA i TAF3 poden interaccionar, vam decidir fer assajos de coimmunoprecipitació. L'assaig el vam fer a partir d'extractes de cèl·lules S2, transfectades transitòriament sobreexpressant GAGA i TAF3-HA. Com a mostra control per la immunoprecipitació vam transfectar cèl·lules amb un plasmidi irrellevant, pUC19. Per fer la immunoprecipitació, tant en la mostra d'interès, com en la mostra control, vam fer servir anticòs α -HA per immunoprecipitar TAF3-HA i com a anticòs no específic de la immunoprecipitació l'anticòs α -tubulina.

El *western blot* resultat de la immunoprecipitació (veure figura D.5) el vam revelar amb anticòs α -HA per detectar TAF3-HA (part superior de la figura D.5); la mateixa membrana la vam revelar amb anticòs α -GAGA per poder detectar GAGA (part inferior de la figura D.5). Observant la figura es poden veure les dues proteïnes sobreexpressades en l'input. En l'últim carril, es pot veure que TAF3-HA ha immunoprecipitat correctament i en el mateix carril, a la part inferior de la figura, es pot veure una banda que mostra que GAGA ha coimmunoprecipitat, suggerint que les dues proteïnes poden interaccionar.

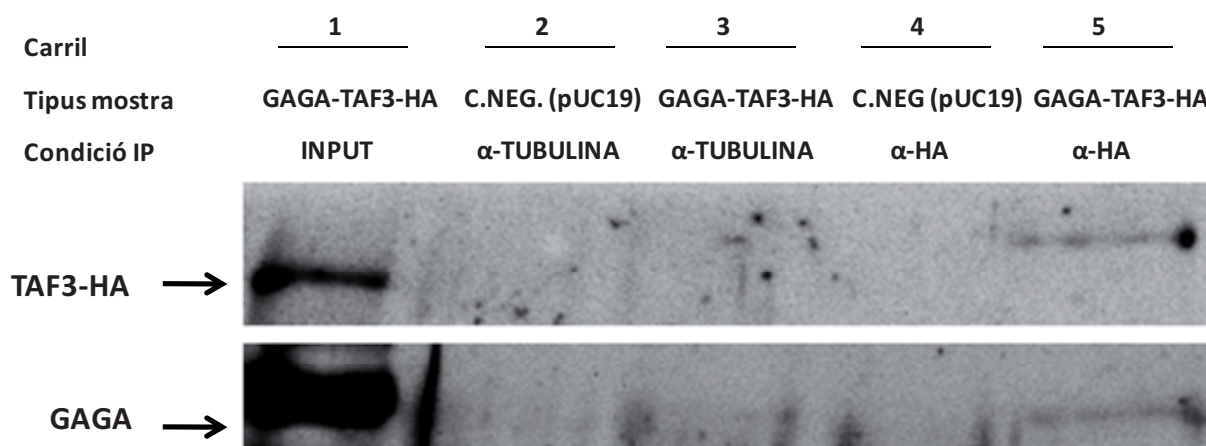


Figura D.5. Western blot de l'assaig de coimmunoprecipitació de TAF3-HA i GAGA. A la part superior de la figura, la membrana està revelada amb α -HA que permet detectar TAF3-HA. A la part inferior de la figura, la membrana està revelada amb α -GAGA. El primer carril és l'input de la immunoprecipitació on es veu TAF3-HA i GAGA sobreexpressats. El segon i tercer carrils corresponen a l'extracte del control negatiu i l'extracte on hi ha sobreexpressat GAGA i TAF3-HA immunoprecipitats amb l'anticòs irrellevant α -tubulina. Finalment, als dos últims carrils s'observa la mostra control i la mostra d'interès immunoprecipitades amb α -HA. A la part superior de la figura, a l'últim carril, es veu el senyal de TAF3-HA immunoprecipitat amb α -HA i a la part inferior es veu la banda de GAGA que ha coimmunoprecipitat.

Per aprofundir més en la interacció de les dues proteïnes vam realitzar assajos de *pull-down* per tal d'acotar el domini d'interacció de GAGA amb TAF3. La semblança entre els dominis POZ/BTB de GAGA i BAB1, proteïna capaç d'interaccionar amb TAF3 mitjançant el domini POZ (veure apartat A.3.4), indicava que GAGA podia ser una bona candidata a interaccionar amb TAF3 utilitzant el POZ com a domini d'interacció.

El *pull-down* es va realitzar mitjançant construccions delecionades de GAGA fusionades a GST i utilitzant extracte de proteïna recombinant del fragment de TAF3 BIP2G77 amb un *tag* d'histidines a N-terminal (His-BIP2G77), expressat i purificat a bacteris. No s'ha fet servir la proteïna sencera perquè no es va aconseguir expressar-la correctament a bacteris. Aquest fragment de TAF3, BIP2G77, va de l'aminoàcid 757 al 1091 i es va utilitzar per descriure la interacció amb Bric à Brac.

Contrari al que s'esperava d'entrada, GAGA i TAF3 no interaccionen pel POZ (veure figura D.6). En canvi, sí que hi ha senyal en el constructe POZ₂₄₅ que inclou el domini POZ i una part del domini X, suggerint que la interacció es dona més enllà del domini POZ. Amb la construcció Δ POZ₂₄₅ també hi ha interacció indicant que la zona de contacte va més enllà de l'aminoàcid 245. Finalment, el senyal amb el constructe X₂₄₅-BD, que inclou part del domini X i el DBD, acota la zona d'interacció entre la zona adjacent al domini POZ, la regió X i el DBD.

Resultats

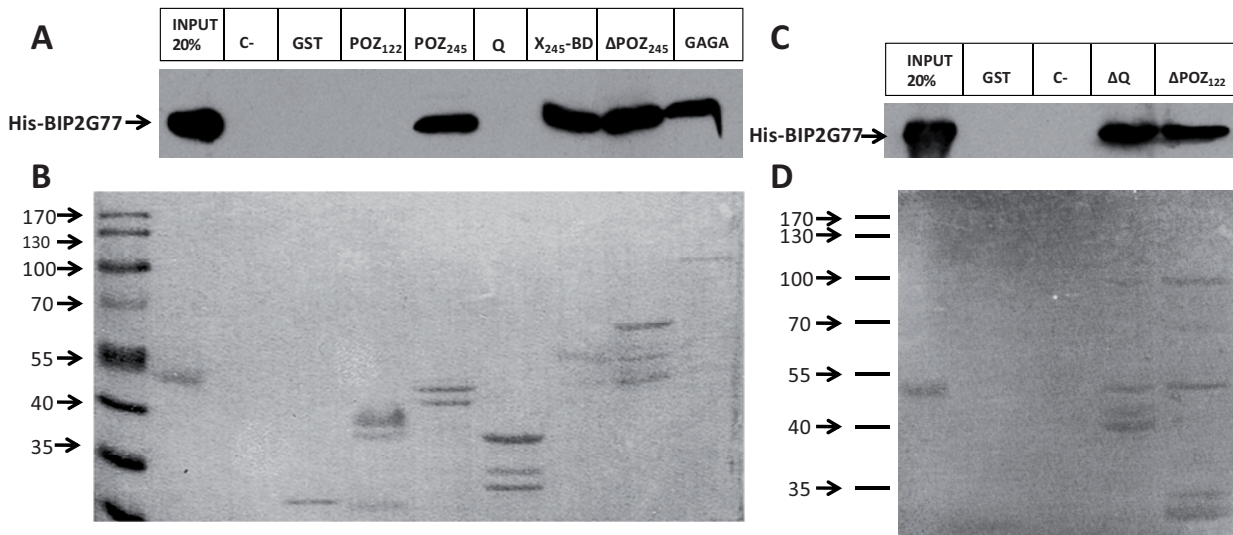


Figura D.6. (A i C) *Western-blot* de l'assaig de *pull-down* realitzat amb diferents construccions delecionades de GAGA fusionades a GST i el fragment de proteïna TAF3 (His-BIP2G77) expressat i purificat d'extractes bacterians. El *western* ha estat revelat amb α -His per poder detectar el senyal de His-BIP2G77. El control negatiu (c-) està realitzat amb boles sense cap proteïna unida i el carril GST és el control amb el GST sol, sense fusionar a cap proteïna. **(B i D)** Tincions de *ponceau* de les membranes A i C respectivament, de l'assaig de *pull-down* per veure el nivell d'expressió de cada proteïna (control de càrrega).

D.1.2.B. La interacció de Ttk69 amb TAF3 suggereix un model per a l'efecte repressor de Ttk69 sobre GAGA

Tenint en compte que TAF3 és un component de TFIID amb funció coactivadora i que, possiblement, és capaç d'interaccionar amb un cert nombre de proteïnes, vam considerar la possible interacció del factor Ttk69 amb TAF3. Ttk69 presenta domini POZ i s'ha caracteritzat que interacciona amb GAGA a través d'aquest domini (Pagans et al. 2002). L'estudi de la interacció Ttk69 i TAF3 ens va semblar de gran interès per continuar l'anàlisi de la capacitat activadora de GAGA i de la regulació d'aquesta activitat. Se sap que Ttk69 reprimeix l'activitat duta a terme per GAGA en el promotor *eve stripe 2*, però es desconeix encara el mecanisme pel qual Ttk69 permet aquesta repressió simplement interaccionant amb GAGA, sense necessitar llocs específics de seqüència en el promotor (Pagans et al. 2002).

Vam realitzar assajos de *pull-down* amb el fragment de la proteïna TAF3 (His-BIP2G77), sobreexpressat i purificat d'extractes bacterians i amb deleccions de Ttk69 fusionades a GST. En el mateix assaig, vam incloure-hi també GAGA i les deleccions POZ₁₂₂ i ΔPOZ₁₂₂. En el *western* de l'assaig de *pull-down* (veure figura D.7) es veu que Ttk69 és capaç d'interaccionar amb TAF3 (His-BIP2G77). La interacció amb el domini POZ de Ttk69 és molt dèbil suggerint més punts d'interacció.

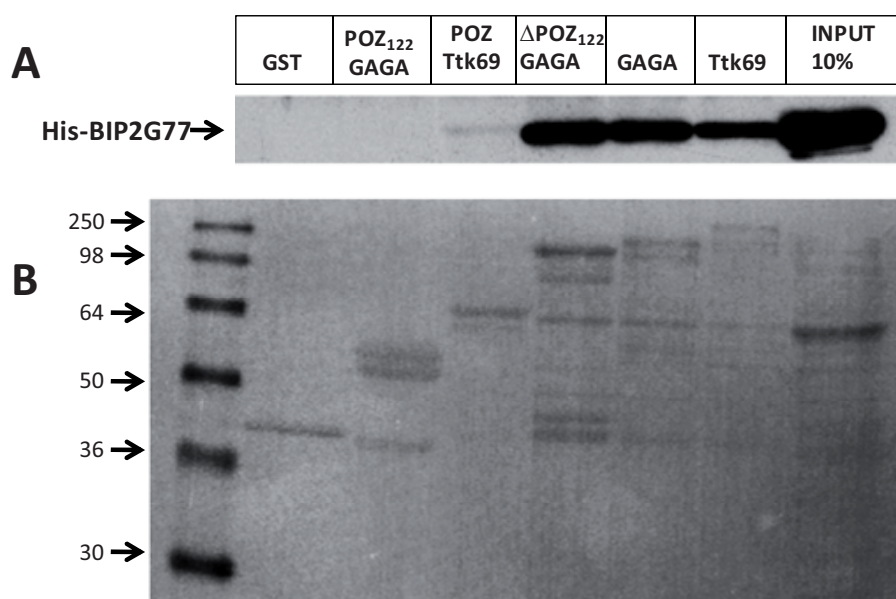


Figura D.7. **A)** *Western-blot* de l'assaig de *pull-down* realitzat amb diferents construccions de GAGA i Ttk69 fusionades a GST i el fragment de proteïna TAF3 (His-BIP2G77) expressat i purificat d'extractes bacterians. El *western* va ser revelat amb anticòs α-His per poder detectar el fragment de TAF3, His-BIP2G77. El carril GST és el control amb el GST sol sense fusionar a cap proteïna. **B)** Tinció de *ponceau* de la membrana de l'assaig de *pull-down* per veure el nivell d'expressió de cada proteïna (control de càrrega).

D.1.2.C. GAGA interacciona amb TAF4

Per confirmar la possible interacció entre GAGA i TAF4 vam realitzar assajos de coimmunoprecipitació similars als presentats a l'apartat D.1.2.A. En aquest cas, vam immunoprecipitar TAF4-HA amb anticòs α-HA i es va utilitzar α-tubulina com a anticòs irrellevant per la immunoprecipitació.

Es pot observar a la figura D.8 que TAF4 immunoprecipita de manera molt eficient (veure últim carril de la part superior de la figura D.9). Al revelar la membrana amb l'anticòs α-GAGA, es pot observar que GAGA coimmunoprecipita amb TAF4-HA (veure últim carril de la part inferior de la figura D.8). Aquest assaig de corrobora els resultats de l'assaig de dos híbrids massiu i denota que GAGA i TAF4 poden interaccionar *in vivo* a cèl·lules S2.

Resultats

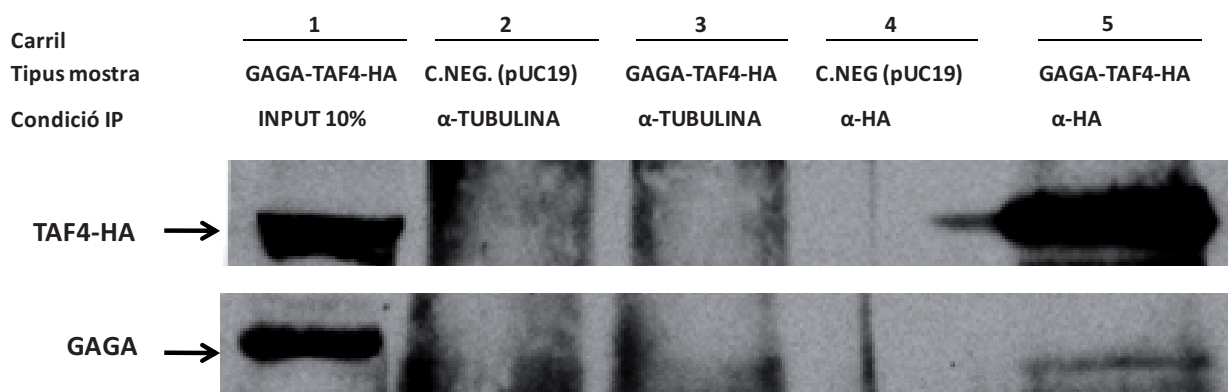


Figura D.8. *Western blot* de l'assaig de coimmunoprecipitació de TAF4-HA i GAGA. A la part superior de la figura la membrana està revelada amb l'anticòs α -HA que permet detectar TAF4-HA i a la part inferior de la figura la membrana està revelada contra GAGA. En l'input de la immunoprecipitació (carril 2), es veuen TAF4 i GAGA sobreexpressats. Seguidament, es troben els carrils immunoprecipitats amb l'anticòs irrellevant α - tubulina que no donen senyal (carrils 3 i 4) i finalment, en el cinquè i sisè carrils s'observen la mostra control i la mostra d'interès immunoprecipitades amb α -HA. Es pot observar que TAF4-HA immunoprecipita molt eficientment i que la membrana revelada amb α -GAGA mostra una banda dèbil però indicativa de la coimmunoprecipitació de GAGA amb TAF4HA (carril 5).

D.1.3. Conseqüències funcionals de la interacció de GAGA amb els TAFs. Assajos transcripcionals a cèl·lules S2

Hem vist que GAGA pot interaccionar *in vivo* amb TAF3 i TAF4, de manera que pot existir una vinculació directa amb TFIID. Els TAFs tenen funció coactivadora i, per tant, els contactes de GAGA amb aquests components de TFIID obren la possibilitat de considerar-los com a coactivadors de GAGA en la seva funció d'activador transcripcional. Vam realitzar transfeccions transitòries a cèl·lules S2 amb diferents promotors activables per GAGA seguint sempre la mateixa metodologia. A cada assaig vam transfectar: 1) concentracions creixents de GAGA per veure l'activació dosi-dependent del promotor 2) concentracions creixents de TAF sense GAGA, 3) sobre una concentració constant de GAGA, afegir quantitats creixents de TAF per veure si s'incrementava l'activació, indicant coactivació. En aquests assaigs transcripcionals vam utilitzar dos promotors que s'activen per GAGA de manera dosi dependent: *even-skipped* (*eve*), que ja estava descrit, i *sickle* (*skl*) que el vam caracteritzar a resultes dels nostres assajos de *microarray* (veure apartat D.3.4). Vam realitzar els experiments posant concentracions baixes i concentracions altes dels TAFs per veure quina concentració de TAF era òptima per observar coactivació.

D.1.3.A. Assajos transcripcionals de sobreexpressió de GAGA i TAF3 no mostren coactivació

La cotransfecció de GAGA i TAF3 a cèl·lules S2 no resulta en un increment significatiu de l'activació dels promotors *eve* i *skl* a l'afegir quantitats creixents de TAF3-HA sobre una quantitat fixa de GAGA (veure figura D.9 i comparar el segon punt blau amb els tres últims punts de cada gràfic). No veiem que l'activació de GAGA+TAF3-HA sigui major que l'obtinguda amb mateixa quantitat de GAGA, independentment de la concentració de TAF3-HA emprada. De fet, a concentracions altes, tant a *eve* com a *skl* (veure D.9.B i D.9.D), s'observa una davallada de l'activitat de GAGA respecte el mateix punt sense TAF3-HA (comparar els tres últims punts blau fosc, amb el primer blau fosc de cada gràfic). TAF3-HA, per si sol, no té cap efecte sobre l'activitat luciferasa (comparar els punts blaus clars, 4 i 5, de cada gràfic amb el seu primer punt, on hi ha l'activitat inicial del promotor).

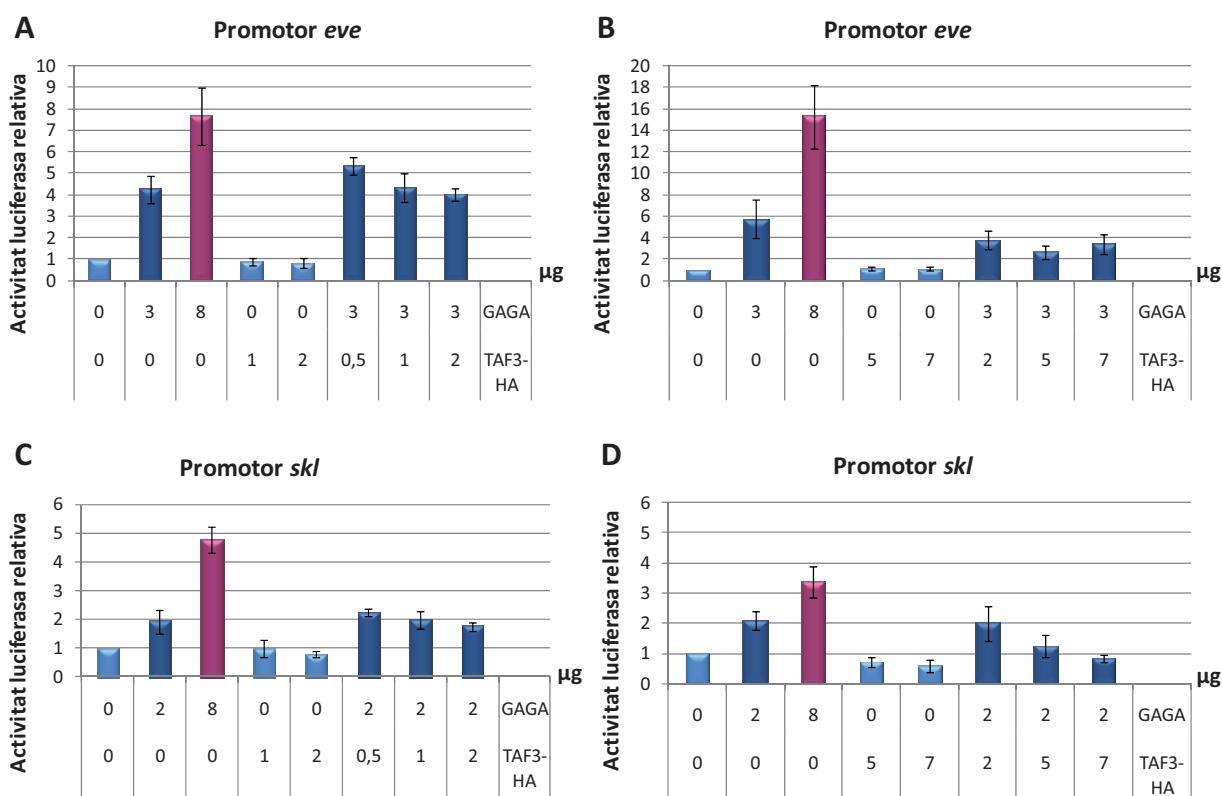


Figura D.9. Assajos de transfecció transitoria a cèl·lules S2 amb els promotors *eve* i *skl* per mirar la possible coactivació de TAF3. **A) i B)** Assajos amb el promotor *eve* amb diferents quantitats de TAF3-HA expressades en µg a l'eix abscisses. **C) i D)** Assajos amb el promotor *skl* amb diferents concentracions de TAF3-HA (veure eix abscisses). En els gràfics, cada barra representa l'activitat luciferasa corregida pels nivells d'activitat de β-galactosidasa i relativitzada al primer punt, activitat inicial del promotor (color blau clar). El segons i tercers punts de cada gràfic mostren l'activació dosi-dependenta de GAGA. Els punts quart i cinquè mostren l'efecte de TAF3-HA per si sol (color blau clar, igual que el primer punt). Als tres últims punts s'han transfectat quantitats constants de GAGA, i quantitats creixents de TAF3-HA (color blau fosc). Cal comparar el primer punt blau fosc amb els tres últims punts per veure si hi ha una diferència substancial d'activitat a l'afegir TAF3-HA. Tots els gràfics són el promig de 3 experiments independents, cadascun d'ells amb duplicats de cada punt de transfecció.

Resultats

Després de veure que no hi havia efecte de coactivació amb les condicions experimentals emprades, vam voler estar segurs que TAF3-HA s'estava sobreexpressant suficientment en les transfeccions i que la seva localització era correcta i nuclear, com en el cas de la proteïna endògena. Immunolocalitzacions sobre cèl·lules S2 transfectades amb TAF3-HA indiquen que la proteïna es transfecta correctament i que la seva localització és nuclear, tant utilitzant l'anticòs α -TAF3, com amb α -HA (veure figura D.10.A). Els *western blots* realitzats a partir dels extractes dels assajos luciferasa anteriors indiquen que les bandes TAF3-HA, tenen la mida correcta de la proteïna, no hi ha degradacions aparents i el nivell de sobreexpressió és bo (veure figura D.10.B). Amb tots els controls d'expressió correctes, es pot afirmar que amb els assajos de sobreexpressió realitzats no som capaços de detectar coactivació.

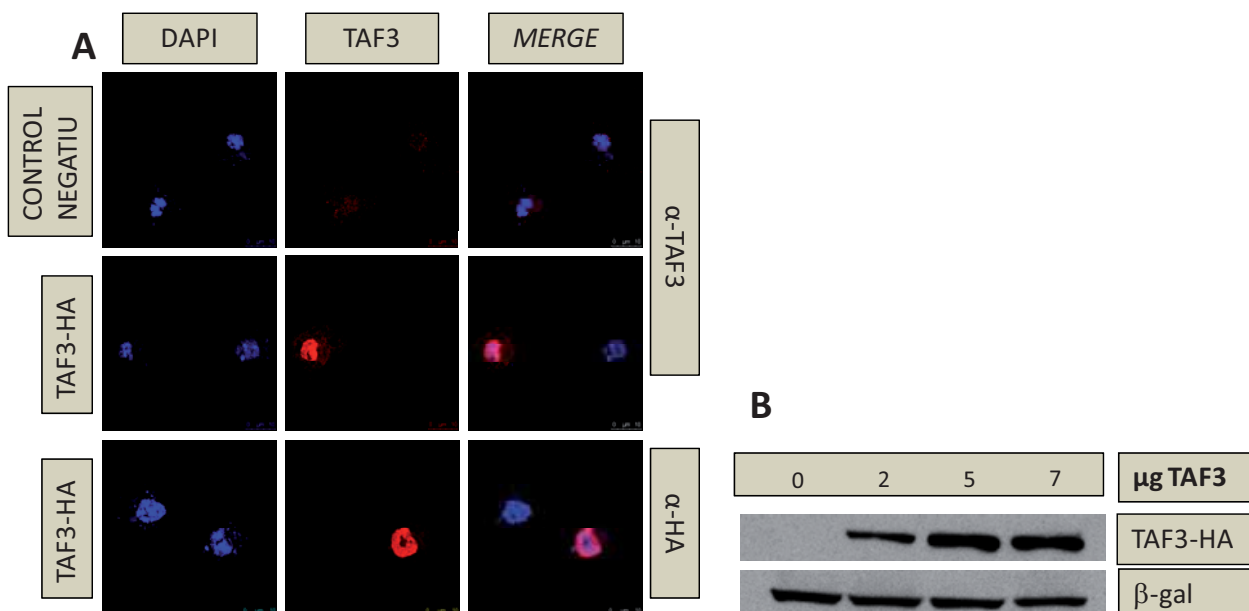


Figura D.10. Immunolocalitzacions i *western blot* per detectar TAF3-HA sobreexpressat. **A)** Projeccions màximes d'imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE d'immunolocalitzacions de cèl·lules transfectades transitòriament amb TAF3-HA. Les immunolocalitzacions s'han revelat amb α -HA i α -TAF3 per veure la sobreexpressió de TAF3-HA. A l'esquerra s'observa la tinció de DAPI (blau), al centre, el senyal de TAF3 (vermell) i a la dreta el solapament dels dos canals (*merge*). Amb tots dos anticossos es detecten cèl·lules sobreexpressades i s'observa que la proteïna és nuclear. El control negatiu, de cèl·lules transfectades amb plasmidi irrellevant pUC19, revelat amb α -TAF3, indica el nivell de senyal de TAF3 endogen que és nuclear. **B)** *Western blot* a partir dels extractes d'un experiment d'assaig de luciferasa de la figura D.10. La membrana està revelada amb anticòs α -HA per veure la sobreexpressió de TAF3-HA i amb α - β gal com a control intern.

D.1.3.B. Assajos transcripcionals de sobreexpressió de GAGA i TAF4 no mostren coactivació

Els mateixos assajos d'activitat transcripcional que vam fer amb TAF3-HA, els vam realitzar en paral·lel també amb TAF4-HA. El resultat obtingut és el mateix que en el cas de TAF3-HA, no s'observa una coactivació significativa per part de TAF4-HA, en cap dels dos promotors, ni a concentracions baixes, ni a concentracions altes de TAF4-HA (veure figura D.11). També, en aquest cas, a concentracions elevades de TAF4-HA es veu una davallada gradual de l'activació per excés de TAF.

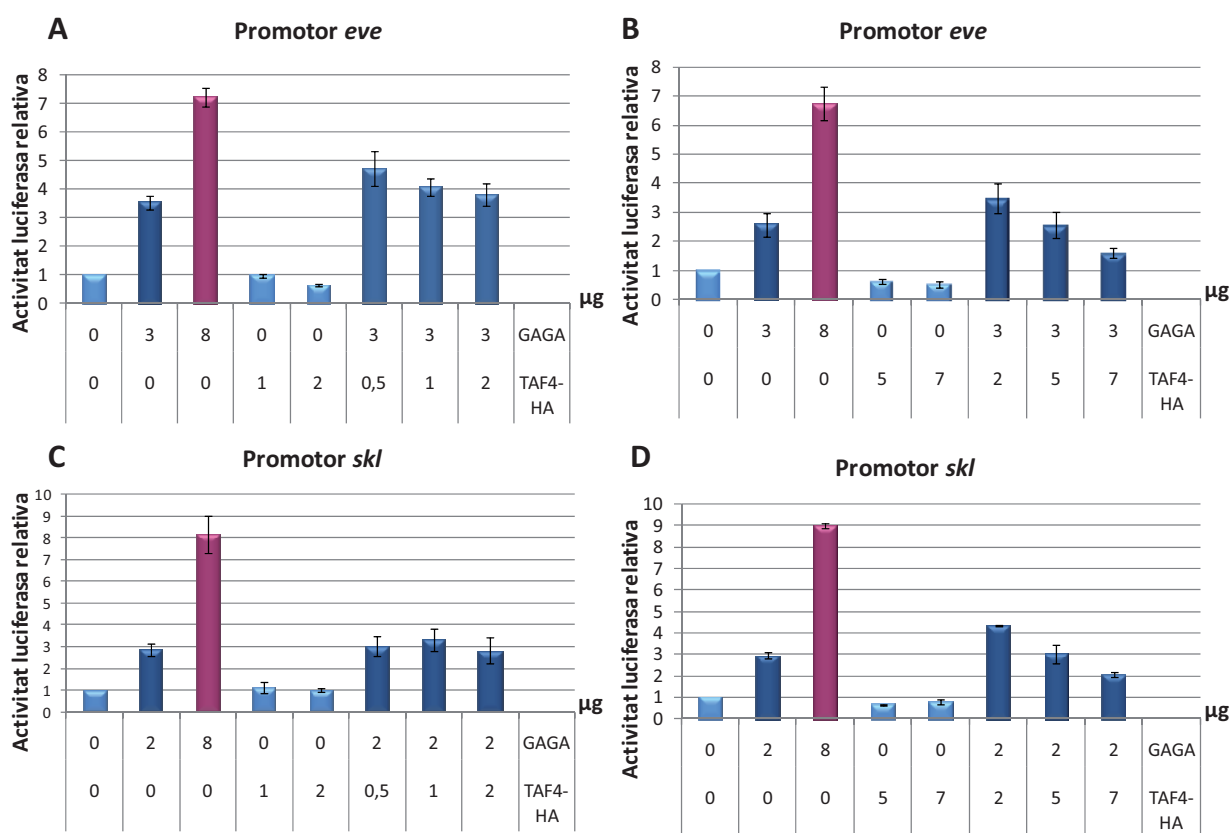


Figura D.11. Assajos de transfecció transitoria a cèl·lules S2 amb els promotors *eve* i *skl* per mirar la possible coactivació de TAF4. **A) i B)** Assajos amb el promotor *eve* amb diferents quantitats de TAF4-HA expressades en µg a l'eix d'abscisses. **C) i D)** Assajos amb el promotor *skl* amb diferents quantitats de TAF4-HA expressades en µg a l'eix d'abscisses. En els gràfics, cada barra representa l'activitat luciferasa, corregida pels nivells d'activitat de β-galactosidasa i relativitzada al primer punt, que és l'activitat inicial del promotor (color blau clar). El segons i tercers punts de cada gràfic mostren l'activació dosi-dependenta de GAGA. Els punts quart i cinquè mostren l'efecte de TAF4-HA per si sol (color blau clar, igual que el primer punt). Als tres últims punts s'han transfectat concentracions constants de GAGA, i concentracions creixents de TAF4-HA (color blau fosc). Cal comparar el primer punt blau fosc amb els tres últims punts per veure si hi ha una diferència substancial d'activitat a l'afegir TAF4-HA. Tots els gràfics són el promig de 3 experiments independents, cadascun d'ells amb duplicats de cada punt de transfecció.

Resultats

En aquest cas, les immunolocalitzacions de cèl·lules transfectades amb TAF4-HA també indiquen que la construcció s'expressa i ho fa de manera correcta, essent el senyal nuclear, com en el cas de la proteïna endògena (veure figura D.12.A). Els *western blots* a partir dels extractes utilitzats pels assajos luciferasa indiquen que la proteïna s'expressa correctament (veure figura D.12.B). Sabent que la proteïna TAF4-HA s'expressa correctament, es pot afirmar que utilitzant les condicions experimentals emprades en els assajos de transfecció transitòria no som capaços de veure coactivació per part de TAF4.

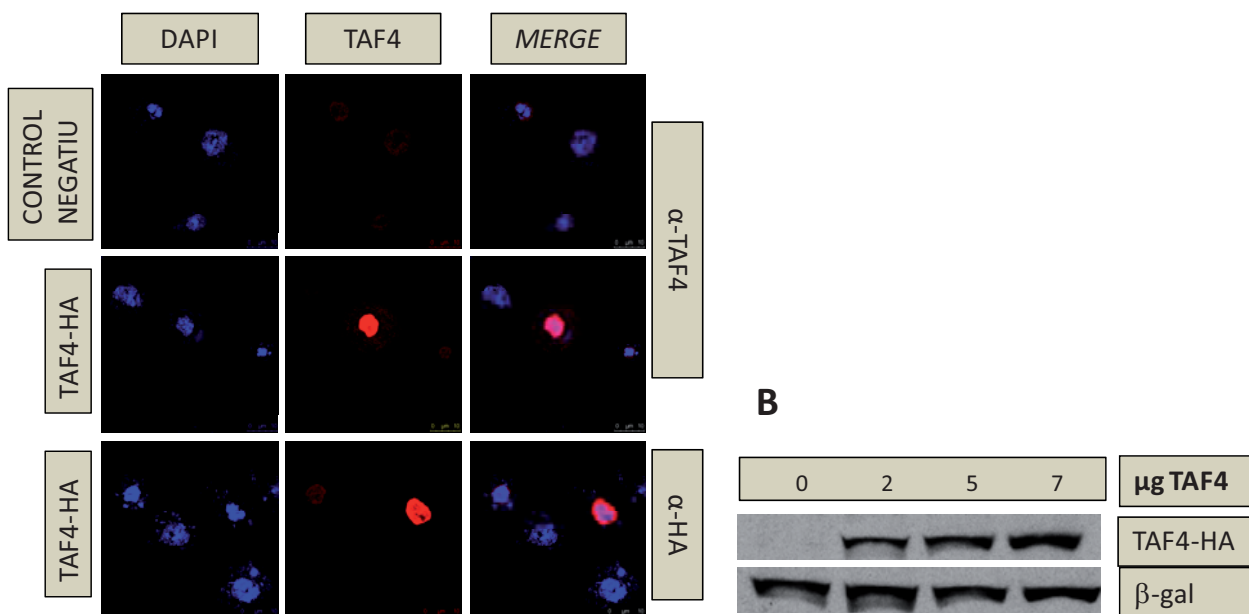


Figura D.12. Immunolocalitzacions i *western blot* per detectar TAF4-HA sobreexpressat. **A)** Projeccions màximes d'imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE d'immunolocalitzacions de cèl·lules transfectades transitòriament amb TAF4-HA. D'esquerra a dreta de la imatge, DAPI (blau), TAF4 (vermell) i solapament dels dos senyals anteriors (*merge*). Les immunolocalitzacions s'han revelat amb α -HA i α -TAF4. Es detecten cèl·lules sobreexpressades i s'observa que la proteïna és nuclear amb els dos anticossos utilitzats. El control negatiu, de cèl·lules transfectades amb el plasmidi irrellevant pUC19, revelat amb α -TAF4, indica el nivell de senyal de TAF4 endogen nuclear. **B)** *Western blot* a partir dels extractes d'un experiment d'assaig de luciferasa on s'han transfectat concentracions creixents de TAF4-HA i com a control intern de l'experiment una concentració fixa amb una construcció expressant β -galactosidasa. La membrana està revelada amb anticòs α -HA per veure la sobreexpressió de TAF4-HA i amb α - β gal com a control intern.

D.1.3.C. Mutació de possibles seqüències d'interacció de GAGA amb TAF4 indiquen que TAF4 pot ser important per l'activació de GAGA

Com que els assajos de transfecció sobreexpressant GAGA i TAFs no ens van donar cap indicació de coactivació, calia buscar experiments alternatius per poder tenir més dades de la possible relació de GAGA amb els TAFs. Hi ha indicacions que mostren que el TAF4 humà pot contactar amb diferents factors de transcripció a través del domini TAFH i que aquest, actua com una plataforma d'intercanvi de proteïnes co-reguladores pel control de la transcripció (Wei et al. 2007). Aquest domini TAFH del TAF4 humà s'ha vist que pot unir proteïnes que contenen seqüències del tipus LLxxL(L/M/F) i LLxx(I/L)L i que són una mica diferents de les del tipus LxxLL, que s'uneixen al domini TAFH de la proteïna ETO.

Tenint en compte que GAGA és un factor de transcripció i que hem vist que pot contactar amb TAF4, vam fer una anàlisi de seqüència de GAGA per tal de trobar seqüències similars a les que es troben a les proteïnes que interaccionen amb el TAF4 humà o seqüències similars a les que s'uneixen al domini de les proteïnes ETO. Calia tenir en compte que s'havia suggerit que els dominis TAF4-TAFH dels invertebrats han de ser més similars a les que s'uneixen al domini TAFH de les proteïnes ETO, que no pas a les que s'uneixen al TAF4 humà (Wang et al. 2007). Per tant, podíem esperar trobar a GAGA seqüències similars al domini d'unió a les proteïnes ETO. Dins la seqüència de GAGA, vam trobar dues seqüències similars al consens d'unió al domini ETO-TAFH (LXXLL). Aquestes seqüències, a GAGA, es troben com LLDLL i LEALL i estan situades al domini POZ de la proteïna. A partir de la identificació d'aquests motius a GAGA, vam generar una bateria de mutants puntuals de diferents aminoàcids d'aquests motius i vam realitzar assajos d'activitat luciferasa, per veure si l'alteració d'aquests possibles llocs d'interacció amb TAF4 afectaven l'activitat de GAGA. En aquests assajos luciferasa vam comparar l'activació produïda per la GAGA salvatge amb l'activitat de les GAGA mutants. Vam utilitzar diferents promotors, *eve*, *hsp70* i *Trl*, per veure com es veia afectada GAGA en la seva capacitat activadora i repressora amb aquests possibles dominis d'interacció amb TAF4 mutats. Les mutacions es van fer sobre els residus L60 i D61 del primer motiu i E84 i L87 del segon motiu. Les mutacions realitzades van ser L60E, D61N, E84Q i L87E (veure figura D.13).



Figura D.13. Esquema de les diferents mutacions puntuals realitzades en els dos motius del tipus LxxLL identificats al POZ de GAGA. El motiu 1 és LLDLL (marcat amb una línia verda) i s'ha fet les substitucions L60E i D61N. El motiu 2 (marcat amb una línia blava) és LEALL i s'ha fet les substitucions de E84Q i L87E.

Resultats

D.1.3.C.1. Mutacions de residus no essencials en el motiu LxxLL no afecten la capacitat activadora de GAGA

En primer lloc, vam fer assajats luciferasa sobre els promotors *eve* i *hsp70* amb els mutants L60E (leucina 60 canviada per un àcid glutàmic), D61N (canvi de l'àcid aspàrtic 61 per asparagina) i E84Q (àcid glutàmic 84 canviat per glutamina). Aquests tres mutants assajats impliquen un canvi en un aminoàcid acídic, que no és essencial en el motiu, o en una leucina que tampoc és essencial en la seqüència consens (veure figura D.14).

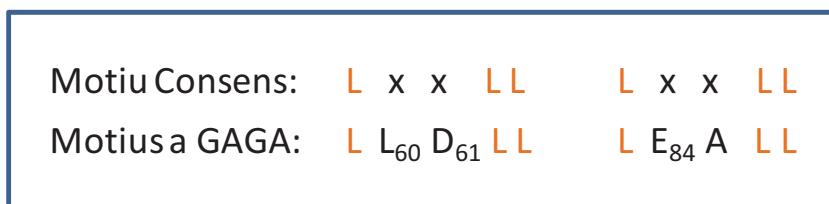


Figura D.14. Esquema dels diferents residus no essencials mutats a GAGA en les seqüències del tipus LxxLL. A la part superior de la figura es pot observar el motiu consens LxxLL. En taronja es troben marcats els residus essencials i en negre els residus no essencials del motiu que poden correspondre a qualsevol aminoàcid. A la part inferior de la figura es poden observar els dos motius identificats a GAGA en el domini POZ (LLDLL i LEALL). Es poden veure marcats en negre, els residus no essencials L60, D61 i E84 que hem mutat.

Vam transfectar concentracions creixents de la GAGA salvatge i dels diferents mutants per tal de comparar les seves capacitats d'activació (veure figura D.15). Cap dels mutants assajats afecta la capacitat activadora de GAGA (veure figura D.15). Gairebé en tots els casos, les diferències d'activació respecte la GAGA salvatge no són significatives. En algun cas, com en les transfeccions d'*eve* amb la mutació L60E, l'activació és baixa en el primer punt, però afegint més quantitat es veu que hi ha una activació dosi dependent. Per tant, es manté una capacitat d'activació important. Semblaria que aquests tres residus (L60, D61 i E84) no són importants perquè al substituir-los, GAGA continua tenint la mateixa capacitat d'activar.

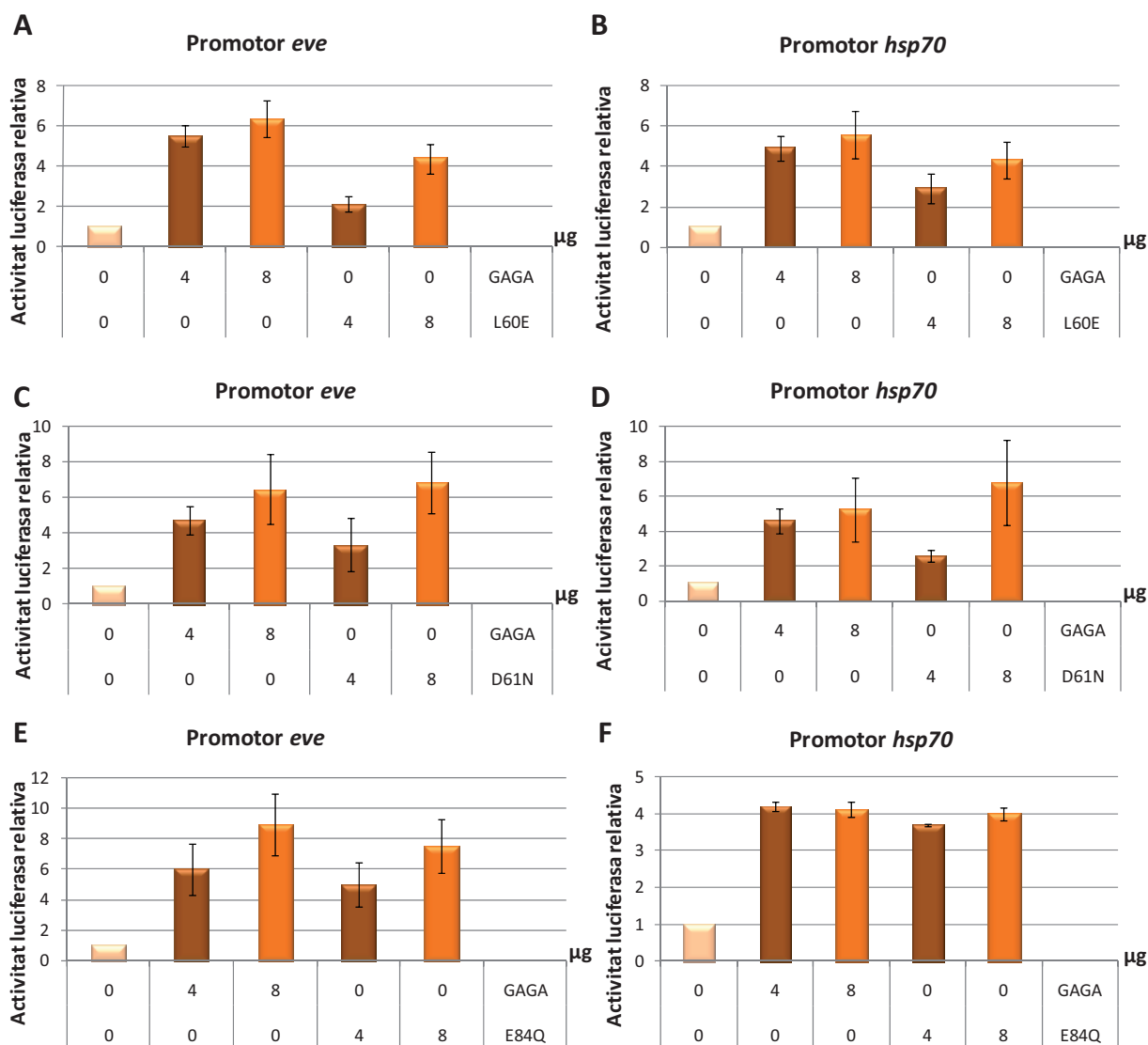


Figura D.15. Assajos de transfecció transitòria a cèl·lules S2 amb els promotors *eve* i *hsp70*, sobreexpressant GAGA i els mutants L60E, D61N i E84Q, no essencials en el motiu LxxLL. **A i B)** Transfeccions dels promotors *eve* i *hsp70* respectivament, que contenen la mutació L60E. **C i D)** Transfeccions dels promotors *eve* i *hsp70* respectivament que impliquen el canvi D₆₁N. **E i F)** Transfeccions dels promotors *eve* i *hsp70* respectivament que impliquen la mutació E84Q. En els gràfics, cada barra representa l'activitat luciferasa corregida pels nivells d'activitat de β -galactosidasa i relativitzada al primer punt, que és l'activitat inicial del promotor (color beix). El segons i tercers punts de cada gràfic, marró i taronja respectivament, contenen quantitats creixents de GAGA salvatge per veure l'activació dels promotors de manera dosi-dependent. Els punts quart i cinquè, marró i taronja, contenen quantitats creixents de la GAGA mutada en un dels residus del motiu consens. Cap dels mutants assajats afecta la capacitat activadora de GAGA. Tots els gràfics són el promig de 3 experiments independents, cadascun d'ells amb duplicats de cada punt de transfecció.

Resultats

Vam veure que la capacitat d'activació d'aquests mutants no variava però, com a control, vam voler mirar què passava en repressió amb el promotor de *Trl*. Els experiments de transfecció realitzats amb els mateixos mutants anteriors L60E, D61N i E84Q, indiquen que aquests mutants es comporten igual que GAGA salvatge a nivells de repressió. Per tant, són mutants que no afecten ni la capacitat activadora ni la capacitat repressora de GAGA (veure figura D.16).

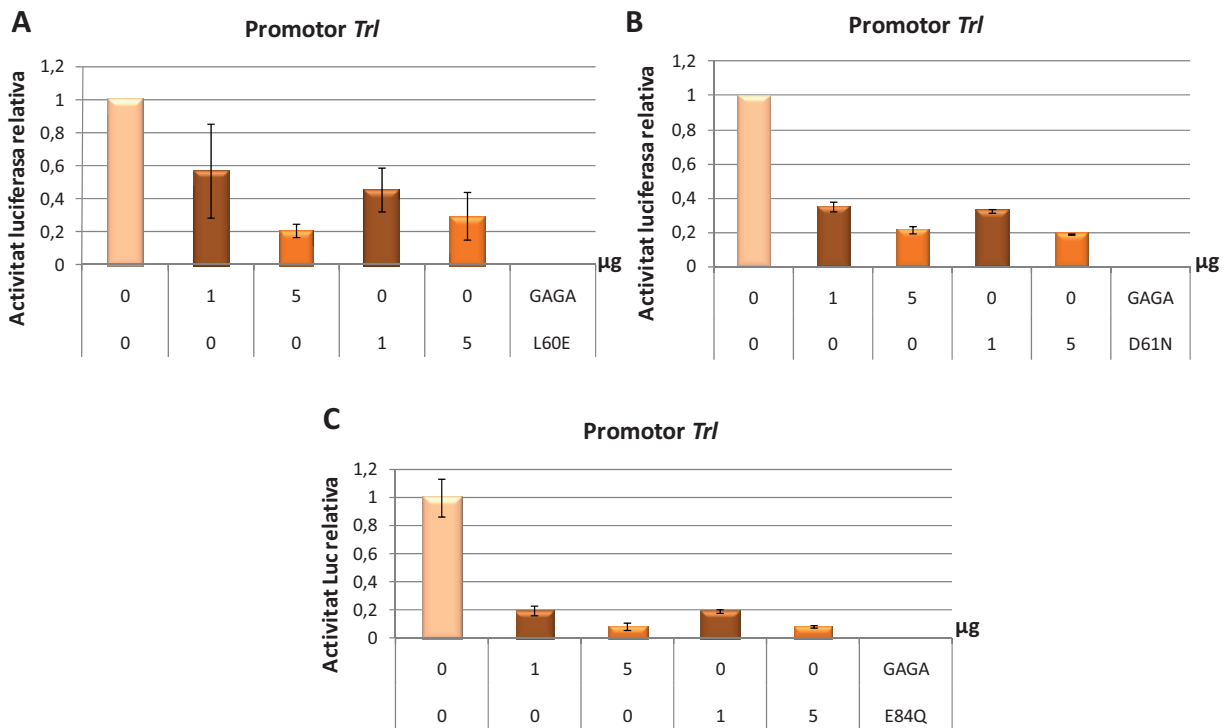


Figura D.16. Assajos de transfecció transitòria a cèl·lules S2 del promotor *Trl* sobreexpressant GAGA i els mutants L60E, D61N i E84Q, no essencials en el motiu LxxLL. Els gràfics **A**, **B** i **C** corresponen als assajos amb el promotor *Trl* a les mutacions L60E, D61N i E84Q respectivament. Cada barra representa l'activitat luciferasa corregida pels nivells d'activitat de β -galactosidasa i relativitzada al primer punt, que és l'activitat inicial del promotor (color beix). El segons i tercers punts de cada gràfic, marró i taronja respectivament, contenen quantitats creixents de GAGA salvatge per veure la repressió del promotor *Trl* de manera dosi-dependent. Els punts quart i cinquè contenen concentracions creixents de la GAGA mutada en un dels residus del motiu consens. Cap dels mutants assajats afecta la capacitat repressora de GAGA. Tots els gràfics són el promig de 3 experiments independents, cadascun d'ells amb duplicats de cada punt de transfecció.

Experiments de *western blot* i d'immunolocalització indiquen que els nivells de proteïna dels mutants són similars als de la GAGA salvatge i que la localització de la proteïna amb aquests residus mutats no varia i continua essent nuclear (veure figura D.17). Només en el cas de la mutació L60E, on l'activació no és molt forta, l'expressió també és una mica menys intensa però, tot i així, l'activació d'aquest mutant és clara i és dosi dependent.

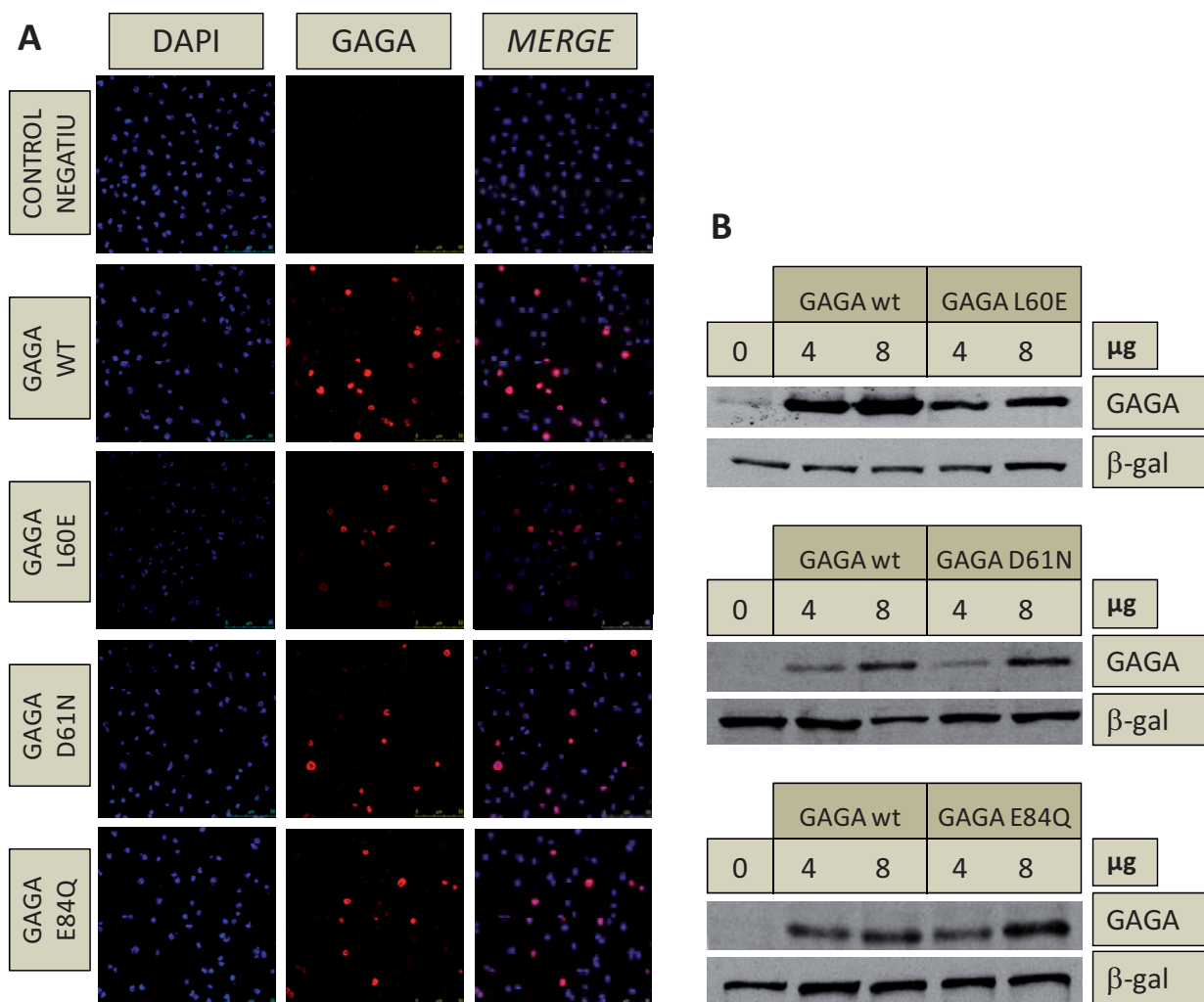


Figura D.17. Immunolocalitzacions i *western blot* per detectar els nivells de proteïna dels mutants no essencials del motiu LxxLL. **A)** Projeccions màximes d'imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE d'immunolocalitzacions de cèl·lules transfectades transitòriament amb GAGA salvatge i amb les diferents mutacions L60E, D61N i E84Q. D'esquerra a dreta de la imatge, DAPI (blau), GAGA (vermell) i *merge* (solapament dels dos canals). Les immunolocalitzacions s'han realitzat amb α -GAGA. El nivell d'expressió dels diferents mutants és similar al de la GAGA sense mutar i les mutacions no afecten la localització nuclear de la proteïna. **B)** *Western blot* a partir dels extractes d'un experiment d'assaig de luciferasa on s'han transfectat concentracions creixents dels diferents constructes de GAGA i GAGA mutades i com a control intern de l'experiment una concentració fixa amb una construcció expressant β -galactosidasa. La membrana està revelada amb anticòs α -GAGA i α - β gal.

Resultats

D.1.3.C.2. Mutacions de residus essencials en el motiu LxxLL afecten la capacitat activadora de GAGA a cèl·lules S2

La mutació de residus essencials en la seqüència consens LxxLL va produir uns resultats molt diferents. La mutació del residu L87, leucina exposada al solvent segons el model estructural del POZ construït a partir de l'estructura cristal·logràfica del POZ de PLZ (Pagans et al. 2002), suposa un canvi en un residu essencial en la seqüència consens LxxLL (veure figura D.18). Com que alguns dels residus essencials no estaven accessibles al solvent segons l'estructura cristal·logràfica i quedaven amagats ens vam centrar principalment amb el residu L87.

Motiu Consens:	L	x	x	LL	L	x	x	LL
Motius a GAGA:	L	L	D	LL	L	E	A	LL ₈₇

Figura D.18. Esquema dels diferents residus essencials mutats a GAGA en les seqüències del tipus LxxLL. A la part superior de la figura es pot observar el motiu consens LxxLL. En taronja es troben marcats els residus essencials i en negre els residus no essencials del motiu que poden correspondre a qualsevol aminoàcid. A la part inferior de la figura es poden observar els dos motius identificats a GAGA en el domini POZ (LLDLL i LEALL). Es pot veure marcat en taronja, el residu essencial L87 que hem mutat.

Inicialment, vam fer la mutació L87E (canvi de la leucina 87 a àcid glutàmic) i en els assajos de transfecció vam veure que es perdia la capacitat activadora de GAGA tant amb *eve* com amb *hsp70* però que, en canvi, aquest mutant podia reprimir perfectament *Trl* (veure figura D.19). El canvi de leucina a àcid glutàmic és un canvi molt radical perquè es passa d'un aminoàcid no polar i petit, a un aminoàcid polar acídic i gran. Per tant, podia ser que els fenotips de manca d'activació fossin deguts a la generació d'un canvi estructural que desestabilitzés la proteïna, o bé, a un canvi de grup químic que afectés les propietats activadores de la proteïna. Vam decidir repetir els experiments amb un mutant que suposés un canvi menys gran, per valorar si els resultats de manca d'activació es devien a problemes de la construcció o bé si realment afectaven les propietats d'activació de GAGA a l'alterar la possible superfície d'unió amb TAF4. Així, vam decidir canviar la leucina a alanina (L87A). En aquest cas, tots dos són aminoàcids polars i no gaire grossos. Els resultats obtinguts amb el mutant L87A van ser exactament iguals que els obtinguts amb L87E (veure figura D.19). També es perdia la capacitat de GAGA per activar però no la capacitat per reprimir.

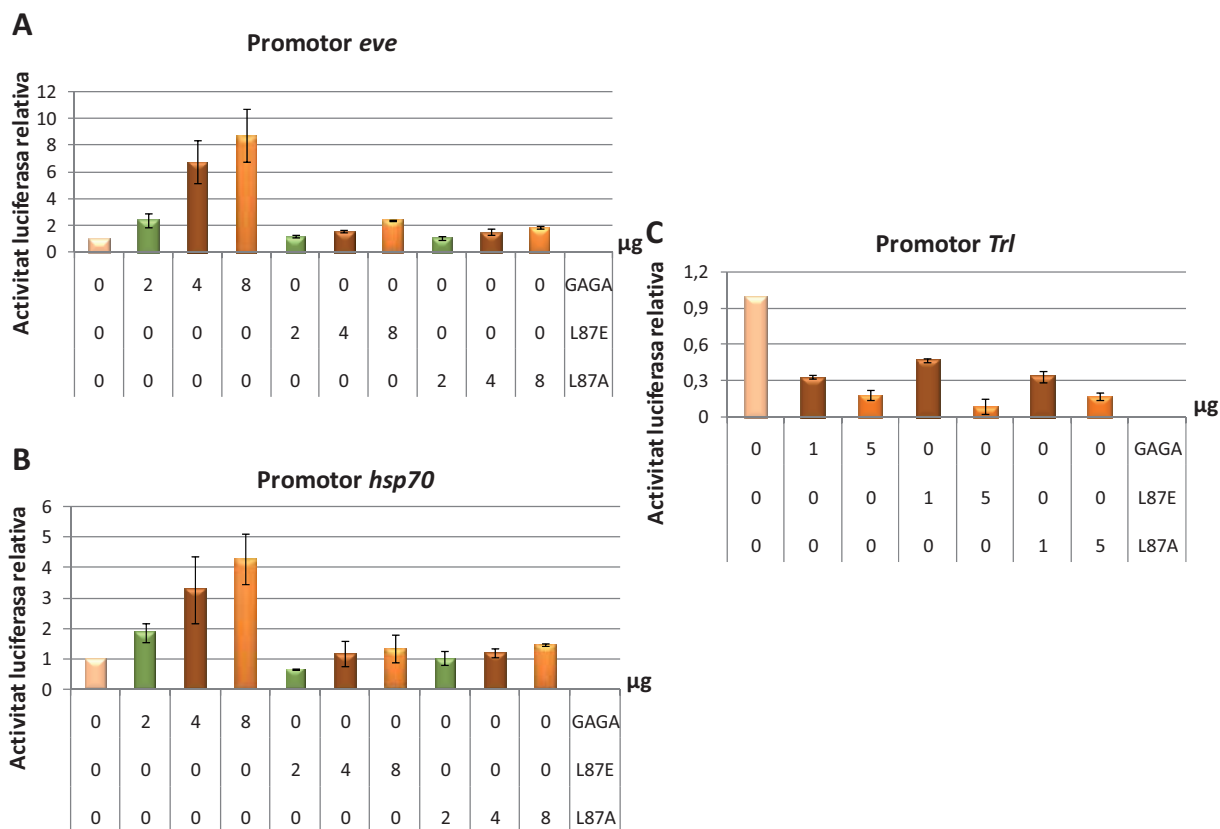


Figura D.19. Assajos de transfecció transitòria a cèl·lules S2 amb els promotors *eve*, *hsp70* i *Trl* sobreexpressant GAGA i els mutants GAGAL87E i GAGAL87A. Cada barra representa l'activitat luciferasa, corregida pels nivells d'activitat de β -galactosidasa i relativitzada al primer punt, que és l'activitat inicial del promotor (color beix). Els segons, tercers i quarts punts de cada gràfic (verd, marró i taronja respectivament) contenen quantitats creixents de GAGA salvatge per veure l'efecte de la repressió de manera dosi-dependent. La resta de punts contenen concentracions creixents (verd, marró i taronja) de la GAGA mutada puntualment en el residu L87 del motiu consens, amb la mutació L87E i L87A. Els gràfics **A**, **B** i **C** corresponen als experiments amb els promotors *eve*, *hsp70* i *Trl*, respectivament. Els mutants assajats L87E i L87A afecten la capacitat activadora de GAGA i en canvi, no afecten l'activitat repressora. Tots els gràfics són el promig de 3 experiments independents, cadascun d'ells amb duplicats de cada punt de transfecció.

A partir d'aquí, vam fer comprovacions per *western blot* i per immunolocalització de l'expressió de les proteïnes amb les mutacions puntuals, i tant L87E com L87A indicaven uns nivells de proteïna molt inferiors als de la GAGA salvatge (GAGAwT). En el *western blot* s'observa que les bandes dels mutants són molt menys intenses que la GAGA salvatge (wt), i en les immunolocalitzacions, la intensitat de fluorescència dels nuclis és molt menor (veure figura D.21 A i B). Aquestes mutacions en la leucina L87 feien perdre la capacitat activadora de GAGA però mantenien la capacitat de reprimir. Com que aquests mutants mostraven menor quantitat de proteïna que la GAGAwT, no podíem saber si no activaven perquè afectaven la capacitat d'interacció amb TAF4 perquè tenen mutat el motiu LxxLL, o bé degut als seus baixos nivells de sobreexpressió.

Resultats

Arribats en aquest punt, vam voler veure perquè aquests mutants puntuals s'expressaven menys que GAGA salvatge. En col·laboració amb el Dr Miguel Ortiz, vam analitzar l'estabilitat dels mutants en l'estructura del domini POZ per veure si l'expressió reduïda dels mutants es podia atribuir a alguna alteració de l'estructura del domini que el fes més inestable i, per tant, més fàcilment degradable.

Segons diferents càlculs, tant la mutació L87E com la L87A no eren mutacions estables en l'estructura del domini POZ. Aquests càlculs no van estar fets a partir d'una estructura experimental sinó a partir del model amb el POZ de PLZF com a motllo, però tot i així, calia tenir en compte els resultats de l'aproximació. Els càlculs obtinguts utilitzant el servidor <http://cupsat.tu-bs.de>, amb el model del POZ, ens van donar uns valors d'energia lliure de Gibbs referents al canvi aminocídic aplicat que indicaven que les mutacions L87E i L87A eren desestabilitzants, tant en els càlculs fets sobre el monòmer, com amb el dímer (els canvis d'energia en el dímer cal multiplicar-los per 2) (veure taula D.1). En tots dos casos, la mutació L87A desestabilitzava més que L87E, contràriament al que ens havia semblat a priori. De tota manera, les energies negatives no eren molt grans, per al monòmer eren de menys de 0,5 Kcal/mol i per al dímer, poc més de 1 Kcal/mol. No es coneix la significació d'aquestes energies, si en tenen, *in vivo* a *Drosophila* però, tot i així, calia tenir en compte totes les dades a l'hora de poder interpretar els nostres resultats.

A				B			
LLOC DE MUTACIÓ				LLOC DE MUTACIÓ			
Proteïna	Cadena	Aminoàcid salvatge	ID del residu	Proteïna	Cadena	Aminoàcid salvatge	ID del residu
GAFPOZMON.PDB	A	LEU	87	GAFPOZDIM.PDB	A	LEU	87
PROPIETATS ESTRUCTURALS			PROPIETATS ESTRUCTURALS				
Element SS	Accessibilitat del solvent	Angles de torsió (φ, ψ)		Element SS	Accessibilitat del solvent	Angles de torsió (φ, ψ)	
Hèlix	10,92%	-60.6°, -41.8°		Hèlix	10,92%	-60.6°, -41.8°	
AMINOÀCIDS MUTANTS MONÒMER				AMINOÀCIDS MUTANTS DÍMER			
Aminoàcid	Estabilitat general	Torsió	Predicció $\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)	Aminoàcid	Estabilitat general	Torsió	Predicció $\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)
Glutàmic (E)	Desestabilitzant	Favorable	-0,1	Glutàmic (E)	Desestabilitzant	Favorable	-0,69
Alanina (A)	Desestabilitzant	Favorable	-0,49	Alanina (A)	Desestabilitzant	Favorable	-0,81
Aspàrtic (D)	Estabilitzant	Desfavorable	0,88	Aspàrtic (D)	Estabilitzant	Desfavorable	0,07
Isoleucina (I)	Desestabilitzant	Favorable	-0,14	Isoleucina (I)	Desestabilitzant	Favorable	-0,21

Taula D.1. Resum de resultats de predicció de canvi d'aminoàcids en el residu L87 de GAGA, sobre el model estructural del POZ. Càlculs realitzats a partir del servidor <http://cupsat.tu-bs.de>. L'estabilitat general es calcula a partir dels potencials dels àtoms i dels potencials dels angles de torsió. En cas d'angles de torsió desfavorable els potencials dels àtoms poden tenir major impacte en l'estabilitat que pot resultar en una mutació estable.

A part de mirar les mutacions que havíem assajat fins al moment vam decidir fer la predicció de les mutacions amb altres residus per tal de trobar-ne algun que afectés menys a l'estructura alhora de substituir la leucina. De tots els possibles canvis, no hi havia cap aminoàcid per substituir la leucina que suposés estabilitat i fos favorable a la torsió (veure taula D.1). A partir de la llista obtinguda de possibles substitucions, vam triar l'àcid aspàrtic (D), estabilitzador i desfavorable a la torsió i la isoleucina (I), desestabilitzant i favorable a la torsió (però amb un canvi energètic baix), per a fer assajos addicionals i veure si obteníem els mateixos resultats que amb les mutacions L87E i L87A.

Amb aquestes dues noves mutacions, L87D i L87I, vam realitzar els mateixos assajos de transfecció que havíem fet amb les mutacions L87E i L87A. Novament, es torna a observar que GAGA perd, en gran part, la seva capacitat d'activació. Amb la substitució de leucina (L) per aspàrtic (D) la capacitat activadora cau molt. Amb el canvi de Leucina (L) a isoleucina (I) la capacitat activadora es redueix una tercera part aproximadament. Tots dos canvis, tampoc afecten a la repressió de *Trl* (veure figura D.20).

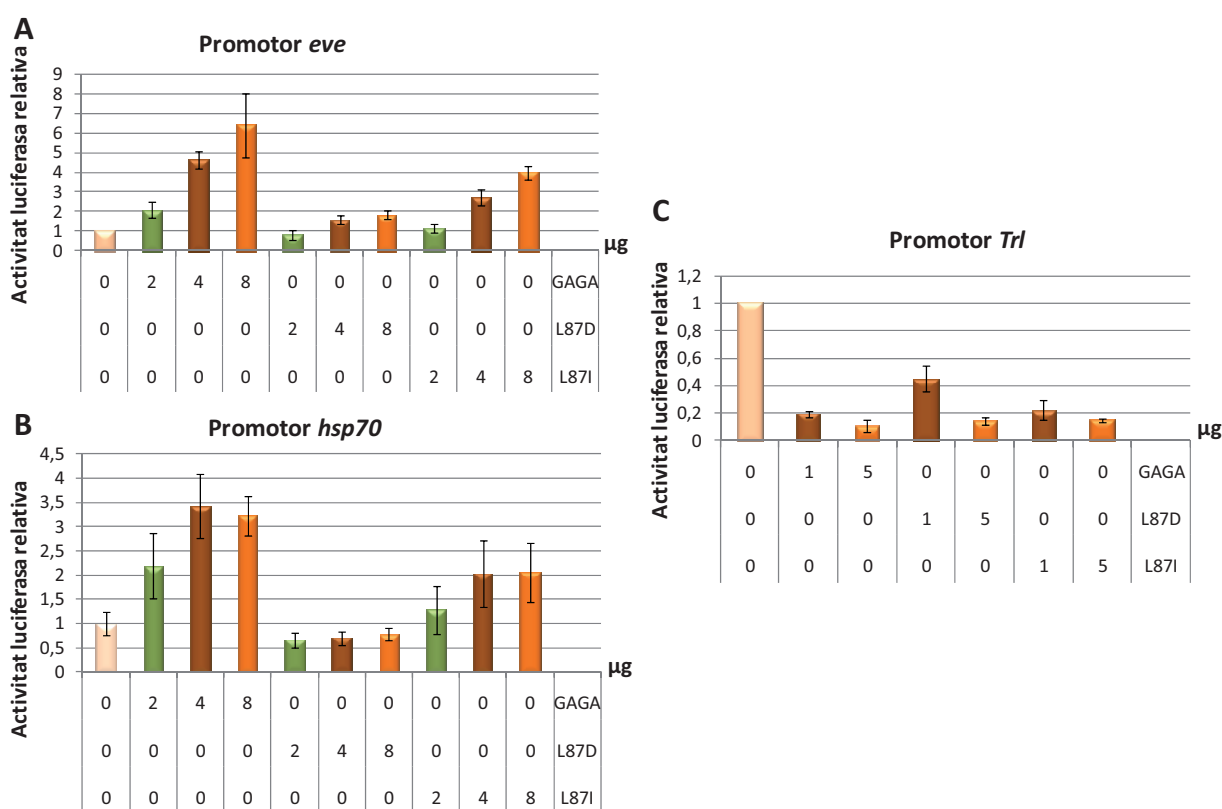


Figura D.20. Assajos de transfecció transitòria a cèl·lules S2 amb els promotors *eve*, *hsp70* i *Trl*, sobreexpressant GAGA i els mutants GAGAL87D i GAGAL87I. Cada barra representa l'activitat luciferasa, corregida pels nivells d'activitat de β -galactosidasa i relativitzada al primer punt, que és l'activitat inicial del promotor (color beix). Els segons, tercers i quarts punts de cada gràfic (verd, marró i taronja respectivament) contenen quantitats creixents de GAGAwt per veure la repressió del promotor *Trl* de manera dosi-dependent. La resta de punts contenen concentracions creixents (verd, marró i taronja) de la GAGA mutada en el residu L87 del motiu consens, amb les mutacions L87D i L87I. Els gràfics **A**, **B** i **C** corresponen als experiments amb els promotors *eve*, *hsp-70* i *Trl*

Resultats

respectivament. Tots els gràfics són el promig de 3 experiments independents, cadascun d'ells amb duplicats de cada punt de transfecció.

Observant les immunolocalitzacions i *westerns* d'aquests dos nous mutants, es pot veure que L87D, que activa molt poc, s'expressa bastant pitjor que GAGAwT i L87I, que activa una mica millor, s'expressa a nivells més propers, als de la GAGAwT (veure figura D.21).

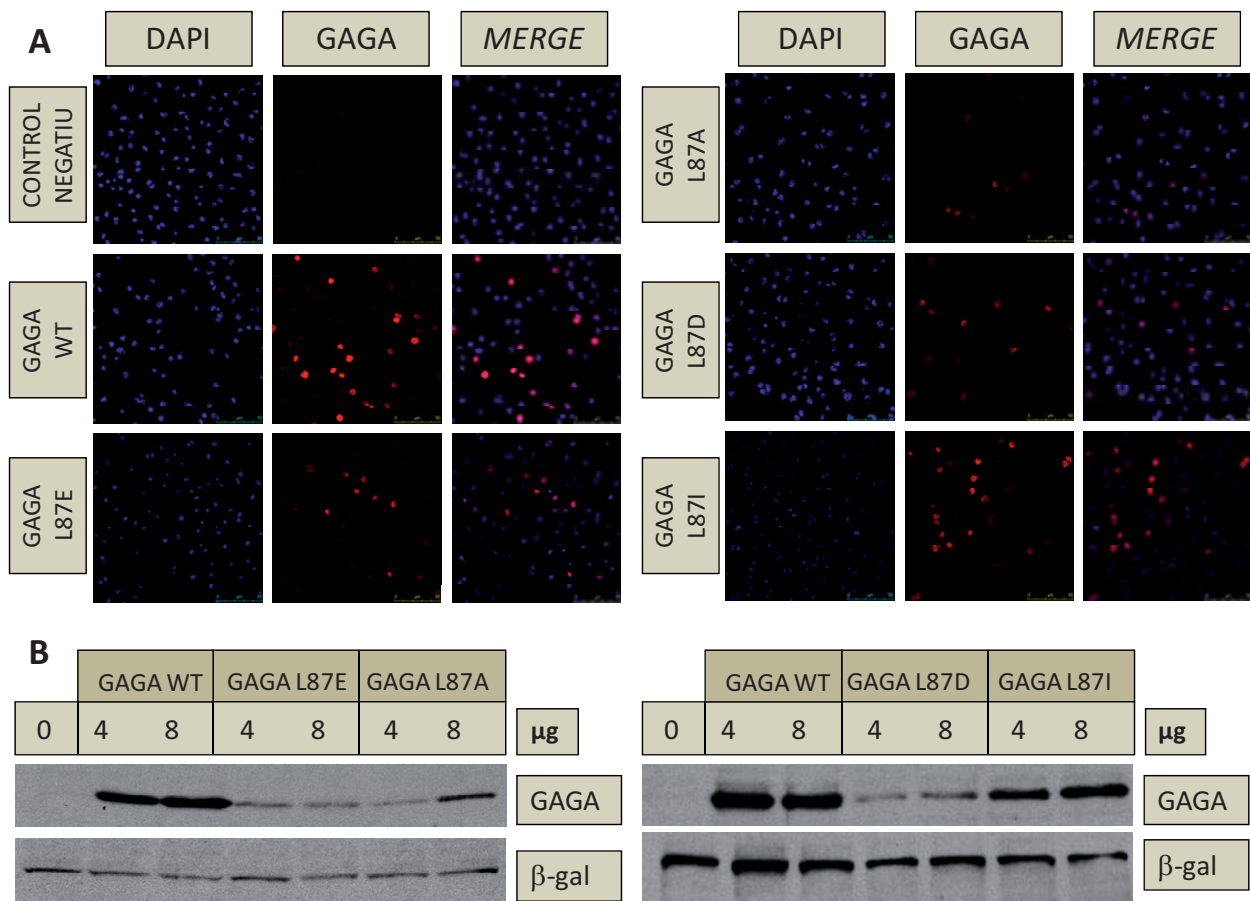


Figura D.21. Immunolocalitzacions i *western blot* per detectar els nivells de proteïna de diferents mutants sobre el residu L87, essencial en del motiu LxxLL. **A)** Projeccions màximes d'imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE d'immunolocalitzacions de cèl·lules transfectades transitòriament amb GAGA salvatge i amb les diferents mutacions L87E, L87A, L87D i L87I. D'esquerra a dreta de la imatge DAPI (blau), GAGA (vermell) i *merge* (solapament dels dos canals). Les immunolocalitzacions s'han realitzat amb α -GAGA. Es detecten cèl·lules sobreexpressant, tant en la imatge de la GAGA salvatge com en les diferents mutacions. En tots els casos, la proteïna és nuclear i per tant, els mutants no alteren la localització de la proteïna. El nivell d'expressió dels diferents mutants és molt baix respecte la GAGAwT. **B)** *Western blot* a partir dels extractes d'un experiment d'assaig luciferasa on s'han transfectat concentracions creixents de les diferents construccions de GAGA, GAGA mutades i, com a control intern de l'experiment, una concentració fixa d'una construcció expressant β -galactosidasa. La membrana està revelada amb anticòs α -GAGA i amb α - β -gal com a control intern. Es pot observar que els mutants tenen una expressió d'una intensitat molt feble, comparat amb la GAGAwT. Només el mutant L87I presenta uns nivells més semblants a la GAGAwT.

Així doncs, com a resum podem dir que qualsevol mutació en la leucina essencial L87, tant les que per predicció desestabilitzen el POZ (L87E, L87A, L87I) com les que no el desestabilitzen (L87D), generen una proteïna GAGA defectiva en activació i totalment funcional en repressió. Al transfectar aquests mutants, es detecta GAGA en menor quantitat que al sobreexpressar la GAGAw_t.

Per intentar aprofundir en la caracterització d'aquests mutants vam intentar veure si la baixa expressió dels mutants es devia a una degradació proteolítica conseqüència de la generació d'una proteïna no funcional. Així, vam transfectar, a cèl·lules S2, la construcció GAGA salvatge i la d'un dels mutants més afectats i que menys s'expressen, l'L87A. A les 39 hores de transfecció, a dues de les plaques de cada construcció, els vam afegir un inhibidor de proteosoma, MG132 diluït amb DMSO, i a les altres dues plaques els vam afegir només DMSO com a control. Nou hores més tard (48 hores després de transfectar) vam recollir les cèl·lules i vam fer *western blot* contra GAGA. En el *western* no es veu cap increment dels nivells de proteïna del mutant afegint MG132 i això suggereix que no es deu donar degradació del mutant via proteosoma (veure figura D.22). Si es tracta de degradació, la degradació d'aquesta forma mutada es deu donar per alguna via alternativa a la del proteosoma.

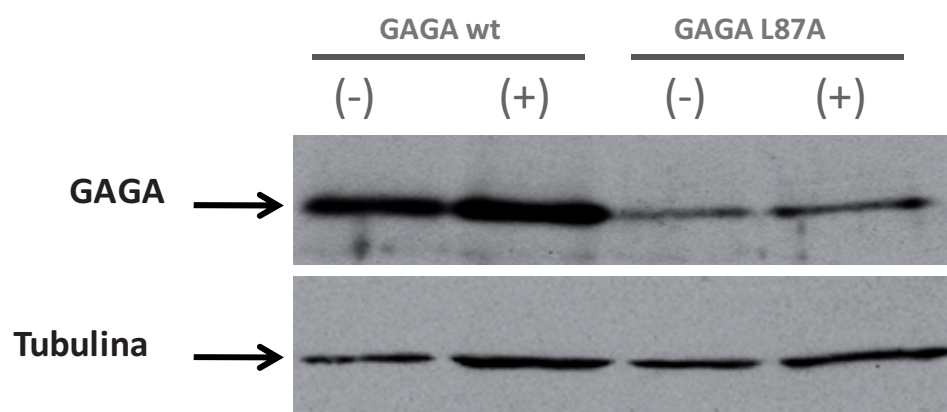


Figura D.22. *Western blot* d'extractes de cèl·lules S2 transfectades transitòriament amb GAGAw_t i GAGAL87A i tractades amb l'inhibidor de proteosoma MG132. Les cèl·lules han estat tractades 9 hores amb inhibidor del proteosoma MG132 diluït amb DMSO, a una concentració de 10 μ M final (+), i les cèl·lules control només tractades amb DMSO (-). La membrana ha estat revelada amb anticòs α -GAGA (part superior de la figura) i amb α - β -gal (part inferior de la figura) com a control intern.

Resultats

D.1.3.C.3. Mutacions de residus essencials en el motiu LxxLL en un sistema heteròleg també afecten la capacitat activadora de GAGA

Com que els mutants del POZ generaven molt poca proteïna a cèl·lules S2, vam decidir transfectar el mutant L87D a cèl·lules HeLa. Aquest mutant, segons els càlculs sobre el model del POZ, no havia de desestabilitzar l'estructura del POZ. Assajos de *western blot* i d'immunolocalització indiquen que, a HeLa, el mutant L87D s'expressa molt millor que a cèl·lules S2 (veure figura D.23). Mirant les immunolocalitzacions, la intensitat dels nuclis i la quantitat de cèl·lules transfectades, entre el mutant i la GAGAwT, són similars.

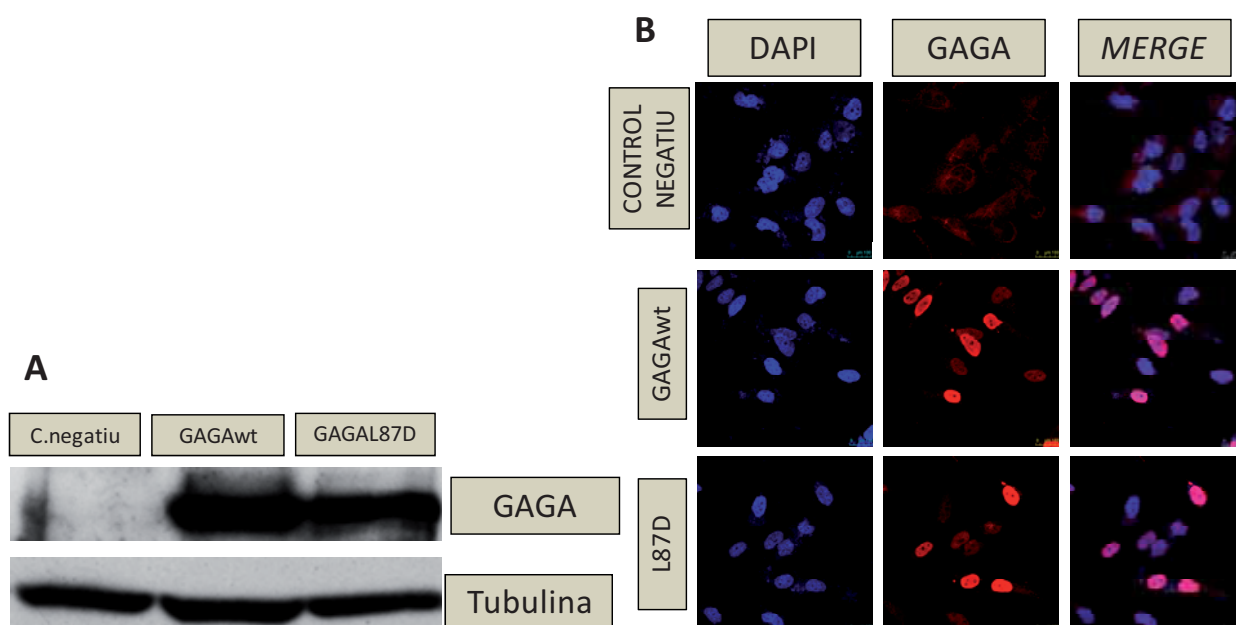


Figura D.23. Immunolocalitzacions i *western blot* per detectar els nivells de proteïna del mutant L87D a HeLa. **A)** *Western blot* de cèl·lules HeLa transfectades amb GAGA i GAGAL87D. La membrana està revelada amb anticòs α -GAGA i α -tubulina. **B)** Projeccions màximes d'imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE d'immunolocalitzacions de cèl·lules HeLa transfectades transitòriament amb GAGA salvatge i amb el mutant L87D. D'esquerra a dreta de la imatge DAPI (blau), GAGA (vermell) i *merge* (solapament dels dos canals). Les immunolocalitzacions s'han revelat amb α -GAGA. Es detecten cèl·lules sobreexpressant tant la GAGA salvatge com el mutant i el nivell de sobreexpressió és similar, a diferència del que s'havia vist a S2.

Un cop vam veure que a HeLa el mutant s'expressava millor que a S2, vam voler veure si igualment es veia afectada la capacitat activadora de GAGA. Vam realitzar transfecció del mutant L87D a HeLa i vam observar que, tot i que el mutant s'expressa correctament, l'activació d' *eve* a HeLa amb el mutant de GAGA és molt menor que la GAGAw_t (veure figura D.24).

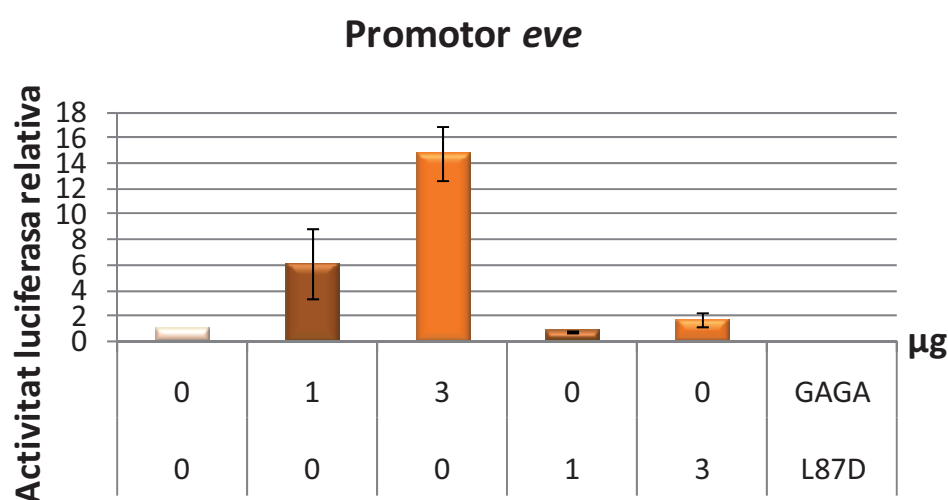


Figura D.24. Assaig de transfecció transitòria a cèl·lules HeLa amb el promotor *eve*, sobreexpressant GAGA i GAGAL87D. Cada barra representa l'activitat luciferasa, corregida pels nivells d'activitat de β -galactosidasa i relativitzada al primer punt, que és l'activitat inicial del promotor (color rosa pàl·lid). Els segon i tercer punt del gràfic, marró i taronja respectivament, contenen quantitats creixents de GAGA salvatge per veure la l'activació d'*eve* de manera dosi-dependent. La resta de punts contenen concentracions creixents (marró i taronja) del mutant GAGAL87D. El gràfic és un promig de 2 experiments independents, cadascun d'ells amb duplicats de cada punt de transfecció.

Partint de la base que a HeLa el mutant L87D s'expressa correctament però no activa, i que a S2 no activa ni s'expressa bé, vam decidir realitzar experiments de coimmunoprecipitació de TAF4-HA i L87D a cèl·lules HeLa. Vam transfectar TAF4-HA i GAGA a HeLa de forma transitòria i vam immunoprecipitar amb anticòs α -HA. Aquestes coimmunoprecipitacions a HeLa ens mostren que TAF4-HA immunoprecipita de forma eficient i amb α -GAGA veiem que hi ha una elevada coimmunoprecipitació, tant de GAGAL87D com de GAGA salvatge (veure figura D.25). El mutant L87D, per tant, pot continuar interaccionant amb TAF4 tot i tenir mutada la leucina del motiu LxxLL.

Resultats

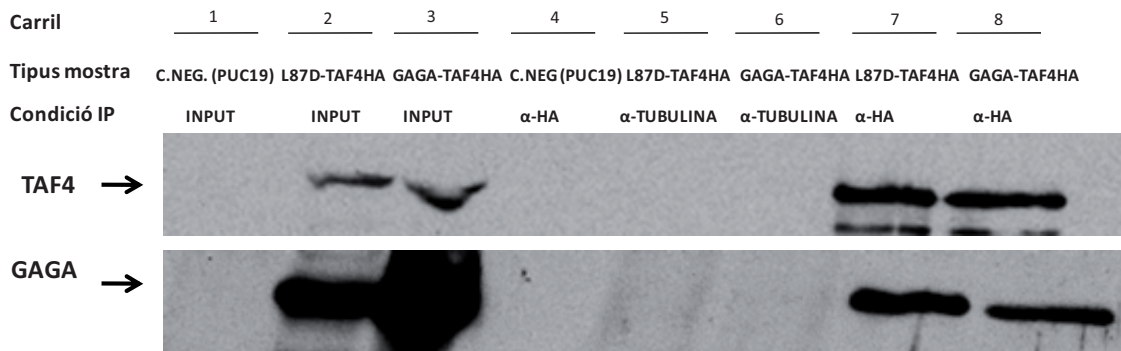


Figura D.25. *Western blot* de l'assaig de coimmunoprecipitació de TAF4-HA, GAGA i GAGAL87D a cèl·lules HeLa. A la part superior de la figura, la membrana està revelada amb l'anticòs α -HA i ens permet detectar TAF4-HA i a la part inferior de la figura la membrana està revelada contra GAGA. En l'input de la immunoprecipitació es veu TAF4, GAGAL87D i GAGAwT que hem transfectat (carrils 1-3), el carril del control negatiu immunoprecipitat amb anticòs α -HA i els carrils immunoprecipitats amb l'anticòs irrellevant α -tubulina (carrils 4-6) i finalment els dos últims carrils s'observen la GAGAL87D i GAGAwT que han coimmunoprecipitat amb TAF4HA (carrils 7-8).

Veient que, tant GAGA, com GAGAL87D coimmunoprecipiten amb TAF4-HA a HeLa, vam preguntar-nos si el domini POZ era necessari per a la interacció de GAGA amb TAF4. A més de mirar si Δ POZ interaccionava amb TAF4 també vam mirar què passava amb la construcció Δ Q. Vam transfectar GAGA i les delecions de GAGA, (Δ POZ i Δ Q) juntament amb TAF4-HA per veure si el domini POZ era necessari per la interacció amb TAF4. A la figura D.26, s'observa que la interacció continua donant-se en absència del domini POZ i del domini Q, suggerint que els dos dominis no són imprescindibles per la interacció.

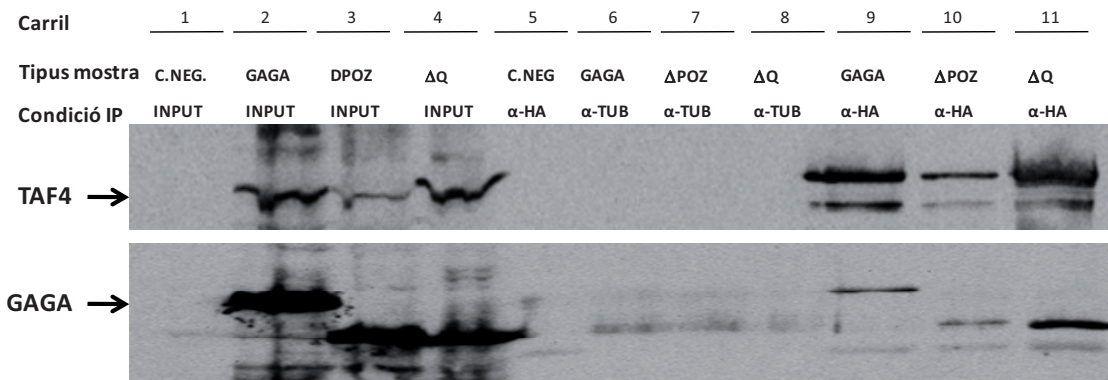


Figura D.26. *Western blot* de l'assaig de coimmunoprecipitació de TAF4-HA amb les construccions GAGA, GAGA- Δ POZ i GAGA- Δ Q a partir d'extractes de cèl·lules HeLa transfectades transitòriament. En els títols del tipus de mostra hi trobem el control negatiu de cèl·lules transfectades amb pUC19, en la resta de mostres, només hem indicat la construcció de GAGA transfectada, però totes elles també tenen transfectat TAF4-HA. A la part superior de la figura, la membrana està revelada amb l'anticòs α -HA i ens permet detectar TAF4-HA i a la part inferior de la figura la membrana està revelada amb α -GAGA. Al primer carril hi ha l'input del control negatiu, seguit dels carrils 2, 3 i 4 on es veuen els inputs de TAF4 sobreexpressat, i a la part inferior els inputs de GAGA i Δ POZ i Δ Q sobreexpressats. Al carril 5 s'hi troba el control negatiu immunoprecipitat amb α -HA, al carril 6, 7 i 8 els immunoprecipitats amb l'anticòs irrellevant α -tubulina i finalment en els carrils 9, 10 i 11 les mostres immunoprecipitades amb α -HA.

D.2. Reavaluació de l'activitat de GAGA sobre gens diana coneguts

D.2.1. La sobreexpressió de GAGA no altera el patró d'expressió d'*engrailed*, *even-skipped* ni *Ultrabithorax*

Des de l'inici de l'estudi de GAGA, s'han descrit diferents gens que tenen llocs d'unió de GAGA a les seves regions promotores i s'ha vist que GAGA és capaç d'activar aquests gens, tant *in vitro*, com *in vivo*. Entre els gens diana més coneguts i estudiats trobem *even-skipped*, *engrailed* i *Ultrabithorax*. Volíem veure si la sobreexpressió de GAGA podia induir l'expressió ectòpica d'aquests gens diana fora del seu domini d'expressió. En certs casos, l'expressió ectòpica de gens s'ha descrit que reprograma l'expressió gènica. Així, per exemple, l'expressió ectòpica de *wingless* en discos imaginals interfereix amb l'expressió de *decapentaplegic* i altera els gens homeòtics i la determinació cel·lular. Així, l'increment de *wingless* produeix una expansió de l'expressió d'*engrailed* a la zona anterior del disc imaginal (Johnston et al. 1996). Nosaltres volíem veure si es podia produir un fenomen similar en els gens controlats per GAGA en una situació de sobreexpressió.

Vam realitzar experiments de sobreexpressió de GAGA utilitzant el sistema d'expressió UAS-GAL4 descrit a l'apartat C.3 de Materials i mètodes. Vam sobreexpressar GAGA a embrions i discos imaginals de larva en estadi 3, utilitzant els diferents *drivers*. Volíem veure què passava en els dominis d'expressió del *driver* on s'incrementava la quantitat de GAGA, respecte l'expressió dels gens *engrailed*, *even-skipped* i *Ultrabithorax*.

Resultats

Engrailed (en)

Actua com a gen de polaritat de segment en estadis primerencs del desenvolupament embrionari. En estadi de blastoderm cel·lular, s'expressa com una sola banda i en la gastrulació genera un patró de 14 bandes aïllades i estretes, formades per una sola cèl·lula d'amplada, al llarg l'eix antero-posterior de l'embrió. A discos imaginals s'expressa només en la meitat posterior dels discos de pota, halteri i ala (veure figura D.27). La major part de l'epidermis de *Drosophila* es desenvolupa com una cadena, alternant compartiments anteriors i posteriors, poblacions de cèl·lules que difereixen unes de les altres, gràcies a *engrailed*, que és actiu en les cèl·lules posteriors però no anteriors.

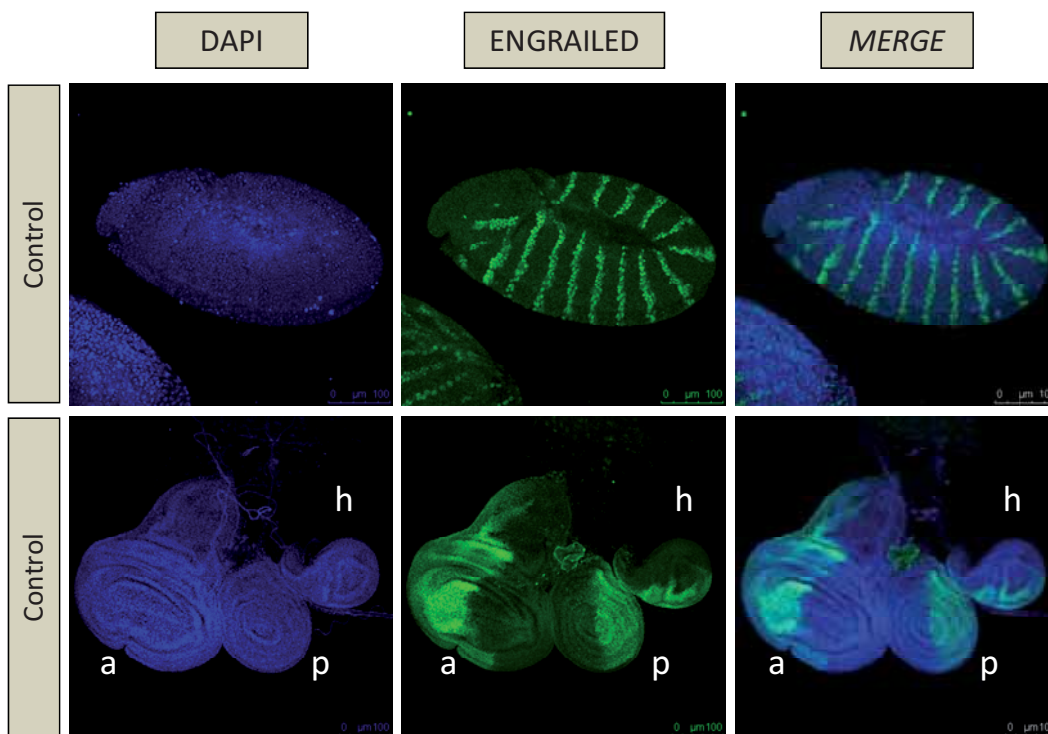


Figura D.27. Immunolocalitzacions d'individus control a embrions i discos imaginals per tal de veure els patrons d'expressió salvatges d'*en*. Imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE. D'esquerra a dreta de la imatge trobem, DAPI (blau), la tinció amb α -engrailed (verd) i *merge* (solapament dels dos canals). A la part superior de la figura s'observa el patró d'expressió d'*en* a l'embrió i a la part inferior de la figura, s'observa el patró d'*en* a discos imaginals d'ala (a), pota (p) i halteri (h).

Utilitzant els *drivers* *ptc*-GAL4 i *prd*-GAL4, vam sobreexpressar GAGA a embrions i discos imaginals. El patró de *ptc*, a embrions, consta d'una sèrie de bandes gruixudes. Les bandes d'expressió d'*en* cauen ben bé a l'interstici d'aquestes bandes de *ptc*, on es sobreexpressa GAGA. Com es pot observar a la figura, no hi ha expressió d'*en* més enllà del seu patró normal, no apareixent en els dominis de sobreexpressió de GAGA que cauen fora de la seva zona d'expressió (veure figura D.28). Amb el *driver* *prd*-GAL4, que sobreexpressa GAGA en set bandes gruixudes, tampoc veiem que el patró d'*en* s'eixampli i aparegui expressat ectòpicament seguint el patró de sobreexpressió de GAGA (veure figura D.28). En disc imaginal d'ala, *en* s'expressa de forma salvatge en tota la meitat posterior del disc. Sobreexpressant GAGA amb el *driver* *MS1096*-GAL4, que expressa principalment a tota la zona del *wing pouch*, no veiem que *en* tingui expressió a la part anterior del disc, allà on també hi ha sobreexpressió de GAGA. Per tant, en totes les immunolocalitzacions realitzades no hi ha cap efecte resultant de la sobreexpressió de GAGA sobre el patró d'expressió d'*en* (veure figura D.28).

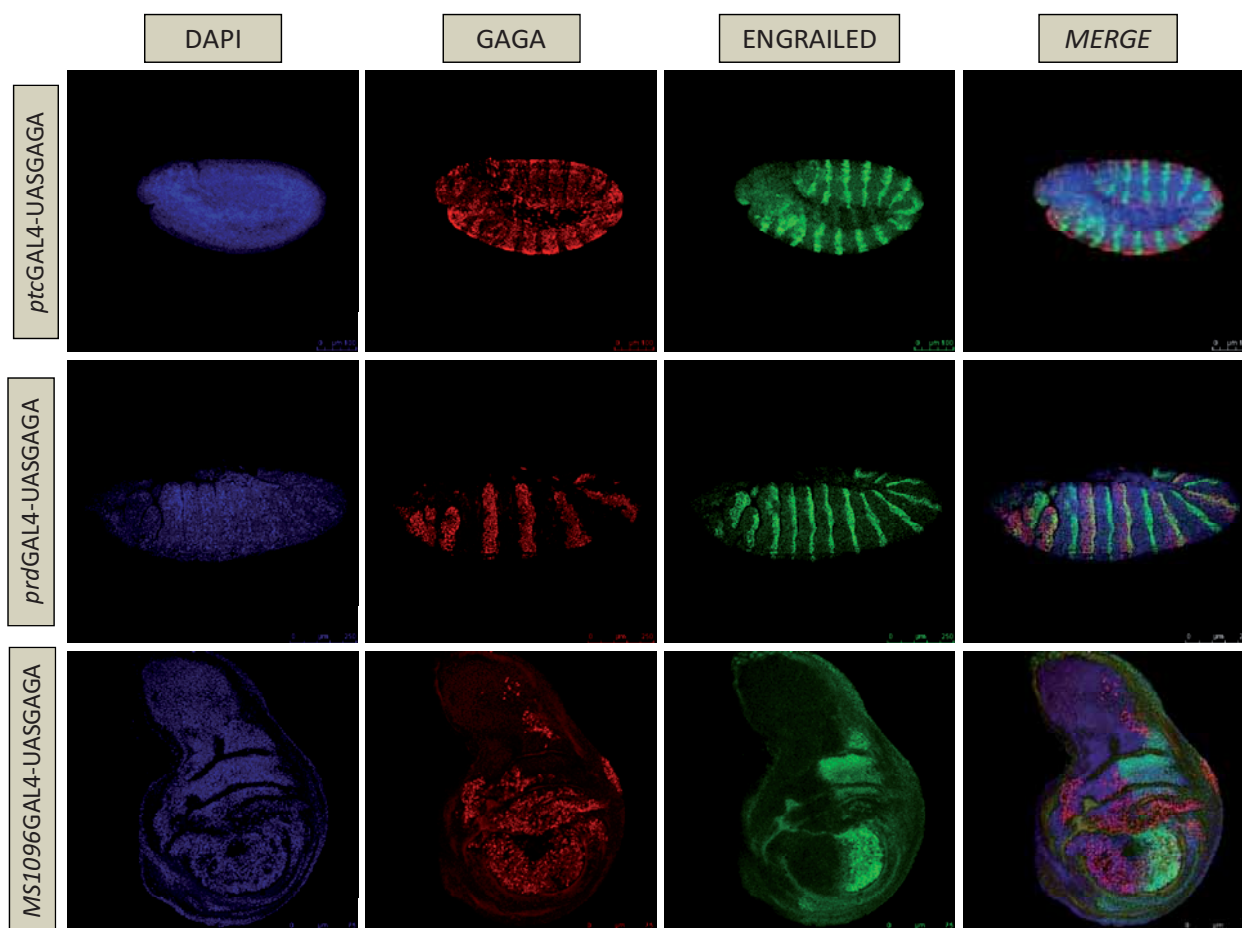


Figura D.28. Immunolocalitzacions d'embrions i discos imaginals de larves en estadi 3 que sobreexpressen GAGA per veure els efectes de la sobreexpressió de GAGA sobre *en*. Imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE. D'esquerra a dreta de la imatge trobem DAPI (blau), la tinció amb α -GAGA (vermell), la tinció amb α -engrailed (verd) i *merge* (solapament dels tres canals). Els embrions *ptc*GAL4-UASGAGA i *prd*GAL4-UASGAGA sobreexpressen GAGA i es veu que el patró d'*en* no s'altera ni s'expandeix a les zones on s'ha sobreexpressat GAGA. En el disc imaginal d'ala, *en* s'expressa a la part posterior del disc i quan GAGA es sobreexpressa sota el control del *driver* *MS1096*-GAL4, *en* tampoc altera el seu patró.

Resultats

Ultrabithorax (Ubx)

És un gen de la família de gens homeòtics que forma part del complex *Bithorax*, junt amb els gens *Abdominal A* i *Abdominal B*. El complex *Bithorax* controla la identitat dels segments que donaran lloc al tòrax posterior i l'abdomen. Els tres gens s'expressen en diferents intensitats en els dos terços posteriors de la mosca de forma additiva en l'eix antero-posterior de l'embrió. En l'embrió, *Ubx* s'expressa del parasegment PS5 al PS12. L'expressió més forta és dona en el parasegment PS6 i la seva intensitat és menor en la resta de bandes (veure figura D.29). A discos imaginals s'expressa a pota i halteri però no a disc d'ala. (veure figura D.29).

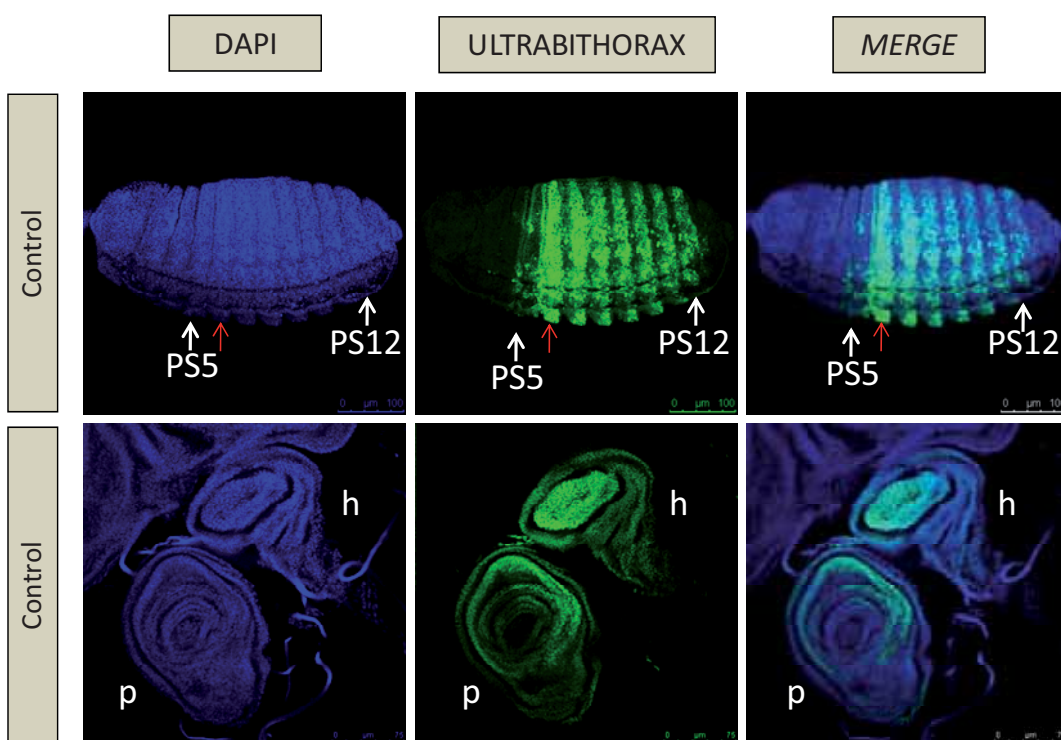


Figura D.29. Immunolocalitzacions d'embrió i discos imaginals d'individus control per tal de veure els patrons salvatges d'*Ubx*. Imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE. D'esquerra a dreta de la imatge trobem, DAPI (blau), la tinció amb α -*Ubx* (verd) i *merge* (solapament dels dos canals). A la part superior de la figura s'observa el patró d'expressió d'*Ubx* a embrió. *Ubx* s'expressa del parasegment PS5, al parasegment PS12 (indicats a la foto). L'expressió més forta es dona en el parasegment PS6 (marcat amb una fletxa vermella). A la part inferior de la figura, s'observa el patró d'*Ubx* a discos imaginals de pota (p) i halteri (h). No s'ha inclòs imatge del disc d'ala perquè *Ubx* no s'hi expressa.

Vam sobreexpressar GAGA a embrions, a través dels *drivers* *ptc*-GAL4 i *prd*-GAL4 i les imatges de les immunolocalitzacions mostren un patró normal d'*Ubx*, que no es veu alterat. Les bandes sempre es troben limitades a la part posterior de l'embrió dels parasegments PS5 a PS12 i la banda més intensa sempre és la corresponent al parasegment PS6 (veure figura D.30). Tal i com s'ha descrit anteriorment a discos imaginals, *Ubx* s'expressa en els discos d'halter i i pota però no en el disc d'ala (veure figura D.29). La sobreexpressió de GAGA amb el *driver* *MS1096*-GAL4, que s'expressa als discos d'halter i ala, no afecta l'expressió normal d'*Ubx* a l'halter, ni suposa que *Ubx* passi a expressar-se a l'ala (veure figura D.30).

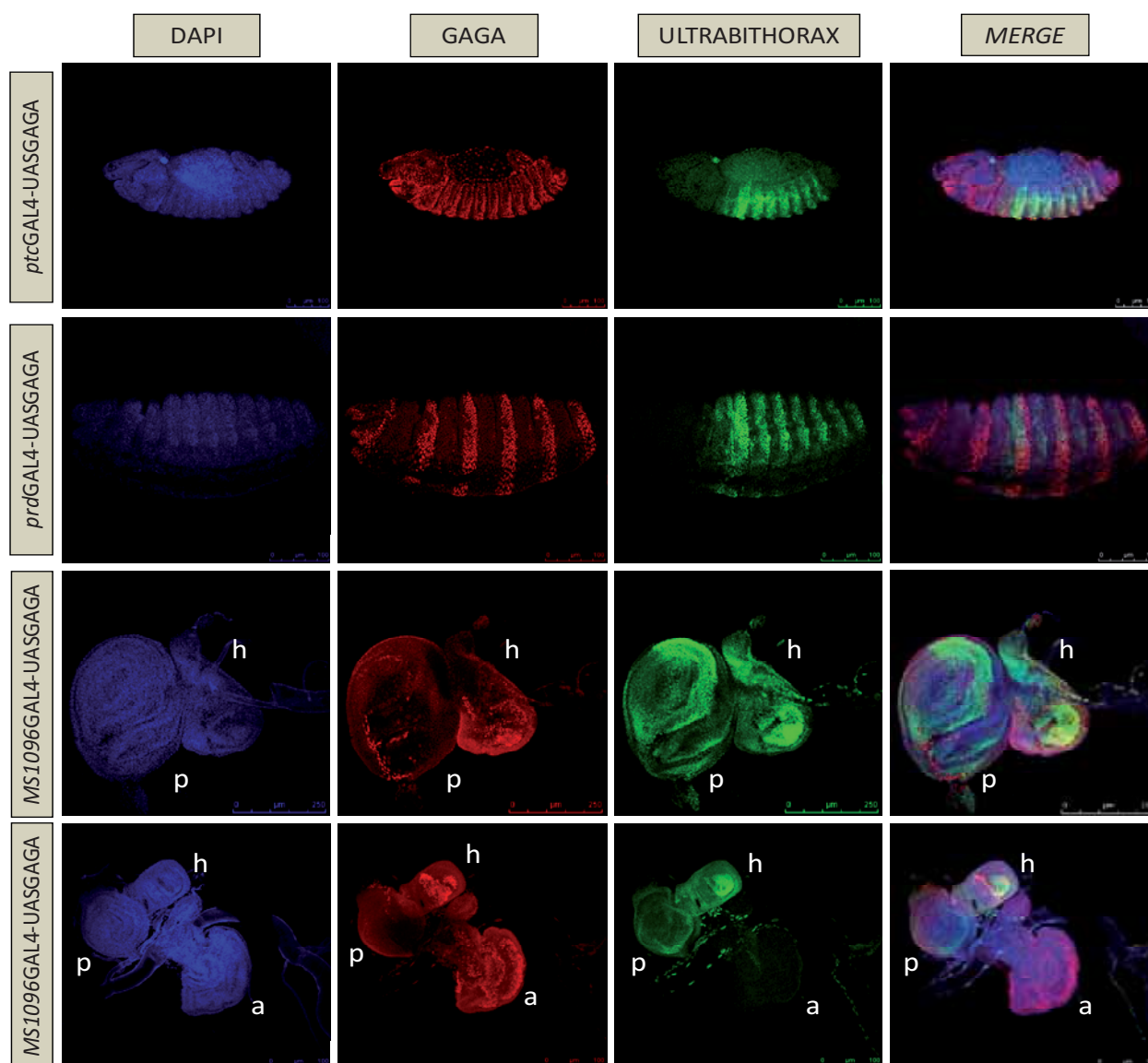


Figura D.30. Immunolocalitzacions d'embrions i discos imaginals de larves en estadi 3 que sobreexpressen GAGA per veure els efectes de la sobreexpressió de GAGA sobre *Ubx*. Imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE. D'esquerra a dreta de la imatge, DAPI (blau), tinció amb α -GAGA (vermell), tinció amb α -*Ubx* (verd) i *merge* (solapament dels tres canals). Els embrions *ptc*GAL4-UASGAGA i *prd*GAL4-UASGAGA sobreexpressen GAGA i s'observa que el patró d'*Ubx* no es veu alterat ni s'expandeix a les zones on s'ha sobreexpressat GAGA. A discos imaginals, GAGA es sobreexpressa sota el control del *driver* *MS1096*-GAL4 que té expressió en els discos d'halter i i ala. *Ubx* no altera el seu patró a l'halter i degut a la sobreexpressió de GAGA, ni passa a expressar-se a l'ala.

Resultats

Even-skipped (eve)

És un gen *pair-rule* que s'expressa a l'embrió primerenc, en forma d'una banda gruixuda i quan l'embriogènesi avança, el seu patró consisteix en 7 bandes corresponents a tots els parasegments senars. Aquest patró *pair-rule* és veu per primer cop al final de l'estadi de tancament i persisteix al llarg de tota la gastrulació i l'elongació de la banda germinal. Abans de la retracció de la banda germinal, el patró de segmentació desapareix i l'expressió d'*eve* persisteix només en la banda més posterior de la banda germinal. Quan la retracció de la banda germinal comença, *eve* es detecta en la regió neurogènica de l'embrió i s'observen agrupaments d'unes 4 o 6 cèl·lules a cada cantó del solc ventral, d'una manera repetitiva i segmentada. No presenta expressió en discos imaginals (veure figura D.31).

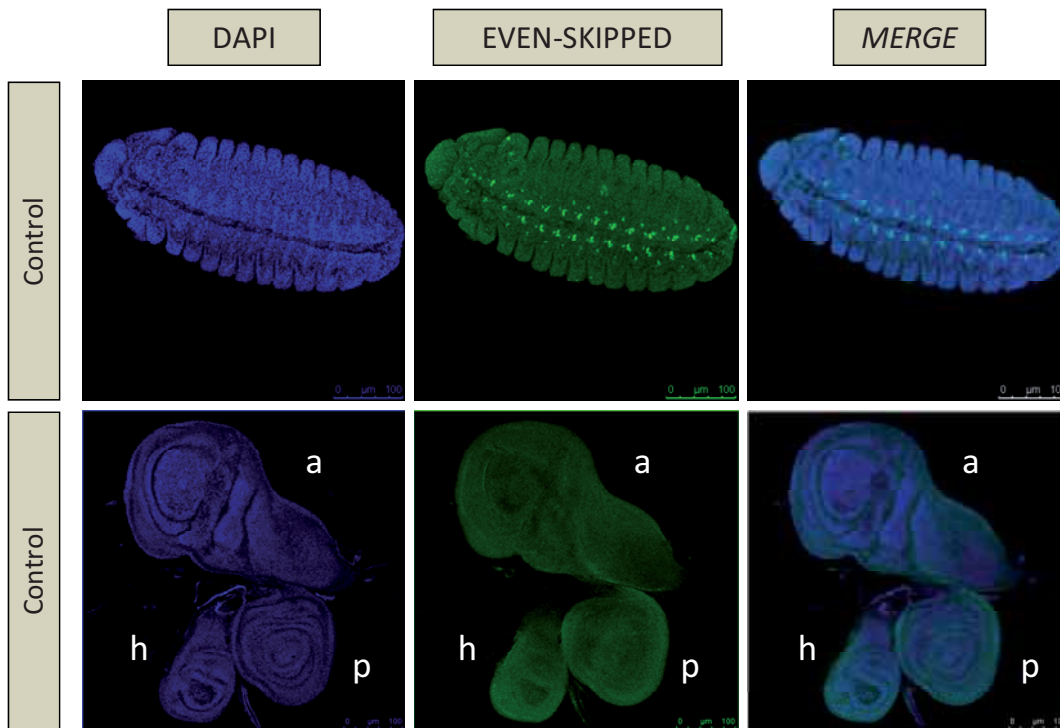


Figura D.31. Immunolocalitzacions d'embrions i discos imaginals d'individus control per tal de veure els patrons salvatges d'*eve*. Imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE. D'esquerra a dreta de la imatge trobem DAPI (blau), la tinció amb α -*eve* (verd) i *merge* (solapament dels dos canals). A la part superior de la figura s'observa el patró d'expressió puntejat d'*eve* a cada cantó del solc ventral a un embrió en estadi de gàstrula. A la part inferior de la figura immunolocalitzacions dels discos imaginals d'ala, pota i halteri mostren que no hi ha expressió d'*eve* a discos. El senyal que es veu en verd és senyal de fons inespecífic de l'anticòs α -*eve*.

A la figura D.32 es pot veure la GAGA sobreexpressada en els embrions amb els *drivers* *ptc*-GAL4 i *prd*-GAL4. A les imatges es pot veure el patró puntejat d'*eve*, al voltant del solc ventral, que de cap manera s'altera ni apareix cap altre senyal al llarg de les bandes on es sobreexpressa GAGA. En mosques salvatges *eve* no s'expressa a discos imaginals i la sobreexpressió de GAGA, tant amb el *driver* *MS1096*-GAL4, com amb el *driver* *dpp*-GAL4, no suposa una expressió d'*eve* en el domini de sobreexpressió de GAGA. Igual que en embrions, no es veu cap mena d'efecte de la sobreexpressió de GAGA sobre *eve*.

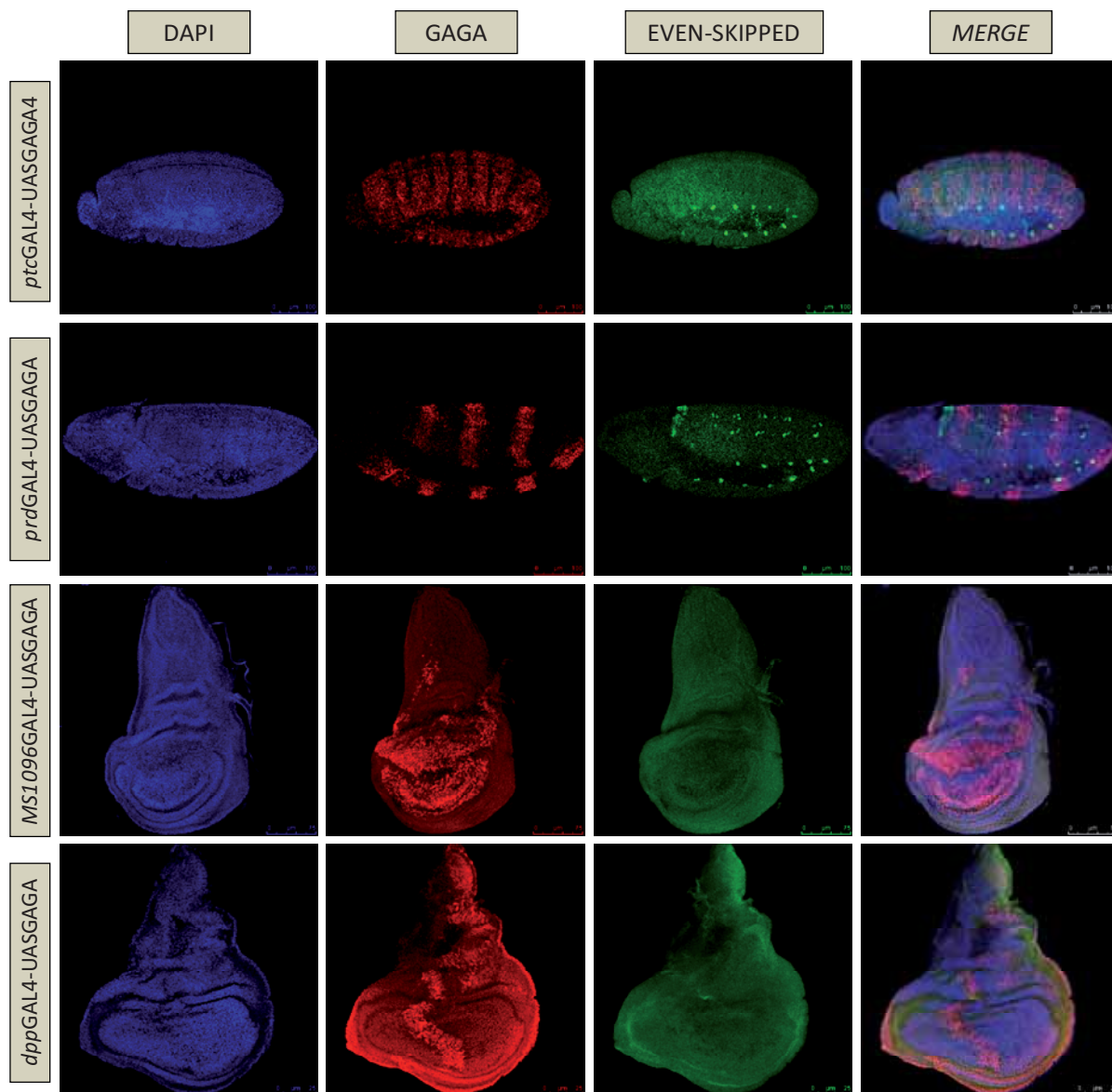


Figura D.32. Immunolocalitzacions d'embrions i discos imaginals de larves en estadi 3 que sobreexpressen GAGA per veure els efectes de la sobreexpressió de GAGA sobre *eve*. Imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE. D'esquerra a dreta de la imatge, DAPI (blau), tinció amb α -GAGA (vermell), tinció amb α -even skipped (verd) i *merge* (solapament dels tres canals). Els embrions *ptc*GAL4-UASGAGA i *prd*GAL4-UASGAGA sobreexpressen GAGA i s'observa que el patró d'*eve* no s'altera ni s'expandeix a les zones on s'ha sobreexpressat GAGA. GAGA s'ha sobreexpressat a discos d'ala amb els *drivers* *MS1096*-GAL4 i *dpp*-GAL4. La sobreexpressió de GAGA a disc imaginal no té cap efecte sobre *eve*.

D.2.2. La depleció de GAGA a discos imaginals no afecta l'expressió de gens diana coneguts

Veient que l'expressió ectòpica de GAGA no dirigia ni alterava l'expressió de cap dels gens estudiats, i que no vèiem cap mena d'efecte sobre discos ni embrions, vam decidir sobreexpressar un *hairpin* d'RNAi de GAGA, que permetés veure què passava amb aquests gens quan es reduïen els nivells endògens de GAGA a discos imaginals. Estudis sobre mutants *Trl^{13C}*, mutants genètics de GAGA, indiquen que la falta de GAGA genera elevat nombre de defectes (veure A.4.2). Les mosques doble heterozigotes *Trl^{13C}; Ubx¹³⁰* presenten uns halteris molt grossos, indicatius de l'alteració de l'expressió del gen homeòtic *Ubx*. Les mosques heterozigotes per *Trl^{13C}* presenten anormalitats en el patró d'expressió en el cas d'*en* (Bhat et al. 1996). Aquests mutants genètics tenen molts problemes de viabilitat i no permeten fer estudis a disc imaginal. És per això que per veure els efectes de la manca de GAGA sobre aquests gens a discos imaginals, vam haver de fer servir el sistema UAS-GAL4 per expressar un *hairpin* RNAiGAGA que permetés reduir els nivells de GAGA a nivell larvari.

En aquests experiments vam utilitzar els *drivers nub-GAL4* i *ptc-GAL4* per expressar el *hairpin* RNAiGAGA. Amb el *driver nub-GAL4*, a part del *hairpin* RNAiGAGA, també vam sobreexpressar *dicer2*, component de la maquinària d'interferència, per incrementar els efectes de l'RNAi. D'aquesta manera, les mosques que expressaven el *hairpin* RNAi de GAGA i *dicer2* sota el control del *driver nubbi-GAL4* (*nubGal4-UASdicer2-UASGAGA*) presentaven, a discos imaginals, una forta disminució de GAGA. En el cas del *driver ptc-GAL4* no va caldre sobreexpressar *dicer2* perquè per si sol l'expressió del *hairpin* d'RNAi, sota el control de *ptc*, ja generava una forta davallada de GAGA. Tot l'estudi el vam realitzar amb discos imaginals ja que en embrions no s'aconsegueix reduir la proteïna GAGA amb RNAi. Això podria ser degut a que el sistema UAS-GAL4 comença a funcionar ben entrada l'embriogènesi i aleshores, no hi ha suficient temps perquè l'RNAi comenci a actuar i es vegi una davallada proteica important. O també podria ser que la GAGA dipositada maternament fos suficient i impedís veure cap efecte sobre la davallada de GAGA produïda en el zigot.

Vam enfocar l'estudi mirant com s'afectaven els patrons d'*Ubx* i *en*, a discos imaginals, dins la zona on la quantitat de GAGA es reduïa considerablement. El gen *eve* no el vam tenir en compte en aquest experiment de reducció de GAGA ja que a discos imaginals no s'expressa i, per tant, la reducció de GAGA a discos no podria afectar-lo.

A la figura D.33 es pot veure que, allà on s'expressa l'RNAi, hi ha una forta disminució de la quantitat de GAGA, com "un forat" en la zona d'expressió de *nubbin*GAL4, indicatiu de la reducció dels nivells de GAGA. Tot i la forta baixada de GAGA, el patró d'*en*, tant a disc d'ala com d'halter, no s'altera. No es veu cap reducció de l'expressió d'*en* allà on el patró d'*en* i la forta baixada de GAGA coincideixen espacialment. Tampoc es veu cap mena d'alteració del patró respecte els discos control, on no hi ha expressió del *hairpin* d'RNAi.

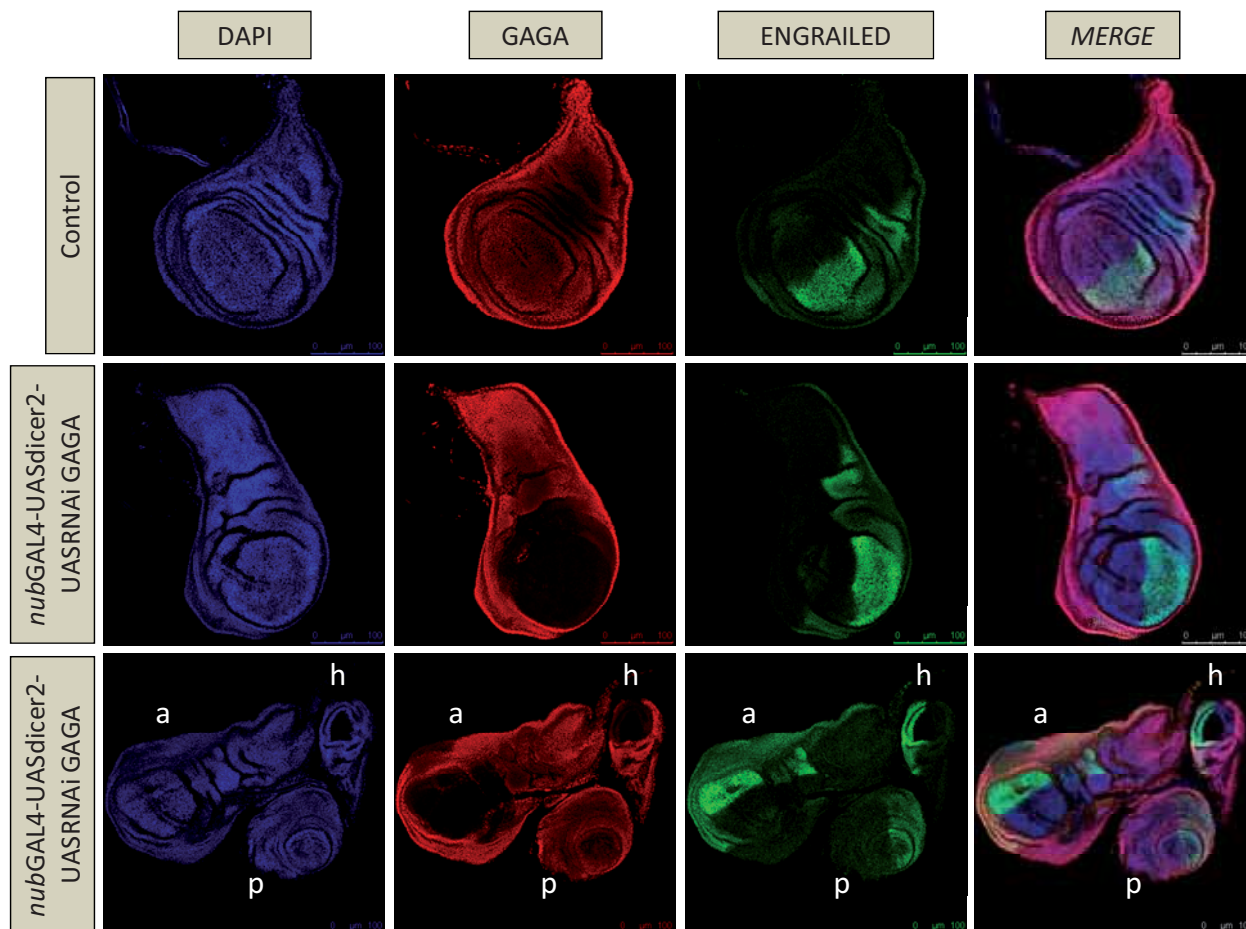


Figura D.33. Immunolocalitzacions de discos imaginals de larves en estadi 3 que expressen un *hairpin* RNAiGAGA, per veure els efectes de la depleció dels nivells de GAGA sobre *en*. Imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE. A la primera fila s'observa el control i la resta de files són discos que expressen *nubGAL4-UASdicer2-UASRNAiGAGA*. D'esquerra a dreta de la imatge es pot observar DAPI (blau), tinció amb α -GAGA (vermell), α -engrailed (verd) i *merge* (solapament dels tres canals). En la columna de GAGA (vermell) es veu una forta baixada dels nivells endògens de GAGA que genera un "forat" en els discos. En la zona on GAGA està disminuïda i la zona d'expressió d'*en* coincideixen no es veu cap mena d'alteració, ni reducció de l'expressió d'*en*.

Resultats

Respecte *Ubx*, tampoc veiem cap mena d'alteració de patró ni disminució dels nivells d'expressió en la zona on s'ha reduït la quantitat de GAGA (veure figura D.34).

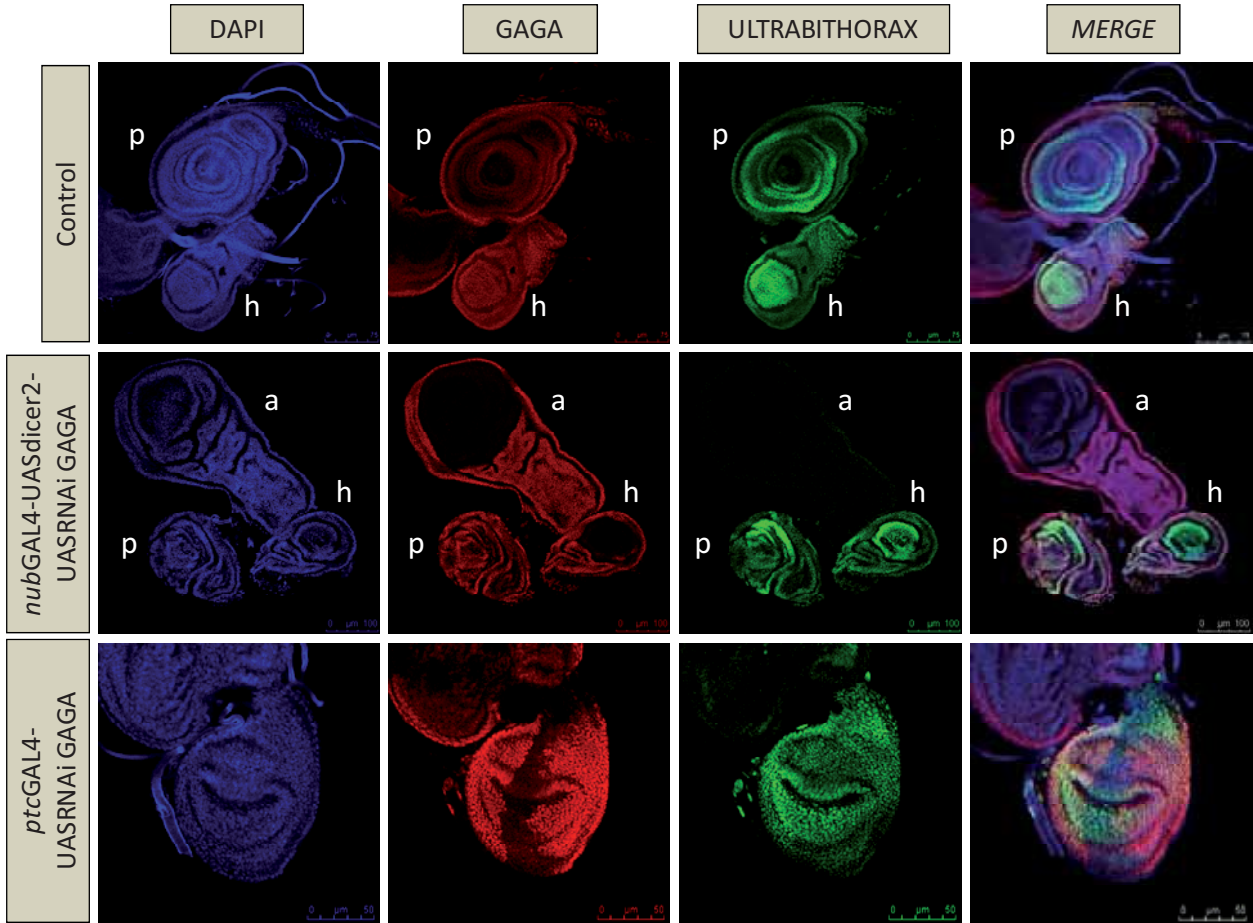


Figura D.34. Immunolocalitzacions de discos imaginals de larves en estadi 3 que expressen un *hairpin* RNAiGAGA, per veure els efectes de la depleció de GAGA sobre *Ubx*. Imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE. D'esquerra a dreta de la imatge es pot observar DAPI (blau), α -GAGA (vermell), α -*Ubx* (verd) i *merge* (solapament dels tres canals). A la primera fila es poden observar els discos control d'halteri (h) i pota (p) que no expressen res. La segona fila, discos d'ala i pota que expressen l'RNAiGAGA i *dicer2* sota el control del *driver nubbin-GAL4* i la tercera fila mostra un disc d'halteri que expressa l'RNAiGAGA sota el control del *driver ptc-GAL4*, sense la sobreexpressió de *dicer2*. Es pot observar, tant amb *nubbin* sobreexpressant *dicer2*, com amb *ptc*, una forta baixada de GAGA que genera un buit d'expressió en els discos. En les zones solapants on GAGA està disminuïda i *Ubx* s'expressa no es veu cap mena d'alteració, ni reducció de l'expressió d'*Ubx*.

D.3. Cerca de nous gens diana per a GAGA.

Microarrays de sobreexpressió i de falta de funció

Per poder veure a nivell global quins gens són controlats directament per GAGA i, d'aquesta manera, poder tenir més informació sobre el funcionament de GAGA, vam decidir realitzar *microarrays* d'expressió. Per una banda, vam dissenyar un sistema de *microarray* per sobreexpressar la proteïna i per un altre cantó, un *microarray* per reduir els nivells endògens de GAGA. D'aquesta manera, preteníem tenir experiments complementaris que ens ajudessin a l'hora d'interpretar els resultats obtinguts.

Per realitzar ambdós tipus de *microarrays*, vam utilitzar el sistema UAS-GAL4 (veure apartat C.3 Materials i mètodes) sota el control d'un *driver* general que sobreexpressava la nostra proteïna (*microarray* de sobreexpressió) o bé un *hairpin* d'RNAi dissenyat contra GAGA (*microarray* de manca de funció) per tal de disminuir els nivells de proteïna. Com que volíem fer el màxim de comparatius tots dos tipus de *microarrays*, i el sistema d'RNAi a embrions no funciona per poder disminuir els nivells de GAGA, vam decidir realitzar els dos *microarrays* utilitzant larves de tercer estadi. Addicionalment, el fet de realitzar els *microarrays* a larva ens permetia veure el paper de GAGA a larva, on no es té informació de quins gens regula, ni quin paper funcional té. Com que GAGA és una proteïna implicada en gran nombre de processos i funcions, ens va semblar que utilitzar larves senceres per fer els *microarray* generaria gran nombre de gens diferencialment expressats i seria molt complicat a l'hora de fer l'anàlisi de dades. Per aquesta raó, vam decidir utilitzar discos imaginals d'ala, un teixit de la larva que permetria tenir informació d'un nombre de gens concrets per poder extreure conclusions més ajustades dels gens regulats per GAGA, tot i que limitats a un sol teixit.

En els *microarrays*, vam voler tenir en compte les dues isoformes, GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁. Les dues isoformes, fins al moment, s'han descrit com a proteïnes de funció similar però no solapant, tot i que actualment encara no estan clares les diferències entre ambdues (veure apartat A.4.2). El fet de fer els *microarrays* amb les dues isoformes permetia obtenir major informació i ens donava la oportunitat de poder trobar diferències funcionals entre les dues isoformes. En el *microarray* de sobreexpressió va ser possible sobreexpressar les dues isoformes per obtenir dades per separat de cada una. En el *microarray* de falta de funció, no es va poder dissenyar cap RNAi específic d'isoforma ja que la zona que difereix entre les dues proteïnes és la zona del domini Q, una zona altament repetitiva i comuna a moltes altres proteïnes. Qualsevol RNAi dissenyat a la zona del domini Q coincidia amb la seqüència d'altres proteïnes i podia generar gran quantitat d'efectes inespecífics. L'RNAi, homòleg a la seqüència comuna entre les GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁, disminueix la quantitat de les dues isoformes, i d'aquesta manera, la informació del *microarray* de falta de funció reflecteix la manca global de GAGA.

D.3.1. Experiments preliminars al *microarray* de sobreexpressió

D.3.1.A. Condicions experimentals i controls pel correcte funcionament del *microarray*

En el *microarray* de sobreexpressió vam decidir utilitzar un sistema que ens permetés sobreexpressar GAGA de manera controlada, utilitzant un sistema induïble i sobreexpressant GAGA dins uns nivells no gaire elevats per evitar efectes no desitjats derivats de la sobreexpressió. D'aquesta manera, podíem aconseguir veure quins gens eren els més sensibles a un increment molt limitat de GAGA i, per tant, podíem trobar els gens capaços de reaccionar de forma més directa i més susceptibles de ser controlats per GAGA.

Un dels principals problemes i desavantatges de sobreexpressar GAGA des de l'inici dels creuaments és que es generen severos fenotips de malformació i letalitat (Bernues et al. 2007). Per evitar tots aquests efectes indesitjats, vam decidir utilitzar un sistema de sobreexpressió dirigida en el temps i en l'espai per expressar el transgèn que sobreexpressa GAGA. Aquest sistema consisteix en l'ús combinat del sistema UAS-GAL4 i un mutant termosensible de GAL80 (GAL80^{ts}), que és un repressor de l'activitat transcripcional de GAL4 (veure apartat C.4.1.A de Materials i mètodes). Aquest sistema permet el manteniment silent del transgèn a 18°C perquè GAL80 reprimeix GAL4 i quan es situa el creuament a 29-30°C GAL4 no està reprimit i pot activar l'expressió del transgèn.

GAL80^{ts}, en les nostres construccions, està sota el control del *driver Tub-GAL4* (*Tubulina*), que s'expressa ubiquament. Com que es poden utilitzar diferents *drivers* per expressar GAL4, es pot dirigir la sobreexpressió en teixits determinats, la capacitat d'induir del sistema és dual: es pot sobreexpressar GAGA en el moment que es vulgui gràcies al canvi de temperatura, i en el teixit que es vulgui, segons el *driver* utilitzat. Mitjançant aquest sistema, podíem induir la sobreexpressió de GAGA amb un mínim pols de temps per tal de minimitzar els efectes deleteris i poder identificar els gens diana més directes. Vam decidir utilitzar el *driver* ubiqü *Actina* per expressar GAL4, per tal de poder sobreexpressar GAGA en tot el disc imaginal.

Vam realitzar tres tipus de condicions diferents pels *microarrays* de sobreexpressió. Un *microarray* de sobreexpressió de la isoforma GAGA₅₁₉, un altre de sobreexpressió de GAGA₅₈₁, i finalment, un *microarray* control de sobreexpressió de la proteïna verda fluorescent, GFP. En principi, la sobreexpressió de GFP era la millor opció com a control negatiu de sobreexpressió ja

que permetia tenir un *microarray* en les mateixes condicions que els anteriors, on també s'utilitza el mateix sistema de sobreexpressió.

A la taula C.5 de Materials i mètodes es pot trobar un resum dels diferents creuaments utilitzats en els *microarrays* de sobreexpressió. Cal recordar que entre les mosques obtingudes fruit de cada creuament hi ha mosques que no sobreexpressen el transgèn, i per tant, són controls negatius i mosques que sí que expressen el transgèn. Les mosques control negatiu es diferencien de les que sí que expressen perquè contenen el cromosoma balancejador *TM6B*, que porta associat un marcador *tubby* que fa que les larves siguin més petites.

Per posar a punt el sistema, vam realitzar diferents proves d'inducció a 29°C per sobreexpressar GAGA₅₁₉. Volíem veure quin era el mínim temps possible d'inducció per tal de tenir una sobreexpressió suficient, però tampoc molt llarga, per evitar efectes indirectes no desitjats. Vam mantenir els creuaments a 18°C fins que les larves van arribar a l'estadi de larva 3. Aleshores, vam fer diferents proves d'inducció a 4, 8, 12 i 14 hores a 29°C. Passades les hores d'inducció corresponents, vam extreure per un cantó, discos d'ala de les larves que no expressaven els transgens com a control negatiu de sobreexpressió (*tubby*) i per un altre cantó discos imaginals d'ala de les larves expressaven els nostres transgens (no *tubby*). Aquests discos imaginals els vam fixar i vam fer immunolocalitzacions amb l'anticòs α -GAGA per veure els nivells de sobreexpressió de la proteïna (veure figura D.35). En les immunolocalitzacions realitzades s'observa que a les 4 hores d'inducció comencen a aparèixer cèl·lules aïllades que sobreexpressen GAGA₅₁₉. A les 8 hores, el nombre de cèl·lules incrementa en gran mesura i a les 12 hores ja s'observa un gran nombre de cèl·lules que sobreexpressen GAGA₅₁₉ al llarg de tot el disc (a 14 hores d'inducció l'expressió és molt similar a l'obtinguda a les 12 hores, i no es mostra). Les larves control negatiu (*tubby*), que no sobreexpressen GAGA, no presenten cap canvi en l'expressió de GAGA al llarg de les hores d'inducció. (veure figura D.35).

Resultats

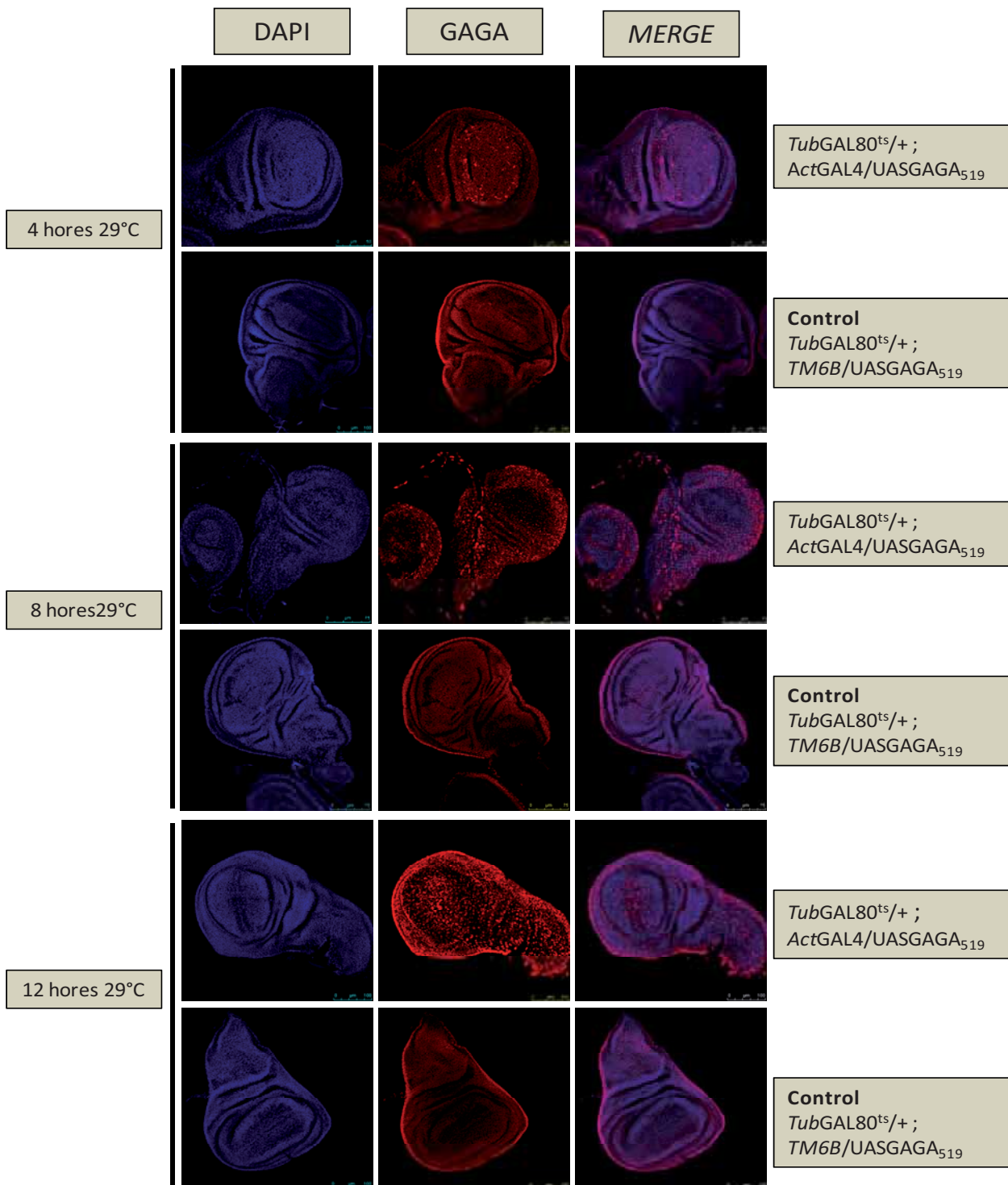


Figura D.35. Immunolocalitzacions per posar a punt el sistema de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ amb el sistema GAL4-GAL80^{ts}. Imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE d'immunolocalitzacions de discos imaginis d'ala de larves en estadi 3. Els discos, induïts 4, 8 i 12 hores a 29°C, són de larves que sobreexpressen GAGA₅₁₉ (*TubGAL80^{ts}/+ ; ActGAL4/UASGAGA₅₁₉*) i larves *tubby* control que no expressen el transgèn (*TubGAL80^{ts}/+ ; TM6B/UASGAGA₅₁₉*). D'esquerra a dreta de la imatge es pot observar la tinció amb DAPI (blau), la tinció amb l'anticòs α -GAGA (vermell), i el solapament dels dos canals (*merge*). A les 4 hores d'inducció, en els discos que sobreexpressen GAGA₅₁₉ es pot observar que comencen a aparèixer algunes cèl·lules que sobreexpressen GAGA, respecte el disc control que no sobreexpressa. L'aparició de cèl·lules que sobreexpressen GAGA incrementa amb el temps, havent-hi cada cop més cèl·lules sobreexpressant GAGA. A les 12 hores, ja es veuen moltes cèl·lules sobreexpressant la proteïna.

Després de realitzar experiments d'inducció a diferents temps amb la isoforma GAGA₅₁₉ i de veure que a les 12 hores hi havia un clar increment de proteïna, vam decidir mirar la inducció a 12 hores de les mosques que sobreexpressaven GAGA₅₈₁ i les que sobreexpressaven GFP. Les larves procedents del creuament de GAGA₅₈₁ les vam fixar i vam fer immunolocalitzacions tenyint amb anticòs α -GAGA. A les imatges de les immunolocalitzacions es pot veure GAGA₅₈₁ sobreexpressada després de 12 hores d'inducció (veure figura D.36.A). Les larves procedents dels creuaments amb GFP, les vam fixar, vam extreure els discos i només vam tenyir amb DAPI ja que podíem veure la fluorescència directa de GFP en els discos. En les imatges es pot veure el GFP sobreexpressat a tot el disc d'ala després de les 12 hores d'inducció a 29°C (veure figura D.36.B).

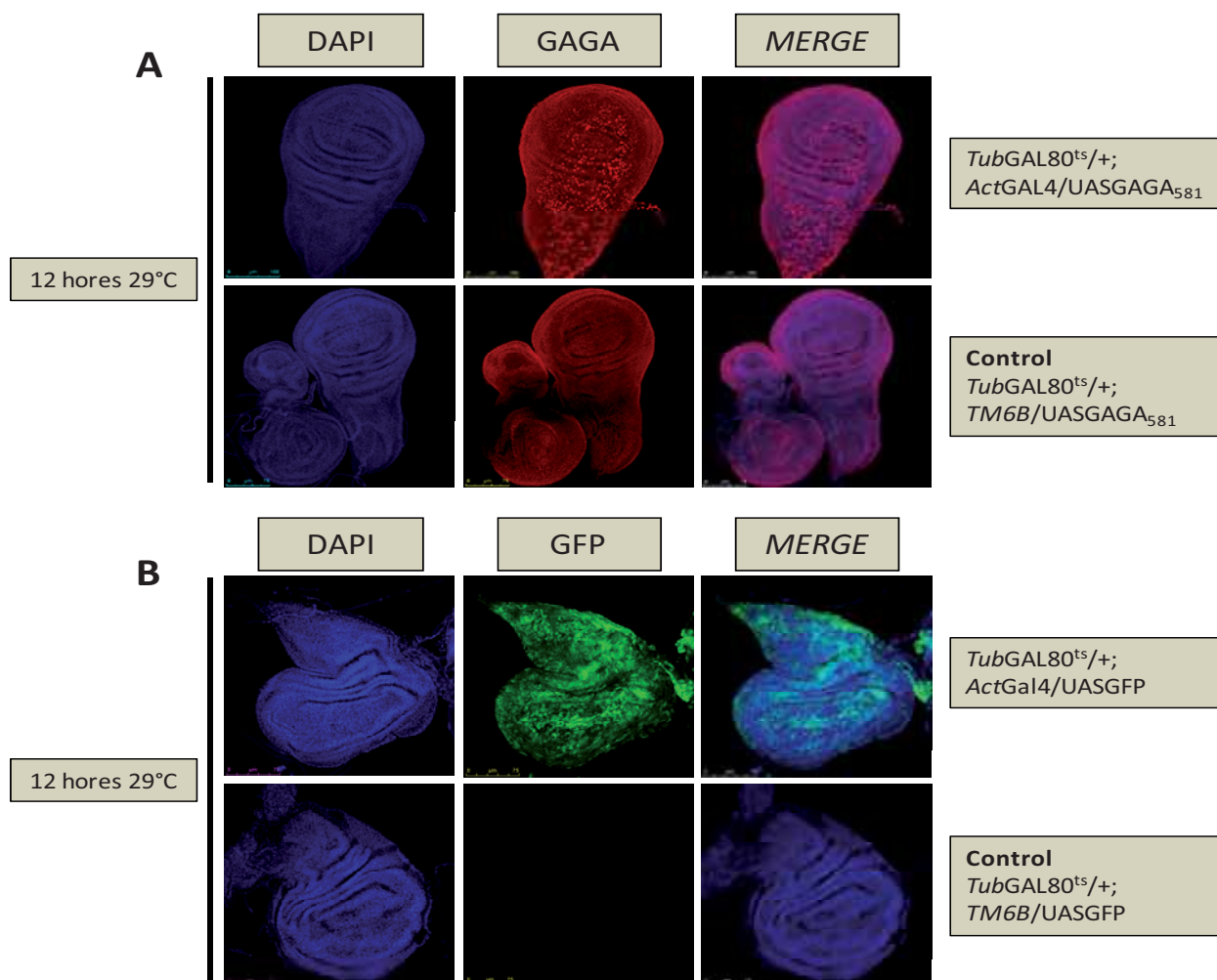


Figura D.36. Immunolocalitzacions que corroboren el funcionament del sistema GAL4-GAL80^{ts} per la sobreexpressió de GAGA₅₈₁ i GFP. Imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE d'immunolocalitzacions de discos imaginals d'ala de larves en estadi 3. Totes les larves han estat induïdes 12 hores a 29°C. **A)** Discos de larves que sobreexpressen GAGA₅₈₁ (*TubGAL80^{ts}/+; ActGAL4/UASGAGA₅₈₁*) i larves *tubby* control que no expressen el transgèn (*TubGAL80^{ts}/+; TM6B/UASGAGA₅₈₁*). D'esquerra a dreta de la imatge es pot observar DAPI (blau), tinció amb α GAGA (vermell), i *merge*. **B)** Discos de larves que sobreexpressen GFP (*TubGAL80^{ts}/+; ActGal4/UASGFP*) i larves *tubby* control que no expressen el GFP (*TubGAL80^{ts}/+; TM6B/UASGFP*). D'esquerra a dreta de la imatge es pot observar DAPI (blau), fluorescència directa de GFP (verd), i *merge*. Veiem que tant en el cas de sobreexpressió de GAGA₅₈₁, com en el cas de la sobreexpressió de GFP, a les 12 hores hi ha una sobreexpressió bona en tot el disc.

Resultats

Després de comprovar que entre 12 i 14 hores la inducció no canviava, que era força bona i que la sobreexpressió era clara, vam decidir fer l'experiment de *microarrays* a 13 hores d'inducció a 29°C per tal de coordinar els temps d'inducció i les disseccions immediates després del temps d'inducció. Fins al moment, havíem utilitzat com a control les larves *tubby* en les immunolocalitzacions per veure si hi havia canvis d'expressió. Per realitzar els *microarrays* vam decidir no utilitzar aquestes larves com a control negatiu perquè encara que no expressen el transgèn a 29°C, tenen un fons genètic diferent a les que no són *TM6B (tubby)*. Per tant, ens interessava més utilitzar larves no induïdes, com a control negatiu del *microarray*.

Abans de fer el *microarray*, calia fer controls per veure quins eren els nivells d'mRNA després de les 13h d'inducció a 29°C. Vam realitzar RT-PCRs (*Reverse transcription polymerase chain reaction*), per veure els nivells de sobreexpressió de l'mRNA de GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁. A la figura D.33, es poden veure les RT-PCRs dissenyades amb encebadors específics per detectar els nivells d'mRNA de GAGA₅₁₉ (A) i GAGA₅₈₁ (B) dels discos no induïts (-) i els induïts 13 hores a 29°C (+). També vam realitzar RT-PCRs sobre les mateixes mostres per detectar els transcrits endògens d'U6 com a control de càrrega. Vam realitzar cada reacció amb tres concentracions d'RNA total, (0,5 ng, 5 ng i 50 ng, les concentracions creixents estan representades per un triangle a la figura D.33). A més, per cada experiment vam realitzar una reacció sense el pas de retrotranscripció com a control de contaminació de genòmic amb 50 ng d'RNA total amb les mostres no induïdes (-) i induïdes (+). Tant la RT-PCR específica per GAGA₅₁₉ (veure figura D.37.A), com l'específica per GAGA₅₈₁ (veure figura D.37.B), mostren sobreexpressió dels respectius transcrits. La sobreexpressió, en ambdós casos, com a molt, és d'unes 3 vegades més d'mRNA respecte les mostres no induïdes. Aquest resultat amb una sobreexpressió no molt alta, és el que volíem aconseguir per a fer els *microarrays* evitant efectes indesitjats deguts a la sobreexpressió. Els RNAs que s'han fet servir per les RT-PCR de la figura D.37 corresponen a mostres d'RNAs utilitzades per fer el *microarray*.

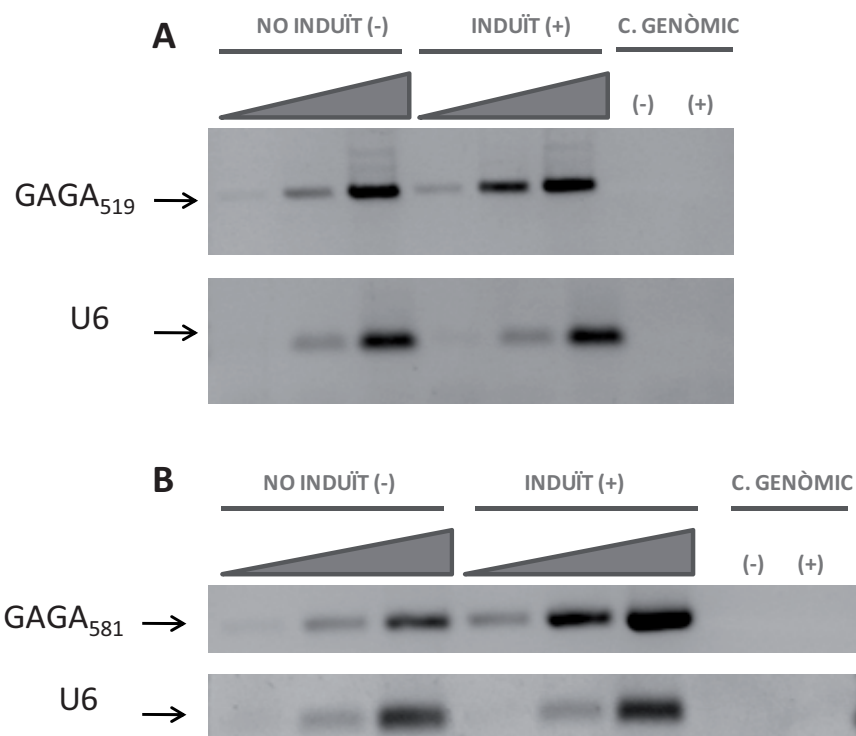


Figura D.37. RT-PCRs d'RNA total extret de disc imaginal d'ala de larva 3 de discos que sobreexpressen GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁ després de 13 hores d'inducció a 29°C. **A)** RT-PCR amb encebadors específics per detectar els transcrits de GAGA₅₁₉ i els transcrits d'U6, com a control de càrrega. Es pot observar l'mRNA de GAGA₅₁₉ sobreexpressat respecte les mostres no induïdes. No apareix senyal en el control de genòmic, indicatiu que les mostres estan processades correctament. **B)** RT-PCR amb encebadors específics per detectar els transcrits de GAGA₅₈₁ i els transcrits d'U6, com a control de càrrega. Es pot observar l'mRNA de GAGA₅₈₁ sobreexpressat respecte les mostres no induïdes. No apareix senyal en el control de genòmic, indicatiu que les mostres estan processades correctament.

Un cop havíem vist que els nivells de proteïna s'incrementaven i que en les RT-PCRs es podia detectar l'increment de l'mRNA de GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁, ja vam poder iniciar el protocol per fer els *microarrays* (veure apartat C.4.1.A).

D.3.1.B. Efectes fenotípics llarg termini deguts la sobreexpressió de GAGA

Tot i que nosaltres induïem només 13 hores a 29°C, de seguida fèiem l'extracció de l'RNA per processar als *microarrays* i no donàvem temps suficient a generar problemes derivats de la sobreexpressió, vam voler fer un seguiment dels creuaments al llarg del temps, per veure si en 13 hores es podien donar efectes indesitjats a llarg termini. Vam posar els diferents tipus de creuaments a 18°C, arribats a larva 3, els vam deixar 13 hores a 29°C i passat el temps d'inducció els vam incubar de nou a 18°C per tal d'anar controlant els tubs, mirar fenotips i poder calcular la viabilitat dels diferents creuaments. Mirant els tubs al llarg dels dies, no vam veure cap fenotip aparent en les larves dels creuaments. Però, més tardanament, vam veure que en els creuaments de GAGA₅₁₉ apareixia un gran nombre de pupes que expressaven el transgèn de GAGA₅₁₉ (no *tubby*) mortes.

Vam procedir doncs, a comptar tots els individus que arribaven a adults de cada creuament. Els gràfics de la figura D.34 representen el tant per cent de mosques adultes que no expressaven les construccions trangèniques (*tubby*) i mosques que sí les expressaven (no *tubby*) de cada tipus de creuament. De 231 mosques contades del creuament amb el transgèn de GFP, un 43% de mosques no expressaven el transgèn (*tubby*) i un 57% expressaven GFP (D.38.A). En el creuament de GAGA₅₈₁ vam contar 457 mosques adultes, d'aquestes, un 54% no expressaven el transgèn i un 46% expressaven GAGA₅₈₁ (veure D.38.B). En aquests dos casos, aproximadament la meitat de mosques expressaven el transgèn i l'altra meitat no l'expressaven, indicant que els transgens de GFP i de GAGA₅₈₁ no afectaven la viabilitat de les mosques. Un resultat molt diferent va ser l'obtingut amb GAGA₅₁₉ on, de 188 mosques adultes contades provinents del creuament amb el transgèn de GAGA₅₁₉, un 88% no expressaven el transgèn i només un 12% expressaven GAGA₅₁₉, indicant que les mosques que sobreexpressaven GAGA₅₁₉ tenien problemes de viabilitat (veure figura D.38.C). La gran majoria de mosques que sobreexpressen la isoforma GAGA₅₁₉, es moren en fase de pupa, presentant totes un anell necròtic envoltant l'abdomen, i no arriben a fase adulta (veure figura D.38.D). Només unes poques hores d'inducció de la sobreexpressió ja són suficients per generar efectes deleteris a llarg termini. En qualsevol cas, les condicions del nostre *microarray* de sobreexpressió no donaven temps a generar aquests fenotips deleteris en el temps que les mostres es processaven.

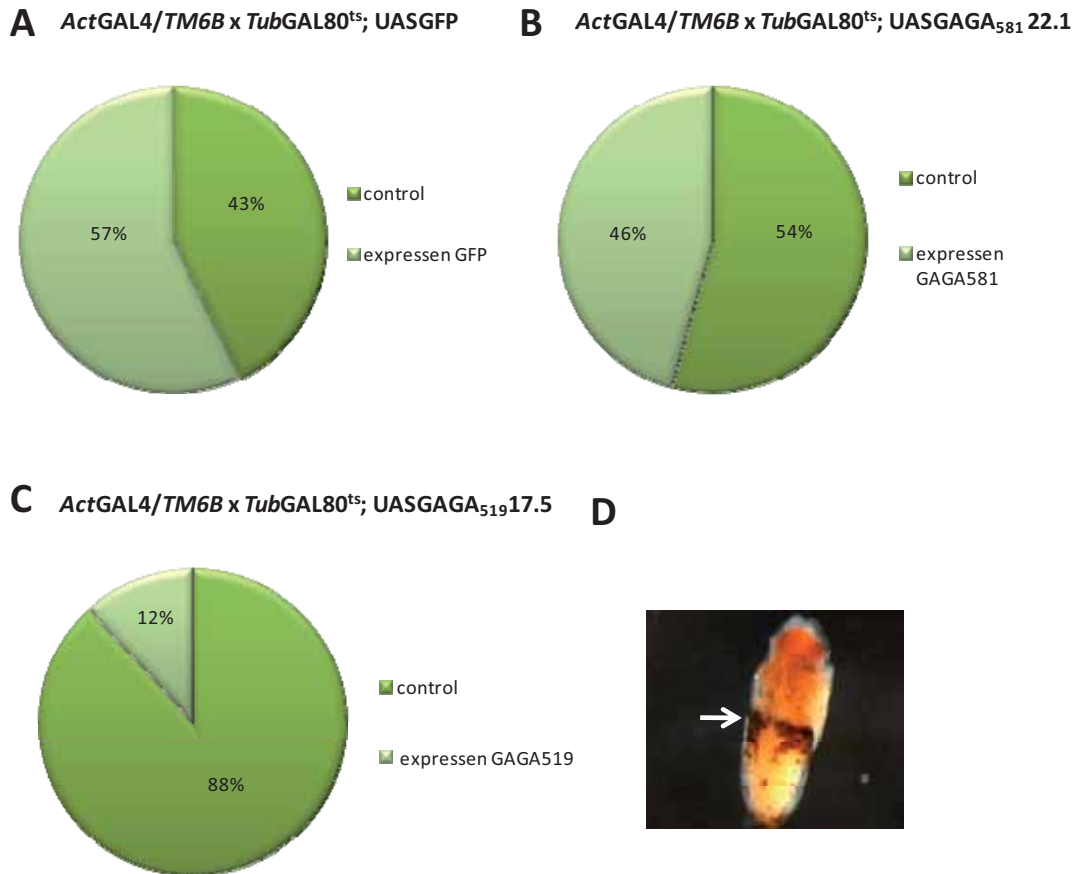


Figura D.38. Estudi de la viabilitat dels creuaments del *microarray* de sobreexpressió, després de 13 hores d'inducció a 29°C en estadi de larva 3, i posteriorment retornats a 18°C fins a estadi adult. Les figures de la **A** a la **C** són gràfics del tant per cent dels individus capaços d'arribar a adults després d'estar induïts durant 13 hores a 29°C. **D**) Pupa morta disseccionada que sobreexpressava GAGA₅₁₉. Cal destacar la presència d'un anell necròtic envoltant l'abdomen en totes les pupes mortes (fletxa).

D.3.2. Experiments preliminars al *microarray* de falta de funció

D.3.2.A. Condicions experimentals i controls pel correcte funcionament del *microarray*

Per realitzar el *microarray* de falta de funció, vam decidir utilitzar el sistema d'RNA d'interferència ja que no podíem utilitzar els mutants genètics de GAGA degut als grans fenotips que presenten i a la gran dificultat dels mutants per arribar a larva 3. Vam decidir utilitzar mosques transgèniques que expressen un *hairpin* d'RNAi de GAGA. Aquestes mosques contenen un transgèn que té dues seqüències de GAGA antiparal·leles i homòlogues, que alhora són homòlogues amb l'mRNA de GAGA. En aquest transgèn, les dues seqüències, gràcies a la seva orientació, formen una estructura de *hairpin* que s'expressa gràcies al sistema d'expressió UAS-GAL4. Aquest *hairpin* es processa per la maquinària d'RNA d'interferència en RNAs d'interferència petits siRNAs (*small interfering RNAs*) que són capaços d'unir-se a l'mRNA de GAGA perquè sigui degradat. L'RNAi dels transgens no és específic d'isoforma, sinó que afecta les dues isoformes de GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁ per igual. La seqüència de l'RNAi s'havia dissenyat a la part comuna de les dues isoformes. No era possible dissenyar un RNAi específic per cada isoforma, ja que la part que difereix entre les dues és la part del domini Q, altament repetitiva, i amb un elevat nombre de seqüències similars a d'altres proteïnes i que podria generar múltiples *off targets*. Per l'expressió del *hairpin* RNAi de GAGA vam utilitzar la línia de mosques transgèniques generada pel Dr. Jordi Bernués, RNAiGAGA 9.1 (cromosoma II), i com a control, una línia transgènica generada pel Dr. Joan Font, amb un *hairpin* d'RNAi per la seqüència de GFP, RNAiGFP 62.1 (cromosoma II).

Per realitzar el *microarray* de falta de funció no vam poder fer servir el sistema induïble UASGAL4-TubG80^{ts} que havíem usat el *microarray* de sobreexpressió perquè GAGA és una proteïna molt estable en el temps i vam comprovar que unes hores d'inducció no eren suficients per poder veure una disminució dels nivells de proteïna. En experiments d'RNAi a cèl·lules es necessiten 4 dies d'acció de l'RNAi per veure una baixada dels nivells de GAGA (D. Piñeyro, Tesi doctoral) i experiments de FRAP realitzats en el nostre grup indiquen que la proteïna GAGA té una vida mitja molt llarga (Dr. M.Badal, comunicació personal). Així doncs, vam canviar d'estratègia i vam decidir utilitzar un *driver* que ens permetés posar el creuament a 25°C des del principi perquè el *hairpin* pogués actuar a partir del moment on comença a funcionar el sistema UAS-GAL4 i l'RNAi pogués actuar durant diversos dies. No vam poder utilitzar el *driver* *Actina*-GAL4 perquè l'expressió de l'RNAiGAGA era massa forta, les larves es morien i no arribaven a larva 3 per poder fer l'experiment (cap individu arribava a adult). Vam

optar doncs per utilitzar el *driver* 69B-GAL4. 69B-GAL4 és un *driver* que s'expressa principalment en teixits ectodèrmics, a disc d'ala té una expressió general però no tant forta com amb el *driver* Actina-GAL4 i, per tant, era una bona opció per realitzar el *microarray* de falta de funció. Els creuaments utilitzats per realitzar l'experiment de falta de funció es mostren a la taula C.6 de Materials i mètodes.

Vam realitzar diferents experiments per comprovar que els nivells de GAGA es reduïen amb el sistema utilitzat. Vam realitzar assajos de *Western blot* de discos de larva en tercer estadi que expressaven el *hairpin* RNAiGAGA i discos control que expressaven el *hairpin* RNAiGFP per veure la reducció dels nivells de proteïna. A la figura D.39 es pot observar una clara reducció dels nivells de GAGA en la mostra dels discos que expressen el *hairpin* RNAiGAGA respecte la mostra dels discos que expressen el *hairpin* control de GFP.

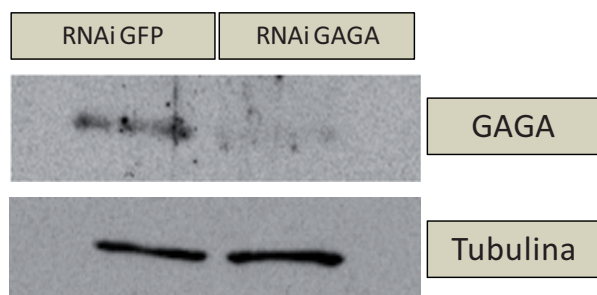


Figura D.39. *Western blot* per veure la depleció de GAGA. A partir d'extractes amb 15 discos imaginals d'ala de larva 3 de les construccions que expressen RNAiGAGA i RNAi de GFP, sota el control del *driver* 69B-GAL4. El western està revelat amb anticòs α -GAGA i amb anticòs α -tubulina, com a control intern. Es pot observar la reducció de la quantitat de GAGA en la mostra RNAiGAGA respecte la mostra RNAiGFP.

Per una altra banda, mitjançant RT-PCRs vam mirar quina era la reducció causada pel sistema RNAi a nivell d'RNA. Les RT-PCRs mostren una clara disminució dels nivells d'mRNA de GAGA en la mostra que expressa el *hairpin* RNAiGAGA respecte la mostra que expressa el *hairpin* control RNAiGFP (veure figura D.40). L'experiment de la figura D.40 va ser realitzat mostres dels RNAs utilitzats per fer el *microarray*.

Resultats

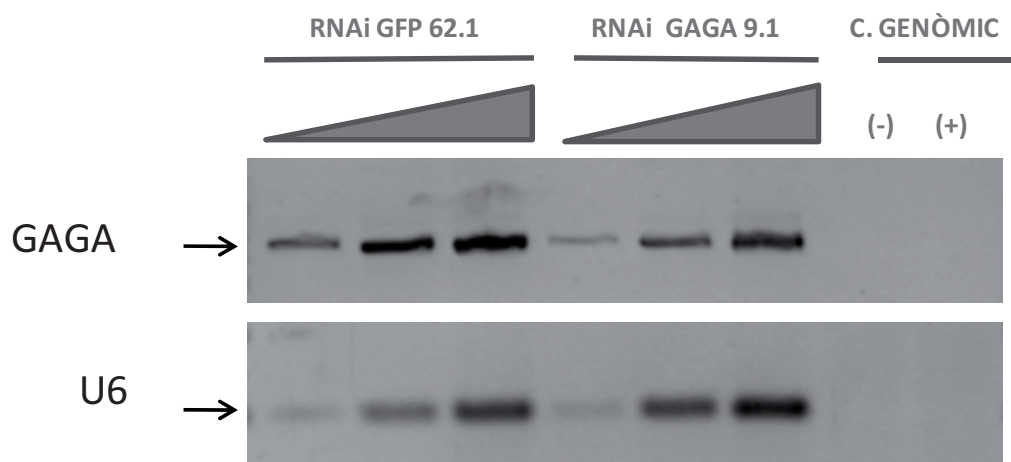


Figura D.40. RT-PCRs per veure la depleció de GAGA. A partir d'RNA total extret de 25 discos imaginals d'ala de larva en estadi 3 de larves que expressen el *hairpin* RNAiGAGA i larves que expressen el *hairpin* RNAiGFP. Les RT-PCRs van estar fetes amb encebadors per detectar els transcrits de GAGA, i els transcrits d'U6, com a control de càrrega. Es pot observar que l'mRNA de GAGA de la mostra RNAiGAGA disminueix respecte les mostres RNAi GFP. No apareix senyal en el control de genòmic indicatiu que les mostres estan processades correctament.

Una altra manera per veure si realment la depleció de GAGA era prou important i efectiva va ser mirar la presència de transformacions homeòtiques en adults. Els mutants hipomorfs Trl^{13C} , en homozigosi, presenten una transformació homeòtica del segment abdominal A6 en A5 degut a la manca de GAGA que genera la desregulació del gen Abdominal B, que passa a expressar-se en el segment A6. En mascles, es pot detectar aquesta transformació a nivell fenotípic per la presència de pèls en el segment abdominal A6. (els individus salvatges, no tenen pèls en aquest segment abdominal) (Farkas et al. 1994). En el nostre laboratori, la Dra. Sílvia Pérez, estudiant la línia RNAiGAGA 4.2, ja va observar que la reducció de GAGA per l'RNAi amb el *driver* 69B-GAL4 generava la presència de pèls en el segment A6 dels mascles. Aquestes observacions li van indicar que la disminució de GAGA amb l'RNAi era efectiva i que era capaç de desregular Abdominal B (*AbdB*). Nosaltres no vam fer servir la línia 4.2 pel *microarray* ja que amb posterioritat vam observar que les femelles presentaven alguns problemes d'infertilitat. Així que vam voler comprovar si en el creuament de 69B amb la línia RNAiGAGA 9.1 també veiem el mateix efecte fenotípic de la transformació homeòtica. Vam recollir mascles adults i vam mirar si hi havia presència de pèls en la regió abdominal A6. Vam veure que es podien observar pèls en aquesta regió, però en canvi, mai hi havia presència de pèls en els controls amb RNAi de GFP (veure figura D.41.A). Amb aquesta línia de mosques RNAiGAGA 9.1, podíem trobar a la F1, de 0 a 12 pèls per mascle i la mitjana de pèls per individu, en 200 individus mascles analitzats, era de 3,35 (veure figura D.41.B). Aquestes observacions indicaven que el *hairpin* RNAiGAGA de la línia 9.1 reduïa suficientment els nivells de GAGA endògena per veure efectes sobre *AbdB*.

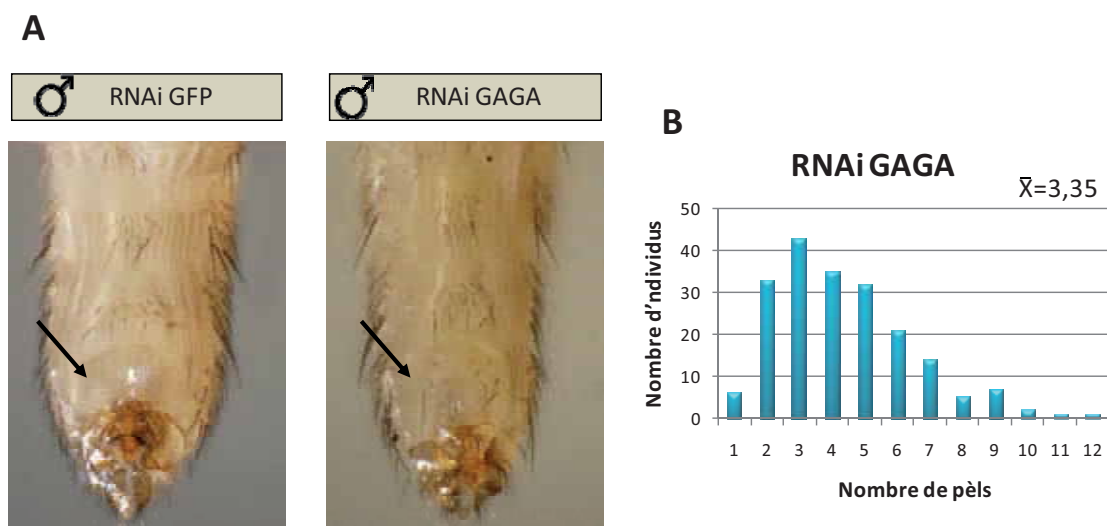


Figura D.41. Anàlisi de la transformació homeòtica del segment abdominal A6 en A5. Mosques fruit del creuament de les línies RNAiGAGA 9.1 i RNAiGFP 62.1 amb el *driver 69B-GAL4*. **A)** Fotos d'abdòmens d'un mascle que expressa el *hairpin* RNAiGAGA i d'un mascle control que expressa el *hairpin* RNAiGFP. A la foto de l'esquerra, els mascles control no presenten cap pèl al segment A6 (fletxa). A la foto de la dreta, el mascle que expressa el *hairpin* RNAiGAGA presenta diversos pèls en el segment abdominal A6, indicant que hi ha transformació homeòtica A6-A5. **B)** Estadística del nombre de pèls observats en 200 mascles. En el creuament de *69B* amb la línia 9.1 s'han trobat a la F1 de 0 a 12 pèls i una mitjana de 3,35 pèls per individu.

Havent comprovat que el sistema experimental dissenyat funcionava per reduir els nivells endògens de GAGA, vam procedir a fer els *microarrays* segons s'explica a l'apartat C.4.1.B de Materials i mètodes.

D.3.2.B. Efectes fenotípics a llarg termini deguts a reducció de GAGA

L'RNAi de GAGA genera en adults una sèrie de fenotips que cal tenir en compte. Un dels efectes fenotípics en adults és el que hem comentat de la presència de pèls en el segment A6 dels mascles degut a una davallada de GAGA. En adults tant a mascles com a femelles, també es poden observar fenotips a l'ala. En treballs anteriors amb la línia RNAiGAGA 4.2, s'havia vist que amb el *driver ptc-GAL4* es generaven fenotips a l'ala de les mosques adultes (Bernues et al. 2007). Nosaltres vam voler comprovar si amb la línia RNAiGAGA 9.1 amb el *driver ptc-GAL4* podíem observar els mateixos fenotips i després ens vam plantejar si s'observarien els mateixos fenotips amb el creuament amb el *driver 69B-GAL4* que volíem utilitzar per fer el *microarray*. La línia RNAiGAGA 9.1 amb el *driver ptc-GAL4*, igual que en la línia RNAiGAGA 4.2, produeix, en les ales dels adults, una reducció considerable de l'àrea compresa entre les venes L3-L4. Aquest és un fenomen d'elevada penetrància ja que es pot observar en gairebé tots els adults estudiats (veure figura D.42.A). Les fletxes en blau marquen la distància entre les venes L3-L4. Comparar

Resultats

la distància entre les venes dels individus RNAiGFP 62.1 amb els RNAiGAGA 9.1. També es pot observar, amb menor penetrància, la pèrdua total o parcial de la vena creuada anterior. A la figura D.39.A, les fletxes vermelles indiquen la posició de la vena creuada anterior. S'observa que en els controls RNAi de GFP la vena està present i en canvi, en els RNAi GAGA s'ha perdut .

Vam fer fotos a gran nombre d'ales, tant a mascles com a femelles dels controls RNAiGFP i de l'RNAiGAGA. Sobre les fotos, vam realitzar mesures de l'àrea d'expressió de *ptc*, l'àrea de la regió que queda entre les venes L3 i L4. Vam comparar la mitjana de les àrees de les femelles control RNAiGFP amb la de les femelles RNAiGAGA i vam veure que hi havia una reducció de la zona intervena del 35,86%. En mascles, la comparativa de les àrees dels macles control RNAiGFP amb les àrees dels mascles RNAiGAGA indica una reducció d'un 36,7% en la mida de l'ala, entre les venes L3 i L4 (veure figura D.42.C). Tant en mascles, com en femelles, vam aplicar el test estadístic *T-student* per veure si les diferències de mida eren significatives i vam obtenir un valor p inferior a 0,0001, indicatiu d'una elevada significació.

Vist els forts fenotips observats amb el *driver ptc-GAL4*, vam procedir a fer el mateix amb les mosques dels creuaments amb el *driver 69B*. Com que *69B-GAL4* és un *driver* que s'expressa en tota l'ala, no vàiem reduccions entre les venes com vàiem en el cas de *ptc* sinó una reducció a nivell global de tota l'ala. En aquest cas, les fotos de les ales indiquen, a nivell visual, una reducció moderada de la mida de tota l'ala (veure figura D.42.B. Comparar l'ala del mascle RNAiGFP amb el mascle RNAiGAGA i la femella RNAiGFP amb l'RNAiGAGA). A part de la reducció de mida, no es veu cap altre fenotip aparent: no es veu cap pèrdua de la vena creuada anterior, ni la presència de deltes o venes ectòpiques en les mosques estudiades. Sobre les fotos de les ales vam fer mesures de l'àrea i vam observar una reducció de la mida de l'ala dels individus RNAi GAGA respecte les RNAi de GFP, d'un 9,06% entre les femelles i d'un 9,96% entre els mascles. Tot i que el nivell de reducció és moderat, els tests estadístics indiquen que és un fenotip altament significatiu ($p < 0,0001$) (veure figura D.42.D).

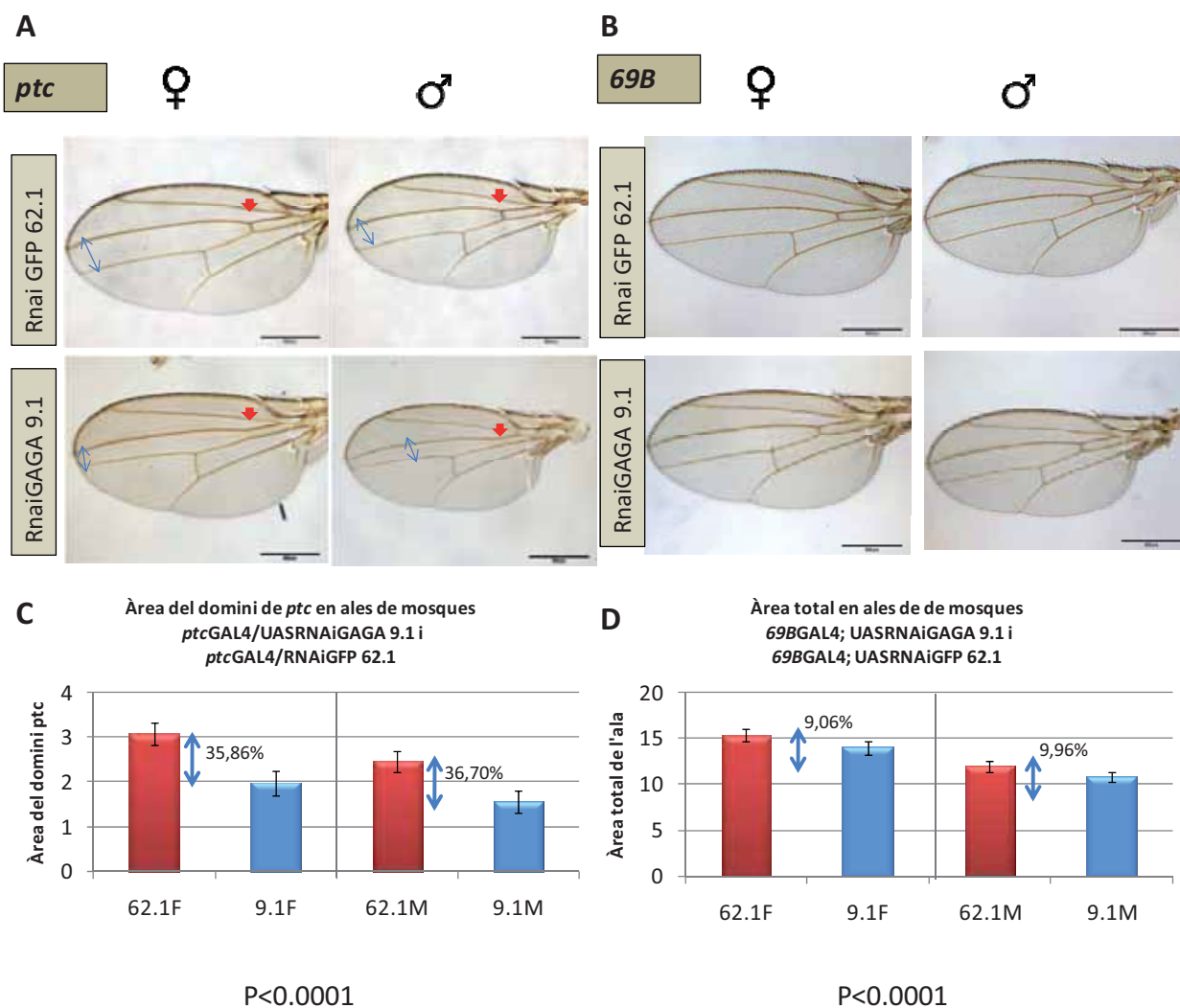


Figura D.42. Fenotips associats a la reducció de GAGA en les ales d'individus adults. **A)** Fotos d'ales de mascles i femelles que expressen RNAiGFP i RNAiGAGA sota el control *ptcGAL4*. Les fletxes blaves marquen la distància entre les venes L3 i L4. Aquesta àrea està reduïda en els individus RNAiGAGA (comparar mascles RNAiGFP amb mascles RNAiGAGA i femelles RNAiGFP amb les RNAiGAGA). Les fletxes vermelles indiquen la posició de la vena creuada anterior, present en les mosques control RNAiGFP i absent en les RNAiGAGA. **B)** Fotos d'ales de mascles i femelles que expressen RNAiGFP i RNAiGAGA sota el control *69BGAL4*. Comparant els mascles i femelles RNAiGFP amb els respectius RNAiGAGA es pot veure una moderada reducció de la mida total de les ales. No es veu cap zona concreta reduïda entre venes ni cap altre fenotip aparent. **C)** Gràfic on es representa la mitjana de l'àrea entre les venes L3 i L4 de les ales de les diferents mosques *ptcGAL4-UAS RNAiGAGA 9.1* i *ptcGAL4-UAS RNAiGFP 62.1* analitzades. La diferència de l'àrea intervé entre els individus RNAiGFP i RNAiGAGA, del 35,86% entre femelles i del 36,7% entre mascles. Aquestes diferències són altament significatives, amb un valor $p < 0,0001$. **D)** Gràfic on es representa la mitjana de l'àrea total de les ales de les diferents mosques analitzades *69BGAL4-UAS RNAiGAGA 9.1* i *69BGAL4-UAS RNAiGFP 62.1*. La diferència de mida total de l'ala, entre els individus RNAiGFP i RNAiGAGA, és del 9,06% entre femelles i del 9,96% entre mascles. Aquestes diferències són altament significatives amb un valor $p < 0,0001$.

D.3.3. Resultats dels *microarrays*

Un cop vam tenir tota la bateria d'RNAs dels experiments de sobreexpressió i de falta de funció, aquests RNAs eren de bona qualitat, i havien passat tots els controls explicats en els apartats D.3.2.A i D.3.2.B, vam poder procedir a fer els *microarrays*. Després d'aplicar tots els filtres necessaris i els tests estadístics adequats, tal i com s'explica en l'apartat C.4.2 de Materials i mètodes, vam poder estudiar i comparar els resultats dels diferents *microarrays* per extreure'n conclusions. L'anàlisi dels processos biològics sobrerepresentats al llistat de gens diferencialment expressats entre control i tractades (*Gene Ontology*) es va dur a terme utilitzant el *software* DAVID (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*), disponible *on line* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) tal i com s'explica en l'apartat C.4.3 de materials i mètodes.

D.3.3.A. Resultats del *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉

En el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ vam trobar 196 gens diferencialment expressats. El fet de trobar només 196 gens amb l'expressió alterada, dels 18952 transcrits representats en el chip d'*Affymetrix*, ens indicava que el disseny experimental era correcte. Nosaltres havíem fet induccions de 13 hores a 29°C, esperàvem tenir una sobreexpressió no molt elevada i suposàvem que aquesta sobreexpressió, a molt curt termini, només afectaria a uns pocs gens.

D'aquests 196 gens diferencialment expressats, 189 es troben activats i només 7 es troben reprimits (veure figura D.43). La proporció de gens activats respecte els reprimits està molt esbiaixada corroborant que GAGA és una proteïna activadora de l'expressió gènica.

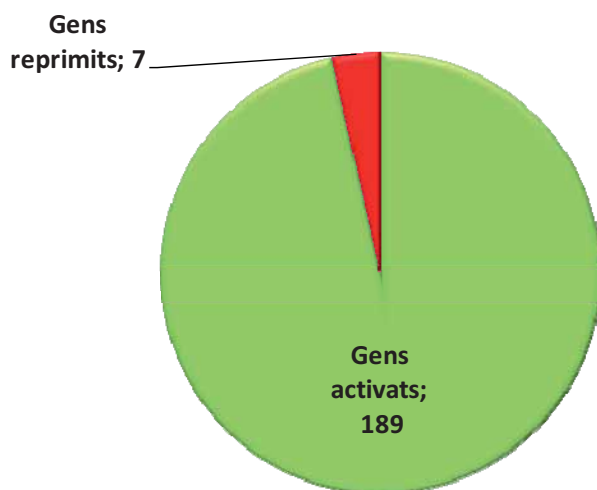


Figura D.43. Gràfic circular que representa els gens diferencialment expressats en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉. Hi ha un total de 196 gens que s'alteren, dels quals 189 s'activen i 7 es reprimeixen.

Cal destacar que en el chip d'*Affymetrix*, per alguns gens hi ha més d'un transcrit representat, existint diverses sondes o *probes* per un mateix gen. Entre els 189 gens activats, n'hi ha que donen positiu en més d'una sonda com: *Ank2* (positiu en 2 sondes), *GluClalpha* (positiu en 2 sondes), *Hsc70-1* (positiu en 3 sondes) i *SK* (positiu en 3 sondes). Com que el llistat sencer de totes les diferents sondes que han donat positiu per la sobreexpressió de GAGA₅₁₉ és molt llarg, hem adjuntat les taules amb els resultats corresponents a l'apartat Annex H.1.

Gens activats en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉

Entre els gens activats cal destacar que es troba *Trl*, com era de suposar, degut a la sobreexpressió del transgèn amb el cDNA de GAGA₅₁₉. Només es pot detectar la sobreexpressió de *Trl* en una de les quatre sondes de *Trl* del chip d'*Affymetrix* ja que la resta de sondes no cauen dins la regió codificant del gen i nosaltres només vam sobreexpressar la seqüència codificant. Aquesta sonda on s'observa la sobreexpressió, (1629754_s_at) de *Trl*, es troba en la posició 183 de les taules adjuntades a l'Annex. Observant la taula es pot veure que seu *fold change* és de 2,7488859. Aquest valor indica quants cops difereixen les mostres amb GAGA₅₁₉ sobreexpressada, respecte les de GFP. Aquests nivells de sobreexpressió de *Trl* detectats en el *microarray* són similars als nivells que havíem observat a nivell d'mRNA en els controls per RT-PCR semiquantitativa de la figura D.37. A la taula D.2 només hem inclòs els primers 25 gens amb la probabilitat més alta d'estar diferencialment expressats dels 196 del llistat total de gens activats.

Resultats

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₁₉ Induïda	GAGA ₅₁₉ Basal	GFP Induït	GFP Basal	Fold Change	ProbDE
1	1633066_at	CG13215	CG13215 gene product from transcript CG13215-RA	9,15235502	2,77779067	2,99658656	2,86953581	75,9781983	0,99999846
2	1623558_at	Cpr49Ae	Cuticular protein 49Ae	6,39994097	2,40576506	2,2766668	2,33622585	16,6071771	0,99998175
3	1624809_s_at	NA	NA	7,27083115	3,44075947	2,93443507	2,81792377	13,1187685	0,99997838
4	1628702_at	Muc14A	Mucin 14A	6,22147772	1,79844505	2,39567188	2,16094627	18,2308138	0,99997265
5	1637975_at	Dhc36C	Dynein heavy chain at 36C	6,82161318	3,79094687	4,0783097	3,80117058	6,74363846	0,9999481
6	1635166_at	NA	NA	6,60634601	2,87867172	3,07226103	2,84454176	11,3133558	0,99994484
7	1639222_at	CG32191	CG32191 gene product from transcript CG32191-RA	6,35315876	3,50566659	3,4665502	3,48608688	7,29561116	0,99993107
8	1639380_a_at	Hsc70-1	Heat shock protein cognate 1	7,70239488	4,00049773	4,0770251	4,00320835	12,3640578	0,99993074
9	1629085_at	CG14227	CG14227 gene product from transcript CG14227-RB	7,36648197	3,56715805	3,68609892	3,66195629	13,6912408	0,99991131
10	1634526_a_at	qua	quail	8,00896206	3,95164405	3,50770281	3,7534828	19,7406555	0,99990392
11	1626797_a_at	Ntl	Neurotransmitter transporter-like	7,79010341	2,93317627	2,6473254	2,87598277	33,9557621	0,99990049
12	1630273_at	CG15145	CG15145 gene product from transcript CG15145-RA	5,68197224	2,19630926	2,26688292	2,33838053	11,7709641	0,99988364
13	1631085_a_at	Myo28B1	CG6976 gene product from transcript CG6976-RB	4,83175497	1,96915716	1,93056184	2,27674888	9,24571476	0,99984808
14	1630897_at	GluClalpha	CG7535 gene product from transcript CG7535-RC	5,20424436	1,98368137	2,10033945	2,16845043	9,77213623	0,99980175
15	1624985_at	CG7886	CG7886 gene product from transcript CG7886-RA	7,21814667	3,56837839	3,76506076	3,58324196	11,0651376	0,99978939
16	1639862_at	Eaat2	Excitatory amino acid transporter 2	5,2481191	2,47538819	2,28548212	2,35799459	7,18627114	0,99974141
17	1626124_at	CG9717	CG9717 gene product from transcript CG9717-RA	5,20195497	2,80914999	2,57222606	2,7110878	5,78239324	0,99970279
18	1638004_at	Cbp53E	Calbindin 53E	6,30954371	2,19084082	2,28756486	1,94799175	13,7287635	0,99969785
19	1633674_at	CG31150	CG31150 gene product from transcript CG31150-RA	9,27616876	5,79784609	5,48333273	5,67141855	12,696936	0,99967924
20	1639523_s_at	NA	NA	5,17218399	2,64920654	2,48059747	2,53561153	5,97107837	0,99965618
21	1638057_at	CG18765	CG18765 gene product from transcript CG18765-RB	4,09659814	1,99168259	2,1251441	2,13358293	4,32696177	0,999651
22	1632923_at	CG14661	CG14661 gene product from transcript CG14661-RA	8,04796337	3,32412804	3,25109093	3,24372119	26,2904254	0,99961762
23	1624772_at	CG14186	CG14186 gene product from transcript CG14186-RA	4,8403506	2,25388384	1,94097156	2,02597685	6,37078898	0,9995487
24	1633244_at	CG31551	CG31551 gene product from transcript CG31551-RA	4,78163775	2,89148399	2,59751128	2,47407316	3,40278415	0,99947819
25	1624054_at	Adgf-A	Adenosine deaminase-related growth factor A	9,03484204	5,20291834	5,32595658	5,62097992	17,4716873	0,99939453

Taula D.2. Llistat amb els 25 gens estadísticament més significatius que s'activen en l'experiment de sobreexpressió de GAGA₅₁₉, respecte el de sobreexpressió de GFP. La columna "identificador d'*Affymetrix*" indica el nombre de sonda de cada gen i les columnes, "símbol gen" i "nom del gen" indiquen a quin gen pertany cada sonda. Les columnes "GAGA₅₁₉ induïda" i "GAGA₅₁₉ basal" mostren els valors, en escala logarítmica en base 2, de la mitjana dels resultats obtinguts de dues mostres independents que sobreexpressen GAGA₅₁₉ i que no sobreexpressen, respectivament. Les columnes "GFP induït" i "GFP no induït" mostren la mitjana dels resultats obtinguts de dues mostres independents que sobreexpressen GFP i que no sobreexpressen, en escala logarítmica de base 2. La columna "Fold change" és el valor en escala líneal que indica quants cops difereixen les mostres de GAGA₅₁₉, respecte les de GFP. Tots els gens que en aquestes condicions tenien un *fold change* superior a 2, són els que vam considerar activats. En la columna "probDE" s'indica la probabilitat del gen d'estar diferencialment expressat, essent 1, la màxima probabilitat que el gen estigui diferencialment expressat i no s'hagi donat per atzar. Els gens del llistat estan ordenats de forma decreixent, tenint en compte la seva significació estadística "probDE".

Gràcies al programa DAVID, vam poder analitzar les funcions dels gens diferencialment activats en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉. Com que el nombre de gens activats era de 189, vam poder utilitzar la funció del programa DAVID *Functional annotation clustering* (veure apartat C.4.3 de Materials i mètodes) que agrupa els gens en clústers de funcions. Aplicant aquesta funció, dels 189 gens totals, el programa va reconèixer 186 gens amb informació funcional, *Gene Ontology* (GO) coneguda, i va generar 16 clústers o agrupacions de funcions similars.

Nosaltres hem representat els diferents clústers obtinguts en un gràfic de barres horitzontals (veure figura D.44). Cada barra indica una agrupació funcional o clúster identificat amb el nom de la funció biològica més genèrica dins de cada agrupació. Al cantó de cada funció representativa de cada clúster, hi ha entre parèntesi, el nombre de gens que s'hi troben representats. La llargada de la barra indica el paràmetre *enrichment score*, una estimació de quant enriquida està la llista de gens en una agrupació de funcions biològiques concretes, respecte del que es podria donar per atzar (veure apartat C.4.3 Materials i mètodes). Els clústers amb major *enrichment score* són els que contenen grups d'anotacions funcionals amb un menor valor "p" i per tant, més significatius. Els 3 clústers més significatius són els de localització, transmissió d'impulsos nerviosos i transmissió de senyals mediada per GTPases.

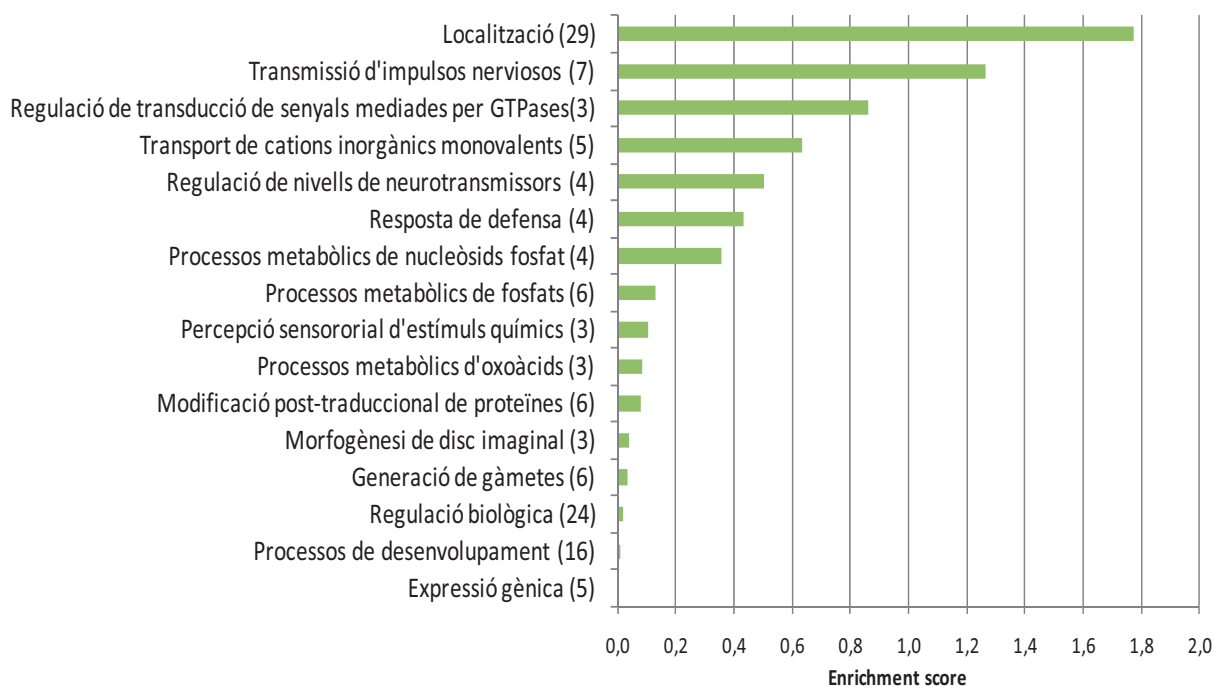


Figura D.44. Representació de les agrupacions (clústers) de diferents funcions biològiques dels gens diferencialment expressats, activats en l'experiment de sobreexpressió de GAGA₅₁₉. S'ha utilitzat l'eina *Functional annotation cluster* del programa DAVID. Dels 189 gens totals diferencialment activats del llistat, 186 tenen implicació coneguda dins algun procés biològic. Els diferents grups porten el nom de la funció biològica més genèrica dins de cada clúster i entre parèntesi està indicat el nombre de gens implicats. Els diferents clústers estan ordenats verticalment de dalt a baix, segons la seva significació estadística donada per l'*enrichment score*.

Resultats

Gens reprimits en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉

Els gens que es reprimeixen en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ només són 7, llistats a la taula D.3.

Nº	Identificador <i>Affymetrix</i>	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₁₉ Induïda	GAGA ₅₁₉ Basal	GFP Induït	GFP Basal	<i>Fold Change</i>	ProbDE
1	1628177_at	jhamt	juvenile hormone acid methyltransferase	3,55961817	2,35584749	5,5570294	2,45895394	-3,7174279	0,97180829
2	1638017_at	Cpr78E	Cuticular protein 78E	7,04598246	10,2225795	10,4630634	10,769901	-7,3094332	0,85655143
3	1632685_at	CG32603	CG32603 gene product from transcript CG32603-RA	5,15332934	6,39317853	5,10015217	4,8686065	-2,7728986	0,85190332
4	1640614_at	cac	cacophony	6,60330377	8,27260284	7,62257551	7,60315329	-3,2237085	0,83916835
5	1631408_at	SoxN	SoxNeuro	3,66699011	4,6758222	4,60219715	4,34779669	-2,4003296	0,83660388
6	1640854_at	CG31248	CG31248 gene product from transcript CG31248-RA	5,17231651	7,82395188	6,90291095	7,42392051	-4,3790739	0,81319644
7	1631521_at	CG33469	CG33469 gene product from transcript CG33469-RA	5,15492555	6,75425262	6,30007878	6,52862681	-2,5861018	0,8126125

Taula D.3. Llistat de gens reprimits significativament en l'experiment de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ respecte el de sobreexpressió de GFP. La columna "identificador d'*Affymetrix*" indica el nombre de sonda de cada gen. La tercera i quarta columna mostren el "símbol del gen" i "nom del gen". Les columnes "GAGA₅₁₉ induïda" i "GAGA₅₁₉ basal" mostren els valors, en escala logarítmica en base 2 de la mitjana dels resultats obtinguts de dues mostres independents que sobreexpressen GAGA₅₁₉ i que no sobreexpressen, respectivament. Les columnes "GFP induït" i "GFP no induït" mostren la mitjana dels resultats obtinguts de dues mostres independents que sobreexpressen GFP i que no sobreexpressen, en escala logarítmica de base 2. La columna "*Fold change*" és el valor en escala lineal que indica quants cops difereixen les mostres GAGA₅₁₉, respecte les GFP. Tots els gens que en aquestes condicions tenien un *fold change* inferior a -2, són els que vam considerar reprimits. En la columna "probDE" s'indica la probabilitat del gen d'estar diferencialment expressat, essent 1, la màxima probabilitat que el gen estigui diferencialment expressat i no s'hagi donat per atzar. Els gens del llistat estan ordenats de forma decreixent tenint en compte la seva significació estadística "probDE".

Com que el nombre de gens obtinguts per repressió és tan baix, no vam poder fer servir la funció de *Functional annotation clustering* del programa DAVID. La *Functional annotation chart*, en aquest cas, ens permet trobar una agrupació entre 3 dels 7 gens reprimits (veure Taula D.4).

Categoria Gene Ontology (GO)	Nombre de gens	p valor	-log(pvalor)	Gens
GO:0065007~regulació biològica	3	0,0945281	1,0244388	1631408_at SoxN 1640614_at cac 1628177_at jhamt

Taula D.4. Informació de l'única categoria funcional obtinguda dels gens reprimits en l'experiment de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ utilitzant l'eina *Functional annotation chart* del programa DAVID. Dels 7 gens diferencialment reprimits del llistat, 3 tenen implicació coneguda dins algun procés biològic i es poden agrupar en la mateixa categoria funcional. A la taula, es mostra la categoria funcional, el nombre de gens que inclou, la significació mitjançant el "p valor" que indica la significació de la categoria funcional. La quarta columna indica el valor $-\log(\text{valor } p)$ i la columna "gens" indica quins gens són els que es troben dins la categoria de regulació biològica.

A la taula D.5 es troba informació dels gens que s'han pogut agrupar dins la categoria funcional de regulació biològica i la d'un gens reprimits de la llista del qual es té informació de funció molecular.

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	probDE	Fold Change	Descripció del gen
1	1628177_at	jhamt	0,97180829	-3,71742795	Funció molecular: segons evidències experimentals; activitat O-metiltransferasa d'àcid farnesoic, activitat metiltransferasa d'àcid d'hormona juvenil Procés biològic: segons evidències experimentals; implicat en el procés biosintètic d'hormona juvenil.
2	1638017_at	Cpr78E	0,85655143	-7,3094332	Funció molecular: basat en similitud de seqüència, constituent de la cutícula de quitina Procés biològic: desconegut
3	1640614_at	cac	0,83916835	-3,2237085	Funció molecular: activitat canal de calci dependent de voltatge Procés biològic: segons evidències experimentals; involucrat en processos com transmissió sinàptica, regulació processos biològics, secrecions cel·lulars, interacció comportament, transport ions i neurotransmissors, procés reproductiu, comportament locomotor, excitosi
4	1631408_at	SoxN	0,83660388	-2,4003296	Funció molecular: segons evidències experimentals; unió a cromatina i unió a proteïnes Procés biològic: segons evidències experimentals; involucrat en desenvolupament de sistema nerviós central, regulació via senyalització receptor Wnt

Taula D.5. Informació dels gens reprimits en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ que tenen funció coneguda. La columna "identificador d'*Affymetrix*" correspon al número de sonda d'*Affymetrix* de cada gen. Les columnes "símbol del gen" i "nom del gen" indiquen la nomenclatura dels gens. La columna "prob DE" indica la probabilitat de que el gen en qüestió estigui realment expressat diferencialment entre les mostres de GAGA₅₁₉ i GFP. La columna "*Fold change*" indica el nivell de canvi entre les mostres. I la columna "descripció del gen" indica la descripció dels gens a la base de dades *Flybase*.

Resultats

D.3.3.B. Resultats del *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁

Amb les dades estadísticament analitzades vam veure que en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁ només hi havia 18 gens diferencialment expressats. Esperàvem, igual que en el cas de sobreexpressió de GAGA₅₁₉, que el nombre de gens diferencialment expressat fos reduït perquè la sobreexpressió que havíem induït era reduïda i molt curta. Tot i que els nivells de sobreexpressió obtinguts de GAGA₅₁₉ i de GAGA₅₈₁ després de la inducció no eren gaire diferents, és sorprenent un número de canvis tant limitat, amb la sobreexpressió de GAGA₅₈₁.

Gens activats en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁

A la figura D.45. es pot veure un gràfic circular que mostra que dels 18 gens diferencialment expressats només 5 gens es troben activats i 13 es troben reprimits al sobreexpressar la isoforma GAGA₅₈₁.

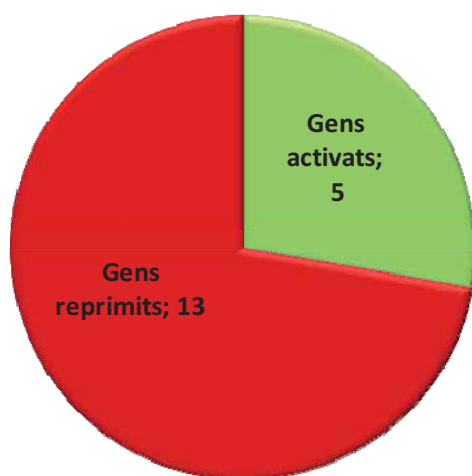


Figura D.45. Gràfic circular que representa els gens diferencialment expressats en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁. Els gens diferencialment expressats de forma significativa són molt pocs. Només 18 gens presenten una diferència en la seva expressió i dins aquests gens, només 5 s'activen i 13 es reprimeixen.

La taula D.6 mostra la informació dels 5 gens activats deguts a la sobreexpressió de GAGA₅₈₁.

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₈₁ Induït	GAGA ₅₈₁ Basal	GFP Induït	GFP Basal	Fold Change	ProbDE
1	1641475_at	Syt4	Synaptotagmin 4	4,872917834	3,439705107	7,49743648	8,89078574	7,09381638	0,98869656
2	1624862_at	NA	NA	7,08477269	6,039930575	7,23310395	7,41407543	2,33887312	0,93250547
3	1624911_at	Cyp28d2	CG6081 gene product from transcript CG6081-RA	7,250619443	6,122451327	6,62693345	6,57851764	2,11367315	0,88340932
4	1630285_at	RhoGAP100F	CG1976 gene product from transcript CG1976-RB	6,96144669	5,361746414	5,6237366	5,29996411	2,42154495	0,87505776
5	1637420_a_at	GABA-B-R2	metabotropic GABA-B receptor subtype 2	8,096768761	6,515530387	7,13354095	7,34986957	3,4763347	0,87063758

Taula D.6. Llistat de gens activats significativament en el microarray de sobreexpressió de GAGA₅₈₁ respecte el de sobreexpressió de GFP. La columna "identificador d'*Affymetrix*" indica el nombre de sonda de cada gen i les columnes, "símbol gen" i "nom del gen" ens indiquen a quin gen pertany cada sonda. Les columnes "GAGA₅₈₁ induïda" i "GAGA₅₈₁ basal" mostren els valors, en escala logarítmica en base 2, de la mitjana dels resultats obtinguts de dues mostres independents que sobreexpressen GAGA₅₈₁ i que no sobreexpressen, respectivament. Les columnes "GFP induït" i "GFP no induït" mostren la mitjana dels resultats obtinguts de dues mostres independents que sobreexpressen GFP i que no sobreexpressen, en escala logarítmica en base 2. La columna "*Fold change*" és el valor en escala lineal que indica quants cops difereixen les mostres de GAGA₅₈₁, respecte les de GFP. Els gens amb un *fold change* superior a 2, són els que vam considerar activats. En la columna "probDE" s'indica la probabilitat del gen d'estar diferencialment expressat. Els gens del llistat estan ordenats de forma decreixent tenint en compte la seva significació estadística.

Com que dels 5 gens que es troben activats en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁ només 4 d'ells eren reconeguts pel programa DAVID com a gens amb informació biològica funcional, no ens podíem plantejar aplicar la funció de *Functional annotation clustering*. Vam provar d'aplicar la funció de *Functional annotation chart* i tampoc es generava cap agrupament funcional. Vam decidir doncs buscar informació detallada dels cinc gens per saber més informació de cada un de forma individual (veure taula D.7).

Resultats

Nº	Identificador <i>Affymetrix</i>	Símbol gen	probDE	<i>Fold Change</i>	Descripció del gen
1	1641475_at	Syt4	0,98869656	7,09381638	Funció molecular: unió de fosfolípids dependent de calci Procés biològic: evidències experimentals que demostren que està relacionat amb la regulació de la secreció de neurotransmissors i amb regulació de la plasticitat sinàptica
2	1624911_at	Cyp28d2	0,88340932	2,11367315	Funció molecular: basada amb similitud de seqüència, activitat transportadora d'electrons Procés biològic: desconegut
3	1630285_at	RhoGAP100F	0,87505776	2,42154495	Funció molecular: basada amb similitud de seqüència, activador GTPases Procés biològic: es suggereix que està involucrat en transducció de senyals
4	1637420_a_at	GABA-B-R2	0,87063758	3,4763347	Funció molecular: basada amb similitud de seqüència, activitat receptora GABA-B Procés biològic: evidències experimentals demostren implicació en comportament olfatori i regulació negativa de la fusió de vesícules sinàptiques a la membrana pre-sinàptica.

Taula D.7. Informació dels gens activats en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁ que tenen funció coneguda. La columna "identificador d'*Affymetrix*" correspon al número de sonda d'*Affymetrix* de cada gen. Les columnes "símbol del gen" i "nom del gen" indiquen la nomenclatura dels gens. La columna "prob DE" indica la probabilitat de que el gen en qüestió estigui realment expressat diferencialment entre les mostres de GAGA₅₈₁ i GFP. La columna "*Fold change*" indica el nivell de canvi entre les mostres. I la columna "descripció del gen" indica la descripció dels gens a la base de dades *Flybase*.

Gens reprimits en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA581

Els gens que es troben reprimits en el *microarray* de GAGA₅₈₁ són només 13. La taula D.8. inclou la informació obtinguda per aquests 13 gens.

Nº	Identificador <i>Affymetrix</i>	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₈₁ Induït	GAGA ₅₈₁ Basal	GFP Induït	GFP Basal	Fold Change	ProbDE
1	1640845_at	CG10581	CG10581 gene product from transcript CG10581-RA	7,96885542	10,9604824	10,4856041	11,0178409	-5,4998421	0,99768123
2	1636456_at	CG13053	CG13053 gene product from transcript CG13053-RA	8,41206553	10,1392732	10,246242	10,1406382	-3,5623062	0,986435
3	1631521_at	CG33469	CG33469 gene product from transcript CG33469-RA	4,71890496	6,64475698	6,30007878	6,52862681	-3,2429437	0,97355333
4	1634471_at	CG33214	CG33214 gene product from transcript CG33214-RA	7,11135965	8,54670557	8,24781267	8,51065649	-2,2540228	0,95426459
5	1638558_a_at	Snap25	Synapse protein 25	4,95592994	6,91900028	6,81258528	6,12879029	-6,2630498	0,95059382
6	1624657_at	NA	NA	5,85383467	7,43245335	7,55961957	7,45722299	-3,2065352	0,94832363
7	1625885_at	betaTub97EF	beta-Tubulin at 97EF	7,96162019	10,1940659	9,66778867	10,2740502	-3,0869544	0,94491811
8	1640854_at	CG31248	CG31248 gene product from transcript CG31248-RA	4,59599515	7,37794731	6,90291095	7,42392051	-4,7930454	0,93408902
9	1634788_at	CG4872	CG4872 gene product from transcript CG4872-RA	7,67804686	9,95621259	9,48793717	9,87040634	-3,7210159	0,93148859
10	1634343_at	Rpt6R	CG2241 gene product from transcript CG2241-RA	4,07140903	5,93919746	6,45418641	4,90648901	-10,669982	0,92602709
11	1627160_at	CG34247	CG34247 gene product from transcript CG34247-RA	4,75193252	7,55227326	6,95760653	6,81751556	-7,6764097	0,92574781
12	1633572_at	NA	NA	5,63244884	7,22508712	6,8682119	7,20485363	-2,3883207	0,92260671
13	1640217_at	CG30154	CG30154 gene product from transcript CG30154-RA	3,88239156	5,6211595	5,51839598	5,68422421	-2,9751032	0,84637005

Taula D.8. Llistat de gens reprimits significativament en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁ respecte el de sobreexpressió de GFP. La columna "identificador d'*Affymetrix*" indica el nombre de sonda de cada gen. També es mostra el "símbol gen" i "nom del gen". Les columnes "GAGA₅₈₁ induïda" i "GAGA₅₈₁ basal" mostren els valors, en escala logarítmica en base 2, de la mitjana dels resultats obtinguts de rèpliques independents que sobreexpressen GAGA₅₈₁ i que no sobreexpressen, respectivament. Les columnes "GFP induït" i "GFP no induït" mostren la mitjana dels resultats obtinguts de dues mostres independents que sobreexpressen GFP i que no sobreexpressen, en escala logarítmica de base 2. La columna "Fold change" és el valor en escala lineal que indica quants cops difereixen les mostres GAGA₅₈₁, respecte les GFP. Tots els gens que en aquestes condicions tenien un *fold change* inferior a -2, són els que vam considerar reprimits. En la columna "probDE" la probabilitat del gen d'estar diferencialment expressat, essent 1, la màxima probabilitat que el gen estigui diferencialment expressat i no s'hagi donat per atzar. Els gens del llistat estan ordenats de forma decreixent tenint en compte la seva significació estadística.

El programa DAVID, de les 13 entrades del llistat anterior, no pot fer cap agrupació funcional ni amb la funció *Functional annotation clustering*, ni amb la *Functional annotation chart*. La informació dels diferents gens amb funció biològica coneguda es troba resumida a la taula D.9.

Resultats

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	probDE	Fold Change	Descripció del gen
1	1640845_at	CG10581	0,99768123	-5,4998421	Funció molecular: basada en similitud de seqüència; activitat NAD deshidrogenasa Procés biològic: basat en similitud de seqüència; transportador d'electrons i NADH a ubiquinona
2	1634471_at	CG33214	0,95426459	-2,2540228	Funció molecular: basada en similitud de seqüència; activitat nucleòtid trifosfat, activitat transferasa i unió ATP. Procés biològic: desconegut
3	1638558_a_at	Snap25	0,95059382	-6,26304975	Funció molecular: basada en similitud de seqüència; activitat receptora SNAP Procés biològic: evidències experimentals indiquen que està involucrat en transport de vesícules sinàptiques i en regulació de plasticitat neuronal a curt termini
4	1625885_at	betaTub97EF	0,94491811	-3,0869544	Funció molecular: basada en similitud de seqüència; component estructural del citoesquelet Procés biològic: es suggereix que està involucrat en polimerització de proteïnes i moviment de microtúbuls
5	1634788_at	CG4872	0,93148859	-3,7210159	Funció molecular: unió; activitat catalítica Procés biològic: es suggereix una funció en processos metabòlics
6	1634343_at	Rpt6R	0,92602709	-10,669982	Funció molecular: basada en similitud de seqüència; activitat ATPasa Procés biològic: basat en similitud de seqüència; proteòlisi

Taula D.9. Informació dels gens reprimits en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁ que tenen funció coneguda. La columna "identificador d'*Affymetrix*" correspon al número de sonda d'*Affymetrix* de cada gen. Les columnes "símbol del gen" i "nom del gen" indiquen la nomenclatura dels gens. La columna "prob DE" indica la probabilitat de que el gen en qüestió estigui realment expressat diferencialment entre les mostres de GAGA₅₁₉ i GFP. La columna "*Fold change*" indica el nivell de canvi entre les mostres. I la columna "descripció del gen" indica la descripció dels gens a la base de dades *Flybase*.

D.3.3.C. Resultats del *microarray* de falta de funció

En el *microarray* d'RNAi vam trobar 54 gens diferencialment expressats dels 18952 gens representats en el *microarray GeneChip Drosophila 2.0*. Dels 54 gens diferencialment expressats, vam trobar que 25 gens estaven activats, un d'ells amb dues sondes que han donat (Caps) i 29 estaven reprimits. (veure figura D.46).

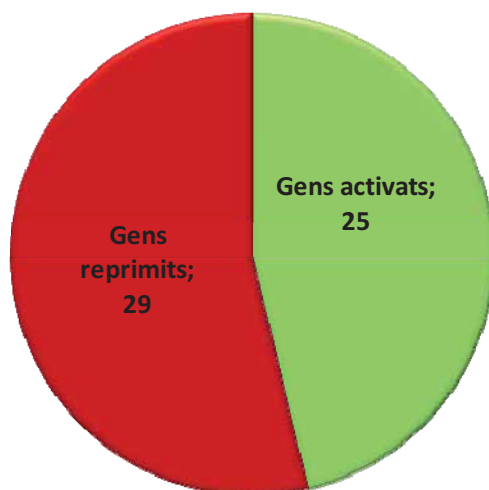


Figura D.46. Representació esquemàtica de la proporció de gens activats i reprimits significativament, en el *microarray* de falta de funció. Hi ha un total de 54 gens que s'alteren, dels quals 25 s'activen i 29 es reprimeixen.

Gens activats en el *microarray* falta de funció

A la taula D.10 es pot observar el llistat de gens activats en els *microarrays* RNAiGAGA, respecte els *microarrays* RNAiGFP. Entre els gens activats, la majoria corresponen a gens no coneguts, (CG) dels quals no hi ha cap mena d'informació, però de la resta, sí que se'n coneixen les funcions moleculars i les funcions biològiques. Els valors d'expressió dels diferents gens es troben a les columnes RNAiGAGA i RNAiGFP i estan expressats en escala logarítmica en base 2. Aquests valors són la mitjana entre els valors d'expressió obtinguts de dos experiments de *microarray* independents. Els valors de la columna *Fold change* indiquen la variació de l'expressió entre els nivells d'expressió de les mostres RNAiGFP i les de RNAiGAGA. En aquest cas, valors negatius de *fold change* indiquen que els nivells d'expressió són més elevats en la mostra RNAiGAGA i per tant, són gens sobreexpressats respecte RNAiGFP. Les variacions d'expressió (*fold change*) iguals o inferiors a 2, es van considerar diferencialment expressades per activació. En la columna *Prob DE*, està indicada la probabilitat de cada gen d'estar activat.

Resultats

Nº	Identificador <i>Affymetrix</i>	Símbol gen	Nom del gen	RNAiGFP	RNAiGAGA	<i>Fold Change</i>	ProbDE
1	1629125_at	gp210	CG7897 gene product from transcript CG7897-RA	3,691714555	8,788706662	-34,2253196	0,99973088
2	1641475_at	SytIV	Synaptotagmin IV	3,841647041	9,905095367	-66,8774682	0,99700714
3	1628238_at	Tektin-C	Tektin C	5,485508767	10,44793884	-31,1774294	0,99696915
4	1631678_at	NA	NA	3,641657103	6,219857543	-5,97194318	0,99534358
5	1631142_a_at	Caps	Calcium activated protein for secretion	5,645708036	9,282842453	-12,4418957	0,99481823
6	1627884_at	CG5281	CG5281 gene product from transcript CG5281-RA	6,800984029	8,653153291	-3,61042647	0,99190471
7	1623559_s_at	NA	NA	5,50696885	7,26773543	-3,38878141	0,98546323
8	1628231_at	Ac76E	Adenylyl cyclase 76E	6,479324611	8,227236663	-3,35872121	0,98434634
9	1640167_s_at	CG34104	CG34104 gene product from transcript CG34104-RB	10,24826679	11,53552791	-2,44064273	0,9828932
10	1628675_at	Caps	Calcium activated protein for secretion	5,594931828	8,856050139	-9,58725836	0,98283463
11	1636631_at	CG1139	CG1139 gene product from transcript CG1139-RA	6,763453774	9,332107197	-5,93255439	0,9804782
12	1623486_at	CG7900	CG7900 gene product from transcript CG7900-RB	5,145061467	7,556190223	-5,31890311	0,979911
13	1627297_at	CG15270	CG15270 gene product from transcript CG15270-RA	3,183165929	5,786462441	-6,07673556	0,97763257
14	1634343_at	CG2241	CG2241 gene product from transcript CG2241-RA	5,693847537	7,224163831	-2,88849159	0,9707936
15	1631521_at	CG33469	CG33469 gene product from transcript CG33469-RA	6,686478709	7,711212787	-2,03458433	0,962715
16	1633329_at	yellow-h	CG1629 gene product from transcript CG1629-RA	6,249737867	7,450619578	-2,29880121	0,96269279
17	1636268_at	CG10570	CG10570 gene product from transcript CG10570-RA	9,322985163	10,75217679	-2,69295781	0,95678478
18	1625428_at	CG13707	CG13707 gene product from transcript CG13707-RA	3,996920741	5,186299044	-2,28054447	0,95671369
19	1640363_a_at	CG6330	CG6330 gene product from transcript CG6330-RB	7,856409868	9,995363408	-4,40442455	0,95557418
20	1633152_at	mod(mdg4)	modifier of mdg4	4,661785256	6,544052239	-3,68653891	0,93700375
21	1640961_at	CG32313	CG32313 gene product from transcript CG32313-RA	4,921829109	6,04936108	-2,18484657	0,93157681
22	1638885_at	NA	NA	5,037401213	6,135428262	-2,14061753	0,93030027
23	1641142_at	CG5217	CG5217 gene product from transcript CG5217-RA	5,036391663	7,942137254	-7,49404993	0,92713626
24	1630927_x_at	Pxd	Peroxidase	4,630369492	6,545657119	-3,77189006	0,92372468
25	1625778_at	CG4562	CG4562 gene product from transcript CG4562-RB	5,665266396	6,685743222	-2,02858932	0,91427868
26	1626772_at	Fili	Fish-lips	4,839995218	6,001243974	-2,2365093	0,89814626

Taula D.10. Gens activats en l'experiment de *microarray* de falta de funció. La columna "identificador d'*Affymetrix*" correspon al número de sonda d'*Affymetrix* de cada gen. Les columnes "símbol del gen" i "nom del gen" indiquen la nomenclatura dels gens. Les columnes "RNAiGFP" i "RNAiGAGA" són el valor mitjà entre dues rèpiques del nivell d'expressió de cada gen expressat en valors d'escala logarítmica en base 2. La columna "*Fold change*" indica el nivell de canvi entre les mostres "RNAiGFP" i "RNAiGAGA". Es calcula fent la diferència dels valors expressats en escala logarítmica RNAiGFP amb els de RNAiGAGA i s'expressa la diferència en escala lineal (valors negatius de *Fold change* indiquen que els nivells d'expressió són més elevats en la mostra RNAiGAGA i per tant, són gens sobreexpressats respecte RNAiGFP). La columna "prob DE" indica la probabilitat de que el gen en qüestió estigui realment expressat diferencialment entre les mostres "RNAiGFP" i "RNAiGAGA" on 1 és el 100% de probabilitat que els gens estiguin diferencialment expressats entre les dues mostres. Tots els gens estan ordenats de forma decreixent tenint en compte la seva significació estadística.

Vam utilitzar l'eina *Functional annotation clustering* del programa DAVID per representar grups de gens segons processos biològics amb els gens del llistat dels que es disposa informació. Vam obtenir 4 agrupacions funcionals (clústers), on es podien aglutinar els gens que s'activaven en el *microarray* de falta de funció, segons les seves funcions biològiques (veure figura D.47). L'agrupació més significativa correspon a 6 gens relacionats amb la funció de localització, 5 d'ells, també relacionats amb transport per l'exocitosi i transport vesicular. La segona categoria inclou 5 gens relacionats amb processos multicel·lulars, entre els que hi ha 3 gens relacionats amb processos neurològics. La tercera agrupació és la de regulació biològica i la quarta està relacionada amb processos cel·lulars, la majoria centrats en metabolisme.

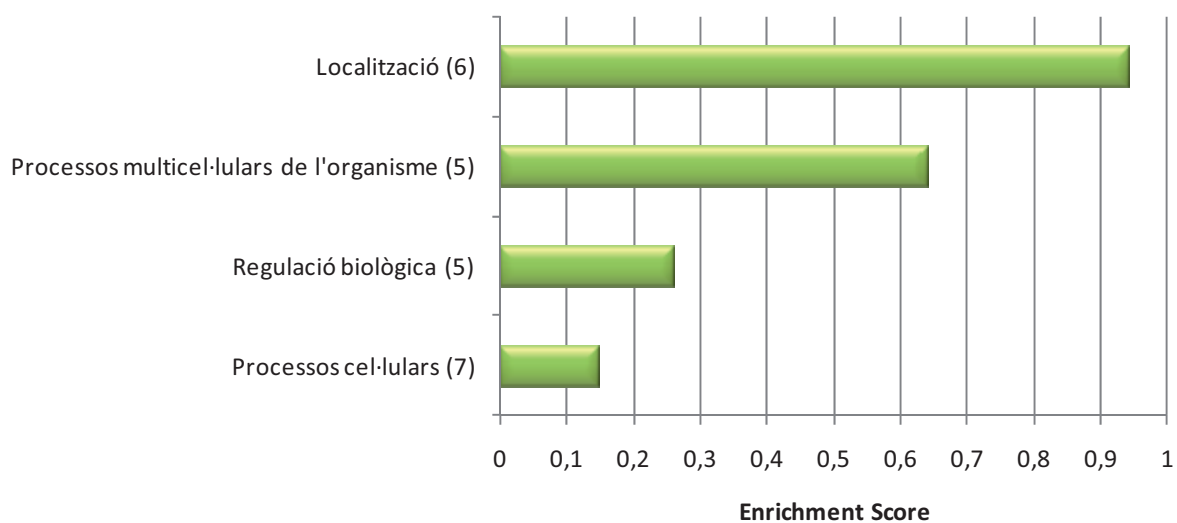


Figura.D.47. Agrupació dels gens activats a l'experiment d'RNAi segons la seva funció biològica. Gràfic obtingut amb l'eina *functional annotation clustering* del programa DAVID. Els diferents grups estan ordenats segons la seva significació estadística donada pel paràmetre *enrichment score*. El valor *enrichment score* dona una idea estimada de com està enriquida la llista de gens en una funció biològica concreta, respecte del que es podria donar per l'atzar. Entre parèntesi, al costat de la funció biològica més representativa de cada agrupació, està indicat el nombre de gens dins de cada categoria.

La informació detallada dels gens obtinguts es mostra a la taula D.11. D'aquesta manera, amb els resultats obtinguts amb el programa DAVID on les categories funcionals biològiques estan agrupades juntament amb la informació individual de cada gen, podíem tenir una idea més concreta dels processos biològics que s'activen quan reduïm GAGA amb RNAi.

Resultats

Nº	Identificador <i>Affymetrix</i>	Símbol gen	probDE	<i>Fold Change</i>	Descripció del gen
1	1629125_at	gp210	0,99973088	-34,2253196	Funció molecular: desconeguda Procés biològic: evidències experimentals demostren que està involucrada amb l'aprenentatge olfatori i l'aprenentatge o memòria
2	1641475_at	SytIV	0,99700714	-66,8774682	Funció molecular: unió de fosfolípids dependent de calci Procés biològic: evidències experimentals que demostren que està relacionada amb la regulació de la secreció de neurotransmissors i amb regulació de la plasticitat sinàptica
3	1628238_at	Tektin-C	0,99696915	-31,1774294	Funció molecular: basada amb similitud de seqüència, unió microtúbuls Procés biològic: basat amb similitud de seqüència, involucrada amb els processos basats amb microtúbuls
4	1631142_a_at; 1628675_at	Caps	0,99481823; 0,9828346	-12,4418957; -9,58725836	Funció molecular: desconeguda Procés biològic: involucrada amb transmissió sinàptica glutamaèrgica i exocitosi de vesícules sinàptiques. Contribueix amb el paper instructiu de les cèl·lules pont de les tràquees embrionàries.
5	1628231_at	Ac76E	0,98434634	-3,35872121	Funció molecular: basada amb similitud de seqüència, activitat adenilat ciclasa. Procés biològic: es suggereix que està involucrada amb el procés biosintètic de nucleòtids.
6	1640167_s_at	CG34104	0,9828932	-2,44064273	Funció molecular: basada amb similitud de seqüència, activitat GTPasa. Procés biològic: es suggereix que està involucrada amb la transducció de senyals duta a terme per GTPasa.
7	1636631_at	CG1139	0,9804782	-5,93255439	Funció molecular: basada amb similitud de seqüència, activitat transportadora d'aminoàcids transmembrana Procés biològic: evidències experimentals relacionades amb creixement.
8	1640363_a_at	CG6330	0,95557418	-4,40442455	Funció molecular: basada amb similitud de seqüència, activitat uridina fosforilasa Procés biològic: es suggereix que està involucrada en processos catabòlics de nucleòtids i metabolisme de nucleòsids
9	1633152_at	mod(mdg4)	0,93700375	-3,68653891	Funció molecular: unió a proteïnes, unió a cromatina Procés biològic: hi ha evidències experimentals que demostren que està relacionat amb regulació de l'apoptosi, segregació cromosòmica en meiosi masculina, oogènesi, migració de les cèl·lules germinals, regulació de l'ensamblatge i desensamblatge de cromatina.
10	1630927_x_at	Pxd	0,92372468	-3,77189006	Funció molecular: Basada amb similitud de seqüència, activitat peroxidasa Procés biològic: hi ha evidències experimentals que està relacionada amb fagocitosi.
11	1625778_at	CG4562	0,91427868	-2,02858932	Funció molecular: basada amb similitud de seqüència, activitat ATPasa acoblada al moviment transmembrana de substàncies. Activitat transportadora. Pertany a la família de transportadors ABC Procés biològic: transport transmembrana

Taula D.11. Informació dels gens activats en el *microarray* de falta de funció que tenen funció coneguda. La columna "identificador d'*Affymetrix*" correspon al número de sonda d'*Affymetrix* de cada gen. Les columnes "símbol del gen" i "nom del gen" indiquen la nomenclatura dels gens. La columna "prob DE" indica la probabilitat de que el gen en qüestió estigui realment expressat diferencialment entre les mostres dels RNAiGAGA i RNAiGFP. La columna "*Fold change*" indica el nivell de canvi entre les mostres. I la columna "descripció del gen" indica la descripció dels gens a la base de dades *Flybase*.

Gens reprimits en el *microarray* falta de funció

A la taula D.12 es pot observar el llistat de gens reprimits en els *microarray* RNAiGAGA, respecte els *microarray* RNAiGFP. Entre els gens reprimits hi ha molts gens no coneguts, (CG) dels quals no hi ha cap mena d'informació. Els valors d'expressió dels diferents gens, es troben a les columnes RNAiGAGA i RNAiGFP i estan expressats en escala logarítmica en base 2. Aquests valors són la mitjana dels valors d'expressió de dos experiments de *microarray* independents. En aquest cas, els valors d'expressió els valors de *fold change* calculats fent la diferència entre els valors RNAiGFP i RNAiGAGA són valors positius, indicant que els nivells expressió són més alts en les mostres RNAiGFP i per tant, els gens de RNAiGAGA es troben reprimits respecte els de RNAiGFP. Les variacions d'expressió (*fold change*) iguals o superiors a 2, es van considerar diferencialment reprimides. En la columna *Prob DE*, està indicat el valor p, que indica la probabilitat de cada gen d'estar reprimat.

Resultats

Nº	Identificador <i>Affymetrix</i>	Símbol gen	Nom del gen	RNAiGFP	RNAiGAGA	<i>Fold change</i>	ProbDE
1	1636566_at	CG32368	CG32368 gene product from transcript CG32368-RA	8,240972231	5,179400619	8,34881599	0,99353772
2	1633793_at	unc-13-4A	CG32381 gene product from transcript CG32381-RB	6,801575234	3,489387021	9,93271566	0,99321978
3	1628263_s_at	CG15236	CG15236 gene product from transcript CG15236-RB	8,834690658	3,864207551	31,3519464	0,99056096
4	1640300_at	CG33144	CG33144 gene product from transcript CG33144-RA	10,76013141	8,862523094	3,72595002	0,98967846
5	1626088_at	CG2177	CG2177 gene product from transcript CG2177-RA	10,63348123	5,138007848	45,1130643	0,98344763
6	1628989_at	NA	NA	7,643187696	5,385345446	4,78275619	0,98276195
7	1640217_at	CG30154	CG30154 gene product from transcript CG30154-RA	5,463270425	3,634206842	3,55306377	0,98142963
8	1623971_at	CG9150	CG9150 gene product from transcript CG9150-RA	6,24464787	4,908308402	2,52509815	0,98087795
9	1638053_at	Cyp4p1	Cytochrome P450-4p1	8,913521461	3,848996423	33,4636994	0,97929832
10	1641242_at	Ugt86Di	CG6658 gene product from transcript CG6658-RA	8,986637837	7,803218935	2,27114356	0,97815631
11	1638082_at	CG6678	CG6678 gene product from transcript CG6678-RA	7,885412998	6,324874756	2,94963868	0,97723755
12	1627510_at	CG12842	CG12842 gene product from transcript CG12842-RA	8,978799028	7,30777103	3,18441419	0,97619657
13	1636015_s_at	CG32850	CG32850 gene product from transcript CG32850-RA	11,6710567	7,194513724	22,2624887	0,97248976
14	1640065_at	GstE7	Glutathione S transferase E7	6,600386814	4,996301198	3,04003012	0,9712156
15	1624855_at	CG31988	CG31988 gene product from transcript CG31988-RA	4,129850375	2,809573058	2,49714106	0,96997439
16	1629410_at	CG32572	CG32572 gene product from transcript CG32572-RA	7,394768319	4,704178489	6,4557729	0,96357036
17	1637854_at	CG18335	CG18335 gene product from transcript CG18335-RA	5,889789494	4,819999924	2,09912717	0,96321004
18	1635312_at	NA	NA	7,869875216	4,945362327	7,59217312	0,96089649
19	1623931_s_at	CanA-14F	Calcineurin A at 14F	6,692913033	5,074282609	3,07083378	0,96033689
20	1630696_at	CG12972	CG12972 gene product from transcript CG12972-RA	6,872982179	5,806360119	2,09452348	0,95126026
21	1635651_at	CG30195	CG30195 gene product from transcript CG30195-RA	7,799258776	6,295145196	2,83650337	0,94671082
22	1623327_at	NA	NA	7,977538112	5,774071613	4,60584704	0,93192014
23	1630802_at	Cyp6d4	CG12800 gene product from transcript CG12800-RA	7,696554164	6,363347404	2,51962103	0,92622673
24	1628972_at	CG30488	CG30488 gene product from transcript CG30488-RA	6,974992862	5,832718056	2,20728789	0,92489335
25	1637216_at	CG7328	CG7328 gene product from transcript CG7328-RA	5,863582727	4,519117935	2,53935974	0,92034648
26	1625744_at	GstE6	Glutathione S transferase E6	7,77507203	6,460114168	2,48795064	0,91708865
27	1637211_at	CG13045	CG13045 gene product from transcript CG13045-RA	6,277321002	4,501657614	3,42395416	0,90443095
28	1624820_at	CG8800	CG8800 gene product from transcript CG8800-RA	7,20440331	5,742131528	2,75541912	0,90392229
29	1626079_a_at	CG2201	CG2201 gene product from transcript CG2201-RA	8,973353009	7,751317221	2,33275661	0,89931558

Taula D.12. Llistat de gens reprimits significativament en l'experiment de *microarray* de falta de funció. La columna "identificador d'*Affymetrix*" correspon al número de sonda d'*Affymetrix* de cada gen. Les columnes "símbol del gen" i "nom del gen" indiquen la nomenclatura dels gens diferencialment expressats. Les columnes "RNAiGFP" i "RNAiGAGA" són el valor mitjà del nivell d'expressió en escala logarítmica en base 2. La columna "*Fold change*" indica el nivell de canvi entre les mostres "RNAiGFP" i "RNAiGAGA". Cal tenir present que valors positius de *Fold change* indiquen que els nivells d'expressió són menors en la mostra RNAiGAGA i per tant, són gens reprimits respecte la mostra control RNAiGFP. La columna "prob DE" indica la probabilitat de que el gen en qüestió estigui realment expressat diferencialment entre les mostres "RNAiGFP" i "RNAiGAGA". Tots els gens estan ordenats de forma decreixent tenint en compte la seva significació estadística.

A l'introduir les dades en el programa DAVID, com que eren molt pocs els gens reprimits, i dels 29 gens, la majoria eren gens que no s'han estudiat i no hi ha cap mena d'informació anotada, va ser impossible classificar els gens en agrupacions funcionals no redundants (clústers) mitjançant l'eina *Functional annotation clustering*. Vam utilitzar aleshores l'eina *Functional annotation chart*. Utilitzant aquesta eina vam poder veure que, dels 29 gens, 4 es podien classificar dins la categoria biològica oxidació-reducció, enriquida respecte el llistat total de gens (veure taula D.13). Posteriorment també vam buscar informació detallada d'aquests gens així com de la resta de gens reprimits amb funció coneguda (veure taula D.14).

Categoria Gene Ontology (GO)	Nombre de gens	p valor	-log(pvalor)	Gens
GO:0055114~oxidació reducció	4	0,010592651	1,97499535	1623931_s_at Calcineurin A at 14F, 1638053_at Cytochrome P450-4p1 1623971_at Dmel_CG9150 1630802_at Probable cytochrome P450 6d4

Taula D.13. Taula del resultat obtingut el programa DAVID amb la funció *Functional annotation chart* pels gens reprimits en el *microarray* de falta de funció. La columna "Categoria Gene Ontology (GO)" indica les categories de funció biològica del projecte *Gene Ontology*, enriquides en la llista de gens reprimits. La columna "nombre de gens" indica els enriquits dins el grup de funció biològica similar. La columna "valor p" indica un valor p modificat del p valor *Fisher exact* i anomenat "*Modified fisher exact p-value-EASE score*". Aquest valor p modificat va de 0 a 1, on zero representa un enriquiment perfecte. Com més petit és el valor, més enriquit està el nombre de gens de la categoria. Es considera un fort enriquiment de les categories anotades si el valor $p \leq 0,05$. En la columna "Gens" s'indica el número identificatiu de les sondes d'*Affymetrix*, i el nom corresponent als diferents gens.

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	probDE	Fold Change	Descripció del gen
1	1623971_at	CG9150	0,98087795	2,52509815	Funció molecular: predita per similitud de seqüència, pertany a la família deshidrogenases/reductases, SDR. Activitat oxidoreductasa, actua sobre els grups donadors Procés biològic: CH-OH. oxidació-reducció. Regulació positiva de l'import de NFAT al nucli
2	1638053_at	Cyp4p1	0,97929832	33,4636994	Funció molecular: predita per similitud de seqüència, té activitat transportadora d'electrons. Procés biològic: oxidació-reducció.
3	1640065_at	GstE7	0,9712156	3,04003012	Funció molecular: predita per similitud de seqüència. Activitat Glutatió transferasa. Procés biològic: desconegut
3	1623931_s_at	CanA-14F	0,96033689	3,07083378	Funció molecular: predita per similitud de seqüència. Fosfatasa serina/treonina. Procés biològic: oxidació-reducció. Regulació positiva de l'import de NFAT al nucli
4	1630802_at	Cyp6d4	0,92622673	2,51962103	Funció molecular: predita per similitud de seqüència, té activitat transportadora d'electrons. Procés biològic: oxidació-reducció
5	1625744_at	GstE6	0,91708865	2,48795064	Funció molecular: predita per similitud de seqüència. Activitat Glutatió transferasa. Procés biològic: desconegut

Taula D.14. Informació dels reprimits en el *microarray* de falta de funció que tenen funció coneguda. La columna "identificador d'*Affymetrix*" correspon al número de sonda d'*Affymetrix* de cada gen. En les columnes "símbol del gen" i "nom del gen" es mostra la nomenclatura dels gens diferencialment expressats. Les columnes "RNAiGFP" i "RNAiGAGA" són el valor mitjà del nivell d'expressió en escala logarítmica en base 2 de les dades d'expressió del *microarray*. La columna "prob DE" indica la probabilitat que el gen en qüestió estigui realment expressat diferencialment entre les mostres "RNAiGFP" i "RNAiGAGA". La columna "Fold change" indica el nivell de canvi entre les mostres "RNAiGFP" i "RNAiGAGA". La columna "descripció del gen" indica la descripció del gen a la base de dades *Flybase*.

D.3.4. Comprovació d'alguns gens dels *microarrays*

Com que la bateria d'experiments de *microarrays* realitzada és complexa, és necessari fer diferents comparacions entre ells, veure si hi ha gens en comú entre ells, mirar si els gens diferencialment expressats tenen llocs d'unió per GAGA en els seus promotors. També cal mirar els punts en comú amb els *microarrays* de sobreexpressió i falta de funció, realitzats a cèl·lules S2 (D.Piñeyro, Tesi doctoral), per veure si en dos sistemes diferents els resultats són similars. Totes aquestes observacions i comparacions s'han realitzat de manera exhaustiva i estan incloses més endavant, en l'apartat de discussió.

Les primeres comprovacions dels *microarrays* les vam realitzar sobre el gen *sickle* (*skl*). *skl*, és un dels gens diferencialment activats en el nostre *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉. Aquest gen també havia sortit positiu en el *microarray* de cèl·lules S2 i positiu en el CHIP on Chip de GAGA realitzat a embrions (Schuettengruber et al. 2009).

En el nostre grup ja s'han fet diverses comprovacions per corroborar que *skl* està sota el control de GAGA quan es van fer les comprovacions del *microarray* de sobreexpressió a cèl·lules S2. Es van realitzar immunolocalitzacions a la línia cel·lular S2 establiment transfectada, utilitzada en el *microarray* de sobreexpressió, i també en discos d'ala de larves en estadi 3 que sobreexpressaven GAGA sota el control del *driver* *dpp*-GAL4. Aquestes immunolocalitzacions confirmaven que al sobreexpressar GAGA es podia detectar la sobreexpressió de *skl*. Nosaltres vam voler veure si en els discos d'ala utilitzats per fer el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ també podíem veure que *skl* estava sobreexpressat. Vam realitzar immunolocalitzacions utilitzant els anticossos α -GAGA i α -*sickle* amb discos imaginals de larva en tercer estadi després de les 13 hores d'inducció a 29°C. En la immunolocalització es pot veure que als discos control (*TM6B*, *tubby*) no hi ha sobreexpressió de GAGA₅₁₉, hi ha uns nivells de GAGA endògens i es veu que *skl* no s'expressa. En els discos que sobreexpressen GAGA₅₁₉, es pot veure aquesta sobreexpressió i es pot veure que *skl*, s'expressa presentant un patró puntejat en el disc (veure figura D.48).

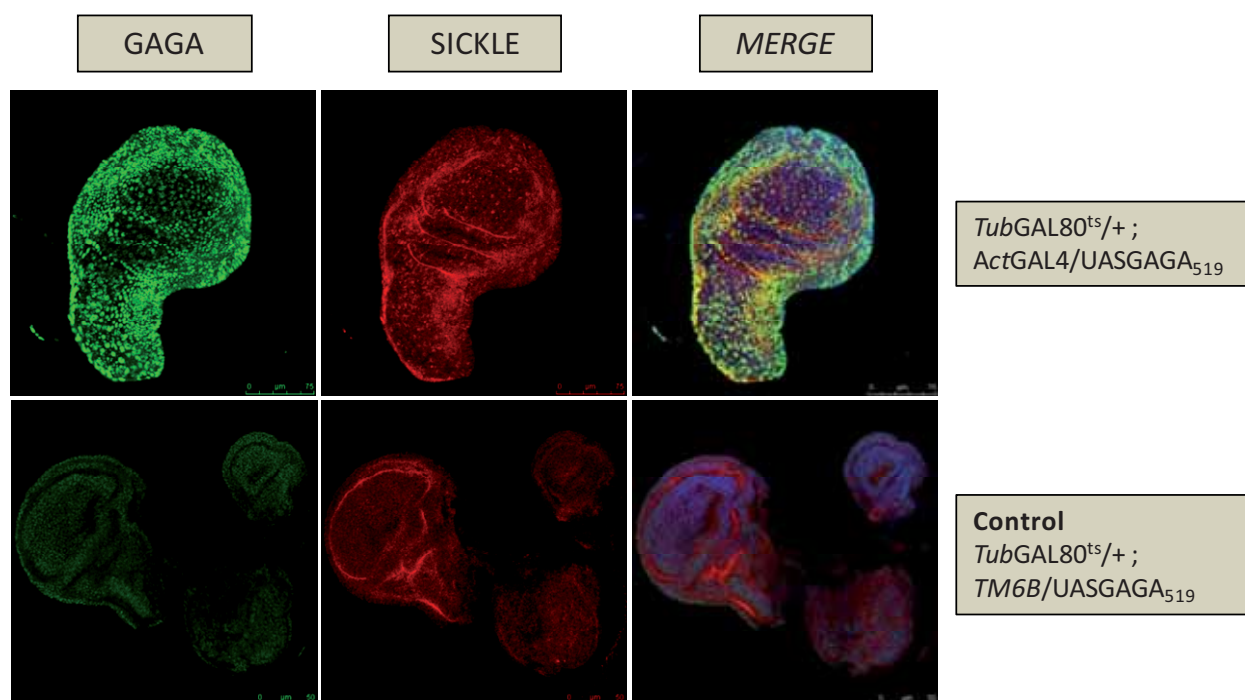


Figura D.48. Immunolocalitzacions per comprovar l'expressió de *skl* deguda a la sobreexpressió de GAGA. Imatges obtingudes al microscopi LEICA SPE d'immunolocalitzacions de discos imaginals de larves en estadi 3. Les larves han estat induïdes 13 hores a 29°C. A la part superior de la figura, es poden observar discos de larves que sobreexpressen GAGA₅₁₉ (*TubGAL80^{ts}/+;ActGAL4/UASGAGA₅₁₉*) i a la part inferior de la figura, larves control que no expressen el transgèn (*TubGAL80^{ts}/+;TM6B/UASGAGA₅₁₉*). D'esquerra a dreta de la imatge es pot observar la tinció amb l'anticòs α -GAGA (verd), la tinció amb α -sickle (vermell) i *merge* (solapament dels dos canals). Es pot observar que quan es sobreexpressa GAGA, també hi ha una sobreexpressió de *skl*, que no presenta cap patró d'expressió en els discos control.

Vam voler fer comprovacions amb altres tècniques per corroborar aquest increment de *skl* a conseqüència de la sobreexpressió de GAGA. Sobre els RNAs utilitzats per fer els *microarrays*, vam realitzar RT-PCRs per veure si la sobreexpressió de GAGA comportava un augment dels nivells d'mRNA de *skl*. En les RT-PCR vam utilitzar encebadors específics per detectar GAGA₅₁₉, per detectar *skl* i per detectar U6, com a control de càrrega. Vam realitzar cada reacció amb tres concentracions d'RNA total (0,5 ng, 5 ng i 50 ng; aquestes concentracions creixents estan representades per un triangle a la figura D.49). A més, per cada experiment vam realitzar una reacció sense el pas de retrotranscripció, com a control de contaminació de genòmic amb 50ng d'RNA total de les mostres no induïdes (-) i induïdes (+). A la figura D.44, es pot veure que el nivell de GAGA s'incrementa en les mostres induïdes 13 hores a 29°C (+) respecte les no induïdes (-), tal i com ja havíem vist en les RT-PCR control dels *microarrays*. Mirant com es troben els transcrits de *skl* en els dos tipus de mostra es pot veure un clar augment dels nivells d'mRNA de *skl* en les mostres induïdes.

Resultats

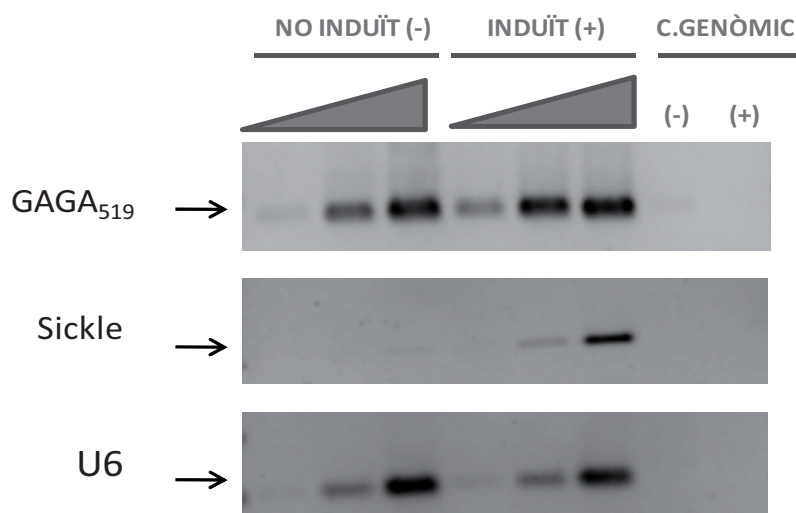


Figura D.49. RT-PCRs per comprovar l'expressió de *skl* al sobreexpressar GAGA. RT-PCRs d'RNA total extret de 25 discos imaginals d'ala de larva en estadi 3. Les mostres d'RNA d'aquestes PCRs corresponen a RNAs utilitzats per realitzar el *microarray* de sobreexpressió. Es poden observar les mostres induïdes 13 hores a 29°C (+) i no induïdes (-). Es van usar tres concentracions diferents d'RNA total (0,5 ng, 5 ng i 50 ng; representades pel triangle gris). Es van usar encebadors per detectar els transcrits de GAGA, els transcrits de *skl* i els transcrits d'U6, aquest últim, com a control de càrrega. S'observa que l'mRNA de GAGA incrementa en les mostres induïdes. *SkI* gairebé no s'expressa en les mostres no induïdes i apareix incrementat clarament a les mostres induïdes. No apareix senyal en el control de contaminació de genòmic, indicant que les mostres estan processades correctament.

Com que tant el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉, les immunolocalitzacions i les RT-PCRs ens indicaven que la sobreexpressió de GAGA implicava una activació de *skl*, vam decidir clonar el promotor de *skl* per fer més comprovacions. Volíem veure si, per transfecció transitòria, el promotor de *skl* podia respondre a quantitats creixents de GAGA. Vam transfectar 3 micrograms de la construcció amb el promotor de *sickle* (pGL3-*skl*) i vam afegir concentracions creixents d'ActppaGAGA. Clarament, es pot observar que el promotor respon a GAGA i s'activa de manera dosi dependent (veure figura D.50). Amb tots els experiments realitzats es pot concloure que *skl* respon a concentracions creixents de GAGA i, per tant, és un gen que està sota el seu control.

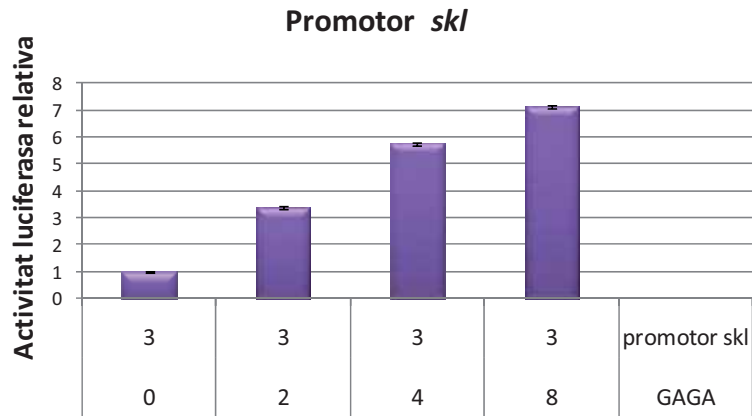


Figura D.50. Assaig de transfecció transitòria a cèl·lules S2 per comprovar l'activitat del promotor de *skl* en resposta a GAGA. En el gràfic, cada barra representa l'activitat luciferasa, corregida pels nivells d'activitat de β -galactosidasa i relativitzada al primer punt, que és l'activitat basal del promotor. Vam afegir a una concentració constant de promotor (3 μ g) quantitats creixents de GAGA (2, 4 i 8 μ g), per veure l'activació del promotor de *skl* de manera dosi-dependent d'activador. El gràfic és el promig de 3 experiments independents, cadascun d'ells amb duplicats de cada punt de transfecció.

E. DISCUSSIÓ

E.1. Distribució de GAGA respecte la maquinària general de transcripció

Per veure la distribució de GAGA i la maquinària basal de transcripció hem realitzat immunolocalitzacions en cromosomes politènics per veure la col·localització de GAGA amb l'RNA polimerasa II i amb diferents TAFs de TFIID. Aquestes immunolocalitzacions mostren una col·localització elevada amb l'RNA polimerasa II i els diferents TAFs, tot i que no és total, suggerint que GAGA no sempre es troba associada a la maquinària transcripcional (veure figura D.1). També hem realitzat immunolocalitzacions de GAGA i la polimerasa en diferents estats de fosforilació del CTD en cromosomes politènics, per veure si GAGA té alguna preferència per associar-se amb alguna de les dues formes de la polimerasa (veure figura D.3).

Existeixen diferents estats de fosforilació del CTD de l'RNA polimerasa II (veure apartat A.2.2.A). A l'inici de la transcripció, el CTD es fosforila a la serina 5 i l'RNA polimerasa només pot avançar entre uns 20 i 40 pb. Aquest estat on la polimerasa s'atura és el que es coneix com a PrPP (*promoter-proximal pausing*). Inicialment, aquesta fase de parada en la transcripció es va descriure en els gens *heat shock* (Rougvie et al. 1988). Actualment, se sap que és un mecanisme de regulació i control de l'expressió gènica estès en molts altres gens que permet un estat de la maquinària en espera per poder donar una activació ràpida de la transcripció en resposta a diferents estímuls (Muse et al. 2007). Al realitzar experiments de reducció dels nivells de NELF (*Negative elongation factor*) amb RNA d'interferència s'ha vist que es redueix el nombre de gens pausats a la meitat i s'ha atribuït a NELF un important paper en l'aturada de la polimerasa (Muse et al. 2007). També s'ha pogut comprovar, mitjançant assajos de ChIP-on-Chip, que NELF es troba en un gran nombre de gens amb l'RNA polimerasa II pausada (Lee et al. 2008). NELF, s'havia vist que inhibia l'elongació i per tant s'havia assumit que era un factor repressor de la transcripció. Sorprenentment, en l'estudi de Lee i col·laboradors troben que els gens que presenten NELF unit són gens d'alta expressió, indicant que NELF podria no ser obligatòriament repressor i el PrPP mediat per NELF podria ser una etapa necessària més, sovint transitòria, del cicle de transcripció.

Discussió

Hi ha diferents evidències que porten a pensar en una possible relació de GAGA amb el fenomen d'aturada de la polimerasa. Així, s'ha vist que els elements GAGA, essencials en l'aturada de la polimerasa en gens *heat shock* (Tsukiyama et al. 1994; Shopland et al. 1995; Wilkins et al. 1997), estan presents en la regió proximal de molts gens aturats. Tant els elements GAGA com els elements Inr i DPE estan sobrerrepresentats en regions promotores de gens aturats (Hendrix et al. 2008). A més, en el treball de ChIP-on-Chip realitzat per Lee i col·laboradors caracteritzen una associació freqüent entre GAGA i NELF en el procés de PrPP de l'RNA pol II (Lee et al. 2008). A partir d'aquesta associació, suggereixen que GAGA podria formar part també d'aquest fenomen d'aturada de la polimerasa. A la figura E.1 es pot veure un diagrama de Venn que mostra les relacions entre els gens que tenen GAGA, els que tenen NELF i els que presenten polimerasa encallada. Es pot observar que GAGA s'associa amb un nombre significatiu de gens que presenten NELF o polimerasa pausada. Com que GAGA s'ha vist que està implicada en l'aturada de la polimerasa II en el gen *hsp70*, ja que mutacions en llocs GAGA del promotor *hsp70* redueixen els nivells de polimerasa pausada en aquest promotor (Lee et al. 1992; Shopland et al. 1995), es podia pensar que GAGA pot estar implicada en l'aturada de la polimerasa en molts altres gens.

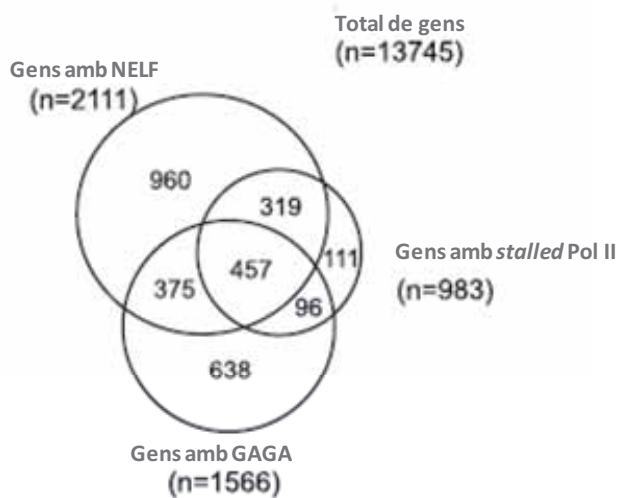


Figura E.1. Diagrama de Venn que mostra les relacions entre els gens associats amb NELF, els associats amb GAGA i aquells amb *stalled* pol II o polimerasa encallada (Adaptat de Lee et al. 2008).

Aquesta assumpció que GAGA participa en el procés de pausa de la polimerasa en gran nombre de gens és inferida de la observació que GAGA i NELF es troben junts. Pot ser que l'associació de GAGA amb NELF i la polimerasa encallada sigui només una associació indirecta, deguda a la unió de GAGA a TFIID. Potser GAGA es troba unida a regions similars a les de NELF i la polimerasa encallada perquè GAGA, simplement, es troba unida a la maquinària transcripcional, sense participar activament en el procés PrPP. Donat que ja es coneix el

requeriment de GAGA per a pausar l'RNA polimerasa II en els gens *heat shock*, s'hauria de comprovar si realment GAGA participa de forma general en el procés de PrPP. Ens podríem plantejar fer ChIP-on-ChIP o ChIP-seq de l'RNA polimerasa pausada en cèl·lules tractades amb RNAi de GAGA per veure si, igual que en el cas de NELF, al reduir els nivells de GAGA també hi ha una reducció del nombre de gens pausats en el genoma.

El que nosaltres observem en les nostres coimmunolocalitzacions de GAGA amb la polimerasa encallada (fosforilada a a serina 5) i la polimerasa elongant (fosforilada a la serina 2) és que no hi ha una clara preferència de GAGA per un dels dos estats fosforilats de la polimerasa (veure figura D.3). D'entrada, amb totes aquestes dades sobre el possible paper de GAGA en el procés de pausa de la polimerasa potser podríem trobar que hi hagués més col·localització amb la polimerasa fosforilada a la serina 5. Però els nostres resultats semblen indicar que això no és així. El que nosaltres observem és que allà on GAGA es troba associada a la maquinària general, els gens són activament transcrits. En el treball realitzat per *O'Brien* i col·laboradors sobre el gen *hsp70*, van veure que en un estat de no inducció del promotor, GAGA es troba unida a la zona promotora. Però en un estat induït del promotor podien detectar GAGA distribuïda al llarg de tota la unitat transcripcional, suggerint que es propaga al llarg del gen, de manera similar a l'RNA polimerasa II per tal d'obrir o disrompre la cromatina permetent a la polimerasa l'elongació a través del gen (*O'Brien et al. 1995*). Cal tenir present però que en el ChIP-on-Chip realitzat a cèl·lules S2, GAGA està exclosa de les seqüències exòniques i només es troba a zones promotores i zones intròniques dels gens (*Lee et al. 2008*). Les nostres col·localitzacions, donada la baixa resolució de la tècnica emprada no poden distingir entre aquestes possibilitats.

Sabent que GAGA és un activador transcripcional, vam voler comprovar què passava amb la distribució de GAGA i l'RNA polimerasa II pel fet de sobreexpressar GAGA. En les immunolocalitzacions a cromosomes politènics de glàndules salivals que sobreexpressen GAGA apareixen gran nombre de cromosomes més fins i fragmentats degut a la sobreexpressió. Tot i així, aquesta sobreexpressió no genera un increment de *loci* ocupats per GAGA, ni cap mena d'alteració en la distribució normal de GAGA, ni tampoc, una major col·localització de GAGA amb l'RNA polimerasa II (veure figura D.2). Amb la limitació que això s'ha observat en un teixit concret i tenint en compte la baixa resolució de les tècniques de localització a cromosomes politènics, els resultats indiquen que la sobreexpressió de GAGA no produeix grans canvis en la seva distribució gènica, ni presumiblement tampoc una activació generalitzada de molts gens. Aquests fets han estat molt importants de cara a la realització dels experiments de *microarrays* de sobreexpressió (veure més endavant).

E.2. Interaccions de GAGA amb la maquinària general de transcripció

Veient que a cromosomes politènics la col·localització de GAGA amb TAF3 i TAF4 era força elevada, i que en un estudi de dos híbrids massiu s'havia vist que GAGA era capaç d'interaccionar amb aquestes dues proteïnes (Giot et al. 2003), vam decidir continuar estudiant la possible relació de GAGA amb aquests components de TFIID. Un dels nostres objectius ha sigut comprovar si realment GAGA és capaç d'interaccionar amb aquests dos TAFs de manera directa i, d'aquesta manera, corroborar el possible contacte de GAGA amb la maquinària general de transcripció.

E.2.1. Interacció de GAGA amb TAF3 i TAF4 i implicació biològica d'aquestes interaccions

Mitjançant assajos de coimmunoprecipitació en cèl·lules S2 transfectades transitòriament amb GAGA i TAF3-HA, hem vist que TAF3 i GAGA poden interaccionar *in vivo* (veure figura D.5). A partir d'assajos de *pulldown* sobreexpressant el fragment His-Bip2G77, fragment de TAF3 que va de l'aminoàcid 757-1091 i que es va utilitzar per detectar la interacció amb Bric à Brac, hem pogut acotar el domini d'interacció de GAGA amb TAF3. Tenint en compte que GAGA té domini POZ i que TAF3 és capaç d'interaccionar amb el domini POZ/BTB del factor de transcripció Bric à Brac, (Pointud et al. 2001), esperàvem que GAGA i TAF3 interaccionessin també pel POZ. Per contra, hem vist que GAGA i TAF3 no interaccionen pels 122 primers aminoàcids corresponents al domini POZ. La zona d'interacció es pot acotar més enllà dels 122 aminoàcids del POZ, a zona de la regió X i el DBD (veure figura D.6). Posteriorment a la obtenció dels nostres resultats de la interacció de GAGA amb TAF3, Chopra i col·laboradors van publicar que la interacció de GAGA i TAF3 involucra el domini POZ perquè han vist que hi ha interacció amb una construcció que contenia els primers 245 aminoàcids de la proteïna (Chopra et al. 2008). Aquests resultats, tot i que pensem que interpretats erròniament, corroboren i reafirmen el nostre treball perquè no han assajat cap altra part de la proteïna i nosaltres hem vist que amb el domini POZ estricte (primers 122 aminoàcids) no hi ha interacció i per tant, definim el lloc d'interacció a la zona dels dominis X-DBD. En qualsevol cas, i donat que mai s'ha utilitzat el TAF3 sencer per a mapar aquestes interaccions per motius tècnics, resta oberta la possibilitat de l'existència d'altres contactes que podrien involucrar altres interaccions de GAGA.

Mitjançant coimmunoprecipitació a cèl·lules S2 sobreexpressant GAGA i TAF4-HA, hem vist que GAGA pot interaccionar amb TAF4 (veure figura D.8). Aquest resultat també confirma el que s'havia observat en l'assaig de dos híbrid massiu (Giot et al. 2003) i ens indica que GAGA pot interaccionar amb el complex TFIID *in vivo*. Hem vist que ni el domini Q, ni el domini POZ són imprescindibles per aquesta interacció, ja que quan fem deleció d'aquests dominis les dues proteïnes poden continuar interaccionant. Això suggereix que el lloc d'interacció es dona als dominis X o DBD, o bé que existeix més d'un lloc d'interacció entre GAGA i TAF4 (veure figura D.23).

Un cop havíem vist que GAGA podia interaccionar amb TAF3 i TAF4, ja teníem evidències que indicaven que GAGA podia interaccionar amb TFIID. Sabent que TAF3 i TAF4 tenen un paper de coactivadors transcripcionals en el context de TFIID, vam voler veure la implicació biològica de la interacció física de GAGA amb aquests TAFs.

El nostre disseny experimental es basava en la sobreexpressió de quantitats creixents de TAF3 o TAF4 sobre una quantitat fixa de GAGA. Volíem veure si es podia observar un efecte coactivador d'aquests TAFs sobre l'activació de GAGA i, d'aquesta manera, poder entendre millor el mecanisme que GAGA utilitza per activar. La coexpressió d'aquests TAFs i GAGA a cèl·lules S2 no va resultar en cap increment de l'activació de GAGA degut la major presència de TAF3 o TAF4 (veure figures D.9 i D.11). De fet, vam observar que a majors concentracions dels TAFs es donava una disminució de l'activació de GAGA. Pensem que això es produïa a conseqüència de la interacció de GAGA amb aquests TAFs en solució i fora del promotor, el que es coneix com a fenomen d'*sqelching*. En aquest fenomen d'*sqelching*, l'activador queda segrestat per un component que està en excés i impedeix que s'uneixi al promotor. D'aquesta manera, un excés de TAF4 segrestaria a GAGA impedit que pogués activar el promotor. Els *western blots* i les immunolocalitzacions ens indiquen que l'expressió dels TAFs era correcta, i es localitzaven al nucli, igual que els TAFs endògens (veure figures D.10 i D.12). Les raons per les quals no vam aconseguir veure cap increment de l'activació de GAGA poden ser diverses. És possible que la sobreexpressió de només un dels components del complex TFIID no fos suficient per a observar la coactivació. De fet, el nostre disseny experimental es basava en la possibilitat, en el cas de TAF4, que pogués estar en condicions limitants a la cèl·lula de manera que la sobreexpressió de TAF4 pogués permetre l'ensamblatge de tot el complex TFIID, basant-nos en el fet que TAF4 forma part del nucli estructural del complex TFIID (Wright et al. 2006). En el cas de TAF3, el nostre disseny es basava igualment en un possible ensamblatge addicional d'aquest TAF a complexos TFIID preformats. Això es fonamentava en dades de la bibliografia que indicaven que aquesta subunitat no es trobava sempre present al complex TFIID i podria ser limitant (Gangloff et al. 2001). Altrament, també és possible que en els promotors estudiats (*even skipped stripe 2* i *sickle*) ni TAF3, ni TAF4 fossin els coactivadors específics de GAGA i, en canvi, hi hagués algun altre coactivador implicat que desconeixem.

Discussió

Hem de tenir present que nosaltres hem assumit que la interacció de GAGA amb TAF3 i TAF4 es dona el context de TFIID però podria donar-se en el d'altres complexos que contenen aquests TAFs però no són TFIID, com per exemple TFTC (TBP-free TAF complex). No obstant, les immunolocalitzacions coincidents amb TAF1 o, sobretot amb TBP (no mostrat), ho fan improbable encara que no es pot descartar l'existència d'altres complexos encara no descrits que continguessin aquestes subunitats.

Com que amb l'estratègia de la sobreexpressió dels TAFs no havíem pogut veure cap efecte, calia buscar alternatives experimentals per poder veure si, realment, la interacció física de GAGA amb TAF3 i TAF4 es podia relacionar amb un mecanisme de coactivació per part dels TAFs. Una alternativa experimental utilitzant la depleció dels TAFs mitjançant RNA d'interferència, podia ser una manera més directa de poder veure si la manca d'un d'aquests dos TAFs reportava una davallada en l'activació per part de GAGA en els diferents promotors. La utilització de l'RNA d'interferència però, no va ser una estratègia experimental viable. En cèl·lules S2, la quantitat de TAF3 endogen és molt difícil de detectar mitjançant *western blot* i això dificultava enormement la realització d'aquest experiment. Aquesta observació utilitzant dos anticossos diferents, un generat per nosaltres mateixos i un altre proporcionat pel Dr. Couderc, sembla confirmar la limitada quantitat d'aquest TAF per cèl·lula, descrita ja a la bibliografia (Soutoglou et al. 2005). Tampoc vam poder fer servir l'estratègia d'RNAi en el TAF4 perquè, tot i que el TAF4 endogen si que es detecta a uns nivells raonables, i sí que era fàcil poder veure una disminució dels nivells endògens del TAF, aquest experiment presentava altres problemes. S'ha vist que TAF4 nuclea tot el complex TFIID, de tal manera que la seva depleció mitjançant RNAi comporta una desestabilització de tot el complex TFIID (Wright et al. 2006). Per tant, eliminant els nivells de TAF4 mitjançant RNAi no podríem distingir si la davallada d'activació seria deguda a la manca de TAF4 com a coactivador o a la desestabilització general de TFIID.

En el cas de TAF3, cal destacar que a la bibliografia recent apareixen més dades sobre la relació de GAGA amb TAF3. ChIPs de GAGA i ChIPs de TAF3 indiquen que pot haver-hi una associació física del TAF3 amb GAGA, particularment, en aquells promotors que contenen llocs GAGA, com el promotor d'*Ubx*, el d'*hsp70* i *hsp26*, on també es troba TAF3 (Chopra et al. 2008). Partint de la idea que GAGA és un activador d'*Ubx* i que les mutacions de *Trl* alteren la regulació d'*Ubx* promovent una transformació homeòtica d'halteri a ala (Farkas et al. 1994), Chopra i col·laboradors van voler veure si TAF3 era necessari en la regulació de GAGA sobre *Ubx*. Veuen que mutacions de *TAF3* incrementen el fenotip de transformació homeòtica ja que les mosques *Trl^{85R}/TM2, Ubx; dmTAF3^{Fa4a}/dmTAF3^{Fa4a}* tenen incrementats els efectes de la transformació homeòtica respecte les mateixes mosques sense *dmTAF3* mutat. Els efectes sembla que poden donar-se a nivell transcripcional ja que la modificació de l'expressió d'un transgèn *Ubx-lacZ* en

un fons mutant per *dTAF3* i *Trl* confirma que hi ha una davallada en els nivells d'*Ubx* en el context del doble mutant. D'aquesta manera suggereixen un paper coactivador de TAF3 sobre GAGA a *Ubx* (Chopra et al. 2008). A partir d'aquestes observacions nosaltres ens preguntem si aquest caràcter coactivador de TAF3 sobre *Ubx* es podria extrapolar a altres promotors. Creiem que seria interessant poder veure si el mutant de TAF3 pot afectar també l'activació d'altres gens que GAGA pot activar. En tot cas, aquests estudis no poden descartar que els resultats que veuen siguin deguts a algun efecte indirecte de la manca de TAF3 que finalment reverteix en l'activitat d'*Ubx*.

Per tal d'estudiar el possible paper de TAF4 com a coactivador de GAGA ens vam plantejar una estratègia alternativa que va consistir en fer mutants sobre possibles seqüències d'interacció de GAGA amb TAF4. A la bibliografia s'acabava de descriure que TAF4 humà podia interaccionar a través del seu domini TAFH amb proteïnes que presenten uns motius similars als que s'uneixen a la proteïna ETO (Wang et al. 2007). Fent una anàlisi de la seqüència de GAGA vam trobar dues seqüències similars al consens d'unió al domini ETO-TAFH (LXXLL). Aquestes seqüències, a GAGA, es troben com LLDLL i LEALL i ambdues estan situades al domini POZ de la proteïna. A partir de la identificació d'aquests motius a GAGA, vam generar una bateria de mutants puntuals de diferents aminoàcids d'aquests motius amb els que vam realitzar assajos de transfecció transitòria amb diferents promotors (*even-skipped*, *hsp70* i *Trl*). En aquests assajos luciferasa vam comparar l'activació i repressió produïda per la GAGA salvatge amb l'activitat dels mutants.

Els mutants puntuals que afecten residus no essencials del motiu d'unió LxxLL, no afecten la capacitat activadora de GAGA ni la capacitat repressora i són construccions mutades que al transfectar-se generen una quantitat de proteïna a uns nivells comparables als nivells observats amb la sobreexpressió de GAGA salvatge (veure figures D.15, D.16 i D.17).

En canvi, diferents mutacions en un residu essencial del motiu d'unió a TAF4 (L87), tant les que per predicció poden desestabilitzar el POZ (L87E, L87A, L87I) com la que no el desestabilitza (L87D), en tant que provoquen una gran davallada en la capacitat activadora de GAGA, no afecten en absolut la capacitat repressora de la proteïna (veure figures D.19 i D.20). Això era d'esperar ja que el domini POZ és prescindible pel mecanisme d'autoregulació negativa de *Trl* (Kosoy et al. 2002). D'entrada, el resultat podria indicar que la mutació d'aquest residu afectava alguna de les interaccions amb TAF4 i que això es traduïa en una mermada capacitat activadora de GAGA que, d'altra banda, no afectava a l'estructura general de la proteïna que seguia sent perfectament capaç de reprimir *Trl*. Al realitzar immunolocalitzacions i *western blot* de control, vam observar que amb les diferents mutacions transfectades d'aquests mutants del residu L87 detectàvem quantitats molt menors de proteïna que l'obtinguda amb la GAGA salvatge (veure figura D.21).

Discussió

En un sistema heteròleg com les cèl·lules HeLa, els mutants sí que mostraven nivells de proteïna similars a GAGA salvatge però, tot i així, seguien sense poder activar correctament (veure figures D.23 i D.24). En aquest moment vam pensar que una possibilitat era que els mutants en S2 es podien detectar com una GAGA no funcional en activació a cèl·lules S2 i, per tant, es degradaven. La possibilitat d'un efecte negatiu sobre la transcripció es va descartar perquè els canvis puntuals s'introduïen a la seqüència codificant i perquè, malgrat ser molt propers entre ells, donaven lloc a resultats molt diferents. Això ens va fer pensar que no podíem estar afectant cap element regulador de la transcripció desconegut i que es localitzés en aquestes seqüències. Per tal d'intentar minimitzar aquesta possible degradació, vam fer proves d'inhibició del proteosoma en cèl·lules S2 amb l'inhibidor MG132. Aquest tractament no va resultar en cap millora dels nivells observats de les proteïnes mutants i per tant, semblaria que la ruta de degradació d'aquests mutants no aniria via proteosoma (veure figura D.22).

Donat que a cèl·lules HeLa el mutants de L87 generaven nivells de proteïna iguals a la GAGA salvatge, vam mirar si perdien la seva capacitat d'interacció amb TAF4. Els resultats d'assajos de coimmunoprecipitació ens indiquen que TAF4 pot continuar interaccionant igualment amb la GAGA mutant L87D (veure figura D.25). D'acord amb això, assajos de coimmunoprecipitació de TAF4 amb els mutants de GAGA, ΔQ i ΔPOZ , a cèl·lules HeLa, ens indiquen que ni el domini Q ni el domini POZ són imprescindibles per la interacció (veure figura D.26). A partir d'aquests resultats, podem pensar que la interacció no es dona ni pel domini POZ ni pel domini Q o bé que pot existir més d'una zona d'interacció entre GAGA i TAF4, i per això podem continuar veient que el mutant no perd la capacitat d'interaccionar. Si fos així, pensem que els mutants podrien perdre algun dels contactes importants amb el seu coactivador i amb això la capacitat d'activar. A la figura E.2 hem inclòs un model de l'estructura del dímer format per dos dominis POZ, modelats segons el POZ de PFLZ (Pagans et al. 2002). Es troben marcats dos dels aminoàcids que hem mutat per indicar que aquests residus, en el model del POZ, són residus que es troben accessibles per a possible interacció amb TAF4 confirmant, que al mutar-los es podrien afectar algun dels possibles contactes amb TAF4.

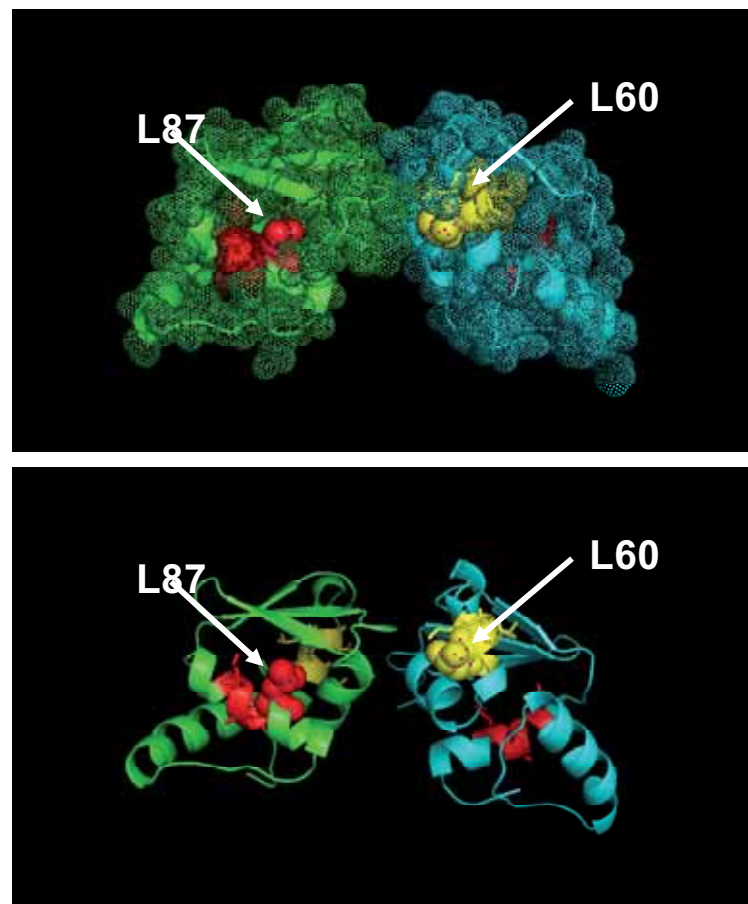


Figura E.2. Model del dímer format pel POZ de GAGA. Es pot observar que els residus L87 i L60 són residus accessibles, exposats al solvent.

El que podem concloure dels nostres resultats és que el residu L87, que forma part dels residus importants en el possible motiu d'unió a TAF4, és un residu essencial en l'activació de GAGA ja que quan es muta, GAGA perd la capacitat per activar correctament.

Cal tenir present que no podem descartar però que els efectes que veiem de pèrdua d'activació en el mutant essencial del domini LxxLL siguin deguts a una pèrdua d'estabilitat del domini POZ. Tot i que tenim mutants que per predicció podrien ser desestabilitzants, tenim diverses indicacions que suggereixen que la manca d'activació no deu ser deguda a un canvi estructural d'aquest domini. Per una banda, cal recordar que hem fet assajos amb un mutant que per predicció no hauria d'afectar l'estabilitat del POZ (L87). Els resultats d'activació amb aquest mutant són extremadament dràstics, provoca una gran davallada en la capacitat activadora de GAGA, mentre que la capacitat repressora de la proteïna no es veu afectada. Això ens indica que la proteïna mutada en el residu L87 és funcional i que deu estar plegada correctament. Si la mutació generés una desestructuració general, o un mal plegament de la proteïna, aquesta no seria funcional. Cal tenir present que les immunolocalitzacions a cèl·lules S2 amb aquest mutant, tot i que presenten uns nivells de proteïna menors que la GAGA

Discussió

salvatge, mostren un senyal nuclear de la proteïna. Això és indicatiu que no es tracta una mutació desestabilitzadora capaç de deslocalitzar la proteïna del nucli.

Un estudi realitzat per *Read* i col·laboradors sobre els dominis POZ de Mod(*mdg4*) i de GAGA indica que mutacions en residus altament conservats entre els dominis POZ de diverses proteïnes pot afectar l'estabilitat d'aquest domini (Read et al. 2000). En aquest treball veuen que l'al·lel letal *mod(mdg4)*³⁵¹ presenta dues mutacions en residus altament conservats entre diverses proteïnes amb domini POZ. Aquests residus, D35 i G97 també es troben conservats a GAGA i quan els muten, GAGA perd la seva capacitat d'activar. Aquests mutants, junt amb un altre mutant que generen (L112), trenquen l'estabilitat del POZ. A la figura E.3 es poden veure les seqüències aminoacídiques del POZ de GAGA, Mod(*mdg4*) i Ttk69. A la part inferior de la figura, enquadrats en blau, es poden observar els tres residus essencials que *Read* i col·laboradors van mutar. A la part superior de la figura estan indicats els aminoàcids que nosaltres hem mutat. Es pot observar que el residu L87 no es troba conservat entre les tres proteïnes, suggerint i reafirmant que mutacions en aquest aminoàcid no tenen perquè generar alteracions estructurals.

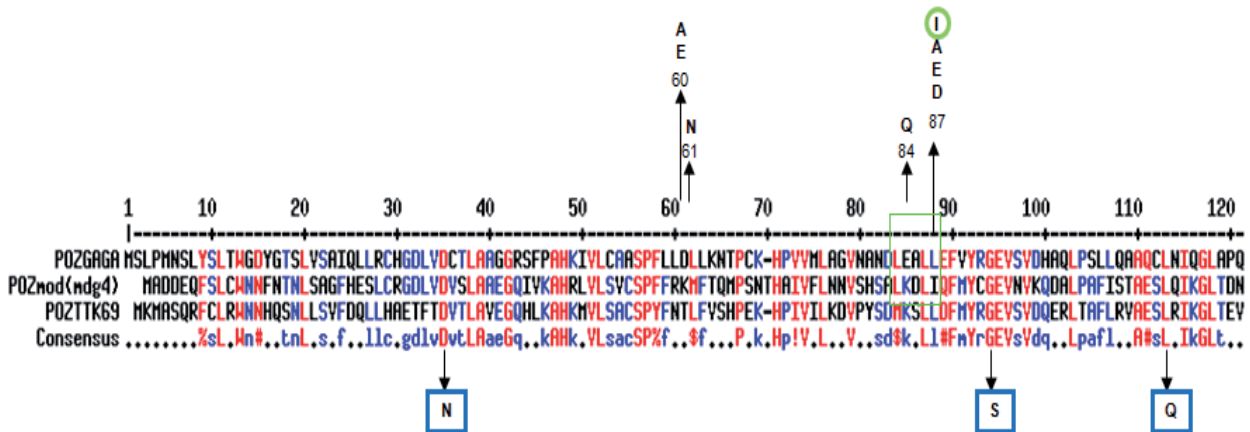


Figura E.3. Comparació de la seqüència aminoacídica dels dominis POZ de GAGA, Mod(*mdg4*) i TTK69. En vermell es troben marcats els residus conservats entre les tres proteïnes, en blau els que estan conservats almenys en dues de les proteïnes i en negre els residus no conservats. A la part superior de la figura estan indicats els residus que nosaltres hem mutat i el canvi aminoacídic corresponent en cada cas. A la part inferior de la figura, enquadrats en blau, hi ha indicats els canvis dels residus conservats D35, G93 i L112 realitzats per *Read* i col·laboradors (Read et al. 2000).

E.2.2. Interacció de TAF3 amb GAGA i Ttk69. Una possible explicació del mecanisme de regulació de l'activació d'*even skipped stripe 2*

Sabent que GAGA i TAF3 poden interaccionar *in vivo*, ens va semblar interessant també mirar si TAF3 podia interaccionar amb el factor repressor Ttk69. Ttk69, presenta domini POZ i pot interaccionar amb GAGA a través d'aquest domini (Pagans et al. 2002). Ttk69 reprimeix l'activitat duta a terme per GAGA en el promotor *even skipped stripe 2* i una de les hipòtesis proposades per explicar aquesta repressió consisteix en que Ttk69 sigui capaç d'unir-se a la maquinària de transcripció bloquejant així la seva interacció amb GAGA. Resultats no publicats d'un assaig de dos híbrids suggereixen una interacció de POZ de Ttk69 amb TAF3 (dTAF₁₁₅₅) (Badenhorst et al. 2002). A partir d'aquí ens vam plantejar la possibilitat que Ttk69 pogués associar-se amb components de la maquinària basal i interferir la interacció amb GAGA.

Mitjançant assajos de *pulldown* sobreexpressant un fragment de TAF3 de l'aminoàcid 757 al 1091, fusionat a un *tag* (His-BIP2G77), hem vist que TAF3 pot interaccionar amb Ttk69. Tot i que la interacció amb el POZ de Ttk69 és pot donar, ho fa de forma molt dèbil. Semblaria que apart del domini POZ, hi deuen haver més llocs d'interacció (veure figura D.7). Cal recordar que no s'ha utilitzat el TAF3 sencer per mapar aquestes interaccions per motius tècnics i per tant, resta oberta la possibilitat de l'existència d'altres contactes entre Ttk i TAF3.

Com que Ttk69 és capaç d'interaccionar amb TAF3 i GAGA també pot unir-se a TAF3, seria factible que Ttk69 pogués segrestar TAF3 i/o bloquejar la interacció de TAF3 amb GAGA per tal de poder reprimir l'activació realitzada per GAGA. En aquest sentit, experiments de transfecció demostren que la repressió per Ttk69 de l'activació depenent de GAGA requereix de la contribució dels dominis POZ de les dues proteïnes. A més, s'ha demostrat que el domini POZ de Ttk69 és el principal responsable de la repressió que exerceix aquest factor sobre l'activació del promotor *eve stripe 2* depenent de GAGA, essent tan necessari com suficient perquè aquesta tingui lloc (Pagans et al. 2002). Tenint en compte que aquests dominis són els responsables de la interacció GAGA-Ttk69, els models que apareixerien com a més probables serien els que impliquen una interacció directa entre aquestes dues proteïnes. A més, el fet que el POZ de Ttk69 pugui reprimir en absència d'un domini d'unió al DNA suggereix que aquesta repressió no requereix una unió directa de Ttk69 amb el DNA motlle (Pagans et al. 2002).

En un possible model on TAF3 fos el coactivador de GAGA en el promotor *eve*, (nosaltres no hem pogut demostrar que ho sigui però tampoc ho hem pogut descartar), GAGA interaccionaria amb TAF3 en una situació d'activació, a través d'un domini diferent al domini

POZ tal i com indiquen els nostres resultats. El fet d'haver vist que TAF3 i Ttk69 poden interaccionar, reafirma la hipotesi que Ttk69 interaccionaria amb TAF3, segrestant i/o bloquejant la maquinària general resultant, en darrera instància, en una abolicció de l'activació (veure figura E.2.C). De tota manera, la situació probablement és més complexa donat el fet que la proteïna quimèrica POZ_{Ttk}-ΔPOZGAGA519, on el POZ de GAGA ha estat reemplaçat pel POZ de Ttk69, no pot activar el promotor *eve stripe 2* (D.Piñeyro, Tesis Doctoral). Això suggereix que no seria el simple contacte de GAGA amb la maquinària general de la transcripció, sinó que més aviat serien alguns contactes molt específics els que permetrien que es donés l'activació. Cal recordar que el domini POZ de GAGA per si mateix fusionat al domini d'unió a DNA de GAL4 no pot transactivar, que això sí ho fa el domini Q, però que per contra col·labora decisivament en l'activació mediada pel domini Q en el context de la proteïna GAGA (Vaquero et al. 2000).

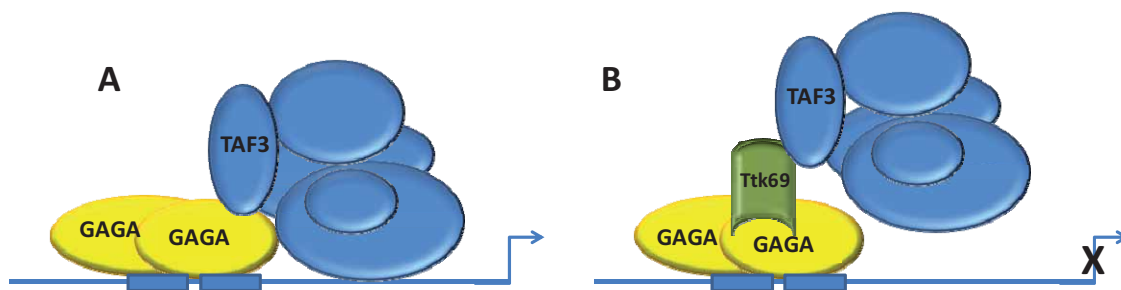


Figura E.5. Representació del possible model de repressió de Ttk69 sobre el promotor *even skipped stripe 2* activat per GAGA. **A)** Model que representa el promotor *eve* activat per GAGA on TAF3 és el coactivador. **B)** Model on Ttk69 s'uneix a GAGA a través del domini POZ i alhora interacciona amb TAF3 segrestant-lo i/o impedint la seva interacció amb GAGA.

E.3. Reavaluació de l'activitat de GAGA sobre gens diana coneguts

Entre els diversos estudis realitzats amb GAGA, s'han definit diferents gens que tenen llocs d'unió a GAGA en els seus promotors i s'ha vist que GAGA és capaç d'activar-los. Ens vam plantejar mirar si la sobreexpressió de GAGA podia conduir a l'expressió ectòpica d'algun d'aquests gens fora del seu patró normal, i per tant, obrir finestres d'expressió on normalment aquests gens no s'expressen. La idea era veure si GAGA era el regulador principal d'aquests gens. A la bibliografia es poden trobar exemples que indiquen que l'expressió ectòpica de gens pot reprogramar l'expressió gènica. S'ha vist, per exemple, que l'expressió ectòpica de *wingless* a disc imaginal interfereix amb l'expressió de *dpp* i s'altera el patró d'*en* que passa a expressar-se a la part anterior del disc, on no s'expressa de forma salvatge (Johnston et al. 1996).

Les nostres immunolocalitzacions realitzades en embrions i discos imaginals que sobreexpressen GAGA sota el control de diversos *drivers*, en cap cas afecten l'expressió d'*Ubx*, *en*, *eve* o *ftz* (resultats no mostrats) de cap manera (veure figures D.28, D.30 i D.32 i resultats no mostrats). En el seu conjunt els resultats indiquen que GAGA no és el principal regulador de l'expressió d'*Ubx*, *en*, *eve* i *ftz*.

Donats aquests resultats, vam voler estudiar què passava amb l'expressió d'aquests gens si reduïem els nivells de GAGA mitjançant RNA d'interferència. En estadi d'embrió, no hem aconseguit reduir els nivells de GAGA, bé perquè la el sistema GAL4UAS comença a funcionar en un estat massa avançat, o bé perquè el component de GAGA d'efecte matern no permet disminuir suficientment els nivells de proteïna per veure efectes. Vam aplicar doncs RNAi a discos imaginals. Amb la sobreexpressió del *hairpin* RNAi de GAGA i de *dicer2* sota el control del *driver nubbin* (*nubbinGal4>UASdicer2;UASGAGA*) vam aconseguir una forta davallada dels nivells de GAGA. Tot i així, el patró d'*en*, tant a disc d'ala, com a halteri, no s'altera, i tampoc veiem cap mena d'alteració de patró ni disminució dels nivells d'expressió d'*Ubx* (veure figures D.33 i D.34).

Sabem que embrions que no tenen ni GAGA zigòtica ni materna no es desenvolupen, indicant que GAGA és necessària en els primers estadis de desenvolupament (Bejarano et al. 2004) i també sabem que GAGA és important durant l'embriogènesi per la regulació d'alguns gens homeòtics i de polaritat de segment. Resultats obtinguts en els mutants hipomòrfics *Trl*^{13C}, que tenen molt poca quantitat de GAGA, mostren alteracions dels patrons tant d'*en* com d'*Ubx* (Farkas et al. 1994; Bhat et al. 1996). Embrions mutants nuls homozigots per *Trl* (*Trl*^{R85}) presenten una reducció de les funcions d'activació i repressió d'alguns gens homeòtics i presenten una reducció de l'expressió tant de les proteïnes UBX com EN (Bejarano et al. 2004).

Els nostres resultats indiquen que GAGA no sembla afectar la regulació ni d'*Ubx* ni d'*en* en estat larvari, a diferència del que s'ha vist que passa en estat embrionari. Això ens suggereix que GAGA és important per la regulació d'aquests gens en els primers estadis del desenvolupament però que GAGA no semblaria controlar aquests gens més enllà de l'embriogènesi. Malgrat que no podem descartar completament que la petita quantitat de GAGA que pugui quedar sigui suficient per a l'expressió d'aquests gens, sí que és cert que els nostres resultats corroboren els resultats de *Bejarano* i *Busturia*, on clons de falta de funció a larva sobre fons mutants per *Trl* no mostren cap fenotip de transformació homeòtica indicatiu d'alteracions en activació o repressió dels gens homeòtics. Mitjançant els clons sobre fons mutants no veuen cap canvi de l'expressió d'*Antennapedia (Antp)*, *Sex comb reduced (Scr)*, *abd-A*, *Abd-B*, *Ubx* o *en*. Per tant, tant els seus resultats com els nostres suggereixen que GAGA és necessària durant l'embriogènesi però no durant el desenvolupament larvari per la regulació de l'expressió d'alguns gens homeòtics i de polaritat de segment. Cal fer notar, però, que l'efecte de GAGA sobre l'expressió d'*Ubx* s'havia descrit en la transformació d'halteri a ala que s'ha de donar a nivell larvari. Això podria indicar que aquesta transformació s'hauria de reinterpretar més aviat com un efecte indirecte de la falta de funció de GAGA. Aquesta interpretació inicial, i possiblement equivocada, és conseqüència de l'estudi amb mutants convencionals de falta de funció per inserció d'elements P i/o deleció i ens porta a pensar que caldria una reavaluació a nivell més molecular dels efectes de GAGA sobre els seus gens diana per tal de separar els efectes directes dels indirectes.

Possiblement GAGA té diferents papers i varis mecanismes d'activació segons l'estadi de desenvolupament de la mosca. *Trl* es requereix durant l'embriogènesi per l'activació de certs homeòtics i formadors de patró, essencials per un correcte funcionament embrionari però sembla dispensable durant el desenvolupament de disc imaginal per la regulació d'aquests gens. GAGA segurament serà imprescindible per la regulació d'altres gens clau durant l'estadi larvari i els nostres assajos de *microarray* en discos imaginals de larva 3 ens poden suggerir el paper de GAGA en aquest estadi.

E.4. Cerca de nous gens diana per a GAGA. *Microarrays* de sobreexpressió i de falta de funció a disc imaginal d'ala de larves de tercer estadi

GAGA és una proteïna nuclear i ubiqua (Soeller et al. 1993), es coneix com una proteïna polifacètica implicada en gran varietat de processos biològics diferents en els que no s'ha definit exactament com participa. L'estudi funcional de GAGA, fins al moment, s'ha centrat principalment en experiments de transcripció *in vitro* on s'ha descrit com a proteïna activadora i en l'estudi de mutants genètics que demostren que en la fase embrionària GAGA pot tenir implicació en la regulació i activació de certs gens homeòtics (Farkas et al. 1994). Es desconeix però si les funcions de GAGA són iguals al llarg dels diferents estadis de desenvolupament o bé, si té diferents papers especialitzats per cada fase de la vida de la mosca, tal i com suggereixen els nostres experiments d'interferència en discos imaginals. Per conèixer el paper de GAGA fora de la fase embrionària, i veure quins gens regula en estadi larvari, vam decidir realitzar *microarrays* en disc imaginal de larva en estadi 3. Amb aquests experiments preteníem tenir una idea de si GAGA té un paper concret i global, o bé si les seves funcions estan especialitzades. Cal remarcar que aquests *microarrays* realitzats a disc d'ala formen part d'un projecte més ampli del nostre grup que pretén realitzar *microarrays* en altres teixits i fases del cicle vital de la mosca per tal de fer una anàlisi funcional *in vivo* de GAGA que permeti tenir una idea del seu paper biològic en cada moment. Aquests estudis de *microarrays* també pretenen elucidar les diferències funcionals que puguin haver-hi entre les dues isoformes de GAGA, GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁. Fins al moment, se sap que les dues isoformes comparteixen gran part de la seqüència i que només difereixen en la part C-terminal rica en glutamines, zona que correspon al domini de transactivació i que és més llarga en la isoforma GAGA₅₈₁ (Benyajati et al. 1997). S'ha descrit que ambdues isoformes tenen funcions solapants però no idèntiques (Greenberg et al. 2001). El fet de veure si en els *microarrays* les dues proteïnes afecten o no els mateixos gens ens pot permetre extreure conclusions sobre la seva participació, o no, en els mateixos processos biològics.

E.4.1. Disseny experimental dels *microarrays*

Els *microarrays* de sobreexpressió han estat dissenyats per incrementar els nivells de les dues isoformes amb una sobreexpressió limitada i controlada. Com que la sobreexpressió de GAGA s'ha vist que porta a la generació de fenotips deleteris severos i a una gran letalitat (Bernues et al. 2007), ens ha interessat limitar la sobreexpressió a nivells no molt elevats i durant molt poc temps, per intentar evitar els efectes indesitjats de la sobreexpressió. És per això que hem optat per un sistema d'inducció dual, espacial i temporal, GAL4-GAL80^{ts}. A 13 hores d'inducció a 29°C, la sobreexpressió tant de la isoforma GAGA₅₁₉, com de GAGA₅₈₁, a disc imaginal, és suficient i no molt elevada (veure figures D.35, D.36 i D.37). L'expressió de GFP com a control d'aquests *microarrays* ens permetien discernir els efectes directes de GAGA dels efectes produïts pel canvi de temperatura. Els resultats dels *microarrays* de sobreexpressió de GFP indiquen, però, que la sobreexpressió de GFP no és neutra. Comparant els *microarrays* de les mostres de GFP sense induir amb les induïdes, es pot veure que la sobreexpressió de GFP altera l'expressió d'alguns gens (no mostrats). Cal assumir que el nostre control és el millor control possible però, tot i així, no és un control perfecte. Per sort, la gran majoria de gens afectats per la sobreexpressió de GFP no són comuns als gens afectats per la sobreexpressió de GAGA.

El disseny experimental del *microarray* de falta de funció és lleugerament diferent del disseny dels *microarrays* de sobreexpressió. D'entrada cal esmentar de nou, que no ha estat possible dissenyar *hairpins* d'RNAi que permetessin la depleció selectiva de cada isoforma, ja que la zona que difereix entre GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁ és una regió altament repetitiva i similar a gran nombre de proteïnes amb dominis rics en glutamines. A més, aquesta regió de la isoforma GAGA₅₈₁ també pot formar part de la regió 3' UTR d'alguns dels mRNAs de la isoforma GAGA₅₁₉ (veure figura E.6).

Discussió

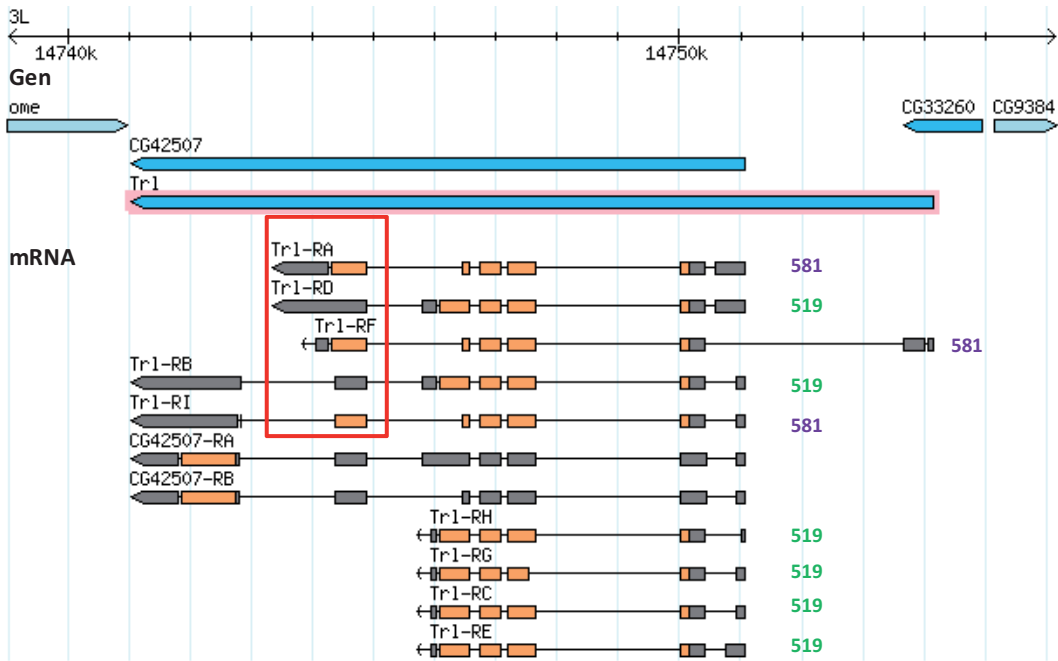


Figura E.6. Representació esquemàtica de la regió gènica de *Trl* i dels seus possibles transcrits. A la dreta de cada transcrit s'indica a quin isoforma de GAGA donaria lloc. També es troben representats el gen *omega* (*ome*) i CG9384, que no solapen amb el gen *Trl*, el gen CG33260 que solapa amb la regió 5'UTR del transcrit Trl-RF de *Trl* i el gen CG42507 amb els seus transcrits és un gen dicistrònic que solapa àmpliament amb *Trl*. Enquadrada en color vermell es pot observar la regió on zones codificants per la isoforma GAGA₅₈₁ solapen amb zones no codificants 3' UTR de GAGA₅₁₉ (Adaptat de *Flybase*).

El sistema d'inducció dual utilitzat pels *microarrays* de sobreexpressió no el vam poder fer servir en el cas del *microarray* de falta de funció perquè els temps d'inducció de poques hores no era suficient per obtenir una davallada de GAGA. La vida mitjana de GAGA és llarga i es necessiten diversos dies d'actuació de l'RNAi per tal d'observar una davallada d'expressió acceptable, així que vam decidir utilitzar el *driver* 69B-GAL4 i mantenir els tubs a 25°C des de l'inici dels creuaments, sense el sistema d'inducció controlada. Amb aquest sistema podíem veure una baixada considerable de la proteïna (veure figures D.39 i D.40) i com que els creuaments estaven a temperatura ambient, no calia tenir controls per tenir en compte els efectes deguts al canvi de temperatura. Com a control per el *microarray* de falta de funció vam fer servir una línia que expressava un *hairpin* contra GFP que ens permetia eliminar aquells gens alterats pel simple fet d'activar la maquinària d'RNA d'interferència i que no estan directament relacionats amb la manca de GAGA.

E.4.2. Observacions generals dels resultats dels *microarrays*

A grans trets, la primera observació que cal tenir en compte dels resultats dels *microarrays* és que en els *microarrays* de sobreexpressió, tant en els de GAGA₅₁₉ com, en els de GAGA₅₈₁, hi ha molt pocs gens afectats, tal i com esperàvem degut al nostre disseny experimental. Aquest resultat l'interpretem com que aquests gens que presenten la seva expressió alterada són els més sensibles a la sobreexpressió de GAGA i per tant, probables dianes directes de la seva acció.

En el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ hi ha 196 gens diferencialment expressats, d'aquests, 189 estan activats i 7 estan reprimits (veure figura D.43). Aquesta gran diferència entre nombre de gens activats i reprimits indica que GAGA és clarament una proteïna activadora. Fins al moment, només s'ha vist que és capaç de reprimir el seu propi promotor (Kosoy et al. 2002; Bernues et al. 2007) i que pot arribar a reprimir gràcies a la seva implicació en el mecanisme de silenciament del grup de proteïnes Polycomb. S'ha vist que la relació amb les proteïnes Polycomb no és molt forta perquè només col·localitza de manera parcial amb Polycomb (PC) i Polyhomeòtic (PH) (Negre et al. 2006). Això reforça la importància de la vessant activadora de la proteïna en front la seva capacitat repressora. Com que *Trl* és l'únic gen que se sap que GAGA reprimeix, serà molt interessant poder comprovar aquests 7 gens reprimits en el *microarray* per tècniques alternatives, com *Real time PCR* que confirmin que són candidats reals a ser regulats per GAGA negativament.

Observant els clústers d'agrupacions funcionals dels gens activats per la isoforma GAGA₅₁₉ (veure figura D.44) es pot veure que altera processos biològics diversos. Això ens indica un cop més, la gran plasticitat i la implicació de GAGA en l'activació d'un elevat nombre de gens. Els clústers més significatius estan relacionats amb localització, transmissió d'impulsos nerviosos i regulació de transducció de senyals mediades per GTPases. D'entre la resta de clústers no tant significatius, destacaríem com a interessants o rellevants els relacionats amb transducció de senyals, diferenciació del sistema nerviós central, diferenciació cel·lular i desenvolupament d'òrgans (veure figura D.44).

Un punt important que cal comentar és que amb la isoforma GAGA₅₈₁, els gens diferencialment expressats són molt pocs. Les immunolocalitzacions i les RT-PCR indiquen una bona sobreexpressió de la proteïna i de l'mRNA, tot i així, en el *microarray*, els gens activats són només 5 i els reprimits 13 (veure figura D.45). La informació que tenim dels 5 gens activats per GAGA₅₈₁, a la descripció de cada un d'ells, es pot veure que estan relacionats amb secreció de neurotransmissors i transducció de senyals i la resta tenen activitat transportadora d'electrons. Tot i tenir tan pocs gens activats, aquestes funcions dels gens activats amb GAGA₅₈₁, també les

Discussió

trobem entre les funcions associades a la sobreexpressió de GAGA₅₁₉. De manera que les dues isoformes comparteixen funcions similars, encara que una sigui molt més potent que l'altra.

Experiments realitzats en el nostre laboratori, on s'ha sobreexpressat la isoforma GAGA₅₈₁ a mosca amb diferents drivers, indiquen que genera fenotips similars als que s'obtenen amb la isoforma GAGA₅₁₉, però amb molta menor penetrància. Els efectes fenotípics fruit de la sobreexpressió de GAGA₅₈₁ són sempre més febles que els de GAGA₅₁₉, essent la sobreexpressió de GAGA₅₈₁ menys deletèria i millor tolerada. D'això, la conclusió que es pot extreure és que sembla que GAGA₅₈₁ és molt menys activa que GAGA₅₁₉, tal i com ja s'havia observat quan es va analitzar la capacitat de cada isoforma a l'hora de rescatar els fenotips dels mutants de *Trl* (Greenberg et al. 2001). També podria ser que les dues proteïnes tinguessin un paper diferencial a diferents etapes del desenvolupament i que GAGA₅₈₁ no tingués un paper definit a nivell larvari. Una altra possible hipòtesi per explicar els efectes més dèbils de GAGA₅₈₁ seria que la seva vida mitjana fos sensiblement més curta que GAGA₅₁₉ i es degradés més ràpidament de manera que no fos possible veure els seus efectes. Per poder comprovar aquesta hipòtesi en la diferència de vida mitja entre les dues isoformes, en el nostre grup, el Dr. Martí Badal va realitzar experiments de FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*) sobre diferents línies de cèl·lules S2 transfectades establement que sobreexpressaven les isoformes GAGA₅₈₁ i GAGA₅₁₉, fusionades a una proteïna GFP fotoactivable a cèl·lules S2. Aquests experiments de FRAP suggereixen que la isoforma GAGA₅₈₁ té una vida mitjana sensiblement més curta que GAGA₅₁₉, que presenta una vida mitjana sorprenentment llarga per ser un factor de transcripció (resultats no publicats). GAGA₅₈₁, al presentar una menor vida mitjana, tindria menys temps a l'hora de poder realitzar les diferents funcions i es degradaria molt abans que GAGA₅₁₉ que seria més potent perquè els seus efectes podrien donar-se a més llarg termini.

Entre els gens diferencialment expressats en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ trobem, com era d'esperar, *Trl* que està activat degut a la sobreexpressió de GAGA. De les quatre sondes que hi ha dissenyades per detectar *Trl* en el Chip d'*Affymetrix*, només veiem incrementada l'expressió de l'RNA amb la sonda 1629754_S_AT, que és la única que cau dins la regió codificant de GAGA₅₁₉. La resta de sondes dissenyades per la detecció de *Trl* es localitzen en zones no traduïdes, 3' UTR. En el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁ no podem detectar, de cap manera, la sobreexpressió de *Trl*, degut a la sobreexpressió perquè la única sonda que cau dins la regió codificant coincideix amb un intró de la isoforma GAGA₅₈₁ i nosaltres hem sobreexpressat la seqüència codificant sense introns. En el cas de GAGA₅₈₁, la resta de sondes també cauen en regions no traduïdes de la proteïna, 3' i 5' UTR. Estem segurs que hi ha hagut sobreexpressió de *Trl* perquè en les RT-PCR que hem realitzat sobre les mostres

d'RNA dels *microarrays* de GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁ amb encebadors específics per cada isoforma, indiquen clarament la sobreexpressió en els dos casos (veure figura D.37).

En les sondes on no podem detectar el transgen sobreexpressat ectòpicament, es podria detectar una davallada dels nivells endògens de *Trl* degut a l'autorepressió de GAGA. Cal esmentar que entre les sondes de l'*array* per detectar *Trl*, la sonda 163505_at hibrida amb una zona 3'UTR comuna a les dues isoformes i es detecta una repressió de *Trl* de 1,7 cops. La repressió observada amb aquesta sonda té un nivell de significació molt baix (probDE: 0,48), però s'hauria de recomprovar la davallada de *Trl* endogen per *Real-time* PCR ja que ens corroboraria l'efecte repressor de GAGA, in vivo, sobre el seu propi gen.

Respecte el *microarray* de falta de funció, els gens que estan diferencialment expressats també són sorprenentment pocs. En aquest experiment d'RNAi els gens que s'activen són només 25 i els que es reprimeixen 29 (veure figura D.46). El nombre de gens afectats esperaríem que fos molt més elevat que l'obtingut amb els *microarrays* de sobreexpressió perquè, en aquest cas, el temps d'expressió del *hairpin* d'RNAi és molt superior a les només 13 hores d'inducció de la sobreexpressió i podrien aparèixer més gens afectats indirectament a resultes de la llargada del tractament. Els *western blots* realitzats sobre els discos imaginals indiquen que els nivells de proteïna es redueixen en un 50% aproximadament i les RT-PCRs indiquen una disminució similar dels nivells d'RNA (veure figures D39 i D40). Amb aquests nivells de reducció del 50% de proteïna aconseguim tenir pocs gens diferencialment expressats. Això indica que segurament la reducció dels nivells de proteïna a la meitat no són suficients per alterar els nivells d'expressió de la majoria de gens regulats per GAGA. Inicialment, per posar a punt el sistema de falta de funció, vam estar fent proves sense el sistema induïble amb el *driver Actina-GAL4* i en aquest cas, es produïa una baixada massa forta que generava una gran letalitat a nivell larvari que dificultava molt la obtenció de larves que arribessin al tercer estadi. L'avantatge que vam trobar en utilitzar el *driver 69B-GAL4* és que comença la seva expressió més tard que el *driver d'Actina* i que ens permetia tenir individus de l'estadi desitjat. El més complicat del cas era poder trobar un equilibri entre una baixada suficient de proteïna i tenir individus que arribessin a larva 3 i que no morissin aviat, degut a una reducció massa forta de la proteïna. En un futur, veient que reduccions de la proteïna a la meitat ens donen una informació limitada en els *microarrays*, es podria plantejar repetir els *microarrays* de falta de funció intentant forçar les condicions de reducció de la proteïna. Caldria intentar reduir més els nivells de GAGA però evitant la mort dels individus. Hi hauria diverses estratègies per poder forçar la reducció dels nivells de GAGA, una d'elles seria posar els creuaments a 29°C, enlloc de tenir-los a 25°C, els efectes de l'RNAi s'intensificarien i la baixada seria major. Una altra manera d'incrementar més la baixada de proteïna seria el fet de coexpressar *dicer2* junt amb el *hairpin* de GAGA per obtenir una major la reducció dels nivells de proteïna.

Discussió

Fent una observació global dels resultats dels *microarrays* cal destacar que ens ha sobtat que, ni en el llistat de gens activats per GAGA en el *microarray* de sobreexpressió, ni en els gens reprimits en el *microarray* de falta de funció hem trobat cap gen alterat dels que se sap que estan regulats per GAGA. Com que els *microarrays* estan realitzats amb disc imaginal d'ala, d'entrada, no podem detectar l'expressió d'*Ultrabithorax*, d'*even skipped* ni de *fushi tarazu* perquè no s'expressen a disc d'ala. Es pot veure clarament que la sobreexpressió de GAGA no pot portar una l'expressió ectòpica de cap d'aquests gens que no s'expressen normalment a disc imaginal. Es reforcen així els resultats negatius obtinguts en l'apartat D.2, on la sobreexpressió de GAGA no altera el patró d'expressió ja existent d'*Ubx*, *en* i *eve* i no suposa, en cap cas, una expressió d'aquests gens en zones fora dels seus dominis a resultes de la sobreexpressió de GAGA. El gen que sí que s'expressa de forma salvatge a disc d'ala és *en*, però en els *microarrays* no trobem alterats els seus nivells d'expressió. Això ens fa pensar que a disc imaginal, GAGA, no deu tenir cap mena d'implicació en la regulació d'aquest gen tal i com ja hem comentat el l'apartat E.3 de la discussió.

Hi ha molts indicis que apunten que GAGA té un paper important en la regulació de certs gens homeòtics i gens formadors de patró en estadi embrionari però que en estadi larvari GAGA té altres funcions no relacionades amb aquests gens.

E.4.3. Creuament de dades dels *microarrays* amb dades de CHIP-on-Chip

Aprofitant les dades accessibles *on line* de dos experiments de CHIP-on-Chip de GAGA realitzats a cèl·lules S2 (Lee et al. 2008) i a embrions de 4 a 12 hores (Schuettengruber et al. 2009), hem aconseguit tenir uns llistats de gens on GAGA es troba unida al llarg del genoma (veure apartat C.4.4 de Materials i mètodes per veure els criteris d'assignació dels pics d'intensitat dels chips als gens). Aquests llistats ens han permès veure si els gens diferencialment expressats dels nostres *microarrays* poden contenir GAGA a la possible zona promotora del gen en estadi embrionari. Cal tenir present que dels dos CHIP-on-Chip que hi ha publicats no n'hi ha cap realitzat a larva sencera, ni a disc imaginal, de manera que la informació de la correlació dels nostres *microarrays* amb aquests CHIP-on-Chip només ens dóna una idea de si aquests gens podrien tenir-hi GAGA unida. Aquesta correlació no ens assegura que GAGA estigui present damunt la regió promotora d'aquests gens a nivell de disc imaginal. Es podria inferir que si el gen en qüestió presenta GAGA unida a la seva seqüència en estadi embrionari, també podria presentar GAGA en altres moments posteriors del desenvolupament. Els gens positius en el nostre *microarray* que també ho són per CHIP-on-Chip tenen una

probabilitat més elevada de poder estar realment regulats per GAGA. En el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉, dels 196 gens activats, 23 es troben exclusivament al ChIP-on-Chip d'embrions. Un d'aquests gens és *skl* que com ja hem comprovat que és positiu amb altres tècniques el podem classificar com a gen directament regulat per GAGA. (veure figures D.48, D.49 i D.50). 15 gens es troben exclusivament al ChIP-on-Chip d'S2 (Lee) i n'hi ha 29 que són comuns als dos 2 ChIP-on-Chip. Finalment, dels 7 gens que es troben reprimits en el *microarray* de sobreexpressió, 1 és positiu en el ChIP-on-Chip d'embrions i cap és positiu en el ChIP-on-Chip de cèl·lules S2 (veure taula E.1).

Nº	↑ GAGA ₅₁₉ ; ChIP on ChIP embrions	↑ GAGA ₅₁₉ ; ChIP on ChIP S2	↑ GAGA ₅₁₉ ; comuns als dos ChIP on ChIP	↓ GAGA ₅₁₉ ; ChIP on ChIP embrions	↓ GAGA ₅₁₉ ; ChIP on ChIP S2	↓ GAGA ₅₁₉ ; comuns als dos ChIP on ChIP
1	CG10433	CG10126	Ace	SoxN		
2	CG14636	CG15917	Adgf-A			
3	CG17321	CG2065	CG10512			
4	CG17928	CG30456	CG12972			
5	CG18304	CG34283	CG13397			
6	CG30195	CG5783	CG14186			
7	CG3078	CG6293	CG14227			
8	CG33120	CG8539	CG18536			
9	CG34400	CG9717	CG30497			
10	CG42260	Mmp1	CG31150			
11	CG42322	Obp56a	CG31619			
12	CG42329	PGRP-LF	CG31674			
13	CG7458	RhoGAP100F	CG32813			
14	CG7582	Sdic1	CG4267			
15	CG9813	Sp7	CG5707			
16	GluClalpha		CG6765			
17	hig		CG8147			
18	Hk		CG8303			
19	nAcRbeta-64B		CG9232			
20	SK		CG9460			
21	skl		dei			
22	Takl2		Faa			
23	Ugt36Ba		GstE3			
24			hiw			
25			ine			
26			jdp			
27			Rbp9			
28			Trl			
29			UGP			

Taula E.1. Llistat de gens activats i reprimits en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ que són positius en els ChIP-on-Chip de GAGA a S2 i a embrions. A la part superior de la figura s'indiquen els gens activats (fletxa verda ascendent), i els gens reprimits (fletxa rosa descendent). Amb un codi de colors: gens que donen positiu només en el ChIP-on-Chip d'embrions (vermell), gens presents exclusivament en el ChIP-on-Chip a cèl·lules S2 (verd), gens positius en els dos tipus de ChIP-on-Chip (blau).

Discussió

En els *microarrays* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁, dels 5 gens activats, només un es troba en el ChIP-on-Chip de cèl·lules S2 i cap d'ells es troba en el d'embrions. Dels 13 gens reprimits al sobreexpressar GAGA₅₈₁, 1 es troba exclusivament al ChIP-on-Chip d'embrions, i un altre és comú a tots 2 ChIP-on-Chip (veure figura E.2.A).

Respecte els *microarrays* de falta de funció, dels 29 gens activats, 1 gen és exclusiu del ChIP-on-Chip d'embrions, un altre és exclusiu del ChIP-on-Chip de cèl·lules S2 i 9 gens són comuns a tots dos ChIP-on-Chip. Respecte els 29 gens reprimits en l'*microarray* d'RNAi, 3 es troben exclusivament en el ChIP-on-ChIP d'embrions, 1 és positiu exclusivament en el de cèl·lules S2 i 5 d'ells són comuns a tots dos ChIP-on-Chip (veure figura E.2.B).

Aquells gens que són positius en els *microarrays* i que alhora són positius en els ChIP on ChIP tenen un valor afegit i per tant són candidats amb més probabilitats de ser gens directament regulats per GAGA.

A	Nº	↑ GAGA ₅₈₁ ; ChIP on ChIP embrions	↑ GAGA ₅₈₁ ; ChIP on ChIP S2	↑ GAGA ₅₈₁ ; comuns als dos ChIP on ChIP	↓ GAGA ₅₈₁ ; ChIP on ChIP embrions	↓ GAGA ₅₈₁ ; ChIP on ChIP S2	↓ GAGA ₅₈₁ ; comuns als dos ChIP on ChIP
	1			RhoGAP100F		CG33214	

B	Nº	↑ RNAiGAGA; ChIP on ChIP embrions	↑ RNAiGAGA; ChIP on ChIP S2	↑ RNAiGAGA; comuns als dos ChIP on ChIP	↓ RNAiGAGA; ChIP on ChIP embrions	↓ RNAiGAGA; ChIP on ChIP S2	↓ RNAiGAGA; comuns als dos ChIP on ChIP
	1	CG34104		CG6330	Caps	CG30195	CG7328
2	CG7900			Ac76E			GstE7
3	CG4562			mod(mdg4)			CG32572
4				CG32313			CG18335
5				Fili			CanA-14F
6							CG12972
7							Cyp6d4
8							GstE6
9							CG2201

Taula E.2. Llistat de gens activats i reprimits en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁ i en el *microarray* de falta de funció que són positius en els ChIP-on-Chip de GAGA a S2 i a embrions. A la part superior de la figura s'indiquen els gens activats (fletxa verda ascendent) i els gens reprimits (fletxa rosa descendent). Amb un codi de colors: gens que donen positiu només en el ChIP-on-Chip d'embrions (vermell), gens presents exclusivament en el ChIP-on-Chip a cèl·lules S2 (verd), gens positius en els dos tipus de ChIP-on-Chip (blau).

A) Llistat de gens activats i reprimits en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁ que són positius en els ChIP-on-Chip de GAGA a cèl·lules S2 i a embrions. **B)** Llistat de gens activats i reprimits en el *microarray* de falta de funció que són positius en el ChIP-on-Chip de GAGA a cèl·lules i a embrions.

E.2.4. Comparació dels *microarrays* de sobreexpressió de les dues isoformes de GAGA a disc imaginal d'ala i comparació d'aquests amb el de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ a cèl·lules S2

Hem fet una anàlisi comparativa entre els nostres *microarrays* de sobreexpressió per trobar similituds i diferències entre les dues isoformes. Ja hem comentat anteriorment que el nombre de gens activats en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ (196) és molt superior al de GAGA₅₈₁ (5) i ja s'han comentat possibles explicacions per aquesta gran diferència entre les dues isoformes. Dels 5 gens activats al *microarray* de GAGA₅₈₁, 2 d'ells també estan presents en el *microarray* de GAGA₅₁₉. Aquests gens comuns a les dues proteïnes, són gens relacionats amb secreció de neurotransmissors i transducció de senyals. No hi ha cap mena de coincidència entre els gens reprimits en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ i el realitzat a cèl·lules S2 (D. Piñeyro, Tesi Doctoral). Tampoc hi ha cap gen del *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₈₁, ni activat ni reprimat que coincideixi amb el *microarray* de S2.

Nº	↑ GAGA ₅₁₉ i ↑ GAGA ₅₁₉ S2	↑ GAGA ₅₁₉ i ↑ GAGA ₅₈₁	↓ GAGA ₅₁₉ i ↓ GAGA ₅₈₁
1	CG14227	Syt4	CG31248
2	CG14661	RhoGAP100F	CG33469
3	Obp56a		
4	CG15394		
5	CG14636		
6	Rbp9		
7	CG8539		
8	Cyp28a5		
9	Cpr51A		
10	CG9083		
11	CG9813		
12	skl		
13	Ugt36Ba		
14	CG11241		
15	CG10126		
16	Trl		

Taula E.3. Llistat de gens coincidents entre els *microarrays* de sobreexpressió de les dues isoformes de GAGA a disc imaginal d'ala i comparació d'aquests amb el de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ a cèl·lules S2 (D. Piñeyro, Tesi doctoral). A la part superior de la figura s'indiquen els gens activats (fletxa verda ascendent), i els gens reprimits (fletxa rosa descendent). Amb un codi de colors: gens que donen positiu només en el ChIP-on-Chip d'embrions (blau), gens presents exclusivament en el ChIP-on-Chip a cèl·lules S2 (verd), gens positius en els dos tipus de ChIP-on-Chip (blau) i gens no positius ChIP-on-Chip (negre). A la primera columna s'observen els gens coincidents que s'activen en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ a discos i en el *microarray* a cèl·lules S2. La segona columna són els gens comuns que s'activen en els *microarrays* de les dues isoformes a discos i la última columna mostra els gens que es reprimeixen en els *microarrays* de les dues isoformes.

Discussió

D'entre els gens activats en el *microarray* de GAGA₅₁₉ trobem el gen *skl* que també va donar positiu en el *microarray* de sobreexpressió en cèl·lules S2 i és positiu en el ChIP-on-Chip d'embrions però no així en el ChIP-on-Chip de cèl·lules S2 (veure taula E.3). A partir de discos imaginals induïts amb les mateixes condicions que el *microarray*, vam fer immunolocalitzacions amb anticossos α -GAGA i α -*skl* i vam observar que allà on hi havia sobreexpressada GAGA, apareixia també expressió de *skl* que en condicions salvatges no té cap patró d'expressió a disc d'ala (veure figura D.48). RT-PCRs realitzades sobre mostres induïdes i no induïdes indiquen, de nou, que quan GAGA no està sobreexpressada no hi ha expressió de *skl*, mentre que en situació de GAGA sobreexpressada sí que s'expressa, confirmant-se així l'observació inicial (veure figura D.49). Posteriorment, el clonatge del promotor de *skl* i els assajos de transfecció transitòria en cèl·lules S2 confirmen que el promotor s'activa de manera dosi dependent a la sobreexpressió de GAGA indicant que *skl* és un gen que es troba sota la regulació de GAGA (veure figura D.50). *skl* és un gen proapoptòtic que juntament amb *rpr*, *hid* i *grim* regula l'apoptosi inhibint *DIAP1* (*Drosophila inhibitor of apoptosis*, també conegut com *th*, *thread*) (Christich et al. 2002; Srinivasula et al. 2002; Wing et al. 2002). Sabem que la sobreexpressió de GAGA, a llarg termini, genera greus fenotips de malformació i una elevada letalitat. S'ha vist que la sobreexpressió de GAGA sota el control del driver *dpp*-GAL4 implica un procés apoptòtic que afecta alguns teixits concrets i comporta la pèrdua de les potes de la mosca que, en canvi, no afecta les ales ni els halteris, on *dpp* també s'expressa (Bernues et al. 2007).

En els nostres *microarrays* no hi ha activat cap gen relacionat amb apoptosi, a part de *skl*. Segurament amb un temps tant limitat de sobreexpressió no hi ha temps suficient perquè la via de l'apoptosi tingui lloc i per tant, l'apoptosi només apareixeria amb una sobreexpressió de GAGA a més llarg termini. GAGA activaria *skl*, que inhibiria *DIAP1*, proteïna que interacciona amb les caspases i inhibeix la seva activitat proteasa. *skl* a l'inhibir l'activitat de *DIAP1*, activaria per defecte la via de les caspases i l'entrada en apoptosi. Tanmateix, la sobreexpressió de GAGA no sempre condueix a l'apoptosi, sinó que sembla ser dependent del llinatge cel·lular.

Com a control dels efectes de la sobreexpressió de GAGA en apoptosi hem realitzat anàlisis del contingut de DNA cel·lular utilitzant tinció amb iodur de propidi sobre línies establiment transfectades que sobreexpressen GAGA (S2-GAGA) i cèl·lules control (S2 control). Aquestes anàlisis ens proporcionen informació sobre la distribució de les cèl·lules d'un cultiu en les fases del cicle cel·lular. Els resultats ens indiquen que la sobreexpressió de GAGA no implica cap canvi sobre la distribució de les diferents fases del cicle cel·lular, ni apareix cap pic que indiqui apoptosi en la línia que sobreexpressa GAGA (veure Annex H.2), malgrat que en aquestes cèl·lules l'expressió de *skl* resulta activada (David Piñeyro, Tesi doctoral). Això confirma que la simple sobreexpressió de GAGA no porta necessàriament a l'activació de l'apoptosi, i que altres mecanismes són necessaris perquè es doni. Això també ve confirmat per la falta de fenotips anormals en altres teixits on la sobreexpressió de GAGA activa *skl*, com per

exemple a ala (Bernues et al. 2007). Segurament la sobreexpressió ha de superar un llindar concret en la concentració de GAGA i donar-se en el llinatge cel·lular concret per poder activar la via de la mort cel·lular programada. De retruc cal notar que com que l'activació de *skl* no sempre resulta en apoptosi o bé en aquests llinatges cel·lulars els inhibidors dels gens proapoptòtics (*Diap1*, *Diap2*, etc) estan en un clar excès o bé es dispara algun tipus de mecanisme antiapoptòtic que no hem pogut detectar. Finalment, esmentar que *skl* és un dels gens proapoptòtics més desconeguts i del que en principi s'havia descrit una expressió molt restringida a SNC (Srinivasula et al. 2002). Recentment s'ha descrit que GAGA és necessària per a la correcta eliminació per apoptosi de les cèl·lules pigmentades de la retina de l'ull de la mosca de forma dependent de la posició (Dos-Santos et al., 2008). Aquesta implicació de GAGA en un procés apoptòtic natural es desconeix, per ara, si implica l'activació de *skl* o bé d'algun altre gen proapoptòtic però d'alguna manera els nostres resultats obren la porta a considerar aquesta possibilitat. De retruc, aquest treball ens confirma un paper de GAGA en la regulació de l'apoptosi en condicions salvatges fins ara desconegut

E.2.5. Comparativa del *microarray* de falta de funció amb els de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁ a disc imaginal d'ala i comparativa entre *microarrays* de falta de funció a discos i cèl·lules S2

Quan comparem els gens que s'activen en el *microarray* d'RNAi de GAGA de falta de funció amb els gens reprimits per la sobreexpressió de GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁, s'observa que gairebé no hi ha cap gen en comú i els pocs que es troben en comú són gens de funció desconeguda (veure taula E.4). Aquesta manca de solapament entre els gens reprimits per l'excés de GAGA i els activats per l'RNAi de GAGA pot indicar, de nou, que els nivells de depleció de proteïna no són suficients per afectar la majoria dels gens regulats per GAGA.

La comparació dels gens reprimits en els *microarrays* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁, amb els *microarrays* d'RNAi realitzats a cèl·lules S2 (D.Piñeyro, Tesi Doctoral), mostra que no hi ha cap gen en comú amb els nostres *microarrays*. Això ens pot portar a pensar que les funcions de repressió en cèl·lules S2 i en disc imaginal són totalment diferents ja que les S2 són cèl·lules embrionàries i hi hauria una especialització funcional dependent del teixit. O bé que com que les S2 són cèl·lules embrionàries en cultiu immortalitzades, es comportin de manera molt diferent a un teixit de la mosca.

↑ RNAiGAGA i ↑ RNAiGAGA S2	↑ RNAi GAGA i ↓ GAGA ₅₁₉	↑ RNAiGAGA i ↓ GAGA ₅₈₁	↓ RNAiGAGA i ↓ RNAiGAGA S2	↓ RNAiGAGA i ↑ GAGA ₅₁₉	↓ RNAiGAGA ↑ GAGA ₅₈₁
CG33469	CG33469	CG33469	CG33144	CG15236	
Ac76E		Rpt6R	CG12972	CG12972	
GC6330			CG2201	CG30195	

Taula E.4. Llistat de gens coincidents entre els *microarrays* de falta de funció (RNAi GAGA) i els de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ i GAGA₅₈₁, a discos imaginals. Comparació entre els *microarrays* de falta de funció a disc imaginal i a cèl·lules S2 (D. Piñeyro, Tesi Doctoral). A la part superior de la figura s'indiquen els gens activats (fletxa verda ascendent), i els gens reprimits (fletxa rosa descendent). Amb un codi de colors : gens que donen positiu només en el ChIP-on-Chip d'embrions (blau), gens presents exclusivament en el ChIP-on-Chip a cèl·lules S2 (verd), gens positius en els dos tipus de ChIP-on-Chip (blau) i gens no positius ChIP-on-Chip (negre).

E.2.6. Funcions biològiques importants en els gens diferencialment expressats el *microarray* de falta de funció

En el *microarray* de falta de funció hi ha 25 gens que estan activats. Aquests 25 gens els hem agrupat en diferents clústers de categories funcionals i bàsicament es poden classificar en processos de localització i transport, processos multicel·lulars de l'organisme, regulació biològica i processos cel·lulars (veure figura D.47). D'entre el llistat de gens activats ens ha cridat l'atenció el gen *mod(mdg4)* que és un gen que codifica diverses isoformes de la proteïna que presenten un domini POZ amb capacitat d'unió a proteïnes i a cromatina, i igual que GAGA, també és un *enhancer* de *position effect variegation* (Gerasimova et al. 1998; Read et al. 2000). Experiments de coimmunoprecipitació a cèl·lules S2 indiquen que les dues proteïnes poden interaccionar *in vivo* i experiments de *pull down* mapen els llocs d'interacció al domini POZ i al domini Q de GAGA (Melnikova et al. 2004). A més, *mod(mdg4)* és un gen que dóna positiu tant en el ChIP-on-Chip de cèl·lules com en el d'embrions i això el fa un candidat amb elevades probabilitats d'estar directament regulat per GAGA. El que estem fent ara al laboratori és intentar comprovar aquest gen per altres tècniques alternatives al *microarray* com ara RT-PCR, *western blot*, immunolocalitzacions i immunotincions de cromosomes politènics per veure si realment *mod(mdg4)* està realment sota el control de GAGA. Tanmateix el més estrany en aquest cas és que de totes les sondes per aquest gen que hi ha al *microarray* només una va donar una clara alteració. Tenint en compte l'elevat nombre d'isoformes a que dóna lloc *mod(mdg4)* i que les diverses sondes podrien en principi discriminar entre algunes d'elles podríem estar davant una activació selectiva potser deguda a algun promotor críptic.

En el *microarray* de falta de funció trobem 29 gens reprimits. El programa DAVID ens classifica quatre d'aquests gens dins la categoria funcional oxidació-reducció. Mirant la resta de gens dels que no es coneix encara la funció biològica però se'n coneix la funció molecular, hem trobat que hi ha 2 gens, *GstE7* i *GstE6*, que també es troben reprimits i que poden també tenir relació amb processos d'oxidació-reducció perquè són gens que per similitud de seqüència se'ls ha atribuït la funció molecular de Glutatió S transferasa (veure taula D.14). A més, tant *GstE7* com *GstE6* són positius en els dos CHIP-on-Chip junt amb 2 gens més relacionats amb oxidació-reducció (*Cyp6d4* i *CanA-14F*) (veure taula E.2). A la taula E.4 hi ha la relació de gens coincidents entre els microarrays de RNAi (falta de funció) i la resta de microarrays i es pot veure que *GstE7* es positiu en el *microarray* de sobreexpressió de GAGA a S2. Cal tenir present també que *GstE6* i *GstE7* formen part d'una família de gens, els *GstE*, que s'agrupen en el genoma en forma de clúster. El curiós del cas, és que només 2 dels 10 gens *GstE* es veuen afectats per la reducció dels nivells de GAGA i tot i que gairebé tots els gens del clúster són positius en els dos CHIP-on-Chip (veure figura E.7).

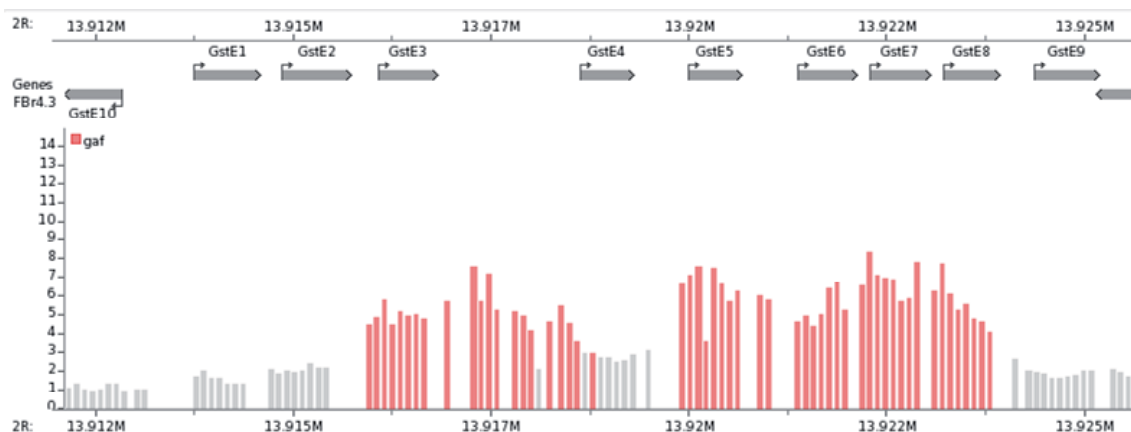


Figura E.7. Representació de la situació en el genoma del clúster de la família de gens *GstE*. Perfil obtingut en el CHIP-on-Chip de GAGA sobre aquesta regió gènica en embrions de 4 a 12 hores (Schuettengruber et al. 2009).

Les glutatió S transferases (*GST*) formen una família d'enzims que tenen gran importància en els mecanismes de desintoxicació cel·lular, eliminant xenobiòtics o substàncies nocives per les cèl·lules. Catalitzen la conjugació del glutatió reduït a centres electrofílics i lipofílics en una àmplia varietat de substrats. El fet que GAGA pugui estar relacionada amb processos d'oxidació-reducció ens porta a pensar que GAGA el que podria estar fent és activant les glutatió transferases que permeten la detoxificació cel·lular i així evitar que es donin fenòmens d'estrés oxidatiu a la cèl·lula. Cal destacar que les mosques que expressen l'RNAi de GAGA amb el driver *ptc-GAL4*, presenten problemes de creixement entre les venes 3 i 4 on hi ha el domini d'expressió del *driver* i les mosques que expressen l'RNAi de GAGA amb el *driver* *69B-GAL4* presenten una disminució de la mida de tota l'ala (veure figura D.42). A més,

Discussió

recentment hem comprovat que la coexpressió de diverses línies independents d'RNAi de GAGA i Dicer2 amb el driver *nubbin*-GAL4 també provoca una important reducció en la mida de l'ala sense afectar el patró general que és deguda a un problema de creixement (resultats no mostrats). Tots aquests problemes de creixement podrien venir relacionats directament amb un mal funcionament de la maquinària que controla els processos oxidatius. Recentment, també hem pogut observar un fort fenotip que la interferència de GAGA amb *nubbin*GAL4 provoca a glàndula salival, i que comporta una greu desorganització de l'estructura nuclear i dels cromosomes politènics que esdevenen molt fràgils i trencadissos. Aquest fenotip podria estar associat també a alteracions en processos d'oxidació-reducció (resultats no publicats). Si GAGA no pot activar les glutatió transferases, hi hauria acumulació de radicals lliures i productes tòxics i a més si la cadena oxidativa no funciona correctament poden haver-hi problemes amb la obtenció d'ATP que provocaria les deficiències de creixement. Ara, el que estem estudiant en el nostre laboratori és si l'addició d'un complex antioxidant a la papilla de les mosques podria recuperar al menys en part el fenotip de creixement dels fenotips observats i d'aquesta manera, poder confirmar la participació de GAGA en processos d'oxidació-reducció.

En el seu conjunt, els resultats obtinguts dels microarrays podem dir que revelen una nova faceta de GAGA en el control de gens involucrats en processos metabòlics, de neurotransmissió i transducció de senyals fins ara insospitats, i que indiquen uns papers molt diferents de GAGA a nivell d'embrió i de larva a *Drosophila*. Aquests resultats amplien encara més el ventall d'actuació de GAGA en el control i regulació de l'expressió gènica i confirmen el seu paper de gen essencial per a *Drosophila*.

F. CONCLUSIONS

1) Immunolocalitzacions en cromosomes politènics indiquen que GAGA col·localitza àmpliament amb la polimerasa II i amb TAF1, TAF3 i TAF4 del complex TFIID. GAGA, en la seva interacció amb la polimerasa II no sembla tenir preferència per cap dels 2 estats de fosforilació del CTD. La sobreexpressió de GAGA a cromosomes politènics genera cromosomes més primis i fràgils però no incrementa el nombre de *loci* ocupats per GAGA ni canvia la seva distribució, així com tampoc s'observa una major col·localització amb l'RNA polimerasa II.

2) Coimmunoprecipitacions realitzades sobreexpressant GAGA i TAF3-HA a cèl·lules S2 indiquen que GAGA pot interaccionar *in vivo* amb TAF3. Assajos de *pull down* amb GAGA i diverses deleccions de la proteïna fusionades a GST, utilitzant el fragment de TAF3 BIP2G77 que va de l'aminoàcid 757 al 1091, suggereixen que la interacció GAGA-TAF3 es pot acotar en els dominis X i DBD.

3) Coimmunoprecipitacions realitzades sobreexpressant GAGA i TAF4-HA a cèl·lules S2 i cèl·lules HeLa indiquen que GAGA pot interaccionar *in vivo* amb TAF4 i que ni el domini POZ ni el domini Q són imprescindibles perquè es doni la interacció.

4) Assajos de *pull down* amb Ttk69 i la construcció POZ Ttk69 fusionades a GST i utilitzant el fragment de TAF3 BIP2G77, suggereixen que tant la interacció amb Ttk69 com amb el domini POZ de Ttk69, poden donar-se. El fet que Ttk69 i TAF3 puguin interaccionar reafirma la hipòtesi en que Ttk69 podria interaccionar amb TAF3, segrestant i/o bloquejant la maquinària general resultant, en darrera instància, en una abolició de l'activació.

5) Assajos de transfecció transitòria en cèl·lules S2 sobreexpressant quantitats constants de GAGA i quantitats creixents de TAF3-HA o TAF4-HA no permeten veure cap efecte coactivador dels TAF_s sobre GAGA, en els promotors assajats *even-skipped stripe 2* i *sickle*.

6) S'han identificat dos motius del tipus LxxLL al domini POZ de GAGA, motiu descrit com a possible motiu d'interacció de factors de transcripció amb TAF4 a insectes a partir de la identificació de motius similars d'interacció amb TAF4 humà. Mitjançant assajos de transfecció transitòria s'ha comprovat que mutants de residus no essencials en el motiu LxxLL no afecten la capacitat activadora ni repressora de GAGA. L'expressió d'aquests residus no essencials indica uns nivells de proteïna equiparables als que s'obtenen sobreexpressant la proteïna salvatge. Per contra, qualsevol mutació en la leucina essencial L87, (L87E, L87A, L87I i L87D), genera una proteïna GAGA defectiva en activació i totalment funcional en repressió. Al transfectar aquests mutants, es detecta GAGA en menor quantitat que al sobreexpressar GAGA salvatge. Paral·lelament, en un sistema heteròleg s'ha vist que tot i que el mutant L87D sí que presenta nivells de proteïna similars als de la proteïna salvatge, tampoc és capaç d'activar correctament suggerint que a cèl·lules S2 la proteïna podria ser detectada com a defectiva en activació i per

Conclusions

tant, ser degradada ràpidament. No es pot descartar que la manca d'activació sigui deguda a una desestabilització del domini POZ. El que sí que es pot afirmar és que els residu L87 és un residu important per la capacitat activadora de GAGA.

7) La sobreexpressió de GAGA a embrions i discos imaginals de larves en tercer estadi no altera els patrons d'expressió d'*Ultrabithorax*, *engrailed* i *even-skipped*. La sobreexpressió no és capaç d'obrir finestres d'expressió per aquests gens en teixits on normalment no s'expressen, indicant que GAGA no és el seu regulador principal. La depleció de GAGA a disc imaginal tampoc afecta l'expressió d'*engrailed* i *Ultrabithorax*, gens que es veuen alterats a nivell embrionari en mutants genètics de *Trl*. El fet que ni la sobreexpressió ni la depleció de GAGA a disc imaginal alterin cap d'aquests gens que se sap que GAGA controla a nivell embrionari, suggereix que GAGA deu ser important per la regulació d'aquests a nivell embrionari, però no a nivell larvari.

8) Assajos de *microarrays* de sobreexpressió i de falta de funció de GAGA a disc imaginal de larva 3 corroboren que GAGA és una proteïna clarament activadora. A més, els nostres resultats obren la possibilitat de que GAGA, a nivell larvari, estigui implicada en multitud de processos diferents dels que es donen a nivell embrionari. La sobreexpressió de la isoforma GAGA₅₈₁ genera molt pocs gens diferencialment expressats suggerint, o bé que és una forma menys activa que la isoforma GAGA₅₁₉, tal i com està descrit a la bibliografia, o bé que és una forma amb una vida mitjana més curta que impedeix veure efectes de la seva sobreexpressió a curt termini. S'ha corroborat que GAGA pot activar *sickle*, un gen pro-apoptòtic, que podria estar relacionat amb certs fenotips de letalitat a llarg termini derivats de la sobreexpressió de GAGA.

9) Els resultats dels *microarrays* de falta de funció indiquen que els gens *Gst-E6* i *GstE7*, positius en ChIP-on-Chip de GAGA a cèl·lules S2 i a embrions, estan reprimits. El fet que GAGA pugui controlar l'expressió d'aquests dos gens del tipus Gst-E i d'altres implicats en processos d'oxidació-reducció, suggereix que els fenotips de problemes de creixement en la reducció de la mida de les ales al disminuir els nivells endògens de GAGA podrien donar-se per una manca de funcionament de les proteïnes Gst-E. Això comportaria alteracions en el procés de detoxificació cel·lular que crearia problemes d'estrés oxidatiu i generaria els problemes de creixement.

10) Els resultats derivats de l'anàlisi dels *microarrays* en el seu conjunt suggereixen una implicació de GAGA en el control de processos com ara la localització cel·lular, la transmissió de l'impuls nerviós o la transducció de senyals, entre d'altres, que, pendents de confirmació, ampliarien encara més el ventall de les múltiples funcions ja conegudes del factor GAGA, que es confirma com un factor activador de la transcripció de múltiples gens a *Drosophila*.

F. BIBLIOGRAFIA

- Aasland, R., T. J. Gibson, et al. (1995). "The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation." Trends Biochem Sci **20**(2): 56-9.
- Adelman, K., M. T. Marr, et al. (2005). "Efficient release from promoter-proximal stall sites requires transcript cleavage factor TFIIIS." Mol Cell **17**(1): 103-12.
- Agianian, B., K. Leonard, et al. (1999). "The glutamine-rich domain of the Drosophila GAGA factor is necessary for amyloid fibre formation in vitro, but not for chromatin remodelling." J Mol Biol **285**(2): 527-44.
- Albagli, O., P. Dhordain, et al. (1995). "The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins." Cell Growth Differ **6**(9): 1193-8.
- Albright, S. R. and R. Tjian (2000). "TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas." Gene **242**(1-2): 1-13.
- Andel, F., 3rd, A. G. Ladurner, et al. (1999). "Three-dimensional structure of the human TFIID-IIA-IIB complex." Science **286**(5447): 2153-6.
- Anish, R., M. B. Hossain, et al. (2009). "Characterization of transcription from TATA-less promoters: identification of a new core promoter element XCPE2 and analysis of factor requirements." PLoS One **4**(4): e5103.
- Aravind, L. and D. Landsman (1998). "AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins." Nucleic Acids Res **26**(19): 4413-21.
- Arents, G., R. W. Burlingame, et al. (1991). "The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10148-52.
- Badenhorst, P., J. T. Finch, et al. (2002). "Tramtrack co-operates to prevent inappropriate neural development in Drosophila." Mech Dev **117**(1-2): 87-101.
- Bardwell, V. J. and R. Treisman (1994). "The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif." Genes Dev **8**(14): 1664-77.
- Bejarano, F. and A. Busturia (2004). "Function of the Trithorax-like gene during Drosophila development." Dev Biol **268**(2): 327-41.
- Belozerov, V. E., P. Majumder, et al. (2003). "A novel boundary element may facilitate independent gene regulation in the Antennapedia complex of Drosophila." EMBO J **22**(12): 3113-21.
- Benyajati, C., L. Mueller, et al. (1997). "Multiple isoforms of GAGA factor, a critical component of chromatin structure." Nucleic Acids Res **25**(16): 3345-53.
- Bereczki, O., Z. Ujfaludi, et al. (2008). "TATA binding protein associated factor 3 (TAF3) interacts with p53 and inhibits its function." BMC Mol Biol **9**: 57.
- Berk, A. J. (2000). "TBP-like factors come into focus." Cell **103**(1): 5-8.
- Bernues, J., D. Pineyro, et al. (2007). "General, negative feedback mechanism for regulation of Trithorax-like gene expression in vivo: new roles for GAGA factor in flies." Nucleic Acids Res **35**(21): 7150-9.
- Beverly, S. M. and A. C. Wilson (1984). "Molecular evolution in Drosophila and the higher Diptera II. A time scale for fly evolution." J Mol Evol **21**(1): 1-13.
- Bevilacqua, A., M. T. Fiorenza, et al. (2000). "A developmentally regulated GAGA box-binding factor and Sp1 are required for transcription of the hsp70.1 gene at the onset of mouse zygotic genome activation." Development **127**(7): 1541-51.
- Bhat, K. M., G. Farkas, et al. (1996). "The GAGA factor is required in the early Drosophila embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division." Development **122**(4): 1113-24.
- Biggin, M. D. and R. Tjian (1988). "Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts." Cell **53**(5): 699-711.
- Bonet, C., I. Fernandez, et al. (2005). "The GAGA protein of Drosophila is phosphorylated by CK2." J Mol Biol **351**(3): 562-72.
- Bouazoune, K. and A. Brehm (2006). "ATP-dependent chromatin remodeling complexes in Drosophila." Chromosome Res **14**(4): 433-49.
- Brand, M., C. Leurent, et al. (1999). "Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFTC." Science **286**(5447): 2151-3.

Bibliografia

- Brown, C. E., T. Lechner, et al. (2000). "The many HATs of transcription coactivators." *Trends Biochem Sci* **25**(1): 15-9.
- Brunkhorst, A., M. Karlen, et al. (2005). "A specific role for the TFIID subunit TAF4 and RanBPM in neural progenitor differentiation." *Mol Cell Neurosci* **29**(2): 250-8.
- Buratowski, S., S. Hahn, et al. (1989). "Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II." *Cell* **56**(4): 549-61.
- Buratowski, S., S. Hahn, et al. (1988). "Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system." *Nature* **334**(6177): 37-42.
- Burke, T. W. and J. T. Kadonaga (1996). "Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters." *Genes Dev* **10**(6): 711-24.
- Burke, T. W. and J. T. Kadonaga (1997). "The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila." *Genes Dev* **11**(22): 3020-31.
- Burley, S. K. (1996). "The TATA box binding protein." *Curr Opin Struct Biol* **6**(1): 69-75.
- Burley, S. K. and R. G. Roeder (1996). "Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID)." *Annu Rev Biochem* **65**: 769-99.
- Bushnell, D. A., K. D. Westover, et al. (2004). "Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Angstroms." *Science* **303**(5660): 983-8.
- Busturia, A., A. Lloyd, et al. (2001). "The MCP silencer of the Drosophila Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression." *Development* **128**(11): 2163-73.
- Canudas, S., S. Perez, et al. (2005). "dSAP18 and dHDAC1 contribute to the functional regulation of the Drosophila Fab-7 element." *Nucleic Acids Res* **33**(15): 4857-64.
- Coin, F., L. Proietti De Santis, et al. (2006). "p8/TTD-A as a repair-specific TFIIF subunit." *Mol Cell* **21**(2): 215-26.
- Comer, F. I. and G. W. Hart (2001). "Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II." *Biochemistry* **40**(26): 7845-52.
- Conaway, R. C. and J. W. Conaway (1989). "An RNA polymerase II transcription factor has an associated DNA-dependent ATPase (dATPase) activity strongly stimulated by the TATA region of promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(19): 7356-60.
- Cramer, P. (2004). "RNA polymerase II structure: from core to functional complexes." *Curr Opin Genet Dev* **14**(2): 218-26.
- Cramer, P., K. J. Armache, et al. (2008). "Structure of eukaryotic RNA polymerases." *Annu Rev Biophys* **37**: 337-52.
- Croston, G. E., L. A. Kerrigan, et al. (1991). "Sequence-specific antirepression of histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription." *Science* **251**(4994): 643-9.
- Croston, G. E., P. J. Laybourn, et al. (1992). "Mechanism of transcriptional antirepression by GAL4-VP16." *Genes Dev* **6**(12A): 2270-81.
- Crowley, T. E., T. Hoey, et al. (1993). "A new factor related to TATA-binding protein has highly restricted expression patterns in Drosophila." *Nature* **361**(6412): 557-61.
- Chalkley, G. E. and C. P. Verrijzer (1999). "DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator." *EMBO J* **18**(17): 4835-45.
- Chiang, C. M. and R. G. Roeder (1995). "Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators." *Science* **267**(5197): 531-6.
- Chicca, J. J., 2nd, D. T. Auble, et al. (1998). "Cloning and biochemical characterization of TAF-172, a human homolog of yeast Mot1." *Mol Cell Biol* **18**(3): 1701-10.
- Chinwalla, V., E. P. Jane, et al. (1995). "The Drosophila trithorax protein binds to specific chromosomal sites and is co-localized with Polycomb at many sites." *EMBO J* **14**(9): 2056-65.
- Cho, E. J., M. S. Kobor, et al. (2001). "Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain." *Genes Dev* **15**(24): 3319-29.

- Chopra, V. S., A. Srinivasan, et al. (2008). "Transcriptional activation by GAGA factor is through its direct interaction with dmTAF3." *Dev Biol* **317**(2): 660-70.
- Christich, A., S. Kauppila, et al. (2002). "The damage-responsive Drosophila gene sickle encodes a novel IAP binding protein similar to but distinct from reaper, grim, and hid." *Curr Biol* **12**(2): 137-40.
- Chung, Y. T. and E. B. Keller (1990). "Regulatory elements mediating transcription from the Drosophila melanogaster actin 5C proximal promoter." *Mol Cell Biol* **10**(1): 206-16.
- Dahmus, M. E. (1996). "Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II." *J Biol Chem* **271**(32): 19009-12.
- Dantonel, J. C., J. M. Wurtz, et al. (1999). "The TBP-like factor: an alternative transcription factor in metazoa?" *Trends Biochem Sci* **24**(9): 335-9.
- Davidson, I., D. Kobi, et al. (2005). "New insights into TAFs as regulators of cell cycle and signaling pathways." *Cell Cycle* **4**(11): 1486-90.
- Deng, W. and S. G. Roberts (2005). "A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB." *Genes Dev* **19**(20): 2418-23.
- Deng, W. and S. G. Roberts (2007). "TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II." *Chromosoma* **116**(5): 417-29.
- Deuring, R., L. Fantì, et al. (2000). "The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo." *Mol Cell* **5**(2): 355-65.
- Dhanasekaran, M., S. Negi, et al. (2007). "DNA-Binding ability of GAGA zinc finger depends on the nature of amino acids present in the beta-hairpin." *Biochemistry* **46**(25): 7506-13.
- Dikstein, R., S. Zhou, et al. (1996). "Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130." *Cell* **87**(1): 137-46.
- Dingwall, C. and R. A. Laskey (1991). "Nuclear targeting sequences--a consensus?" *Trends Biochem Sci* **16**(12): 478-81.
- Drapkin, R., J. T. Reardon, et al. (1994). "Dual role of TFIIF in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II." *Nature* **368**(6473): 769-72.
- Dvir, A., K. P. Garrett, et al. (1996). "A role for ATP and TFIIF in activation of the RNA polymerase II preinitiation complex prior to transcription initiation." *J Biol Chem* **271**(13): 7245-8.
- Dynlacht, B. D., T. Hoey, et al. (1991). "Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation." *Cell* **66**(3): 563-76.
- Ebert, A., G. Schotta, et al. (2004). "Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in Drosophila." *Genes Dev* **18**(23): 2973-83.
- Ebright, R. H. (2000). "RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II." *J Mol Biol* **304**(5): 687-98.
- Espinosa, M. L., S. Canudas, et al. (2000). "The GAGA factor of Drosophila interacts with SAP18, a Sin3-associated polypeptide." *EMBO Rep* **1**(3): 253-9.
- Espinosa, M. L., E. Jimenez-Garcia, et al. (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**(23): 16461-9.
- Fadloun, A., D. Kobi, et al. (2007). "The TFIID subunit TAF4 regulates keratinocyte proliferation and has cell-autonomous and non-cell-autonomous tumour suppressor activity in mouse epidermis." *Development* **134**(16): 2947-58.
- Fairley, J. A., R. Evans, et al. (2002). "Core promoter-dependent TFIIB conformation and a role for TFIIB conformation in transcription start site selection." *Mol Cell Biol* **22**(19): 6697-705.
- Falender, A. E., R. N. Freiman, et al. (2005). "Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID." *Genes Dev* **19**(7): 794-803.
- Falender, A. E., M. Shimada, et al. (2005). "TAF4b, a TBP associated factor, is required for oocyte development and function." *Dev Biol* **288**(2): 405-19.
- Farkas, G., J. Gausz, et al. (1994). "The Trithorax-like gene encodes the Drosophila GAGA factor." *Nature* **371**(6500): 806-8.

Bibliografia

- Faucheux, M., J. Y. Roignant, et al. (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**(4): 1181-95.
- Felinski, E. A. and P. G. Quinn (1999). "The CREB constitutive activation domain interacts with TATA-binding protein-associated factor 110 (TAF110) through specific hydrophobic residues in one of the three subdomains required for both activation and TAF110 binding." *J Biol Chem* **274**(17): 11672-8.
- Ferreri, K., G. Gill, et al. (1994). "The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1210-3.
- Fire, A., M. Samuels, et al. (1984). "Interactions between RNA polymerase II, factors, and template leading to accurate transcription." *J Biol Chem* **259**(4): 2509-16.
- Fischle, W., Y. Wang, et al. (2003). "Histone and chromatin cross-talk." *Curr Opin Cell Biol* **15**(2): 172-83.
- Flores, O., H. Lu, et al. (1991). "The small subunit of transcription factor IIF recruits RNA polymerase II into the preinitiation complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 9999-10003.
- Fondell, J. D., M. Guermah, et al. (1999). "Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive cofactors mediate thyroid hormone receptor function in the absence of the TATA box-binding protein-associated factors of TFIID." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 1959-64.
- Francis, N. J. and R. E. Kingston (2001). "Mechanisms of transcriptional memory." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(6): 409-21.
- Freiman, R. N., S. R. Albright, et al. (2001). "Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development." *Science* **293**(5537): 2084-7.
- Freire-Picos, M. A., S. Krishnamurthy, et al. (2005). "Evidence that the Tfg1/Tfg2 dimer interface of TFIIF lies near the active center of the RNA polymerase II initiation complex." *Nucleic Acids Res* **33**(16): 5045-52.
- Frustaci, J. M., I. Sangwan, et al. (1995). "gsa1 is a universal tetrapyrrole synthesis gene in soybean and is regulated by a GAGA element." *J Biol Chem* **270**(13): 7387-93.
- Gangloff, Y. G., J. C. Pointud, et al. (2001). "The TFIID components human TAF(II)140 and Drosophila BIP2 (TAF(II)155) are novel metazoan homologues of yeast TAF(II)47 containing a histone fold and a PHD finger." *Mol Cell Biol* **21**(15): 5109-21.
- Gangloff, Y. G., S. Werten, et al. (2000). "The human TFIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form histone-like pairs." *Mol Cell Biol* **20**(1): 340-51.
- Geiger, J. H., S. Hahn, et al. (1996). "Crystal structure of the yeast TFIIA/TBP/DNA complex." *Science* **272**(5263): 830-6.
- Gerasimova, T. I. and V. G. Corces (1998). "Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator." *Cell* **92**(4): 511-21.
- Ghazy, M. A., S. A. Brodie, et al. (2004). "Amino acid substitutions in yeast TFIIF confer upstream shifts in transcription initiation and altered interaction with RNA polymerase II." *Mol Cell Biol* **24**(24): 10975-85.
- Giglia-Mari, G., F. Coin, et al. (2004). "A new, tenth subunit of TFIIF is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A." *Nat Genet* **36**(7): 714-9.
- Gilmour, D. S. and J. T. Lis (1986). "RNA polymerase II interacts with the promoter region of the noninduced hsp70 gene in Drosophila melanogaster cells." *Mol Cell Biol* **6**(11): 3984-9.
- Gilmour, D. S., G. H. Thomas, et al. (1989). "Drosophila nuclear proteins bind to regions of alternating C and T residues in gene promoters." *Science* **245**(4925): 1487-90.
- Gill, G., E. Pascal, et al. (1994). "A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(1): 192-6.
- Giot, L., J. S. Bader, et al. (2003). "A protein interaction map of Drosophila melanogaster." *Science* **302**(5651): 1727-36.

- Godt, D., J. L. Couderc, et al. (1993). "Pattern formation in the limbs of *Drosophila*: bric a brac is expressed in both a gradient and a wave-like pattern and is required for specification and proper segmentation of the tarsus." *Development* **119**(3): 799-812.
- Goodrich, J. A. and R. Tjian (1994). "TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription." *Curr Opin Cell Biol* **6**(3): 403-9.
- Greenberg, A. J. and P. Schedl (2001). "GAGA factor isoforms have distinct but overlapping functions in vivo." *Mol Cell Biol* **21**(24): 8565-74.
- Guenther, M. G., S. S. Levine, et al. (2007). "A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells." *Cell* **130**(1): 77-88.
- Ha, I., S. Roberts, et al. (1993). "Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II." *Genes Dev* **7**(6): 1021-32.
- Hagstrom, K., M. Muller, et al. (1997). "A Polycomb and GAGA dependent silencer adjoins the Fab-7 boundary in the *Drosophila* bithorax complex." *Genetics* **146**(4): 1365-80.
- Hendrix, D. A., J. W. Hong, et al. (2008). "Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the *Drosophila* embryo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(22): 7762-7.
- Hernandez, N. (1993). "TBP, a universal eukaryotic transcription factor?" *Genes Dev* **7**(7B): 1291-308.
- Hiller, M. A., T. Y. Lin, et al. (2001). "Developmental regulation of transcription by a tissue-specific TAF homolog." *Genes Dev* **15**(8): 1021-30.
- Hodgson, J. W., B. Argiropoulos, et al. (2001). "Site-specific recognition of a 70-base-pair element containing d(GA)(n) repeats mediates bithoraxoid polycomb group response element-dependent silencing." *Mol Cell Biol* **21**(14): 4528-43.
- Hoey, T., B. D. Dynlacht, et al. (1990). "Isolation and characterization of the *Drosophila* gene encoding the TATA box binding protein, TFIID." *Cell* **61**(7): 1179-86.
- Hoey, T., R. O. Weinzierl, et al. (1993). "Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators." *Cell* **72**(2): 247-60.
- Holstege, F. C., P. C. van der Vliet, et al. (1996). "Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH." *EMBO J* **15**(7): 1666-77.
- Horard, B., C. Tatout, et al. (2000). "Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor." *Mol Cell Biol* **20**(9): 3187-97.
- Imbalzano, A. N., K. S. Zaret, et al. (1994). "Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA." *J Biol Chem* **269**(11): 8280-6.
- Jackson, S. P. and R. Tjian (1988). "O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation." *Cell* **55**(1): 125-33.
- Johnson, K. M. and M. Carey (2003). "Assembly of a mediator/TFIID/TFIIA complex bypasses the need for an activator." *Curr Biol* **13**(9): 772-7.
- Johnson, K. M., J. Wang, et al. (2002). "TFIID and human mediator coactivator complexes assemble cooperatively on promoter DNA." *Genes Dev* **16**(14): 1852-63.
- Johnston, L. A. and G. Schubiger (1996). "Ectopic expression of wingless in imaginal discs interferes with decapentaplegic expression and alters cell determination." *Development* **122**(11): 3519-29.
- Juven-Gershon, T., J. Y. Hsu, et al. (2008). "The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription." *Curr Opin Cell Biol* **20**(3): 253-9.
- Kaiser, K. and M. Meisterernst (1996). "The human general co-factors." *Trends Biochem Sci* **21**(9): 342-5.
- Katsani, K. R., M. A. Hajibagheri, et al. (1999). "Co-operative DNA binding by GAGA transcription factor requires the conserved BTB/POZ domain and reorganizes promoter topology." *EMBO J* **18**(3): 698-708.
- Kellum, R., J. W. Raff, et al. (1995). "Heterochromatin protein 1 distribution during development and during the cell cycle in *Drosophila* embryos." *J Cell Sci* **108** (Pt 4): 1407-18.
- Kelly, W. G., M. E. Dahmus, et al. (1993). "RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc." *J Biol Chem* **268**(14): 10416-24.

Bibliografia

- Kennison, J. A. (1995). "The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function." *Annu Rev Genet* **29**: 289-303.
- Kerrigan, L. A., G. E. Croston, et al. (1991). "Sequence-specific transcriptional antirepression of the *Drosophila* Kruppel gene by the GAGA factor." *J Biol Chem* **266**(1): 574-82.
- Kershner, E., S. Y. Wu, et al. (1998). "Immunoaffinity purification and functional characterization of human transcription factor IIF and RNA polymerase II from clonal cell lines that conditionally express epitope-tagged subunits of the multiprotein complexes." *J Biol Chem* **273**(51): 34444-53.
- Kim, M. H., J. S. Shin, et al. (2002). "Retinoic acid response element in HOXA-7 regulatory region affects the rate, not the formation of anterior boundary expression." *Int J Dev Biol* **46**(3): 325-8.
- Kim, Y. J., S. Bjorklund, et al. (1994). "A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II." *Cell* **77**(4): 599-608.
- Knoepfler, P. S. and R. N. Eisenman (1999). "Sin meets NuRD and other tails of repression." *Cell* **99**(5): 447-50.
- Koch, F., F. Jourquin, et al. (2008). "Genome-wide RNA polymerase II: not genes only!" *Trends Biochem Sci* **33**(6): 265-73.
- Kokubo, T., D. W. Gong, et al. (1993). "*Drosophila* 230-kD TFIID subunit, a functional homolog of the human cell cycle gene product, negatively regulates DNA binding of the TATA box-binding subunit of TFIID." *Genes Dev* **7**(6): 1033-46.
- Kokubo, T., M. J. Swanson, et al. (1998). "The yeast TAF145 inhibitory domain and TFIIA competitively bind to TATA-binding protein." *Mol Cell Biol* **18**(2): 1003-12.
- Kosoy, A., S. Pagans, et al. (2002). "GAGA factor down-regulates its own promoter." *J Biol Chem* **277**(44): 42280-8.
- Kress, H. (1993). "The salivary gland chromosomes of *Drosophila virilis*: a cytological map, pattern of transcription and aspects of chromosome evolution." *Chromosoma* **102**(10): 734-42.
- Kuldell, N. H. and S. Buratowski (1997). "Genetic analysis of the large subunit of yeast transcription factor IIE reveals two regions with distinct functions." *Mol Cell Biol* **17**(9): 5288-98.
- Kutach, A. K. and J. T. Kadonaga (2000). "The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters." *Mol Cell Biol* **20**(13): 4754-64.
- Lagrange, T., A. N. Kapanidis, et al. (1998). "New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB." *Genes Dev* **12**(1): 34-44.
- Lagrange, T., T. K. Kim, et al. (1996). "High-resolution mapping of nucleoprotein complexes by site-specific protein-DNA photocrosslinking: organization of the human TBP-TFIIA-TFIIB-DNA quaternary complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 10620-5.
- Langelier, M. F., D. Forget, et al. (2001). "Structural and functional interactions of transcription factor (TF) IIA with TFIIE and TFIIF in transcription initiation by RNA polymerase II." *J Biol Chem* **276**(42): 38652-7.
- Lavigne, A. C., G. Mengus, et al. (1996). "Multiple interactions between hTAFII55 and other TFIID subunits. Requirements for the formation of stable ternary complexes between hTAFII55 and the TATA-binding protein." *J Biol Chem* **271**(33): 19774-80.
- Lee, C., X. Li, et al. (2008). "NELF and GAGA factor are linked to promoter-proximal pausing at many genes in *Drosophila*." *Mol Cell Biol* **28**(10): 3290-300.
- Lee, D. H., N. Gershenzon, et al. (2005). "Functional characterization of core promoter elements: the downstream core element is recognized by TAF1." *Mol Cell Biol* **25**(21): 9674-86.
- Lee, D. K., J. DeJong, et al. (1992). "TFIIA induces conformational changes in TFIID via interactions with the basic repeat." *Mol Cell Biol* **12**(11): 5189-96.
- Lee, H., K. W. Kraus, et al. (1992). "DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of hsp70." *Genes Dev* **6**(2): 284-95.
- Lehmann, M. (2004). "Anything else but GAGA: a nonhistone protein complex reshapes chromatin structure." *Trends Genet* **20**(1): 15-22.
- Lehmann, M., T. Siegmund, et al. (1998). "The pipsqueak protein of *Drosophila melanogaster* binds to GAGA sequences through a novel DNA-binding domain." *J Biol Chem* **273**(43): 28504-9.

- Leurent, C., S. L. Sanders, et al. (2004). "Mapping key functional sites within yeast TFIID." *EMBO J* **23**(4): 719-27.
- Lim, C. Y., B. Santoso, et al. (2004). "The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II." *Genes Dev* **18**(13): 1606-17.
- Linder, B., R. Newman, et al. (2000). "Biochemical analyses of the AF10 protein: the extended LAP/PHD-finger mediates oligomerisation." *J Mol Biol* **299**(2): 369-78.
- Lintermann, K. G., G. E. Roth, et al. (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**(8): 447-56.
- Lu, H., O. Flores, et al. (1991). "The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10004-8.
- Lu, H., L. Zawel, et al. (1992). "Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II." *Nature* **358**(6388): 641-5.
- Lu, Q., L. L. Wallrath, et al. (1993). "(CT)_n (GA)_n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the *Drosophila* hsp26 gene." *Mol Cell Biol* **13**(5): 2802-14.
- Mahmoudi, T., K. R. Katsani, et al. (2002). "GAGA can mediate enhancer function in trans by linking two separate DNA molecules." *EMBO J* **21**(7): 1775-81.
- Maile, T., S. Kwoczyński, et al. (2004). "TAF1 activates transcription by phosphorylation of serine 33 in histone H2B." *Science* **304**(5673): 1010-4.
- Martinez-Campa, C., P. Politis, et al. (2004). "Precise nucleosome positioning and the TATA box dictate requirements for the histone H4 tail and the bromodomain factor Bdf1." *Mol Cell* **15**(1): 69-81.
- Mason, P. B., Jr. and J. T. Lis (1997). "Cooperative and competitive protein interactions at the hsp70 promoter." *J Biol Chem* **272**(52): 33227-33.
- Matharu, N. K., T. Hussain, et al. "Vertebrate homologue of *Drosophila* GAGA factor." *J Mol Biol*.
- Maxon, M. E., J. A. Goodrich, et al. (1994). "Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIID: a model for promoter clearance." *Genes Dev* **8**(5): 515-24.
- McGinnis, W. and R. Krumlauf (1992). "Homeobox genes and axial patterning." *Cell* **68**(2): 283-302.
- Melfi, R., F. Palla, et al. (2000). "Functional characterization of the enhancer blocking element of the sea urchin early histone gene cluster reveals insulator properties and three essential cis-acting sequences." *J Mol Biol* **304**(5): 753-63.
- Melnikova, L., F. Juge, et al. (2004). "Interaction between the GAGA factor and Mod(mdg4) proteins promotes insulator bypass in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(41): 14806-11.
- Mengus, G., A. Fadloun, et al. (2005). "TAF4 inactivation in embryonic fibroblasts activates TGF beta signalling and autocrine growth." *EMBO J* **24**(15): 2753-67.
- Mengus, G., M. May, et al. (1997). "Human TAF(II)135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells." *Genes Dev* **11**(11): 1381-95.
- Mihaly, J., I. Hogga, et al. (1998). "Chromatin domain boundaries in the Bithorax complex." *Cell Mol Life Sci* **54**(1): 60-70.
- Mishra, K., V. S. Chopra, et al. (2003). "Trl-GAGA directly interacts with lola like and both are part of the repressive complex of Polycomb group of genes." *Mech Dev* **120**(6): 681-9.
- Mishra, R. K., J. Mihaly, et al. (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**(4): 1311-8.
- Mizzen, C. A., X. J. Yang, et al. (1996). "The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity." *Cell* **87**(7): 1261-70.
- Muse, G. W., D. A. Gilchrist, et al. (2007). "RNA polymerase is poised for activation across the genome." *Nat Genet* **39**(12): 1507-11.
- Naar, A. M., B. D. Lemon, et al. (2001). "Transcriptional coactivator complexes." *Annu Rev Biochem* **70**: 475-501.

Bibliografia

- Nakayama, T., K. Nishioka, et al. (2007). "Drosophila GAGA factor directs histone H3.3 replacement that prevents the heterochromatin spreading." *Genes Dev* **21**(5): 552-61.
- Narlikar, G. J., H. Y. Fan, et al. (2002). "Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription." *Cell* **108**(4): 475-87.
- Negre, N., J. Hennetin, et al. (2006). "Chromosomal distribution of PcG proteins during Drosophila development." *PLoS Biol* **4**(6): e170.
- Neufeld, T. P., R. W. Carthew, et al. (1991). "Evolution of gene position: chromosomal arrangement and sequence comparison of the Drosophila melanogaster and Drosophila virilis sina and Rh4 genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10203-7.
- Nowak, S. J. and V. G. Corces (2000). "Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci." *Genes Dev* **14**(23): 3003-13.
- O'Brien, T., R. C. Wilkins, et al. (1995). "Distribution of GAGA protein on Drosophila genes in vivo." *Genes Dev* **9**(9): 1098-110.
- Oelgeschlager, T. (2002). "Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control." *J Cell Physiol* **190**(2): 160-9.
- Ohkuma, Y., S. Hashimoto, et al. (1995). "Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIE-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE-alpha." *Mol Cell Biol* **15**(9): 4856-66.
- Ohkuma, Y. and R. G. Roeder (1994). "Regulation of TFIIE ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation." *Nature* **368**(6467): 160-3.
- Ohtsuki, S. and M. Levine (1998). "GAGA mediates the enhancer blocking activity of the eve promoter in the Drosophila embryo." *Genes Dev* **12**(21): 3325-30.
- Okada, M. and S. Hirose (1998). "Chromatin remodeling mediated by Drosophila GAGA factor and ISWI activates fushi tarazu gene transcription in vitro." *Mol Cell Biol* **18**(5): 2455-61.
- Okamoto, T., S. Yamamoto, et al. (1998). "Analysis of the role of TFIIE in transcriptional regulation through structure-function studies of the TFIIEbeta subunit." *J Biol Chem* **273**(31): 19866-76.
- Omichinski, J. G., P. V. Pedone, et al. (1997). "The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode." *Nat Struct Biol* **4**(2): 122-32.
- Orphanides, G., T. Lagrange, et al. (1996). "The general transcription factors of RNA polymerase II." *Genes Dev* **10**(21): 2657-83.
- Pagans, S., M. Ortiz-Lombardia, et al. (2002). "The Drosophila transcription factor tramtrack (TTK) interacts with Trithorax-like (GAGA) and represses GAGA-mediated activation." *Nucleic Acids Res* **30**(20): 4406-13.
- Pedone, P. V., R. Ghirlando, et al. (1996). "The single Cys2-His2 zinc finger domain of the GAGA protein flanked by basic residues is sufficient for high-affinity specific DNA binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(7): 2822-6.
- Pereira, L. A., J. A. van der Knaap, et al. (2001). "TAF(II)170 interacts with the concave surface of TATA-binding protein to inhibit its DNA binding activity." *Mol Cell Biol* **21**(21): 7523-34.
- Perkins, K. K., G. M. Dailey, et al. (1988). "In vitro analysis of the Antennapedia P2 promoter: identification of a new Drosophila transcription factor." *Genes Dev* **2**(12A): 1615-26.
- Persengiev, S. P., X. Zhu, et al. (2003). "TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 14887-91.
- Peterlin, B. M. and D. H. Price (2006). "Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb." *Mol Cell* **23**(3): 297-305.
- Peterson, M. G., N. Tanese, et al. (1990). "Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein." *Science* **248**(4963): 1625-30.
- Pham, A. D., S. Muller, et al. (1999). "Mesoderm-determining transcription in Drosophila is alleviated by mutations in TAF(II)60 and TAF(II)110." *Mech Dev* **84**(1-2): 3-16.
- Pham, A. D. and F. Sauer (2000). "Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in Drosophila." *Science* **289**(5488): 2357-60.
- Pijnappel, W. P., A. Kolkman, et al. (2009). "Quantitative mass spectrometry of TATA binding protein-containing complexes and subunit phosphorylations during the cell cycle." *Proteome Sci* **7**: 46.

- Pile, L. A. and I. L. Cartwright (2000). "GAGA factor-dependent transcription and establishment of DNase hypersensitivity are independent and unrelated events in vivo." *J Biol Chem* **275**(2): 1398-404.
- Pinto, I., D. E. Ware, et al. (1992). "The yeast SUA7 gene encodes a homolog of human transcription factor TFIIB and is required for normal start site selection in vivo." *Cell* **68**(5): 977-88.
- Platero, J. S., A. K. Csink, et al. (1998). "Changes in chromosomal localization of heterochromatin-binding proteins during the cell cycle in *Drosophila*." *J Cell Biol* **140**(6): 1297-306.
- Plevin, M. J., J. Zhang, et al. (2006). "The acute myeloid leukemia fusion protein AML1-ETO targets E proteins via a paired amphipathic helix-like TBP-associated factor homology domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10242-7.
- Pointud, J. C., J. Larsson, et al. (2001). "The BTB/POZ domain of the regulatory proteins Bric a brac 1 (BAB1) and Bric a brac 2 (BAB2) interacts with the novel *Drosophila* TAF(II) factor BIP2/dTAF(II)155." *Dev Biol* **237**(2): 368-80.
- Pointud, J. C., G. Mengus, et al. (2003). "The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation." *J Cell Sci* **116**(Pt 9): 1847-58.
- Poux, S., B. Horard, et al. (2002). "The *Drosophila* trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing." *Development* **129**(10): 2483-93.
- Poux, S., R. Melfi, et al. (2001). "Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC." *Genes Dev* **15**(19): 2509-14.
- Prince, F., T. Katsuyama, et al. (2008). "The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery." *Development* **135**(9): 1669-79.
- Ptashne, M. and A. Gann (1997). "Transcriptional activation by recruitment." *Nature* **386**(6625): 569-77.
- Raff, J. W., R. Kellum, et al. (1994). "The *Drosophila* GAGA transcription factor is associated with specific regions of heterochromatin throughout the cell cycle." *EMBO J* **13**(24): 5977-83.
- Read, D., M. J. Butte, et al. (2000). "Functional studies of the BTB domain in the *Drosophila* GAGA and Mod(mdg4) proteins." *Nucleic Acids Res* **28**(20): 3864-70.
- Read, D., T. Nishigaki, et al. (1990). "The *Drosophila* even-skipped promoter is transcribed in a stage-specific manner in vitro and contains multiple, overlapping factor-binding sites." *Mol Cell Biol* **10**(8): 4334-44.
- Robert, F., M. Douziech, et al. (1998). "Wrapping of promoter DNA around the RNA polymerase II initiation complex induced by TFIIF." *Mol Cell* **2**(3): 341-51.
- Rougvie, A. E. and J. T. Lis (1988). "The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged." *Cell* **54**(6): 795-804.
- Roy, R., L. Schaeffer, et al. (1994). "The DNA-dependent ATPase activity associated with the class II basic transcription factor BTF2/TFIIH." *J Biol Chem* **269**(13): 9826-32.
- Ruan, J. P., G. K. Arhin, et al. (2004). "Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes." *Mol Cell Biol* **24**(21): 9610-8.
- Saha, V., T. Chaplin, et al. (1995). "The leukemia-associated-protein (LAP) domain, a cysteine-rich motif, is present in a wide range of proteins, including MLL, AF10, and MLLT6 proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9737-41.
- Saluja, D., M. F. Vassallo, et al. (1998). "Distinct subdomains of human TAFII130 are required for interactions with glutamine-rich transcriptional activators." *Mol Cell Biol* **18**(10): 5734-43.
- Salvaing, J., A. Lopez, et al. (2003). "The *Drosophila* Corto protein interacts with Polycomb-group proteins and the GAGA factor." *Nucleic Acids Res* **31**(11): 2873-82.
- Sanders, S. L. and P. A. Weil (2000). "Identification of two novel TAF subunits of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* TFIID complex." *J Biol Chem* **275**(18): 13895-900.
- Sangwan, I. and M. R. O'Brian (2002). "Identification of a soybean protein that interacts with GAGA element dinucleotide repeat DNA." *Plant Physiol* **129**(4): 1788-94.
- Santi, L., Y. Wang, et al. (2003). "The GA octodinucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene *Bkn3*." *Plant J* **34**(6): 813-26.

Bibliografia

- Saunders, A., L. J. Core, et al. (2006). "Breaking barriers to transcription elongation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(8): 557-67.
- Schaeffer, L., R. Roy, et al. (1993). "DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor." *Science* **260**(5104): 58-63.
- Schuettengruber, B., M. Ganapathi, et al. (2009). "Functional anatomy of polycomb and trithorax chromatin landscapes in *Drosophila* embryos." *PLoS Biol* **7**(1): e13.
- Schweinsberg, S., K. Hagstrom, et al. (2004). "The enhancer-blocking activity of the Fab-7 boundary from the *Drosophila* bithorax complex requires GAGA-factor-binding sites." *Genetics* **168**(3): 1371-84.
- Schwendemann, A. 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**(20): 12883-8.
- Serizawa, H., J. W. Conaway, et al. (1993). "Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription." *Nature* **363**(6427): 371-4.
- Serizawa, H., R. C. Conaway, et al. (1992). "A carboxyl-terminal-domain kinase associated with RNA polymerase II transcription factor delta from rat liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7476-80.
- Shao, H., M. Revach, et al. (2005). "Core promoter binding by histone-like TAF complexes." *Mol Cell Biol* **25**(1): 206-19.
- Shi, Y., F. Lan, et al. (2004). "Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1." *Cell* **119**(7): 941-53.
- Shimohata, T., T. Nakajima, et al. (2000). "Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription." *Nat Genet* **26**(1): 29-36.
- Shimajima, T., M. Okada, et al. (2003). "*Drosophila* FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor." *Genes Dev* **17**(13): 1605-16.
- Shopland, L. S., K. Hirayoshi, et al. (1995). "HSF access to heat shock elements in vivo depends critically on promoter architecture defined by GAGA factor, TFIID, and RNA polymerase II binding sites." *Genes Dev* **9**(22): 2756-69.
- Smale, S. T. and J. T. Kadonaga (2003). "The RNA polymerase II core promoter." *Annu Rev Biochem* **72**: 449-79.
- Soeller, W. C., C. E. Oh, et al. (1993). "Isolation of cDNAs encoding the *Drosophila* GAGA transcription factor." *Mol Cell Biol* **13**(12): 7961-70.
- Soeller, W. C., S. J. Poole, et al. (1988). "In vitro transcription of the *Drosophila* engrailed gene." *Genes Dev* **2**(1): 68-81.
- Soutoglou, E., M. A. Demeny, et al. (2005). "The nuclear import of TAF10 is regulated by one of its three histone fold domain-containing interaction partners." *Mol Cell Biol* **25**(10): 4092-104.
- Srinivasula, S. M., P. Datta, et al. (2002). "sickle, a novel *Drosophila* death gene in the reaper/hid/grim region, encodes an IAP-inhibitory protein." *Curr Biol* **12**(2): 125-30.
- Stogios, P. J., J. A. Cuesta-Seijo, et al. "Insights into strand exchange in BTB domain dimers from the crystal structures of FAZF and Miz1." *J Mol Biol* **400**(5): 983-97.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." *Nature* **403**(6765): 41-5.
- Strutt, H., G. Cavalli, et al. (1997). "Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression." *EMBO J* **16**(12): 3621-32.
- Suganuma, T., J. L. Gutierrez, et al. (2008). "ATAC is a double histone acetyltransferase complex that stimulates nucleosome sliding." *Nat Struct Mol Biol* **15**(4): 364-72.
- Sun, L. V., L. Chen, et al. (2003). "Protein-DNA interaction mapping using genomic tiling path microarrays in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): 9428-33.
- Takada, S., J. T. Lis, et al. (2000). "A TRF1:BRF complex directs *Drosophila* RNA polymerase III transcription." *Cell* **101**(5): 459-69.
- Tanese, N., B. F. Pugh, et al. (1991). "Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex." *Genes Dev* **5**(12A): 2212-24.
- Tanese, N., D. Saluja, et al. (1996). "Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13611-6.

- Thomas, M. C. and C. M. Chiang (2006). "The general transcription machinery and general cofactors." Crit Rev Biochem Mol Biol **41**(3): 105-78.
- Thummel, C. S. (1989). "The Drosophila E74 promoter contains essential sequences downstream from the start site of transcription." Genes Dev **3**(6): 782-92.
- Timmers, H. T., R. E. Meyers, et al. (1992). "Composition of transcription factor B-TFIID." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(17): 8140-4.
- Tokusumi, Y., Y. Ma, et al. (2007). "The new core promoter element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters." Mol Cell Biol **27**(5): 1844-58.
- Tora, L. (2002). "A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription." Genes Dev **16**(6): 673-5.
- Tsukiyama, T., P. B. Becker, et al. (1994). "ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor." Nature **367**(6463): 525-32.
- Tsukiyama, T. and C. Wu (1995). "Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor." Cell **83**(6): 1011-20.
- Upton, C. and G. McFadden (1986). "Tumorigenic poxviruses: analysis of viral DNA sequences implicated in the tumorigenicity of Shope fibroma virus and malignant rabbit virus." Virology **152**(2): 308-21.
- van Ingen, H., F. M. van Schaik, et al. (2008). "Structural insight into the recognition of the H3K4me3 mark by the TFIID subunit TAF3." Structure **16**(8): 1245-56.
- van Steensel, B., J. Delrow, et al. (2003). "Genomewide analysis of Drosophila GAGA factor target genes reveals context-dependent DNA binding." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2580-5.
- van Steensel, B., J. Delrow, et al. (2001). "Chromatin profiling using targeted DNA adenine methyltransferase." Nat Genet **27**(3): 304-8.
- Vaquero, A., M. Blanch, et al. (2008). "Activation properties of GAGA transcription factor." Biochim Biophys Acta **1779**(5): 312-7.
- Vaquero, A., M. L. Espinas, et al. (2000). "Functional mapping of the GAGA factor assigns its transcriptional activity to the C-terminal glutamine-rich domain." J Biol Chem **275**(26): 19461-8.
- Vermeulen, M., K. W. Mulder, et al. (2007). "Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4." Cell **131**(1): 58-69.
- Verrijzer, C. P. and R. Tjian (1996). "TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity." Trends Biochem Sci **21**(9): 338-42.
- Volpi, S., C. Rabadan-Diehl, et al. (2002). "Transcriptional regulation of the pituitary vasopressin V1b receptor involves a GAGA-binding protein." J Biol Chem **277**(31): 27829-38.
- Walker, A. K., J. H. Rothman, et al. (2001). "Distinct requirements for C.elegans TAF(II)s in early embryonic transcription." EMBO J **20**(18): 5269-79.
- Wang, X., D. M. Truckses, et al. (2007). "Conserved region I of human coactivator TAF4 binds to a short hydrophobic motif present in transcriptional regulators." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7839-44.
- Watanabe, T., K. Hayashi, et al. (2003). "The carboxy terminus of the small subunit of TFIIE regulates the transition from transcription initiation to elongation by RNA polymerase II." Mol Cell Biol **23**(8): 2914-26.
- Weber, J. A., D. J. Taxman, et al. (1997). "Molecular architecture of the hsp70 promoter after deletion of the TATA box or the upstream regulation region." Mol Cell Biol **17**(7): 3799-808.
- Wei, Y., S. Liu, et al. (2007). "A TAF4-homology domain from the corepressor ETO is a docking platform for positive and negative regulators of transcription." Nat Struct Mol Biol **14**(7): 653-61.
- Weinzierl, R. O., B. D. Dynlacht, et al. (1993). "Largest subunit of Drosophila transcription factor IID directs assembly of a complex containing TBP and a coactivator." Nature **362**(6420): 511-7.
- Wilkins, R. C. and J. T. Lis (1997). "Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock gene regulation." Nucleic Acids Res **25**(20): 3963-8.
- Wilkins, R. C. and J. T. Lis (1998). "GAGA factor binding to DNA via a single trinucleotide sequence element." Nucleic Acids Res **26**(11): 2672-8.

Bibliografia

- Wilkins, R. C. and J. T. Lis (1999). "DNA distortion and multimerization: novel functions of the glutamine-rich domain of GAGA factor." *J Mol Biol* **285**(2): 515-25.
- Willy, P. J., R. Kobayashi, et al. (2000). "A basal transcription factor that activates or represses transcription." *Science* **290**(5493): 982-5.
- Wing, J. P., J. S. Karres, et al. (2002). "Drosophila sickle is a novel grim-reaper cell death activator." *Curr Biol* **12**(2): 131-5.
- Wright, K. J., M. T. Marr, 2nd, et al. (2006). "TAF4 nucleates a core subcomplex of TFIID and mediates activated transcription from a TATA-less promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(33): 12347-52.
- Wright, K. J. and R. Tjian (2009). "Wnt signaling targets ETO coactivation domain of TAF4/TFIID in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(1): 55-60.
- Wu, C. H., Y. Yamaguchi, et al. (2003). "NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in Drosophila." *Genes Dev* **17**(11): 1402-14.
- Wu, J. Q. and M. Snyder (2008). "RNA polymerase II stalling: loading at the start prepares genes for a sprint." *Genome Biol* **9**(5): 220.
- Wu, S. Y. and C. M. Chiang (1998). "Properties of PC4 and an RNA polymerase II complex in directing activated and basal transcription in vitro." *J Biol Chem* **273**(20): 12492-8.
- Wu, S. Y., E. Kershner, et al. (1998). "TAFII-independent activation mediated by human TBP in the presence of the positive cofactor PC4." *EMBO J* **17**(15): 4478-90.
- Wu, S. Y., M. C. Thomas, et al. (1999). "Isolation of mouse TFIID and functional characterization of TBP and TFIID in mediating estrogen receptor and chromatin transcription." *J Biol Chem* **274**(33): 23480-90.
- Xiao, H., R. Sandaltzopoulos, et al. (2001). "Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions." *Mol Cell* **8**(3): 531-43.
- Yamaguchi, Y., N. Inukai, et al. (2002). "Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA." *Mol Cell Biol* **22**(9): 2918-27.
- Yan, Q., R. J. Moreland, et al. (1999). "Dual roles for transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II." *J Biol Chem* **274**(50): 35668-75.
- Yatsu, J., M. Hayashi, et al. (2008). "Maternal RNAs encoding transcription factors for germline-specific gene expression in Drosophila embryos." *Int J Dev Biol* **52**(7): 913-23.
- Zhang, C. and Z. F. Burton (2004). "Transcription factors IIF and IIS and nucleoside triphosphate substrates as dynamic probes of the human RNA polymerase II mechanism." *J Mol Biol* **342**(4): 1085-99.
- Zollman, S., D. Godt, et al. (1994). "The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in Drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22): 10717-21.

G. ANNEX

H.1. Taules de gens activats en l'experiment de *microarray* de sobreexpressió de GAGA₅₁₉ a disc imaginal d'ala de larves en tercer estadi

Adjuntem a continuació el llistat de gens activats en el *microarray* de sobreexpressió GAGA₅₁₉. A cada gràfic, la columna "identificador d'*Affymetrix*" indica el nombre de sonda de cada gen i les columnes, "símbol gen" i "nom del gen" ens indiquen a quin gen pertany cada sonda. Les columnes "GAGA₅₁₉ induïda" i "GAGA₅₁₉ basal " mostren els valors, en escala logarítmica en base 2, de la mitjana conjunta dels resultats obtinguts de dues mostres independents que sobreexpressen GAGA₅₁₉ i que no sobreexpressen, respectivament. Les columnes "GFP induït" i "GFP no induït" mostren la mitjana conjunta dels resultats obtinguts de dues mostres independents que sobreexpressen GFP i que no sobreexpressen, en escala logarítmica en base 2. La columna "*Fold change*" és el valor en escala líneal que indica quants cops difereixen les mostres de GAGA₅₁₉, respecte les de GFP. Tots els gens que en aquestes condicions tenien un *fold change* superior a 2, són els que vam considerar diferencialment activats. En la columna "probDE" s'indica la probabilitat del gen d'estar diferencialment expressat, essent 1, la màxima probabilitat que el gen estigui diferencialment expressat i no s'hagi donat per atzar. Els gens del llistat estan ordenats de forma decreixent, tenint en compte la seva significació estadística "probDE".

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₁₉ Induïda	GAGA ₅₁₉ Basal	GFP Induït	GFP Basal	Fold Change	ProbDE
1	1633066_at	CG13215	CG13215 gene product from transcript CG13215-RA	9,15235502	2,77779067	2,99658656	2,86953581	75,9781983	0,99999846
2	1623558_at	Cpr49Ae	Cuticular protein 49Ae	6,39994097	2,40576506	2,2766668	2,33622585	16,6071771	0,99998175
3	1624809_s_at	NA	NA	7,27083115	3,44075947	2,93443507	2,81792377	13,1187685	0,99997838
4	1628702_at	Muc14A	Mucin 14A	6,22147772	1,79844505	2,39567188	2,16094627	18,2308138	0,99997265
5	1637975_at	Dhc36C	Dynein heavy chain at 36C	6,82161318	3,79094687	4,0783097	3,80117058	6,74363846	0,9999481
6	1635166_at	NA	NA	6,60634601	2,87867172	3,07226103	2,84454176	11,3133558	0,99994484
7	1639222_at	CG32191	CG32191 gene product from transcript CG32191-RA	6,35315876	3,50566659	3,4665502	3,48608688	7,29561116	0,99993107
8	1639380_a_at	Hsc70-1	Heat shock protein cognate 1	7,70239488	4,00049773	4,0770251	4,00320835	12,3640578	0,99993074
9	1629085_at	CG14227	CG14227 gene product from transcript CG14227-RB	7,36648197	3,56715805	3,68609892	3,66195629	13,6912408	0,99991131
10	1634526_a_at	qua	quail	8,00896206	3,95164405	3,50770281	3,7534828	19,7406555	0,99990392
11	1626797_a_at	Ntl	Neurotransmitter transporter-like	7,79010341	2,93317627	2,6473254	2,87598277	33,9557621	0,99990049
12	1630273_at	CG15145	CG15145 gene product from transcript CG15145-RA	5,68197224	2,19630926	2,26688292	2,33838053	11,7709641	0,99988364
13	1631085_a_at	Myo28B1	CG6976 gene product from transcript CG6976- RB	4,83175497	1,96915716	1,93056184	2,27674888	9,24571476	0,99984808
14	1630897_at	GluClalpha	CG7535 gene product from transcript CG7535-RC	5,20424436	1,98368137	2,10033945	2,16845043	9,77213623	0,99980175
15	1624985_at	CG7886	CG7886 gene product from transcript CG7886-RA	7,21814667	3,56837839	3,76506076	3,58324196	11,0651376	0,99978939
16	1639862_at	Eaat2	Excitatory amino acid transporter 2	5,2481191	2,47538819	2,28548212	2,35799459	7,18627114	0,99974141
17	1626124_at	CG9717	CG9717 gene product from transcript CG9717-RA	5,20195497	2,80914999	2,57222606	2,7110878	5,78239324	0,99970279
18	1638004_at	Cbp53E	Calbindin 53E	6,30954371	2,19084082	2,28756486	1,94799175	13,7287635	0,99969785
19	1633674_at	CG31150	CG31150 gene product from transcript CG31150-RA	9,27616876	5,79784609	5,48333273	5,67141855	12,696936	0,99967924
20	1639523_s_at	NA	NA	5,17218399	2,64920654	2,48059747	2,53561153	5,97107837	0,99965618
21	1638057_at	CG18765	CG18765 gene product from transcript CG18765-RB	4,09659814	1,99168259	2,1251441	2,13358293	4,32696177	0,999651
22	1632923_at	CG14661	CG14661 gene product from transcript CG14661-RA	8,04796337	3,32412804	3,25109093	3,24372119	26,2904254	0,99961762
23	1624772_at	CG14186	CG14186 gene product from transcript CG14186-RA	4,8403506	2,25388384	1,94097156	2,02597685	6,37078898	0,9995487
24	1633244_at	CG31551	CG31551 gene product from transcript CG31551-RA	4,78163775	2,89148399	2,59751128	2,47407316	3,40278415	0,99947819
25	1624054_at	Adgf-A	Adenosine deaminase- related growth factor A	9,03484204	5,20291834	5,32595658	5,62097992	17,4716873	0,99939453

Annex

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₁₉ Induïda	GAGA ₅₁₉ Basal	GFP Induït	GFP Basal	Fold Change	ProbDE
26	1627752_s_at	SK	small conductance calcium-activated potassium channel	5,97928186	4,60367193	3,80778331	5,86559184	10,8034371	0,99938159
27	1626537_at	CG17321	CG17321 gene product from transcript CG17321-RA	6,73683348	4,33052419	4,10583749	4,24827232	5,85124701	0,9992435
28	1632435_at	CG7804	CG7804 gene product from transcript CG7804-RA	4,76453677	2,43386579	2,68259782	2,49882943	4,42875932	0,99921234
29	1625203_at	CG9826	CG9826 gene product from transcript CG9826-RA	5,10177928	2,95567024	3,08235016	3,20011586	4,80279669	0,9991859
30	1639157_at	CG6765	CG6765 gene product from transcript CG6765-RA	6,96650054	3,40652801	4,05695844	3,69918287	9,2035915	0,99913601
31	1633405_s_at	CG4288	CG4288 gene product from transcript CG4288-RB	5,3574782	3,11272222	3,38600676	3,6792338	5,80776475	0,99909759
32	1639587_s_at	CG7458	CG7458 gene product from transcript CG7458-RA	6,77689008	4,33644999	4,69693014	4,3584299	4,29286216	0,99903992
33	1632359_at	Tak12	Tak1-like 2	5,77015491	2,93819009	3,01235327	3,15469893	7,85880786	0,99888132
34	1634330_at	ndl	nudel	5,05916888	2,81389452	2,70606854	2,74272397	4,86328043	0,99862097
35	1630180_at	CG4815	CG4815 gene product from transcript CG4815-RA	6,17730135	3,19852621	3,22447972	3,14919129	7,48232542	0,99844527
36	1627435_at	clumsy	CG8681 gene product from transcript CG8681-RB	4,69691955	2,21231462	1,99577219	2,32446113	7,02887534	0,99841558
37	1628035_at	CG18536	CG18536 gene product from transcript CG18536-RB	6,04677042	4,95228536	4,49018769	5,28222115	3,69741898	0,99809938
38	1635945_at	CG15394	CG15394 gene product from transcript CG15394-RB	4,70504661	2,17961299	2,41238999	2,50191484	6,12605562	0,99789306
39	1629499_at	CG11915	CG11915 gene product from transcript CG11915-RA	7,6699175	5,75760445	5,3143728	5,43706466	4,09824124	0,99785743
40	1637692_at	NA	NA	6,00312776	2,84320716	3,10153451	3,12897689	9,1094439	0,99783219
41	1628468_at	CG8738	CG8738 gene product from transcript CG8738-RA	7,99934387	5,3036599	5,2428288	5,38840383	7,16645182	0,99774346
42	1624577_at	Ace	Acetylcholine esterase	6,24191806	2,48833219	2,45768054	2,40916608	13,0418029	0,99709836
43	1631477_a_at	Sdic1	Sperm-specific dynein intermediate chain 1	5,15643977	2,55347798	2,53130936	2,51800645	6,01956354	0,99705871
44	1636956_at	Hsc70-1	Heat shock protein cognate 1	7,09299918	2,98831951	3,25289919	3,10714797	15,5509246	0,99682872
45	1635792_a_at	Ela	Elastin-like	7,23754318	3,48247223	3,75676442	3,62992533	12,365356	0,99679296
46	1630696_at	CG12972	CG12972 gene product from transcript CG12972-RA	7,17632419	5,861895	5,90761865	5,98514585	2,62434319	0,99650151
47	1628084_at	BobA	Brother of Bearded A	4,51679068	2,1673319	2,47366932	2,35942769	4,70833559	0,99640281
48	1625065_s_at	SK	small conductance calcium-activated potassium channel	7,93239275	6,74572643	6,11670023	8,26842485	10,1147653	0,99628161
49	1628226_at	CG8539	CG8539 gene product from transcript CG8539-RA	6,79915299	3,89121789	3,13264607	3,44560499	9,32364468	0,99621248
50	1625891_at	CG17111	CG17111 gene product from transcript CG17111-RA	5,29258969	3,90735458	3,42542229	3,93963352	3,73069998	0,99616935

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₁₉ Induïda	GAGA ₅₁₉ Basal	GFP Induït	GFP Basal	Fold Change	ProbDE
51	1631599_at	CG31976	CG31976 gene product from transcript CG31976-RB	5,50195786	3,28163118	2,61186092	3,28951168	7,45380688	0,99600029
52	1624098_s_at	NA	NA	4,75575668	2,65621558	2,96062129	3,00405491	4,41671802	0,99591004
53	1636345_s_at	Syt1	Synaptotagmin 1	8,3514352	3,15965002	4,54928284	3,70474469	20,3540929	0,99542283
54	1627441_at	TyrR	Tyramine receptor	3,56113427	1,80395653	1,66628451	1,83285525	3,79407573	0,99520824
55	1639539_at	Cyp4e1	Cytochrome P450-4e1	8,02956682	6,04772572	5,49405158	6,01817398	5,68028575	0,99519342
56	1635455_at	CG14529	CG14529 gene product from transcript CG14529-RA	4,466236	2,47681201	2,45903138	2,4923972	4,0636885	0,99507524
57	1634465_a_at	GluClalpha	CG7535 gene product from transcript CG7535- RC	5,21023682	2,56926564	2,3231515	2,3681968	6,43534044	0,99506359
58	1630920_at	Tsp42Ek	Tetraspanin 42Ek	8,37480829	5,1393059	5,98945001	5,4184956	6,34028628	0,9937889
59	1635188_at	CG6675	CG6675 gene product from transcript CG6675- RB	5,71030667	3,36901415	3,49543858	3,69000671	5,79922715	0,99377977
60	1624074_at	Obp56a	Odorant-binding protein 56a	11,1834764	8,64708845	9,57896392	8,95009243	3,75162704	0,99349283
61	1628315_at	CG17264	CG17264 gene product from transcript CG17264-RA	5,55915516	4,20532315	4,47666218	4,46130262	2,52883422	0,9934579
62	1636118_at	CG13065	CG13065 gene product from transcript CG13065-RA	4,45672049	3,03663402	2,68446446	3,0084776	3,34985723	0,99233503
63	1634468_at	CG13397	CG13397 gene product from transcript CG13397-RA	7,91114828	6,37298271	5,9865757	6,47260706	4,06765388	0,99228677
64	1637853_a_at	Hk	Hyperkinetic	4,83902999	2,8290848	2,93227001	2,82654609	3,74306801	0,99144044
65	1639778_at	CG18304	CG18304 gene product from transcript CG18304-RA	6,01192364	4,22663724	3,95363087	4,12493612	3,88143912	0,99066236
66	1626400_at	CG30049	CG30049 gene product from transcript CG30049-RA	5,35796119	3,03620545	2,68658682	2,85705663	5,62645242	0,99063934
67	1634439_at	CG33256	CG33256 gene product from transcript CG33256-RA	6,29356832	5,23080018	4,3980404	4,79630208	2,75304812	0,99027917
68	1635651_at	CG30195	CG30195 gene product from transcript CG30195-RA	10,8614577	8,51206299	8,44395907	8,47244871	5,19773952	0,99022589
69	1623241_s_at	CG30104	CG30104 gene product from transcript CG30104-RB	5,63110985	2,86040016	2,99421064	2,85354433	6,1904461	0,99010169
70	1628263_s_at	CG15236	CG15236 gene product from transcript CG15236-RB	4,01049773	2,19055684	2,1569456	2,24868011	3,76245779	0,99009174
71	1630285_at	RhoGAP100 F	CG1976 gene product from transcript CG1976- RB	7,74059418	5,41494792	5,6237366	5,29996411	4,00519857	0,98960164
72	1637321_at	nAcRbeta- 64B	nicotinic Acetylcholine Receptor beta 64B	3,86837761	2,4225639	2,24862195	2,33333268	2,88890835	0,98930208
73	1638583_at	CG31103	CG31103 gene product from transcript CG31103-RB	7,67454568	5,06400928	4,8086028	4,61113961	5,32607673	0,98929179
74	1632761_at	NA	NA	4,63179035	3,04025385	3,15940467	3,10739825	2,906998	0,98916994
75	1631783_at	CG4267	CG4267 gene product from transcript CG4267- RA	6,23641761	4,06697722	3,9288715	4,18369012	5,36753248	0,98895215

Annex

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₁₉ Induïda	GAGA ₅₁₉ Basal	GFP Induït	GFP Basal	Fold Change	ProbDE
76	1637957_s_at	Rbp9	RNA-binding protein 9	6,86532529	4,06417532	4,4783675	4,21502751	5,80706823	0,98879618
77	1624821_at	CG8586	CG8586 gene product from transcript CG8586- RA	5,2100065	3,24611541	3,74883633	3,32424036	2,90652463	0,98864531
78	1627636_at	CG14636	CG14636 gene product from transcript CG14636-RA	6,26845166	4,14181979	4,68501649	4,47173503	3,76682862	0,98837949
79	1631632_s_at	BicC	Bicaudal C	6,41420769	3,484104	4,2699018	3,6870993	5,08871427	0,98813078
80	1640416_at	CG34283	CG34283 gene product from transcript CG34283-RA	5,37289473	2,73208834	2,69913566	2,78299356	6,61006422	0,98799858
81	1636405_a_at	CG4329	CG4329 gene product from transcript CG4329- RB	5,71573218	3,85184172	3,90965417	3,88081573	3,56784273	0,98765928
82	1626578_at	CG5195	CG5195 gene product from transcript CG5195- RA	5,16338593	3,15654529	3,08492897	3,2530378	4,51569946	0,98705056
83	1627963_s_at	Hsc70-1	Heat shock protein cognate 1	5,12944703	3,37932688	3,42370851	3,36944126	3,23968355	0,98626823
84	1636585_a_at	hig	hikaru genki	6,22545723	2,95930983	2,82820476	3,20029653	12,4514268	0,98546124
85	1638368_at	CG31674	CG31674 gene product from transcript CG31674-RA	4,57249582	2,23079942	2,30855325	2,42999848	5,5141619	0,98516173
86	1631835_at	CG6300	CG6300 gene product from transcript CG6300- RA	4,74525387	2,72191926	2,5512068	2,33322819	3,49515395	0,98515521
87	1641108_at	CG17928	CG17928 gene product from transcript CG17928-RA	4,7819684	2,66041599	2,88601532	2,71168539	3,85631387	0,98514158
88	1634630_at	CG5707	CG5707 gene product from transcript CG5707- RA	5,3146406	3,35846465	3,17188752	3,20425606	3,96836434	0,98500865
89	1629009_at	Cyp28a5	CG8864 gene product from transcript CG8864- RA	5,50692937	3,03370853	2,80268905	2,77353251	5,4417259	0,98496224
90	1631262_at	CG14866	CG14866 gene product from transcript CG14866-RA	4,41971274	2,58150782	2,52035154	2,49913638	3,52345248	0,98411047
91	1636676_at	CG2150	CG2150 gene product from transcript CG2150- RA	7,32125803	3,51882415	4,20706641	4,21962334	14,0742956	0,98376281
92	1626298_at	CG14958	CG14958 gene product from transcript CG14958-RA	4,91555425	3,22499795	3,04656817	3,33093239	3,93106582	0,98301663
93	1637129_at	GstE3	Glutathione S transferase E3	9,32066413	7,20947082	7,35966568	7,14373517	3,71989734	0,98278678
94	1641513_at	CG12239	CG12239 gene product from transcript CG12239-RA	6,60002211	3,87813217	3,38860516	3,88953968	9,33612876	0,98241208
95	1636266_at	psh	persephone	6,95433847	5,58695853	5,24926525	5,33862203	2,74486792	0,98184557
96	1637569_s_at	NA	NA	4,61132726	2,22068599	2,17476555	2,1846449	5,27993665	0,98155257
97	1630223_at	skl	sickle	5,57830814	2,62560211	2,01810093	2,44211967	10,387127	0,98121619
98	1627041_s_at	ine	inebriated	8,63921805	6,96388515	6,24435955	6,58930401	4,05661774	0,98031093
99	1639575_at	CG18446	CG18446 gene product from transcript CG18446-RA	4,12353428	2,55575458	2,91041193	2,76900547	2,68770208	0,97990401
100	1635083_at	CG32458	CG32458 gene product from transcript CG32458-RA	6,1700162	3,60246474	3,45866632	3,43334825	5,82490042	0,97984677

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₁₉ Induïda	GAGA ₅₁₉ Basal	GFP Induït	GFP Basal	Fold Change	ProbDE
101	1632082_at	Ndg	Nidogen/entactin	8,11871778	4,52765062	5,15009893	4,33666967	6,85728699	0,97940498
102	1623346_at	CG2861	CG2861 gene product from transcript CG2861- RA	4,79511254	2,14070004	2,77885945	2,35258918	4,6853026	0,97885304
103	1632490_at	CG8008	CG8008 gene product from transcript CG8008- RA	4,5549015	2,44989272	2,85063131	2,70882996	3,8992791	0,97879703
104	1639033_at	l(2)01289	lethal (2) 01289	5,11735545	2,31111731	2,84719529	2,62321046	5,98874336	0,97863772
105	1641475_at	Syt4	Synaptotagmin 4	5,24664973	4,04493416	7,49743648	8,89078574	6,04216187	0,97802845
106	1636843_a_at	CG10512	CG10512 gene product from transcript CG10512-RA	8,05224362	5,12326565	5,58512488	5,18308669	5,76347841	0,97735455
107	1630212_at	CG2065	CG2065 gene product from transcript CG2065- RA	6,84775113	4,07012932	3,65523221	3,92917188	8,29108829	0,97687517
108	1634029_at	Ugt86Dj	CG15902 gene product from transcript CG15902-RA	4,32945009	2,38996114	2,27827561	2,34841902	4,02679594	0,9767911
109	1634134_at	CG6114	CG6114 gene product from transcript CG6114- RA	3,5662488	2,45671955	2,38896773	2,57331659	2,45186256	0,97598492
110	1641647_at	CG9232	CG9232 gene product from transcript CG9232- RA	9,77553589	8,41143529	8,51874953	8,5241138	2,5837471	0,97475209
111	1634855_s_at	CG9813	CG9813 gene product from transcript CG9813- RE	5,36650682	2,95923766	3,12477519	3,23166606	5,71264953	0,97458786
112	1633313_at	Ank2	CG34416 gene product from transcript CG34416-RK	8,23983737	2,6627497	4,1684554	2,88404019	19,5985153	0,97361518
113	1623096_a_at	Tsp68C	Tetraspanin 68C	7,95777637	4,36414657	5,04753237	4,08498314	6,19489821	0,97308772
114	1636384_at	CG32703	CG32703 gene product from transcript CG32703-RA	5,93254354	4,31688085	4,07420577	4,26192212	3,4903677	0,97290464
115	1636493_at	dei	deilah	5,44265228	3,87290569	3,22059171	4,56485446	7,53709902	0,97267305
116	1638091_at	CG15143	CG15143 gene product from transcript CG15143-RA	3,80468355	2,06366243	2,30531258	2,31317252	3,36097792	0,97236251
117	1640204_at	CG31619	CG31619 gene product from transcript CG31619-RC	4,28101221	2,01023873	2,34147335	2,4232055	5,1071047	0,970556
118	1625227_at	CG30456	CG30456 gene product from transcript CG30456-RB	4,44768909	3,20160776	2,86295096	3,05771958	2,71480757	0,97015505
119	1624802_at	CG31686	CG31686 gene product from transcript CG31686-RA	4,8182494	2,73573853	2,63655726	2,88921071	5,04608434	0,96865779
120	1633145_at	PGRP-LF	Peptidoglycan recognition protein LF	6,98474773	5,69918919	6,09585702	6,56483824	3,37418656	0,96738578
121	1636759_at	CG8303	CG8303 gene product from transcript CG8303- RB	7,75610494	6,5676804	6,59300504	6,58676299	2,26919798	0,96658752
122	1625559_a_at	CG30217	CG30217 gene product from transcript CG30217-RA	8,22138725	5,4539853	6,2511027	5,45173596	3,91234938	0,96641678
123	1639643_at	CG18557	CG18557 gene product from transcript CG18557-RA	6,03052312	3,84093301	3,87030555	3,92190406	4,72786427	0,96628982
124	1635593_at	Cyp6d2	CG4373 gene product from transcript CG4373- RA	10,4722823	5,86017506	5,81774041	5,04991597	14,3629756	0,9626311
125	1634259_at	CG9083	CG9083 gene product from transcript CG9083- RB	4,94892311	3,06567752	3,20865333	3,0558533	3,31830284	0,96200434

Annex

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₁₉ Induïda	GAGA ₅₁₉ Basal	GFP Induït	GFP Basal	Fold Change	ProbDE
126	1623201_at	CG5783	CG5783 gene product from transcript CG5783- RA	5,91698352	3,94995003	3,97366326	4,02822539	4,06032616	0,96089991
127	1631662_a_at	Ank2	CG34416 gene product from transcript CG34416-RK	4,55911107	3,16460352	3,04785378	2,95151722	2,4591692	0,96070701
128	1637625_s_at	CG32813	CG32813 gene product from transcript CG32813-RD	9,33148898	7,88876094	8,08832504	8,18204591	2,90079615	0,96030792
129	1624816_at	NA	NA	9,16782742	7,35646508	7,64999311	7,38306349	2,91689353	0,95910913
130	1636589_s_at	NA	NA	4,1140673	2,28229194	2,72574384	2,69392005	3,48208538	0,95785595
131	1632637_at	hiw	highwire	5,29042222	3,67794418	3,73307589	3,86737684	3,35608436	0,95531337
132	1623868_a_at	CG30275	CG30275 gene product from transcript CG30275-RF	3,17864758	2,10762205	2,19298605	2,31156096	2,28089565	0,95401952
133	1626174_a_at	jdp	CG2239 gene product from transcript CG2239- RA	6,25216834	4,56886541	4,63431608	4,91590119	3,90382405	0,95372495
134	1623802_at	CG1625	CG1625 gene product from transcript CG1625- RB	6,22307303	4,40159076	3,50579057	3,606367	3,78963449	0,95369652
135	1633809_at	CG13046	CG13046 gene product from transcript CG13046-RB	7,39739073	5,76501983	5,88548658	5,52220037	2,41008609	0,95204247
136	1633772_at	CG32564	CG32564 gene product from transcript CG32564-RA	7,80410256	6,25329015	5,92300496	5,83799131	2,76216358	0,95172668
137	1641623_at	CG15917	CG15917 gene product from transcript CG15917-RA	7,36419288	5,25539707	5,15649109	5,41967814	5,17652113	0,94957277
138	1630733_s_at	CG42322	CG42322 gene product from transcript CG42322-RI	5,82134191	3,51968564	3,37801729	3,62106166	5,83487053	0,94903054
139	1625761_a_at	Mmp1	Matrix metalloproteinase 1	7,97633399	6,49541668	6,81827663	6,9871361	3,13785084	0,94873143
140	1628611_at	CG11241	CG11241 gene product from transcript CG11241-RB	6,56992087	5,15053312	5,24701842	5,39418957	2,96197385	0,94804174
141	1639401_at	LvpH	Larval visceral protein H	5,26161463	3,17208888	3,69231286	3,32650004	3,30285337	0,94652515
142	1628419_a_at	CG8909	CG8909 gene product from transcript CG8909- RC	4,96555915	3,00748752	2,74651299	2,94769565	4,46683912	0,9448281
143	1633218_a_at	UGP	CG4347 gene product from transcript CG4347- RE	6,84193229	5,64904425	6,13665978	6,77450342	3,5571743	0,94421124
144	1631548_at	CG30196	CG30196 gene product from transcript CG30196-RA	9,46379913	5,64290489	6,49358741	5,61821552	7,70354421	0,94389442
145	1635936_at	CG13822	CG13822 gene product from transcript CG13822-RA	6,68063516	3,67087228	4,37507663	4,86607448	11,3196758	0,94252032
146	1624017_at	Ahcy89E	Adenosylhomocysteinase 89E	7,59865946	5,63056236	5,34837823	5,26051584	3,68134945	0,94163441
147	1623894_a_at	CG8086	CG8086 gene product from transcript CG8086- RE	5,51934849	4,42833931	4,34222196	4,58598708	2,52236019	0,94140512
148	1630447_at	CG3078	CG3078 gene product from transcript CG3078- RA	4,57428922	3,16128476	2,77102189	2,96592073	3,04808535	0,93600152
149	1640236_at	CG4325	CG4325 gene product from transcript CG4325- RA	5,14341493	3,97848925	4,04296888	4,00592627	2,18537835	0,93507719
150	1626272_s_at	Sp7	Serine protease 7	7,99782407	6,22958312	6,04753729	6,41383491	4,39096664	0,93491176

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₁₉ Induïda	GAGA ₅₁₉ Basal	GFP Induït	GFP Basal	Fold Change	ProbDE
151	1636751_x_at	NA	NA	3,76424213	2,72417477	2,67223578	2,8596517	2,34158155	0,93336857
152	1637281_at	NA	NA	5,04455666	4,02669338	4,31369849	4,51248157	2,32405849	0,93066182
153	1627073_a_at	CG10126	CG10126 gene product from transcript CG10126-RB	9,34640729	8,25685927	8,54747012	8,66323435	2,30587169	0,93037349
154	1630385_at	NA	NA	4,44635426	3,38945375	2,95002165	3,38780019	2,81801452	0,92975875
155	1638388_at	CG10559	CG10559 gene product from transcript CG10559-RB	6,80515707	5,58945355	6,82692192	7,14096898	2,88735918	0,92966759
156	1629836_at	Ugt36Ba	CG13270 gene product from transcript CG13270-RA	4,66338319	2,89878171	3,09993475	2,96406312	3,09240623	0,92685372
157	1633540_at	CG8147	CG8147 gene product from transcript CG8147- RA	4,78734564	3,40980666	3,48590097	3,6054227	2,82267044	0,92685156
158	1634339_at	CG32694	CG32694 gene product from transcript CG32694-RA	6,31194316	5,29935896	5,50941998	5,7456542	2,37646707	0,92510628
159	1625688_at	CG6293	CG6293 gene product from transcript CG6293- RA	5,54788896	3,90469624	5,14229294	5,21462332	3,28415701	0,92324358
160	1631215_at	CG32132	CG32132 gene product from transcript CG32132-RA	5,92351748	4,11482654	4,20101913	4,18195694	3,45725915	0,92274039
161	1639597_at	Obp44a	CG2297 gene product from transcript CG2297- RA	8,58698618	5,0357993	6,15723826	5,01963469	5,32796022	0,92074413
162	1636338_at	CG15021	CG15021 gene product from transcript CG15021-RA	5,08803802	3,9031724	3,79574161	3,93338208	2,5010018	0,92010804
163	1627159_at	CG13427	CG13427 gene product from transcript CG13427-RA	5,7142691	3,53234506	3,3587526	3,39029859	4,63789458	0,91888222
164	1635862_at	CG33120	CG33120 gene product from transcript CG33120-RA	3,94445763	2,30616394	2,5671657	2,22247717	2,45139873	0,91780786
165	1623394_at	CG42260	CG42260 gene product from transcript CG42260-RA	4,95001599	3,03634794	3,47479242	3,37174088	3,50792163	0,91668608
166	1636757_at	CG14107	CG14107 gene product from transcript CG14107-RA	5,94028653	3,66785241	3,67198506	4,58178564	9,07712051	0,9160267
167	1638869_at	Cpr51A	Cuticular protein 51A	11,0099625	8,53763853	9,6564057	9,04326933	3,62803303	0,91080535
168	1626200_s_at	tipE	temperature-induced paralytic E	5,21138076	2,97507642	3,2678767	3,0051657	3,92745118	0,90924454
169	1627388_at	Lcp65Ag3	Larval cuticle protein	5,95939661	3,29619568	3,4641971	3,09865661	4,91659815	0,90740968
170	1629605_at	CG15056	CG15056 gene product from transcript CG15056-RA	4,02051541	2,65833873	2,74825342	2,78522687	2,63746168	0,90440348
171	1630171_at	Cpr97Ea	Cuticular protein 97Ea	7,28017535	5,53592311	5,67455416	5,91607554	3,96074994	0,9027863
172	1638810_at	Faa	Fumarylacetoacetase	8,10224426	6,56616038	6,75049588	6,35976425	2,21200133	0,90266467
173	1625654_at	GluRIIB	Glutamate receptor IIB	4,84239906	3,44533982	3,23915815	3,05067772	2,3110986	0,90035503
174	1637590_at	CG42329	CG42329 gene product from transcript CG42329-RA	4,35441999	2,45926175	2,52607707	2,3860865	3,37565547	0,90024279
175	1640213_at	CG18631	CG18631 gene product from transcript CG18631-RA	4,4728012	3,00377943	3,13032023	3,71998522	4,16606905	0,89859651

Annex

Nº	Identificador Affymetrix	Símbol gen	Nom del gen	GAGA ₅₁₉ Induïda	GAGA ₅₁₉ Basal	GFP Induït	GFP Basal	Fold Change	ProbDE
176	1638205_s_at	NA	NA	8,50867002	7,3601284	7,1424542	7,27029304	2,42230488	0,89613873
177	1628147_at	neuroligin	CG13772 gene product from transcript CG13772-RA	5,08583889	2,02286895	2,28357333	2,27726542	8,32045271	0,89584675
178	1629696_a_at	CG30497	CG30497 gene product from transcript CG30497-RA	9,01670737	7,68337176	7,88905787	7,82698342	2,41372475	0,89569084
179	1626851_at	CG9460	CG9460 gene product from transcript CG9460-RA	9,76396291	8,70637562	8,55818827	8,60879415	2,15575493	0,89189811
180	1639609_s_at	NA	NA	4,7662744	2,77977506	2,86071325	2,91521089	4,11529823	0,8832541
181	1637483_at	CG8736	CG8736 gene product from transcript CG8736-RB	6,41050211	4,3592907	4,28982046	4,51419569	4,84194484	0,88093936
182	1628261_at	CG13067	CG13067 gene product from transcript CG13067-RA	10,3493897	6,90368912	8,24966996	7,81183666	8,04374455	0,88033737
183	1629754_s_at	Trl	Trithorax-like	12,6427016	11,2280212	11,2979761	11,3421427	2,7488859	0,87381989
184	1639431_at	synaptogyrin	CG10808 gene product from transcript CG10808-RA	8,15191955	6,76770723	6,04672972	6,47326803	3,50824775	0,86926507
185	1640729_s_at	nrv3	nervana 3	6,25251163	3,50153537	3,66992859	2,8401939	3,78748867	0,86906531
186	1633427_at	CG7582	CG7582 gene product from transcript CG7582-RA	6,01268844	4,29330519	4,22885241	4,45911077	3,86278562	0,86693322
187	1623552_s_at	CG2893	CG2893 gene product from transcript CG2893-RE	6,56540346	4,18339238	4,72349525	4,39331554	4,14631972	0,86606831
188	1630710_at	GluRIIA	Glutamate receptor IIA	4,33000757	3,2188133	3,45983438	3,57410788	2,33831254	0,8650315
189	1626577_at	CG15556	CG15556 gene product from transcript CG15556-RA	6,57353802	3,0947174	3,54097842	2,77263411	6,54537708	0,86481289
190	1631340_at	Ggamma1	G protein gamma 1	8,12424528	7,0427328	7,31784498	7,25259356	2,02267013	0,86166033
191	1630725_at	CG14572	CG14572 gene product from transcript CG14572-RA	7,69961669	6,40326344	6,67866698	6,47551449	2,13346841	0,8561175
192	1632463_at	NA	NA	4,80602281	2,69938438	3,15554369	2,68531557	3,10891312	0,85302791
193	1636000_at	CG13640	CG13640 gene product from transcript CG13640-RA	6,62175666	4,16567694	4,81691137	4,18158736	3,53266198	0,84597945
194	1627489_a_at	CG10433	CG10433 gene product from transcript CG10433-RA	7,90946795	5,32951477	5,64862092	5,62336094	5,87542497	0,8455478
195	1638861_at	NA	NA	3,90650138	2,35464542	2,17857167	2,35407345	3,31120822	0,84367797
196	1637391_at	Cpr76Bd	Cuticular protein 76Bd	4,94926448	3,8046898	3,89495127	3,85774106	2,15451699	0,84330561
197	1623295_at	CG8564	CG8564 gene product from transcript CG8564-RA	5,96196614	4,10791128	4,16425536	4,2202711	3,75827491	0,83854373
198	1625064_at	CG34400	CG34400 gene product from transcript CG34400-RC	4,17819958	3,17172303	3,15741805	3,25179576	2,14481654	0,83811429
199	1639891_at	CG13733	CG13733 gene product from transcript CG13733-RA	4,78276423	3,27482028	2,97863008	3,11378571	3,12336153	0,83457368
200	1638879_a_at	CG33012	CG33012 gene product from transcript CG33012-RA	4,8869831	3,30799038	3,22269517	3,14936493	2,8395503	0,81876132
201	1635467_a_at	CG7381	CG7381 gene product from transcript CG7381-RD	4,05335947	2,85413539	2,9730746	3,08101058	2,47453948	0,81428039
202	1630777_at	fzy	fizzy	5,95410684	4,34653628	4,18094819	4,06532065	2,8126753	0,81054937
203	1639584_at	Cyp4ad1	CG2110 gene product from transcript CG2110-RA	5,27254777	3,69189095	3,6155311	3,46810773	2,70051295	0,80750385

H.2. Anàlisi de cicle cel·lular a cèl·lules que sobreexpressen GAGA

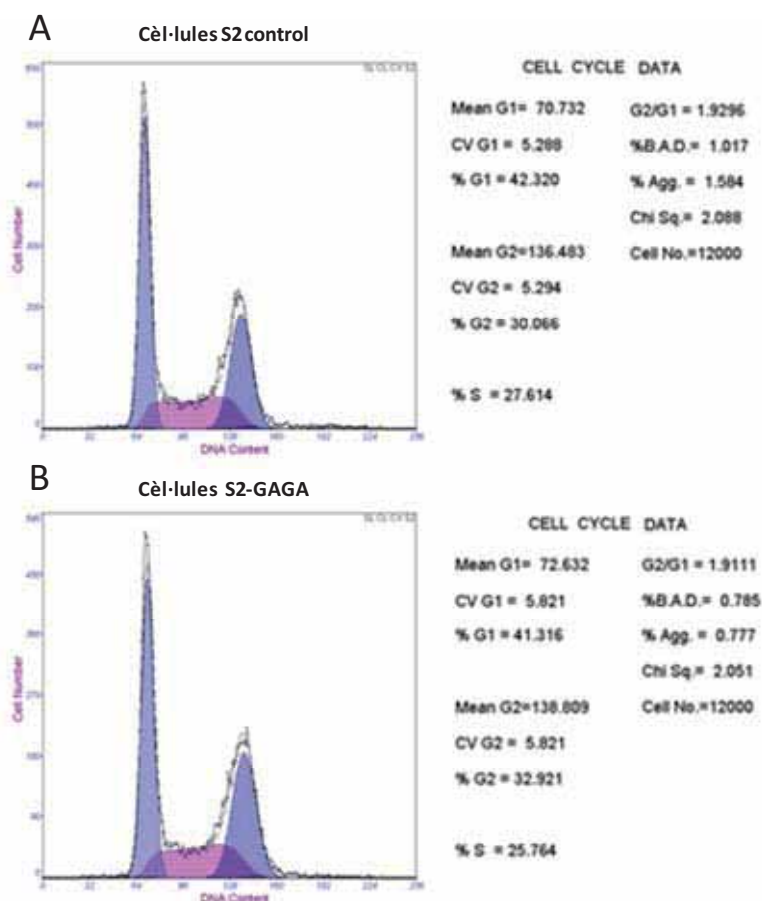


Figura H.1. Anàlisi de la distribució del cicle cel·lular de cèl·lules que sobreexpressen GAGA. Les cèl·lules s'han tenyit amb iodur de propidi per poder saber el contingut de DNA de cada cèl·lula i poder saber la distribució de les cèl·lules del cultiu en les fases del cicle cel·lular. A l'eix d'ordenades (Y) es representa el nombre de cèl·lules i a l'eix d'abscisses (X), el contingut de DNA. A la dreta de cada gràfic hi ha la informació de cada fase del cicle cel·lular. **A)** Cèl·lules control S2 salvatges. **B)** Línia de cèl·lules establiment transfectades que sobreexpressen GAGA. No existeixen diferències en les fases del cicle entre les cèl·lules control i les que sobreexpressen GAGA i tampoc apareix cap indicati d'apoptosi en els cultius. S'han realitzat tres experiments independents tots ells amb resultats molt similars.