

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

TESI DOCTORAL

**Estudi de la interacció entre els factors de
transcripció de *Drosophila* GAGA i Tramtrack**

Sara Pagans i Lista

Novembre del 2002

Programa de Bioquímica i Biologia Molecular

Estudi de la interacció entre els factors de transcripció de *Drosophila* GAGA i Tramtrack

Memòria presentada per la Sara Pagans i Lista per aspirar al grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular. Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del Dr. Ferran Azorín i Marín en el Departament de Biologia Molecular i Cel.lular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC).

Vist-i-plau del director:

Vist-i-plau del tutor:

Dr. Ferran Azorín i Marín

Dra. M. Carmen Martínez

I.-ÍNDICE

ÍNDIX DE MATÈRIES

I. ÍNDIX	1
ÍNDIX DE MATÈRIES	3
ÍNDIX DE TAULES I FIGURES	11
ABREVIATURES	15
II. INTRODUCCIÓ	17
1. Mecanismes de regulació de la transcripció	19
1.1. El procés de transcripció a eucariotes	19
1.1.1. Estructura dels promotors Pol II	19
1.1.2. Transcripció basal	20
1.1.3. Iniciació	21
1.1.3.1. RNA Polimerasa II (RNAP II)	21
1.1.3.2. Factors generals de transcripció o GTFs	22
1.1.3.3. El “Mediator”	23
1.1.4. Elongació i reiniciació	24
1.2. La transcripció en presència de cromatina	25
1.2.1. Efectes de l’estructura de la cromatina en la transcripció	25
1.2.1.1. Els nucleosomes i la cromatina	25
1.2.1.2. Paper repressor dels nucleosomes i la cromatina	25
1.2.1.3. Eucromatina i heterocromatina	26
1.2.2. Complexes remodeladors de la cromatina	27
1.2.3. Modificacions post-traduccionals de les histones	30
1.2.3.1. Acetilació/desacetilació d’histones	31
1.2.3.2. Metilació d’histones	35
1.2.3.3. Fosforilació d’histones	36
1.2.3.4. Ubiquitinització d’histones	37
1.2.3.5. Metilació del DNA i la seva connexió amb HDACs i HMTs	37
1.2.4. Reclutament dels complexos remodeladors i modificadors de la cromatina	38

1.2.5. Elongació i cromatina	39
1.3. Mecanismes d'activació i de repressió	40
1.3.1. Activació	41
1.3.1.1. Classificació dels activadors	41
1.3.1.2. Mecanismes d'activació	42
1.3.1.3. Actuacions sinèrgiques dels activadors	43
1.3.2. Repressió	44
1.3.2.1. Mecanismes de repressió	44
1.3.2.2. <i>Long-range/short-range repression</i>	46
1.3.2.3. La repressió <i>long-range</i> mediada per Groucho	47
1.3.2.4. La repressió <i>short-range</i> mediada per dCtBP	48
1.3.3. Factors de transcripció involucrats en processos d'activació i de repressió	50
2. GAGA i Tramtrack, dos factors de transcripció amb dominis POZ	51
2.1. Els dominis POZ/BTB	51
2.1.1. Proteïnes amb dominis POZ	51
2.1.2. Dominis associats	52
2.1.3. Interaccions entre proteïnes mediades pel domini POZ	53
2.1.4. Estructura del domini POZ	54
2.1.5. Funcions associades al domini POZ	56
2.1.5.1. Modulació de l'activitat transcripcional	57
2.1.5.2. Modulació de la unió al DNA	58
2.1.5.3. Localització nuclear	59
2.2. La proteïna GAGA	59
2.2.1. Isoformes de GAGA	59
2.2.2. Dominis de GAGA	61
2.2.2.1. El domini POZ/BTB de GAGA	61
2.2.2.2. La regió X	62
2.2.2.3. El domini d'unió a DNA de GAGA	62
2.2.2.4. El domini ric en glutamines o domini Q	64
2.2.3. Funcions de GAGA	64
2.2.3.1. GAGA com a factor de transcripció	64
2.2.3.2. GAGA i la remodelació de la cromatina	65

2.2.3.3. GAGA en la regulació dels gens homeòtics	66
2.2.3.4. GAGA en els <i>insulators</i>	67
2.2.3.5. GAGA i heterocromatina	68
2.3. La proteïna Tramtrack	68
2.3.1. Isoformes de TTK	69
2.3.2. Dominis de TTK	70
2.3.2.1. El domini POZ/BTB de TTK	70
2.3.2.2. El domini d'unió a DNA de TTK	71
2.3.3. Funcions de TTK	72
2.3.3.1. TTK69 i els gens "pair-rule"	72
2.3.3.2. TTK en la regulació del destí neuronal	74
2.3.3.3. Possibles mecanismes d'actuació de TTK	75
III. OBJECTIUS	77
IV. MATERIALS I MÈTODES	81
1. Materials	83
1.1. Enzims i reactius	83
1.2. DNA: plàsmids i oligonucleòtids	83
1.2.1. Plàsmids	83
1.2.1.1. Plàsmids bàsics	83
1.2.1.2. Plàsmids d'expressió de proteïnes en bacteris	84
1.2.1.3. Plàsmids de dos híbrids	85
1.2.1.4. Plàsmids de transfecció a SL2	86
1.2.2. Oligonucleòtids	89
1.3. Proteïnes recombinants	91
1.4. Soques i línies cel.lulars	91
1.4.1. Soques bacterianes d' <i>E. coli</i>	91
1.4.2. Soques de <i>S. cerevisiae</i>	92
1.4.3. Línies cel.lulars eucariotes	92

1.5. Anticossos	92
2. Mètodes	95
2.1. Mètodes de manipulació del DNA	95
2.1.1. Mètodes d'obtenció de DNA	95
2.1.1.1. Minipreparacions de DNA	95
2.1.1.2. Maxipreparacions de DNA	95
2.1.2. Transformació del DNA en bacteris	95
2.2. Tècniques bàsiques de proteïnes	96
2.2.1. Anàlisi de proteïnes per electroforesi en gels de poliacrilamida- SDS (SDS-PAGE)	96
2.2.2. Anàlisi de proteïnes per <i>Western blot</i>	97
2.3. Expressió i purificació de proteïnes recombinants	97
2.3.1. Expressió i purificació de proteïnes fusionades a una cua d'histidines	97
2.3.1.1. Tramtrack69	98
2.3.1.2. GAGA-519	101
2.3.2. Expressió i purificació de proteïnes fusionades a GST	102
2.4. Obtenció i purificació d'anticossos	103
2.4.1. Obtenció d'anticossos policlonals α -TTK	103
2.4.1.1. Preparació de l'antigen	103
2.4.1.2. Immunització	104
2.4.1.3. Processament de la sang	104
2.4.2. Purificació d'anticossos	104
2.4.2.1. Fraccionament o precipitació amb sulfat amònic del sèrum α -TTK	105
2.4.2.2. Purificació per afinitat del sèrum α -TTK	105
2.5. Experiments de co-immunoprecipitació	106
2.6. Assaig d'interacció proteïna-proteïna <i>in vitro</i>: GST-pulldowns	108
2.6.1. <i>In vitro</i> transcripció-traducció en lisat de reticulòcits	108
2.6.2. Preparació de les proteïnes de fusió unides a Glutatió Sepharosa	109

2.6.3. Assaig GST- <i>pulldown</i>	109
2.7. Assaig de dos híbrids a <i>S. cerevisiae</i>	110
2.7.1. Manteniment de les cèl.ules de <i>S. cerevisiae</i>	110
2.7.1.1. Creixement	110
2.7.1.2. Congelació	111
2.7.1.3. Descongelació	111
2.7.2. Transformació dels llevats per acetat de liti	111
2.7.3. Anàlisi de les interaccions per creixement en placa	112
2.8. Mètodes de treball amb SL2	112
2.8.1. Manteniment de les cèl.ules	112
2.8.1.1. Creixement	112
2.8.1.2. Congelació	113
2.8.1.3. Descongelació	113
2.8.2. Transfecció pel mètode de fosfat càlcic	113
2.8.3. Assajos de transcripció a cèl.lules SL2	114
2.8.3.1. Transfecció i preparació dels extractes cel.lulars	114
2.8.3.2. Determinació de les activitats luciferasa i β -galactosidasa	115
2.8.4. Immunolocalitzacions a cèl.ules SL2	116
2.8.5. Extracció àcida d'histones	118
2.9. Mètodes d'anàlisi d'interaccions DNA-proteïna <i>in vitro</i>	119
2.9.1. Marcatge radioactiu dels fragments de DNA	119
2.9.2. Electroforesi en gels de retardament (EMSA)	120
2.9.3. <i>Footprinting</i> amb DNasa I	120
2.9.3.1. Marcador G+A	121
2.9.3.2. Digestió amb DNasa I	121
V. RESULTATS I DISCUSSIÓ	123
1. Estudi de la interacció entre les proteïnes GAGA i TTK	125
1.1. Experiments de co-immunoprecipitació en extractes cel.lulars de SL2	126
1.2. Anàlisi de la interacció GAGA-TTK <i>in vitro</i>: GST-<i>pulldowns</i>	128

1.3. Determinació dels dominis responsables de la interacció: assaig de dos híbrids a <i>S. cerevisiae</i>	130
1.3.1. El sistema de dos híbrids	130
1.3.1.1. Descripció del sistema de dos híbrids	130
1.3.1.2. Components del sistema de dos híbrids	131
1.3.2. Interacció GAGA-TTK	132
1.3.3. Interacció TTK-TTK	134
2. Conseqüències funcionals de la interacció GAGA-TTK: assajos transcripcionals a cèl.lules SL2	137
2.1. El promotor d'<i>even-skipped</i>	137
2.1.1. Regulació de l'expressió d' <i>even-skipped</i>	137
2.1.2. El promotor <i>eve stripe 2</i>	139
2.2. Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de GAGA i TTK en l'activitat del promotor <i>eve stripe 2</i>	140
2.3. Anàlisi de la contribució dels dominis POZ de GAGA i TTK a la repressió per TTK de l'activació dependent de GAGA	144
2.3.1. Estudi de la contribució del domini POZ de TTK: la proteïna $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$	144
2.3.2. Estudi de la contribució del domini POZ de GAGA	147
2.3.2.1. La proteïna $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$	147
2.3.2.2. El sistema heteròleg $\text{GAL4Q}/\text{POZ}_{\text{GAGA}}\text{GAL4Q}$	149
2.4. Caracterització dels dominis de TTK implicats en la repressió	150
2.4.1. La proteïna ΔTTK580	151
2.4.2. La proteïna POZ_{TTK}	151
2.4.3. La proteïna de fusió $\text{POZ}_{\text{TTK}}\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$	154
2.5. Estudi de l'efecte del TSA sobre la repressió per TTK del promotor <i>eve</i> activat per GAGA	157
2.5.1. Efectes del TSA sobre l'acetilació d'histones a SL2	157

2.5.2. Efecte del TSA en la repressió per TTK de l'activació del promotor <i>eve stripe 2</i> mediada per GAGA.	158
2.6. Determinació de les regions del promotor d'<i>eve</i> que medien la repressió per TTK de l'activació mediada per GAGA	160
3. Estudi de la interacció <i>in vitro</i> de GAGA i TTK amb el promotor <i>eve stripe 2</i>	165
3.1. Determinació de les regions del promotor a les quals GAGA i TTK s'uneixen amb més afinitat	166
3.2. Efecte de TTK sobre la unió de GAGA al promotor proximal -185<i>eve</i>	170
3.2.1. Anàlisi per EMSA de la unió de GAGA i TTK a la regió -185 <i>eve</i>	170
3.2.2. Anàlisi per <i>footprinting</i> amb DNasa I de la unió de GAGA i TTK a la regió -185 <i>eve</i>	172
VI. DISCUSSIÓ GENERAL	175
1. La interacció entre GAGA i TTK	177
2. L'efecte repressor de TTK sobre l'activació dependent de GAGA	183
Quines conseqüències pot tenir la repressió per TTK de l'activació dependent de GAGA a <i>Drosophila</i> ?	184
Quin és el mecanisme de la repressió de TTK sobre l'activació dependent de GAGA?	185
VII. CONCLUSIONS	191
VIII. REFERÈNCIES	195
IX. APÈNDIX	221

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

ÍNDIX DE TAULES

Taula I.1. Classificació dels complexos remodeladors de la cromatina.	29
Taula I.2. Principals complexos HAT i les seves funcions relacionades amb la transcripció.	32
Taula M.1. Taula-resum de totes les formes de GAGA i TTK clonades en vectors d'expressió en bacteris, llevats o cèl.lules SL2.	88
Taula D.1. Àrea accessible del solvent (D-asa) i superfície de complementaritat (Sc) dels homodímers i homotetràmers dels dominis POZ de PLZF, GAGA i TTK, i de l'heterodímer i heterotetràmer GAGA-TTK.	178

ÍNDIX DE FIGURES

Figura I.1. Etapes del procés de transcripció que es veuen inhibides per la presència de nucleosomes.	26
Figura I.2. Modificacions post-traduccionals de les cues de les histones.	30
Figura I.3. Possibles models sobre la connexió entre metilació del DNA, desacetilació d'histones i metilació d'histones.	38
Figura I.4. Reclutament de reguladors, complexos HAT i complexos remodeladors en el procés d'activació de la transcripció.	39
Figura I.5. Models suggerits per a l'actuació dels co-repressors Groucho i dCtBP en les repressions de tipus <i>long-range</i> i <i>short-range</i> .	49
Figura I.6. Estructura tridimensional del domini POZ de PLZF.	54
Figura I.7. Alineament de seqüència d'alguns dominis POZ/BTB i l'estructura secundària observada pel domini POZ de PLZF.	55
Figura I.8. Interaccions dímer-dímer en el cristall del POZ de PLZF.	57
Figura I.9. Dominis de les isoformes GAGA-519 i GAGA-581 i seqüència aminoacídica.	60
Figura I.10. Distribució dels llocs d'unió de GAGA en diversos promotors.	63
Figura I.11. Dominis de TTK69 i seqüència aminoacídica.	71

Figura M.1. Seqüència aminoacídica de l'extrem N-terminal de la proteïna TTK69 expressada com a proteïna de fusió amb histidines.	100
Figura R.1. Alineament de seqüència dels dominis POZ de GAGA, TTK i PLZF.	125
Figura R.2. Co-immunoprecipitació de GAGA i TTK a SL2.	127
Figura R.3. Proteïnes utilitzades a l'assaig <i>GST-pulldown</i> .	129
Figura R.4. Assajos <i>GST-pulldown</i> de la interacció de les proteïnes recombinants TTK i Δ POZ _{TTK} amb les proteïnes de fusió a GST.	129
Figura R.5. Representació esquemàtica del sistema de dos híbrids.	131
Figura R.6. Vectors d'expressió de proteïnes del sistema de dos híbrids.	132
Figura R.7. Assaig de dos híbrids de la interacció GAGA-TTK.	134
Figura R.8. Assaig de dos híbrids de la interacció TTK-TTK.	135
Figura R.9. Representació esquemàtica de la regió reguladora del gen <i>even-skipped</i> (<i>eve</i>) compresa entre -6.4 kpb i el lloc d'inici de transcripció.	139
Figura R.10. Representació esquemàtica del promotor <i>eve stripe 2</i> .	140
Figura R.11. Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de GAGA i/o TTK en l'activitat del promotor <i>eve stripe 2</i> .	141
Figura R.12. Anàlisi dels nivells de sobreexpressió de GAGA i TTK en els experiments de transfecció.	142
Figura R.13. Anàlisi de la funció repressora de TTK en el context del promotor 5×GAL4 <i>hsp70</i> UAS.	144
Figura R.14. Anàlisi de la contribució del domini POZ de TTK en la repressió.	145
Figura R.15. Immunolocalitzacions de TTK i Δ POZ _{TTK} a cèl.lules SL2.	146
Figura R.16. Estudi de l'activitat transcripcional de la proteïna Δ POZ _{GAGA} en assajos de transfecció a cèl.lules SL2.	148
Figura R.17. Estudi de la contribució del domini POZ de GAGA en la repressió per TTK en el context del promotor 5×GAL4 <i>hsp70</i> UAS.	150
Figura R.18. Anàlisi de la capacitat repressora de les proteïnes Δ TTK580 i POZ _{TTK} .	152
Figura R.19. Localització de les proteïnes GFP i GFP-POZ _{TTK} a cèl.lules SL2.	153
Figura R.20. Estudi de l'activitat transcripcional de la proteïna POZ _{TTK} Δ POZ _{GAGA} .	155
Figura R.21. Estudi dels efectes de la sobreexpressió de les proteïnes POZ _{TTK} Δ POZ _{GAGA} i Δ POZ _{GAGA} sobre l'activació de GAGA.	156
Figura R.22. Anàlisi dels efectes del TSA sobre l'acetilació d'histones a cèl.lules SL2.	158

Figura R.23. Efecte del TSA en la repressió per TTK de l'activació del promotor <i>eve stripe 2</i> mediada per GAGA.	159
Figura R.24. Estudi de l'efecte de GAGA i TTK sobre l'activitat de diferents delecions del promotor <i>eve stripe 2</i> .	163
Figura R.25. Proteïnes recombinants GAGA i TTK utilitzades en els experiments d'unió a DNA <i>in vitro</i> .	166
Figura R.26. Anàlisi per EMSA de la unió de GAGA als fragments proximal (413), intermedi (666) i distal (680) del promotor <i>eve stripe 2</i> .	168
Figura R.27. Anàlisi per EMSA de la unió de TTK als fragments proximal (413), intermedi (666) i distal (680) del promotor <i>eve stripe 2</i> .	169
Figura R.28. Anàlisi per EMSA de la unió de GAGA i TTK a la regió -185 <i>eve</i> .	171
Figura R.29. Anàlisi per <i>footprinting</i> amb DNasa I de la unió de GAGA i TTK a la regió -185 <i>eve</i> .	173
Figura D.1. Model dels dímers de POZes.	179
Figura D.2. Representació esquemàtica de la formació d'oligòmers del POZ de PLZF d'alt pes molecular a partir dels homodímers.	180
Figura D.3. Model dels tetràmers de POZes.	181
Figura D.4. Models per la unió al DNA dels heterooligòmers GAGA-TTK.	186
Figura D.5. Possibles models per la repressió de TTK sobre l'activació depenent de GAGA.	187
Figura D.6. Posició dels residus no conservats entre els POZes de GAGA i TTK en l'estructura d'un homodímer POZ-POZ.	189

ABREVIATURES

aa	Aminoàcid
BSA	Albúmina de sèrum boví
dNTP	Desoxiribonucleòtids trifosfats
DNasa I	Desoxiribonucleasa
DNMT	DNA metilasa
DO	Densitat òptica
DTT	Ditiotreitòl
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Àcid etilen-diamo-tetracètic
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
HAT	Acetiltransferasa d'histones
HDAC	Desacetilasa d'histones
HMT	Metiltransferasa d'histones
HEPES	Àcid N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfònic
IPTG	Isopropil-b-D-tiogalactopiranosid
kpb	10 ³ parells de bases
kDa	10 ³ Daltons
LB	Luria Bertrani, <i>liquid broth</i>
NP-40	Nonidet P-40
NuRCs	Complexes remodeladors de la cromatina
o/n	<i>Overnight</i>
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i>
pb	Parells de bases
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEV	<i>Position effect variegation</i>
PIC	Complex de preiniciació
PLB	<i>Protein loading buffer</i>
PMSF	Fluor Fenilmetilsulfonil
PSA	Persulfat amònic
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revolucions per minut
SDS	Dodecil sulfat sòdic
T^a	Temperatura
TEMED	N,N,N'-(tetrametil)-etilendiamino
TSA	Trichostatina A
TTK	Tramtrack

II.-INTRODUCCIÓ

1. MECANISMES DE REGULACIÓ DE LA TRANSCRIPCIÓ

1.1. El procés de transcripció a eucariotes

La transcripció és el procés pel qual una RNA polimerasa sintetitza una cadena de RNA a partir d'un DNA motlle. En els organismes eucariotes existeixen tres tipus de RNA polimerases (I, II i III), de les quals la RNA polimerasa II (RNAP II) és la responsable de la síntesi dels mRNAs que codifiquen per proteïnes (així com també d'alguns snRNAs).

La transcripció per una RNA polimerasa determinada està associada a una arquitectura concreta del gen. Així, es poden definir com a gens de classe II aquells que estan regulats per la RNAP II.

1.1.1. Estructura dels promotors Pol II

Els elements de seqüència en *cis* que dirigeixen un programa concret de transcripció per la RNAP II inclouen la regió basal del promotor (*core*) i els elements *enhancer*.

La **regió basal del promotor** (*core promoter*) comprèn les seqüències mínimes que dirigeixen el reclutament de la RNAP II i el lloc d'inici de la transcripció. Els elements del *core* estan situats entre -35 i +35 bases del lloc d'inici de transcripció, i constitueixen llocs de reconeixement pels factors involucrats en l'inici de la transcripció. Aquests elements són variables en seqüència i es poden presentar en forma de diferents combinacions a l'hora de constituir el *core* (revisat a Veenstra i Wolffe, 2001):

- la **caixa TATA**, de seqüència consens TATAAA, està situada al voltant de la posició -25/-30 i és reconeguda de manera específica per la proteïna TBP (*TATA binding protein*).

- l'**element BRE** (*IIB recognition element*), situat a 5' de la caixa TATA i de seqüència consens (G/C)(G/C)(G/A)GGCC, és un element de reconeixement pel factor TFIIB.

- l'**element iniciador (Inr)**, responsable d'assenyalar el lloc d'inici de transcripció (i localitzat al voltant d'aquest), és reconegut per alguns TAFs (*TBP associated factors*) del complex TFIID. A *Drosophila* té com a seqüència consens TCA(T/G)TPyPy.

- l'**element DPE** (*downstream promoter element*), de seqüència consens (A/G)G(A/T)CGTG, va ser identificat originalment en promotors de *Drosophila*, tot i que

també s'ha trobat en alguns promotors de mamífers. Està situat a la posició +30 i constitueix un element de reconeixement per TAFs (Smale, 2001; Butler i Kadonaga, 2001).

Els *enhancers* són elements de reconeixement per a factors de transcripció específics de seqüència. Es caracteritzen per poder activar la transcripció independentment de la seva orientació o distància relativa al lloc d'inici de transcripció. Segons la seva localització, s'han definit dos tipus d'*enhancers*: els *enhancers* proximals, situats entre 50 i centenars de bases a 5' de l'inici de transcripció, i els *enhancers* distals, que es troben fins a milers de kilobases *upstream* o *downstream* de l'inici de transcripció (Orphanides *et al*, 1996; Lemon i Tjian, 2000; Butler i Kadonaga, 2001). El mecanisme pel qual funcionen aquests *enhancers* distals és encara un interrogant, tot i que s'han descrit alguns models que proposen la formació de *loops* de DNA, deslliçament de proteïnes al llarg del DNA o la generació de grans dominis cromatínics que facilitarien o impedirien l'activació gènica (Mahmoudi *et al*, 2002).

De manera anàloga als *enhancers*, es poden definir també com a *silencers* els elements de reconeixement per moduladors negatius de la transcripció (repressors); poden estar també situats en regions properes o llunyanes a l'inici de transcripció segons el mode d'actuació del repressor (veure apartat 1.3.2.2: *long/short-range repression*).

El fet de poder trobar seqüències reguladores molt llunyanes a l'inici de transcripció així com dins la seqüència codificant fa realment difícil poder definir els límits d'un promotor. No obstant, sí que s'empra sovint el terme de **promotor proximal** com la regió compresa fins a centenars de bases del lloc d'inici de transcripció i que conté elements de seqüència reconeguts per factors moduladors de la transcripció.

1.1.2. Transcripció basal

La **transcripció basal** es defineix com el procés de transcripció que té lloc *in vitro* en presència de l'aparell de transcripció basal, constituït pels factors generals de transcripció (GTFs) i la RNAP II. En aquest context, la presència de molècules reguladores (activadors o repressors) que s'uneixen a seqüències concretes del promotor, donarà lloc a una transcripció activada o reprimida (Orphanides *et al*, 1996).

A la cèl.lula, aquesta divisió entre transcripció basal i activada no té cap sentit: l'empaquetament del DNA en forma de cromatina provoca una repressió generalitzada, i només la presència d'activadors induirà l'expressió d'un gen concret. Per tant, *in vivo* només es pot parlar de transcripció activada.

No obstant, els estudis de transcripció basal *in vitro* han permès obtenir una visió seqüencial de la mecànica del procés. D'aquests estudis sorgí la divisió del procés de transcripció en tres etapes: iniciació, elongació i "terminació". La **iniciació** comprèn en primer lloc una primera fase anomenada preiniciació, en la qual els GTFs s'uneixen al promotor basal i recluten la RNAP II, formant el complex de preiniciació (PIC). Una vegada el PIC està ensamblat al promotor, es separen les cadenes de DNA (*promoter melting*) de

forma dependent d'ATP, i la RNAP II sintetitza el primer enllaç fosfodièster del mRNA naixent. La transició iniciació-**elongació** inclou un alliberament de la RNAP II del promotor (*promoter clearance*), acompanyat d'una hiperfosforilació de la CTD de la RNAP II. A partir d'aleshores, la RNAP II s'associa a factors d'elongació que, juntament amb altres factors reguladors, facilitaran la transcripció del mRNA. La “**terminació**” pròpiament dita culmina amb el final de la síntesi del mRNA per part de la RNAP II. El processament d'aquest pre-mRNA (*5' capping*, *splicing* i alliberament de la cua poli-A) s'ha observat que té lloc co-transcripcionalment, i les reaccions que el constitueixen estan coordinades i interconnectades amb el procés de transcripció (Proudfoot *et al*, 2002).

1.1.3. Iniciació

Les característiques principals dels components de la maquinària transcripcional durant el procés d'iniciació es descriuen a continuació:

1.1.3.1. RNA polimerasa II (RNAP II)

La RNAP II, constituïda per 12 subunitats, pot catalitzar inespecíficament la síntesi d'un RNA a partir d'un DNA motlle, però requereix dels GTFs per reconèixer de forma específica un promotor.

Un dels elements clau de la RNAP II, tant en la regulació de la transcripció com en la coordinació co-transcripcional de les reaccions de processament del mRNA, és el domini C-terminal (CTD) de la subunitat major Rpb1. El **domini CTD** és hiperfosforilat (forma IIA) quan la RNAP II està elongant de forma activa, mentre que per iniciar la transcripció ha d'estar defosforilat (forma IIO). Aquesta fosforilació permet que la RNAP II s'alliberi del promotor i els GTFs, però no afecta a la seva capacitat d'elongació.

Hi ha descrites diverses **CTD quinases**: la cdk8/ciclinaC del “Mediator”, que fosforila la CTD abans de l'ensamblatge del PIC (Hampsey i Reinberg, 1999); la cdk7 del TFIIH, clau en la transició iniciació-elongació; i el pTEF-b, factor d'elongació responsable de retornar a l'estat actiu la RNAP II després de l'addició del *capping*. Com a **CTD fosfatasa** només es coneix la Fcp1, reponsible de reciclar la forma fosforilada de la RNAP II (Woychik i Hampsey, 2002).

A més de ser sensible a fosforilació, el domini CTD és també un lloc d'interacció amb altres factors moduladors de la transcripció (“Mediator” o “Elongator”) o el processament del mRNA (Proudfoot *et al*, 2002). Així doncs, el CTD serveix com a plataforma per a l'ensamblatge ordenat dels factors responsables de la transcripció i processament del mRNA durant les diferents etapes de síntesi del transcrit (Orphanides i Reinberg, 2002).

1.1.3.2. Factors generals de transcripció o GTFs

• TFIID:

El complex TFIID està constituït per la TBP (*TATA binding protein*) i uns deu TAF_{II}s (*TBP-associated factors*).

La TBP s'uneix específicament a les caixes TATA dels promotors, un pas que s'ha descrit com el més limitant de tota la regulació de la transcripció (Colgan i Manley, 1992).

Els TAF_{II}s, no requerits en la transcripció basal, van ser descrits inicialment com a co-activadors que mediaven la interacció entre activadors transcripcionals i la maquinària basal (Verrijzer i Tjian, 1996); no obstant, recentment s'ha pogut descriure activació independent de TAF_{II}s (Oelgeschlager *et al*, 1998), posant en dubte el paper essencial dels TAF_{II}s com a co-activadors. D'altra banda, degut a la capacitat d'alguns TAF_{II}s d'unir-se a als elements Inr i DPE del promotor i al seu requeriment en promotors sense caixa TATA, es considera que una de les funcions més importants dels TAF_{II}s seria la de reclutar la TBP en promotors sense TATA (Orphanides *et al*, 1996; Woychik i Hampsey, 2002). S'ha proposat també que la unió al DNA d'alguns TAF_{II}s (*histone-like* TAF_{II}s) podria ser en forma d'un octàmer similar a les histones, i de fet recentment s'ha aconseguit reconstituir un octàmer de TAFs *in vitro* (Selleck *et al*, 2001), però es desconeix si *in vivo* també adoptarien aquesta estructura. Aquests *histone-like* TAF_{II}s no són específics per TFIID, sinó que també formen part de complexes acetiltransferasa d'histones com SAGA, PCAF o TFTC, havent-se suggerit un paper d'aquests TAF_{II}s com a elements *core* de múltiples complexes. L'únic TAF_{II} al que se li ha descrit activitat enzimàtica és el TAF_{II}250, concretament activitat quinasa (es pot autofosforilar i fosforilar la subunitat RAP74 de TFIIF) i acetiltransferasa d'histones.

• TFIIB:

El segon pas de la iniciació és el reconeixement del complex TFIID-DNA per TFIIB i la formació d'un complex ternari TFIIB-TFIID-DNA molt estable. Degut a que TFIIB té llocs d'unió per RNAP II i TFIIF, s'ha proposat que TFIIB participa en el reclutament de la RNAP II i en la determinació precisa del lloc d'inici de la transcripció (revisat a Orphanides *et al*, 1996). No obstant, estudis molt recents suggereixen que la unió de TFIIB a l'element BRE de fet reprimiria la transcripció basal, essent la disrupció de la interacció BRE-TFIIB per part d'un activador (TFIIB és una diana per alguns activadors àcids o rics en glutamines) un mecanisme d'activació gènica (Evans *et al*, 2001).

• TFIIA:

TFIIA també s'uneix al complex TFIID-DNA i incrementa l'estabilitat de TBP per l'element TATA independentment de TFIIB (Imbalzano *et al*, 1994). Associada a aquesta funció estabilitzadora, a TFIIA se li ha atribuït també una funció antirepressora, que implicaria un desplaçament de factors que estan units al DNA tant de forma específica (repressors específics) com inespecífica.

- **TFIIF:**

TFIIF és un heterotetràmer format per dues subunitats grans (TFIIF α /RAP74) i dues de petites (TFIIF β /RAP30) que participen en diferents estadis de la iniciació i l'elongació. En la iniciació, TFIIF s'associa amb la RNAP II per incrementar l'eficiència de reclutament d'aquesta. A més a més, també té una funció desestabilitzadora d'interaccions RNAP II-DNA inespecífiques, evitant una iniciació expúria (Woychik i Hampsey, 2002). La funció de TFIIF durant l'elongació, en la qual hi participa activament augmentant-ne la velocitat, és totalment depenent de la subunitat RAP74. Concretament, una de les accions que se li han atribuït a RAP74 durant l'elongació és la d'estimular la Fcp1 CTD fosfatasa (Svejstrup *et al*, 1996).

L'activitat de TFIIF és regulada per fosforilació de la subunitat RAP74 (pot ser fosforilada per diferents quinases, una d'elles TAF $_{II}$ 250), una modificació que augmenta la velocitat d'iniciació i elongació *in vitro* (Orphanides *et al*, 1996).

- **TFIIE:**

Les funcions de TFIIE en la transició iniciació-elongació estan molt lligades a TFIIF: per una banda, la seva incorporació al PIC després de TFIIF (via interacció amb la forma IIA de la RNAP II) és imprescindible pel posterior reclutament del complex TFIIF; i per altra banda, té una funció reguladora de les activitats quinasa i helicasa/ATPasa de TFIIF (Roeder, 1996; Woychik i Hampsey, 2002).

- **TFIIF:**

TFIIF consta de nou subunitats organitzades en dos subcomplexes (*core*-TFIIF i un complex ciclina-quinasa (CAK)). És un complex multifuncional, ja que a més de la seva funció associada a la transcripció participa en processos de reparació de DNA i control del cicle cel.lular.

En la transcripció, TFIIF hi té un paper essencial en la transició iniciació-elongació. En primer lloc, actua en la separació de les cadenes de DNA després de l'ensamblatge del PIC (*promoter melting*) utilitzant l'activitat helicasa depenent d'ATP d'una de les seves subunitats (XPB). I posteriorment, la subunitat cdk7 del mateix complex fosforila el domini CTD de la RNAP II, donant lloc a una forma IIO que es pot desenganxar del promotor (*promoter clearance*) i iniciar l'elongació (Orphanides *et al*, 1996).

1.1.3.3. El "Mediator"

Inicialment, el "Mediator" es va descriure com un complex co-activador íntimament associat a la RNAP II que mediava la interacció entre activadors i maquinària transcripcional durant el procés d'iniciació. No obstant, també s'ha observat que en determinats casos pot exercir com a co-repressor, i per això es considera que el complex "Mediator" de fet actuaria com un element integrador de moltes i diverses senyals reguladores que són transmeses a la maquinària de la RNAP II (Woychik i Hampsey, 2002). La seva interacció amb la RNAP II

és a través de la CTD en estat defosforilat (IIA), amb la qual hi està associada durant tot el procés d'iniciació.

S'han aïllat complexos "Mediator" de varis d'organismes, i s'ha pogut observar que la composició i organització d'aquests es troba àmpliament conservada des de llevats a humans. Un dels més estudiats és el "Mediator" de llevats, format per unes ~20 subunitats organitzades en 3 subcomplexos: el mòdul Gal11, el mòdul Med9/10 (responsable de la interacció amb CTD) i el mòdul Srb4. Per la seva banda, a mamífers s'han pogut identificar varis complexos que actuen com a "Mediator": TRAP/SMCC, ARC/DRIP, mMED, NAT, hSURC2, CRSP i PC2 (revisat a Boube *et al*, 2002).

1.1.4. Elongació i reiniciació

El procés d'elongació *in vitro* és discontinu i més lent que *in vivo* degut a que és interromput per una sèrie de pauses i detencions. Aquest fet evidencia la importància de l'existència de factors que evitin aquestes pauses i detencions *in vivo*, sobretot en els processos d'elongació de gens extremadament llargs (Reines *et al*, 1996). S'han descrit dos tipus de factors que participen en l'elongació: factors generals i factors reguladors (que serien els activadors o repressors que modulen l'elongació).

Alguns factors generals d'elongació actuen evitant la detenció de la RNAP II, com seria el cas de p-TEFb (quinasa de la CTD) i el TFIIS. Altres factors, com el TFIIF i el complex Elongin (SIII), augmenten la velocitat d'elongació suprimint les pauses (Reines *et al*, 1996).

A més dels factors anteriors s'han identificat també els *Chromatin elongation factors*, que facilitarien el procés d'elongació a través dels nucleosomes (veure apartat 1.2.5). Aquests factors són tres complexos anomenats "Elongator", FACT i Spt4/Spt5/DSIF (Svejstrup, 2002). D'aquests tres, l'"Elongator" va ser aïllat a partir de la caracterització del complex de la RNAP II en estat d'elongació, i sembla ser que només s'associa a la forma fosforilada IIO (elongant) de la RNAP II, havent-se descrit com un co-activador que substitueix al "Mediator" durant d'elongació (Orphanides i Reinberg, 2000).

Durant el procés de transcripció d'un gen varies polimerases transcriuen al mateix temps, de tal manera que mentre una està en la fase d'elongació, una de nova s'incorpora al promotor, i així successivament. Aquests processos consecutius de reiniciació són però més ràpids que la primera iniciació, degut a que alguns GTFs com TFIID, TFIIB, TFIIF, TFIIE i TFIIH es queden units al promotor. Així, quan arriba la següent polimerasa, es pot formar ràpidament el complex PIC i de seguida es torna a iniciar la transcripció.

1.2. La transcripció en presència de cromatina

1.2.1. Efectes de l'estructura de la cromatina en la transcripció

1.2.1.1. Els nucleosomes i la cromatina

El DNA dels genomes eucariotes té una mida d'uns 6×10^9 pb que s'empaqueten dins el nucli en forma d'una estructura nucleoproteica altament organitzada i compactada, la cromatina. La unitat repetitiva bàsica de la cromatina són els nucleosomes (Kornberg, 1974), els quals estan formats per tres elements: el **core del nucleosoma**, que consisteix en 146 pb enrotllats en 1.65 voltes al voltant d'un octàmer d'histones (format per un tetràmer central $(H3)_2(H4)_2$ flanquejat per dos heterodímers H2A/H2B); la **histona linker H1** (o variants d'aquesta); i el **DNA linker** entre els *cores* de nucleosomes (Workman i Kingston, 1998; Kornberg i Lorch, 1999).

Les histones, que es troben al nucli a una relació de massa 1:1 amb el DNA, tenen un paper fonamental en el manteniment de l'estat empaquetat de la cromatina. Són proteïnes petites formades per un domini estructurat de tipus *histone-fold* (que media les interaccions histona-DNA així com la dimerització entre histones) i dues "cues" no estructurades i carregades positivament d'uns 15-30 residus que corresponen a les seves regions N i C-terminal i sobresurten del *core* del nucleosoma. Aquestes cues de les histones, pel fet de ser dominis desestructurats i estendre's enfora del nucli nucleosomal, semblen tenir un paper essencial en les interaccions entre nucleosomes necessàries per la formació de la fibra de cromatina (Björklund *et al.*, 1999; Kornberg i Lorch, 1999).

Les estructures d'ordre superior al nucleosoma fins al màxim estat de compactació que és el cromosoma mitòtic encara no estan ben definides. No obstant, sí que es pot parlar de l'existència d'estructures secundàries, formades per interaccions entre nucleosomes, que poden ser de tipus global (representades per les fibres de cromatina de 30 nm) com local (ensamblatge d'alguns nucleosomes amb complexos reguladors i/o transcripcionals) (revisat a Woodcock i Dimitrov, 2001).

1.2.1.2. Paper repressor dels nucleosomes i la cromatina

La presència de nucleosomes reprimeix l'expressió gènica per inhibició de diferents etapes de la transcripció (figura I.1): en primer lloc, els nucleosomes impedeixen que els activadors s'uneixin a *enhancers* i regions promotores; en segon lloc, la presència de nucleosomes obstaculitza l'ensamblatge del PIC en el lloc d'inici de transcripció; i finalment, el pas de la maquinària de la RNAP II a través del DNA durant l'elongació es veu dificultada per la presència dels nucleosomes, resultant en un increment de les pauses de la polimerasa. Aquests impediments que imposen els nucleosomes en el procés de transcripció impliquen que sigui necessari un desplaçament o rearranjament temporal dels octàmers d'histones per tal que el procés de transcripció sigui productiu (Workman i Kingston, 1998).

A més del paper repressor dels nucleosomes en la fibra de cromatina primària, l'empaquetament de la cromatina en estructures d'ordre superior també té una importància crítica. Concretament, modificacions post-traduccionals de les histones i l'ús de variants tant de la histona *linker* com de les histones del *core* semblen tenir un profund efecte sobre l'estat de condensació dels nucleosomes en la fibra cromatínica de 30 nm. Una de les modificacions que tenen més importància a aquest nivell és l'estat acetilat/desacetilat de les cues de les histones H3 i H4, essent l'estat acetilat el responsable de la desestructuració de la fibra de cromatina i l'estat hipoacetilat el que mantindria la fibra empaquetada (Farkas *et al*, 2000).

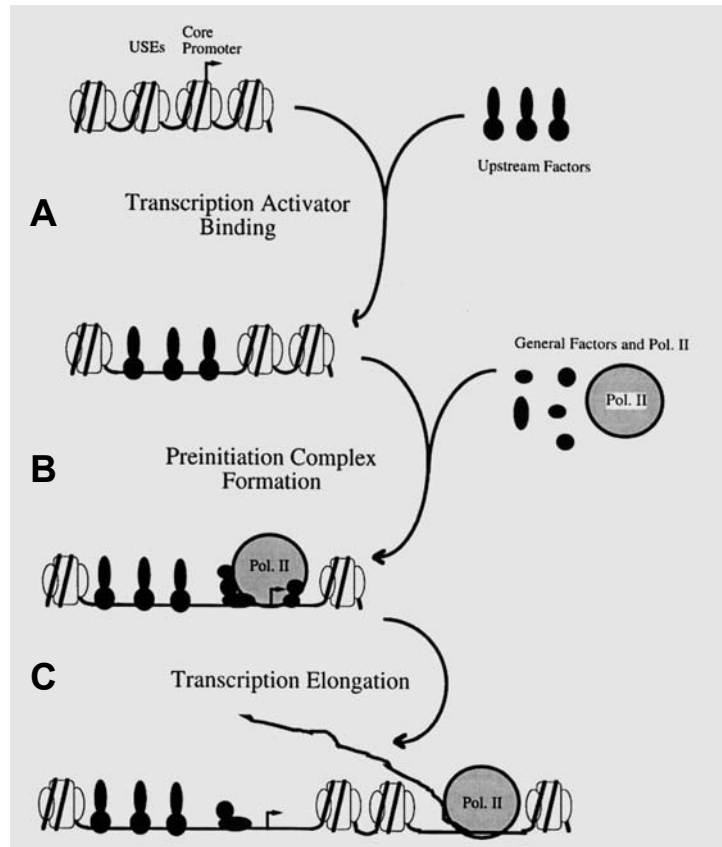


Figura I.1. Etapes del procés de transcripció que es veuen inhibides per la presència de nucleosomes. **A.** Unió dels activadors transcripcionals a elements *enhancer*. **B.** Formació del complex de preiniciació al lloc d'inici de transcripció. **C.** Moviment de la maquinària transcripcional a través del DNA motlle durant el procés d'elongació. Per tal que aquestes tres etapes siguin productives, és necessària una reorganització nucleosomal en els llocs estratègics on s'esdevenen aquests processos (extret de Workman i Kingston, 1998).

1.2.1.3. Eucromatina i heterocromatina

La major part dels gens transcripcionalment actius del genoma formen part de l'**eucromatina**, un estat dinàmic de la cromatina i sensible a sofrir modificacions constants que es caracteritza per la presència de llocs DH (llocs hipersensibles a DNasa I), nucleosomes irregulars i una hiperacetilació de les histones. En contraposició, l'**heterocromatina**, que inclou totes aquelles regions del genoma que no es transcriuen (bàsicament seqüències repetitives, gens silenciats i alguns gens induïbles), presenta un

espaiament regular dels nucleosomes i un alt grau de compactació que es manté al llarg de tot el cicle cel.lular. Hi ha 3 modificacions que caracteritzen l'heterocromatina, dues d'elles a les histones, i que són responsables de mantenir aquest estat altament empaquetat (revisat a Richards i Elgin, 2002):

- hipoacetilació dels residus de lisina de les histones H3 i H4 per la desacetilasa Sir2.
- metilació de la lisina 9 de la histona H3 (H3-mK9), duta a terme per la metilasa Su(var)3-9 i reconeguda específicament pel *chromodomain* de la proteïna HP1 (Bannister *et al*, 2001), una unió essencial per a la compactació de l'heterocromatina.
- metilació de citosines (5-metilcitosina) per DNA metilases.

Estudis de variegació han evidenciat des de fa temps que les barreres entre eucromatina i heterocromatina actuen com a interfase en la qual l'estat reprimint heterocromàtic es pot estendre (Grewal i Elgin, 2002). L'exemple més clar estaria en la *position effect variegation* (PEV), un fenomen que consisteix en l'expressió variegada d'un gen quan està inserit (per rearranjament cromosòmic o transposició) prop d'una zona heterocromàtica. Aquest efecte estaria modulats per *enhancers* E(var) o *suppressors* Su(var) de la PEV. Els *suppressors* són proteïnes que normalment col.laboren a augmentar l'expansió de l'heterocromatina, i per tant quan estan mutades suprimeixen aquesta expansió (disminueix la PEV); exemples clàssics de *suppressors* serien els gens que codifiquen per HP1, Su(var)3-9 i gens del grup *Polycomb*. Per la seva banda, els *enhancers* corresponen a proteïnes que normalment actuen disminuint l'heterocromatinització, i per tant quan estan mutades té lloc un augment de l'expansió de l'heterocromatina (augmenta la PEV); alguns dels *enhancers* més coneguts corresponen als gens que codifiquen per la desacetilasa Rpd3, la subunitat ATPasa *Brahma* de complexes remodeladors de tipus SWI2/SNF2, o a gens del grup *Trithorax*.

A *Drosophila* s'han identificat grans dominis eucromàtics que moltes vegades presenten estats de compactació similars a l'heterocromatina, tot i que són susceptibles a transicions entre els estats de condensació i descondensació. El grau de compactació que presentin, regulat per grans complexes proteics que actuen sobre la cromatina, determinarà l'estat actiu o inactiu del gen. Un dels exemples més coneguts correspon a la regulació de l'expressió dels gens homeòtics als complexes Bithorax (BX-C) i Antennapedia (ANT-C) per proteïnes del grup *Polycomb* (*PcG*) i del grup *Trithorax* (*TrxG*). Concretament, les proteïnes *PcG* s'encarreguen de mantenir la repressió de determinades regions compactant la cromatina, mentre les proteïnes *TrxG* participen en el manteniment d'estats transcripcionalment actius afavorint la descondensació de la cromatina (Farkas *et al*, 2000).

1.2.2. Complexes remodeladors de la cromatina

Els complexes remodeladors de la cromatina depenents d'ATP (NuRCs) alteren l'estructura de la cromatina a nivell local, ja sigui per canvis en el posicionament dels nucleosomes, o bé per canvis conformacionals dels nucleosomes. Aquesta remodelació dels

nucleosomes incrementa l'accessibilitat del DNA nucleosomal a factors reguladors, tant activadors com repressors, facilitant així tant processos d'activació com de repressió (revisat a Narlikar *et al*, 2002). Els complexos remodeladors tenen una subunitat ATPasa, responsable principal de la seva activitat remodeladora, segons la identitat de la qual els complexos remodeladors es poden classificar en tres famílies (taula I.1):

Família SWI2/SNF2. Tenen una subunitat ATPasa de tipus Swi2/Snf2 o homòloga que es caracteritza per un domini DNA helicasa/ATPasa i un *bromodomain* (domini de reconeixement d'acetil-lisines).

Família ISWI. Tenen una subunitat ATPasa de tipus ISWI, a la qual, a més del domini DNA helicasa/ATPasa se li ha identificat un domini de tipus SANT, que podria estar implicat en unió a DNA (Marmorstein, 2001).

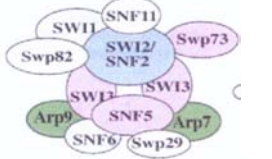
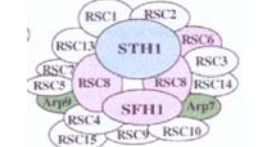
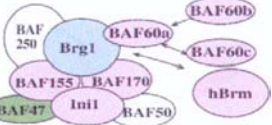
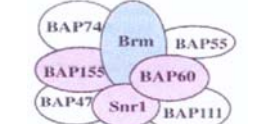
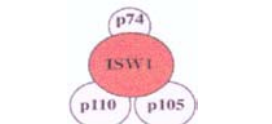



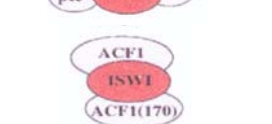
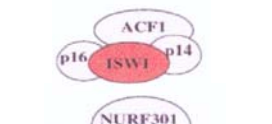
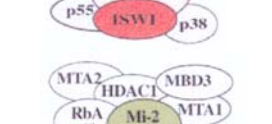
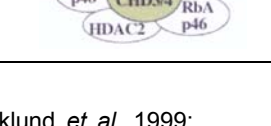

Família Mi-2/CHD. La subunitat ATPasa és Mi-2, formada per un motiu DNA helicasa/ATPasa, dos dominis de tipus *chromodomain* (diferents del d'HP1) i un domini PHD o un altre domini d'unió a DNA. La presència de dues subunitats que corresponen a desacetilases d'histones (HDAC1 i 2) converteixen a NuRD en un complex amb una doble capacitat remodeladora i desacetilasa, essent l'activitat remodeladora requerida per la desacetilació (Tyler i Kadonaga, 1999).

Els complexos remodeladors faciliten l'accessibilitat del DNA nucleosomal a d'altres factors bàsicament per dos mecanismes: l'*sliding* de nucleosomes o el canvi conformacional. El deslliçament o *sliding* de nucleosomes, que implica un canvi en la posició translacional de l'octàmer d'histones, és un mecanisme comú en les tres famílies de NuRCs. En canvi, la inducció de canvis conformacionals en el DNA i/o les histones del nucleosoma sense deslliçament de l'octàmer d'histones, però involucrant canvis topològics del DNA, és un mecanisme exclusiu de la família SWI2/SNF2 (Travers, 1999; Narlikar *et al*, 2002).

Les subunitats no ATPases que constitueixen els complexos remodeladors són importants en la regulació de l'activitat del complex, tant modulant l'activitat ATPasa com localitzant els complexos remodeladors a promotors específics directament o via interaccions amb activadors/repressors transcripcionals (Narlikar *et al*, 2002). Així, tot i que la subunitat ATPasa ISWI és capaç de dur a terme per ella mateixa la remodelació de nucleosomes (Corona *et al*, 1999), les altres subunitats que configuren el complex n'incrementen l'eficiència de remodelatge i l'especificitat de substrat. Un exemple seria la subunitat NURF301 del complex NURF, la qual té una funció dual de facilitar l'*sliding* de nucleosomes i mediar el reclutament del complex via factors de transcripció (Xiao *et al*, 2001).

S'han identificat varis mecanismes a través dels quals es regula l'activitat dels complexos remodeladors (Peterson, 2002):

(a) reclutament actiu d'activadors o repressors transcripcionals (SWI/SNF, per exemple, interacciona amb dominis àcids d'alguns activadors, i Mi-2 amb alguns repressors).

Complexes remodeladors de la cromatina dependents d'ATP				
Complex	Nom	Organisme	Subunitat ATPasa	Composició del complex
Família SWI2/SNF2				
SWI/SNF	<i>Switching mating type sucrose fermenting</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Swi2/Snf2	
RSC	<i>Remodels the structure of chromatin</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Sth1	
BAF o hSWI/SNF	<i>BRG1-associated factors</i>	<i>H. Sapiens</i>	Brg1	
Complex Brahma o dSWI/SNF		<i>Drosophila</i>	Brahma	
Família ISWI				
ISW1		<i>S. cerevisiae</i>	ISW1	
ISW2		<i>S. cerevisiae</i>	ISW2	
RSF	<i>Remodeling and spacing factor</i>	<i>H. Sapiens</i>	hSNF2h	
hACF/WCRF	<i>ATP-utilizing chromatin assembly and spacing factor</i>	<i>H. Sapiens</i>	hSNF2h	
hCHRAC	<i>Chromatin accessibility complex</i>	<i>H. Sapiens</i>	hSNF2h	
ACF	<i>ATP-utilizing chromatin assembly and spacing factor</i>	<i>Drosophila</i>	ISWI	
CHRAC	<i>Chromatin accessibility complex</i>	<i>Drosophila</i>	ISWI	
NURF	<i>Nucleosome remodeling factor</i>	<i>Drosophila</i>	ISWI	
Família Mi-2				
hNuRD	<i>Nucleosome remodeling and deacetylase complex</i>	<i>H. Sapiens</i>	Mi-2 α /CHD3, Mi2 β /CHD4	

Taula I.1. Classificació dels complexos remodeladors de la cromatina. (extret de Björklund *et al*, 1999; Narlikar *et al*, 2002 i altres).

(b) bloqueig de la unió del complex remodelador de la cromatina, una paper que compartien la histona *linker* H1 (els NuRCs no es poden unir a estructures nucleosomals que contenen la histona H1) i les proteïnes PcG (una vegada reclutats productes PcG als loci PRE -elements de resposta a *Polycomb*- es mantenen els patrons de repressió transcripcional al llarg del desenvolupament degut a que impedeixen la unió dels complexos remodeladors).

(c) inactivació dels complexos (la fosforilació d'algunes subunitats del complex SWI/SNF inactiva l'enzim).

1.2.3. Modificacions post-traduccionals de les histones

Les cues N i C-terminal de les histones són uns dominis desestructurats i flexibles que sobresurten del nucleosoma, proporcionant una superfície exposada per interaccions potencials amb altres proteïnes (Strahl i Allis, 2000). Tot i que són dispensables per a la formació del nucleosoma, són essencials en les interaccions entre nucleosomes per formar la fibra de cromatina i, com ja s'ha comentat anteriorment, per establir la cromatina transcripcionalment repressiva (heterocromatina) (Zhang i Reinberg, 2001).

Les cues de les histones contenen varis residus conservats que són susceptibles a una varietat de modificacions post-traduccionals que inclouen acetilació, fosforilació, metilació, ADP-ribosilació i ubiquitinització (Goll i Bestor, 2002) (figura I.2). Donat el nombre de llocs potencialment modificables i la varietat d'aquestes modificacions, s'ha proposat l'existència d'un **codi d'histones** que postula que les modificacions a la mateixa o a diferents cues de les histones són interdependents i generen una determinada combinació que és "llegida" per proteïnes o complexos proteics que intervenen en la formació d'estructures de la cromatina d'ordre superior o en processos d'activació/inactivació gènica (Strahl i Allis, 2000; Jenuwein i Allis, 2001).

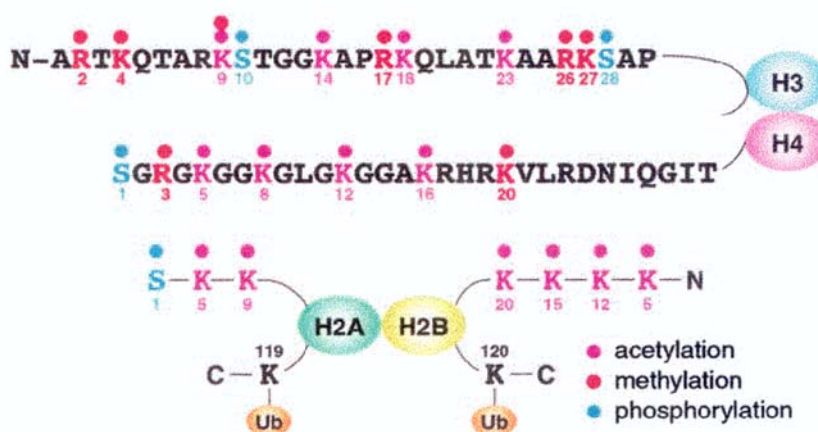


Figura I.2. Residus de les cues de les histones humanes H2A, H2B, H3 i H4 sensibles a ser modificats post-traduccionalment per acetilació (rosa), metilació (vermell), fosforilació (blau) o ubiquitinització (taronja). Extret de Zhang i Reinberg, 2001.

D'acord amb aquesta hipòtesi, s'han identificat una sèrie de dominis proteics, presents en proteïnes que participen en la regulació de la transcripció i/o estructuració de la cromatina que reconeixen de manera específica aquestes modificacions de les histones (Jenuwein i Allis, 2001; Marmorstein, 2001). Els exemples més coneguts són el *bromodomain* i el *chromodomain*. El ***bromodomain*** interacciona específicament amb lisines acetilades i és present en acetiltransferases d'histones (PCAF, p300/CBP o TAF_{II}250) i en complexos remodeladors (a la subunitat ATPasa Swi2/Snf2). Per la seva banda, el ***chromodomain***, és present en diverses proteïnes com Polycomb, Mi-2, Su(var)3-9 i HP1, tot i que només en el cas d'HP1 s'ha observat que reconeix específicament la metilació de la lisina 9 de la histona H3.

Aquest reconeixement específic de les modificacions de les histones és també doncs un element clau a l'hora d'explicar la influència que pot tenir una modificació pre-existent en el reclutament d'altres activitats modificadores.

1.2.3.1. Acetilació/desacetilació d'histones

L'acetilació dels grups ϵ -amino de les lisines disminueix l'afinitat de les cues de les histones pel DNA carregat negativament, contrarrestant la tendència dels nucleosomes a formar estructures d'ordre superior i fent que la cromatina sigui més accessible a proteïnes d'unió a DNA (Rice i Allis, 2001; Eberharter i Becker, 2002); altres estudis recents suggereixen que l'acetilació també comportaria una alteració de l'estructura de les histones incrementant-ne el contingut en α -hèlix (Wang *et al*, 2000).

L'acetilació de les histones la duen a terme acetiltransferases (**HATs**), algunes de les quals havien estat inicialment identificades com a co-activadors que modulaven l'accés d'activadors als promotors i estimulaven l'inici de la transcripció (Lee *et al*, 1993; Nightingale *et al*, 1998); anàlogament, proteïnes identificades originalment com a co-repressors s'ha demostrat que tenen activitat desacetilasa d'histones (**HDACs**) i el seu reclutament és necessari en molts processos de repressió (Kadosh i Struhl, 1998).

Tot i que durant molt de temps s'han relacionat processos d'acetilació amb activació i processos de desacetilació amb repressió, no sempre existeix una correlació tan directa, i fins i tot s'han trobat algunes excepcions en què l'acetilació té com a conseqüència una repressió transcripcional (Jenuwein i Allis, 2001). De fet, s'ha suggerit que l'acetilació *per se* no comporta una activació, sinó que serveix com a senyal pel reclutament d'altres activitats modificadores o complexos remodeladors de la cromatina (Eberharter i Becker, 2002).

• **Acetiltransferases d'histones (HATs)**

Les HATs estan agrupades en dues grans categories: les HATs de tipus A (nuclears), que acetilen les histones cromosomals i participen en processos de regulació de la transcripció, i les HATs de tipus B (citoplasmàtiques), que s'encarreguen d'acetilar les histones H3 i H4 sintetitzades *de novo* per ser dipositades al DNA després de la replicació (Workman i Kingston, 1998).

Complexes HAT i la seva funció relacionada amb la transcripció			
Complex HAT	Subunitat catalítica	Organisme	Activitat HAT i paper en la transcripció
	p300/CBP	<i>H. sapiens</i>	Regulador transcripcional global Activitat HAT estimula la transcripció <i>in vivo</i> Acetila H2A, H2B, H3 nucleosomals i factors de transcripció
	SCR1/ACTR	<i>H. sapiens</i>	Transcripció depenent de receptors nuclears
Complex PCAF	PCAF	<i>H. sapiens</i>	Interacció amb p300/CBP, SCR1/ACTR i activadors Activitat HAT estimula la transcripció <i>in vivo</i> Acetila H3 i factors de transcripció
STAGA/TFTC	GCN5L	<i>H. sapiens</i>	Pot substituir TFIID en la transcripció Acetila H3 nucleosomal
TFIIIC	p220, p110, p90	<i>H. sapiens</i>	Essencial per la transcripció RNAP III Acetila H2A, H3 i H4 nucleosomals
TFIID	hTAF _{II} 250 dTAF _{II} 230 yTAF _{II} 130	<i>H. sapiens</i> <i>D. melanogaster</i> <i>S. cerevisiae</i>	Subunitat del complex TFIID Acetila H3, H4 i factors de transcripció
SAGA	GCN5	<i>S. cerevisiae</i>	Interacciona amb dominis d'activació acídics i TBP Activitat HAT estimula la transcripció Acetila H3 i H2B nucleosomals
ADA	GCN5	<i>S. cerevisiae</i>	Acetila H3 i H2B nucleosomals
NuA3	?	<i>S. cerevisiae</i>	Acetila H3 nucleosomal
NuA4	ESA1	<i>S. cerevisiae</i>	Interacciona amb dominis d'activació acídics Activitat HAT estimula la transcripció <i>in vitro</i> Acetila H4 nucleosomal i H2A
Elongator	ELP3	<i>S. cerevisiae</i>	Elongació de la transcripció Acetila histones H2A, H2B, H3 i H4

Taula I.2. Principals complexos HAT i les seves funcions relacionades amb la transcripció (extret de Brown *et al*, 2000 i altres).

S'han identificat sis famílies de proteïnes HAT de tipus A, les quals només tenen en comú el domini HAT responsable de la unió al cofactor Acetil-CoA i de l'activitat acetiltransferasa:

Gcn5/PCAF: y-hGcn5, hPCAF.

CBP/P300: hCBP/p300.

MYST: ySas2, ySas3, yEsa1, dMOF, hTip60, hMOZ, hHB01.

TAF_{II}250: y-hTAF_{II}250

SRC: hSRC-1, hACTR/AIB1/pCIP/TRAM-1/RAC-3, hSRC-3, hTIF-2, hGRIP-1, hATF-2.

GNAT: yElp-3, yHpa-2, y-hHAT1, yTFIIIC.

Tot i que algunes d'elles tenen activitat acetiltransferasa *in vitro*, *in vivo* formen part de grans complexos que difereixen tant en composició, especificitat d'acetilació com en funcions biològiques en què estan involucrats (Marmorstein i Roth, 2001). Les subunitats no HATs d'aquests complexos participen en el seu reclutament cap a gens concrets via interacció amb factors reguladors i també modulen l'activitat acetilasa del complex. A la taula **I.2** es descriuen els complexos HAT descrits i la seva funció relacionada amb la transcripció.

Les HATs de tipus B identificades fins al moment corresponen a la HAT1 (que per homologia pertany a la superfamília GNAT) i la HAT2. Ambdues formen part o bé estan associades amb complexos d'ensamblatge de la cromatina com el complex CAF-1 (*chromatin assembly factor-1*), encarregats de la incorporació de noves histones H3 i H4 acetilades al DNA replicat de *novo* (Workman i Kingston, 1998; Makowski *et al*, 2001).

• **Desacetilases d'histones (HDACs)**

Les HDACs identificades fins a la data en humans es poden agrupar en tres classes i estan relacionades amb algun membre trobat a *S. cerevisiae* i/o *Drosophila*:

HDACs de classe I (homòlogues a y-dRPD3): HDAC 1, 2, 3 i 8. Consten d'un sol domini catalític homòleg a Rpd3. Són proteïnes exclusivament nuclears que presenten una expressió ubicua a tots els teixits.

HDACs de classe II (homòlogues a yHda1): HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10 i 11. Tenen un domini N-terminal no-catalític o regulador i un domini C-terminal catalític (excepte les 6 i 10 que presenten dos dominis catalítics). Les HDACII es caracteritzen per estar regulades nucleocitoplasmàticament a través d'un mecanisme llançadora (*shuttling*), i per tenir una expressió específica de teixit (revisat a Khochbin *et al*, 2001).

HDACs de classe III (homòlogues a y-dSir2): SIRT 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7. L'activitat desacetilasa de Sir2 és dependent de NAD⁺ i està acoblada a una activitat ADP-ribosiltransferasa, essent ambdues necessàries pel silenciament mediat per Sir2 (Tanny *et al*, 1999).

Les classes I i II es caracteritzen per ser sensibles a Trichostatina A (TSA) i estar relacionades amb processos de regulació de la transcripció, mentre els membres de classe III són desacetilases dependents de NAD⁺, insensibles a TSA i estan relacionades amb silenciament heterocromàtic. De manera similar a les HAT, les HDACs formen part de grans complexos:

COMPLEXES CLASSE I

Complex Sin3/HDAC. Està format per set polipèptids diferents que inclouen dues desacetilases (HDAC1 i 2), Sin3, RbAp46, RbAp48, SAP30 i SAP18 (Zhang *et al*, 1997). **Sin3**, identificat inicialment com un repressor transcripcional, és una proteïna multidomini molt gran que segurament actua com a plataforma en l'ensamblatge del complex; a més, té

varis dominis d'interacció que medien la unió de Sin3 amb factors de transcripció i proteïnes accessòries: co-repressors N-CoR, SMRT o l'homòleg de *Drosophila* SMRTER, p53, PLZF i la *CpG binding protein* (MeCP2) entre d'altres (Knoepfler i Eisenman, 1999). **RbAp46 i 48** s'uneixen a les histones *core* i es creu que faciliten el remodelatge de nucleosomes necessari per una desacetilació eficient (Ng i Bird, 2000). **SAP30** interacciona amb mSin3 i N-CoR, essent requerit per la repressió mediada per N-CoR (Laherty *et al*, 1998). I finalment, **SAP18** s'ha proposat que també podria intervenir en el reclutament del complex Sin3/HDAC ja que s'ha observat que està associat amb Sin3 i interacciona amb factors transcripcionals de *Drosophila* com GAGA (Espinás *et al*, 2000), Bicoid (Zhu *et al*, 2001) o Enhancer of zeste (Wang *et al*, 2002), tot i que es desconeix si aquestes interaccions tenen una repercussió en el funcionament del complex Sin3/HDAC o bé són un indicatiu de que SAP18 contribueix en les activitats de múltiples complexos.

Complex NuRD. A més a més de les subunitats que comparteix amb el complex Sin3 (HDAC1, HDAC2, RbAp46 i RbAp48), el complex NuRD també conté les subunitats Mi-2 α , Mi-2 β , MTA-1, MTA-2 i MBD3 (Zhang *et al*, 1999). **Mi-2** és un factor remodelador de la cromatina dependent d'ATP que en el context de NuRD es creu que facilita l'actuació de les HDAC1 i 2 incrementant l'accessibilitat al DNA, per la qual cosa s'ha suggerit que NuRD actuaria en regions més tancades i inaccessibles (Knoepfler i Eisenman, 1999). Mi-2 s'ha vist també que interacciona amb alguns repressors com Hunchback, Polycomb (Kehle *et al*, 1998) o TTK69 (Murawsky *et al*, 2001). **MTA-2**, homòloga a MTA-1, modula l'activitat desacetilasa del complex associant-se amb el complex via MBD3 (Zhang *et al*, 1999). **MBD3**, tot i que té un domini *methyl CpG binding domain* (MBD) homòleg al de les MeCPs no s'uneix a DNA metilat; en canvi, l'homòloga MBD2, una proteïna que sí uneix DNA metilat, interacciona amb el complex NuRD dirigint-lo a regions metilades (Zhang *et al*, 1999).

Les identitats de les subunitats dels complexos Sin3/HDAC i NuRD suggereixen dos possibles modes de reclutament: per interacció específica amb repressors/co-repressors o per reconeixement de zones de DNA metilat. De fet, arrel de l'observació que els complexos Sin3/HDAC i NuRD exhibeixen una associació constitutiva amb determinades regions de la cromatina, recentment s'ha proposat que els complexos HDAC contribuirien a la repressió tant per mecanismes específics que involucrarien un reclutament per co-repressors, com per mecanismes inespecífics, degut a una associació constitutiva dels complexos a la cromatina que precisament podria ser a través del DNA metilat (Li *et al*, 2002).

Complex HDAC3 que conté SMRT/N-CoR. La desacetilasa HDAC3 forma part de complexos que contenen TBL-1 (homòloga al co-repressor Groucho) i SMRT/N-CoR, els quals estan involucrats en la repressió per receptors d'hormones nuclears (Guenther *et al*, 2000; Li *et al*, 2000).

COMPLEXES CLASSE II

Estudis recents suggereixen que l'activitat d'algunes HDACII, concretament HDAC4, 5 i 7, és depenent de l'associació amb complexos HDAC3-N-CoR/SMRT via interacció directa amb N-CoR i SMRT (Fischle *et al*, 2001; Fischle *et al*, 2002).

COMPLEXES CLASSE III

L'estudi de la desacetilasa Sir2 a llevat ha permès identificar-la com a component de dos complexos diferents, el complex SIR i el complex RENT, implicats en silenciament de l'heterocromatina i de l'rDNA respectivament (Moazed, 2001). L'homòleg de *Drosophila*, per la seva banda, semblaria estar implicat tant en silenciament heterocromàtic com en silenciament de loci eucromàtics per interacció amb repressors (Rosenberg i Parkhurst, 2002).

1.2.3.2. Metilació d'histones

La metilació de les cues d'histones es dona principalment a les cadenes bàsiques dels residus lisina i arginina. *In vivo*, les lisines metilades es poden trobar mono-, di- o trimetilades, mentre les arginines es poden mono- o dimetilar (i en aquest cas de manera simètrica o asimètrica). Les posicions preferides per metilar lisines són K4, K9, K27 i K36 de la histona H3 i la K20 de la histona H4; i la metilació d'arginines té lloc principalment a les posicions R2, R17 i R26 de la H3 i la R3 de la H4. Els enzims responsables de la metilació, les metiltransferases d'histones (**HMTs**), metilen de manera preferencial un o altre residu, per tant es pot parlar de metiltransferases de lisina o metiltransferases d'arginina. Unes i altres, però, utilitzen com a grup donador S-adenosil-metionina (Zhang i Reinberg, 2001; Bannister *et al*, 2002).

El fet de que no s'hagi identificat cap desmetilasa d'histones ha dut a pensar durant molt de temps que la metilació d'histones era un procés irreversible, una "marca epigenètica" estable. No obstant, evidències recents suggereixen l'existència d'un *turnover* actiu de grups metil que té lloc lentament però és detectable, proposant-se tres possibles mecanismes (desmetilació, reemplaçament de les histones o tall de la cua metilada) per explicar la dinàmica d'intercanvi observada (Bannister *et al*, 2002).

• Metiltransferases de lisina

La primera metiltransferasa d'histones que es va identificar corresponia a la proteïna **Su(var)3-9**, originalment coneguda com a supressora de la PEV, l'activitat de la qual anava dirigida de manera específica cap a la K9 de la histona H3 (Rea *et al*, 2000), tot i que més tard s'ha vist que també és capaç de metilar la K-26 de la histona H1 (Jenuwein i Allis, 2001). El domini conservat SET de Su(var)3-9 és el responsable de l'activitat catalítica, tot i

que només s'observa activitat enzimàtica quan es troba flanquejat per dues seqüències riques en cisteïnes (pre-SET i post-SET). A part del domini SET, Su(var)3-9 presenta un domini de tipus *chromodomain* (revisat a Kouzarides, 2002).

La metilació de la H3-K9 per Su(var)3-9 és essencial per a la formació d'heterocromatina i el silenciament de gens eucromàtics: H3-mK9 és reconeguda de manera específica pel *chromodomain* de la proteïna HP1, la qual propaga l'heterocromatització en oligomeritzar a través del *chromoshadowdomain* (Richards i Elgin, 2002); en els gens eucromàtics, la proteïna del retinoblastoma Rb, sembla tenir un paper essencial en el reclutament de Su(var)3-9 i HP1 en promotors específics (Nielsen *et al*, 2001).

El previ requisit de la desacetilació de les lisines 9 i 14 per tal que es dongui la metilació de la K9, així com la recent observació per dos grups diferents que Su(var)3-9 està associada física i funcionalment a les desacetilases HDAC 1, 2 i 3 (Czermin *et al*, 2001; Vaute *et al*, 2001), ha fet sorgir la hipòtesi segons la qual l'actuació concertada de la desacetilació i metilació per un complex que contingui Su(var)3-9 i desacetilases mediarà el silenciament de determinades regions del genoma.

Altres metiltransferases d'H3-K9 són la **G9a**, involucrada en la repressió transcripcional de gens eucromàtics (Tachibana *et al*, 2002), i la **SETDB1**, la qual té un domini MBD i contribueix al silenciament de gens eucromàtics mediat per HP1 (Schultz *et al*, 2002).

D'altra banda, també hi ha algunes metiltransferases de lisines que participen en l'activació transcripcional. Aquest seria el cas de **Set9**, la metilació de la qual a H3-K4 impedeix per una banda que el complex desacetilasa NuRD pugui interaccionar amb H3 i per l'altra que Su(var)3-9 pugui metilar H3-K9 (Nishioka *et al*, 2002). De fet, així com H3-mK9 és una marca d'un estat reprimat de la cromatina, H3-mK4 es troba localitzada en barreres heterocromàtiques i loci actius (Zhang i Reinberg, 2001).

• **Metiltransferases d'arginina (PRMTs)**

Fins al moment es coneixen cinc metiltransferases d'arginina, les quals tenen en comú un domini catalític molt conservat. **PRMT1** és la principal HMT específica de la histona H4 (metila específicament H4-R3) i està involucrada en la regulació de múltiples processos. **CARM1/PRMT4** metila R2, R17 i R26 de la H3, i actua com a co-activador transcripcional en actuacions sinèrgiques amb acetilases d'histones com p300/CBP (revisat a Zhang i Reinberg, 2001; Kouzarides, 2002).

1.2.3.3. Fosforilació d'histones

La fosforilació de la S-10 de la histona H3 és requerida per la correcta condensació dels cromosomes a mitosi i meiosi i, a més, està correlacionada amb la transcripció de gens després d'una inducció mitogènica. El fet que una mateixa modificació estigui associada a dos processos que involucren alteracions físiques de la cromatina oposades, dona suport a la

idea que les modificacions actuen més com a superfícies de reconeixement per altres factors que no per alteració directa de l'estat de la cromatina (Berger, 2002). Així, es creu que per una eficient condensació dels cromosomes serien necessàries múltiples fosforilacions a la mateixa o diferents cues; en canvi, l'activació transcripcional de determinats gens correlacionaria la fosforilació de la S-10 amb una acetilació en determinats residus (Strahl i Allis, 2000). Precisament, i donant suport a aquesta hipòtesi, s'ha observat que la quinasa d'histones Rsk actua de manera conjunta amb les acetilases CBP/p300.

1.2.3.4. Ubiquitinització d'histones

Recentment han sorgit evidències que indicarien que la ubiquitinització d'histones també tindria un paper important en la regulació transcripcional. Primer, s'ha observat que alguns residus de lisina conservats de les cues C-terminal de les histones H2A i H2B poden ser subjectes a monoubiquitinització com una via alternativa al processament proteolític de la histona sencera. I en segon lloc, s'ha identificat una activitat ubiquitinitzadora de la histona H1 a TAF_{II}250 que correlaciona amb l'activació transcripcional (Jenuwein i Allis, 2001).

1.2.3.5. Metilació del DNA i la seva connexió amb HDACs i HMTs

La metilació de citosines al carboni 5 dels dinucleòtids CpG per les DNA metilases (DNMTs) és una característica de molts genomes eucariotes. En vertebrats, entre el 60 i 90% de les CpGs estan metilades, i les no metilades es troben localitzades a les anomenades "illes CpG", normalment formant part de promotors funcionals. Hi ha moltes evidències experimentals que suggereixen que la metilació del DNA és incompatible amb l'activació transcripcional o, dit d'una altra manera, que la conseqüència més directa de la metilació és el silenciament (Ng i Bird, 1999). Recentment, a més a més, s'ha demostrat l'existència d'una connexió entre la metilació del DNA i dues de les modificacions més conegudes de les histones: l'acetilació i la metilació.

La connexió entre metilació del DNA i desacetilació d'histones ha estat objecte d'estudi en els darrers anys a partir de l'observació que el DNA poc metilat es trobava associat a la cromatina acetilada mentre que el DNA molt metilat correlacionava amb un estat hipoacetilat de la cromatina. Actualment, està bastant acceptat que la metilació del DNA en 5-metilC per DNMTs indueix un estat de la cromatina encara més silenciada per un reclutament de desacetilases (Bird i Wolffe, 1999); aquestes últimes accedirien a les regions metilades via interacció amb MeCP o MBP, o bé a través de la interacció directa amb DNA metilases (figura **I.3A**). Un cop desacetilades, la cromatina seria més susceptible a la metilació per HMTs, les quals s'unirien directament al DNA metilat via MBDs (figura **I.3B**).

En el cas de la metilació d'histones, en canvi, s'ha suggerit que aquesta modificació és un pre-requisit per la metilació *de novo* del DNA: concretament, s'ha proposat que les histones metilades servirien com a diana de reconeixement per al reclutament de DNMTs (figura **I.3C**) (Zhang i Reinberg, 2001; Ben-Porath i Cedar, 2002; Richards i Elgin, 2002).

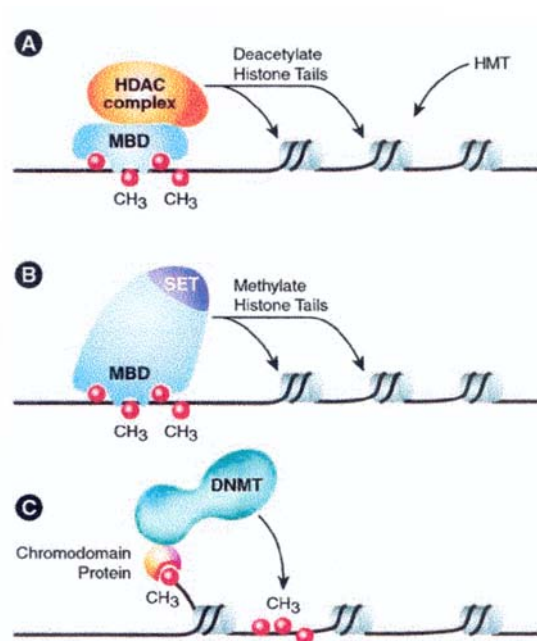


Figura I.3. Possibles models sobre la connexió entre metilació del DNA, desacetilació d'histones i metilació d'histones. **A.** *Methyl-CpG binding proteins* unides a DNA metilat reclutarien complexes HDACs per desacetilar les histones properes. **B.** En dominis cromatínics on les histones són hipoacetilades, HMTs amb dominis MBD s'unirien directament al DNA nucleosomal metilat i metil·larien les cues de les histones. **C.** Les cues de les histones metilades reclutarien DNMTs per metilar DNA i així aconseguir un silenciament a llarg plaç (extret de Zhang i Reinberg, 2001).

1.2.4. Reclutament dels complexos remodeladors i modificadors de la cromatina

En els darrers anys s'han dedicat molts esforços en estudiar les interaccions funcionals que tenen lloc entre els nombrosos complexos que regulen la transcripció per tal d'intentar establir quina és la seqüència d'aconteixements que determinaran que un gen concret es transcriu. No obstant, aquests estudis han evidenciat que no hi ha un requeriment *a priori* de que el reclutament de complexos remodeladors, modificadors d'histones, factors reguladors o components de la maquinària transcripcional tingui lloc en un ordre determinat (figura I.4), sinó que l'activació de cada gen comporta un ordre de reclutament de factors concret i específic (Narlikar *et al*, 2002). Actualment no hi ha gaires exemples de promotors en què s'hagi arribat a establir l'ordre d'esdeveniments que en porten l'activació; un d'aquests casos correspon al promotor del gen *HO* de llevat (Cosma *et al*, 1999).

Quan les activitats modificadores de la cromatina són requerides a nivell global, el mecanisme de reclutament involucra dianes poc específiques (com seria el cas del reclutament d'HDACs en zones de DNA metilat per propagar silenciament). En canvi, quan els complexos remodeladors/modificadors són necessaris en seqüències diana concretes, factors de transcripció específics de seqüència (activadors o repressors) s'hi uneixen directament o indirectament (via co-activadors/co-repressors) per reclutar-los de forma específica (veure exemples a l'apartat 1.3).

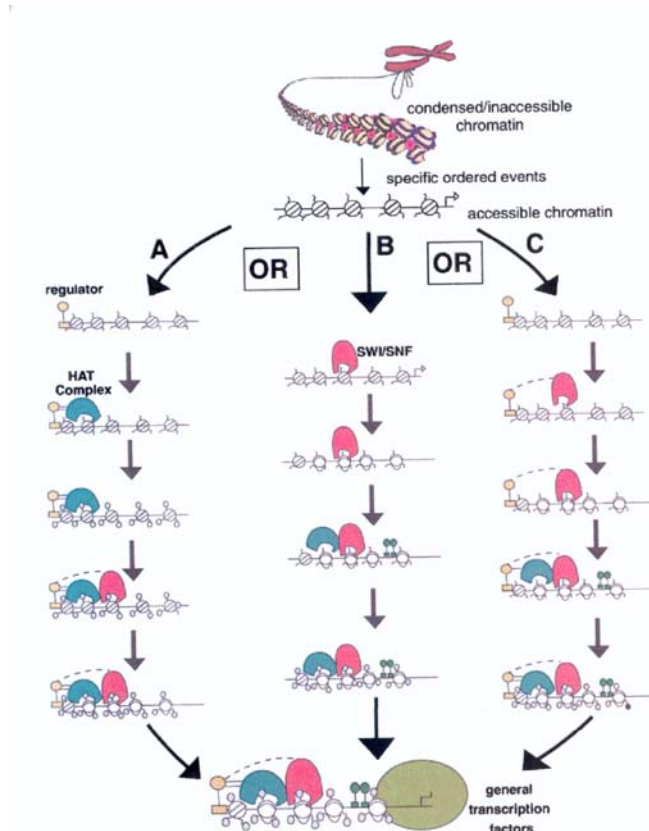


Figura I.4. Reclutament de reguladors, complexes HAT i complexes remodeladors en el procés d'activació de la transcripció. Diferents ordres d'actuació d'aquests factors (**A**, **B** o **C**), poden donar lloc a un motlle competent per la transcripció a partir d'una estructura condensada de la cromatina. Encara que no es mostri, també és possible que la unió de GTFs precedeixi l'acció i reclutament de complexes HAT (extret de Narlikar *et al*, 2002).

D'altra banda, també tenen lloc interaccions físiques entre remodeladors i modificadors que en molts casos són essencials per l'activitat d'alguns d'ells. Així, s'ha observat que els complexes acetiltransferasa SAGA i NuA4 de llevat estableixen la unió del complex SWI/SNF als nucleosomes del promotor diana (Hassan *et al*, 2001).

1.2.5. Elongació i cromatina

En un principi, es va suggerir que el pas de la RNAP II a través dels nucleosomes durant el procés de transcripció era facilitat per una transferència de l'octàmer d'histones que tenia davant cap al seu darrere, i que aquest procés estaria catalitzat per enzims remodeladors de la família SWI2/SNF2. No obstant, aquest mecanisme tan sols s'ha observat per polimerases petites, però no sembla factible per una polimerasa tan gran com la RNAP II (Orphanides i Reinberg, 2000).

El model més acceptat actualment és el de la dissociació parcial d'un dímer H2A/H2B d'un nucleosoma durant l'elongació i la posterior reassociació després del pas de la RNAP II. Consistent amb aquest model, recentment s'ha demostrat que durant la transcripció *in*

in vitro a través d'un nucleosoma, la RNAP II desplaça un dímer H2A/H2B (Kireeva *et al*, 2002). *In vivo*, però, aquesta dissociació està facilitada per altres factors, entre els quals s'inclourien el complex SWI/SNF i els *chromatin elongation factors*, cadascun dels quals desenvolupa una funció concreta:

SWI/SNF promou l'elongació a través dels nucleosomes presumiblement per una disrupció dels contactes DNA-histona (Orphanides i Reinberg, 2000). En canvi, el complex **FACT** (*facilitates chromatin transcription*) interacciona específicament amb els dímers H2A/H2B, facilitant així la disrupció del nucleosoma induïda per RNAP II (Adelman i Lis, 2002). El complex "**Elongator**" conté una subunitat (Elp3) amb activitat HAT específica per la H3-K14 i la H4-K8 (Winkler *et al*, 2002), i a més a més interacciona amb la CTD de la RNAP II només quan està fosforilada; aquestes dues dades suggereixen doncs un reclutament d'aquest complex quan la RNAP II està elongant per tal d'acetilar les histones i facilitar la descondensació de la cromatina. Finalment, **Spt4/Spt5/DSIF** promou l'elongació a través de la cromatina *in vitro*, però es desconeix el mecanisme pel qual actua *in vivo* (Orphanides i Reinberg, 2000; Svejstrup, 2002).

1.3. Mecanismes d'activació i de repressió

Com ja s'ha comentat anteriorment, la transcripció basal és el procés que té lloc *in vitro* en presència dels factors generals de transcripció (GTFs) i la RNAP II. *In vivo*, però, l'activitat global d'un gen està controlada per factors de transcripció específics, activadors o repressors, que s'uneixen a determinats elements reguladors del promotor. Un **activador transcripcional** es defineix com aquell factor que s'uneix a seqüències específiques d'elements *enhancer* del promotor i estimula la taxa de transcripció en resposta a estímuls fisiològics o de desenvolupament (Wu i Hampsey, 1999). Per la seva banda, els **repressors transcripcionals** són aquelles proteïnes que s'associen als seus gens diana, bé directament a través d'un domini d'unió a DNA o bé indirectament per interacció amb altres proteïnes, i inhibeixen la transcripció de manera selectiva (Maldonado *et al*, 1999).

Els activadors o repressors interaccionen amb cofactors o coreguladors que són reclutats al promotor i contribueixen activament a l'activació (co-activadors) o a la repressió (co-repressors). De fet, algunes vegades és precisament la interacció amb un co-activador o un co-repressor el que determina que un factor de transcripció actui com a activador o com a repressor.

Els **co-activadors** inclouen, per una banda, els components de la maquinària transcripcional (TAF_{II}s) o factors íntimament associats a aquesta maquinària ("Mediator"), i per altra banda complexes que modifiquen l'estructura de la cromatina, ja siguin complexes remodeladors depenents d'ATP (p.ex. SWI/SNF) com complexes amb activitat HAT (p.ex. CBP/p300, que de fet és un dels co-activadors més àmpliament caracteritzats) (revisat a Mannervik *et al*, 1999; Featherstone, 2002).

Els **co-repressors** medien el silenciament transcripcional per mecanismes que inclouen la inhibició directa de la transcripció basal i el reclutament d'enzims modificadors de la cromatina. Així, es consideren co-repressors tant aquells factors que interaccionen amb complexes desacetilasa o que formen part dels mateixos, com seria el cas de Sin3, Mi-2, N-CoR, SMRT, SMRTER o les pròpies HDACs; com les molècules associades als repressors i que actuen com a adaptadors entre aquests i la maquinària de transcripció i/o els complexes modificadors, essent aquest el cas de Groucho o CtBP entre d'altres (revisat a Burke i Baniahmad, 2000).

1.3.1. Activació

1.3.1.1. Classificació dels activadors

Els activadors transcripcionals normalment estan formats per tres dominis: un domini d'unió a DNA que els permetrà dirigir-los a la seva seqüència diana; un domini d'homo/heteroligomerització no sempre present, però que quan el tenen pot ajudar a estimular actuacions sinèrgiques amb altres o el mateix activador; i un domini d'activació.

Els **dominis d'activació** es defineixen com aquelles seqüències aminoacídiques que quan estan connectades de manera adequada a un domini d'unió a DNA estimulen la taxa de transcripció d'un promotor específic (Brent i Ptashne, 1985); són, per tant, dominis funcionalment independents. Es poden classificar en tres tipus en base a la seva composició aminoacídica:

- **dominis acídics:** tenen un elevat contingut en residus Glu i Asp que els hi confereix una elevada càrrega negativa. Aquests dominis els tenen els activadors més estudiats com VP16 (del virus *Herpes simplex*) o GAL4 i GCN4 de llevat.

- **dominis rics en glutamines:** presenten una elevada proporció de glutamines a la seva seqüència. Els exemples més coneguts són el de Sp1 de mamífers, o Fushi tarazu i GAGA de *Drosophila*.

- **dominis rics en prolines:** present en activadors com CTF de mamífers.

La classificació dels activadors segons la composició aminoacídica del domini activador és potser la més emprada però també la més criticada per la seva simplicitat. Com a alternativa, s'ha proposat una classificació funcional dels activadors, en base a l'etapa de transcripció que estimulen, distingint així tres famílies d'activadors (Blau *et al*, 1996):

- **Classe I:** corresponen a activadors com Sp1 o CTF que només estimulen la iniciació. Aquests activadors poden actuar de manera sinèrgica amb els de tipus IIA.

- **Classe IIA:** són els activadors que només estimulen l'elongació, com és el cas de la proteïna Tat de l'HIV.

- **Classe IIB:** són els activadors com VP16 o p53 que poden estimular tant la iniciació com l'elongació.

1.3.1.2. Mecanismes d'activació

Les proteïnes activadores poden estimular una o més etapes del procés de la transcripció a través de diferents mecanismes:

1. Reclutament de complexos modificadors de la cromatina

Hi ha moltes evidències de que els GTFs i la RNAP II no es poden unir d'una forma eficient al promotor en presència de nucleosomes, i per tant cal l'assistència de factors remodeladors o modificadors d'histones que facin més accessibles les seqüències del promotor (Orphanides *et al*, 1996).

El reclutament específic d'aquests complexos modificadors, bé directament o bé via co-activadors és, com ja s'ha comentat anteriorment, un mecanisme bastant comú entre els activadors. Així, s'han identificat alguns activadors acídics que poden reclutar SWI/SNF, com seria el cas de Swi5p en l'activació del gen *HO*. Altres activadors també acídics s'encarreguen en canvi de portar al promotor complexos HAT; aquest seria el cas de VP16, Gcn4 i el mateix Swi5p amb els complexos acetiltransferasa SAGA i NuA4 (Emerson, 2002; Eberharter i Becker, 2002).

2. Reclutament dels factors generals transcripció

El reclutament per part dels activadors d'algun component de la maquinària basal que sigui limitant per a la formació del PIC accelera l'ensamblatge d'aquest complex de preiniciació al promotor, donant lloc a uns nivells de transcripció més elevats. Aquest mecanisme sembla estar bastant generalitzat, ja que s'ha observat des de bacteris a mamífers (Ptashne i Gann, 1997). Concretament, s'han identificat interaccions entre activadors i els factors TFIID, TFIIB i subunitats del "Mediator".

La unió de TBP/TFIID al promotor és segurament el nivell d'actuació preferent de molts activadors, podent-se donar la interacció tant amb TBP i/o amb algun TAF_{II}. En aquest sentit, alguns estudis han demostrat que el reclutament de TBP per part de determinats activadors de llevat té lloc *in vivo* i és essencial per l'activació transcripcional (Li *et al*, 1999b; Kuras i Struhl, 1999). També hi ha evidències d'alguns activadors acídics que acceleren l'ensamblatge estable de TFIIB al promotor en una acció que ve acompanyada del reclutament d'altres factors com TBP (Choy i Green, 1993), o bé d'activadors rics en glutamines que desencadenen l'inici de la transcripció per interacció amb TFIIB (Colgan *et al*, 1995). D'altra banda, recentment s'ha proposat que la interacció simultània d'un activador amb TAF_{II}S del TFIID i determinades subunitats del "Mediator", induïnt l'ensamblatge cooperatiu dels dos factors per formar el complex de preiniciació, podria ser el mecanisme d'actuació d'alguns activadors (Johnson *et al*, 2002).

Adicionalment al reclutament, l'activador també pot col·laborar en mantenir determinats factors de transcripció al promotor després de la iniciació (concretament els TFIIA i TFIIB), evitant la seva dissociació del promotor per facilitar les subsegüents rondes de reiniciació (Orphanides *et al*, 1996).

3. Inducció de canvis conformacionals al complex de preiniciació

Hi ha algunes evidències que suggereixen que la inducció de canvis conformacionals de determinats elements del PIC que estimulin el procés de transcripció és un mecanisme emprat per alguns activadors. Així, s'ha observat la inducció d'un canvi conformacional a TFIIB que estimula el posterior reclutament de TFIIF (Roberts i Green, 1994), o que la interacció de determinats activadors amb el complex TFIID-TFIIA genera un canvi conformacional que és necessari i suficient perquè tingui lloc l'activació transcripcional (Chi i Carey, 1996).

4. Estimulació del *clearence* del promotor i l'elongació

La iniciació no és la única etapa que pot ser estimulada per activadors, sinó que etapes posteriors com el *clearence* del promotor i l'elongació també són dianes d'actuació dels activadors. Hi ha activadors que poden actuar en la iniciació i en l'elongació, i semblaria que aquestes dues accions les fan a diferents temps i a través del mateix domini d'activació, tot i que els residus implicats en cada cas són diferents (Brown *et al*, 1998).

S'ha observat que tots els activadors que estimulen l'elongació interaccionen amb TFIIF, mentre que els que només estimulen la iniciació no ho fan. Tenint en compte que TFIIF conté la subunitat cdk7 responsable de fosforilar la CTD i convertir la RNAP II en processiva, tot fa pensar que la inducció de l'activitat quinasa de TFIIF seria el mecanisme pel qual actuarien aquests activadors (Blau *et al*, 1996).

Un altre mode d'actuar dels activadors durant l'elongació s'ha observat que podria ser promovent la disrupció de nucleosomes, potser en col.laboració amb algun *chromatin elongation factor*, quan la RNAP II transcriu en presència de cromatina (Brown i Kingston, 1997).

1.3.1.3. Actuacions sinèrgiques dels activadors

Molt poques vegades, si no cap, els activadors treballen aïlladament, sinó que en la majoria dels casos actuen d'una manera sinèrgica. Aquest sinèrgisme es pot manifestar de dues maneres (Carey, 1998):

- efecte "major que l'addició", degut a la presència de múltiples llocs d'unió d'un activador al promotor o *enhancer*. Aquest efecte es pot explicar per fenòmens d'unió cooperativa d'activadors als elements *enhancers*, o bé per interaccions cooperatives entre components de la maquinària transcripcional i els activadors units als *enhancers*.

- resposta sigmoïdal en l'activació d'un gen en augmentar la concentració de l'activador. Tot i que es desconeix el mecanisme que dona lloc a aquest tipus de resposta, estudis sobre la resposta sigmoïdal de l'activador ZEBRA suggereixen l'existència de dues etapes: una primera unió cooperativa dels activadors als elements *enhancer* (ensamblatge d'un enhanceosoma), seguida d'una segona etapa de cooperativitat recíproca entre l'enhanceosoma i el complex TFIIA-TFIID que donaria lloc a un ensamblatge concertat del complex de preiniciació (Ellwood *et al*, 1999).

La unió cooperativa dels activadors a elements *enhancer* adjacents serveix de plataforma per al reclutament cooperatiu de co-activadors i/o per interaccions cooperatives amb la maquinària transcripcional. Aquests complexos nucleoproteics ensamblats cooperativament reben el nom d'**enhanceosomes**, i requereixen d'un alineament estereoespecífic dels llocs d'unió dels activadors perquè es pugui formar correctament (Merika i Thanos, 2001). La nucleació d'aquests enhanceosomes té lloc en segments de DNA d'uns 100 pb, i està facilitada per proteïnes "arquitectòniques". Concretament, aquestes proteïnes indueixen una alteració de la curvatura del DNA, facilitant així les interaccions entre els diferents components de l'enhanceosoma (Courey i Jia, 2001). L'exemple més estudiat d'enhanceosoma és el que es forma al promotor de l'IFN- β , on té lloc l'ensamblatge cooperatiu d'un complex multiproteic que inclou els activadors NF κ B, IRF3, IRF7 i ATF-2-c-Jun, la proteïna "arquitectònica" HMGI(Y) i el co-activador CBP (Courey, 2002).

1.3.2. Repressió

De manera similar als activadors, els repressors són típicament modulars, podent estar estructurats en forma d'un sol polipèptid amb dominis funcionalment diferents o en forma de complexos multiproteics amb diferents funcions distribuïdes entre les subunitats que el componen (Maldonado *et al*, 1999). Així, els dominis d'unió a DNA i els dominis repressors funcionen independentment, i no sembla haver-hi una correlació entre la natura del domini d'unió a DNA i la funció repressora de la proteïna, havent-se identificat exemples de repressors per tots els tipus de motius d'unió a DNA coneguts (revisat a Johnson, 1995).

1.3.2.1. Mecanismes de repressió

Alguns repressors contribueixen al manteniment silenciats d'alguns gens segurament per interaccions amb la maquinària transcripcional i els nucleosomes. Aquests són els anomenats repressors generals, com serien les proteïnes SIR de llevat (Maldonado *et al*, 1999).

Aquí ens interessen però els repressors que inhibeixen la transcripció de manera específica, els quals poden actuar per diferents mecanismes:

1. Competició pels llocs d'unió a DNA

La repressió per competició pels llocs d'unió a DNA consisteix en la unió de la molècula repressora a elements *enhancer* o del promotor *core*, impedit la unió dels activadors a les seves seqüències diana o bé bloquejant l'ensamblatge de la maquinària transcripcional al promotor (Levine i Manley, 1989). Degut a que aquest tipus de repressió es dona com a resultat d'un desplaçament de factors de transcripció del DNA, aquests repressors no necessàriament han de tenir un domini repressor actiu.

Aquest mecanisme, descrit inicialment en estudis de repressió a procariotes, sembla ser el menys habitual en organismes eucariotes. L'explicació estaria en l'organització de les regions reguladores dels gens eucariotes, les quals sovint consten de nombrosos elements de

resposta a proteïnes activadores. Això vol dir que per tal d'aconseguir una repressió eficient per unió competitiva serien necessàries moltes molècules repressores, representant això un cost massa elevat per a la cèl.lula (Johnson, 1995).

Un dels pocs exemples descrits a eucariotes correspon a la proteïna YB-1, un repressor dels gens del complex d'histocompatibilitat de classe II que, en unir-se específicament a determinades seqüències, indueix una separació local de les cadenes de DNA, prevenint la unió dels activadors (MacDonald *et al*, 1995).

2. Bloqueig de la interacció entre l'activador i components de la maquinària transcripcional: *quenching*

El *quenching* es dona quan activadors i repressors s'uneixen a seqüències adjacents però no solapades, produïnt-se interaccions proteïna-proteïna entre ambdues molècules que impedeixen a l'activador establir els contactes necessaris per realitzar la seva funció activadora (la interacció amb el repressor emmascara la superfície de contacte amb altres factors de transcripció). El repressor que actua per *quenching* no interfereix en la unió de l'activador al DNA, sinó que fins i tot s'han observat casos en què activadors i repressors s'uneixen al DNA cooperativament.

El *quenching* entre activadors i repressors es caracteritza perquè pot tenir lloc en un segment de DNA sense afectar la situació del segment veí. Aquest fet és especialment important de cara a la regulació dels promotors dels gens "pair-rule" de *Drosophila* (*even-skipped*, *fushi tarazu*), els quals estan formats per múltiples *enhancers* que funcionen d'una manera autònoma dirigint l'expressió de bandes (*stripes*) concretes de l'embrió; així, un repressor podrà actuar només sobre un *enhancer* reprimint l'expressió d'una sola banda de l'embrió sense afectar l'expressió de les altres bandes (Johnson, 1995).

Un altre exemple d'aquest mecanisme de repressió el trobem a la proteïna de l'adenovirus E1B 55K, la qual reprimeix l'activació mediada per p53 interaccionant amb aquesta però sense desplaçar-la dels seus llocs d'unió (Yew *et al*, 1994).

3. Repressió directa

La repressió directa té lloc quan el repressor interfereix directament amb la formació o activitat de la maquinària transcripcional en unir-se a seqüències concretes del promotor (no solapants amb el promotor *core*) i interaccionar amb factors basals (Han i Manley, 1993). La majoria de repressors eucariotes actuen per aquest mecanisme que sovint rep també el nom de repressió "activa" per distingir-la de la resta de mecanismes que requereixen de la presència d'un activador.

Existeixen bastants exemples a la bibliografia de repressors que actuen directament sobre la maquinària basal. Un cas força conegut és el del complex Dr1/Drap1 humà (també anomenat NC2), format per una subunitat reguladora (Drap1 o NC2 α) i una subunitat repressora (Dr1 o NC2 β). La repressió mediada per Dr1 és deguda a una interacció directa amb TBP que comporta, per una banda, un bloqueig de l'associació entre TBP i TFIID, i per

altra banda, un canvi conformacional en TBP que inhibeix la unió de TFIIA al complex TBP-DNA (revisat a Maldonado *et al*, 1999).

4. Reclutament de complexos modificadors de la cromatina

Anàlogament als activadors, que poden reclutar complexos remodeladors o modificadors d'histones per tal d'incrementar l'accessibilitat dels factors de transcripció a les seves seqüències diana, els repressors poden reclutar complexos modificadors de la cromatina l'activitat dels quals resulti en una major compactació nucleosomal, dificultant així la unió dels factors de transcripció.

De fet, al llarg dels últims anys i arran del “boom” que hi ha hagut en l'estudi dels processos d'acetilació/desacetilació, s'han anat coneixent molts casos de repressors que actuen reclutant directa o indirectament desacetilases d'histones, i actualment potser és el mecanisme de repressió més estudiat i que genera més interès.

Un dels exemples més coneguts correspon a la repressió dels gens Hox a *Drosophila*, iniciada pel repressor Hunchback (Hb) i mantinguda per algunes proteïnes PcG. S'ha observat que tant Hb com les proteïnes PcG interaccionen física i funcionalment amb dMi-2 (homòleg a hMi-2 del complex NuRD). Per tant, un possible mecanisme per a la repressió dels gens Hox seria que Hb reclutés NuRD, el qual modificaria la cromatina permetent la unió de les proteïnes PcG o bé reclutant-les directament (revisat a Ahringer, 2000).

1.3.2.2. Long-range/short-range repression

La repressió transcripcional té un paper clau en l'establiment precís dels patrons d'expressió gènica durant el desenvolupament embrionari de *Drosophila*. Així, la majoria de reguladors transcripcionals que controlen la formació del patró a l'embrió primerenc són repressors (Jiménez *et al*, 1997). Degut a que aquests repressors poden actuar sobre distàncies curtes (<100 pb) o llargues (1 quilobase o més) es parla de **short-range** o **long-range repression**.

Els repressors *long-range* es caracteritzen perquè actuen de forma dominant, bloquejant tots els *enhancers* (encara que estiguin a milers de pb) i impedit que puguin tenir cap influència sobre el promotor, podent silenciar un locus cromosòmic sencer. En canvi, els repressors *short-range* actuen, bé bloquejant la funció d'activadors units a elements *enhancers* propers sense interferir amb els que estan units a seqüències més allunyades (permeten autonomia entre *enhancers*), bé inhibint l'activitat del complex de preiniciació al promotor *core*. Una altra diferència és que els *long-range* poden induir un estat reprimat estable, mentre els *short-range* tenen un efecte més puntual, essent un tipus de repressió més flexible (Cai *et al*, 1996). La repressió *short-range* és, a més, especialment important en la regulació dels promotors dels gens “pair-rule”, on cada *enhancer* funciona de manera independent.

Estudis recents indiquen que aquests dos modes de repressió, *long-range* i *short-range*, estan associats a dos co-repressors diferents, Groucho i dCtBP respectivament (Zhang i Levine, 1999).

1.3.2.3. La repressió long-range mediada per Groucho

Tot i que el co-repressor **Groucho** (Gro) va ser identificat originalment a *Drosophila*, s'han trobat homòlegs en molts organismes eucariotes, des de llevats (Tup1) fins a humans (proteïnes TLE i TBL-1). Els membres de la família Gro es caracteritzen per tenir un domini d'homotetramerització molt conservat a la regió N-terminal (anomenat domini Q per la seva abundància en residus Gln) essencial per l'acció repressora de Gro; un regió central poc conservada; i un domini C-terminal altament conservat format per set motius de tipus WD implicat en interaccions proteïna-proteïna.

Groucho és reclutat als promotors diana via interaccions directes amb repressors de tipus *long-range* que s'uneixen al DNA de forma específica. Entre aquests repressors hi trobem els factors de la família Hairy o Runt, els quals s'uneixen a Gro a través del motiu WRPW o WRPY respectivament; o proteïnes com Engrailed, Goosecoid, Dorsal o Hairless, que interaccionen amb Gro per un motiu de tipus eh1 (*engrailed-homology motif*) (revisat a Courey i Jia, 2001).

S'ha suggerit que la repressió mediada per Groucho involucraria l'ensamblatge d'un complex multiproteic anomenat **repressossoma**. El repressossoma es formaria per una unió cooperativa de múltiples molècules repressores a les seves seqüències diana, les quals s'encarregarien de reclutar Gro al promotor. Per facilitar l'ensamblatge i manteniment del repressossoma també hi serien requerides, de manera similar a l'enhanceosoma, proteïnes "arquitectòniques". L'exemple més estudiat de repressossoma és el que es forma a l'element silenciador VRR del gen *zen*, on té lloc l'ensamblatge cooperatiu d'un complex multiproteic que inclou els repressors Dorsal i Dead-ringer, el co-repressor Gro i la proteïna arquitectònica Capicua (Courey i Jia, 2002).

S'han descrit dos possibles mecanismes a través dels quals Groucho exerciria la seva activitat repressora:

- **Reclutament de complexos desacetilases.** Estudis recents demostren que Groucho i la desacetilasa Rpd3 (HDAC1) de *Drosophila* poden formar un complex *in vivo* per interacció directa a través d'un domini ric en glicina i prolina (GP) situat a la regió central de la proteïna Groucho. Aquesta interacció amb Rpd3 contribueix en bona part a la repressió mediada per Groucho (Chen *et al*, 1999). D'altres estudis en cèl.lules humanes indiquen que HDAC1, Sin3 i RbAp48 co-immunoprecipiten amb Groucho. Finalment, també s'ha identificat TBL-1 humana com a part d'un macrocomplex amb HDAC3, SMRT i N-CoR (Guenther *et al*, 2000; Li *et al*, 2000). Aquestes evidències suggereixen que la repressió mediada per Groucho involucraria un reclutament d'activitats desacetilases en el promotor diana, bé directament per interacció amb HDAC1 com indirectament per interacció amb altres components de complexos HDAC.

D'altra banda, i de manera similar a Sir3 i Sir4, els co-repressors Gro/Tup1 uneixen histones hipoacetilades (Flores-Saaib i Courey, 2000). Això ha fet sorgir la hipòtesi d'un mecanisme d'actuació de Gro semblant a l'emprat per les proteïnes Sir en el silenciament heterocromàtic. Concretament, s'ha proposat que una vegada portat al promotor per repressors específics, Gro reclutaria HDACs, les quals desacetilarien les histones properes (Sir3 i Sir4 recluten Sir2); aleshores Gro s'uniria a aquestes histones hipoacetilades, reclutaria noves HDACs i així successivament, donant lloc a una extensió de l'estat silenciament al llarg de la cromatina (figura **I.5A**). Aquesta hipòtesi, tot i que no està demostrada, seria una explicació plausible de l'actuació repressiva de Groucho sobre grans loci cromosòmics (Courey i Jia, 2002).

•**Interaccions amb la maquinària basal.** Existeixen diverses evidències experimentals que demostren que la repressió mediada per Groucho també involucra interaccions amb la maquinària basal. Així, s'ha observat que alguns homòlegs humans de Gro interaccionen específicament amb el factor TFIIE, una interacció que serviria per bloquejar la formació del PIC (Yu *et al*, 2001). Altres estudis demostren que Tup1 de llevats es pot unir a la subunitat Srb7 del "Mediator", implicant que aquesta s'associï a la subunitat Med6 i pugui mediar una estimulació de la transcripció induïda per proteïnes activadores (Gromoller i Lehming, 2000).

1.3.2.4. La repressió short-range mediada per dCtBP

Inicialment, **CtBP** (*C-terminal binding protein*) es va identificar en base a la seva interacció amb la regió C-terminal de la proteïna d'adenovirus humà E1A i la seva activitat com a supressor de tumors (Boyd *et al*, 1993; Schaeper *et al*, 1995). Estudis posteriors han identificat proteïnes de la família CtBP des de *Drosophila* a vertebrats amb un alt grau d'homologia entre elles i una funció comuna de co-repressors transcripcionals (revisat a Chinnadurai, 2002). Una de les característiques peculiars de CtBP és la seva homologia amb les 2-hidroxiàcid deshidrogenases dependents de NAD i la seva capacitat d'unió a NAD/NADH.

A *Drosophila* s'ha pogut constatar que la funció de molts dels repressors *short-range* que actuen durant el desenvolupament de l'embrió primerenc entre els quals s'inclouen Giant, Krüppel, Knirps i Snail és, almenys en part, dependent de dCtBP (Nibu *et al*, 1998b). Knirps i Snail interaccionen amb dCtBP a través d'un motiu **P-DLS-K** (Nibu *et al*, 1998a) i Krüppel a través d'un motiu **P-DLS-H**; Giant, en canvi, tot i tenir un motiu conservat **VLDS** similar als anteriors, no interacciona amb dCtBP directament, sinó que ho fa a través d'algun altre factor (Nibu i Levine, 2001). Aquests repressors, tot i que actuen principalment per mecanismes dependents de dCtBP, en alguns casos també poden funcionar-ne de forma independent (Keller *et al*, 1998).

Hairy, descrit inicialment com un repressor de tipus *long-range*, s'ha observat que també interacciona amb dCtBP a través del motiu **P-SLV-K** (Poortinga *et al*, 1998). Tot i que Gro

és el principal co-repressor de Hairy, les evidències experimentals suggereixen que Hairy també podria actuar de forma dependent de dCtBP (és a dir, com a repressor *short-range*) en la repressió de determinats gens diana (Nibu *et al*, 2001), i que la interacció entre Hairy i dCtBP modularia negativament la funció repressora de Hairy associada a Groucho (Phippen *et al*, 2000; Zhang i Levine, 1999).

Recentment també s'ha descrit que Hairless interacciona amb dCtBP a través del motiu **PLNLS-K**, i que aquesta interacció és essencial per la seva funció repressora (Morel *et al*, 2001). Per la seva banda, TTK69 té un motiu **P-DLS** que semblaria contribuir en la seva funció en el desenvolupament dels fotoreceptors (Wen *et al*, 2000).

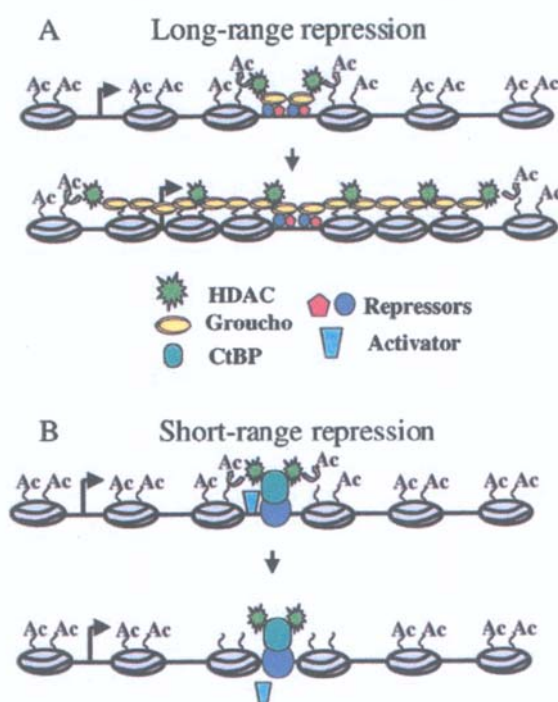


Figura I.5. Models suggerits per a l'actuació dels co-repressors Groucho i dCtBP en les repressions de tipus *long-range* i *short-range*. **A.** Després de ser portat al DNA per repressors específics, el co-repressor Groucho reclutaria HDACs cap a les cues d'histones properes, resultant en una alteració de l'estructura de la cromatina. La capacitat dels co-repressors d'unir histones hipoacetilades permetria que es poguessin estendre al llarg de la cromatina i així poder reclutar noves HDACs. Aquest procés acabaria donant lloc a un llarg locus cromosòmic en estat reprimat. **B.** El co-repressor dCtBP també pot reclutar HDACs a les regions promotores. Aquest reclutament resultaria en una desacetilació local dels nucleosomes, donant lloc a una estructura alterada de la cromatina que desplaçaria activadors propers del seu lloc d'unió. Degut a la incapacitat d'aquests co-repressors de polimeritzar, l'efecte seria local (extret de Courey i Jia, 2001).

La repressió mediada per CtBP en determinats promotors és sensible a TSA, mentre en d'altres és insensible a la presència d'aquest inhibidor de desacetilases. Això suggereix, anàlogament al co-repressor Groucho, dos tipus de mecanismes d'actuació de CtBP, un dependent i l'altre independent d'HDACs:

- **Mecanisme dependent de desacetilases.** Hi ha diverses evidències de que CtBP pot reclutar complexes HDACs: per una banda, s'ha observat que CtBP1 humà pot interaccionar amb HDAC1, HDAC2 i Sin3 (Zhang *et al*, 2001; Chinnadurai, 2002); a més a més, HDAC4

i 7 tenen un motiu PXDLR a través del qual interaccionen amb CtBP (Deltour *et al*, 2002). Aquest reclutament de complexes HDACs per dCtBP donaria lloc a una desacetilació local dels nucleosomes que desplaçaria activadors units a llocs propers. No obstant, la incapacitat de CtBP d'unir histones hipoacetilades impediria que aquest efecte s'extengués més enllà de la regió promotora on CtBP ha estat portat per un repressor (figura I.5B).

•**Mecanisme independent de desacetilases.** L'observació de que CtBP de mamífers es pot associar amb proteïnes PcG ha fet sorgir la hipòtesi d'un possible mecanisme d'actuació de CtBP via el reclutament de complexes PcG, induïnt un estat compactat de la cromatina (Turner i Crossley, 2001). D'altra banda, també seria factible pensar en una possible acció de CtBP bloquejant la formació del complex de preiniciació, ja que recentment s'ha pogut observar que CtBP pot interaccionar amb dos components de la maquinària basal (Koipally i Georgopoulos, 2000).

Evidències experimentals suggereixen que l'activitat de dCtBP podria estar regulada per varis mecanismes: (a) per fosforilació de CtBP; (b) per una acetilació de lisines properes al motiu P-DLS de les proteïnes amb qui interacciona CtBP, una modificació que disminueix l'afinitat per CtBP; o (c) per unió a NAD/NADH: CtBP funciona com a sensor dels nivells NAD/NADH cel·lulars, i la seva activitat repressora es veu estimulada en 2-3 ordres de magnitud quan uneix NADH respecte quan està unit a NAD (revisat a Chinnadurai, 2002).

1.3.3. Factors de transcripció involucrats en processos d'activació i de repressió

En la classificació dels factors de transcripció en activadors/repressors o dels cofactors en co-activadors/co-repressors hi ha proteïnes que serien difícils d'ubicar, ja que poden actuar com a (co-)activadores o (co-)repressores depenent del context en què es troben. En aquests casos, les interaccions amb altres proteïnes són les que acaben determinant que un factor transcripcional acabi actuant com a activador o repressor:

La proteïna NC2 (Dr1/Drap1), per exemple, identificada com un repressor en promotors que tenen caixa TATA, recentment s'ha pogut observar que en promotors amb l'element DPE actua com un activador transcripcional (Willy *et al*, 2000).

Un altre exemple molt conegut correspon a Dorsal, una proteïna que pot interaccionar amb CBP i TAF_{II}s per activar la transcripció, però que en presència de Groucho i d'altres factors actua com a repressor induïnt la formació d'un repressosoma en el promotor diana (Flores-Saib *et al*, 2001).

I per últim citar el cas de CBF1/RBP-Jκ, l'homòleg a mamífers de la proteïna Suppressor of Hairless de *Drosophila*, el qual passa d'actuar de repressor a activador en resposta a la senyal de Notch. Quan actua com a repressor, CBF1/RBP-Jκ recluta el complex SMRT/HDAC1. Però quan s'activa la via de Notch es transloca al nucli una forma truncada de Notch que interacciona amb CBF1/RBP-Jκ, desplaçant el complex desacetilasa i donant lloc a una activació transcripcional (Kao *et al*, 1998).

2. GAGA I TRAMTRACK, DOS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ AMB DOMINIS POZ

2.1. Els dominis POZ/BTB

2.1.1. Proteïnes amb dominis POZ

El domini **POZ** (*poxvirus and zinc fingers*) o **BTB** (*broad complex, tramtrack and bric à brac*) és un motiu estructural d'interacció proteïna-proteïna d'uns 120 aa evolutivament molt conservat.

Tot i que originalment es va identificar en proteïnes de poxvirus i alguns factors de transcripció amb dominis d'unió a DNA de tipus dits de zinc, actualment hi ha descrites moltes proteïnes amb dominis POZ/BTB des de llevats fins a humans, on participen en funcions biològiques molt diverses que van des de l'organització del citoesquelet i la matriu nuclear a la regulació de la transcripció (Aravind i Koonin, 1999).

A *Drosophila* s'han identificat 64 gens que codifiquen per proteïnes amb dominis POZ (Rubin *et al*, 2000), la funció dels quals sovint està associada a etapes concretes del desenvolupament de la mosca. Així, els productes del gen *Broad-Complex* (BR-C) participen en la regulació de la metamorfosi, i les proteïnes Bric à Brac (BAB1 i 2) són requerides tant per al desenvolupament de potes i antenes com per la morfogènesi dels ovaris (Pointud *et al*, 2001). Per la seva banda, els productes dels gens *tramtrack* (TTK69 i TTK88) són repressors transcripcionals que regulen processos com la segmentació abdominal de l'embrió i el desenvolupament dels fotoreceptors. Finalment, el gen *Trithorax-like* (que codifica per GAGA) i el gen *mod(mdg4)*, corresponen a *enhancers* de variegació E(var) i, en el cas de GAGA, és requerida per a la correcta expressió d'alguns gens que participen en el desenvolupament de l'embrió.

A humans s'han trobat 113 proteïnes amb dominis POZ, moltes de les quals tenen papers essencials durant el desenvolupament, homeòstasi i neoplàsia. Una de les més estudiades és **PLZF** (*promyelocytic leukemia zinc finger*), un repressor transcripcional que participa en la regulació del desenvolupament embrionari i l'hematopoiesi. En aquest darrer cas PLZF actua com a supressor de creixement, bloquejant la proliferació i diferenciació mieloide, a través

del silenciament de gens involucrats en el cicle cel.lular (Collins *et al*, 2001). El gen de PLZF es troba disromput en pacients amb leucèmia promielocítica aguda (APL) associada a la translocació t(11;17)(q23;q21), en la qual la regió N-terminal de PLZF (contenint el domini POZ) està fusionada al receptor d'àcid retinoic α (RAR α), formant el producte PLZF-RAR α . Aquest nou producte oncogènic actua com a repressor en els elements de resposta a l'àcid retinoic i interfereix en la via normal de PLZF, donant lloc a una desregulació de la diferenciació mieloide que es manifesta en forma de leucèmia aguda (He *et al*, 1998; Melnick *et al*, 2002).

Una altra proteïna humana molt estudiada per la seva relació amb processos tumorigènics és **LAZ3/Bcl-6** (*lymphoma-associated zinc finger 3/B cell lymphomas 6*). Bcl-6 actua com a repressor d'un gran nombre de gens involucrats en l'activació de cèl.lules B, resposta immune dependent de cèl.lules T, inflamació i regulació del cicle cel.lular, essent essencial en molts d'aquests processos (Lemercier *et al*, 2002). El gen *BCL-6* va ser identificat per la seva implicació en les translocacions cromosomals associades al limfoma non-Hodking's (NHL), on la juxtaposició entre promotors heteròlegs (derivats d'altres cromosomes) i la seqüència codificant intacta per Bcl-6 resulta en una expressió desregulada d'aquest gen. A més a més, s'han trobat mutacions puntuals a la seqüència 5' no codificant del gen *BCL-6* en una gran proporció (40-70%) d'aquests limfomes. Aquestes evidències suggereixen doncs com a causa principal de la diferenciació de limfòcits, l'expressió desregulada del gen *BCL-6* (Chang *et al*, 1996; Huynh i Bardwell, 1998).

D'entre les proteïnes amb funcions no relacionades amb la regulació transcripcional, les més estudiades corresponen a les proteïnes **kelch** d'unió a actina, que actuen en la formació de canals circulars durant el desenvolupament dels oòcits de *Drosophila* (Robinson i Cooley, 1997), o les proteïnes dels **poxvirus**, la funció dels quals es desconeix.

2.1.2. Dominis associats

El domini POZ és un motiu estructuralment independent que desenvolupa funcions específiques a la proteïna on es troba. Normalment es troba en una sola còpia per proteïna i localitzat a la regió N-terminal d'aquesta, en combinació amb altres dominis com els motius de tipus "kelch", motius "ankyrin", dominis transmembrana, dominis d'unió a DNA de tipus Psq o dominis d'unió a DNA de tipus dits de zinc (revisat a Aravind i Koonin, 1999).

Aproximadament dues tercers parts de les proteïnes amb dominis POZ tenen **dits de zinc** a través dels quals s'uneixen a seqüències específiques de determinats promotors diana, on actuen regulant la transcripció (Ahmad *et al*, 1999). El nombre de dits de Zn en aquestes proteïnes és variable, podent trobar proteïnes amb un sol dit (seria el cas de GAGA), dos (TTK), cinc (PLZF o ZF5) o sis (Bcl-6).

Els altres dominis d'unió a DNA que es poden trobar associats al POZ són els **dominis Psq** (Pipsqueak), formats per quatre repeticions en tàndem d'un motiu Psq que s'ha suggerit que té una estructura similar a les *helix-turn-helix*. Les proteïnes Pipsqueak (PsqA i PsqB) i

Bric à brac (BAB1 i BAB2) de *Drosophila* són dos exemples de proteïnes amb la combinació dels dominis POZ i Psq (Siegmond i Lehmann, 2002).

2.1.3. Interaccions entre proteïnes mediades pel domini POZ

La funció principal del domini POZ és la de mediar interaccions proteïna-proteïna, les quals poden ser de tres tipus: (a) interaccions entre proteïnes d'una mateixa espècie a través del domini POZ, donant lloc a la formació d'homooligòmers; (b) interaccions entre proteïnes diferents que tenen dominis POZ, donant lloc a la formació d'heterooligòmers; i (c) interaccions entre proteïnes amb dominis POZ i altres proteïnes. La diversitat de proteïnes amb dominis POZ, així com la diversitat de possibles interaccions que poden mediar, suggereix un paper crític d'aquest domini en la regulació de molts processos biològics a través de la formació de complexos proteics.

La formació d'**homooligòmers** a través del domini POZ sembla ser un denominador comú per les proteïnes que el contenen, havent-se descrit tant per a proteïnes kelch, proteïnes amb domini Psq i proteïnes amb dits de zinc. No obstant, el tipus d'oligòmer que es forma no és igual per a tots els POZes, trobant casos com Bric à brac o PLZF on la forma predominant és un dímer (Chen *et al*, 1995; Li *et al*, 1997a), o el cas de la proteïna GAGA, que pot formar dímers, tetràmers i complexos d'alt pes molecular (Espinás *et al*, 1999; Katsani *et al*, 1999).

La formació d'**heterooligòmers**, en canvi, no sembla estar tan generalitzat, havent-se descrit tant interaccions positives com negatives entre proteïnes amb dominis POZ diferents. Concretament, s'han observat interaccions entre els POZes de PLZF i Bcl-6 (Daniel i Reynolds, 1999), HIC-1 i γ FBP-B (Deltour *et al*, 1999), Bach2 i MAZR (Kobayashi *et al*, 2000), TTK i Bric à Brac (Pointud *et al*, 2001) o Pipsqueak i GAGA (Schwendemann i Lehmann, 2002). D'altra banda, l'absència d'interacció entre els POZes de ZID vs els de GAGA, TTK o Poxvirus (Bardwell i Treisman, 1994), així com entre els POZes de Bcl-6 i Kaiso (Daniel i Reynolds, 1999), suggereix que no tots els dominis POZ poden interaccionar entre si, sinó que hi ha certa especificitat d'interacció.

La **interacció dels dominis POZ amb altres proteïnes** va ser descrita inicialment arrel de l'observació que les proteïnes Bcl-6 i PLZF es podien unir als co-repressors N-CoR i SMRT a través d'aquests dominis (Dhordain *et al*, 1997; Hong *et al*, 1997; Huynh i Bardwell, 1998). Estudis posteriors han identificat noves interaccions entre els dominis POZ de Bcl-6 i PLZF i altres co-repressors com Sin3A (Wong i Privalsky, 1998) o BCoR (Huynh *et al*, 2000), així com interaccions directes amb HDACs (David *et al*, 1998). Aquestes interaccions no són equivalents per les dues molècules repressores, sinó que s'han descrit diferències tant d'afinitat (PLZF s'uneix més dèbilment a SMRT que Bcl-6) com d'especificitat (el co-repressor BCoR interacciona de forma selectiva amb el domini POZ de Bcl-6), suggerint que els mecanismes de repressió, tot i que semblen anar per vies similars, no són idèntics per Bcl-6 o PLZF (Wong i Privalsky, 1998).

Altres interaccions observades són les dels dominis POZ de Bric à Brac (BAB1 i BAB2) amb BIP2/dTAF_{II}155 de *Drosophila* (Pointud *et al*, 2001), o la del POZ de PLZF amb p300 (Melnick *et al*, 2000), tot i que en ambdós casos se'n desconeix la repercussió biològica.

2.1.4. Estructura del domini POZ

El domini POZ de PLZF ha estat cristal.litzat recentment per dos grups diferents i se n'ha pogut resoldre la seva estructura (Ahmad *et al*, 1999; Li *et al*, 1999a). L'estructura cristal.lina, molt similar en ambdós casos, mostra un dímer POZ-POZ fortament entrelaçat amb una extensa interfase hidrofòbica. Aquestes característiques, típiques d'un homodímer obligat, serien consistents amb l'observació que el dímer POZ-POZ és una estructura molt estable i el seu desplegament implica una transició en dos estats totalment irreversible (Li *et al*, 1997a).

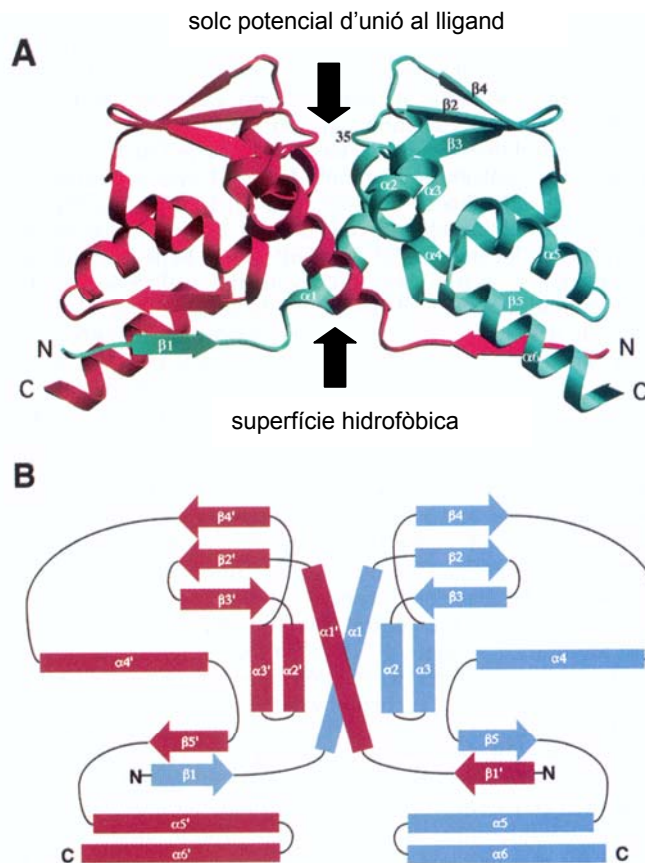


Figura I.6. Estructura tridimensional del domini POZ de PLZF. **A.** Estructura cristal.lina resolta del domini POZ de PLZF en forma de dímer, on cada monòmer està representat per un color diferent. Vénen indicades les regions corresponents al solc potencial d'unió al lligand i a la cara hidrofòbica del dímer. **B.** Representació esquemàtica de la topologia del dímer (extret d'Ahmad *et al*, 1999).

L'esquelet central de la proteïna està format per una agrupació d'hèlixs- α flanquejada per làmines β a la part superior i inferior de la molècula, donant lloc a una estructura globular en forma de papallona (figura I.6). Interaccions entre les regions N i C-terminal dels dos monòmers a la base inferior del dímer contribueixen al sosteniment de l'estructura: així, la

cadena $\beta 1$ de l'N-terminal d'un monòmer interacciona amb la cadena interna $\beta 5'$ de l'altre monòmer formant una làmina β antiparal.lela; a més a més, una cara d'aquesta làmina $\beta 1/\beta 5'$ s'empaqueta amb l'hèlix $\alpha 6'$ de la regió C-terminal del segon monòmer, formant una extensa superfície còncava a la cara inferior del dímer (Ahmad *et al*, 1999) (figures I.6A i I.6B).

L'estructura dimèrica del domini POZ i la seva capacitat d'interaccionar amb altres proteïnes permet definir tres classes estructurals de residus a la molècula: els situats a l'interior del *core* del monòmer, els situats a la interfase del dímer i els exposats a la superfície:

Core del monòmer: les cadenes $\beta 2$, $\beta 3$ i $\beta 4$ formen el sostre del cor hidrofòbic de cada monòmer, el qual està estabilitzat per alguns residus dels segments helicoidals $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ i $\alpha 5$. Tots aquests residus implicats en l'estructura del *core* del domini POZ corresponen als que estan més conservats entre les proteïnes de la família BTB/POZ (veure figura I.7). Així, His-48 (*loop* $\beta 3$ - $\alpha 2$), Leu-52 ($\alpha 2$), Ser-56 (*loop* $\alpha 2$ - $\alpha 3$) i Tyr-88 ($\alpha 4$) es troben conservats en pràcticament tots els dominis POZ.

Interfase del dímer: una quarta part de la superfície del monòmer accessible està involucrada en els contactes intermoleculars per a la formació del dímer. Aquests contactes són bàsicament a dos nivells: les interfases "tancades", que involucren $\beta 1/\beta 5'/\alpha 6'$ i $\beta 1'/\beta 5/\alpha 6$ a banda i banda de la part inferior del dímer; i una interfase "oberta" central formada per un entrecreuament de les hèlixs $\alpha 1$ i $\alpha 1'$ que s'estabilitza en empaquetar-se $\alpha 1'$ d'un monòmer amb el *loop* $\alpha 2/\alpha 3$ de l'altre.

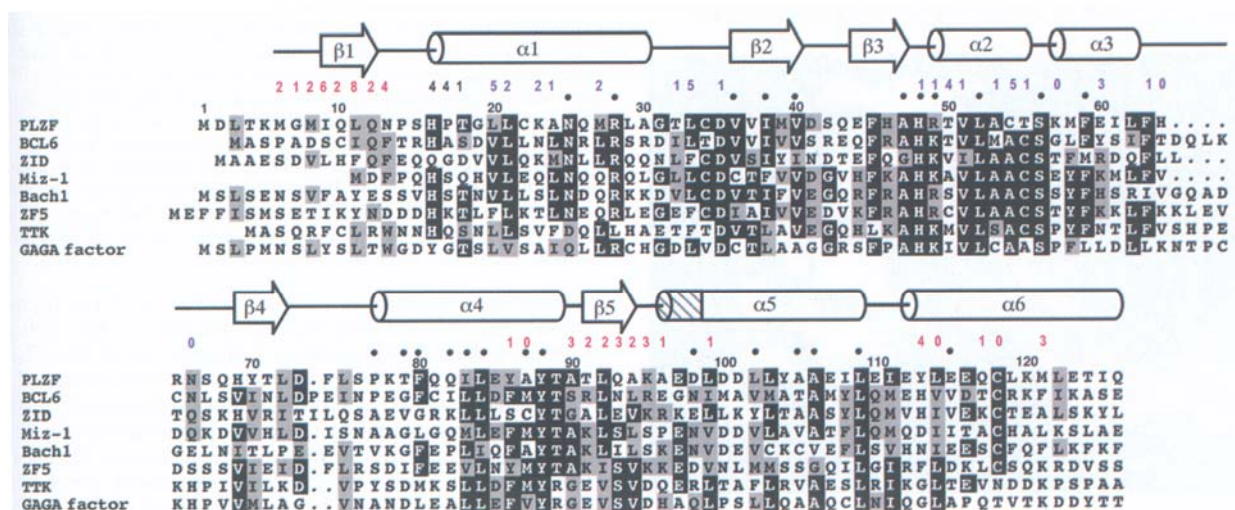


Figura I.7. Alineament de seqüència d'alguns dominis POZ/BTB i l'estructura secundària observada pel domini POZ de PLZF. La numeració s'ha fet en base al PLZF, i l'estructura cristal.lina s'ha resolt pels residus compresos entre les posicions 6-126. En negreta venen indicats els aminoàcids idèntics, i en gris els que estan conservats en almenys un 50% de les proteïnes. • indica els aminoàcids classificats com a "enterrats". Els números en color representen el percentatge amb què contribueix un residu determinat a la interfase "tancada" (vermell) o "oberta" (blau) del dímer (extret d'Ahmad *et al*, 1999).

La majoria de residus que estableixen el dímer són hidrofòbics, i estan conservats en un 80% entre els diferents dominis POZ. Per tant, sembla bastant probable que la majoria dels dominis POZ siguin també uns homodímers obligats i adoptin una estructura molt similar a la descrita pel PLZF. Donat que aquest homodímer és tan estable, però, el què potser sembla més difícil d'explicar és fins a quin punt realment els dominis POZ poden sostenir la formació d'heterooligòmers *in vivo*.

Solc potencial d'unió al lligand: el dímer POZ-POZ conté un solc pronunciat a la part superior de la molècula centrat a la intersecció entre les dues subunitats. El terra del solc està format per residus dels *loops* $\alpha 1/\beta 2$ i $\beta 3/\alpha 2$, mentre les parets estan definides pel *loop* $\alpha 3/\beta 4$. El fet que el solc estigui situat a l'eix central del dímer implica un requeriment de residus equivalents de les dues cadenes per a formar-lo, i que per tant només pugui existir quan el POZ està en forma dimèrica.

Les característiques del solc, amb uns 8 Å d'amplada i 20 Å de llarg que permetria acomodar pèptids de 5-6 aa, així com la presència d'alguns residus carregats al seu interior, han dut a suggerir que la interacció de PLZF amb lligands com SMRT, N-CoR, Sin3A o HDAC1 té lloc a través d'aquest. I donat que el solc només existeix en el dímer, la interacció amb aquestes molècules requeriria la formació del dímer (Ahmad *et al*, 1999).

Els residus del *loop* $\alpha 3/\beta 4$ que configuren la paret del solc tenen factors de temperatura de 40-60 Å², i per tant són els principals candidats a ajustar la seva conformació per acomodar el putatiu lligand. Casualment, aquests residus són dels menys conservats entre diferents dominis POZ (figura I.7), la qual cosa suggereix que segurament són importants en la determinació l'especificitat o afinitat de la interacció.

Tot i pertànyer a grups cristal·logràfics diferents, les dues estructures resoltes mostren interaccions dímer-dímer conservades que involucren l'extensió de la làmina $\beta 1/\beta 5'$ d'un dímer cap a la mateixa regió del dímer contigu, plegant-se en una orientació antiparalela (Li *et al*, 1999a). En aquesta estructura, vuit ponts d'hidrogen connecten els àtoms de les cadenes principals de la làmina $\beta 1$ de cada dímer (figura I.8A). El mode amb què es donen aquests contactes no impediria la formació d'interaccions exteses dímer-dímer que podrien donar lloc a la formació de multímers d'alt pes molecular (figura I.8B). Aquestes observacions suggereixen que els dominis POZ podrien mediar la formació d'oligòmers d'elevat pes molecular *in vivo*, una hipòtesi que d'altra banda estaria recolzada pels resultats que indiquen que GAGA pot formar grans complexos homooligomèrics *in vitro* (Espinás *et al*, 1999; Katsani *et al*, 1999).

2.1.5. Funcions associades al domini POZ

Els dominis POZ modulen la funcionalitat de les proteïnes que els contenen, mitjançant la formació d'homooligòmers o de complexos amb altres proteïnes diferents. Fins al moment s'han descrit tres classes de repercussions que comporta la presència d'un domini POZ:

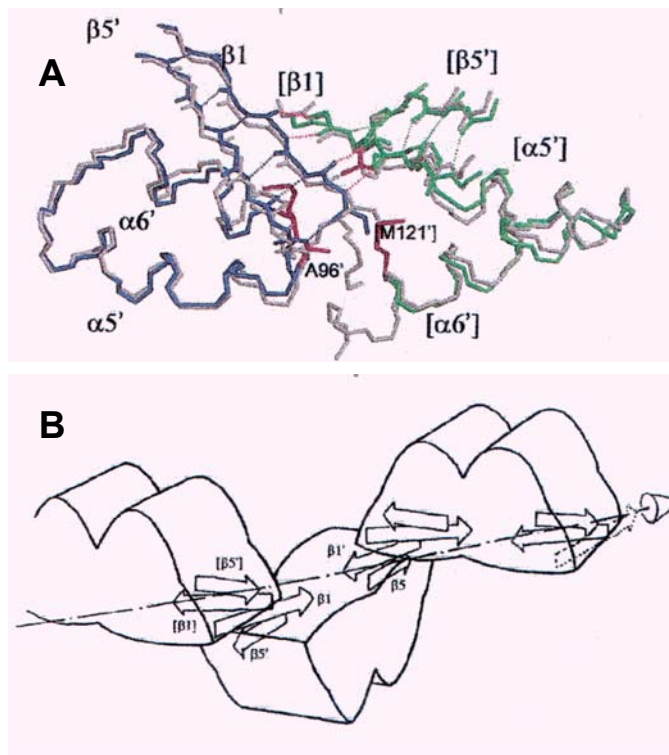


Figura 1.8. Interaccions dímer-dímer en el cristall del POZ de PLZF. **A.** Esquelet proteic de les regions implicades en les interaccions dímer-dímer en el cristall. Els punts d'hidrogen que tenen lloc en un mateix dímer es mostren puntejats amb el color del dímer (blau i verd respectivament), i els 8 punts d'hidrogen que connecten els àtoms de les cadenes principals de cada dímer es mostren en vermell. En gris ve representada una superimposició de les interaccions dímer-dímer descrites a Ahmad *et al*, 1999. **B.** Representació esquemàtica de com l'extensió de la làmina $\beta 1/\beta 5'$ d'un dímer cap a la mateixa regió del dímer contigu en orientació antiparal·lela podria donar lloc a la formació d'oligòmers d'alt pes molecular (extret de Li *et al*, 1999a).

2.1.5.1. Modulació de l'activitat transcripcional

Bona part de les proteïnes amb dominis POZ corresponen a factors de transcripció, i en la majoria dels casos aquest domini és essencial per l'activitat transcripcional de la proteïna. No obstant, les conseqüències que pot tenir la presència del domini POZ en la modulació de l'activitat transcripcional no són equivalents en tots els casos.

El cas més estudiat correspon als repressors **PLZF** i **Bcl-6**. Com ja s'ha comentat, aquestes dues proteïnes poden interaccionar a través del domini POZ amb diferents co-repressors i amb HDACs, i de fet s'ha pogut demostrar que la repressió mediada per PLZF i Bcl-6 és depenent de la dimerització a través del domini POZ i implica un reclutament de desacetilases al promotor diana, bé per interacció directa, o bé indirectament via els co-repressors (Grignani *et al*, 1998; Lin *et al*, 1998). La dimerització, però, tot i ser necessària semblaria no ser suficient per l'activitat repressora de PLZF i Bcl-6: mutacions que afecten al *core* del monòmer o a l'interfase del dímer i impedeixen la dimerització, disminueixen la capacitat de Bcl-6 i PLZF d'interaccionar amb co-repressors i en conseqüència de realitzar la seva activitat repressora (Li *et al*, 1999a; Melnick *et al*, 2000); no obstant, mutacions en residus situats al solc però que no impedeixen la formació del dímer, resulten també en una

incapacitat d'interaccionar amb les molècules co-repressores, donant suport a la hipòtesi que la interacció amb co-repressors és a través del solc generat en el dímer. En aquest sentit, s'ha observat que les variacions en els residus crítics del solc carregat modulen la capacitat dels dominis POZ d'interaccionar amb co-repressors i, en últim terme, el seu potencial repressor (Melnick *et al*, 2002).

El reclutament de complexes desacetilases no és però un mecanisme generalitzat per a tots els repressors amb dominis POZ. Així, la proteïna codificada pel gen **HIC-1** (*hypermethylated in cancer*) té un domini POZ, a través del qual pot dimeritzar, que és necessari per la seva activitat repressora. No obstant, aquest domini POZ no interacciona amb Sin3, SMRT o N-CoR, i la seva repressió no requereix activitat desacetilasa (Deltour *et al*, 1999; Deltour *et al*, 2002).

Un altre exemple de repressió a través del domini POZ és el del factor de transcripció **FBI-1**, el qual actua per un mecanisme que implica una interacció entre el seu domini POZ i els dits de zinc d'Sp1, interferint amb la unió al DNA de l'activador (Lee *et al*, 2002).

Pel què fa als activadors, un dels exemples més interessants és el dels factors de transcripció **Bach2** i **MAZR**, els quals heterodimeritzen a través dels respectius dominis POZ, essent aquesta interacció necessària perquè MAZR pugui mediar l'activació transcripcional (Kobayashi *et al*, 2000).

L'alt grau d'homologia que presenten els dominis POZ permet que en alguns casos es conservi la funció de la proteïna que els conté quan són substituïts pels POZes d'altres proteïnes. Així, s'ha descrit que quan el POZ de GAGA és canviat pel POZ de Mod(mdg4), GAGA reté un 70% de la seva activitat (Read *et al*, 2000). D'altra banda, el POZ de TTK69, essencial per la funció d'aquest durant el desenvolupament dels fotoreceptors, pot ser substituït pel POZ de Bcl-6 o de GAGA sense afectar l'activitat de TTK (Wen *et al*, 2000).

2.1.5.2. Modulació de la unió al DNA

S'ha suggerit en diverses ocasions que la presència del domini POZ inhibeix en part la unió al DNA de la proteïna que el conté, ja que s'observa un increment de l'afinitat pel lloc d'unió quan es deleta aquest domini. Aquest efecte inhibitori s'ha descrit per proteïnes amb dominis d'unió a DNA diferents, i per tant no semblaria ser el resultat d'una interacció específica entre el POZ i el domini d'unió a DNA adjacent (Bardwell i Treisman, 1994). No obstant, els estudis sobre el domini POZ de GAGA han evidenciat que depenent de la naturalesa dels llocs d'unió l'efecte de la presència del domini POZ pot ser totalment diferent (veure apartat 2.2.2.1).

2.1.5.3. Localització nuclear

Algunes proteïnes amb domini POZ (Bcl-6, PLZF, ZID i GAGA) apareixen al nucli en estructures granulades o puntejades (Dhordain *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 1997; Bardwell i Treisman, 1994; Read *et al.*, 2000). En alguns casos s'ha observat que quan es deleciona el POZ la tinció del nucli esdevé més difusa, havent-se suggerit un paper d'aquest domini en la localització nuclear de les proteïnes que el contenen.

2.2. La proteïna GAGA

GAGA és un factor nuclear de *Drosophila* que desenvolupa múltiples funcions en la regulació de la transcripció i el manteniment de determinades configuracions de la cromatina. Tot i ser identificada originalment com un activador transcripcional que s'unia a regions promotores dels gens *engrailed* i *Ultrabithorax* de *Drosophila* (Biggin i Tjian, 1988; Soeller *et al.*, 1988), actualment GAGA està considerada com un factor més complex i versàtil que pot estar associat tant a processos d'activació com de repressió.

2.2.1. Isoformes de GAGA

GAGA està codificada pel gen *Trithorax-like* (*Trl*), un gen que pertany a la família de gens del grup *Trithorax* (*TrG*). *Trl* és un gen de còpia única, i en cromosomes politènics s'ha pogut situar a la regió 70F1-2, un locus conegut perquè els seus mutants actuen com a *enhancers* de PEV (Farkas *et al.*, 1994). Mutants del gen *Trl* no arriben més enllà de la fase de larva, un fenotip indicatiu de que GAGA és essencial durant els primers estadis de desenvolupament.

El gen *Trl* genera, per *splicing* alternatiu, trànscripats amb longituds que varien entre 2.4 i 4.4 kpb i que donen lloc a dues isoformes majoritàries de la proteïna GAGA (Soeller *et al.*, 1993; Benyajati *et al.*, 1997): **GAGA-519** i **GAGA-581**, de 519 i 581 aminoàcids respectivament, les quals tenen una regió N-terminal comuna, i difereixen en el domini C-terminal (veure figura I.9A).

Aquestes dues isoformes co-localitzen en nombroses bandes eucromàtiques en cromosomes politènics i funcionen de manera similar com a transactivadors en assajos de transfecció i com a remodeladors de nucleosomes *in vitro*; a més a més, ambdues són capaces de formar complexos homomèrics i heteromèrics tant *in vivo* com *in vitro* (Benyajati *et al.*, 1997). No obstant, estudis recents amb mosques transgèniques demostren que GAGA-519 i GAGA-581 no són funcionalment equivalents, tot i que les seves activitats estan solapades (Greenberg i Schedl, 2001).

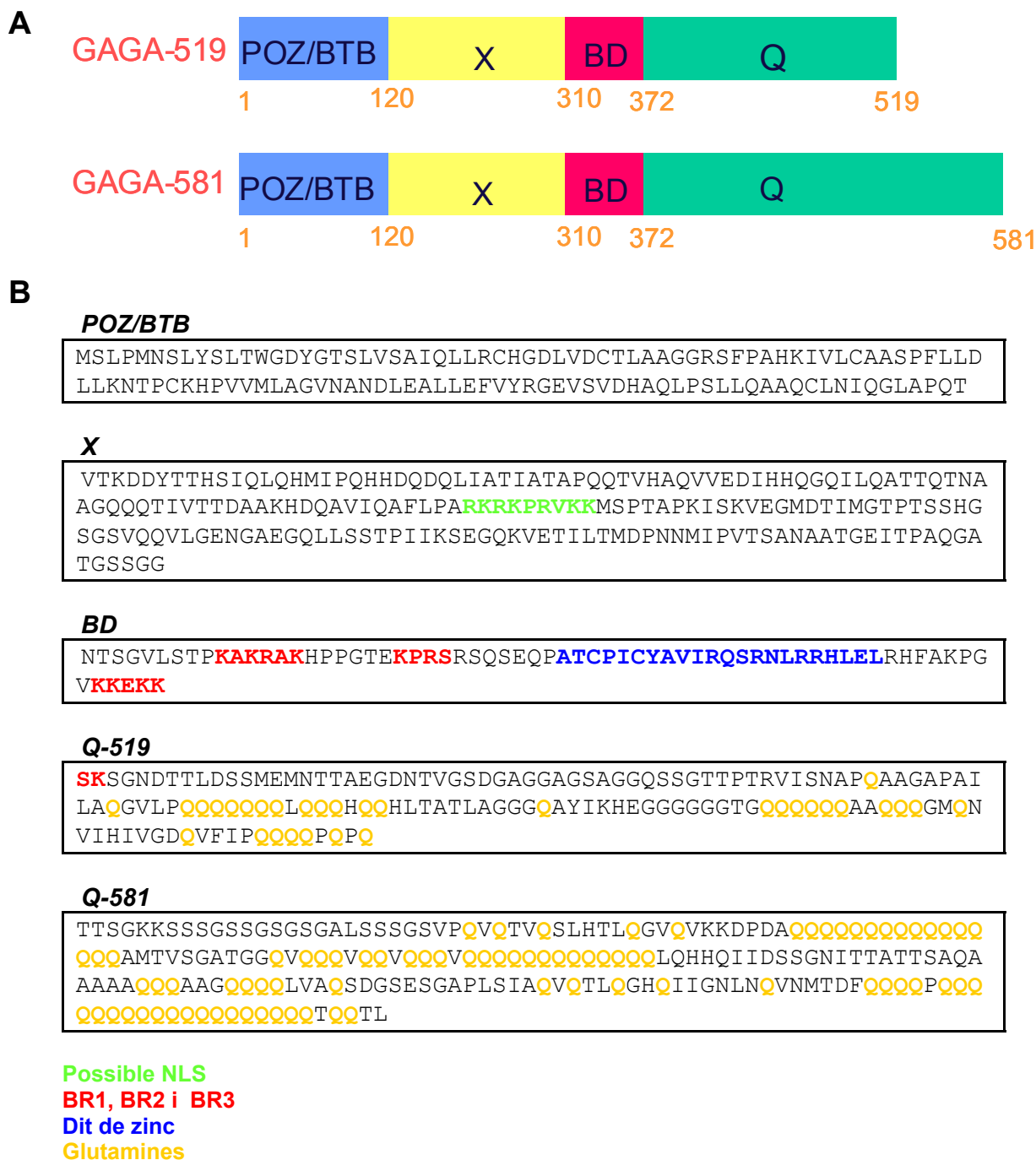


Figura I.9. A. Representació esquemàtica de les isoformes GAGA-519 i GAGA-581. B. Seqüències aminoacídiques de GAGA-519 i GAGA-581 amb els motius més representatius indicats. Extret de Lintermann *et al*, 1998.

De fet, les diferències observades en els respectius patrons d'expressió ja suggereixen que les funcions exercides per les dues isoformes no són idèntiques. Així, només la GAGA-519 s'acumula durant les primeres 6 hores de l'embriogènesi, gràcies a l'aport matern d'mRNA depositat en l'ou durant l'oogènesi (Soeller *et al*, 1993; Bhat *et al*, 1996). Posteriorment, les GAGA-519 i 581 són presents en quantitats similars al llarg del desenvolupament, tot i que a nivell de teixit presenten certa variabilitat (Benyajati *et al*, 1997): a partir de les 6 hores els nivells GAGA-519 i 581 es van incrementant, i arriben a un màxim entre les 9 i 12 hores,

moment en el qual comencen a disminuir progressivament fins a desaparèixer a la fase de larva; a l'estadi de pupa es torna a observar certa expressió, però a adults aquesta és pràcticament nul·la (Soeller *et al*, 1993). Aquest patró d'expressió suggereix, per una banda, un paper essencial de la GAGA-519 en etapes primerenques del desenvolupament embrionari que no compartiria amb la isoforma 581, i per l'altra, funcions de les dues isoformes en estadis més tardans del desenvolupament.

Tant la GAGA-519 com la GAGA-581 semblen estar sotmeses a modificacions post-traduccionals que, de la mateixa manera que l'*splicing* alternatiu, estarien regulades al llarg del desenvolupament, ja que combinacions de vàries espècies de GAGA difereixen durant el desenvolupament i en diferents tipus cel·lulars. Concretament, en assajos *in vitro* s'ha observat que GAGA pot ser o-glicosilada (Jackson i Tjian, 1988), fosforilada i acetilada (C. Bonet, comunicació personal), tot i que encara es desconeix quina repercussió poden tenir aquestes modificacions en la funcionalitat de la proteïna.

Així doncs, a partir d'un únic gen, la complexitat de la proteïna GAGA és força gran en poder-se presentar amb un ventall d'isoformes generades a diferents nivells: vàries seqüències primàries aminoacídiques, diferents modificacions post-traduccionals per una mateixa espècie proteica, o la formació de complexos homo- i heteromèrics.

2.2.2. Dominis de GAGA

Les isoformes 519 i 581 estan organitzades en quatre dominis ben definits: un domini POZ/BTB a la regió N-terminal, una regió X de funció desconeguda, un domini d'unió a DNA amb un dit de zinc de tipus Cys₂-His₂, i un domini C-terminal ric en glutamines (domini Q), diferent per a les dues isoformes (figura I.9B).

2.2.2.1. El domini POZ/BTB de GAGA

El **domini POZ** de GAGA comprèn els primers 120 residus de la proteïna. Els estudis sobre aquest domini han evidenciat que és el responsable de l'oligomerització de GAGA tant *in vivo* com *in vitro*. A més a més, s'ha observat que en condicions *in vitro*, els oligòmers formats poden ser dímers, tetràmers i complexos d'elevat pes molecular (Espinás *et al*, 1999; Katsani *et al*, 1999).

L'efecte del domini POZ de GAGA sobre la unió al DNA, tot i que en un principi es va suggerir que era inhibitori (Bardwell i Treisman, 1994), semblaria que depèn del nombre i la llargada dels llocs d'unió. Concretament, s'ha pogut observar que quan els llocs d'unió són únics i curts sí que és cert que el domini POZ provoca certa inhibició en la unió al DNA (bé perquè el plegament del domini POZ desafavoreix els contactes amb el DNA, o perquè la multimerització de la proteïna impedeix aquesta unió). Ara bé, quan els llocs d'unió són llargs o estan en nombre múltiple, com és el cas d'alguns promotors naturals, els dominis POZ, afavorint l'oligomerització de la proteïna, medien la unió cooperativa de la GAGA al

DNA, la qual, en forma d'oligòmer, pot unir simultàniament diversos llocs independents (Espinás *et al*, 1999). Així doncs, l'oligomerització i unió cooperativa al DNA explica que l'afinitat de GAGA per seqüències múltiples i properes sigui més gran que per llocs únics i curts.

Estudis realitzats amb microscopi electrònic indiquen que la unió sinèrgica de l'oligòmer de GAGA provoca una curvatura en el DNA, suggerint un possible paper de l'oligomerització en assistir la comunicació entre elements molt allunyats en seqüència (Katsani *et al*, 1999). Donant suport a aquesta hipòtesi, recentment s'ha pogut observar que GAGA facilita la trans-activació actuant com a proteïna pont que media la comunicació entre un *enhancer* distal i el promotor, i que aquesta funció és dependent de l'oligomerització a través del domini POZ (Mahmoudi *et al*, 2002).

D'altra banda, assajos de transcripció *in vitro* han demostrat que els oligòmers de GAGA són transcripcionalment actius, i que encara que el domini POZ no és necessari per l'activació, en la seva absència no s'observa un sinèrgisme en incrementar el nombre de llocs d'unió (Espinás *et al*, 1999).

2.2.2.2. La regió X

A diferència dels altres dominis, la **regió X**, que abarca els residus 121-310, ha estat poc estudiada i actualment encara se'n desconeix la seva funció. No obstant, l'alt grau de conservació que presenta entre les espècies de *D. melanogaster* i *D. virilis* suggereix que exerceix algun paper important per a la proteïna GAGA (Lintermann *et al*, 1998).

Aquesta regió conté la putativa senyal de localització nuclear (NLS) de GAGA (Lintermann *et al*, 1998). D'altra banda, recentment s'ha pogut demostrar que és necessària per la interacció de GAGA amb NURF301 (Xiao *et al*, 2001), i que contribueix en la interacció de GAGA amb SAP18 (Espinás *et al*, 2000).

2.2.2.3. El domini d'unió a DNA de GAGA

El **domini d'unió a DNA** o **DBD** (*DNA binding domain*), que inclou els residus 310-372, està format per un únic dit de zinc de tipus Cys₂-His₂ flanquejat per tres regions bàsiques anomenades BR1, BR2 (localitzades a N-terminal del dit de zinc) i BR3 (situada en posició C-terminal).

En la majoria de proteïnes amb dits de zinc, aquests es troben repetits en tàndem en un nombre que oscil·la entre 2 i 32. Quan estan en nombre múltiple, els dominis Cys₂-His₂ acostumen a reconèixer les dianes de forma modular, de manera que cada unitat reconeix 3 pb de DNA. En el cas de GAGA, el domini mínim de reconeixement al DNA requereix, a més del dit de zinc, les regions BR1 i BR2, les quals li confereixen afinitat i especificitat d'unió. La regió BR3, tot i no ser necessària per la unió, n'incrementa l'afinitat (Pedone *et al*, 1996).

El domini d'unió a DNA ha estat un dels més estudiats de la proteïna GAGA, i s'ha arribat a resoldre la seva estructura per RMN conjuntament amb l'oligonucleòtid de doble

cadena **GAGAG** (que constitueix la seqüència consens mínima d'alta afinitat de GAGA). Segons aquesta estructura, el dit de zinc s'uniria als tres primers nucleòtids, i les dues regions bàsiques BR1 i BR2 s'unirien a les dues últimes bases. De fet, BR1 i BR2 semblen tenir una contribució menor en la interacció amb el DNA, ja que mutacions en un sol nucleòtid de la seqüència consens (excepte la G central) tenen només efectes moderats en la unió al DNA (Omichinski *et al*, 1997). Aquests resultats estarien d'acord amb el fet que, tot i que la seqüència consens d'alta afinitat és el pentanucleòtid GAGAG, el DBD també és capaç d'unir el trinucleòtid **GAG** tant en promotors naturals com en llocs sintètics, tot i que amb menor afinitat que seqüències d'unió més llargues (Wilkins i Lis, 1998).

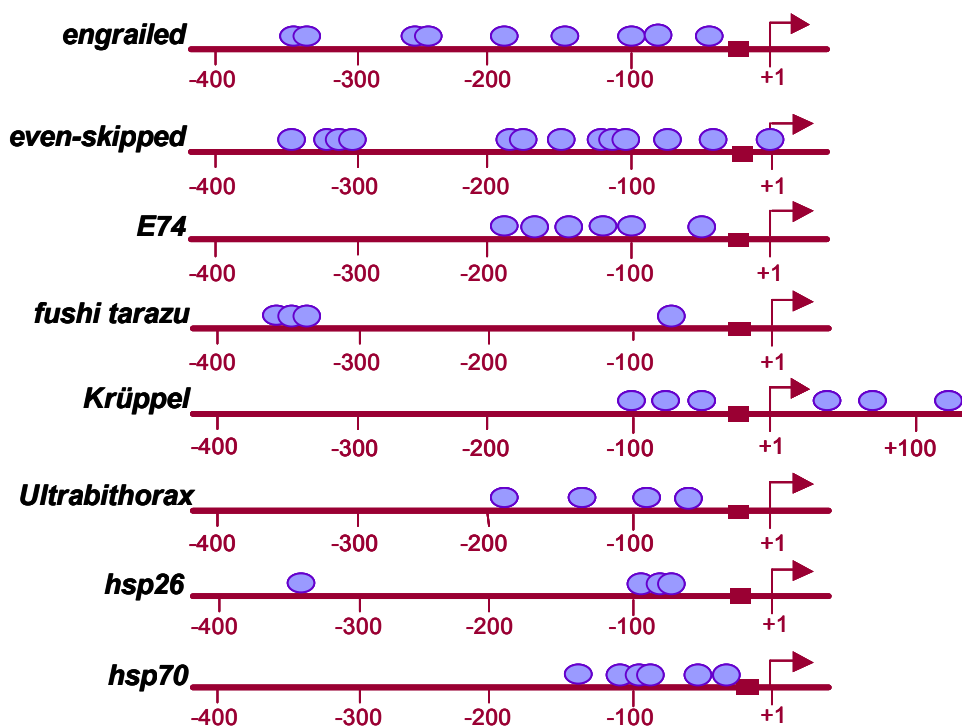


Figura I.10. Distribució dels llocs d'unió de GAGA en diversos promotors. Les localitzacions dels llocs d'unió, obtinguts mitjançant *footprinting* amb DNasa I, s'indiquen amb el.lipses blaves (extret de Soeller *et al*, 1993).

Tot i que la seqüència GAGAG s'ha definit com la seqüència consens a què GAGA s'uneix amb elevada afinitat, els llocs d'unió naturals presenten gran variabilitat tant en longitud com en seqüència (revisat a Granok *et al*, 1995).

GAGA participa en la regulació de l'expressió de bastants gens de *Drosophila*, els quals inclouen gens induïbles o regulats (*hsp26*, *hsp70*, *H3/H4*, *Adh*, *E74*), gens involucrats en el desenvolupament (*engrailed*, *even-skipped*, *fushi-tarazu*, *Krüppel*, *Ultrabithorax*) i gens constitutius o *housekeeping* (*actina 5-C*, *$\alpha 1$ -tubulina*) (Soeller *et al*, 1993). Tots aquests gens presenten llocs d'unió de GAGA en nombre múltiple i extesos al llarg de les seves regions promotores, normalment en un rang entre -30/-300, tot i que en alguns casos es troben més allunyats o bé *downstream* del lloc d'inici de transcripció (figura I.10). Sovint aquests elements GAGA es troben solapats o agrupats en forma de *clusters*, una disposició que facilitaria la unió d'una GAGA oligomèrica al DNA (Wilkins i Lis, 1997).

El paper de GAGA no només està limitat a les regions promotores o *enhancers*, per això també trobem llocs d'unió de GAGA als elements de resposta a Polycomb (concretament als PRE *iab-7* i *bx-d*) i en un domini barrera o *boundary* (*Fab-7*) del complex Bithorax (Hagstrom *et al*, 1997; Horard *et al*, 2000).

Finalment, GAGA també s'ha observat que s'uneix a algunes zones heterocromàtiques, concretament als satèl·lits (AAGAG)_n (Raff *et al*, 1994; Platero *et al*, 1998).

2.2.2.4. El domini ric en glutamines o domini Q

L'extrem C-terminal de la proteïna GAGA té varies regions riques en glutamines, per això es coneix com a **domini Q**. És la única regió diferent per a la GAGA-519 i la GAGA-581, tant en seqüència aminoacídica com en longitud (Q-581 té el doble de residus que Q-519).

Anàlogament a d'altres activadors transcripcionals amb dominis rics en glutamines, s'ha pogut assignar el domini Q com el responsable de la funció transactivadora de GAGA, ja que la deleció d'aquest domini aboleix l'activitat transcripcional de la proteïna. Un anàlisi exhaustiu d'aquest domini ha permès observar que presenta una estructura interna modular en què cadascuna de les diferents regions contribueixen a l'activació. A més a més, el domini Q pot actuar independentment de la resta de la proteïna (Vaquero *et al*, 2000).

Adicionalment a la seva funció transactivadora, al domini Q se li han assignat també altres propietats, com la de distorsió del DNA o la de mediar la multimerització de GAGA formant agregats de tipus fibres amiloides (Agianian *et al*, 1999; Wilkins i Lis, 1999).

D'altra banda, estudis recents sobre les propietats dels dominis Q-519 i Q-581 suggereixen que aquestes regions influenciarien o modularien la selecció del lloc d'actuació d'aquestes dues isoformes (Greenberg i Schedl, 2001).

2.2.3. Funcions de GAGA

2.2.3.1. GAGA com a factor de transcripció

Els primers estudis en què es va identificar GAGA suggerien que aquesta era un activador transcripcional que actuava sobre molts gens de *Drosophila* que contien seqüències alternants d(GA·TC)_n a les seves regions promotores, ja que en assajos de transcripció *in vitro* i de transfecció a cèl·lules s'observava que l'addició de GAGA estimulava la transcripció d'aquests gens (Biggin i Tjian, 1988; Soeller *et al*, 1988; Thummel, 1989; Chung i Keller, 1990; Read *et al*, 1990).

Més tard, en estudis d'activació del gen *Krüppel* es suggerí que l'activació de la transcripció observada en presència de GAGA no era deguda a una acció de GAGA com a activador transcripcional, sinó que aquesta de fet actuaria com un **antirepressor** (Kerrigan *et al*, 1991). Concretament, es va observar que GAGA només estimulava la transcripció quan en el DNA motlle hi era present la histona H1, la qual s'unia de forma inespecífica a les

regions d(GA·TC)_n i era desplaçada per GAGA degut a la seva major afinitat per aquestes seqüències. En canvi, sobre DNAs nus sense histona H1, GAGA no era capaç d'activar, mentre altres repressors com Sp1 o GAL4VP16 sí (Croston *et al*, 1991). Finalment, els mateixos autors van descriure l'antirepressió com un fenomen generalitzat i una propietat de la majoria d'activadors, essent essencial el domini d'unió a DNA per aquesta activitat (Croston *et al*, 1992).

Estudis posteriors han demostrat que GAGA realment funciona com a activador transcripcional, tant *in vivo* (Soeller *et al*, 1993; Benyajati *et al*, 1997) com *in vitro* (Vaquero *et al*, 2000). Tot i que es desconeix el mecanisme d'activació de GAGA, existeixen evidències experimentals que suggereixen que GAGA estimula tant el reclutament de GTFs al promotor com la reiniciació (Vaquero *et al*, 2002).

2.2.3.2. GAGA i la remodelació de la cromatina

Les primeres evidències que revelaren una funció de GAGA associada a la reorganització de l'estructura de la cromatina sorgiren d'estudis sobre el mecanisme d'activació dels gens *heat shock* (*hsp26* i *hsp70*) de *Drosophila*. **Hsp26 i hsp70** són gens l'expressió dels quals pot ser induïda ràpidament en resposta al xoc tèrmic. Això es deu a que les seves regions promotores presenten una estructura de la cromatina oberta, que permet que la maquinària transcripcional estigui constitutivament unida al promotor i la RNAP II pugui iniciar la transcripció, però no pugui progressar més enllà d'una elongació primerenca, mantenint-se aturada entre les posicions +17 i +37. La inducció per xoc tèrmic desencadena una fosforilació del *heat shock factor* (HSF) que indueix la seva trimerització, i li permet aleshores unir-se als *heat shock elements* (HSE) del promotor. Aquesta unió desbloqueja l'estat de pausa en què es troba la RNAP II, la qual aleshores pot continuar elongant normalment (Shopland *et al*, 1995; Wilkins i Lis, 1997).

GAGA té un paper fonamental en l'activació d'aquests gens, ja que en unir-se a les seves regions promotores genera llocs d'hipersensibilitat a DNasa I (llocs DH), mantenint una conformació oberta del promotor que és essencial tant per la unió constitutiva de la maquinària transcripcional (facilita el reclutament de RNAP II i TFIID) com per la unió del HSF als seus elements (Shopland *et al*, 1995; Leibovitch *et al*, 2002).

D'altra banda, estudis de *crosslinking in vivo* han evidenciat que GAGA també es pot unir a les regions codificants d'alguns gens durant l'elongació, seguint una cinètica similar a la de la polimerasa (O'Brien *et al*, 1995). Això ha fet sorgir la hipòtesi de que GAGA podria actuar de dues formes: unint-se constitutivament als llocs d'alta afinitat del promotor, i avançant al llarg del gen una vegada ha estat induït, obrint la cromatina i facilitant el pas de la polimerasa.

Tsukiyama *et al*, 1994, van estudiar l'efecte de GAGA sobre el promotor del gen *hsp70* reconstituït *in vitro* en cromatina a partir d'un extracte embrionari de *Drosophila*. En absència de GAGA, el sistema d'ensamblatge era capaç de col·locar un nucleosoma sobre dos de les quatre seqüències d(GA·TC)_n de promotor. No obstant, l'addició de GAGA abans,

durant o després de l'ensamblatge de la cromatina produïa una disrupció dels nucleosomes i la formació de llocs DH tant a l'element GAGA com al HSE, així com una reordenació dels nucleosomes adjacents. Aquest procés era depenent d'ATP, i com GAGA no té la capacitat d'hidrolitzar ATP, es buscà el factor que actuava en cooperació amb GAGA, que resultà ser el complex remodelador NURF (Tsukiyama i Wu, 1995). Aquesta acció conjunta de NURF i GAGA estaria facilitada per una associació directa entre la subunitat NURF301 del complex remodelador i GAGA (Xiao *et al.*, 2001), i consistiria en un deslliçament (*sliding*) de nucleosomes per part de NURF que permetria a GAGA unir-se a les seves seqüències de reconeixement; posteriorment, i una vegada unida, GAGA redefiniria les posicions dels nucleosomes.

Aquesta propietat de reorganitzar nucleosomes no és exclusiva de GAGA, sinó que altres factors d'unió a DNA com HSF (Wall *et al.*, 1995) o derivats de GAL4 (Mizuguchi *et al.*, 1997) poden actuar també en cooperació amb NURF i afectar l'estructura de la cromatina de manera similar a GAGA.

D'altra banda, l'acció de GAGA no sembla dependre de la presència del complex NURF, sinó que tan sols requeriria la subunitat ATPasa ISWI, present també en altres complexos remodeladors. En aquest sentit, s'ha descrit que GAGA i ISWI poden actuar conjuntament per mediar una disrupció nucleosomal al promotor de *fushi tarazu* que dóna lloc a una activació de la transcripció del gen (Okada i Hirose, 1998). A més a més, GAGA i ISWI col·localitzen en molts loci eucromàtics en cromosomes politéncics (Deuring *et al.*, 2000), havent-se suggerit que una acció dels dos factors sobre les regions promotores podria ser important en l'activació de determinats gens.

Un punt de controvèrsia constant en el mode d'actuació de GAGA ha estat el solapament de les seves propietats activadores i remodeladores de la cromatina. Això ha fet dubtar sovint de la funció de GAGA com a activador de la transcripció, havent-se atribuït l'efecte que s'observava en presència de GAGA a la seva acció sobre els nucleosomes. No obstant, estudis recents en mosques transgèniques indiquen que l'activació transcripcional mediada per GAGA no necessàriament ve acompanyada d'una reorganització nucleosomal, sinó que les dues activitats són independents (Pile i Cartwright, 2000).

2.2.3.3. GAGA en la regulació dels gens homeòtics

El Complex Bithorax (BX-C), de més de 300 kpb, està dividit en grans dominis cadascun dels quals dirigeix l'expressió dels gens homeòtics *Ultrabithorax*, *Abdominal-A* i *Abdominal-B* en un parasegment de la mosca. Les senyals reguladores inicials provenen dels gens "gap" i "pair-rule", però quan aquestes senyals decauen els patrons d'expressió són mantinguts pels membres dels grups PcG (*Polycomb-group*) i TrxG (*Trihorax-group*), per als quals s'han identificat elements de resposta al llarg del BX-C, els *Polycomb response elements* (PRE) i els *Trithorax response elements* (TRE).

Les funcions d'aquests dos grups de gens són en principi antagòniques, de tal manera que els membres PcG (Polycomb, Pleiohomeotic, Posterior Sex Combs, Extra Sex Combs i Enhancer of Zeste) indueixen estats reprimits de determinades regions per compactació de la

cromatina, mentre els TrxG (Trithorax, GAGA, Brahma, Moira, Kismet, Osa i dISWI) produeixen un efecte positiu sobre l'activació dels loci genètics, bé fent més accessible la cromatina a altres factors, bé reclutant elements amb funcions remodeladores de la cromatina (revisat a Farkas *et al*, 2000).

GAGA, com els altres membres de la família TrxG, actua positivament sobre l'expressió dels gens homeòtics, mantenint una estructura oberta de la cromatina en determinades regions reguladores i activant l'expressió d'alguns d'ells.

No obstant, recentment han sorgit una sèrie d'evidències que apuntarien a que GAGA també podria estar associada a una funció repressora en cooperació amb membres PcG. Per una banda, GAGA co-localitza amb Polycomb en alguns PREs (Strutt *et al*, 1997), a més d'haver-se trobat formant part d'alguns complexos PcG i ser requerida per la unió d'aquests als PRE en experiments *in vitro* (Horard *et al*, 2000), suggerint que GAGA participa activament en el reclutament dels PcG als seus elements de resposta. A més a més, s'ha observat que per al correcte silenciament del PRE *iab-7* i el *silencer* MCP d'*Abdominal-B* són necessaris tant GAGA com Pleiohomeotic (Mishra *et al*, 2001; Busturia *et al*, 2001). Algunes evidències experimentals com la interacció física i funcional entre GAGA i SAP18 (Espinás *et al*, 2000), així com la presència de GAGA, Rpd3 i membres del PcG en un complex silenciador (Poux *et al*, 2001), han fet sorgir la hipòtesi que la col.laboració entre GAGA i membres PcG per a la repressió de determinats loci vindria mediada per un reclutament de desacetilases.

D'altra banda, estudis molt recents demostren que GAGA està acomplexada *in vivo* amb la proteïna Pipsqueak, i que de fet ambdues s'uneixen als mateixos elements GAGA per actuar cooperativament en l'activació transcripcional i el silenciament dels gens homeòtics (Schwendemann i Lehmann, 2002).

Aquesta funció repressora de GAGA semblaria no estar limitada al context de la regulació dels gens homeòtics. Concretament, recentment s'ha pogut observar en experiments de transfecció a cèl.lules de *Drosophila* que GAGA media la repressió del seu propi promotor en una acció que requereix del seu domini d'unió a DNA i de la presència dels elements GAGA al promotor *Trl* (Kosoy *et al*, 2002).

2.2.3.4. GAGA en els insulators

Els *insulators* són elements de seqüència que aïllen la regió on es troben de la influència d'*enhancers* o silenciadors de la regió adjacent. Així, la presència d'un *insulator* permet que un *enhancer* afecti a un promotor però no a un altre situat en direcció oposada

S'ha proposat que GAGA podria facilitar l'acció d'alguns *insulators*, bloquejant *enhancers* distals i estabilitzant interaccions *enhancer*-promotor. Concretament, s'ha identificat un element que funciona com a *insulator* entre la caixa TATA i el lloc d'inici de transcripció del promotor d'*even-skipped* (*eve*) que conté una seqüència GAGAG. Mutacions en aquest element donen lloc a una activació dels gens situats a 5' d'*eve* per *enhancers* situats a 3', suggerint que en el promotor natural la unió de GAGA al seu element impediria

que *enhancers* a 3' tinguessin cap influència sobre el promotor (Ohtsuki i Levine, 1998). Aquesta acció de GAGA, "atrapant" *enhancers* distals per una estabilització de les interaccions *enhancer*-promotor, de fet es podria explicar per la seva capacitat d'actuar com a proteïna pont entre elements allunyats físicament (Mahmoudi *et al*, 2002).

2.2.3.5. GAGA i heterocromatina

GAGA no sembla estar implicada només en l'estructuració de la cromatina en regions promotores o grans loci genètics com el BX-C, sinó que també té una influència en regular l'estructura de l'heterocromatina.

La primera evidència d'aquesta funció sobre l'heterocromatina fou l'observació que els mutants del gen *Trl* actuaven com a *enhancers* de PEV (Farkas *et al*, 1994), suggerint un paper de GAGA en mantenir una estructura oberta de la cromatina en determinades regions heterocromàtiques. Concretament, s'ha postulat que la funció de GAGA en relació amb l'heterocromatina podria ser la d'obrir la cromatina per a permetre l'expressió de gens situats en aquestes regions per una banda, i impedir l'expansió de l'heterocromatina als punts on estaria unida per l'altra. Alternativament, també s'ha proposat un paper més general de GAGA modificant l'estructura de la cromatina localment, bé promovent un arranjament nucleosomal alterat o bé permetent que factors específics d'heterocromatina accedissin al DNA (Jiménez-García, 1998).

D'acord amb aquesta hipòtesi, s'ha observat que GAGA es pot unir a regions específiques de l'heterocromatina, concretament als satèl.lits (AAGAG)_n i (AAGAGAG)_n. En embrions pre-blastodèrmics, on encara no s'ha establert l'heterocromatina, GAGA es troba unida a aquestes regions al llarg de tots els estadis del cicle cel.lular (Raff *et al*, 1994); en canvi, en embrions més tardans en els quals ja ha tingut lloc l'heterocromatinització, la localització de GAGA als satèl.lits (AAGAG)_n i (AAGAGAG)_n tan sols s'observa durant la mitosi (Platero *et al*, 1998). El fet que GAGA només es trobi unida a l'heterocromatina a mitosi, juntament amb l'observació que mutants hipomòrfics *Trl*^{l3C} presenten defectes en la condensació i segregació dels cromosomes, ha dut a suggerir un paper actiu de GAGA en l'organització correcta de l'heterocromatina en el moment de la mitosi, evitant una compactació desordenada (Bhat *et al*, 1996).

2.3. La proteïna Tramtrack

Tramtrack (TTK) va ser identificat com un repressor transcripcional que s'unia a determinades regions promotores dels gens "pair-rule" *even-skipped* i *fushi tarazu* (Harrison i Travers, 1990; Read i Manley, 1992; Brown i Wu, 1993). Estudis posteriors han demostrat que TTK també té un paper essencial en el desenvolupament de les cèl.lules neuronals, reprimint la identitat neuronal i estabilitzant els destins no-neuronals (Xiong i Montell, 1993; Lai i Li, 1999; Badenhurst, 2001).

2.3.1. Isoformes de TTK

El gen *tramtrack* (*ttk*), situat a la posició 100D3 a cromosomes politènics, genera per *splicing* alternatiu dos mRNAs de 3.6 i 4.2 kpb que donaran lloc a dues proteïnes, **Tramtrack69** (TTK69) i **Tramtrack88** (TTK88), de 641 i 811 aminoàcids i amb pesos moleculars predits de 69 i 88 kDa respectivament. TTK69 i TTK88 tenen iguals els primers 291 aminoàcids, essent diferents en la resta.

A diferència de les isoformes de GAGA, TTK69 i 88 s'han pogut associar a funcions diferents. Així, mentre TTK69 participa tant en la regulació de la segmentació abdominal de l'embrió com en el desenvolupament neuronal, TTK88 bàsicament se l'ha relacionat amb funcions repressores del destí neuronal.

Els patrons temporals i espacials d'expressió d'ambdues isoformes al llarg de l'embriogènesi són força complexes, i han estat objecte de nombrosos estudis (Harrison i Travers, 1990; Read i Manley, 1992; Read *et al*, 1992; Brown i Wu, 1993). Durant les 2 primeres hores després de la fertilització, i fins a l'estadi de blastoderm cel.lular, TTK69 i 88 s'expressen de forma generalitzada per tot l'embrió degut a la deposició dels respectius mRNAs per part de la mare (són, igual que GAGA, d'efecte matern). Entre les 2-4 hores, de blastoderm a gàstrula, els transcrits de *ttk* ja han desaparegut, i encara no s'ha iniciat l'expressió zigòtica. Aquesta darrera comença a ser evident entre les 4-8 hores, període en què es van incrementant gradualment els nivells de les dues proteïnes fins arribar a un pic a les 8-12 hores. Durant aquesta etapa, que coincideix amb la gastrulació i extensió de la banda germinal, l'expressió de TTK69 i 88 al llarg de l'embrió presenta força diferències. Una de les característiques més peculiars de l'expressió de TTK69 (i que precisament és l'origen del nom de la proteïna), és la formació de 14 bandes a l'ectoderm i mesoderm de la banda germinal en extensió i la posterior fusió d'aquestes bandes formant un patró enreixat o de "tramtrack" al voltant de la banda germinal. Entre les 18-24 hores els nivells de les proteïnes TTK decauen considerablement, essent pràcticament inapreciable a l'estadi de larva. Posteriorment, a pupa i adults, es tornen a detectar quantitats considerables de les dues isoformes.

S'ha suggerit que el patró d'expressió de TTK69 al llarg del desenvolupament és determinant per a les funcions associades a aquesta proteïna. Per una banda, l'aport matern de TTK contribuiria a determinar el moment de l'expressió dels gens de segmentació, prevenint-ne l'activació prematura. I per altra banda, la funció de TTK en el desenvolupament neuronal tindria lloc al final de l'embriogènesi, quan la majoria de tipus cel.lulars s'han especificat i el destí triat s'ha d'estabilitzar, coincidint amb els elevats nivells d'expressió d'aquesta proteïna.

Estudis sobre la funció de TTK al sistema nerviós han evidenciat que tant TTK69 com TTK88 poden ser ubiquitinitzats en un mecanisme que promou la ràpida degradació d'ambdues proteïnes a les cèl.lules neuronals (Li *et al*, 1997b; Tang *et al*, 1997). D'altra banda, estudis recents amb cèl.lules SL2 indiquen que TTK69 és substrat per la conjugació amb dSmt3, l'homòleg de SUMO-1 de mamífers (una proteïna relacionada amb l'Ubiquitina) (Lehembre *et al*, 2000). Aquesta observació suggereix la sumoilització com un mecanisme de regulació dels nivells de TTK al llarg del cicle cel.lular.

També s'ha proposat que TTK podria ser fosforilat, tot i que encara es desconeix si aquesta modificació té lloc *in vivo* i quina repercussió té en l'activitat de la proteïna (Lehembre *et al*, 2000).

2.3.2. Dominis de TTK

TTK només té dos dominis estructuralment ben definits: un domini POZ/BTB a N-terminal de la proteïna, comú per a les dues isoformes, i un domini d'unió a DNA situat a la regió C-terminal, diferent per a TTK69 i TTK88 (veure figura **I.11**).

A part d'aquests dominis, s'han identificat alguns motius conservats a la seqüència aminoacídica de TTK69: trams d'aminoàcids similars a les **seqüències PEST**, típiques de proteïnes amb vides mitges curtes i ràpid *turnover* entre els residus 280-317; tres putatives senyals de localització nuclear (**NLS**), distribuïdes entre els dominis POZ i d'unió a DNA; una regió de 100 aminoàcids, just a N-terminal del primer dit de zinc, d'unió a **dMi-2**; una seqüència consens **P-DLS** d'unió a dCtBP entre els aminoàcids 591-595; i una **regió rica en serines i alanines** a C-terminal de la proteïna, present també en altres repressors transcripcionals com Hunchback o Inveced.

2.3.2.1. El domini POZ/BTB de TTK

El domini POZ de TTK inclou els primers 114 residus de la proteïna. Diverses evidències experimentals apunten a que de forma similar a GAGA o altres proteïnes amb dominis POZ, TTK podria formar homooligòmers a través d'aquest domini. Concretament, a partir d'experiments de co-traducció *in vitro* i immunoprecipitació s'ha observat que TTK pot interaccionar amb si mateix a través dels primers 153 residus de la proteïna (Bardwell i Treisman, 1994). A més a més, estudis molt recents han pogut demostrar, emprant microscopia electrònica, que el domini POZ de TTK oligomeritza en forma de tetràmer (Badenhorst *et al*, 2002).

D'altra banda, també s'ha suggerit que el POZ de TTK pot mediar la formació d'heterooligòmers amb altres proteïnes que tenen domini POZ, concretament GAGA (Bardwell i Treisman, 1994), i Bric à Brac (Pointud *et al*, 2001).



Figura I.11. Dominis de Tramtrack69 (A) i seqüència aminoacídica (B) amb els motius més representatius assenyalats.

2.3.2.2. El domini d'unió a DNA de TTK

Les dues isoformes de TTK tenen dos dits de Zn de tipus Cys₂-His₂, situats entre els residus 508-559 a TTK69 i 610-667 a TTK88. El primer dit és substancialment diferent per a les dues proteïnes, mentre el segon mostra més d'un 50% d'identitat, però tot i això TTK69 i TTK88 tenen especificitats d'unió a DNA força diferents.

El domini d'unió a DNA de TTK69 ha estat àmpliament estudiat, essent el domini més ben caracteritzat de la proteïna. Així, s'ha determinat la regió mínima de reconeixement a DNA que inclou, a més dels dos dits de Zn, una petita seqüència de 7 aminoàcids a N-terminal del primer dit que l'hi confereixen afinitat i especificitat d'unió (els dos dits són insuficients per unir-se al DNA específicament) (Fairall *et al*, 1992).

La cristal·lització del DBD de TTK69 en presència de l'oligonucleòtid de 18 pb CTAATAAGGATAACGTCCG (un dels llocs d'unió de TTK69 al promotor de *ftz*) ha revelat que els dos dits de Zn formen mòduls d'unió a DNA totalment independents: el segon dit té una estructura convencional, amb dos làmines β i una hèlix- α que es pleguen al voltant de l'ió Zn i un *core* hidrofòbic; en canvi, al primer dit els residus situats a N-terminal formen una tercera làmina β que és essencial per a la unió a DNA, tot i que no intervé directament en la unió sinó que dóna estabilitat estructural al dit de zinc (Fairall *et al*, 1993). No obstant, estudis recents de *crosslinking* proteïna-DNA en solució indicarien que aquests 7 residus a N-terminal del primer dit de zinc sí que estan involucrats en la interacció directa amb el DNA, tant per a la unió específica com inespecífica (Kamashev *et al*, 2000).

La base de l'especificitat de seqüència de TTK69 és un dels aspectes que encara no s'ha pogut resoldre, havent-se proposat en diverses ocasions seqüències consens que no acaben mai de coincidir. Així, els primers estudis en què intentaven buscar els llocs d'unió de TTK per assajos de *footprinting* a partir de diferents regions de l'element zebra del promotor *ftz*, proposaren com a seqüència consens **TTATCCG** (Harrison i Travers, 1990) o **TnnnGGACnT** (Brown *et al*, 1991). Posteriorment, realitzant immunoprecipitacions amb fragments de diferents plàsmids s'arribà a una seqüència de reconeixement per TTK69 diferent de les anteriors, **GGTCCTGC** (Read i Manley, 1992). Finalment, una recopilació de totes les seqüències on s'havia pogut veure unió específica de TTK dugué a la conclusió que aquesta proteïna es podia unir a seqüències relacionades però diferents, tot i que és habitual la presència dels nucleòtids **TCCT** (Fairall *et al*, 1993).

Estudis sobre l'especificitat d'unió de TTK88 han demostrat que aquesta isoforma no s'uneix als mateixos elements que TTK69 a les regions promotores d'*even-skipped* i *fushi tarazu*. En canvi, sí han trobat que té com a seqüència consens AGGG(C/T)GG, un element present al promotor d'*engrailed* (Read i Manley, 1992). Això estaria d'acord amb la recent observació que suggereix TTK88 participaria en l'establiment de la repressió d'*engrailed* (Wheeler *et al*, 2002).

2.3.3. Funcions de TTK

2.3.3.1. TTK69 i els gens "pair-rule"

Des de la identificació inicial de TTK per la seva activitat d'unió a diferents elements de la regió promotora de *fushi tarazu* (Harrison i Travers, 1990), han anat sorgint una sèrie d'evidències que suggereixen que TTK69 actua com a repressor d'alguns gens "pair-rule" en els primers estadis de l'embriogènesi, i que la seva acció és essencial per al control temporal de l'expressió d'aquests gens:

1. L'expressió de *ttk* és complementària a la de *fushi tarazu* durant l'embriogènesi

L'observació de que les expressions de *ttk* i *fushi tarazu* (*ftz*) eren complementàries tant en l'espai com en el temps fou el primer indicatiu que dugué a proposar TTK com un repressor

de *ftz*. Concretament, durant les dues primeres hores de l'embriogènesi, els mRNAs de *ttk* es troben distribuïts de forma generalitzada per l'embrió, mentre encara no s'ha iniciat l'expressió zigòtica de *fushi tarazu*. De blastoderm a gàstrula, que és quan *ftz* s'expressa en el patró típic de 7 bandes, coincideix amb el període en què es deixa de detectar senyal de *ttk*. A l'estadi de 7 cèl.lules, quan tot just s'inicia l'expressió zigòtica de *ttk*, encara són presents mRNAs de *ftz* a la banda germinal de l'embrió, però aquests desapareixen a l'estadi 9, que és la fase de màxima expressió de *ttk*. Posteriorment, a l'estadi 11, mentre *ttk* es distribueix formant l'enreixat o "tramtrack", *fushi tarazu* s'expressa de forma complementària a aquest, localitzant-se tan sols a les zones on no es detecten transcrits de *ttk* que correspon a les regions on es formen les cèl.lules mare ganglionars (Harrison i Travers, 1990).

D'altra banda, l'anàlisi de l'expressió d'*even-skipped* (*eve*) evidencia també una complementaritat amb l'expressió de *ttk*: de manera similar a *ftz*, *eve* es comença a expressar a partir de les 2 hores de l'embriogènesi, assolint els màxims nivells cap a les 4 hores, que és quan s'observa el patró de 7-14 bandes. A partir de les 8 hores l'expressió d'*eve* comença a decaure, i a estadis tardans de l'embriogènesi tan sols es detecta en cèl.lules progenitores del sistema nerviós (MacDonald *et al*, 1986).

2. TTK69 s'uneix a diferents elements reguladors dels promotors d'*even-skipped* i *fushi tarazu*

El gen de *fushi tarazu* consta de tres elements reguladors en *cis* (Han *et al*, 1993): l'element zebra, l'element neurogènic i l'*upstream* element, el qual a la vegada està dividit en dues subregions, l'*enhancer* proximal i l'*enhancer* distal. TTK69 té tres llocs d'unió ben definits a l'element zebra (Harrison i Travers, 1990), i almenys cinc a l'*enhancer* proximal (Han *et al*, 1998). L'observació que mutacions en els llocs d'unió de TTK de l'element zebra resultaven en una activació prematura de *ftz* dugué a suggerir que TTK era realment un repressor de *ftz* (Brown *et al*, 1991); no obstant, més tard s'ha vist que mutacions als llocs TTK de l'element proximal donen lloc a una disminució de l'expressió de *ftz*, degut a que els llocs d'unió de TTK solapen amb els d'altres activadors. I, de fet, semblaria que la majoria de llocs TTK solapen amb els d'altres proteïnes reguladores, amb la qual cosa esdevé difícil saber si les primeres observacions sobre l'element zebra són conseqüència directa d'una regulació negativa de *ftz* per TTK (Han *et al*, 1998).

Pel què fa a *even-skipped*, s'han identificat putatius llocs d'unió de TTK69 al llarg de tot el promotor (veure apartat 2.1 de Resultats i discussió), tot i que els únics caracteritzats com a tals són quatre a la regió -400/+1 pb (Read *et al*, 1990) i un a la regió autoreguladora -5.4/-5.2 kpb (Jiang *et al*, 1991). L'anàlisi de l'activitat d'unió de TTK als elements situats entre -400/+1 s'ha observat que varia al llarg de l'embriogènesi, essent l'activitat màxima entre les 5 i 15 hores, i quasi no observant-se en estadis anteriors o posteriors (Read *et al*, 1990). D'altra banda, el lloc d'unió de TTK69 a l'element autoregulador, pel qual TTK69 mostra més afinitat (Read i Manley, 1992), semblaria ser imprescindible per la funcionalitat d'aquest element, ja que quan es destrueix perd la capacitat d'autoregular-se. Això ha dut a suggerir un paper positiu de TTK sobre *eve* a través d'aquest element (Jiang *et al*, 1991).

3. Efectes de l'expressió ectòpica de TTK69

L'expressió ectòpica de TTK69 a l'estadi de blastoderm (però no la de TTK88) aboleix pràcticament els patrons de bandes d'expressió d'*even-skipped* i *fushi tarazu* en embrions transgènics. Encara que totes les bandes es veuen afectades, algunes són més resistents, observant-se certa expressió residual per a les bandes 2 i 7 de *ftz*, o 1, 2 i 7 d'*eve* (Read *et al*, 1992; Brown i Wu, 1993). A més a més, en aquests embrions també s'observa una repressió significativa de l'expressió d'altres gens "pair rule" com *odd-skipped*, *runt* o *hairy* (Brown i Wu, 1993).

Aquests efectes observats en sobreexpressar TTK, juntament amb el fet que en embrions de 0-2 hores es detecti mRNA de *ttk*, dona suport a la idea que la proteïna TTK69 aportada per la mare serveix per prevenir l'activació prematura dels gens "pair rule" i controlar-ne el moment de l'expressió. De fet, s'ha pogut demostrar que un increment de la dosi materna de *ttk* comporta un retard de l'expressió de *ftz*, mentre que una disminució d'aquesta (en mutants nuls *ttk^{le11}*) dona lloc a un augment de la transcripció de *ftz* en un període on normalment no s'expressa (Pritchard i Schubiger, 1996). Aquests resultats suggeririen que TTK és un repressor depenent de dosi.

D'altra banda, la sobreexpressió de TTK69 també resulta en defectes cuticulars larvals, suggerint que també estaria involucrat en la regulació d'altres gens que funcionen en diferents processos de l'embriogènesi (Brown i Wu, 1993).

Totes aquestes observacions suggereixen fortament un paper repressor de TTK69 en la regulació de l'expressió dels gens que controlen la segmentació abdominal, els gens "pair rule". No obstant, existeixen altres evidències, com el requeriment del lloc d'unió de TTK en l'element autoregulator d'*eve*, o la recent descoberta que TTK pot actuar com a activador en llevats (Yu *et al*, 1999), que duen a pensar en una possible funció dual de TTK69, actuant com a repressor en els primers estadis de desenvolupament i com a activador en estadis posteriors, essent aquesta activitat modulada per la presència d'altres factors co-activadors o co-repressors.

2.3.3.2. TTK en la regulació del destí neuronal

Així com només TTK69 sembla estar relacionat amb la repressió dels "pair rule", en les funcions associades amb el desenvolupament neuronal hi estan implicats tant TTK69 com TTK88. En aquest context, les proteïnes TTK actuen reprimint el potencial neuronal i establint els destins de les cèl.lules no-neuronals.

Als òrgans sensitius externs del **sistema nerviós perifèric** (SNP), una sola cèl.lula precursora d'òrgans sensorials (SOP) es divideix en dues progènies, una de les quals (Iib) donarà lloc a una neurona i una cèl.lula glial, mentre l'altra (IIa) produeix dues cèl.lules de suport no neuronals. Aquesta primera divisió asimètrica de SOP en precursors neuronals (Iib) i no neuronals (IIa) està regulada per la via de senyalització de Notch, l'activació de la qual resulta en l'aparició de la proteïna TTK69 al precursor IIa, però no al Iib. A les cèl.lules

Iia, TTK és el responsable de reprimir el destí neuronal de les cèl.lules suport, i la seva presència és necessària i suficient per a l'especificació d'aquest linatge Iia no neuronal (Okabe *et al*, 2001).

Estudis recents indiquen que la presència de TTK69 també és essencial en la diferenciació de la glia al **sistema nerviós central**, controlant-ne tant la proliferació com el desenvolupament. Aquesta funció la realitza a dos nivells: per una banda, reprimeix els gens neuronals específics de les cèl.lules mare, prevenint el reprogramament de la glia en neurones; i per l'altra banda, TTK69 inhibeix la proliferació inapropiada de la glia, aturant el cicle cel.lular (Badenhorst, 2001).

No obstant, el paper que desenvolupen TTK69 i TTK88 en el desenvolupament dels **fotoreceptors** de l'ull compost de *Drosophila* ha estat el més estudiat. Durant l'estadi de larva les proteïnes TTK no són presents als fotoreceptors però sí a les cèl.lules conus, on actuen bloquejant la possible diferenciació d'aquestes cèl.lules en fotoreceptors (Xiong i Montell, 1993; Lai *et al*, 1997). A més a més, l'observació de que la sobreexpressió de TTK69 pot transformar neurones fotoreceptores en cèl.lules conus no neuronals suggereix que TTK també és necessari per al correcte desenvolupament d'aquestes cèl.lules conus (Wen *et al*, 2000). D'altra banda, recentment se li ha pogut associar a TTK69 un paper positiu i autònom en promoure o mantenir la diferenciació de les neurones fotoreceptores en estadis tardans del desenvolupament de l'ull. Consistent amb això, TTK69 (i no TTK88) s'expressa a totes les cèl.lules fotoreceptores a l'estadi de pupa (Lai i Li, 1999).

Així doncs, i de forma similar al què s'havia comentat pels gens "pair rule", TTK69 sembla tenir una funció dual, tenint papers positius i negatius en diferents estadis del desenvolupament dels fotoreceptors.

2.3.3.3. Possibles mecanismes d'actuació de TTK

Tots aquests estudis sobre la funció de TTK en relació als gens "pair-rule" o a la regulació del destí neuronal s'han realitzat bàsicament a nivell genètic, però no s'ha arribat a analitzar per quin mecanisme actua TTK a nivell molecular. Recentment, però, han sorgit dos treballs que aporten noves dades sobre possibles mecanismes d'acció de TTK.

Wen *et al*, 2000, en estudis de sobreexpressió de TTK69 a l'ull de *Drosophila* observen un doble efecte d'aquesta proteïna, bloquejant la diferenciació neuronal dels fotoreceptors i promovent l'especificació no neuronal de les cèl.lules conus. Aquesta funció de TTK és depenent del seu domini POZ, ja que la deleció dels 153 primers residus aboleix la funció d'aquesta proteïna. A més a més, mutacions puntuals en el domini POZ que correspondrien al putatiu *core* del monòmer o bé al lloc d'unió del lligand també resulten en una pèrdua d'activitat de la proteïna, amb el què s'ha suggerit que la funció de TTK requeriria d'un plegament correcte del domini POZ així com de la presència de determinats residus al solc

carregat. No obstant, reduccions de Sin3A o Rpd3 no modulen els fenotips mutants de TTK, i per tant el requeriment del domini POZ en principi no semblaria que és per un reclutament de complexos desacetilases.

D'altra banda, la deleció de la regió C-terminal (residus 568-641) també comporta una pèrdua d'activitat de TTK, i mutacions a la seqüència consens P-DLS donen lloc a una proteïna TTK69 menys efectiva en la seva funció, una dada que podria ser indicativa d'una possible acció conjunta entre TTK i **dCtBP**. Donant suport a aquesta hipòtesi, observen una interacció genètica entre dCtBP i TTK69, en què el fenotip mutant de TTK és intensificat per mutacions de pèrdua de funció de dCtBP. No obstant, en assajos d'interacció *in vitro* observen que la deleció de la regió C-terminal de TTK no afecta la interacció entre dCtBP i TTK69, mentre que la deleció del domini POZ l'aboleix per complet. Això indica que la seqüència P-DLS no és essencial per a la interacció de TTK amb dCtBP, i suggereixen que aquesta estaria mediada per interaccions multivalents mediades entre el domini POZ i P-DLS (Wen *et al*, 2000).

Murawsky *et al*, 2001, mitjançant un crivellatge de dos híbrids identifiquen una interacció positiva entre TTK69 i la subunitat ATPasa **dMi-2** del complex NuRD. Aquesta interacció té lloc a través d'una regió de 100 aminoàcids a N-terminal del primer dit de Zn de TTK69 i del domini C-terminal de dMi-2 (domini pel qual també interacciona amb altres repressors com Hunchback). Consistent amb la hipòtesi que TTK69 i dMi-2 poden formar un complex *in vivo*, observen que ambdues proteïnes co-localitzen en algunes regions a cromosomes politènics, i que TTK69 co-purifica amb el complex NuRD en extractes embrionaris de *Drosophila*. La repercussió funcional d'aquesta interacció s'evalua analitzant els fenotips mutants neuronals de TTK69 al SNP, els quals poden ser augmentats per una pèrdua de dMi-2, indicant que dMi-2 participa en el bloqueig de la diferenciació neuronal mediat per TTK (Murawsky *et al*, 2001).

Aquests resultats apuntarien a mecanismes de repressió de TTK69 via un reclutament del co-repressor dCtBP i/o un reclutament de l'activitat desacetilasa i remodeladora de la cromatina del complex NuRD, tot i que serien necessaris estudis més exhaustius per poder determinar si TTK també pot reprimir a través d'altres mecanismes i quin és el seu mode d'acció en cada context. D'altra banda, estudis molt recents suggereixen que TTK69 reprimiria la transcripció per varis mecanismes independents i parcialment redundants (Badenhorst *et al*, 2002). I, de fet, el mateix treball descriu que el domini POZ de TTK pot interaccionar amb dTAF_{II}155 (una interacció que ja s'havia descrit pel factor Bric à brac), suggerint-se aquest com un mecanisme pel qual TTK podria disrompre l'ensamblatge de la maquinària basal.

III.-OBJECTIUS

L'objectiu fonamental d'aquest treball ha estat analitzar la interacció entre les proteïnes GAGA i TTK i estudiar les possibles conseqüències que pot tenir aquesta interacció en la seva funció com a factors reguladors de la transcripció. Concretament, el què ens proposàvem era:

–Determinar si GAGA i TTK poden interaccionar tant *in vivo* com *in vitro* i analitzar les regions d'ambdues proteïnes responsables de la possible interacció.

–Utilitzant un sistema de transfecció transitòria a cèl.lules SL2, evaluar la contribució de la possible interacció GAGA-TTK en la regulació del promotor *eve stripe 2*, que conté llocs d'unió per a GAGA i TTK.

–Determinar el mecanisme d'actuació de GAGA i TTK en la seva potencial funció reguladora del promotor *eve stripe 2*, analitzant:

(a) quins són els dominis de GAGA i TTK necessaris per dur a terme les seves respectives activitats transcripcionals.

(b) quines són les regions del promotor *eve stripe 2* requerides per la funció de GAGA i TTK sobre aquest promotor.

(c) com afecta la possible interacció GAGA-TTK a la seva unió al DNA.

V.-RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE LES PROTEÏNES GAGA i TTK

Una característica comuna entre els factors de transcripció de *Drosophila* GAGA i TTK és la presència d'un domini POZ d'interacció proteïna-proteïna que en ambdós casos es troba situat en posició N-terminal.

Com ja s'ha comentat a la Introducció, els dominis POZ són motius conservats evolutivament, sobretot en els residus que configuren el *core* del monòmer o que estan implicats en la interfase del dímer POZ-POZ. Aquesta conservació suggereix que tots els dominis POZ adopten una estructura similar a la descrita pel PLZF, i que els residus diferencials són els que determinen les diferències d'especificitats i afinitats en les interaccions amb altres proteïnes.

En el cas dels dominis POZ de GAGA i TTK, el grau de conservació és especialment elevat, com es pot apreciar en un alineament de seqüència on es comparen els POZes de GAGA, TTK i PLZF (figura R.1). Concretament, la regió d'homologia entre els dominis POZ de GAGA i TTK correspon als primers 117 residus de la seqüència de GAGA (114 de la seqüència de TTK) i mostra una identitat total del 40%.

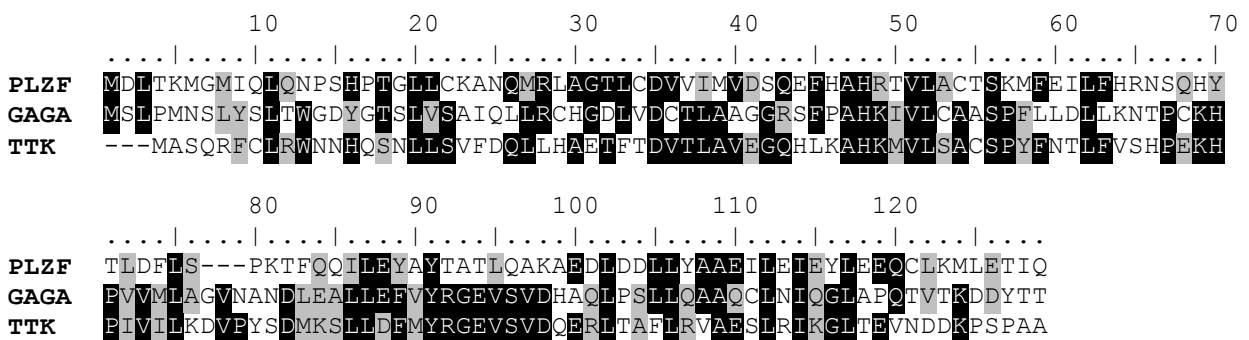


Figura R.1. Alineament de seqüència dels dominis POZ de GAGA, TTK i PLZF. S'indiquen amb negreta els residus idèntics, i amb gris els que són similars. La matriu de similitud emprada és la Blossum 62.

El fet que la capacitat de formar homooligòmers sigui tan extesa entre les proteïnes amb domini POZ és força indicatiu de que entre dominis idèntics existeix una elevada afinitat d'interacció. Això suggereix que com més s'assemblin dos dominis POZ, més probabilitats hi haurà de que puguin interaccionar entre ells. Donada l'elevada conservació entre els dominis POZ de GAGA i TTK, sembla doncs bastant factible pensar en una interacció GAGA-TTK mediada pels respectius dominis POZ.

La possibilitat d'una interacció heteromèrica entre GAGA i TTK s'ha suggerit en nombroses ocasions, i fins i tot en alguns casos s'ha donat per demostrada, però en realitat no ha arribat a ser analitzada amb detall. De fet, només els estudis de Bardwell i Treisman, 1994, aporten els primers indicis que suggereixen que GAGA i TTK poden formar heterooligòmers a través dels respectius dominis POZ. Concretament, a partir d'experiments de co-traducció *in vitro* i immunoprecipitació, es va observar que una forma truncada de GAGA contenint els primers 245 residus de la proteïna (GAGA₂₄₅) era capaç d'interaccionar amb una forma truncada de TTK formada pels primers 153 residus d'aquest (TTK₁₅₃), tot i que aquesta interacció tan sols es detectava quan ambdues proteïnes eren co-expressades alhora, i no si es mesclaven després d'expressar-les. A més a més, les proteïnes truncades utilitzades en aquests experiments contenien, a més del domini POZ, regions de longitud significativa (127 residus per GAGA i 38 residus per TTK) que també podrien contribuir en la interacció (Bardwell i Treisman, 1994).

Amb l'objectiu de confirmar les evidències esmentades que suggereixen una interacció entre les proteïnes GAGA i TTK, en aquesta primera part del treball es va realitzar un estudi exhaustiu de la capacitat d'aquestes dues proteïnes de formar heterooligòmers tant *in vivo* com *in vitro*, i es van analitzar amb detall les regions implicades en la interacció.

1.1. Experiments de co-immunoprecipitació en extractes cel·lulars de SL2

Per tal de determinar si GAGA i TTK poden interaccionar *in vivo* es varen realitzar experiments de co-immunoprecipitació a partir d'extractes totals de cèl·lules SL2 transfectades amb plàsmids d'expressió de les proteïnes GAGA-519 i TTK69.

Seguint el protocol detallat a l'apartat 2.5 de Materials i Mètodes, es van co-transfectar cèl·lules SL2 amb 15 µg de vector de sobreexpressió de GAGA (pActPPA-GAGA) i 15 µg de vector de sobreexpressió de TTK (pActPPA-TTK). Els extractes cel·lulars corresponents, obtinguts al cap 48 hores, van ser immunoprecipitats amb els anticossos α-GAGA, α-TTK i fracció IgG de sèrum preimmune, i posteriorment incubats amb Proteïna A Sepharosa. Les proteïnes presents en els extractes immunoprecipitats es varen analitzar per *Western blot* (figura R.2).

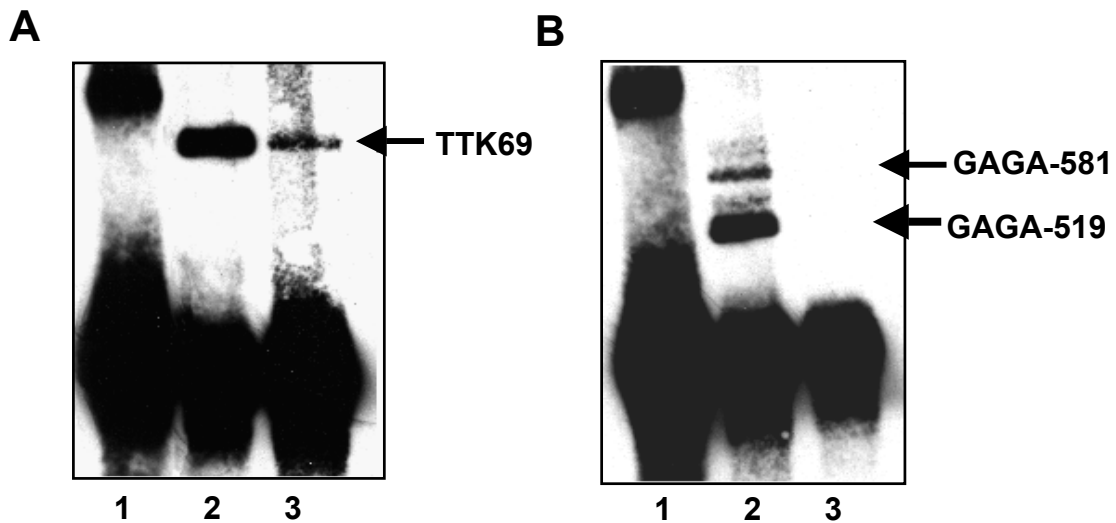


Figura R.2. Co-immunoprecipitació de GAGA i TTK a SL2. **A.** Immunoprecipitacions dels extractes de cèl.lules SL2 sobreexpressant GAGA-519 i TTK69 amb fracció IgG de sèrum preimmune (carril 1), α -TTK purificat per afinitat (carril 2) i α -GAGA purificat per afinitat (carril 3) analitzades amb sèrum α -TTK fraccionat. **B.** Immunoprecipitacions dels mateixos extractes amb fracció IgG de sèrum preimmune (carril 1), α -GAGA purificat per afinitat (carril 2) i α -TTK purificat per afinitat (carril 3) analitzades amb sèrum α -GAGA fraccionat. Les fletxes assenyalen les posicions de TTK69, GAGA-519 i GAGA-581.

La immunoprecipitació amb anticossos α -GAGA dóna lloc a una precipitació de quantitats significatives de proteïna TTK (figura R.2A, carril 3) indicant que, efectivament, GAGA i TTK poden formar complexos *in vivo*, a cèl.lules de *Drosophila* SL2. En aquestes condicions, les formes de GAGA són eficientment immunoprecipitades (figura R.2B, carril 2): concretament, i d'acord amb el que ja està descrit (Benyajati *et al*, 1997), GAGA apareix en forma de dos dobles, dels quals, el de menor migració electroforètica correspon a la forma endògena de GAGA-581, mentre les espècies de mobilitat més ràpida corresponen a la forma de GAGA-519 sobreexpressada de forma selectiva en aquests experiments. La no detecció de proteïna TTK quan la immunoprecipitació es dué a terme en presència d'un excés de la fracció IgG de sèrum preimmune (figura R.2A, carril 1) confirma l'especificitat de la co-immunoprecipitació de TTK en presència d' α -GAGA.

En l'experiment recíproc, els anticossos α -TTK no semblen capaços d'immunoprecipitar GAGA (figura R.2B, carril 3), tot i que en aquestes condicions TTK immunoprecipita de forma abundant (figura R.2A, carril 2). La no detecció de co-immunoprecipitació amb els anticossos α -TTK pot ser una conseqüència bé de la incapacitat d'aquests anticossos de detectar els complexos GAGA-TTK, bé de que pels epítops que reconegui de la proteïna TTK, la seva presència distorsioni o fins i tot arribi a trencar aquests complexos.

1.2. Anàlisi de la interacció GAGA-TTK *in vitro*: GST-pulldowns

Per tal de confirmar la interacció GAGA-TTK observada i analitzar la contribució dels respectius dominis POZ en aquesta, es varen realitzar assajos d'interacció proteïna-proteïna *in vitro* per GST-pulldowns amb formes truncades de les proteïnes GAGA i TTK. Les construccions utilitzades vénen esquematitzades a la figura **R.3A**. És destacable el fet que, mentre a les formes Δ POZ tant de GAGA com de TTK se'ls ha deletat el que correspondria al domini POZ estricte (122 i 115 residus respectivament), la proteïna POZ_{GAGA} correspon a una forma una mica més llarga del que seria el POZ estricte, ja que està formada pels primers 245 residus de la proteïna. Això és degut a que la proteïna recombinant POZ₁₂₂ de GAGA no s'expressa soluble en *E. coli* (Dra. M.L. Espinás, comunicació personal).

Les proteïnes TTK o Δ POZ_{TTK} marcades amb ³⁵S-Met es van obtenir a partir d'un sistema de transcripció-traducció *in vitro* en lisat de reticulòcits a partir dels plàsmids d'expressió corresponents (apartat 2.6.1 de Materials i mètodes). L'anàlisi de l'eficiència d'aquestes reaccions es va fer per mètodes autoradiogràfics i serví per donar-nos una idea de les quantitats relatives d'ambdues proteïnes (figura **R.3B**). Per la seva banda, les diferents versions de GAGA fusionades al pèptid GST, així com el pèptid GST sol, van ser expressades a *E. coli* i purificades segons el protocol descrit a l'apartat 2.3.2 de Materials i mètodes. A continuació es van immobilitzar a reïna de Glutatió Sepharosa (apartat 2.6.2 de Materials i mètodes) i es varen analitzar les quantitats relatives en un gel SDS-PAGE (figura **R.3C**).

Per realitzar l'assaig de *pulldown*, les reïnes de Glutatió Sepharosa amb les proteïnes GST unides van ser incubades amb les proteïnes TTK marcades amb ³⁵S-Met. Es van fer els rentats pertinents, i s'analitzà la quantitat de proteïna marcada que havia quedat retinuda a la columna per autoradiografia (figura **R.4**). És important destacar l'absència de senyal obtinguda quan les proteïnes marcades s'havien incubat amb la proteïna GST, una clara indicació de la manca de soroll de fons i de l'especificitat de les interaccions positives observades (figures **R.4A i B**).

Els resultats obtinguts en els assajos realitzats amb la proteïna TTK sencera (figura **R.4A**) mostren l'existència d'una interacció de TTK amb les fusions GST-GAGA o GST-POZ_{GAGA}, però no amb la forma truncada de GAGA que ha perdut el domini POZ (GST- Δ POZ_{GAGA}). Això indica que el domini POZ de GAGA és necessari perquè GAGA i TTK puguin interaccionar.

De forma similar, el domini POZ de TTK també sembla important per la interacció, ja que si a TTK se li deleta el seu domini POZ (Δ POZ_{TTK}) esdevé incapaç d'unir-se eficientment a GST-GAGA (figura **R.4B**).

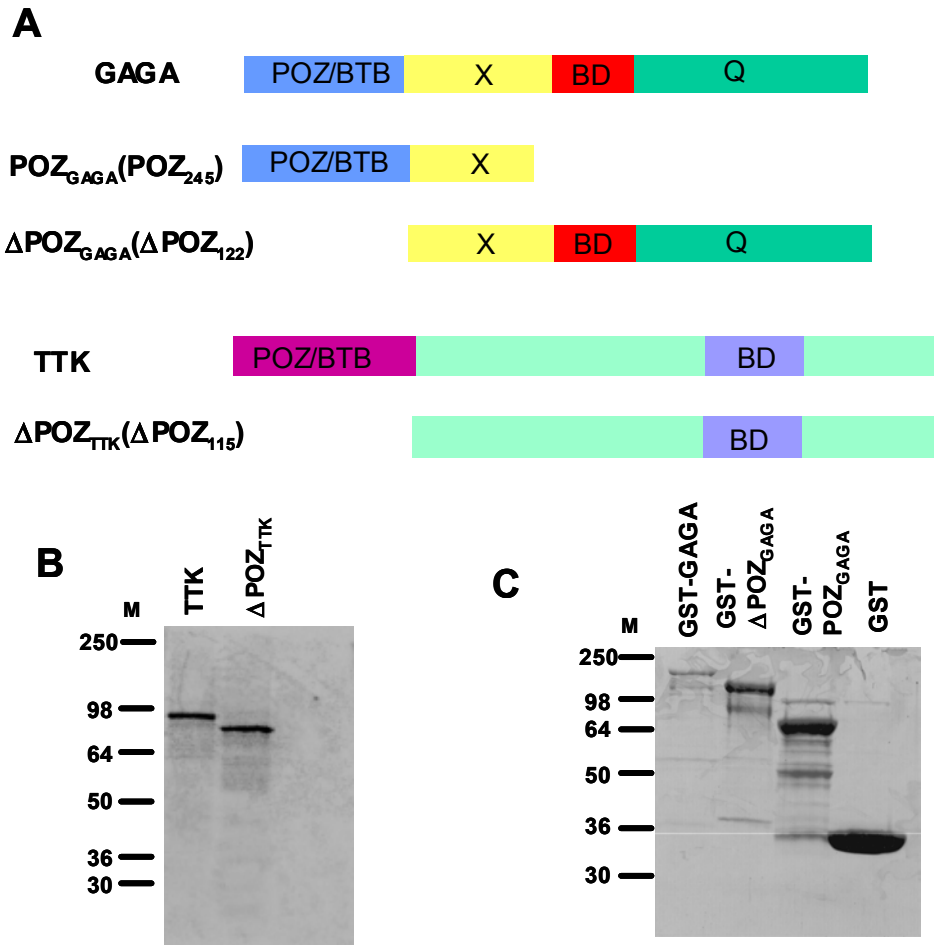


Figura R.3. Proteïnes utilitzades a l'assaig GST-pulldown. **A.** Representació esquemàtica de les construccions de GAGA i TTK emprades. Δ POZ_{GAGA} i Δ POZ_{TTK} corresponen als polipèptids sense els primers 122 i 115 residus respectivament, mentre POZ_{GAGA} correspon a la forma de GAGA que conté els primers 245 residus. **B.** Anàlisi de les reaccions d'*in vitro* transcripció-traducció de les proteïnes TTK i Δ POZ_{TTK} en un gel al 10% SDS-PAGE. El gel va ser transferit a una membrana de nitrocel·lulosa i exposat en un film d'autoradiografia per determinar l'eficiència de les reaccions. Cada carril correspon a 1 μ L de la reacció indicada. **C.** Anàlisi de les proteïnes GST expressades en *E. coli*, purificades i immobilitzades a reïna Glutatió Sepharosa, en un gel 12% SDS-PAGE. A cada carril van ser carregats 10 μ L de la reïna indicada en cada cas. Els carrils M corresponen als marcadors de pesos moleculars de proteïnes (en kDa).

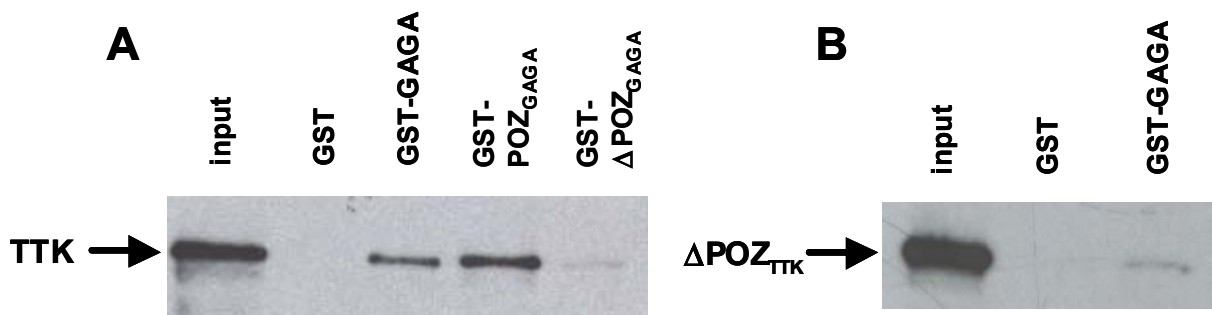


Figura R.4. Assajos GST-pulldown de la interacció de les proteïnes recombinants TTK (A) o Δ POZ_{TTK} (B) amb les proteïnes de fusió a GST indicades en cada cas. Les línies marcades com a input corresponen a un 20% de la proteïna total incubada en les reaccions. La detecció de les proteïnes marcades amb ³⁵S-Met es va fer per autoradiografia.

Així doncs, els assajos de GST-*pull-downs*, a més de corroborar la interacció entre GAGA i TTK descrita en els experiments de co-immunoprecipitació, demostren el requeriment de la presència dels dominis POZ tant de GAGA com de TTK perquè aquesta interacció pugui tenir lloc.

1.3. Determinació dels dominis responsables de la interacció: assaig de dos híbrids a *S. cerevisiae*

1.3.1. El sistema de dos híbrids

1.3.1.1. Descripció del sistema de dos híbrids

L'assaig de dos híbrids és una tècnica molt eficient per detectar l'existència d'interaccions proteïna-proteïna *in vivo* així com per analitzar l'afinitat d'aquestes interaccions.

Aquesta tècnica explota el fet que els activadors transcripcionals són de natura modular. Perquè tingui lloc la transcripció, són necessaris dos dominis física i funcionalment diferents: un domini d'unió a DNA (DBD) que s'uneix a la regió promotora, i un domini d'activació (AD) que, per interacció amb la maquinària basal (o altres mecanismes), estimula l'activació transcripcional. El sistema GAL4 de *S. cerevisiae*, l'emprat en aquest treball, es basa en el descobriment que els dominis d'unió a DNA i d'activació de la proteïna reguladora GAL4 poden actuar com a dominis independents, però quan són expressats separatament i posteriorment són portats l'un a l'altre són capaços de restituir l'activitat de GAL4 (Brent i Ptashne, 1985).

Així doncs, si els dominis d'unió a DNA i d'activació s'expressen de forma separada fusionats a proteïnes X i Y respectivament, tan sols quan aquestes dues proteïnes interaccionin eficientment el domini d'unió a DNA de GAL4 (GAL4BD) i el domini d'activació de GAL4 (GAL4AD) estaran suficientment propers com per activar la transcripció d'un gen marcador que contingui llocs d'unió per GAL4 (figura **R.5**). La tècnica de dos híbrids permet "quantificar" d'alguna manera l'afinitat de la interacció entre les proteïnes X i Y estudiades degut a que com més forta sigui aquesta interacció, més formes transcripcionalment competents es generaran, detectant-se en conseqüència una major activació del gen marcador.

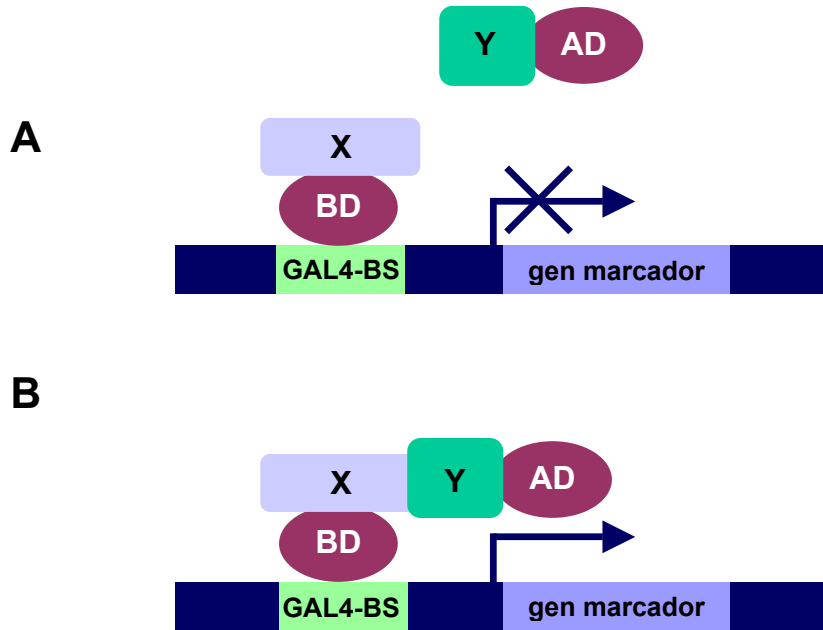


Figura R.5. Representació esquemàtica del sistema de dos híbrids. La proteïna X està fusionada al domini d'unió a DNA de GAL4, i la proteïna Y al domini d'activació de GAL4. Si X i Y no interaccionen entre elles (**A**), la fusió BDGAL4-X s'unirà als llocs d'unió per GAL4 (esquematzats com a GAL4-BS) però no podrà activar la transcripció del gen marcador perquè li mancarà el domini d'activació. En canvi, si X i Y interaccionen eficientment (**B**), els dominis d'unió a DNA i d'activació de GAL4 estaran suficientment propers i s'observarà una activació de la transcripció del gen marcador.

1.3.1.2. Components del sistema de dos híbrids

• La soca de llevat

La soca de *Saccharomyces cerevisiae* emprada per a la realització de l'assaig de dos híbrids va ser la HF7c (Clontech), que posseeix el següent genotip:

MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3,112, gal4-542, gal80-538, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3::GAL4_{17mers(3x)}}-CyC1_{TATA}-HIS3

El què és important ressaltar d'aquesta soca de cara a la realització de la tècnica de dos híbrids són les auxotrofies que presenta pels aminoàcids histidina, triptòfan i leucina. Això ens indica que la soca té els gens endògens *HIS3*, *TRP1* i *LEU2* mutats i, per tant, presenta deficiències metabòliques en les vies de síntesi d'aquests dos metabòlits.

Aquestes deficiències es poden rescatar transformant aquesta soca amb els al·lels salvatges d'aquests gens; així, els al·lels *TRP1* i *LEU2* seran aportats pels vectors d'expressió pGBT9 i pGAD424 respectivament, i utilitzats per a seleccionar els transformants per ambdós vectors.

D'altra banda, tot i que el gen endogen *HIS3* es troba disromput, la soca HF7c conté una integració d'aquest gen sota el control del promotor *GAL1 UAS* (element de resposta a

GAL4). D'aquesta manera, *HIS3* esdevé gen marcador de l'assaig, i l'activació d'aquest gen es podrà correlacionar amb el grau d'interacció entre les proteïnes analitzades evaluant el creixement en un medi deficient en histidina (–His).

• Els vectors d'expressió

Els vectors d'expressió utilitzats en aquest sistema foren pGAD424 i pGBT9 (Clontech). Els elements més interessants de pGAD424 són la presència del domini activador de GAL4 (aa 768-881) i del gen de selecció *LEU2*; per la seva banda, al pGBT9 destaquen la presència del domini d'unió a DNA de GAL4 (aa 1-147) i del gen de selecció *TRP1* (figura R.6).

Ambdós vectors tenen llocs d'inserció per poder clonar les proteïnes d'interès en fase amb els corresponents dominis de GAL4 i generar proteïnes de fusió de tipus GAL4BD-X o GAL4AD-Y respectivament. L'expressió d'aquestes proteïnes de fusió està sota el control del promotor truncat *ADH1*, que proporciona nivells baixos d'expressió (per tal que aquestes proteïnes no alterin excessivament el metabolisme del llevat) i del terminador del mateix gen *ADH1*.

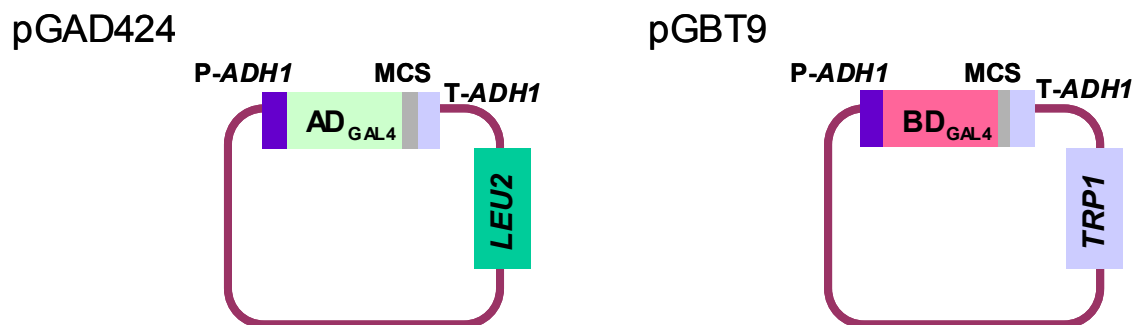


Figura R.6. Vectors d'expressió de proteïnes del sistema de dos híbrids. pGAD424 i pGBT9 tenen el domini d'activació (AD_{GAL4}) i d'unió a DNA (BD_{GAL4}) del factor de transcripció GAL4 sota el control del promotor truncat *ADH1* (P-*ADH1*) i del terminador *ADH1* (T-*ADH1*). Ambdós vectors tenen un lloc d'inserció de fragments de DNA (MCS) situat a 5' del terminador *ADH1* que permet clonar els cDNAs que codifiquen per les proteïnes d'interès en fase amb el domini d'activació o d'unió al DNA de GAL4. Els marcadors de selecció són *LEU2* per pGAD424 i *TRP1* per pGBT9.

1.3.2. Interacció GAGA-TTK

Per poder analitzar amb precisió els dominis de GAGA i TTK implicats en la interacció, diferents delecions d'ambdues proteïnes foren clonades als vectors pGAD424 i pGBT9. Concretament, i per no fer més complex l'anàlisi posterior, totes les versions de GAGA es varen clonar al pGBT9, i les versions de TTK al pGAD424.

A la figura **R.7A** vénen representades aquestes proteïnes truncades: en el cas de GAGA, a més de la proteïna sencera, es varen clonar les formes corresponents a $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ (sense els primers 122 residus) o POZ_{GAGA} (contenint els primers 122 residus); per TTK, i de manera anàloga, es varen clonar les regions corresponents a $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$ (corresponent a una deleció dels primers 115 aminoàcids) o POZ_{TTK} (amb els primers 114 residus).

Seguint el protocol detallat a l'apartat 2.7.2 de Materials i mètodes, es van transformar llevats de la soca HF7c amb els vectors de tipus pGBT9-GAGA i pGAD424-TTK i es van seleccionar els transformants per ambdós vectors en un medi SD/–Leu–Trp. Aquests transformants posteriorment varen ser crescuts en medi líquid i plaquejats en forma de dilucions seriadades en plaques SD/–Leu–Trp com a control positiu de creixement, i plaques SD/–Leu–Trp–His com a mesura de l'activació del gen marcador *HIS3* en funció de l'existència o no d'una interacció entre les proteïnes expressades.

La figura **R.7B** mostra els resultats de l'assaig de dos híbrids entre les proteïnes GAGA i TTK. Es pot observar un creixement significatiu en medi selectiu sense histidina quan els llevats van ser transformats amb les fusions GAL4BD-GAGA i GAL4AD-TTK, confirmant així la interacció GAGA-TTK a cèl.lules de *S. cerevisiae*. Aquesta interacció és estrictament dependent de la presència dels dominis POZ de GAGA i de TTK: la deleció del domini POZ de GAGA aboleix per complet la seva interacció amb TTK (figura **R.7B**, línia $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ -TTK) i, anàlogament, la deleció del POZ de TTK impedeix que pugui interaccionar amb GAGA (figura **R.7B**, línia GAGA- $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$).

A més de ser essencials per a mediar la interacció GAGA-TTK, els dominis POZ d'aquestes dues proteïnes semblen ser suficients perquè es pugui establir la interacció, ja que són capaços per ells mateixos d'interaccionar amb les proteïnes TTK i GAGA senceres (figura **R.7B**, línies POZ_{GAGA} -TTK i GAGA- POZ_{TTK}), i a més interaccionen entre ells molt fortament (figura **R.7B**, línia POZ_{GAGA} - POZ_{TTK}).

De manera similar als resultats obtinguts en els assajos *GST-pulldown*, les interaccions entre les proteïnes GAGA i TTK senceres mai arriben a ser tan fortes com quan tenen lloc només entre els dominis POZ (comparar creixement GAGA-TTK o POZ_{GAGA} - POZ_{TTK}). El fet de que s'hagi pogut observar aquesta propietat de la interacció GAGA-TTK en dues tècniques molt diferents dóna més suport a la idea de que els dominis POZ són suficients per mediar la interacció, mentre la resta de regions d'ambdues proteïnes no semblen contribuir a estabilitzar-la.

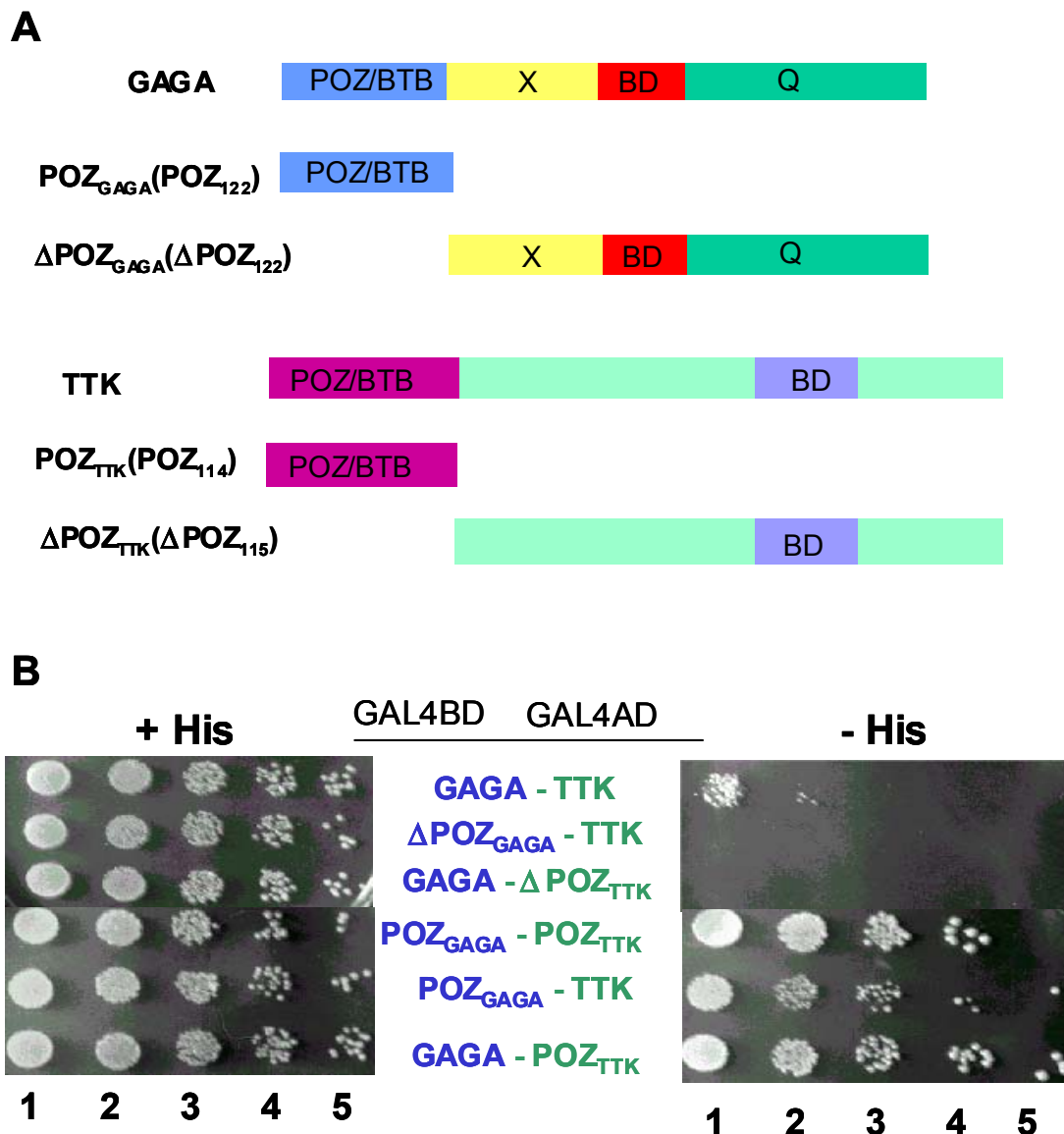


Figura R.7. Assaig de dos híbrids de la interacció GAGA-TTK. A. Representació de les construccions emprades a l'assaig de dos híbrids. POZ_{GAGA} i POZ_{TTK} corresponen als polipèptids que contenen els primers 122 i 114 residus de GAGA i TTK respectivament, mentre ΔPOZ_{GAGA} i ΔPOZ_{TTK} corresponen a les formes proteiques sense els primers 122 i 115 residus de GAGA i TTK. Les proteïnes GAGA van ser clonades al vector pGBT9, i les proteïnes TTK al pGAD424. **B.** Anàlisi de la interacció. 20 μL de cultius de llevat transformats amb les construccions indicades en cada cas van ser plaquejats en medi SD +His (esquerra) i -His (dreta) a una densitat de 2×10⁶ cèl.lules/mL (línies 1) i a dilucions seriades 1:10, 1:100, 1:1000 i 1:10000 (línies 2-5).

1.3.3. Interacció TTK-TTK

Estudis realitzats en el nostre grup (Espinás *et al*, 1999) o en d'altres (Katsani *et al*, 1999) demostren que els primers 122 residus de la proteïna GAGA, que corresponen al domini POZ, medien la formació d'homooligòmers de GAGA tant *in vivo* com *in vitro*, i que el tipus d'oligòmers formats són dímers, tetràmers i complexes d'elevat pes molecular. En canvi, pel què fa a TTK, tot i haver-se proposat en alguna ocasió que formaria

homooligòmers a través del POZ (Bardwell i Treisman, 1994), els requeriments de la interacció no han estat definits amb precisió.

Per tal d'analitzar aquesta interacció TTK-TTK pel sistema de dos híbrids, es varen clonar les formes truncades de TTK en vectors pGBT9, per així disposar de fusions de TTK tant amb GAL4AD com amb GAL4BD.

L'assaig es realitzà tal i com s'ha explicat per a l'anàlisi de la interacció GAGA-TTK, i es van obtenir els resultats que es mostren a la figura R.8. Anàlogament al què ja s'ha descrit per la proteïna GAGA, el creixement en medi selectiu detectat quan s'utilitzen les fusions GAL4BD-TTK i GAL4AD-TTK ens indica que TTK també pot formar homooligòmers (figura R.8, línia TTK-TTK). Aquesta interacció homomèrica TTK-TTK també sembla dependre exclusivament del domini POZ: per una banda, la deleció d'aquest domini aboleix per complet la capacitat de TTK d'interaccionar amb ell mateix (figura R.8, línia Δ POZ_{TTK}-TTK), i per tant apareix com la regió necessària perquè esdevingui la interacció; i, en segon lloc, el domini POZ de TTK sembla ser suficient per mediar l'homooligomerització, ja que pot interaccionar tant amb ell mateix com amb la proteïna TTK sencera (figura R.8, línies POZ_{TTK}-TTK i POZ_{TTK}-POZ_{TTK}).

TTK-TTK

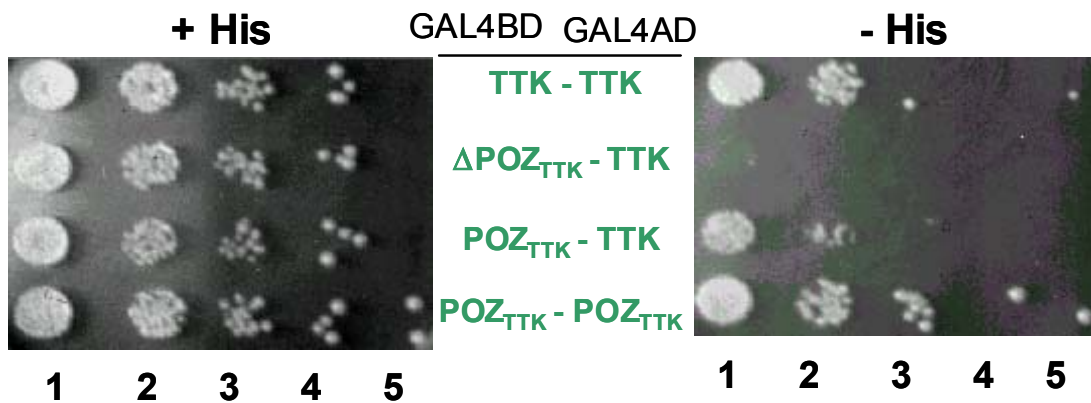


Figura R.8. Assaig de dos híbrids de la interacció TTK-TTK. 20 μ L de cultius de llevat transformats amb les construccions indicades en cada cas van ser plaquejats en medi SD +His (esquerra) i -His (dreta) a una densitat de 2×10^6 cèl.lules/mL (línies 1) i a dilucions seriades 1:10, 1:100, 1:1000 i 1:10000 (línies 2-5).

En resum, doncs, el conjunt d'aquests resultats indica que el domini POZ, que media la formació d'homooligòmers GAGA-GAGA i TTK-TTK, és també el responsable de la interacció GAGA-TTK, detectada tant *in vitro* (GST-pulldowns) com *in vivo* (co-immunoprecipitacions d'extractes de cèl.lules SL2 i assaig de dos híbrids a *S. cerevisiae*).

2. CONSEQÜÈNCIES FUNCIONALS DE LA INTERACCIÓ GAGA-TTK: ASSAJOS TRANSCRIPCIONALS A CÈL.LULES SL2

Com s'ha comentat a la Introducció, tant GAGA com TTK són dos factors de transcripció de *Drosophila* que contribueixen de manera essencial en la regulació de l'expressió gènica durant el desenvolupament embrionari, tot i que no es coneixen amb detall els mecanismes moleculars de la seva acció (veure apartats 2.2 i 2.3). El fet d'haver observat que aquestes dues proteïnes puguin interaccionar, suggereix que una associació GAGA-TTK en determinats estadis de l'embriogènesi podria tenir repercussions funcionals importants en el seu paper com a factors reguladors de la transcripció.

En aquesta segona part del treball es va analitzar la possible contribució de la interacció GAGA-TTK en la regulació transcripcional. El context escollit fou el promotor d'*even-skipped*, un gen "pair-rule" en la regulació del qual semblaria que GAGA i TTK hi podrien participar, GAGA positivament, i TTK negativament. Per tal de realitzar aquest estudi, es posà a punt un assaig transcripcional a cèl.lules SL2 en què es pogués determinar l'activitat promotora d'*eve* en resposta a la sobreexpressió de GAGA i/o TTK.

2.1. El promotor d'*even-skipped*

2.1.1. Regulació de l'expressió d'*even-skipped*

Even-skipped (*eve*) és un gen "pair-rule" primari que té un paper regulador clau en la segmentació de l'embrió durant els primers estadis del desenvolupament de *Drosophila*. *Eve* apareix a l'estadi 12 de l'embriogènesi (embrions de 2 hores) en forma d'una sola banda ampla que cobreix la major part de l'embrió, i no és fins a l'estadi 14 (blastoderm cel.lular) que s'expressa en el característic patró de 7 bandes o *stripes* transversals al llarg de l'eix antero-posterior de l'embrió. Durant la fase de gastrulació, cadascuna d'aquestes bandes es divideix en dos, resultant en un patró de 14 bandes que acaben desapareixent durant l'extensió de la banda germinal. A estadis més tardans de l'embriogènesi, *even-skipped*

s'expressa d'una forma més localitzada en cèl.lules precursoras neuronals (MacDonald *et al*, 1986; Frasch *et al*, 1987).

L'expressió d'*even-skipped* en els primers estadis de l'embriogènesi té dos programes diferents de regulació, primerenc i tardà, regulats per dues classes diferents d'elements reguladors al promotor d'*eve*. Els elements "primerencs" o *early* (E) són específics de banda i dirigeixen l'expressió inicial de cadascuna d'aquestes en el blastoderm cel.lular. En canvi, l'element "tardà" o *late* (L), responsable de l'expressió d'*eve* durant la gastrulació per tal d'aconseguir un refinament de les bandes, és un sol element "multistripte" que regula l'expressió de les 7 bandes. Els elements *early* responen als gens "gap" *hunchback*, *Krüppel*, *giant*, *tailless*, *knirps* i al morfogen *bcd*, mentre l'element *late* respon als gens "pair-rule" *hairy*, *runt*, *paired* i al mateix *even-skipped*, el qual exerceix un paper autoregulator positiu de la seva expressió en aquests estadis tardans (Goto *et al*, 1989).

A més a més, existeixen evidències que suggereixen que els factors de transcripció GAGA i TTK també participarien en el control de l'expressió d'*eve*: GAGA, pel fet d'haver-li identificat múltiples llocs d'unió a la regió situada immediatament a 5' del lloc d'inici de transcripció, s'ha proposat que podria tenir un paper positiu en la regulació de l'expressió d'*eve* (Read *et al*, 1990); en canvi, TTK ha estat descrit com un repressor d'*eve*, ja que a més de tenir varis llocs d'unió al llarg del promotor, aboleix el patró d'expressió de 7 bandes característic d'*eve* quan és sobreexpressat ectòpicament (Read *et al*, 1992, Brown i Wu, 1993).

Tot i que inicialment s'havia definit el promotor d'*even-skipped* com la regió d'unes 7 kpb situada *upstream* del lloc d'inici de transcripció, estudis recents han evidenciat que tots els elements reguladors de l'expressió d'*eve* estan localitzats en una regió de 15.6 kpb que s'extén entre -6.4 i +9.2 kpb respecte l'inici de transcripció (Sackerson *et al*, 1999).

Així, l'expressió de les bandes 1 i 5 està regulada per elements situats en una regió compresa entre +4.8 i +8.4 kpb, i l'expressió de les bandes 4 i 6 està dirigida per elements localitzats entre les posicions +4.8 i +6.6 kpb. A més a més, s'ha pogut observar que la regió 3'UTR d'*eve* controla els nivells d'aquesta proteïna en cèl.lules neuronals (Fujioka *et al*, 1999).

D'altra banda, els elements situats entre les posicions -6.4 kpb i +1 pb inclouen: la regió reguladora de la banda 2 (***eve stripe 2***) entre les posicions -1700 i +1 pb; l'element que dirigeix l'expressió de les bandes 3 i 7 entre les posicions -3.8 i -2.9 kpb; i l'element regulador *late* entre les posicions -5.9 i -5.2 kpb (figura **R.9**). Convé esmentar que en aquest darrer element s'hi ha definit una regió de 200 pb anomenada *Minimal autoregulatory sequence* (MAS) responsable de mediar l'autoregulació d'*eve*; aquesta regió conté, a més de llocs d'unió per la proteïna Even-skipped, llocs d'unió tant per GAGA com per TTK, els quals s'ha suggerit que podrien actuar intensificant la resposta autoregulatora d'*eve* al llarg de la gastrulació (Jiang *et al*, 1991).

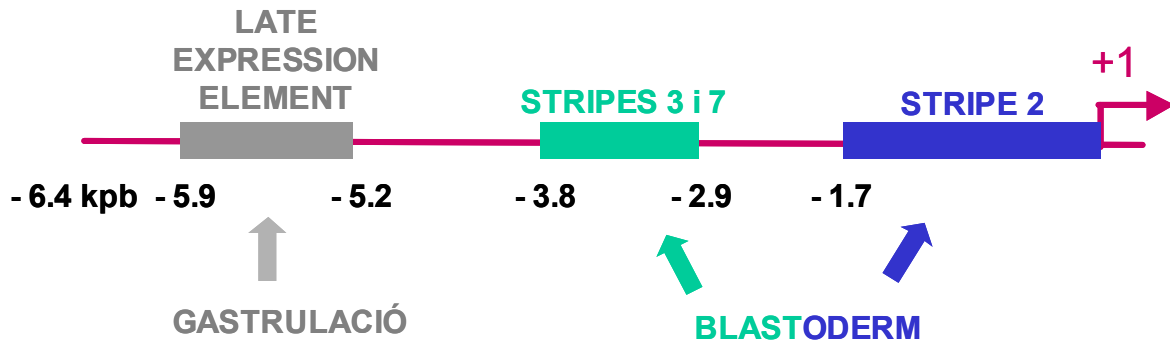


Figura R.9. Representació esquemàtica de la regió reguladora del gen *even-skipped* (*eve*) compresa entre -6.4 kpb i el lloc d'inici de transcripció. Els elements reguladors de les bandes 2, 3 i 7, així com els de les 1, 4, 5 i 6 situades més enllà de l'inici de transcripció, dirigeixen l'expressió de cadascuna d'aquestes bandes a l'etapa de blastoderm cel·lular, mentre l'element *late* controla l'expressió de les 7 bandes d'*eve* durant l'etapa de gastrulació.

2.1.2. El promotor *eve* stripe 2

El promotor *eve* stripe 2 es va definir a partir d'estudis realitzats amb mosques transgèniques com la regió de 1.7 kpb situada immediatament anterior al lloc d'inici de transcripció que era suficient per dirigir l'expressió d'un gen marcador LacZ en els límits de la banda 2 (Harding *et al*, 1989).

Estudis posteriors van acotar l'element regulador mínim capaç de conduir l'expressió de la banda 2, essent una regió de 480 pb situada entre les posicions -1.5 i -1.1 kpb que rebé el nom de *Minimal stripe element* (MSE). Aquest element conté un total de 12 llocs d'unió pels productes dels gens *bicoid* (*bcd*), *hunchback* (*hb*), *giant* (*gt*) i *Krüppel* (*Kr*) que en alguns casos es troben solapats (figura R.10) i, de fet, diferents aproximacions genètiques suggereixen un paper clau d'aquests quatre gens en l'inici de l'expressió de la banda 2 (Small *et al*, 1992). Concretament, s'ha proposat que les proteïnes Bicoid i Hunchback actuarien sinèrgicament per activar l'expressió de la banda 2 en estadis primerencs de l'embriogènesi. Els límits d'aquesta banda estarien definits per la repressió selectiva del producte del gen *giant* en regions anteriors i de *Krüppel* en regions posteriors de l'embrió, els quals s'ha proposat que actuen per un mecanisme de *quenching* segons el qual la seva unió a llocs solapats o molt propers als de Bcd i Hb interfereix en l'activitat d'aquests activadors; consistent amb aquesta hipòtesi, s'ha pogut observar que és necessària la unió al DNA d'aquests dos factors per la seva activitat repressora (Small *et al*, 1991).

No obstant, existeixen evidències experimentals que postulen que l'activació sinèrgica mediada per Bicoid i Hunchback és de fet "promíscua", podent ser la seva funció substituïda per altres activadors. Això duu a pensar que, de fet, l'expressió de la banda 2 d'*eve* tan sols requereix la unió de suficients dominis d'activació que puguin actuar cooperativament per estimular la transcripció (Arnosti *et al*, 1996).

Tal i com ja s'ha comentat a la Introducció (veure apartats 2.2.2.3 i 2.3.3.1) al llarg de la regió promotora *eve stripe 2* s'han descrit llocs d'unió putatius per a GAGA i TTK, tot i que els únics que estan ben establerts com a tals estan situats a la regió compresa entre les posicions -400 i +1 pb (figura R.10). En extractes nuclears preparats a diferents estadis del desenvolupament embrionari, s'ha pogut determinar que l'activitat d'unió de GAGA a aquesta regió és constant al llarg de l'embriogènesi, i per això s'ha suggerit que el seu paper com a activador transcripcional estaria regulat per altres factors en els diferents estadis del desenvolupament de l'embrió. En canvi, la unió de TTK varia d'acord amb el seu patró d'expressió, observant-se una màxima activitat d'unió en els extractes preparats entre les 5 i 15 hores després de la fertilització (Read *et al*, 1990).

Aquesta presència de llocs d'unió per a GAGA i TTK al promotor *eve stripe 2*, així com els ja descrits efectes d'expressió ectòpica de TTK en el patró d'expressió d'*eve* o la possible funció de GAGA com a regulador d'*eve*, suggereixen que GAGA i TTK tenen papers importants en controlar la correcta expressió d'*even-skipped*. El promotor *eve stripe 2* apareix, així doncs, com un context adequat per estudiar la possible contribució de la interacció GAGA- TTK en la regulació transcripcional.

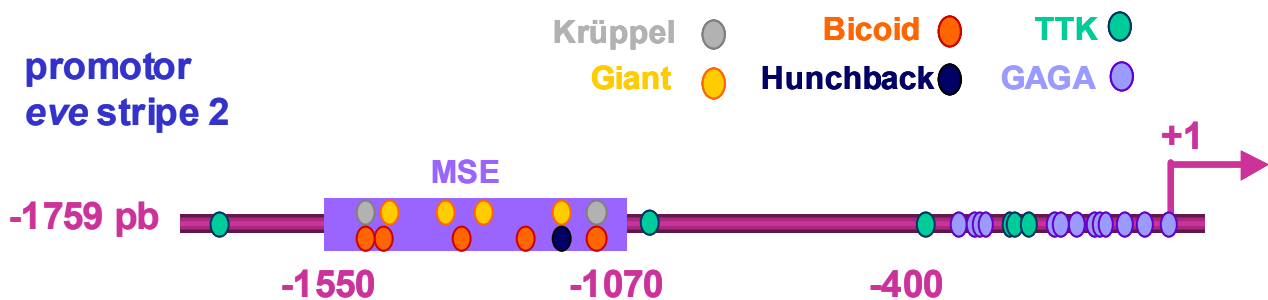


Figura R.10. Representació esquemàtica del promotor *eve stripe 2*. S'indiquen els llocs d'unió per als productes dels gens *bicoid*, *hunchback*, *giant* i *Krüppel* a l'element MSE (*minimal stripe element*), així com els llocs d'unió de GAGA i TTK que principalment es concentren a la regió més proximal del promotor.

2.2. Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de GAGA i TTK en l'activitat del promotor *eve stripe 2*

Per poder analitzar els efectes de GAGA i TTK sobre l'activitat del promotor *eve stripe 2* es va posar a punt l'assaig transcripcional a cèl.lules de *Drosophila* SL2 (veure apartat 2.8.3 de Materials i mètodes). Es realitzaren transfeccions transitòries d'un plàsmid amb la regió promotora *eve stripe 2* fusionada al gen marcador luciferasa (pGL3-*eve*) amb quantitats creixents de plàsmids de sobreexpressió de les proteïnes GAGA i/o TTK (pActPPA-GAGA,

pActPPA-TTK) i un plàsmid control de transfecció amb expressió constitutiva del gen β -galactosidasa (pCMV- β Gal). Així, l'activitat luciferasa present a l'extracte normalitzada respecte l'activitat β -galactosidasa es pogué correlacionar amb l'activitat transcripcional del promotor *eve stripe 2* en resposta a la sobreexpressió de GAGA i/o TTK. A cada experiment, però, aquests valors d'activitat luciferasa foren a la vegada normalitzats respecte l'activitat basal del promotor *eve stripe 2* determinada en absència de cap proteïna sobreexpressada; això ens permeté representar l'activitat del promotor amb GAGA i/o TTK en relació amb la seva activitat transcripcional basal, i poder fer comparables experiments diferents.

A la figura R.11 es mostren els efectes de la sobreexpressió de GAGA i/o TTK en l'activitat del promotor. Els nivells d'expressió de les proteïnes es van determinar per *Western blot* a partir dels extractes corresponents (figura R.12).

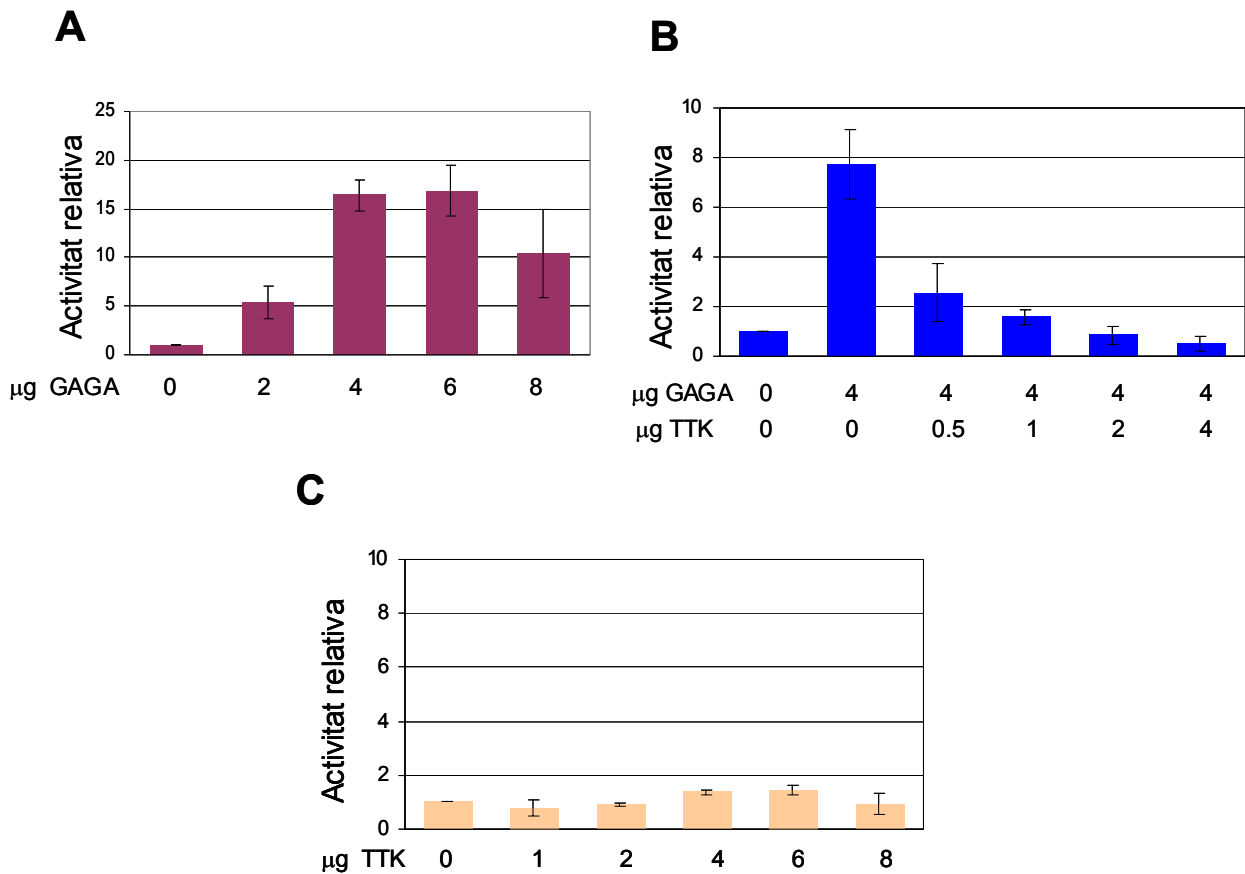


Figura R.11. Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de GAGA i/o TTK en l'activitat del promotor *eve stripe 2*. Es van transfectar cèl.lules SL2 amb 7 μg de plàsmid pGL3-*eve* (format per la fusió entre el promotor *eve stripe 2* i el gen marcador luciferasa) i les quantitats indicades de plàsmids pActPPA sobreexpressant GAGA (A) o TTK (C), o bé 4 μg de vector pActPPA-GAGA amb quantitats creixents de plàsmid pActPPA-TTK (B). Les activitats luciferasa es van mesurar com s'ha especificat a Materials i mètodes (2.8.3), i van ser normalitzades respecte l'activitat basal del promotor *eve stripe 2* determinada en presència del plàsmid buit pActPPA (és a dir, sense sobreexpressar proteïna). Les dades representades corresponen a la mitjana de quatre experiments independents.

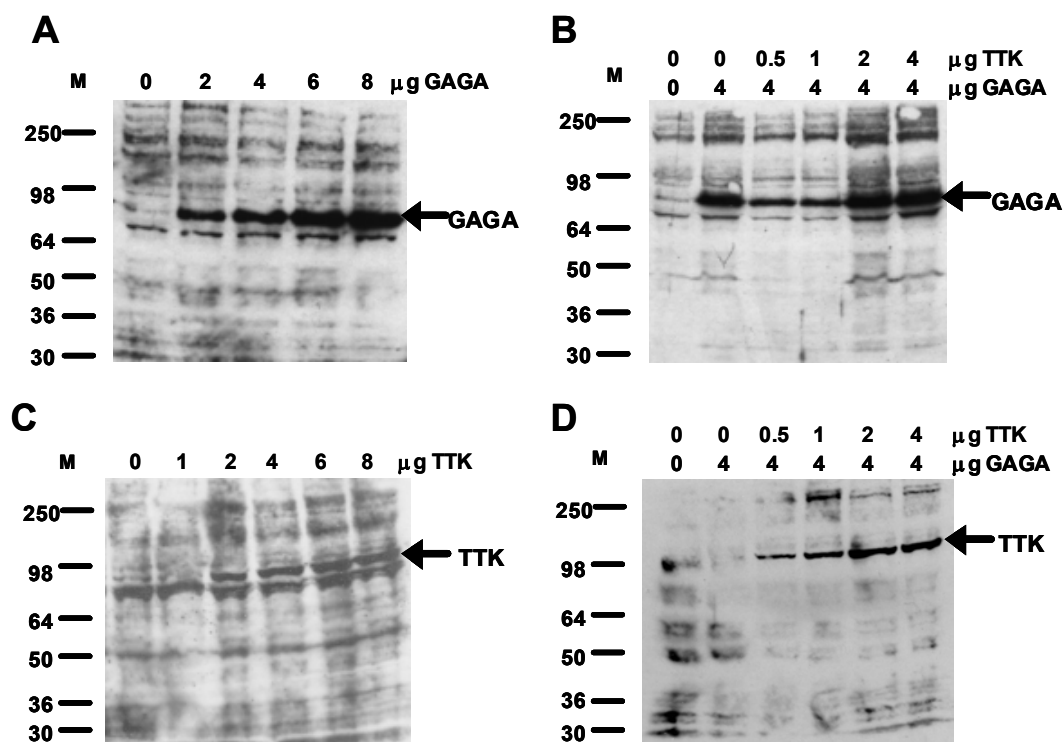


Figura R.12. Anàlisi per *Western blot* dels nivells de sobreexpressió de GAGA i TTK en els experiments de transfecció indicats a la figura R.11. Es va analitzar la sobreexpressió de GAGA i TTK en transfectar quantitats creixents del plàsmid pActPPA-GAGA (A), o pActPPA-TTK (C) respectivament, així com la sobreexpressió de GAGA (B) i TTK (D) en co-transfectar quantitats creixents del vector pActPPA-TTK en presència de 4 µg de pActPPA-GAGA. A cada carril es van carregar 50 µL d'extracte cel·lular provinent d'una transfecció amb les quantitats de plàsmids d'expressió indicats. La detecció de les proteïnes GAGA i TTK sobreexpressades es va fer amb els sèrums α -GAGA (A, B) o α -TTK (C, D) fraccionats. Els carrils M corresponen als marcadors de pesos moleculars de proteïnes (en kDa).

Com es pot observar a la figura R.11A, la sobreexpressió de GAGA resulta en una activació significativa del promotor *eve stripe 2* d'una forma depenent de dosi: l'activitat luciferasa augmenta a mida que s'incrementa l'expressió de GAGA fins a una màxima activació d'unes 15 vegades quan es transfecten 4-6 µg del vector de sobreexpressió de GAGA. L'anàlisi per *Western blot* dels extractes de les cèl·lules transfectades en aquest experiment permeté corroborar que la transfecció de quantitats creixents del plàsmid de sobreexpressió de GAGA es tradueix en un increment dels nivells de sobreexpressió d'aquesta proteïna (figura R.12A). Aquests resultats indiquen que GAGA és capaç d'estimular la transcripció del promotor *eve stripe 2*.

L'activació del promotor *eve stripe 2* en transfectar 4 µg del plàsmid d'expressió de GAGA és reprimida eficientment per una sobreexpressió de TTK (figura R.11B): en presència de 0.5 µg de plàsmid pActPPA-TTK l'activitat luciferasa es redueix de forma dràstica, i amb tan sols 2 µg de vector aquesta activitat assoleix els nivells basals. En aquest experiment, i tal com ens mostren els anàlisis per *Western blot* corresponents als extractes de les cèl·lules transfectades en aquest assaig (figura R.12B i D), els nivells de sobreexpressió

de GAGA no es redueixen en sobreexpressar TTK. Per tant, el decrement observat en l'activitat luciferasa quan es sobreexpressa TTK reflecteix la repressió del promotor *eve stripe 2* i no una disminució de l'expressió de GAGA.

D'altra banda, quan TTK és sobreexpressat en absència de GAGA (veure figura **R.12C**) no es detecten canvis significatius en l'activitat luciferasa, indicant que TTK per ell mateix no afecta l'activitat basal del promotor *eve stripe 2* (figura **R.11C**).

En resum, doncs, aquests resultats indiquen, per una banda, que GAGA és capaç d'activar el promotor *eve stripe 2*, i per l'altra que TTK reprimeix l'activació depenent de GAGA del promotor però no la seva activitat basal, la qual cosa suggereix que aquesta repressió és deguda a la interacció directa GAGA-TTK. L'anàlisi dels dominis de GAGA i TTK necessaris per observar l'efecte descrit confirmà aquesta hipòtesi (veure apartats 2.3 i 2.4).

A continuació es va analitzar si l'efecte repressor de TTK sobre l'activació depenent de GAGA era exclusiu del promotor d'*eve*. Diferents estudis de transfecció a cèl·lules SL2 realitzats al nostre laboratori demostren que el promotor 5×GAL4*hsp70*UAS, que conté 5 llocs d'unió per GAL4 inserits a 5' del promotor mínim *hsp70* de *Drosophila*, és eficientment activat per GAGA, amb uns nivells d'activació força similars als observats pel promotor *eve stripe 2* (de fet l'activació de GAGA no requereix els llocs GAL4, i només depèn del promotor mínim del gen *hsp70*). Aquest resultat, que a més està d'acord amb estudis anteriors que apuntaven a un paper clau de GAGA en l'activació del gen *hsp70* (veure apartat 2.2.3.2 de la Introducció), ens proporcionà un nou context on poder evaluar la capacitat de TTK de reprimir una activació mediada per GAGA.

Es varen realitzar assajos de transfecció a SL2 amb el plàsmid *reporter* pGL3-5×GAL4*hsp70*UAS i quantitats creixents de plàsmid de sobreexpressió de TTK en presència de 4 µg de plàsmid de sobreexpressió de GAGA. Els resultats es mostren a la figura **R.13**, on s'observa que TTK és capaç de reprimir eficientment aquest promotor heteròleg 5×GAL4*hsp70*UAS activat per GAGA: en presència de 0.5 µg de vector de sobreexpressió de TTK s'observa una reducció significativa de l'activitat luciferasa present a l'extracte, i amb 2-4 µg de vector aquesta activitat és fins i tot inferior a la dels nivells basals.

Aquest resultat indica que la repressió per TTK sobre l'activació de GAGA no està limitada al context del promotor *eve*, sinó que també pot tenir lloc en altres promotors que puguin ser activats per GAGA, suggerint que l'acció d'ambdós factors podria contribuir activament en la regulació de l'expressió de nombrosos gens de *Drosophila*.

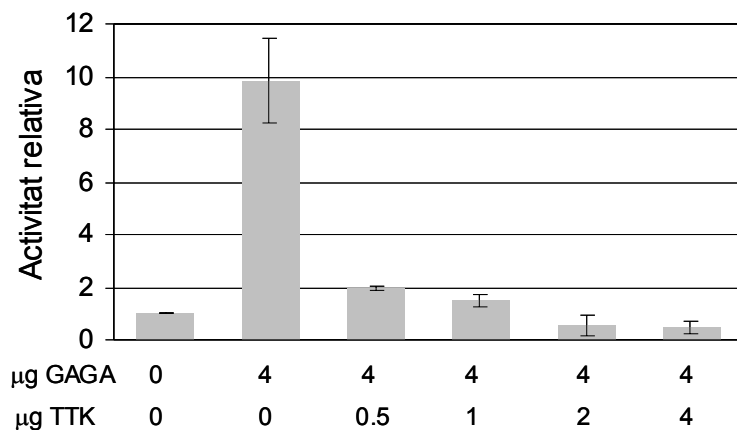


Figura R.13. Anàlisi de la funció repressora de TTK en el context del promotor 5×GAL4hsp70UAS. Es varen transfectar cèl.lules SL2 amb 5 μg de plàsmid pGL3-5×GAL4hsp70UAS (format per la fusió entre el promotor 5×GAL4hsp70UAS i el gen marcador luciferasa) i quantitats creixents de vector de sobreexpressió de TTK en presència de 4 μg de plàsmid de sobreexpressió de GAGA. Les dades representades corresponen a la mitjana de tres experiments independents.

2.3. Anàlisi de la contribució dels dominis POZ de GAGA i TTK a la repressió per TTK de l'activació dependent de GAGA

Per tal de determinar si la repressió observada era deguda a la interacció GAGA-TTK o bé era deguda a efectes indirectes, es va estudiar quina era la contribució dels dominis POZ de GAGA i TTK en aquesta repressió. Per aquesta raó, es varen construir vectors de sobreexpressió de les proteïnes GAGA i TTK a les quals se'ls hi havia deletat els respectius dominis POZ, i es va analitzar la capacitat d'aquestes deletacions de reproduir l'efecte observat per les proteïnes GAGA i TTK senceres.

2.3.1. Estudi de la contribució del domini POZ de TTK: la proteïna Δ POZ_{TTK}

Amb l'objectiu d'evaluar la capacitat repressora de la proteïna truncada Δ POZ_{TTK}, a la qual se li han deletat els primers 115 residus corresponents al domini POZ (figura R.14A), es van efectuar assajos transcripcionals a SL2 co-transfectant quantitats creixents del plàsmid de sobreexpressió de Δ POZ_{TTK} juntament amb 4 μg del plàsmid de sobreexpressió de GAGA i 7 μg del *reporter* pGL3-*eve*.

Els resultats, representats a la figura R.14B, mostren que la sobreexpressió de Δ POZ_{TTK} no interfereix en l'activació del promotor *eve* stripe 2 dependent de GAGA: els nivells d'activitat luciferasa que s'assoleixen en només transfectar el plàsmid pActPPA-GAGA no varien significativament quan alhora es co-transfecten de 0.5 a 4 μg de plàsmid de sobreexpressió de Δ POZ_{TTK}. Això indica que en absència del domini POZ, TTK és incapaç de reprimir el promotor *eve* stripe 2 activat per GAGA, i que per tant el POZ de TTK és

essencial per la seva activitat repressora. Això donaria suport a la hipòtesi formulada anteriorment segons la qual la interacció GAGA-TTK té un paper fonamental en la repressió per TTK.

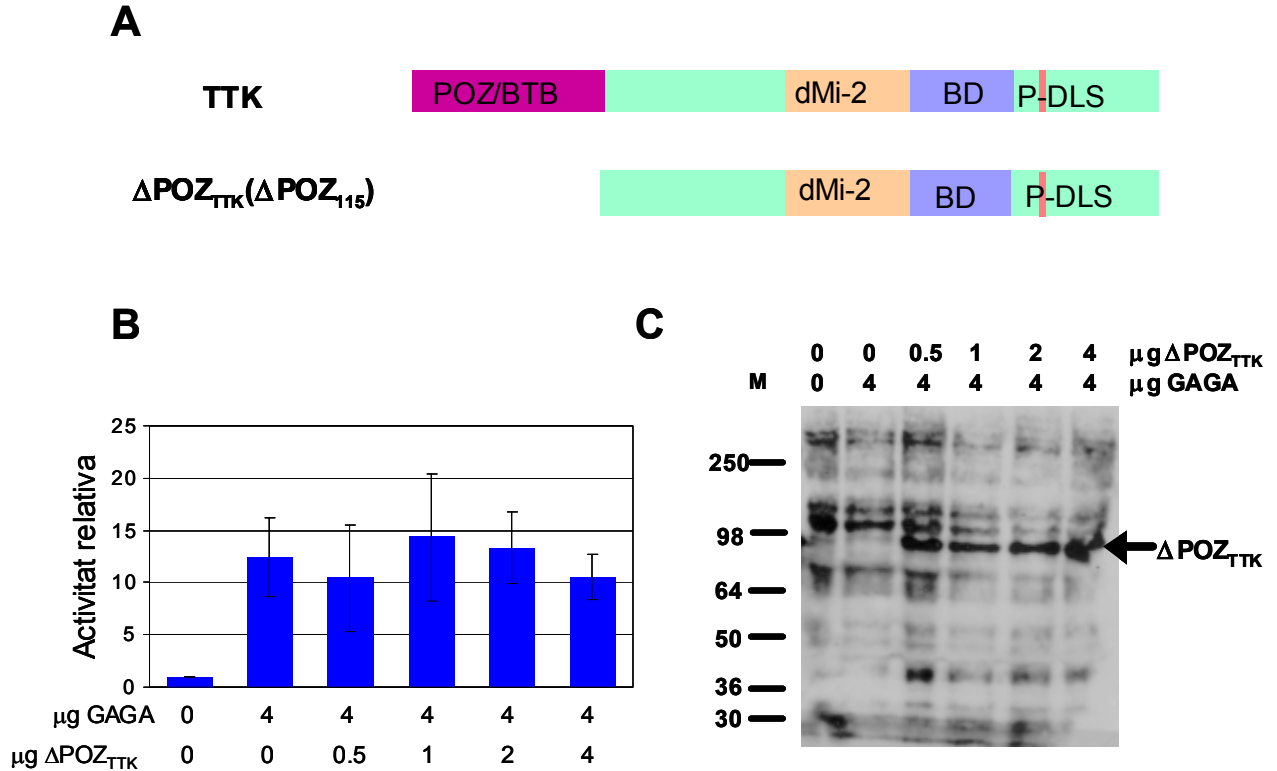


Figura R.14. Anàlisi de la contribució del domini POZ de TTK en la repressió. **A.** Representació esquemàtica de la deleció $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$ emprada en aquest experiment comparada amb la proteïna TTK sencera. **B.** Activitat luciferasa detectada en extractes de cèl.lules SL2 transfectades amb 7 μg de plàsmid pGL3-*eve*, 4 μg de plàsmid pActPPA-GAGA i les quantitats indicades del plàsmid de sobreexpressió de $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$. Les dades representades corresponen a la mitjana de tres experiments independents. **C.** Anàlisi per *Western blot* de la sobreexpressió de $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$ a cèl.lules SL2. A cada carril es van carregar 50 μL d'extracte provinent d'una transfecció amb les quantitats de plàsmids de sobreexpressió indicats. La detecció de la sobreexpressió de $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$ es va fer amb sèrum α -TTK fraccionat. El carril M correspon al marcador de pes molecular de proteïnes (en kDa).

No obstant, es volgué descartar la possibilitat de que la no detecció de repressió en co-transfectar $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$ fos deguda a una minsa expressió d'aquesta proteïna o bé a que no es pogués localitzar correctament a nucli, per la qual cosa s'analitzà amb detall la seva sobreexpressió.

En primer lloc, s'analitzaren per *Western blot* els extractes corresponents a les cèl.lules transfectades amb el vector pActPPA- $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$, on es va poder constatar que els nivells de sobreexpressió de $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$ en els experiments descrits són equivalents als nivells amb què es sobreexpressa la proteïna TTK sencera en assajos de transfecció similars (figura R.14C, comparar amb la figura R.12C i D).

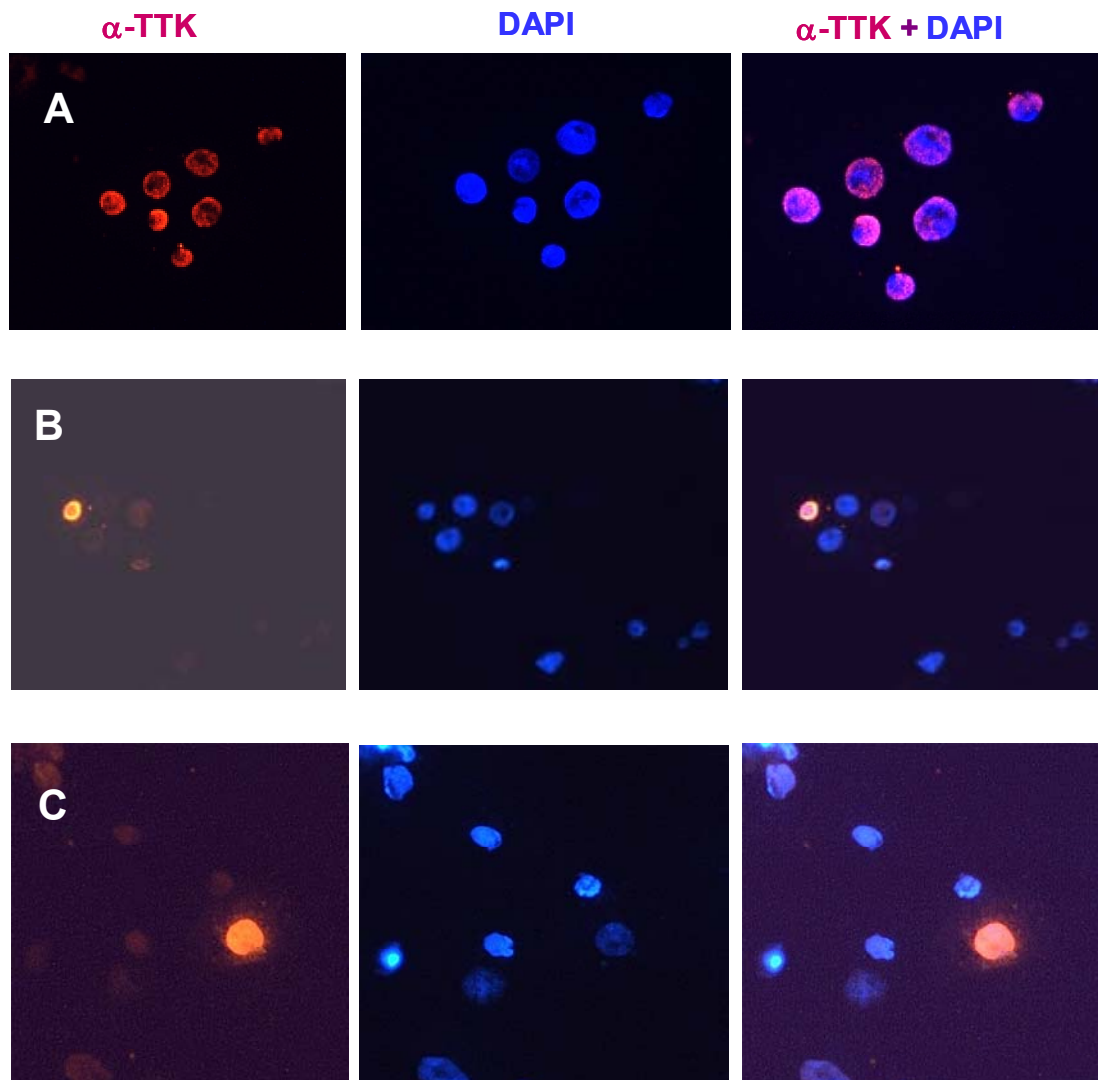


Figura R.15. Immunolocalització de TTK i Δ POZTTK a cèl.lules SL2 no transfectades (A), transfectades amb 5 μ g de plàsmid de sobreexpressió de TTK (B) o transfectades amb 5 μ g de plàsmid de sobreexpressió de Δ POZTTK (C). La impactació i tractament de les cèl.lules es va fer tal i com s'especifica a l'apartat 2.8.4 de Materials i mètodes. La senyal vermella correspon a la tinció amb α -TTK purificat per afinitat i la blava a la tinció amb DAPI, que serveix com a indicació de la posició del nucli. Amb la sobreposició de les senyals de TTK i del DNA (imatges dreta) es pot apreciar un enorme increment de les proteïnes TTK o Δ POZTTK sobreexpressades al nucli de les cèl.lules que han estat transfectades. La tinció d'aquestes cèl.lules amb sèrum preimmune no donà cap senyal.

I en segon lloc, i per tal de determinar si $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$ sobreexpressat localitza correctament a nucli, es realitzaren immunolocalitzacions a cèl.lules SL2 bé no transfectades, bé transfectades amb els vectors de sobreexpressió per TTK o $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$ (figura **R.15**). Aquestes cèl.lules foren tenyides simultàniament amb α -TTK purificat per afinitat i amb DAPI, i la detecció es féu per fluorescència (apartat 2.8.4 de Materials i mètodes). A la figura **R.15A**, corresponent a les cèl.lules SL2 no transfectades, s'observa que la localització de TTK endogen queda restringida al nucli. D'altra banda, quan es sobreexpressen TTK (figura **R.15B**) o $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$ (figura **R.15C**) es detecta una senyal molt intensa al nucli de les cèl.lules transfectades. En aquestes imatges és important tenir en compte que la intensitat de la senyal corresponent a TTK endogen es troba reduïda considerablement respecte les imatges corresponents a les cèl.lules sense transfectar (figura **R.15A**). Això ens està indicant, en primer lloc, que la sobreexpressió de TTK i $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$ té lloc a uns nivells elevadíssims; i en segon lloc, que la localització d'aquestes proteïnes sobreexpressades és completament nuclear.

Així doncs, la manca del domini POZ no sembla afectar ni l'expressió de $\Delta\text{POZ}_{\text{TTK}}$ ni la seva localització nuclear i, per tant, l'absència d'efecte sobre l'activació depenent de GAGA es pot atribuir al paper que exerceix aquest domini en la funció repressora de TTK.

2.3.2. Estudi de la contribució del domini POZ de GAGA

2.3.2.1. La proteïna $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$

Per tal d'evaluar la contribució del domini POZ de GAGA a la repressió per TTK, es volgué analitzar la capacitat de TTK de reprimir una activació mediada per la proteïna $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$, a la qual li falten els primers 122 residus corresponents al domini POZ. Experiments de transcripció *in vitro* en extractes de HeLa realitzats al nostre laboratori havien demostrat que aquesta forma truncada de GAGA era capaç d'activar la transcripció, tot i que d'una forma menys eficient que la proteïna sencera perquè no pot multimeritzar i per tant no pot activar d'un mode sinèrgic (Espinás *et al*, 1999).

No obstant, en el nostres assajos transcripcionals a cèl.lules SL2, la proteïna $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ apareix incapaç d'estimular la transcripció del promotor *eve stripe 2* (figura **R.16A**, comparar amb l'activació amb GAGA sencera), tot i expressar-se de forma eficient a SL2 (figura **R.16B**) i disposar d'evidències experimentals que indicarien que es pot unir al DNA: per una banda, sabem que $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ recombinant s'uneix al DNA *in vitro*, encara que no ho pot fer d'un mode cooperatiu quan hi ha llocs d'unió en nombre múltiple pel fet de no poder oligomeritzar (Espinás *et al*, 1999); i per altra banda, experiments de transfecció a SL2 similars als realitzats en aquest treball demostren que la sobreexpressió de $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ reprimeix quasi tan eficientment com la proteïna GAGA sencera el promotor de *Trl*, una

repressió que com ja s'ha comentat anteriorment sembla dependre de la unió de GAGA a aquest promotor (Kosoy *et al*, 2002).

Aquesta aparent contradicció entre els resultats *in vitro* i a cèl.lules SL2 sobre la capacitat transactivadora de la proteïna $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ es podria atribuir a que els dos sistemes utilitzats són diferents, no només en el mètode d'anàlisi, sinó també en el promotor emprat, la forma de la proteïna utilitzada (en els estudis *in vitro* es va utilitzar una forma de $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ a la qual li mancaven els primers 245 residus de la proteïna) i, encara més important, en el fet que en els assajos transcripcionals *in vitro* s'utilitzava un extracte nuclear de cèl.lules HeLa, mentre que els nostre assajos de transcripció s'han realitzat a partir de cèl.lules de *Drosophila* SL2.

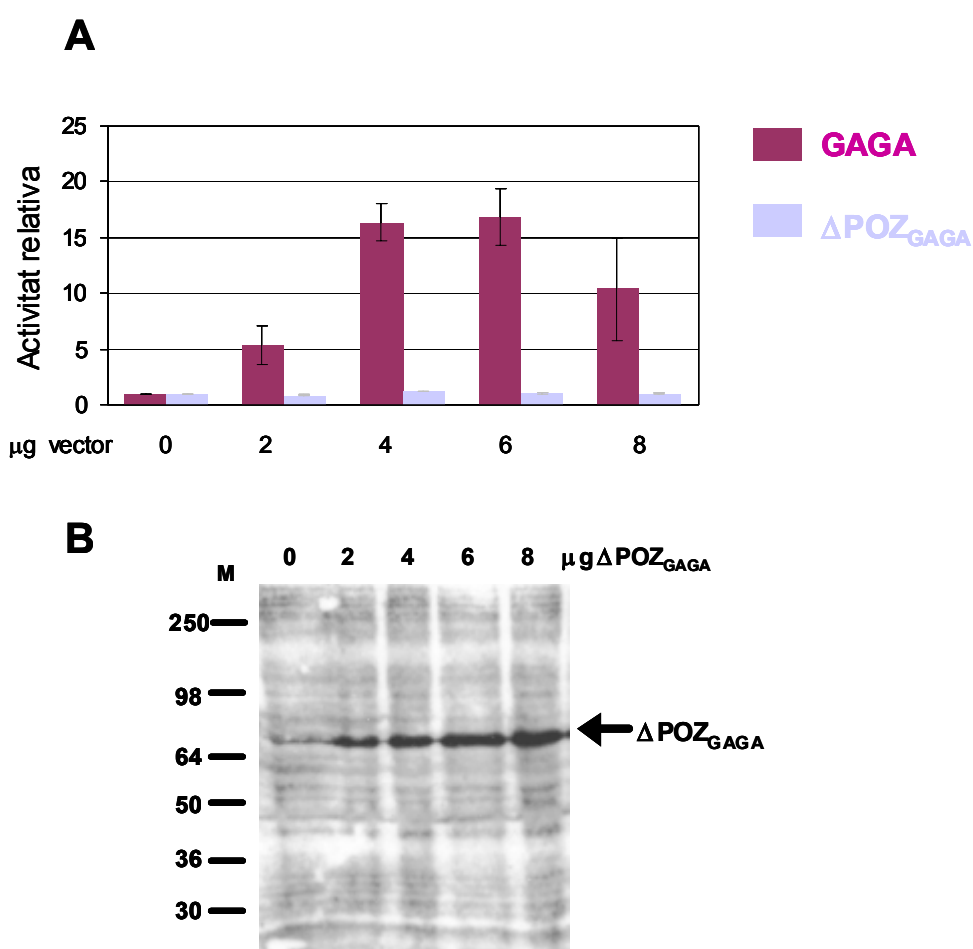


Figura R.16. Estudi de l'activitat transcripcional de la proteïna $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ en assajos de transfecció a cèl.lules SL2. **A.** Activitat luciferasa detectada en extractes de cèl.lules SL2 transfectades amb 7 µg de plàsmid pGL3-eve i les quantitats indicades de plàsmids pActPPA sobreexpressant GAGA o $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$. Els resultats de GAGA corresponen als experiments representats a la figura R.11A, i els de $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ són el promig de tres experiments independents. **B.** Anàlisi per *Western blot* dels nivells de sobreexpressió de $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$. A cada carril es van carregar 50 µL d'extracte de cèl.lules SL2 provinent d'una transfecció amb les quantitats de plàsmid de sobreexpressió de $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ indicats. La detecció dels nivells de sobreexpressió de $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ es va fer amb sèrum α -GAGA fraccionat. El carril M correspon al marcador de pes molecular de proteïnes (en kDa).

En qualsevol cas, el fet que $\Delta\text{POZ}_{\text{GAGA}}$ no pugui activar la transcripció en els nostres assajos transcripcionals a SL2 impedi, en definitiva, que es pogués evaluar d'una manera directa la contribució del domini POZ de GAGA en la repressió per TTK. Això féu que s'hagués de recórrer a un sistema heteròleg.

2.3.2.2. El sistema heteròleg $\text{GAL4Q}/\text{POZ}_{\text{GAGA}}\text{GAL4Q}$

Estudis realitzats al nostre laboratori han demostrat que el domini C-terminal ric en glutamines de GAGA (domini Q), essencial per la funció activadora de GAGA, és un domini autònom que manté les seves propietats quan es troba fusionat a altres dominis d'unió a DNA (Vaquero *et al*, 2000). Així, la proteïna heteròloga GAL4Q, formada per la fusió entre el domini Q i el domini d'unió a DNA de GAL4, pot estimular la transcripció del promotor $5\times\text{GAL4-}hsp70\text{UAS}$, que conté 5 llocs d'unió per GAL4 a 5' del promotor mínim del gen *hsp70* de *Drosophila*.

La figura **R.17A** mostra els resultats d'assajos transcripcionals a SL2 on s'han co-transfectat 5 μg de plàsmid *reporter* pGL3- $5\times\text{GAL4}hsp70\text{UAS}$ i quantitats creixents de plàsmid de sobreexpressió de GAL4Q, on s'observa una màxima activació de fins a 2 a 3 vegades respecte els nivells basals quan es transfecten entre 1-4 μg de vector de sobreexpressió de GAL4Q.

Per la seva banda, la proteïna $\text{POZ}_{\text{GAGA}}\text{GAL4Q}$, que conté el domini POZ de GAGA fusionat a GAL4Q, activa la transcripció del promotor $5\times\text{GAL4}hsp70\text{UAS}$ a uns nivells similars als observats per GAL4Q, tot i que en aquest cas la màxima activació es detecta en transfectar 8 μg de vector de sobreexpressió (figura **R.17C**).

En aquest context, la sobreexpressió de TTK no interfereix en l'activació promoguda per GAL4Q (figura **R.17B**), però en canvi reprimeix la transcripció del promotor $5\times\text{GAL4}hsp70\text{UAS}$ quan és activat per $\text{POZ}_{\text{GAGA}}\text{GAL4Q}$ (figura **R.17D**). De fet, TTK reprimeix $\text{POZ}_{\text{GAGA}}\text{GAL4Q}$ tan eficientment com ho fa amb GAGA: amb 0.5 μg de vector de sobreexpressió de TTK ja es detecta un significatiu efecte sobre l'activació deguda a $\text{POZ}_{\text{GAGA}}\text{GAL4Q}$, i amb 1-2 μg de vector la repressió és total.

Per tant, GAL4Q esdevé reprimible per TTK quan té el domini POZ de GAGA fusionat a N-terminal de la proteïna. Això demostra que la repressió per TTK de l'activació dependent de GAGA requereix la presència d'ambdós dominis POZ, donant més arguments a favor d'un mecanisme de repressió que implica una interacció directa entre GAGA i TTK.

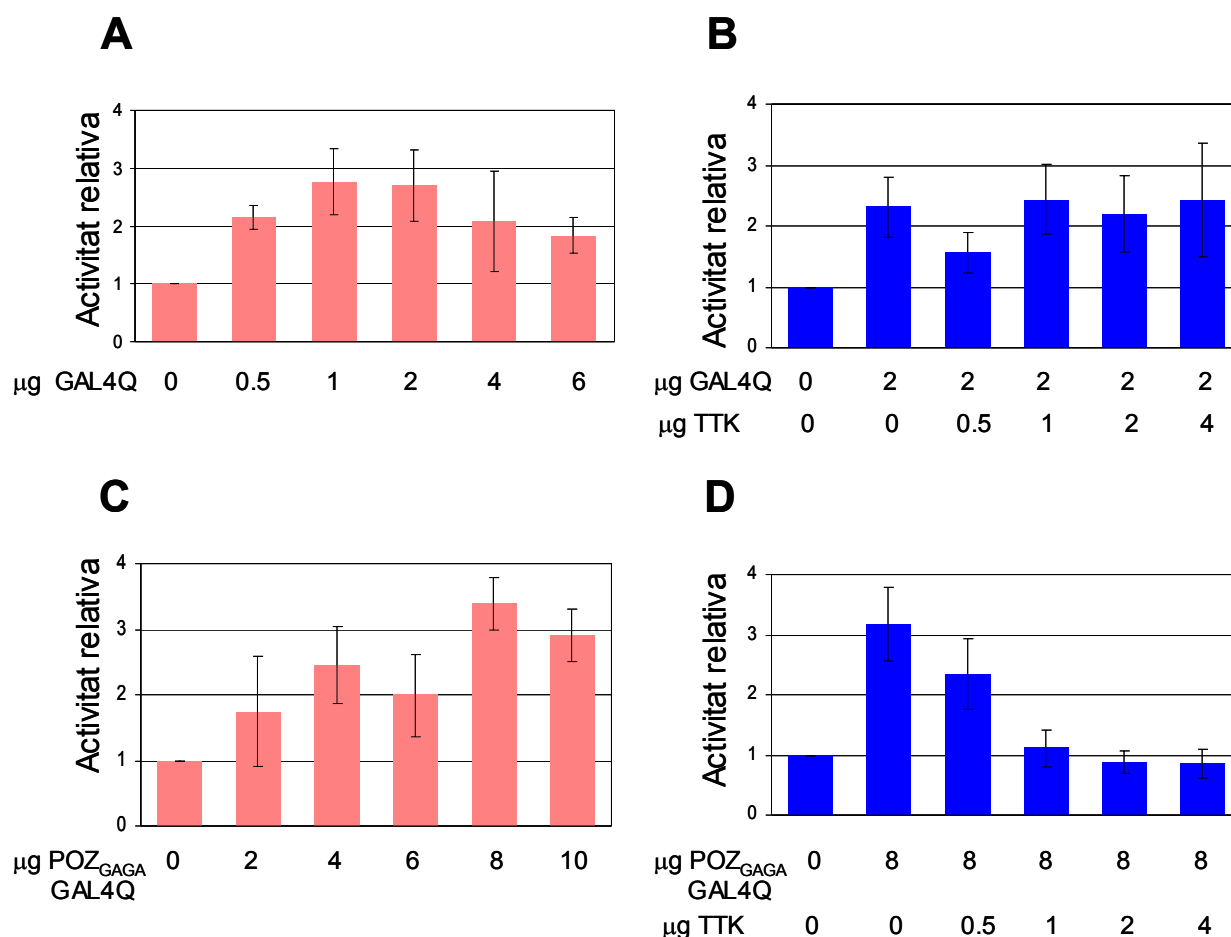


Figura R.17. Estudi de la contribució del domini POZ de GAGA en la repressió per TTK en el context del promotor 5xGAL4hsp70UAS. Es van mesurar les activitats luciferasa d'extractes de cèl.lules SL2 co-transfectades amb 5 μg del plàsmid *reporter* pGL3-5xGAL4hsp70UAS i les quantitats indicades de plàsmids pActPPA sobreexpressant GAL4Q (A) o POZGAGAGAL4Q (C). Amb el mateix plàsmid *reporter*, es van transfectar quantitats creixents de vector de sobreexpressió de TTK en presència de 2 μg de vector de sobreexpressió de GAL4Q (B) o 8 μg de vector de sobreexpressió de POZGAGAGAL4Q (D). Les dades representades corresponen a la mitjana de sis experiments independents.

2.4. Caracterització dels dominis de TTK implicats en la repressió

Havent observat que la repressió del promotor *eve stripe 2* per TTK depèn de la seva activació per GAGA i requereix la presència dels dominis POZ de GAGA i TTK, es va voler analitzar quins altres dominis de la proteïna TTK contribueixen a la seva funció repressora, així com si el domini POZ de TTK actua com a domini repressor per si mateix independentment del context on es trobi. Per aquesta raó, es varen construir vectors de sobreexpressió de diferents formes de la proteïna TTK, els quals van ser co-transfectats a cèl.lules SL2 juntament amb el vector de sobreexpressió de GAGA i el *reporter* pGL3-*eve* amb l'objectiu d'evaluar-ne la seva activitat repressora.

2.4.1. La proteïna Δ TTK580

Com s'ha comentat a la Introducció, TTK69 conté, a la regió C-terminal de la proteïna (aa 591-595), una seqüència consens P-DLS d'unió al co-repressor dCtBP. Tot i que estudis d'interacció *in vitro* suggereixen que la unió de TTK a dCtBP estaria mediada principalment pel domini POZ, s'ha observat que la deleció del motiu P-DLS comporta una pèrdua de l'activitat repressora de TTK en el destí neuronal (Wen *et al*, 2000), amb la qual cosa s'ha suggerit que, tot i no ser essencial, aquesta seqüència contribuiria activament a estabilitzar la interacció entre TTK i el co-repressor dCtBP.

Amb l'objectiu de determinar si aquest motiu P-DLS també participa en la funció repressora de TTK sobre el promotor *eve* stripe 2 activat per GAGA, es van realitzar assajos transcripcionals a SL2 co-transfectant quantitats creixents del plàsmid de sobreexpressió de la proteïna Δ TTK580, que conté una deleció de la regió C-terminal de TTK a partir del residu 580 (figura **R.18A**), juntament amb 4 μ g del plàsmid pActPPA-GAGA i 7 μ g del *reporter* pGL3-*eve*.

Tal i com es mostra a la figura **R.18B**, la sobreexpressió de Δ TTK580 reprimeix la transcripció del promotor *eve* stripe 2 activat per GAGA tan eficientment com ho fa la proteïna TTK sencera (veure figura **R.11B**): en presència de 0.5 μ g de vector pActPPA- Δ TTK580 l'activitat luciferasa ja davalla considerablement, i amb tan sols 1-2 μ g de vector aquesta activitat assoleix els nivells basals.

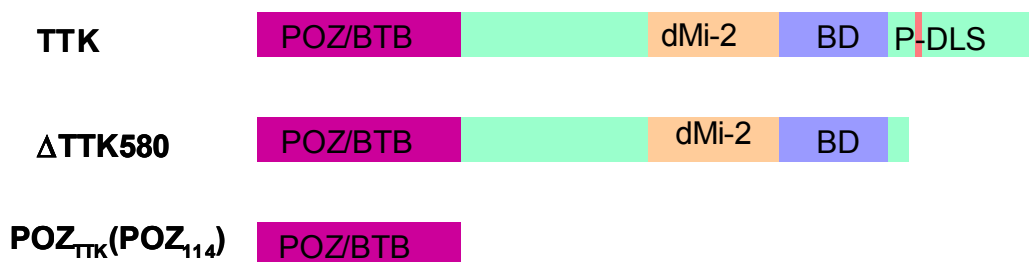
Aquests resultats indiquen que la regió C-terminal de TTK, que conté la seqüència consens P-DLS d'unió a dCtBP, no és necessària per una eficient repressió per TTK de l'activació del promotor *eve* mediada per GAGA.

2.4.2. La proteïna POZ_{TTK}

Havent observat que el domini POZ de TTK és necessari per la repressió i que la deleció de la regió C-terminal no té cap efecte en l'activitat repressora de TTK sobre l'activació depenent de GAGA del promotor *eve*, el següent pas fou analitzar si el POZ de TTK és per si mateix suficient per reprimir. Per això es va assajar la capacitat repressora de la forma truncada POZ_{TTK}, que conté només els primers 114 residus de la proteïna (figura **R.18A**).

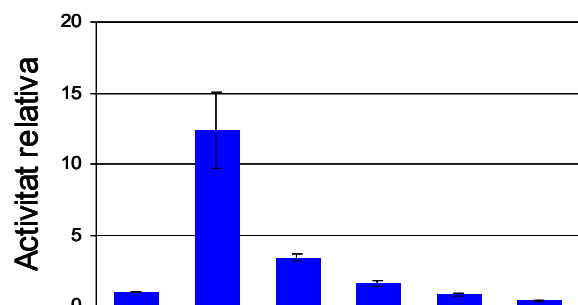
Els resultats d'aquest assaig vénen representats a la figura **R.18C**, on es pot apreciar que la proteïna POZ_{TTK} per si sola és capaç de promoure una significativa repressió de l'activació mediada per GAGA. No obstant, la repressió només s'observa quan es co-transfecten quantitats relativament altes del corresponent vector d'expressió (≥ 2 μ g), mentre que amb les proteïnes TTK o Δ TTK580, amb 0.5 μ g de vector ja es detecta una forta repressió (figures **R.11B** i **R.18B**).

A



B

Δ TTK580



C

POZ_{TTK}

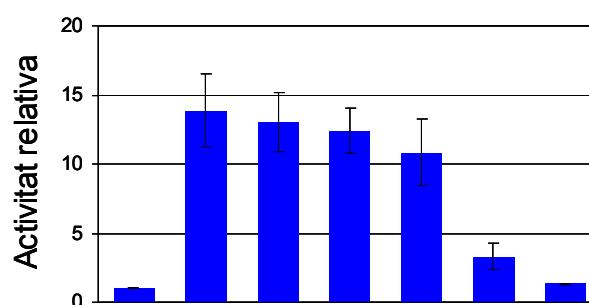


Figura R.18. Anàlisi de la capacitat repressora de les proteïnes Δ TTK580 i POZ_{TTK}. **A**. Representació esquemàtica de les deleccions Δ TTK580 i POZ_{TTK} emprades en aquest experiment comparades amb la proteïna TTK sencera. Les cèl.lules SL2 van ser transfectades amb 7 μ g de plàsmid pGL3-eve, 4 μ g de plàsmid pActPPA-GAGA i les quantitats indicades dels plàsmids de sobreexpressió de Δ TTK580 (**B**) o POZ_{TTK} (**C**). Les dades representades corresponen a la mitjana de tres experiments independents.

Tenint en compte que a la proteïna POZ_{TTK} li manquen les tres putatives senyals de localització nuclear de TTK (estan situades entre els dominis POZ i d'unió a DNA, veure figura I.11), podria ser que aquest requeriment de quantitats més elevades de vector de sobreexpressió de POZ_{TTK} per poder observar un efecte repressor significatiu fos degut a que la proteïna truncada POZ_{TTK} no es localitzés correctament al nucli.

Es procedí doncs a analitzar els nivells de sobreexpressió de POZ_{TTK}, però degut a que l'anticòs α -TTK no reconeix de manera eficient el domini POZ sol, en aquest cas no es va poder realitzar per *Western blot* o immunolocalitzacions.

Així doncs, per poder evaluar la correcta expressió d'aquesta proteïna s'optà per construir un plàsmid de sobreexpressió que dugués la fusió entre el POZ de TTK i la proteïna GFP (*Green Fluorescent Protein*), i transfectar-lo a cèl.lules SL2 amb el plàsmid de sobreexpressió de GAGA (com a control de sobreexpressió nuclear). Les cèl.lules transfectades foren tenyides simultàniament amb α -GAGA purificat per afinitat i amb DAPI tal com s'indica a l'apartat 2.8.4 de Materials i mètodes, i per tècniques fluorescents es pogué detectar una triple senyal corresponent a POZ_{TTK}-GFP (verd), GAGA (vermell) i DNA (blau).

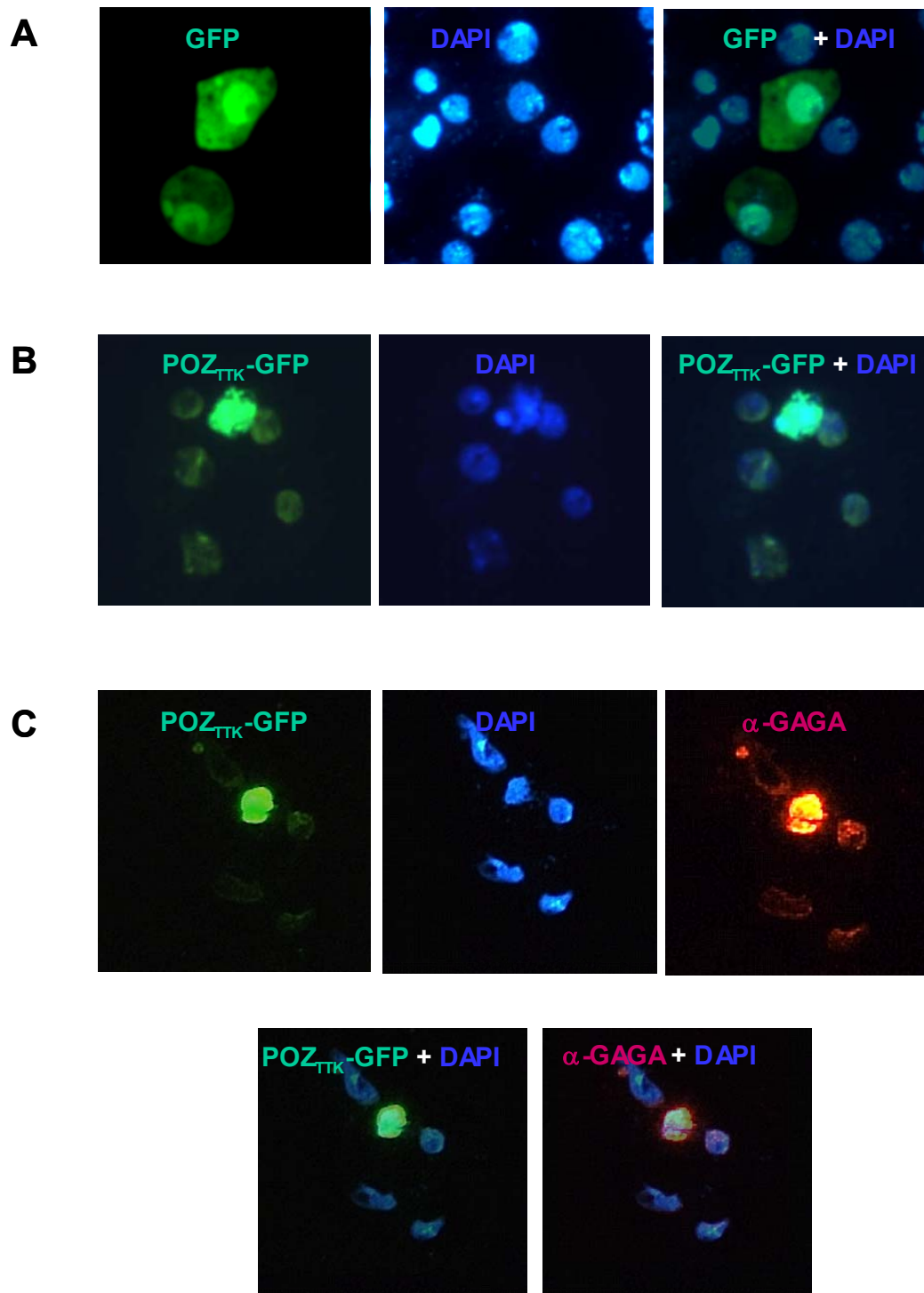


Figura R.19. Localització de les proteïnes GFP i POZ_{TTK}-GFP. Cèl.lules SL2 van ser transfectades amb 7 µg de plàsmid peGFP (A), 7 µg de plàsmid peGFP-POZ_{TTK} (B), o bé co-transfectades amb 7 µg de peGFP-POZ_{TTK} i 7 µg de pActPPA-GAGA (C). La impactació i tractament de les cèl.lules es va fer tal i com s'especifica a l'apartat 2.8.4 de Materials i mètodes. La senyal verda correspon a les proteïnes GFP o POZ_{TTK}-GFP, la blava a la tinció del DNA amb DAPI i la vermella a la tinció de la proteïna GAGA amb α-GAGA purificat per afinitat. La co-localització de la senyal de POZ_{TTK}-GFP amb la del DNA i de GAGA mostra que la localització de POZ_{TTK}-GFP té lloc a nucli (B, C), mentre que la proteïna GFP es localitza per tota la cèl.lula (A, imatges cedides amablement per C. Bonet).

La co-localització de la senyal de POZ_{TTK}-GFP amb la del DNA i GAGA (figura **R.19C**) demostra inequívocament que la proteïna POZ_{TTK}-GFP sobreexpressada es localitza al nucli. A més a més, aquesta localització nuclear no sembla dependre de la presència de GAGA, ja que quan es sobreexpressa el POZ_{TTK}-GFP sol es continua detectant una senyal molt intensa al nucli de les cèl.lules transfectades (figura **R.19B**). D'altra banda, en sobreexpressar la proteïna GFP sense el domini POZ de TTK, la senyal de GFP es localitza de forma difusa per tota la cèl.lula (figura **R.19A**, imatges cedides amablement per C. Bonet). Això indica que l'expressió de POZ_{TTK}-GFP a nucli és atribuïble a la presència del domini POZ de TTK, i permet inferir que en els nostres assajos transcripcionals a SL2 la proteïna POZ_{TTK} s'ha localitzat correctament a nucli.

2.4.3. La proteïna de fusió POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA}

Amb els experiments descrits fins al moment el POZ de TTK apareix com el principal responsable de la repressió observada sobre l'activació mediada per GAGA. Si, com sembla, aquest domini pot exercir per ell mateix una funció repressora, quines propietats funcionals tindria una proteïna GAGA on el seu domini POZ s'hagués substituït pel domini POZ de TTK? Facilitaria una activació sinèrgica de GAGA, en ser un domini d'oligomerització, o bé aboliria la capacitat de GAGA d'activar, pel fet de ser un domini repressor?

Per poder respondre aquesta qüestió es va construir la proteïna POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA}, formada per la fusió entre el domini POZ de TTK i la forma truncada ΔPOZ_{GAGA}, que li manquen els primers 122 residus corresponents al domini POZ (figura **R.20A**).

El primer que es va analitzar va ser si aquesta proteïna mantenia la capacitat transactivadora de GAGA sobre el promotor *eve stripe 2*, a partir d'assajos transcripcionals a SL2 en presència del vector *reporter* pGL3-*eve* i quantitats creixents del plàsmid de sobreexpressió de POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA} (figura **R.20B**). S'observa que, tot i expressar-se eficientment (figura **R.20C**), POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA} no té cap efecte sobre l'activitat basal del promotor *eve stripe 2*, mentre la sobreexpressió de GAGA en el mateix experiment activa la transcripció a nivells considerables.

Sembla doncs que la conseqüència més directa de la substitució del POZ de GAGA pel POZ de TTK és la pèrdua de la capacitat transactivadora de GAGA. Això indica que les funcions d'aquests dos dominis POZ no estan conservades, tot i presentar un elevat grau d'homologia entre ells.

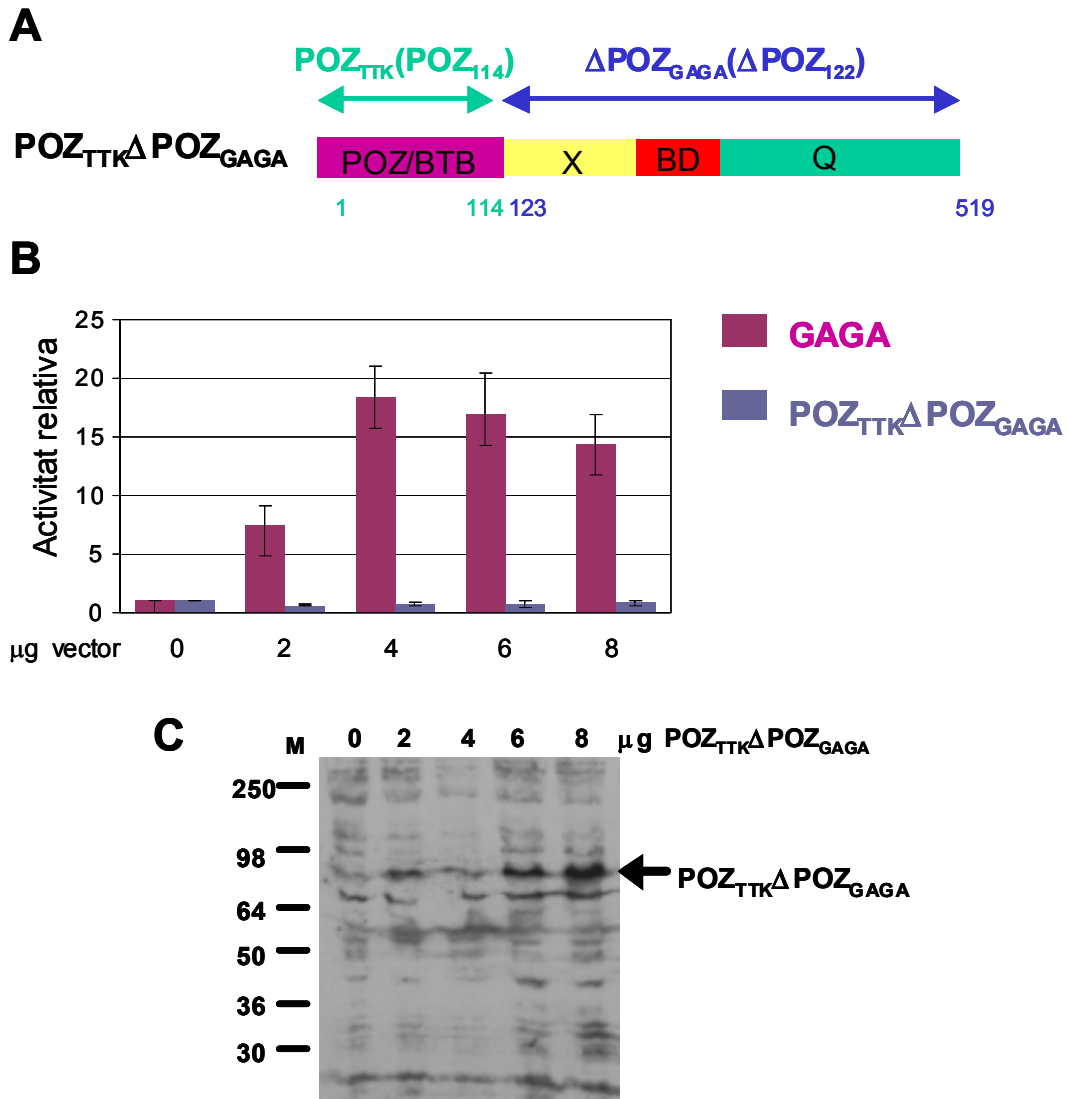


Figura R.20. Estudi de l'activitat transcripcional de la proteïna POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA}. **A.** Representació esquemàtica de la proteïna de fusió POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA}. **B.** Activitat luciferasa detectada en extractes de cèl.lules SL2 transfectades amb 7 µg de plàsmid pGL3-*eve* i les quantitats indicades de plàsmids pActPPA sobreexpressant GAGA o POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA}. Les dades representades corresponen al promig de tres experiments independents. **C.** Anàlisi per *Western blot* dels nivells de sobreexpressió de POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA}. A cada carril es van carregar 50 µL d'extracte de cèl.lules SL2 provinent d'una transfecció amb les quantitats de plàsmid de sobreexpressió de POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA} indicats. La detecció dels nivells de sobreexpressió de POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA} es va fer amb sèrum α-GAGA fraccionat. El carril M correspon al marcador de pes molecular de proteïnes (en kDa).

A continuació es va estudiar si la presència del POZ de TTK conferia a aquesta nova proteïna de fusió la propietat de reprimir l'activació mediada per GAGA. Els resultats es representen a la figura **R.21A**, on s'observa que POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA} reprimeix de manera significativa el promotor *eve stripe 2* activat per GAGA. De fet, s'observa un perfil de repressió bastant similar al descrit per la proteïna POZ_{TTK}, ja que són necessàries quantitats relativament altes del vector de sobreexpressió de POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA} (8 µg) per poder detectar una repressió total.

Per descartar que aquesta repressió fos deguda a una competició pels llocs d'unió a DNA entre GAGA i POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA} (ambdues proteïnes tenen el mateix domini d'unió a DNA), es varen realitzar experiments recíprocs sobreexpressant ΔPOZ_{GAGA}, que com ja s'ha comentat anteriorment no és capaç d'activar però sí d'unir-se al DNA. En aquests experiments es va detectar una lleugera inhibició de l'activació de GAGA en presència d'elevades quantitats de vector de sobreexpressió de ΔPOZ_{GAGA} (figura R.21B), la qual seria perfectament atribuïble a un desplaçament de la proteïna GAGA per competició pels llocs d'unió. No obstant, aquesta inhibició no és comparable a la repressió que s'observa en sobreexpressar POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA}, i per tant es pot afirmar que la capacitat repressora de POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA} no és deguda a una competició amb GAGA pels llocs d'unió al promotor, sinó a la presència del domini POZ de TTK.

Així doncs, la proteïna GAGA es pot convertir en un repressor de la seva pròpia activació en substituir el seu domini POZ pel domini POZ de TTK, donant més suport a la consideració del POZ de TTK com un domini repressor.

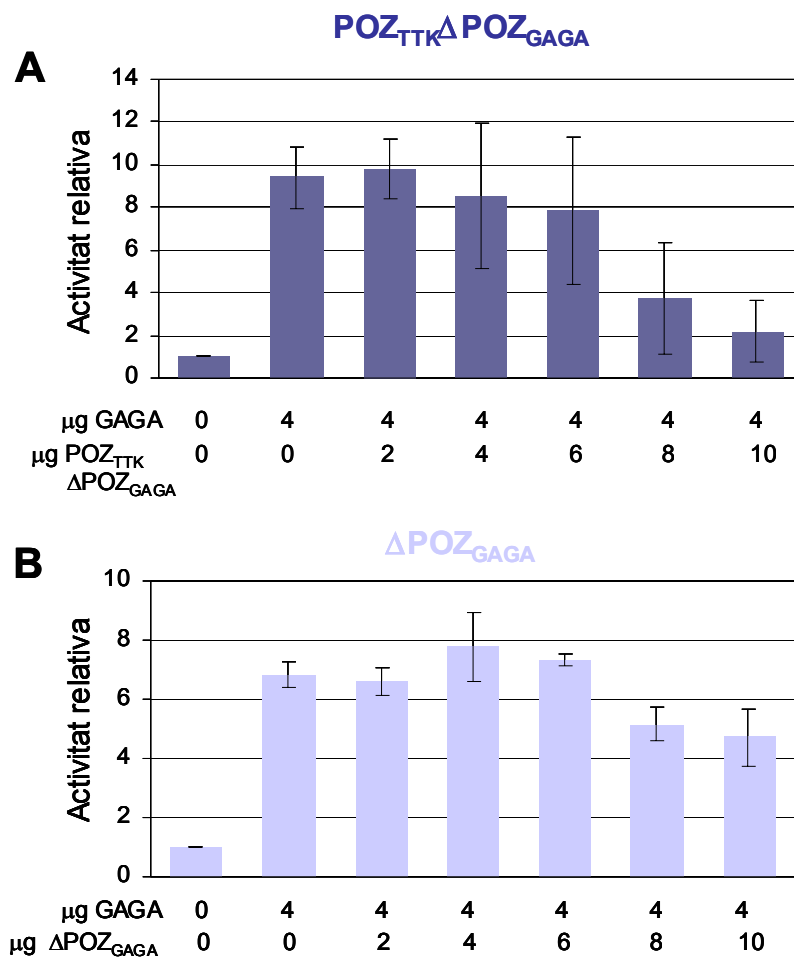


Figura R.21. Estudi dels efectes de la sobreexpressió de les proteïnes POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA} i ΔPOZ_{GAGA} sobre l'activació de GAGA. Cèl.lules SL2 van ser co-transfectades amb 7 μg del vector *reporter* pGL3-*eve*, 4 μg de plàsmid pActPPA-GAGA i les quantitats indicades dels plàsmids de sobreexpressió de POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA} (A) o ΔPOZ_{GAGA} (B). Les dades representades corresponen al promig de tres experiments independents.

El conjunt d'observacions descrites fins al moment demostren que el domini POZ de TTK 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. Per una banda, el fet que el POZ de TTK pugui reprimir en absència d'un domini d'unió al DNA suggereix que aquesta repressió no requereix una unió directa de TTK amb el DNA motlle. I per altra banda, el fet que un domini POZ pugui actuar per ell mateix com a domini repressor convé recordar que també s'ha observat en les proteïnes PLZF i Bcl-6, els dominis POZ de les quals reprimeixen la transcripció mitjançant el reclutament de complexos HDACs al promotor, bé directament (David *et al*, 1998), o bé indirectament a través d'interaccions amb altres co-repressors (Dhordain *et al*, 1997; Hong *et al*, 1997; Huynh i Bardwell, 1998). Tot i que no és un mecanisme generalitzat pels repressors amb dominis POZ, un reclutament d'HDACs mediat pel domini POZ de TTK seria una possibilitat bastant factible per explicar la repressió per TTK.

2.5. Estudi de l'efecte del TSA sobre la repressió per TTK del promotor *eve* activat per GAGA

Amb l'objectiu d'analitzar si el mecanisme de repressió per TTK implica un reclutament d'HDACs al promotor, es va evaluar si la presència del TSA (Trichostatina A), un inhibidor de les HDACs de classe I i II, té algun efecte en l'eficiència de repressió per TTK sobre l'activació del promotor *eve stripe 2* mediada per GAGA.

2.5.1. Efectes del TSA sobre l'acetilació d'histones a SL2

En primer lloc es va estudiar quin és l'efecte que produeix el TSA en els nivells d'acetilació d'histones a cèl.lules SL2, per tal de determinar la seva eficàcia com a inhibidor de les HDACs a SL2.

Seguint el protocol detallat a l'apartat 2.8.5 de Materials i mètodes, 5 plaques de cèl.lules SL2 van ser tractades amb TSA a una concentració final de 0, 100, 200, 300 i 400 nM respectivament. 20 hores després de l'addició del TSA es van recol·lectar les cèl.lules i es van sotmetre a una lisi àcida per extreure les histones. Els nivells d'acetilació de les histones presents en cada mostra es van analitzar per *Western blot* emprant un anticòs específic contra lisines acetilades (figura R.22).

Es pot observar que l'acetilació de les histones H4 s'incrementa significativament a mida que s'ha augmentat la concentració de TSA amb què s'han tractat les cèl.lules. Això significa que les desacetilases que en condicions normals mantenen uns nivells moderats d'acetilació de la histona H4, en presència de TSA es troben inhibides i no poden revertir les activitats acetiltransferasa presents a la cèl.lula, resultant en últim terme en un augment d'histones H4 acetilades.

D'altra banda, semblaria que el TSA té efectes contraris en els nivells d'acetilació de les histones H2A/H2B i H3: en incrementar la concentració de l'inhibidor, s'observa un lleuger decrement en el grau d'acetilació d'aquestes histones (comparar carrils 0 i 400, figura R.22).

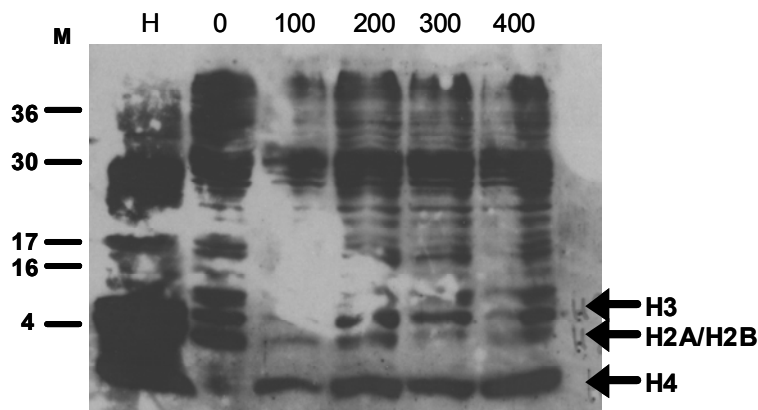


Figura R.22. Anàlisi dels efectes del TSA sobre l'acetilació d'histones a cèl.lules SL2. Es va fer una extracció àcida d'histones de les cèl.lules SL2 tractades amb 0, 100, 200, 300 o 400 nM TSA, i es van analitzar en un gel 18% SDS-PAGE amb un anticòs α -lisines acetylades. El carril H correspon a les histones comercials acetylades. La posició corresponent a marcadors de pes molecular conegut (en kDa) s'indica a l'esquerra.

Així doncs, aquests resultats demostren que l'inhibidor de desacetilases TSA és actiu a cèl.lules SL2, ja que en la seva presència es veuen alterats els nivells d'acetilació de les histones. A més a més, el fet que el grau d'acetilació de la histona H4 estigui significativament incrementat en presència de TSA indica que a les concentracions en què s'ha utilitzat el TSA aquest inhibeix l'activitat almenys d'alguna de les desacetilases d'histones presents a la cèl.lula. De fet, existeixen altres evidències experimentals que també demostrarien que el TSA és actiu a SL2. Concretament, estudis realitzats en aquesta línia cel.lular demostren que el TSA a una concentració de 300 nM inhibeix l'activitat d'Rpd3 (HDAC1), resultant en una parcial abolició de la repressió associada al co-repressor Groucho (Chen *et al*, 1999).

2.5.2. Efecte del TSA en la repressió per TTK de l'activació del promotor *eve stripe 2* mediada per GAGA

Després d'haver comprovat l'eficiència del TSA a SL2, es va estudiar si la presència d'aquest inhibidor de desacetilases afectava la repressió per TTK sobre l'activació del promotor *eve stripe 2* mediada per GAGA.

Es van co-transfectar cèl.lules SL2 amb concentracions creixents del plàsmid de sobreexpressió de TTK en presència de 4 μ g de vector de sobreexpressió de GAGA i 7 μ g de vector *reporter* pGL3-*eve* (condicions que es podrien anomenar "estàndard" de l'efecte de TTK sobre l'activació GAGA). Per fer comparables els resultats obtinguts en presència o absència de TSA, de les dues plaques de cèl.lules que configuraven cada duplicat de

transfecció, només una d'elles va ser tractada amb TSA a una concentració de 300 nM final 20 hores abans de recol·lectar les cèl·lules. Així, en un mateix experiment i en cèl·lules transfectades a partir del mateix precipitat, es pogué determinar l'activitat luciferasa present a l'extracte havent estat en absència o en presència de 300 nM TSA.

Els resultats de l'assaig vénen representats a la figura R.23A. El primer aspecte destacable és la menor eficiència en l'activació de GAGA quan les cèl·lules han estat tractades amb TSA. Tenint en compte els estudis realitzats al nostre laboratori que indiquen que GAGA es pot acetilar almenys *in vitro* (C. Bonet, comunicació personal), es podria pensar que aquesta modificació post-traducciona afecta les propietats activadores de GAGA: concretament, la GAGA en estat acetilat (en presència de TSA) tindria disminuïda la seva capacitat de transactivació. De tota manera, s'ha de tenir en compte que el TSA pot afectar molts processos, i per tant aquesta menor capacitat activadora de GAGA podria ser conseqüència d'un efecte indirecte del TSA.

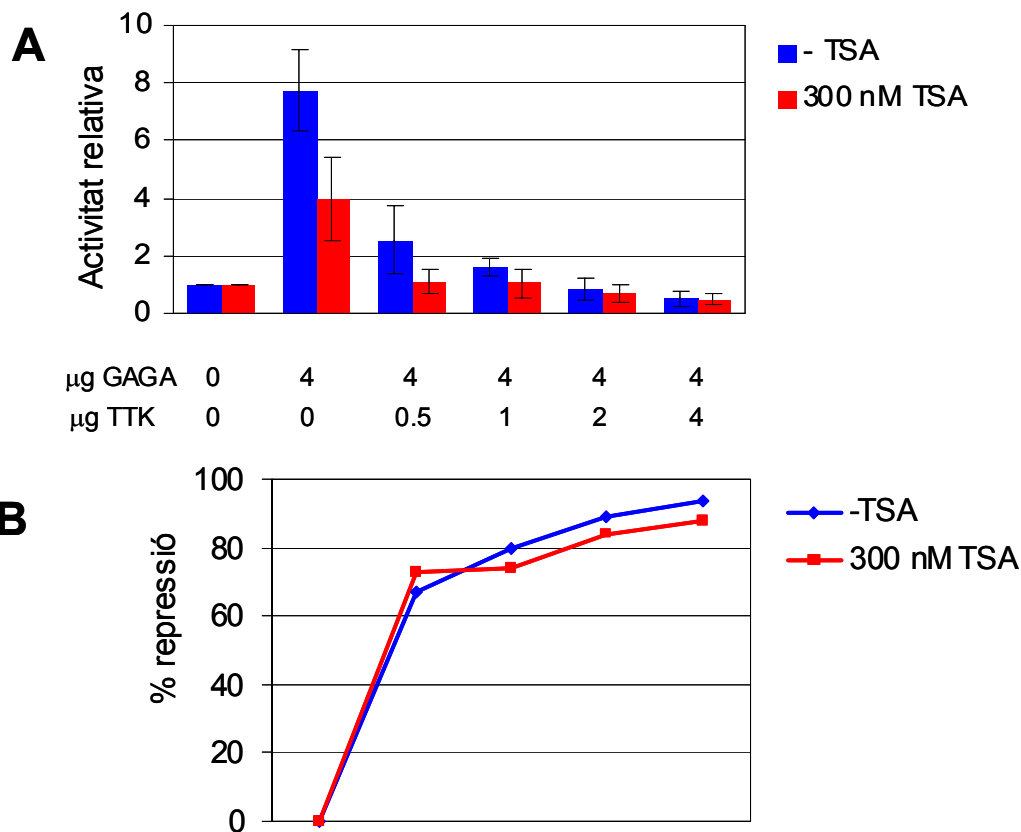


Figura R.23. Efecte del TSA en la repressió per TTK de l'activació del promotor eve stripe 2 mediada per GAGA. **A.** Activitat luciferasa present en extractes de cèl·lules SL2 transfectades amb 7 µg de vector *reporter* pGL3-eve, 4 µg de plàsmid de sobreexpressió de GAGA i les quantitats indicades de plàsmid de sobreexpressió de TTK, no tractades (blau) o tractades amb 300 nM TSA (vermell). Les dades representades corresponen al promig de quatre experiments independents. **B.** Les mateixes dades del panell A representades com a percentatge de repressió respecte la màxima activació obtinguda per cada condició (+ o -TSA).

D'altra banda, la capacitat de TTK de reprimir l'activació d'*eve* mediada per GAGA no semblaria veure's afectada per la presència de TSA, ja que en les dues condicions de treball la sobreexpressió de TTK comporta una reducció significativa de l'activació mediada per GAGA fins a nivells basals (figura **R.23A**). No obstant, el fet que la màxima activació en presència de GAGA estigui força reduïda amb TSA fa una mica més difícil apreciar si la repressió per TTK és tan eficient com en cèl·lules no tractades amb TSA. Per aquesta raó s'ha representat el percentatge de repressió, calculat en funció de l'activació de GAGA en absència de TTK observada en cada cas (a 0 o 300 nM TSA), seguint la següent fórmula:

$$\% \text{ repressió} = 100 - (A_{\text{TTK}}/A_{\text{GAGA}}) \times 100$$

on:

A_{TTK} representa l'activitat luciferasa per una determinada concentració de TTK

A_{GAGA} representa l'activitat luciferasa determinada en absència de TTK

Comparant l'eficiència de repressió en les dues condicions en què s'ha fet l'assaig s'observa que tant sense TSA com a 300 nM TSA, amb 4 µg de vector de sobreexpressió de TTK s'arriba pràcticament al 100% de repressió (figura **R.23B**), confirmant així que la capacitat repressora de TTK és igualment d'eficaç en absència o en presència del TSA. Això significa que la repressió que exerceix TTK sobre l'activació del promotor *eve* stripe 2 mediada per GAGA no requereix d'activitats desacetilases d'histones sensibles al TSA.

No obstant, no es pot descartar la possibilitat de que la funció repressora de TTK involucri un reclutament d'HDACs insensibles al TSA: tot i que en principi el TSA està descrit com un inhibidor de les HDACs de classe I i II (les desacetilases relacionades amb processos transcripcionals), les HDACs II de *Drosophila* no estan molt ben caracteritzades i es desconeix si també obeeixen a aquesta "norma". De fet, estudis molt recents han identificat la dHDAC6 (que seria una HDAC de classe II), i han pogut observar que és insensible a varis inhibidors de desacetilases, entre ells el TSA (Barlow *et al*, 2001).

Així doncs, per tal de determinar si hi ha algun tipus d'activitat desacetilasa d'histones que col·labora amb TTK per reprimir la transcripció, s'haurien de realitzar experiments similars en presència d'inhibidors que tinguessin un espectre d'acció diferent del TSA, com el butirat sòdic, el TPX (trapoxin), etc.

2.6. Determinació de les regions del promotor d'*eve* que medien la repressió per TTK de l'activació mediada per GAGA

Com ja s'ha comentat anteriorment, el fet d'haver trobat una forma de TTK capaç de reprimir en absència del domini d'unió a DNA (el POZ_{TTK}) suggereix que la repressió per TTK no requereix una unió directa al DNA. No obstant, la repressió mediada per POZ_{TTK} semblaria menys eficient que l'observada per les formes que tenen domini d'unió a DNA

(TTK sencer o Δ TTK580), ja que només s'observa en co-transfectar quantitats relativament altes del vector de sobreexpressió de POZ_{TTK} (veure figura **R.18C**). Podria ser doncs, que encara que no sigui estrictament requerit per la repressió, la unió al DNA de TTK incrementés l'eficiència de repressió.

Per tal d'evaluar aquesta hipòtesi, es va estudiar si la repressió per TTK sobre l'activació del promotor *eve stripe 2* mediada per GAGA requereix de la presència de llocs d'unió de TTK, analitzant la capacitat de TTK de reprimir l'activació de GAGA en diferents deleccions del promotor *eve stripe 2*.

Resultats obtinguts en estudis anteriors indicaven que en el promotor *eve stripe 2*, la major part dels llocs d'unió per a GAGA i TTK es concentren a la regió més proximal del promotor, entre les posicions -400 i +1 (Read *et al*, 1990). Concretament, a partir d'assajos de *footprinting* es van identificar en aquesta regió 8 llocs d'unió per GAGA i 4 llocs d'unió per TTK (figura **R.24A**), uns resultats que han estat confirmats en aquest treball amb experiments d'EMSA i de *footprinting* amb DNasa I (veure apartat 3).

Per tal d'analitzar si aquesta regió és suficient per les activitats de GAGA i TTK detectades sobre el promotor sencer, es va deleccionar la regió de l'element *eve stripe 2* més enllà de la posició -413 (figura **R.24A**), i el plàsmid resultant, pGL3-413*eve*, es va co-transfectar amb els vectors de sobreexpressió de les proteïnes GAGA i TTK. Els resultats, representats a la figura **R.24B**, mostren que GAGA pot estimular la transcripció del promotor -413*eve* seguint un perfil d'activació que no és significativament diferent a l'observat pel promotor *eve stripe 2* sencer, assolint una màxima activació de 10 vegades en presència de 8 µg del vector de sobreexpressió de GAGA. D'altra banda, TTK reprimeix l'activació mediada per GAGA en aquest promotor -413*eve* tan eficientment com ho fa en el promotor *eve stripe 2* sencer: en presència de 0.5 µg de vector de sobreexpressió de TTK l'activació de GAGA es veu reduïda a la meitat, i amb 2 µg de vector l'activitat luciferasa present als extractes cel.lulars assoleix els nivells basals.

En el promotor -413*eve*, els quatre llocs d'unió per TTK es troben entre les posicions -400 i -200 (veure figura **R.24A**). Per tant, la repressió observada sobre el promotor -413*eve* no exclou la possibilitat que TTK requereixi unir-se a aquests elements per poder dur a terme la seva activitat repressora. Per aquesta raó, es realitzà una segona delecció sobre el -413*eve* fins a la posició -185, resultant-ne un promotor -185*eve* sense cap lloc d'unió per TTK (corroborat *in vitro* per assajos EMSA i de *footprinting* amb DNasa I, veure apartat 3.2), tot i que encara conserva alguns llocs d'alta afinitat per GAGA (figura **R.24A**).

Consistent amb la presència de llocs d'unió de GAGA en aquesta regió, GAGA activa la transcripció del promotor -185*eve* d'un mode depenent de la quantitat de proteïna sobreexpressada, tal i com ja s'ha descrit per al promotor *eve stripe 2* sencer o la delecció -413*eve* (figura **R.24C**, gràfica esquerra). En aquest cas, la màxima activació és d'unes 15 vegades respecte els nivells basals i es detecta en presència de 4 µg del vector de sobreexpressió de GAGA.

No obstant, el què és més interessant dels resultats obtinguts en aquest assaig és que l'activació del promotor $-185eve$ mediada per GAGA també és reprimida en sobreexpressar TTK (figura **R.24C**, gràfica dreta). A més a més, l'eficiència de repressió de TTK sobre el promotor $-185eve$ sembla bastant similar al què s'ha descrit pels promotors $-413eve$ o *eve stripe 2* sencer, ja que 1-2 μg de vector de sobreexpressió TTK són suficients per observar una repressió total de l'activació mediada per GAGA.

El què ens indiquen doncs aquests resultats és, per una banda, que la interacció de GAGA amb la regió promotora més proximal $-185eve$ és suficient per l'activació del promotor *eve*. A més a més, l'observació de que TTK pot reprimir fins i tot en absència de llocs d'unió al promotor indica que aquesta repressió no requereix unió directa de TTK al DNA, un resultat que seria consistent amb la repressió significativa que es detecta en presència de POZ_{TTK} , al qual li manca domini d'unió al DNA. I de fet, els assajos d'unió *in vitro* de GAGA i TTK al fragment $-185eve$ (veure apartat 3.2) indiquen que TTK, que no es pot unir directament a aquesta regió promotora, podria ser reclutat al promotor a través de la seva interacció amb GAGA.

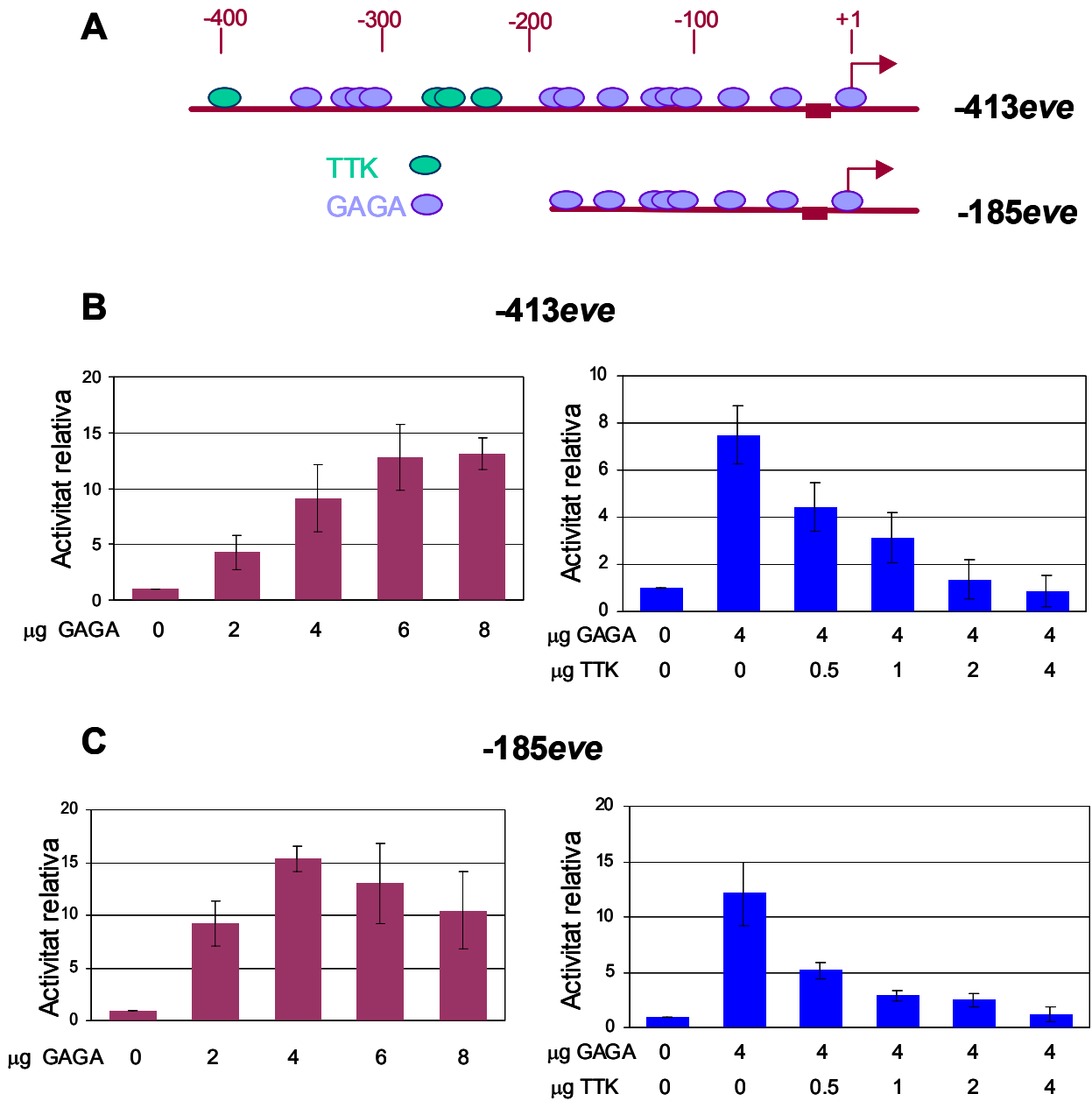


Figura R.24. Estudi de l'efecte de GAGA i TTK sobre l'activitat de diferents deleccions del promotor *eve stripe 2*. **A.** Representació de les deleccions d'*eve* utilitzades en aquests experiments amb la distribució dels llocs d'unió per GAGA (blau) i TTK (verd). Cèl.lules SL2 varen ser co-transfectades amb 7 µg de plàsmids *reporter* amb el gen luciferasa fusionat al promotor -413eve (**B**) o -185eve (**C**) i les quantitats indicades de plàsmids de sobreexpressió de GAGA (esquerra), o bé el mateix vector *reporter* i 4 µg del plàsmid pActPPA-GAGA amb les quantitats creixents indicades del plàsmid de sobreexpressió de TTK (dreta). Les dades representades corresponen al promig de tres experiments independents.

3. ESTUDI DE LA INTERACCIÓ *IN VITRO* DE GAGA I TTK AMB EL PROMOTOR *EVE STRIPE 2*

Els experiments de transfecció a SL2 demostren que TTK pot reprimir la transcripció del promotor *eve stripe 2* activat per GAGA i que aquesta repressió és conseqüència directa de la interacció GAGA-TTK. D'altra banda, la repressió té lloc en absència de llocs d'unió de TTK al promotor (apartat 2.6), i el domini d'unió a DNA no és essencial per la repressió (apartat 2.4.2). Aquests resultats suggereixen que la repressió per TTK no implica una unió directa d'aquest factor a la regió promotora. Es plantegen doncs dues possibilitats: (a) els complexos GAGA-TTK no poden unir-se al DNA, o (b) TTK és reclutat al promotor a través de la interacció amb GAGA.

Per tal de resoldre aquesta qüestió, la tercera part del treball es va centrar en estudiar la unió *in vitro* de les proteïnes recombinants GAGA i TTK sobre el promotor *eve stripe 2*. En primer lloc, es varen realitzar assajos de retardament en gel (EMSA) per determinar a quines regions del promotor s'uneixen amb més afinitat les proteïnes recombinants GAGA i TTK. I finalment, es va analitzar si la presència de TTK té algun efecte en la unió de GAGA a la regió -185*eve* utilitzant les tècniques d'EMSA i de *footprinting* amb DNasa I.

Les proteïnes GAGA-519 i TTK69 utilitzades en aquests experiments varen ser expressades en *E.coli* i purificades tal i com s'ha explicat detalladament a l'apartat 2.3.1 de Materials i mètodes. La purificació es realitzà en tots dos casos mitjançant una cromatografia en columna de níquel (veure Materials i mètodes, apartat 2.3.1.1.C), tot i que en el cas de GAGA fou necessària una primera etapa cromatogràfica amb reïna d'Heparina per millorar l'eficiència de la segona columna (apartat 2.3.1.2.).

La figura **R.25** mostra l'anàlisi per SDS-PAGE de les fraccions obtingudes en les elucions de les columnes de níquel en el darrer pas de purificació de les proteïnes recombinants GAGA i TTK. Les fraccions utilitzades en els experiments *in vitro* varen ser en tots dos casos les corresponents a la primera elució de la columna en ser les més concentrades i presentar un grau de puresa suficient.

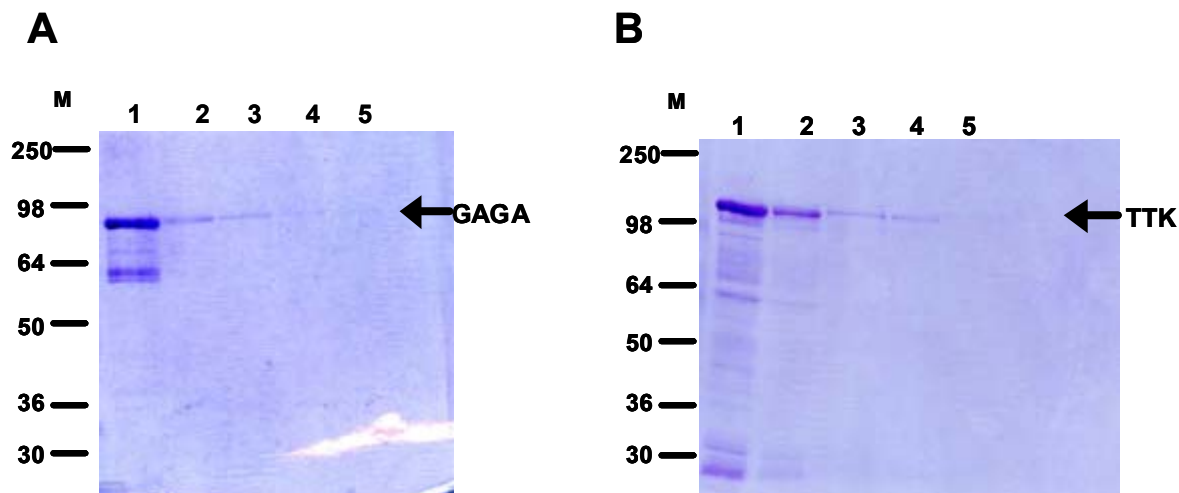


Figura R.25. Proteïnes recombinants GAGA i TTK utilitzades en els experiments d'unió a DNA *in vitro*. 10 μ L de les fraccions corresponents a les cinc elucions (carrils 1-5) obtingudes en les purificacions GAGA (A) i TTK (B) per columnes de níquel (apartat 2.3.1 de Materials i Mètodes) van ser analitzades en gels 10% SDS-PAGE. Les fraccions 1-GAGA i 1-TTK van ser les emprades en els assajos EMSA i de *footprinting* amb DNasa I en ser les més concentrades i presentar un major elevat grau de puresa. Els carrils M corresponen als marcadors de pesos moleculars de proteïnes (en kDa).

3.1. Determinació de les regions del promotor a les quals GAGA i TTK s'uneixen amb més afinitat

Es va analitzar la unió *in vitro* de les proteïnes GAGA i TTK recombinants a diferents regions del promotor *eve stripe 2* mitjançant gels de retardament (EMSA). Per fer aquests assajos es va dividir la regió promotora *eve stripe 2* en tres fragments (figura R.26A): el fragment **proximal**, que correspon a la regió 413 pb més propera al lloc d'inici de la transcripció; el fragment **intermedi**, una regió de 666 pb situada entre les posicions -1079 i -413; i el fragment **distal**, de 680 pb i situat entre les posicions -1759 i -1079 del promotor.

L'afinitat relativa de GAGA i TTK per les regions proximal, intermèdia i distal es va evaluar per la seva capacitat d'unir preferencialment un fragment respecte un altre en assajos de retardament en gel o EMSA. En aquests experiments, quantitats creixents de les proteïnes recombinants GAGA o TTK van ser incubades en presència d'una mescla equimolar de dos fragments marcats radioactivament corresponents bé a les regions 413 i 666, bé a les regions 413 i 680. Les reaccions d'unió es van realitzar en les condicions especificades a l'apartat 2.9.2 de Materials i mètodes, i els complexos formats es van resoldre en gels d'agarosa al 0.8%.

La figura R.26 mostra els retardaments obtinguts quan les dues parelles de fragments varen ser incubades en presència de quantitats creixents de la proteïna GAGA. El primer aspecte destacable en aquests assajos és la formació d'unes bandes de retardament que enlloc de ser discretes, apareixen com a taques difuses al llarg del carril. Aquestes bandes de

retardament corresponen als complexos GAGA-DNA que, degut al caràcter oligomèric de GAGA i a la presència de varis llocs d'unió al fragment, són d'elevat pes molecular i només es poden resoldre en gels d'agarosa al 0.8%, i no en gels d'acrilamida com és habitual pels EMSAs. Resultats similars respecte les propietats d'unió al DNA de GAGA ja s'havien observat en treballs anteriors realitzats al nostre laboratori (Jiménez-García, 1998; Espinás *et al*, 1999).

La representació del percentatge d'unió permet apreciar més fàcilment les diferències d'afinitat que presenta GAGA pels tres fragments. Aquest percentatge d'unió, degut a que no es formen bandes de retardament discretes que es puguin quantificar, s'ha calculat a partir de la intensitat de les bandes corresponents als fragments lliures i suposant que les diferències en la quantitat de radioactivitat present a cada carril són despreciables, seguint la següent fórmula:

$$\% \text{ unió} = 100 - (\text{Ic/I}t) \times 100$$

on:

Ic representa la intensitat de la banda corresponent al fragment lliure en el carril estudiat

It representa la intensitat de la banda corresponent al fragment lliure en el carril 1 (sense proteïna)

S'observa una unió preferencial de GAGA al fragment 413 o proximal, tant en presència del fragment 666 o intermedi (figura **R.26B**) com del fragment 680 o distal (figura **R.26C**). Així, amb 1 µg de proteïna, la unió al fragment 413 és pràcticament total, mentre que la unió als fragments 666 i 680 és d'un 40 i un 50% respectivament. Aquesta elevada afinitat de GAGA per la regió proximal, de fet és força consistent amb els 8 llocs d'unió per aquesta proteïna que ja s'havien descrit entre les posicions -413 i +1 (Read *et al*, 1990).

D'altra banda, pel què fa a la unió als fragments 666 i 680, és important destacar que s'observa sobretot un cop GAGA ja s'ha unit completament al fragment 413 i s'incrementen substancialment les concentracions de proteïna. Així doncs, podria ser que GAGA tingués algun lloc d'unió, tot i que de baixa afinitat, més enllà de la posició -413 en l'element *eve stripe 2*. En qualsevol cas, els resultats obtinguts en els experiments de transfecció, en què s'observa que GAGA activa tant eficientment els promotors -185*eve* o -413*eve* com el promotor *eve stripe 2* sencer, suggereixen que la unió de GAGA als llocs situats a la regió proximal del promotor d'*even-skipped* són suficients per activar-lo.

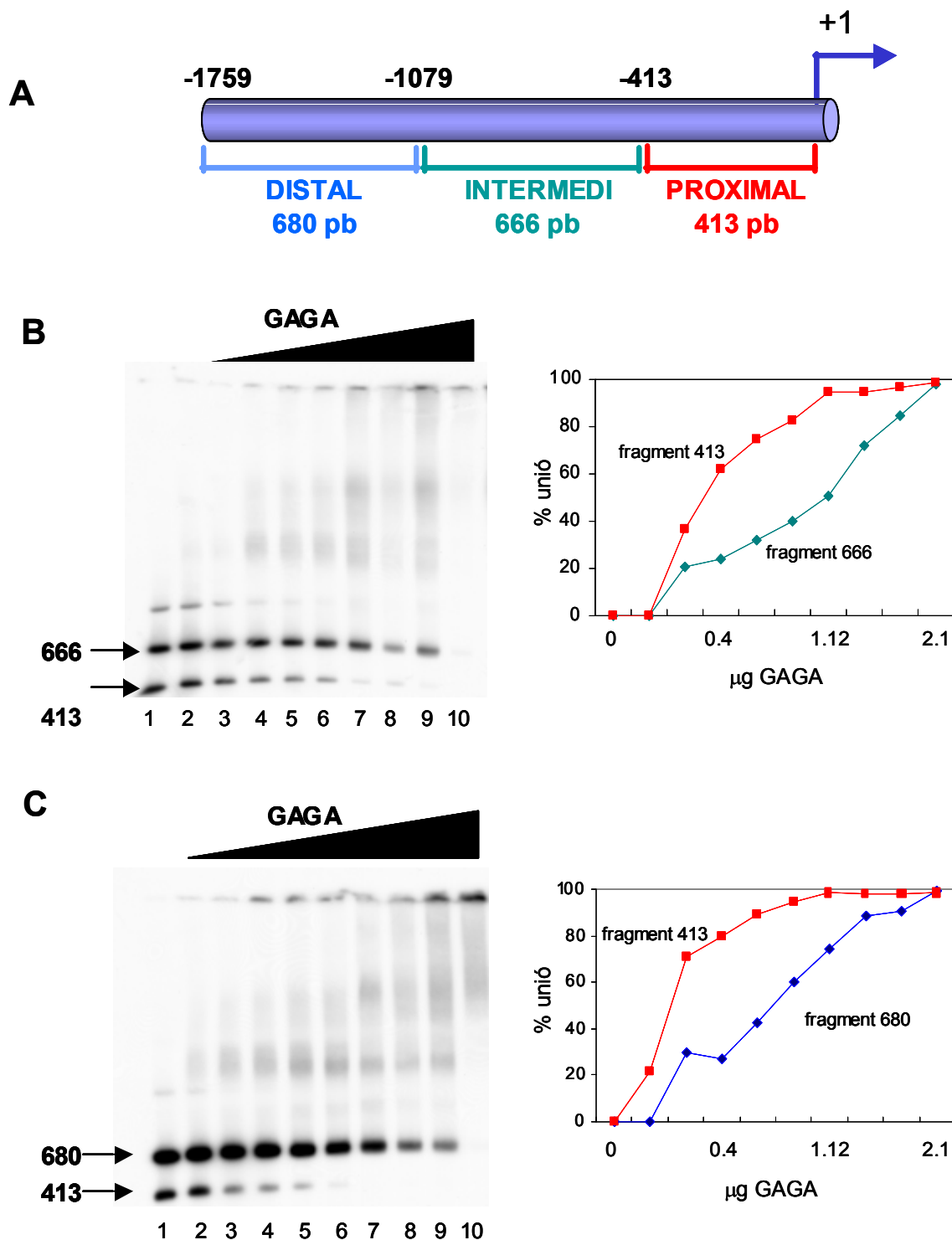


Figura R.26. Anàlisi per EMSA de la unió de GAGA als fragments proximal (413), intermedi (666) i distal (680) del promotor *eve stripe 2*. A. Esquema del promotor amb les regions proximal, intermèdia i distal assenyalades. Els assajos EMSA es van realitzar amb quantitats creixents de GAGA recombinant: 0, 0.14, 0.28, 0.42, 0.56, 0.84, 1.12, 1.4, 1.7 i 2.1 µg (carrils 1-10 respectivament), en presència d'un total de 10 ng dels fragments 666 i 413 (B) o 680 i 413 (C) marcats radioactivament i en quantitats equimolars. Els complexos formats es van analitzar en gels d'agarosa al 0.8%. A les gràfiques de la dreta es representen els percentatges d'unió a cadascun dels fragments en funció de la quantitat de GAGA.

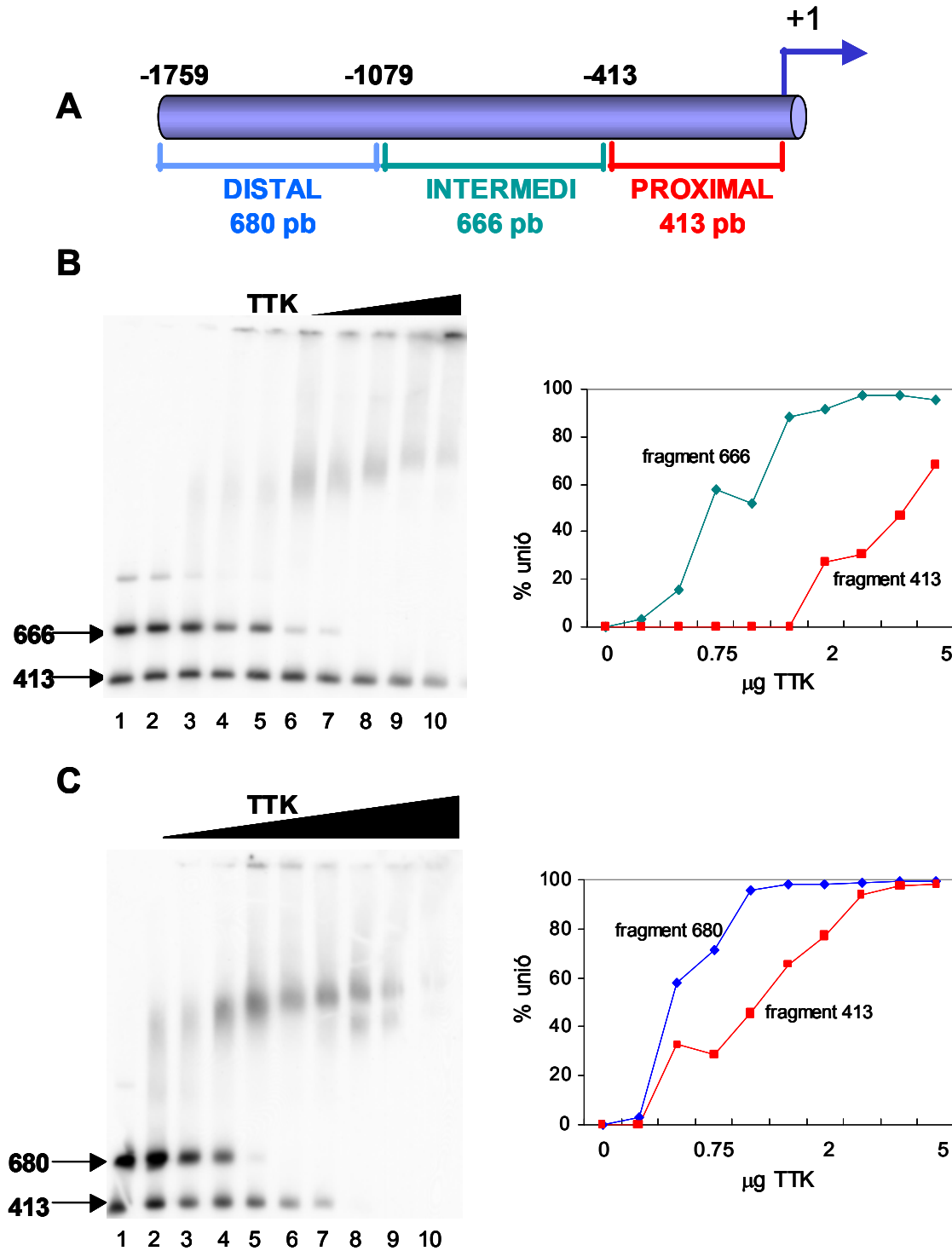


Figura R.27. Anàlisi per EMSA de la unió de TTK als fragments proximal (413), intermedi (666) i distal (680) del promotor *eve stripe 2*. A. Esquema del promotor amb les regions proximal, intermèdia i distal assenyalades. Els assajos EMSA es van realitzar amb quantitats creixents de TTK recombinant: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, i 5 µg (carrils 1-10 respectivament), en presència d'un total de 10 ng dels fragments 666 i 413 (B) o 680 i 413 (C) marcats radioactivament i en quantitats equimolars. Els complexos formats es van analitzar en gels d'agarosa al 0.8%. A les gràfiques de la dreta es representen els percentatges d'unió a cadascun dels fragments en funció de la quantitat de TTK.

Els experiments anàlegs realitzats amb la proteïna TTK es mostren a la figura **R.27**. Igual que pels EMSAs realitzats amb GAGA, no es formen bandes discretes de retardament, indicant que TTK també s'uneix al DNA en forma oligomèrica. En aquest cas, s'observa una situació totalment contrària a la de GAGA, ja que TTK s'uneix preferencialment a les regions intermèdia (**R.27B**) o distal (**R.27C**) respecte la regió proximal. Analitzant els percentatges d'unió (calculats com s'ha explicat per GAGA) s'observa que aproximadament 1 µg de proteïna pot unir quasi completament els fragments 666 o 680, mentre que en aquestes condicions el fragment 413 presenta un percentatge d'unió molt baix. Aquest resultat no deixa de ser sorprenent, si és té en compte que s'havia descrit la presència de 4 llocs d'unió per TTK a la regió 413 (concretament entre les posicions -400 i -200) (Read *et al*, 1990). De fet, el què estaria indicant és que les regions intermèdia i distal contenen més llocs d'unió per TTK o de major afinitat que la regió proximal.

Les repercussions que podria tenir la unió de TTK a la regió compresa entre les posicions -1759 i -413 no deixen de ser una incògnita. En el nostre sistema experimental, on TTK reprimeix l'activació mediada per GAGA independentment del seu domini d'unió a DNA i de la presència de llocs d'unió al promotor, no sembla que aquesta unió sigui important per la seva funció repressora. No obstant, podria ser que en la regulació d'*eve* TTK actués a varis nivells: per una banda, reprimint una activació estimulada per GAGA, en una acció que segons els nostres resultats implica unió directa entre GAGA i TTK; i per altra banda, unint-se directament a les regions distals del promotor, on aleshores segurament actuaria per altres mecanismes.

3.2. Efecte de TTK sobre la unió de GAGA al promotor proximal -185eve

Per poder analitzar si la presència de TTK té algun efecte en la unió de GAGA al DNA, es realitzaren assajos d'EMSA i de *footprinting* amb DNasa I utilitzant com a sonda la regió -185eve del promotor *eve* stripe 2. Aquesta regió, com s'ha comentat anteriorment, conté varis llocs d'unió per GAGA però cap lloc d'unió per TTK (Read *et al*, 1990), i per tant en principi TTK no s'hi pot unir directament. D'aquesta manera, qualsevol alteració en l'activitat d'unió de GAGA pogué ser atribuïble a la seva interacció amb TTK.

3.2.1. Anàlisi per EMSA de la unió de GAGA i TTK a la regió -185eve

En primer lloc, es varen realitzar assajos d'EMSA incubant quantitats creixents de les proteïnes recombinants GAGA o TTK amb el fragment -185eve. Les reaccions d'unió es van dur a terme en les condicions descrites a l'apartat 2.9.2 de Materials i mètodes, i els complexos formats es van resoldre en gels d'agarosa al 0.8%.

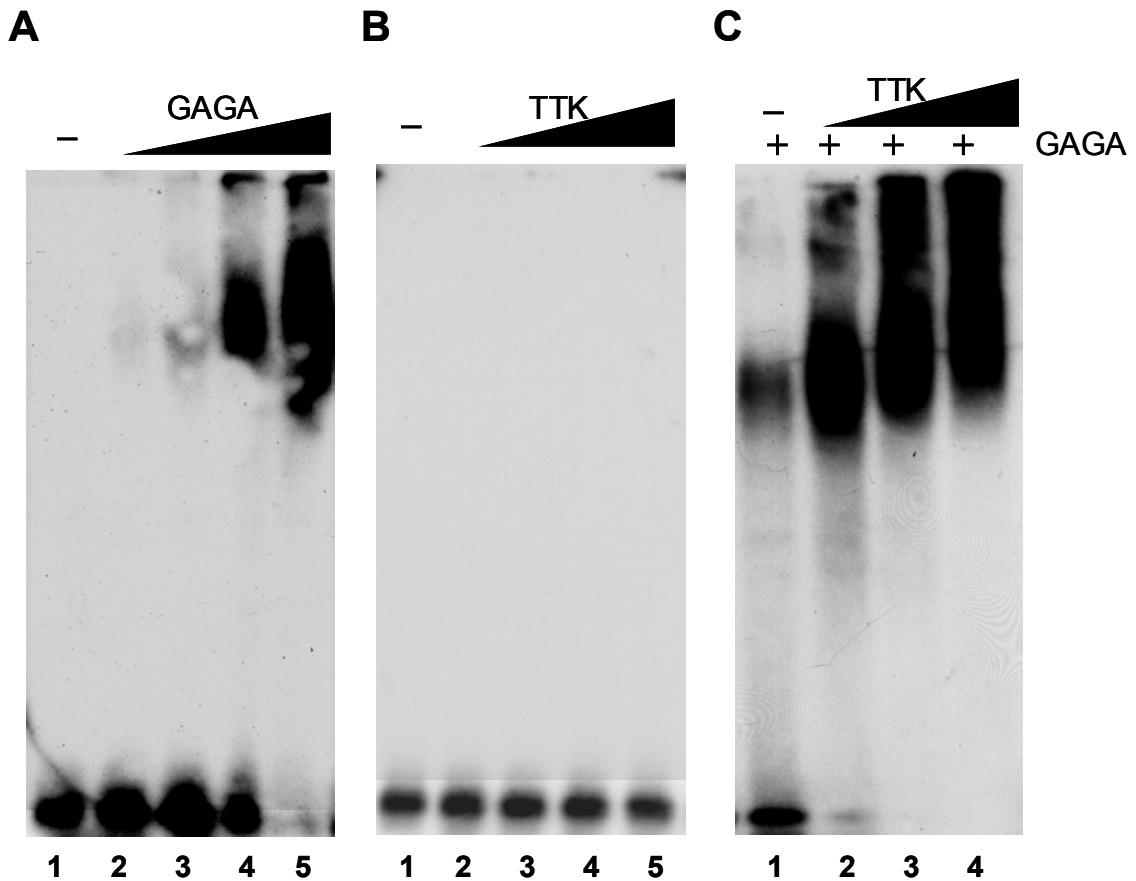


Figura R.28. Anàlisi per EMSA de la unió de GAGA i TTK a la regió -185eve. Les reaccions d'unió es van fer amb 0, 100, 200, 400 i 600 ng (carrils 1-5) de les proteïnes recombinants GAGA (**A**) o TTK (**B**) en presència d'1ng de fragment -185eve marcat radioactivament. En **C**, la unió de 0, 240, 480 i 720 ng de TTK (carrils 1-4) es va fer en presència de 280 ng de GAGA.

Confirmant la presència de llocs d'unió per GAGA en aquesta regió (Read *et al*, 1990), GAGA s'uneix eficientment al fragment -185eve, donant lloc a un retardament total en presència d'uns 600 ng de proteïna recombinant (figura **R.28A**). En canvi, les mateixes quantitats de TTK recombinant no mostren una unió significativa al fragment -185eve (figura **R.28B**). Aquests resultats, al mateix temps que corroboren la presència de llocs GAGA i l'absència de llocs TTK a la regió més proximal del promotor *eve*, ens indiquen que el context escollit és l'adequat per poder analitzar un possible efecte de TTK sobre la unió de GAGA al DNA.

A continuació es van realitzar experiments similars amb quantitats creixents de TTK en presència d'una concentració de GAGA que mostra un 50% d'unió aproximadament (veure figura **R.28C**, carril 1). En aquestes condicions, s'observa una unió total al fragment -185eve a concentracions de TTK que, en absència de GAGA, no donen lloc a un retardament significatiu (carrils 2-4 de la figura **R.28C**). Així, quan les reaccions es fan en presència de 280 ng de GAGA, l'addició de 240 ng de TTK és suficient per obtenir un retard total del fragment -185eve (carril 2 de la figura **R.28C**), mentre que en absència de GAGA, TTK és incapaç d'unir-se significativament a aquest fragment encara que s'emprin concentracions de fins a 600 ng de proteïna (carril 5 de la figura **R.28B**).

Per una banda, aquest resultat indica que TTK no inhibeix la unió de GAGA al DNA, descartant així la possibilitat que la repressió mediada per TTK en els experiments de transfecció fos deguda a que la formació de complexos GAGA-TTK dificultés la unió de GAGA al DNA. Contràriament, l'efecte que s'observa en presència d'ambdues proteïnes suggeriria que els complexos GAGA-TTK són més eficients en la unió al DNA.

De fet, aquestes observacions apunten a que TTK és reclutat per GAGA al promotor $-185eve$ degut a la interacció GAGA-TTK. D'acord amb aquesta hipòtesi, els retards que s'observen en presència de GAGA i TTK semblen tenir un pes molecular més alt que el que s'observa només amb GAGA (comparar carrils 4-5 de **R.28A** amb carrils 3-4 de **R.28C**), suggerint que TTK és present en aquests complexos.

Amb l'objectiu de confirmar aquesta presència de TTK en els complexos de retardament formats, es varen intentar realitzar assajos de "super-shift" emprant anticossos α -GAGA i α -TTK. Però degut al tipus de retardament que presenten GAGA i TTK en forma de "llepissades" enlloc de bandes discretes, sumat a l'elevat pes molecular dels complexos proteïna-DNA formats, fou impossible poder arribar a identificar un canvi de mobilitat electroforètica en presència d'un dels dos anticossos. Per aquesta raó es va optar per analitzar la unió de GAGA i TTK al fragment $-185eve$ mitjançant assajos de *footprinting* amb DNasa I.

3.2.2. Anàlisi per *footprinting* amb DNasa I de la unió de GAGA i TTK a la regió $-185eve$

La tècnica de *footprinting* permet determinar amb precisió a quines regions concretes d'un determinat fragment de DNA s'uneix una proteïna. En el nostre cas, però, l'ús d'aquesta tècnica el què ens permetrà és analitzar si els complexos GAGA-TTK s'uneixen als mateixos llocs GAGA o es generen noves interaccions a la regió $-185eve$.

Els assajos de *footprinting* amb DNasa I es varen realitzar com es descriu a l'apartat 2.9.3 de Materials i mètodes. Les condicions de les reaccions d'unió van ser les mateixes que les dels assajos de retardament en gel, per tal que ambdós resultats poguessin ser comparables.

Primer de tot es varen analitzar les unions de GAGA i TTK per separat sobre el promotor $-185eve$. Com es pot apreciar a la figura **R.29B**, GAGA presenta quatre llocs d'unió a la part central d'aquesta regió que coincideixen exactament amb els llocs d'unió descrits (Read *et al*, 1990), tot i que en el nostre cas les "finestres" de protecció són més extenses (figura **R.29A**). És per aquesta raó que el **lloc d'unió 3**, que està format per 3 elements GAGA molt propers (veure figura **R.29A**), en els nostres assajos apareix com una única "finestra" de protecció que abarca un total de fins a 26 bases al llarg de la seqüència del promotor (figura **R.29B**).

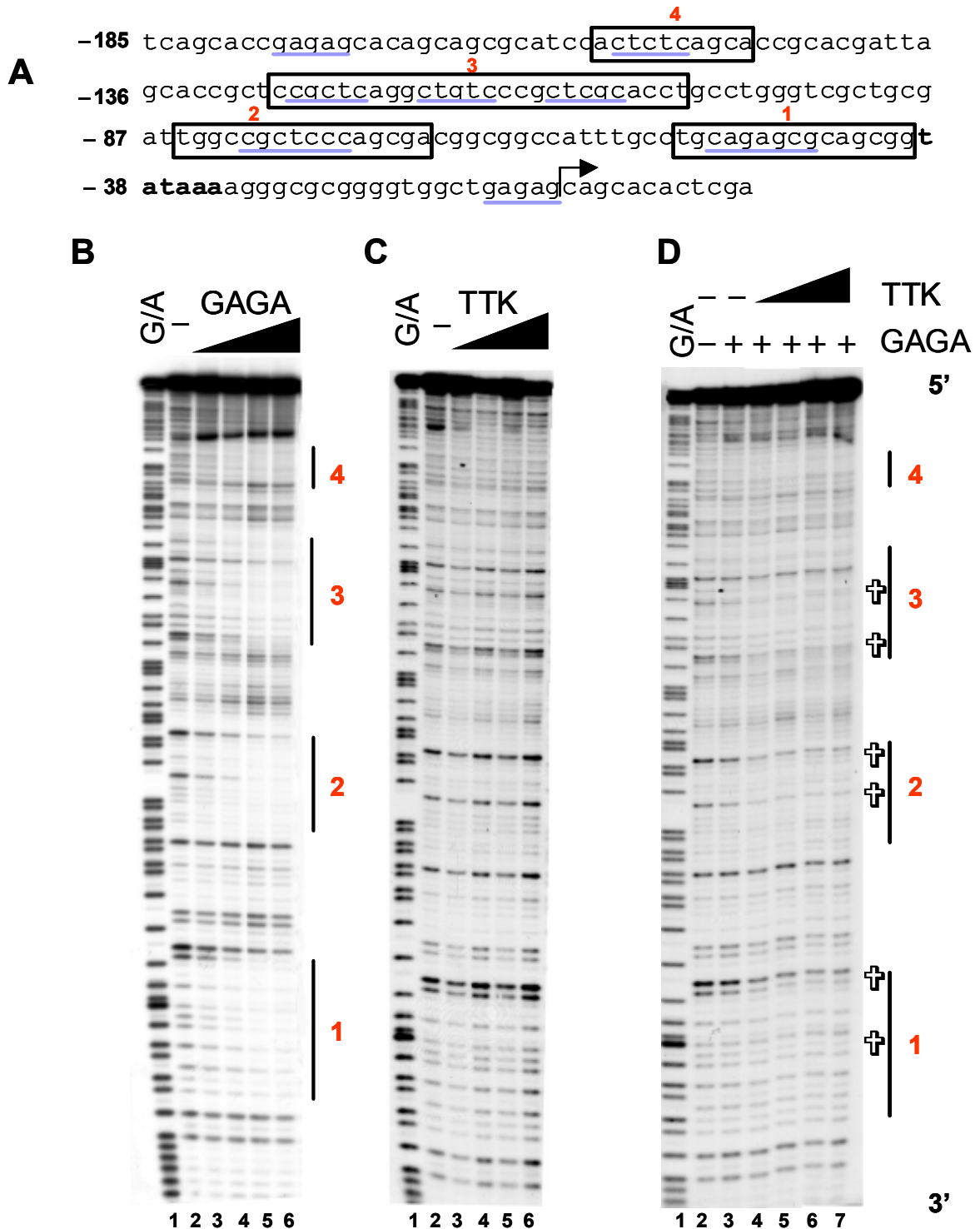


Figura R.29. Anàlisi per footprinting amb DNasa I de la unió de GAGA i TTK a la regió -185eve.
A. Seqüència de la regió -185eve amb les posicions dels llocs d'unió de GAGA prèviament descrits a Read *et al.*, 1990 (blau) i els observats en aquest assaig (negre). 1 ng de fragment -185eve marcat radioactivament i purificat per gel d'acrilamida es va incubar amb 0, 0.2, 0.4, 0.8 i 1.2 µg (carrils 2-6) de proteïnes recombinants GAGA (**B**) o TTK (**C**) en un volum final de 50 µL contenint 1 µg de BSA i 100 ng de DNA d'*E. coli* sonicat i desnaturalitzat. La incubació es va fer durant 20 minuts a 20°C i va donar pas a la digestió amb 0.4 U de DNasa I durant 1 minut a 20°C. Les mostres van ser tractades com s'ha descrit a l'apartat 2.9.3.2 de Materials i mètodes i analitzades en un gel 6% acrilamida: bisacrilamida 8M urea. En les reaccions corresponents al panell **D**, la unió de 0, 0.2, 0.4, 0.8 i 1.2 µg de TTK (carrils 3-7) es va fer en presència de 0.1 µg de GAGA. Les línies 1 corresponen als marcadors G+A preparats com s'ha indicat a l'apartat 2.9.3.1 de Materials i mètodes. Amb línies verticals s'assenyalen les posicions de la seqüència corresponents als llocs d'unió de GAGA (numerats de l'1 al 4 en vermell), i els asteriscs assenyalen els llocs on millor s'observa l'efecte de TTK sobre la unió als llocs GAGA.

De fet, els llocs d'unió de GAGA a l'element *-185eve* descrits són sis (Read *et al*, 1990), però en els nostres assajos els situats a les posicions més distals no es varen poder arribar a identificar pel fet d'estar massa propers als extrems del fragment.

D'altra banda, en els assajos realitzats en presència de TTK no s'observa cap canvi en el patró de digestió amb DNasa I del fragment *-185eve* (figura **R.29C**). Això demostra, un cop més, que TTK no presenta llocs d'unió específics en aquesta regió promotora, confirmant els resultats obtinguts en l'anàlisi per retardament.

Anàlogament als experiments EMSA descrits anteriorment, després d'estudiar la unió de GAGA i TTK separatament es va analitzar la unió de TTK en presència de GAGA. En aquest cas, però, si s'utilitzava una concentració de GAGA que ja s'unia força bé al fragment, les "finestres" formades disminuïen ja des d'un principi la intensitat de les bandes de digestió, essent complicada l'observació de noves reduccions d'intensitat o noves finestres en afegir TTK. Per aquesta raó es va optar per emprar una concentració de GAGA que s'unia molt dèbilment (0.1 µg), essent així més fàcil detectar qualsevol canvi produït per la presència de TTK. La figura **R.29D** mostra el resultat d'aquest assaig, on s'observa que a mida que s'afegeixen quantitats creixents de proteïna TTK, la unió als llocs GAGA es veu significativament incrementada (les posicions on millor es pot apreciar aquest efecte s'han marcat amb asteriscs) i, en canvi, no s'arriba a detectar la formació de cap nou lloc d'unió al llarg de la seqüència del fragment.

Aquests resultats evidencien que la presència de TTK té un efecte significatiu en la unió al DNA de GAGA, que es concreta en una major eficiència d'unió als llocs GAGA. I com que TTK no es pot unir a aquest fragment per si sol, sembla doncs que ha de ser la interacció entre ambdues proteïnes la que permetria portar a TTK fins al DNA.

D'altra banda, el fet que no es detectin nous llocs d'unió al fragment *-185eve* i en canvi sí s'observi una major unió als llocs GAGA està indicant que, una vegada reclutat al DNA, TTK no s'hi uneix de manera inespecífica.

VI.-DISCUSSIÓ GENERAL

1. LA INTERACCIÓ ENTRE GAGA i TTK

El domini POZ/BTB és un domini d'interacció proteïna-proteïna d'uns 120 aminoàcids evolutivament molt conservat des de *Drosophila* a humans. A través d'aquest domini, les proteïnes POZ/BTB poden formar homooligòmers (Chen *et al*, 1995; Li *et al*, 1997; Espinás *et al*, 1999; Katsani *et al*, 1999) i, en alguns casos, heterooligòmers amb altres proteïnes que també tinguin domini POZ (Deltour *et al*, 1999; Kobayashi *et al*, 2000). A més a més, en alguns factors de transcripció s'ha observat que els dominis POZ estan involucrats en interaccions amb co-repressors, com és el cas de Bcl-6 i PLZF (Dhordain *et al*, 1997; Hong *et al*, 1997; Huynh i Bardwell, 1998).

Aproximadament dues tercers parts de les proteïnes amb dominis POZ corresponen a factors de transcripció que tenen dominis d'unió a DNA de tipus dits de zinc (Ahmad *et al*, 1999). Entre aquests hi trobem els factors de transcripció de *Drosophila* GAGA i TTK (Zollman *et al*, 1994), els dominis POZ dels quals presenten un elevat grau d'homologia i fins a un 40% d'identitat (figura **R.1**). A més d'aquesta similitud entre POZes, estudis de co-traducció *in vitro* i immunoprecipitació amb formes truncades de GAGA i TTK apuntaven a una possible una interacció entre aquestes dues proteïnes (Bardwell i Treisman, 1994). Per aquesta raó es va decidir estudiar la interacció entre GAGA i TTK, així com la contribució dels respectius dominis POZ/BTB en aquesta interacció.

Les tres tècniques utilitzades, *GST-pulldown*, co-immunoprecipitació a cèl·lules de *Drosophila* SL2 i assaig de dos híbrids a *S. cerevisiae*, confirmen que GAGA i TTK poden interaccionar tan *in vivo* com *in vitro*.

A més a més, l'anàlisi de la interacció GAGA-TTK a *S. cerevisiae* utilitzant mutants de deleció de les dues proteïnes demostra que aquesta depèn estrictament de la presència d'ambdós dominis POZ. Concretament, aquests dominis apareixen com les regions no només necessàries sinó també suficients perquè pugui tenir lloc la interacció, ja que quan es troben en forma aïllada poden interaccionar i a més molt fortament (figura **R.7B**).

El fet de que el domini POZ, que media l'homooligomerització de GAGA i de TTK, sigui també el responsable de la formació de complexos GAGA-TTK, porta a plantejar quin tipus d'interaccions moleculars suporten la formació d'heterooligòmers GAGA-TTK i si aquestes són diferents de les presents en els respectius homooligòmers.

Per resoldre aquesta qüestió, i servint-nos del fet que els POZes són dominis altament conservats, es varen modelar els dominis POZ de GAGA i TTK a partir de l'estructura cristal·lina del dímer de POZes de PLZF (Pagans *et al*, 2002). Els models van ser generats pel Dr. Ortiz-Lombardía utilitzant el programa MODELLER v4, el qual modela estructures de proteïnes basant-se en una conservació de les restriccions espaials, començant per la conformació de la cadena polipeptídica extesa (Sali i Blundell, 1993). Per fer el modelatge comparatiu dels dominis POZ/BTB de GAGA i TTK, aquestes restriccions es van obtenir a partir de les seqüències alineades dels dominis modelats amb el de PLZF, l'estructura cristal·lina del qual va ser utilitzada com a motlle.

En primer lloc es van modelar les estructures que adoptarien homodímers de GAGA i de TTK i un heterodímer GAGA-TTK utilitzant el dímer de PLZF com a motlle. A la figura **D.1** vénen representats els monòmers modelats en la formació dels dímers mencionats, així com la superfície del monòmer involucrada en la dimerització.

Les estructures modelades de putatius homodímers GAGA-GAGA i TTK-TTK presenten una interfase de dimerització hidrofòbica similar a la del dímer de PLZF, amb una superfície de complementaritat lleugerament menor (Taula **D.1**). Tots els contactes implicats en la dimerització estan conservats i la cavitat central és més hidrofòbica que la de PLZF. Aquests resultats suggereixen que la formació d'homodímers GAGA-GAGA i TTK-TTK involucra interaccions moleculars similars a les observades en el dímer de PLZF. D'altra banda, l'estructura modelada d'un putatiu heterodímer GAGA-TTK mostra molt poques diferències respecte la dels respectius homodímers (Taula **D.1**), indicant que segurament estaria estabilitzat per les mateixes interaccions involucrades en la formació d'homodímers GAGA-GAGA i TTK-TTK.

	DÍMERS		TETRÀMERS	
	D-asa (Å ²) ^a	Sc	D-asa (Å ²) ^b	Sc
PLZF	1972	0.690	700	0.723
GAGA	1847	0.519	759	0.591
TTK	1847	0.596	594	0.463
GAGA/TTK	1899	0.502	653	0.604

^a Per monòmer

^b Per dímer

Taula D.1. Àrea accessible del solvent (D-asa) i superfície de complementaritat (Sc) dels homodímers i homotetràmers dels dominis POZ de PLZF, GAGA i TTK, i de l'heterodímer i heterotetràmer GAGA-TTK.

No obstant, l'homodímer POZ-POZ té unes característiques típiques d'homodímer obligat, pel fet de trobar-se fortament entrellaçat i presentar una extensa interfase de dimerització molt hidrofòbica (figura D.1A). I, de fet, s'ha pogut observar que el dímer POZ-POZ de PLZF és molt estable, i que el seu desplegament implica una transició en dos estats totalment irreversible (Li *et al*, 1997a). En aquest sentit, un putatiu heterodímer GAGA-TTK podria provenir d'un intercanvi de POZes a partir dels respectius homodímers. No obstant, l'extensió i el caràcter altament hidrofòbic dels contactes fa pensar si realment la interacció heteromèrica GAGA-TTK es pot explicar per un model de canvi de POZes entre uns homodímers molt estables.

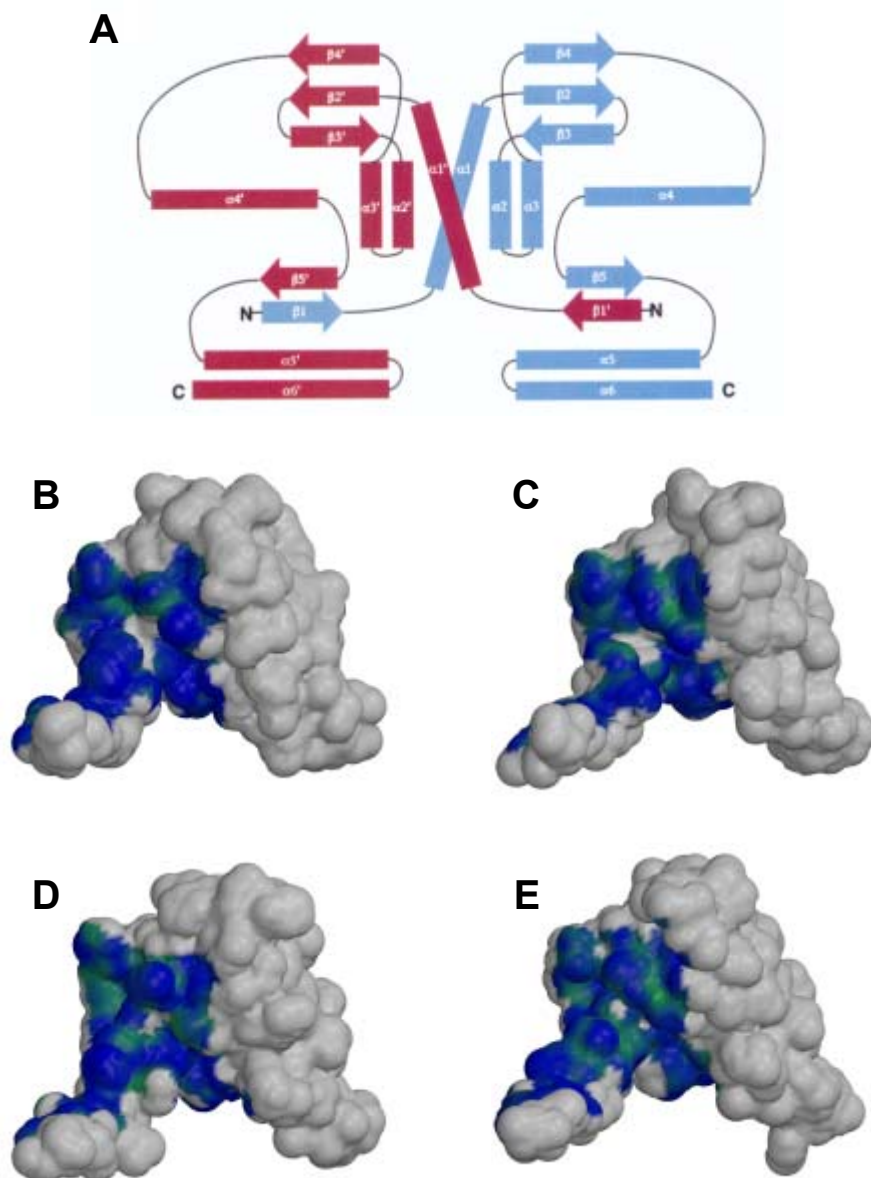


Figura D.1. Model dels dímers de POZes. A. Representació de la topologia del dímer POZ-POZ de PLZF segons l'estructura cristal·lina resolta per Ahmad *et al*, 1999. S'observen les regions de cada monòmer (cadascun representat d'un color diferent) implicades en l'estabilització del dímer. Representació esquemàtica del monòmer del domini POZ de PLZF (B), GAGA (C) o TTK (D) en la formació dels homodímers respectius. El model E representa el monòmer del domini POZ de GAGA en la formació d'un heterodímer GAGA-TTK. Les superfícies d'interacció es troben colorejades: les que presenten més complementaritat en blau, i les que presenten menor complementaritat en verd. Models construïts pel Dr. Ortiz-Lombardía.

Com ja s'ha comentat a la Introducció, les dues estructures cristal·lines resoltes del POZ de PLZF presenten interaccions dímer-dímer conservades. Aquestes interaccions tenen lloc a través de l'extensió de la làmina $\beta 1/\beta 5'$ d'un dímer cap a la mateixa regió del dímer contigu, plegant-se en posició antiparalela (figura D.2). En aquesta estructura, les cadenes principals de la làmina $\beta 1$ de cada dímer estan connectades per vuit ponts d'hidrogen (Ahmad *et al*, 1999; Li *et al*, 1999).

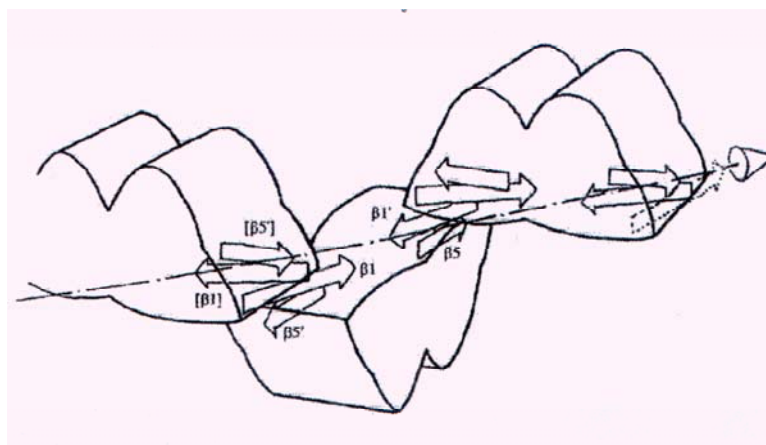


Figura D.2. Representació esquemàtica de la formació d'oligòmers del POZ de PLZF d'alt pes molecular a partir dels homodímers. Les interaccions dímer-dímer observades en el cristall del POZ de PLZF involucren l'extensió de la làmina $\beta 1/\beta 5'$ d'un dímer cap a la mateixa regió del dímer contigu plegant-se en orientació antiparalela (extret de Li *et al*, 1999a).

Es va analitzar si els dominis POZ de GAGA i TTK també conservaven aquestes interaccions dímer-dímer modelant les estructures dels homotetràmers de GAGA i de TTK (figura D.3B i C), així com de l'heterotetràmer GAGA-TTK (figura D.3D). A la taula D.1 es pot observar que els tetràmers modelats tenen una superfície d'interacció i una complementaritat similar de l'homotetràmer de PLZF. Tant l'homotetràmer GAGA-GAGA com l'heterotetràmer GAGA-TTK conserven els 8 ponts d'hidrogen entre les cadenes $\beta 1/\beta 5'$ (figura D.3B i D), mentre que a l'homotetràmer TTK-TTK li'n manquen dos als extrems (figura D.3C).

Aquestes observacions duen a pensar que, més que la formació d'heterodímers, la interacció GAGA-TTK realment estaria involucrant interaccions entre homodímers a través de les làmines $\beta 1/\beta 5'$. En aquest sentit és interessant destacar que la cadena $\beta 5$ que pertany al motiu $\beta 1/\beta 5'$ és totalment idèntic per a GAGA i TTK (veure figura I.8), una característica no compartida amb altres proteïnes amb domini POZ.

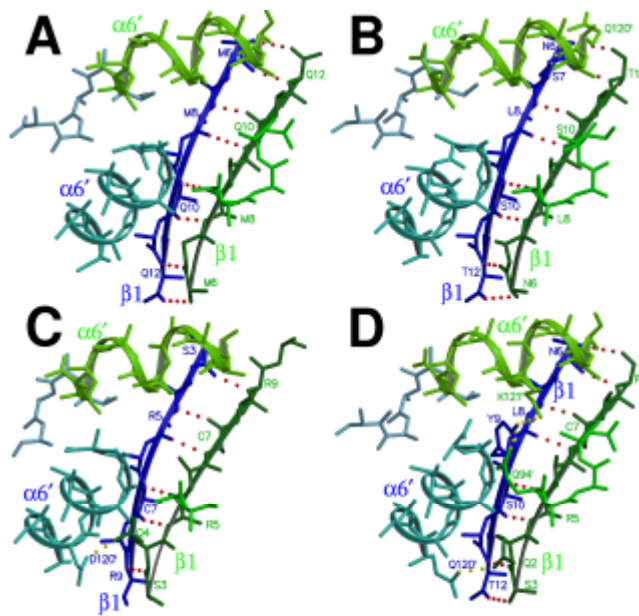


Figura D.3. Model dels tetràmers de POZes. Interacció dímer-dímer a l'estructura cristal·lina del domini POZ de PLZF (A) i als homotetràmers modelats dels dominis POZ de GAGA (B), TTK (C), i a l'heterotetràmer GAGA-TTK (D). Les estructures secundàries de cada dímer es mostren en blau i verd respectivament. Les línies puntejades indiquen els contactes entre les cadenes $\beta 1/\beta 5'$ (vermell) així com possibles contactes de cadenes laterals (groc). Les posicions dels residus més rellevants estan indicades. Models construïts pel Dr. Ortiz-Lombardía.

Per tal de corroborar el model proposat segons el qual la formació d'heterooligòmers GAGA-TTK té lloc a partir dels respectius homodímers i no a partir dels monòmers, es podria pensar en realitzar mutacions puntuals en els residus que formen part de les làmines $\beta 1/\beta 5'$, que són les regions implicades en les interaccions dímer-dímer, i aleshores analitzar si GAGA i TTK encara són capaços d'interaccionar. No obstant, com ja s'ha comentat a la Introducció (apartat 2.1.4), les cadenes $\beta 1/\beta 5'$ no només són les responsables de mediar interaccions entre dímers sinó que també són essencials per a l'estabilització del dímer a través de contactes $\beta 1/\beta 5'/\alpha 6'$ i $\beta 1'/\beta 5/\alpha 6'$ a banda i banda de la part inferior d'aquest (veure figura D.1A) (Ahmad *et al*, 1999). I, de fet, existeixen evidències experimentals que demostren que mutacions en determinats residus de les cadenes $\beta 1/\beta 5'$ dels dominis POZ de Bcl-6 i PLZF impedeixen la seva dimerització (Li *et al*, 1999a; Melnick *et al*, 2000).

Això significa que mutacions puntuals en residus situats a les cadenes $\beta 1/\beta 5'$ dels dominis POZ de GAGA i TTK abolirien tant la formació dels respectius homodímers com la d'un hipotètic heterodímer, i per tant no es detectaria interacció GAGA-TTK tan si aquesta s'estableix a través dels respectius homodímers, com s'ha proposat, com si s'estableix a través dels monòmers.

Aquest model d'interacció GAGA-TTK a través dels respectius homodímers apareix com un model probable que explicaria la formació d'heterooligòmers GAGA-TTK sense obviar la gran estabilitat que presenten els dímers GAGA-GAGA o TTK-TTK.

No obstant, estudis realitzats al nostre laboratori han demostrat que les proteïnes GAGA i TTK recombinants es troben en solució formant homooligòmers d'alt pes molecular (Espinás *et al*, 1999), probablement estabilitzats per aquestes interaccions dímer-dímer. Això suggereix que per poder-se formar heterooligòmers GAGA-TTK primer s'han de desmuntar els multímers de GAGA i de TTK presents. Així, es podria pensar que les afinitats d'interacció entre dos homodímers GAGA-GAGA o dos homodímers TTK-TTK per a la formació dels respectius homooligòmers fossin similars a les que s'estableixen entre un homodímer GAGA-GAGA i un homodímer TTK-TTK per a la formació d'heterooligòmers GAGA-TTK. Si fos així, en entrar en contacte els multímers de GAGA i de TTK tindria lloc una competició d'interaccions entre homodímers fins arribar a una situació d'equilibri en la qual hi hauria homooligòmers de GAGA, homooligòmers de TTK i heterooligòmers. Alternativament, també podria ser que els contactes que s'estableixen entre dos homodímers diferents fossin més forts o més estables que entre homodímers iguals, de tal manera que quan es possessin en contacte GAGA i TTK ràpidament es desmuntarien els homooligòmers i es formarien complexes GAGA-TTK heterogenis. Segons les dades obtingudes del modelatge (figura **D.3**), la formació d'un homotetràmer TTK-TTK només s'estabilitzaria per 6 ponts d'hidrogen, mentre la formació d'un homotetràmer GAGA-GAGA o d'un heterotetràmer GAGA-TTK implicaria la formació de 8 ponts d'hidrogen. Això correspondria a una situació intermèdia entre els dos models proposats, en què els oligòmers més estables serien els homooligòmers GAGA-GAGA i els heterooligòmers GAGA-TTK, i els menys estables els homooligòmers TTK-TTK.

2. L'EFECTE REPRESSOR DE TTK SOBRE L'ACTIVACIÓ DEPENDENT DE GAGA

L'observació d'una interacció entre GAGA i TTK, dos factors de transcripció de *Drosophila* que participen en la regulació de l'expressió gènica durant el desenvolupament embrionari, planteja la qüestió de si aquesta interacció té alguna repercussió en la seva funció reguladora de la transcripció.

La proteïna TTK, d'efecte matern, s'ha proposat que actua com a repressor transcripcional d'alguns gens "pair-rule" durant les primeres fases del desenvolupament embrionari de *Drosophila* (Harrison i Travers, 1990; Read *et al.*, 1990) i, de fet, l'expressió ectòpica de TTK69 durant l'etapa de blastoderm resulta en una abolicció del patró d'expressió en set bandes característic dels gens "pair-rule" *even-skipped* i *fushi tarazu* entre d'altres (Read *et al.*, 1992; Brown i Wu, 1993).

Per la seva banda, la proteïna GAGA, que com TTK també és d'efecte matern, és essencial per al desenvolupament embrionari i se li ha pogut identificar un paper positiu en la regulació d'alguns gens durant els primers estadis del desenvolupament, els promotors dels quals presenten nombrosos llocs d'unió per GAGA (revisat a Soeller *et al.*, 1993). Entre aquests trobem alguns dels gens "pair-rule" que també semblen estar regulats per TTK, com són *even-skipped* i *fushi tarazu* (Read *et al.*, 1990; Topol *et al.*, 1991).

En aquest treball s'ha posat a punt un sistema de transfecció a SL2 per intentar esbrinar quin és el paper de GAGA i TTK i, sobretot, de la interacció GAGA-TTK en la regulació d'*even-skipped*. Els assajos transcripcionals han demostrat que GAGA és capaç d'activar la transcripció de l'element promotor *eve* stripe 2 eficientment, mentre que TTK reprimeix l'activació mediada per GAGA.

Quines conseqüències pot tenir la repressió per TTK de l'activació dependent de GAGA a *Drosophila*?

Respecte l'activació de GAGA sobre el promotor *eve*, és interessant comentar el fet que pugui donar-se només en presència de la regió més proximal del promotor (-185*eve*). Aquesta regió, de fet, no només és necessària per l'expressió de la banda 2 sinó també per la correcta expressió de la resta de bandes de l'embrió (Goto *et al*, 1989; Harding *et al*, 1989), ja que duu els elements mínims que conformen el promotor basal o *core*. Per tant, es podria suggerir que el paper de GAGA com a regulador de l'expressió d'*even-skipped* no estaria restringit a la banda 2, sinó que seria un paper activador més global que afectaria l'expressió de totes les bandes d'*even-skipped*.

En aquest sentit, un potencial paper de TTK com a repressor de l'activació d'*eve* per GAGA durant l'embriogènesi també hauria de repercutir en l'expressió de totes les bandes d'expressió d'*even-skipped*, ja que TTK també és capaç de reprimir el promotor -185*eve* activat per GAGA. I, de fet, això és el que s'observa en els experiments d'expressió ectòpica de TTK, on totes les bandes resulten afectades (Read *et al*, 1992; Brown i Wu, 1993).

Tenint en compte que l'activitat d'unió de GAGA a la regió promotora d'*eve* és constant al llarg de tot el desenvolupament embrionari (Read *et al*, 1990), es podria pensar doncs que la seva funció d'activador transcripcional d'*even-skipped* està modulada per la presència o absència de TTK: així, durant l'estadi de 0-2 hores, la presència de TTK matern reprimiria una possible activació de GAGA sobre *eve*, impeding l'expressió d'aquest gen; a partir de les 2 hores, en què TTK matern ja ha desaparegut, GAGA podria activar eficientment l'expressió d'*eve*, donant lloc al patró típic de 7 bandes de l'embrió blastodèrmic; i finalment, en iniciar-se l'expressió zigòtica de TTK, l'activació d'*eve* per GAGA es tornaria a veure inhibida.

Diverses evidències experimentals donarien suport a aquesta hipòtesi, que de fet també podria fer-se extensiva a la regulació de l'expressió de *fushi tarazu*. Per una banda, el fet que l'expressió d'*even-skipped* i *fushi tarazu* siguin complementàries a la de *tramtrack* tant en l'espai com en el temps (MacDonald, *et al*, 1986; Harrison i Travers, 1990) suggereix que aquests dos gens "pair-rule" no es poden expressar en presència de la proteïna TTK. En aquest sentit, qualsevol alteració en l'expressió de *tramtrack* afectarà directament al patró d'expressió d'*eve* o *ftz*, que és de fet el que s'ha observat en diferents estudis: concretament, a més dels efectes de l'expressió ectòpica de *ttk* ja comentats (Read *et al*, 1992; Brown i Wu, 1993), s'ha vist que un increment de la dosi materna de *ttk* dona lloc a un retard en l'expressió de *ftz*, mentre que una disminució d'aquesta en mutants nuls *ttk^{le11}* incrementa sensiblement l'expressió de *ftz* en un període on normalment no s'expressa (Pritchard i Schubiger, 1996). Això indica que la repressió que exerceix TTK sobre els gens "pair-rule" *even-skipped* i *fushi tarazu* és dependent de dosi, que és el mateix que observem nosaltres en els experiments de transfecció.

Tot i que en el cas de *ftz* primer caldrien fer experiments similars als realitzats amb *eve*, les seves similituds en quant al patró d'expressió així com el paper que exerceixen GAGA i TTK com a reguladors positius i negatius respectivament (Read *et al.*, 1992; Brown i Wu, 1993; Okada i Hirose, 1998), suggereix que aquests dos gens “pair-rule” podrien ser regulats per GAGA i TTK de forma similar.

No obstant, el paper repressor de TTK sobre l'activació mediada per GAGA no semblaria estar limitat a la regulació de gens “pair-rule” com *even-skipped* o *fushi tarazu*. Els nostres assajos transcripcionals a SL2 demostren que la repressió per TTK no requereix de la presència de llocs TTK al promotor (reprimeix l'element promotor $-185eve$), i que a més també pot tenir lloc en un context heteròleg com és el promotor $5\times GAL4hsp70UAS$, tot i que en ambdós casos només s'observa repressió si el promotor està essent activat per GAGA. Això ens està suggerint que aquells promotors que estan essent activats per GAGA són sensibles a una repressió per TTK. Quines repercussions pot tenir aquest fet en les funcions de GAGA i TTK com a factors reguladors de la transcripció *in vivo*? GAGA participa en la regulació de nombrosos gens de *Drosophila*, ja siguin induïbles (*hsp26*, *hsp70...*), constitutius (*actina 5C*, *tubulina*), o involucrats en processos de desenvolupament (*en*, *Kr*, *eve*, *ftz*, *Ubx*) (Soeller *et al.*, 1993), mentre que les funcions repressores de TTK estan associades amb els gens “pair-rule” (Read i Manley, 1992; Brown i Wu, 1993) i amb el desenvolupament neuronal (Lai i Li, 1999; Badenhurst, 2001). Segons aquestes dades, semblaria que els únics gens on ambdues proteïnes participen en la seva regulació són els estudiats, els “pair-rule”. No obstant, s'ha de tenir en compte que de fet no s'ha realitzat cap estudi sobre si TTK té algun paper en la regulació de l'expressió d'aquests altres gens citats que també estan sota el control de GAGA, o anàlogament, sobre si GAGA té alguna funció associada en la regulació del destí de les cèl.lules neuronals. En aquest sentit, seria interessant analitzar si la funció repressora de TTK a nivell del desenvolupament neuronal també depèn d'una activació mediada per GAGA, o bé si en aquest context TTK actua per altres mecanismes.

Quin és el mecanisme de la repressió de TTK sobre l'activació dependent de GAGA?

Una de les qüestions bàsiques d'aquest treball ha estat intentar elucidar per quin mecanisme TTK reprimeix l'activació dependent de GAGA. En un principi vàrem suggerir quatre possibles models que podrien explicar aquesta repressió (figura D.5):

El primer model proposa que la formació d'heterooligòmers GAGA-TTK impediria a GAGA unir-se eficientment al DNA, i en conseqüència poder activar la transcripció (figura D.5A). No obstant, els assajos de retardament i de *footprinting* amb DNasa I amb el

fragment *-185eve*, que conté varis llocs d'unió per GAGA però cap lloc d'unió per TTK, demostren que TTK no inhibeix la unió de GAGA al DNA, sinó que contràriament la seva presència incrementa significativament l'eficiència d'unió als llocs GAGA.

Tenint en compte que TTK per si sol no es pot unir al fragment *-185eve* emprat, aquestes observacions suggereixen que en aquest cas és la formació d'heterooligòmers GAGA-TTK el què permet portar TTK fins al DNA. I d'altra banda, el fet que s'incrementi la unió als llocs GAGA en presència de les dues proteïnes, suggereix que els complexos GAGA-TTK-DNA que es formen són molt estables. Per explicar l'estabilitat d'aquests complexos podem pensar en dues possibilitats (figura D.4).

La primera seria que una vegada reclutat al promotor per GAGA, TTK fos capaç d'unir-se dèbilment i de forma inespecífica al DNA (figura D.4A). Això voldria dir que la major afinitat que mostren els heterooligòmers GAGA-TTK és deguda a la contribució de TTK en unir-se al DNA. Buscant un paral·lelisme en els experiments de transfecció, on s'observa que les formes de TTK capaces d'unir el DNA (TTK sencer o Δ TTK580) són molt més eficients que el POZ_{TTK} en reprimir l'activació de GAGA, seria raonable pensar que la unió de TTK al DNA, tot i que sigui a llocs de baixa afinitat com és el cas del promotor *-185eve*, podria estabilitzar un complex ternari GAGA-TTK-DNA i així incrementar l'eficiència de la repressió.

Una altra possibilitat seria que TTK, degut a la seva interacció amb GAGA a través dels respectius dominis POZ, provoqués una alteració de les propietats d'unió al DNA de GAGA que en últim terme donés lloc a un increment de l'estabilitat del complex GAGA-TTK-DNA (figura D.4B).

Per intentar diferenciar entre aquestes dues possibilitats, seria interessant analitzar si una forma de TTK sense domini d'unió a DNA encara és capaç de promoure un increment de la unió dels complexos GAGA-TTK al promotor.

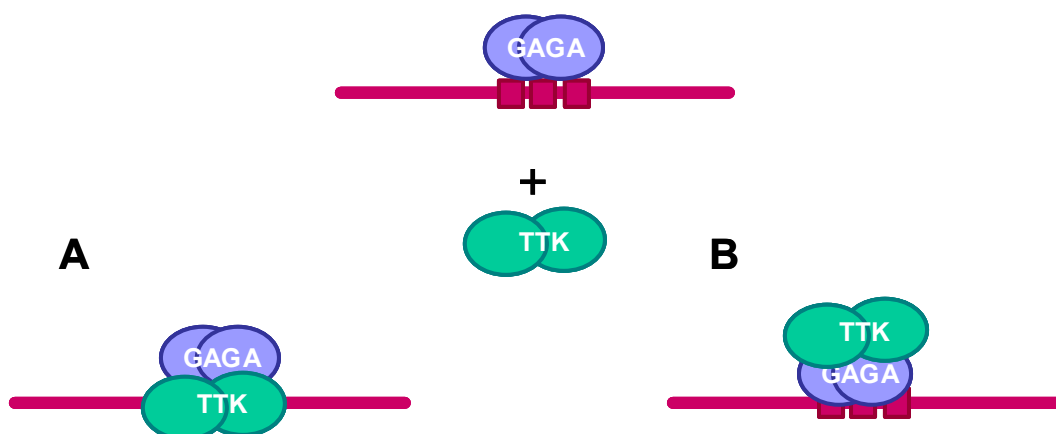


Figura D.4. Models per la unió al DNA dels heterooligòmers GAGA-TTK. A. La formació d'heterooligòmers GAGA-TTK permet a TTK unir-se inespecíficament als llocs GAGA. B. La interacció amb TTK altera les propietats s'unió al DNA de GAGA.

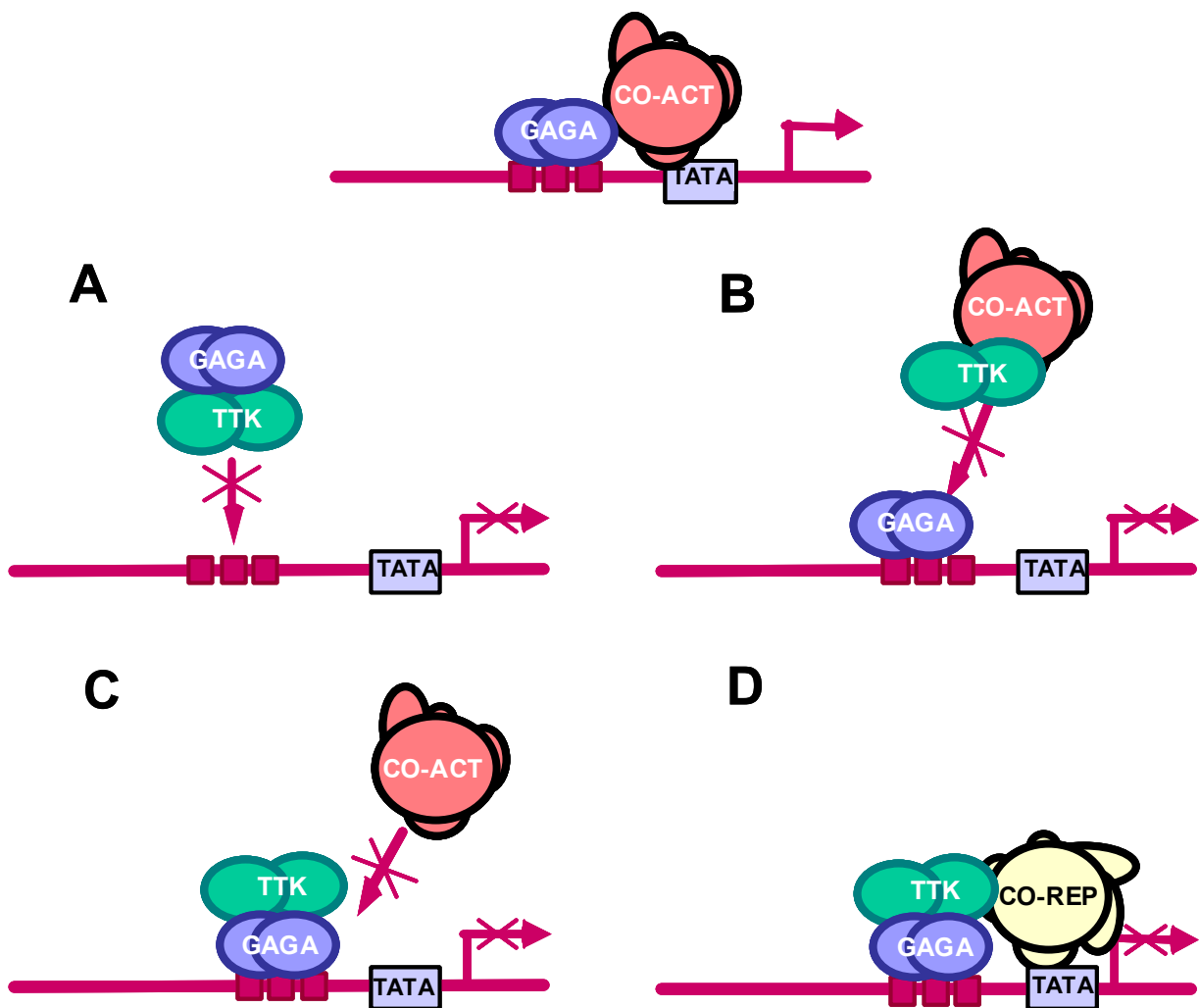


Figura D.5. Possibles models per la repressió de TTK sobre l'activació dependent de GAGA. En un promotor amb llocs d'unió per GAGA, aquesta activa la transcripció. TTK podria reprimir l'activació dependent de GAGA interferint en la unió de GAGA al promotor (A), o interaccionant amb components de la maquinària transcripcional, impedint el seu reclutament al promotor (B). Alternativament, els heterooligòmers GAGA-TTK podrien ser ineficients de reclutar co-activadors necessaris per l'activació de la transcripció (C) o participar activament en el reclutament de complexos co-repressors (D).

En el segon model de repressió, TTK interacciona amb co-activadors o altres components de la maquinària transcripcional, obstaculitzant-ne el seu reclutament al promotor per GAGA (figura D.5B). Com ja s'ha comentat, recentment s'ha pogut observar una interacció entre el domini POZ de TTK i dTAF_{II}155 (Badenhorst *et al*, 2002), per tant sembla factible que TTK pugui associar-se amb components de la maquinària basal i interferir el seu ensamblatge. Però el fet que només s'observi repressió si el promotor està activat per GAGA, i no si es troba en estat basal o en presència d'altres activadors com GAL4Q, està evidenciant que TTK no exerceix la seva funció repressora per ell mateix, sinó que requereix de la presència de GAGA.

A més a més, els experiments de transfecció demostren que la repressió per TTK de l'activació depenent de GAGA requereix de la contribució d'ambdós dominis POZ. Tenint en compte que aquests dominis són els responsables de la interacció GAGA-TTK, els models que apareixen com a més probables són els que impliquen una interacció directa entre aquestes dues proteïnes, a través de la qual, i d'acord amb els resultats d'unió a DNA *in vitro*, GAGA contribuiria al reclutament de TTK al promotor (figura **D.5C i D**). Aquesta hipòtesi estaria d'acord amb l'observació de repressió tot i en absència de llocs d'unió de TTK, així com que el domini POZ de TTK per ell mateix té un efecte repressor significatiu.

D'altra banda, el fet que la proteïna GAGA pugui esdevenir un repressor de la seva pròpia activació quan el seu domini POZ és intercanviat pel POZ de TTK, a més de donar més arguments a la idea que el POZ de TTK és el domini repressor, està indicant que les funcions associades als dominis POZ de GAGA i TTK no estan conservades, tot i presentar un elevat grau d'homologia entre ells (figura **R.1**). En aquest sentit, es podria pensar que són els residus no conservats entre els POZes de GAGA i TTK els que determinen les diferències que s'observen en les respectives funcions. I, de fet, si s'analitza amb detall l'alineament de seqüència dels dominis POZ de GAGA i TTK, s'observen diferències importants en les regions situades al *loop* $\alpha 1$ - $\beta 2$ (residus 23-34) i al *loop* $\alpha 3$ - $\beta 4$ (residus 60-66), els quals formen part, respectivament, del terra i les parets del solc potencial d'unió al lligand (figura **D.6**). Això suggereix que les especificitats d'interacció dels dominis POZ de GAGA i TTK amb proteïnes que s'uneixen a través d'aquest solc poden ser força diferents.

Un cop reclutat al promotor per GAGA, quins mecanismes podrien estar implicats en la repressió per TTK de l'activació depenent de GAGA?

Una possibilitat seria que el reclutament de TTK al promotor interferís en la formació o ensamblatge d'un complex d'activació productiu (figura **D.5C**). En aquest sentit, es podria pensar que la formació d'heterooligòmers GAGA-TTK impedeix que GAGA pugui reclutar molècules co-activadores necessàries perquè tinguin lloc l'activació de la transcripció. Alternativament, aquí també es podria suggerir que una vegada portat al promotor, TTK interaccionés amb dTAF_{II}155 o algun altre component del PIC i disrompés la maquinària basal ensamblada al promotor, resultant en darrera instància en una abolicció del procés transcripcional.

Un bloqueig de la interacció entre GAGA i la maquinària transcripcional correspondria al què s'ha descrit a la Introducció com un mecanisme de *quenching*. No obstant, normalment es considera *quenching* aquella situació en què activadors i repressors s'uneixen a seqüències adjacents, podent-se establir contactes proteïna-proteïna entre ambdues molècules. En el nostre cas, en canvi, l'ordre dels esdeveniments seria diferent, ja que TTK no s'uneix directament al DNA, i més aviat és la interacció amb GAGA el què el permet ser reclutat al promotor.

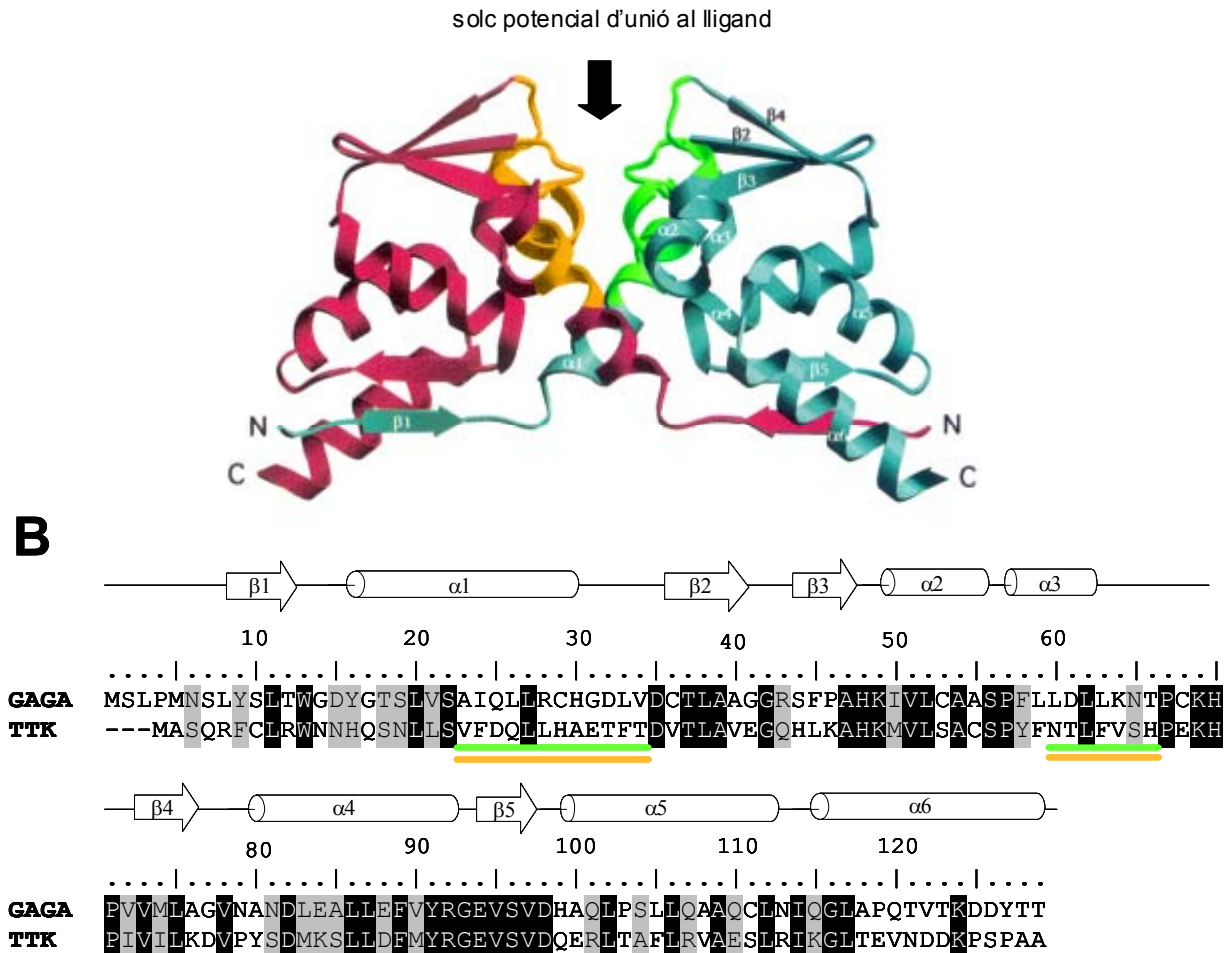


Figura D.6. Posició dels residus no conservats entre els POZes de GAGA i TTK en l'estructura d'un homodímer POZ-POZ. A. Regions no conservades entre els dominis POZ de GAGA i TTK (*loops* α 1- β 2 i α 3- β 4, assenyalats en taronja per un monòmer i verd clar per l'altre) en l'estructura d'un homodímer POZ-POZ. B. Alineament de seqüència dels dominis POZ de GAGA i TTK amb la corresponent estructura secundària segons l'estructura resolta del POZ de PLZF (Ahmad *et al*, 1990).

L'altra possibilitat seria que una vegada portat al promotor, TTK reclutés complexos co-repressors (figura D.5D). Un co-repressor candidat a participar en aquesta repressió és **dCtBP**, pel qual ja s'ha descrit una associació funcional amb TTK en el desenvolupament dels fotoreceptors (Wen *et al*, 2000). Els nostres experiments indiquen que la regió C-terminal de TTK, que conté la seqüència consens d'unió a dCtBP, no és necessària per una repressió eficient. No obstant, alguns estudis apunten a que el domini de TTK responsable de la interacció amb dCtBP és el domini POZ, i que la seqüència P-DLS situada a l'extrem C-terminal tan sols hi tindria una contribució secundària. Si és certa aquesta hipòtesi, i el domini POZ de TTK per ell sol és capaç de mediar un reclutament de dCtBP, podríem pensar en un mecanisme de repressió dirigit pel POZ_{TTK} segons el qual: 1) TTK seria reclutat al promotor per una interacció amb GAGA; 2) una vegada al promotor, podria portar el co-repressor dCtBP; i 3) l'acció repressora de dCtBP resultaria en una inhibició de l'activació mediada per GAGA. En aquests moments s'està intentant analitzar aquesta hipotètica participació de dCtBP en la repressió per TTK sobre l'activació dependent de GAGA emprant el mateix tipus d'assajos transcripcionals a SL2.

Un altre possible candidat a ser reclutat per TTK és **dMi-2**, la subunitat ATPasa del complex remodelador i desacetilasa NuRD. Com ja s'ha comentat, la interacció entre TTK i dMi-2 està mediada per una regió de 100 aa situada just a N-terminal del domini d'unió a DNA de TTK (Murawsky *et al*, 2001). Estudis recents sobre la funció repressora de TTK als òrgans sensorials observen que tot i que el POZ de TTK és el principal responsable d'aquesta activitat, la deleció de la regió a través de la qual s'uneix a dMi-2 disminueix parcialment l'eficiència de TTK com a repressor (Badenhorst *et al*, 2002). De manera similar, els resultats obtinguts en els nostres assajos de transfecció indiquen que en el mutant de deleció de TTK que no conté la regió d'unió a Mi-2 (POZ_{TTK}), la repressió observada és menor que en les formes on hi és present (TTK o Δ TTK580). Tenint en compte aquestes observacions, es podria suggerir un model de repressió per TTK segons el qual l'efecte repressor mediat principalment pel domini POZ de TTK podria ser incrementat en presència de la regió d'unió a dMi-2 per un reclutament del complex NuRD.

Finalment, també és possible que l'acció de TTK impliqui un reclutament directe d'**HDACs** al promotor, no com el cas anterior del complex NuRD en què el reclutament de les desacetilases HDAC1 i 2 tindria lloc indirectament, a través de la subunitat Mi-2. Basant-nos en el precedent que els dominis POZ de Bcl-6 i PLZF poden interaccionar directament amb desacetilases (David *et al*, 1998), és factible pensar que el POZ de TTK pugui actuar per mecanismes similars. En aquest sentit, els assajos de transfecció realitzats en presència de TSA apuntarien a que la repressió per TTK no involucra un reclutament de desacetilases sensibles a aquest inhibidor. No obstant, com ja s'ha dit, no estan del tot establerts els efectes del TSA sobre les HDACs de *Drosophila*, i de fet recentment s'ha identificat una HDACII insensible al TSA, la dHDAC6 (Barlow *et al*, 2001), amb la qual cosa no es pot descartar la possibilitat que en la repressió per TTK hi estiguin participant desacetilases insensibles al TSA. Seria doncs interessant realitzar assajos en presència d'inhibidors que tinguessin un espectre d'acció diferent del TSA, per tal d'analitzar si hi ha algun tipus d'activitat desacetilasa d'histones que col·labora amb TTK per reprimir la transcripció.

En resum, els nostres resultats indiquen que la funció repressora de TTK sobre l'activació depenent de GAGA implica una interacció directa GAGA-TTK i no requereix la unió directa de TTK al DNA. Aquestes observacions suggereixen un model de repressió en el que TTK és reclutat per GAGA al promotor i aleshores exerceix la seva acció repressora. No obstant, els nostres resultats no permeten distingir si la repressió de TTK és deguda a una interferència sobre l'activació depenent de GAGA o a un reclutament actiu de co-repressors.

VII.-CONCLUSIONS

1.- En experiments de co-immunoprecipitació, GST-*pulldowns* i assajos de dos híbrids a *Saccharomyces cerevisiae* s'ha detectat la interacció dels factors de transcripció de *Drosophila* GAGA i TTK.

2.- Els dominis POZ/BTB de GAGA i TTK, responsables de la formació dels homooligòmers GAGA-GAGA i TTK-TTK, són també necessaris i suficients per la interacció GAGA-TTK tant *in vivo* com *in vitro*.

3.- En assajos de transfecció a SL2, l'activació del promotor *eve* stripe 2 mediada per GAGA és reprimida eficientment per TTK. En absència de GAGA, la sobreexpressió de TTK no té cap efecte sobre l'activitat basal del promotor.

4.- La repressió per TTK de l'activació depenent de GAGA requereix la presència dels dominis POZ de GAGA i de TTK, suggerint que és conseqüència de la interacció GAGA-TTK.

5.- El domini POZ de TTK és capaç per si sol de reprimir l'activació mediada per GAGA. Pel contrari, la regió C-terminal de TTK, que conté la seqüència consens P-DLS d'unió al co-repressor dCtBP, no contribueix de manera significativa a la repressió. Aquests resultats identifiquen el domini POZ de TTK com el principal responsable de la repressió.

6.- Consistent amb 5, l'intercanvi del domini POZ de GAGA pel domini POZ de TTK aboleix la capacitat transactivadora de GAGA i converteix la proteïna de fusió POZ_{TTK}ΔPOZ_{GAGA} en un repressor de l'activació depenent de GAGA.

7.- La repressió per TTK de l'activació depenent de GAGA no és inhibible per TSA, suggerint que les HDACs no contribueixen en aquesta repressió. No obstant, no es pot descartar que la repressió per TTK de l'activació depenent de GAGA pugui estar mediada per un reclutament de complexos HDACs insensibles al TSA.

8.- La repressió per TTK de l'activació depenent de GAGA pot tenir lloc en absència de llocs d'unió de TTK al promotor, indicant que la repressió no requereix unió directa de TTK al DNA.

9.- Els assajos d'unió a DNA *in vitro* mostren que TTK no interfereix en la unió de GAGA al DNA. Contràriament, els complexos GAGA-TTK semblen tenir una major afinitat d'unió al DNA.

10.- Aquestes observacions suggereixen un model en el que la repressió per TTK de l'activació depenent de GAGA implica una interacció directa GAGA-TTK a través de la qual GAGA contribueix al reclutament de TTK al promotor. No obstant, els nostres resultats no permeten distingir si l'activitat repressora de TTK és deguda a la interferència en l'activació depenent de GAGA o a un reclutament actiu de co-repressors.

VIII.-REFERÈNCIES

Adelman, K. and Lis, J. (2002). *How does Pol II overcome the nucleosomal barrier?* Mol. Cell **9**, 451-457.

Agianian, B., Leonard, K., Bonte, E., Van der Zandt, H., Becker, P.B. and Tucker, P.A. (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**, 527-544.

Ahmad, K.F., Engel, C.K. and Privé, G.G. (1999). *Crystal structure of the BTB domain from PLZF.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 12123-12128.

Ahringer, J. (2000). *NuRD and Sin3 histone deacetylase complexes in development.* TIG **16**, 351-356.

Aravind, L. and Koonin, E.V. (1999). *Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain.* J. Mol. Biol. **285**, 1353-1361.

Arnosti, D.N., Barolo, S., Levine, M. and Small, S. (1996). *The eve stripe 2 enhancer employs multiple modes of transcriptional synergy.* Development **122**, 205-214.

Badenhorst, P. (2001). *Tramtrack controls glial number and identity in the Drosophila embryonic CNS.* Development **128**, 4093-4101.

Badenhorst, P., Finch, J.T. and Travers, A.A. (2002). *Tramtrack co-operates to prevent inappropriate neural development in Drosophila.* Mech. Dev. **117**, 87-101.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001). *Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromodomain.* Nature **410**, 120-124.

Bannister, A.J., Schneider, R. and Kouzarides, T. (2002). *Histone methylation: dynamic or static?* Cell **109**, 801-806.

Bardwell, V.J. and Treisman, R. (1994). *The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif.* Genes & Dev. **8**, 1664-1677.

Barlow, A.L., van Drunen, C.M., Johnson, C.A., Tweedie, S., Bird, A. and Turner, B.M. (2001). *dSIR2 and dHDAC6: two novel, inhibitor-resistant deacetylases in Drosophila melanogaster.* Exp. Cell Res. **265**, 90-103.

Ben-Porath, I. and Cedar, H. (2002). *Epigenetic cross-talk.* Mol. Cell **9**, 933-935.

Benyajati, C., Mueller, L., Xu, N., Pappano, M., Gao, J., Mosammaparast, M., Conklin, D., Granok, H., Craig, C. and Elgin, S.C.R. (1997). *Multiple isoforms of GAGA factor, a critical component of chromatin structure*. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3345-3353.

Berger, S.L. (2002). *Histone modifications in transcriptional regulation*. *Curr. Op. Gen. & Dev.* **12**, 142-148.

Bhat, K. M., Farkas, G., Karch, F., Gyurkovics, H., Gausz, J. and Schedl, P. (1996). *The GAGA factor is required in the early Drosophila embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division*. *Development* **122**, 1113-1124.

Biggin, M. D. and Tjian, R. (1988). *Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts*. *Cell* **53**, 699-711.

Bird, A.P. and Wolffe, A.P. (1999). *Methylation-induced repression—belts, braces and chromatin*. *Cell* **99**, 451-454.

Björklund, S., Almouzni, G., Davidson, I., Nightingale, K.P. and Weiss, K. (1999). *Global transcription regulators of eukaryotes*. *Cell* **96**, 759-767.

Blau, J., Xiao, H., McCracken, S., O'Hare, P., Greenblatt, J. and Bentley, D. (1996). *Three functional classes of transcriptional activation domains*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2044-2055.

Boube, M., Joulia, L., Cribbs, D.L. and Bourbon, H.-M. (2002). *Evidence for a Mediator of RNA Polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man*. *Cell* **110**, 143-151.

Boyd, J.M., Subramanian, T., Schaeper, U., La Regina, M., Bayley, S. and Chinnadurai, G. (1993). *A region in the C-terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis*. *EMBO J.* **12**, 469-478.

Brent, R., and Ptashne, M. (1985). *A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor*. *Cell* **43**, 729-736.

Brown, J.L., Sonoda, S., Ueda, H., Scott, M.P. and Wu, C. (1991). *Repression of the Drosophila fushi tarazu (ftz) segmentation gene*. *EMBO J.* **10**, 665-674.

Brown, J.L. and Wu, C. (1993). *Repression of Drosophila pair-rule segmentation genes by ectopic expression of tramtrack*. *Development* **117**, 45-58.

Brown, S.A., and Kingston, R.E. (1997). *Disruption of downstream chromatin directed by a transcriptional activator.* Genes & Dev. **11**, 3116-3121.

Brown, S.A., Weirich, C.S., Newton, E.M. and Kingston, R.E. (1998). *Transcriptional activation domains stimulate initiation and elongation at different times and via different residues.* EMBO J. **17**, 3146-3154.

Brown, C.E., Lechner, T., Howe, L. and Workman, J.L. (2000). *The many HATs of transcription coactivators.* TIBS **25**, 15-18.

Burke, L.J. and Baniahmad, A. (2000). *Co-repressors 2000.* FASEB **14**, 1876-1888.

Busturia, A., Lloyd, A., Bejarano, F., Zavortink, M., Xin, H. and Sakonju, S. (2001). *The MCP silencer of the Drosophila Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression.* Development **128**, 2163-2173.

Butler, J.E.F. and Kadonaga, J.T. (2001). *Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs.* Genes & Dev. **15**, 2515-2519.

Cai, H.N., Arnosti, D.N. and Levine, M. (1996). *Long-range repression in the Drosophila embryo.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 9309-9314.

Carey, M. (1998). *The enhanceosoma and transcriptional synergy.* Cell **92**, 5-8.

Carmo-Fonseca, M. (2002). *The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation.* Cell **108**, 513-521.

Chang, C.-C., Ye, B.H., Chaganti, R.S.K. and Dalla-Favera, R. (1996). *BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 6947-6952.

Chen, W., Zollman, S., Couderc, J.-L. and Laski, F.A. (1995). *The BTB domain of bric à brac mediates dimerization in vitro.* Mol. Cell. Biol. **15**, 3424-3429.

Chen, G., Fernandez, J., Mische, S. and Courey, A.T. (1999). *A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor Groucho in Drosophila development.* Genes & Dev. **13**, 2218-2230.

Chi, T. and Carey, M. (1996). *Assembly of the isomerized TFIIA-TFIID-TATA ternary complex is necessary and sufficient for gene activation.* Genes & Dev. **10**, 2540-2550.

Chinnadurai, G. (2002). *CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis.* Mol. Cell. **9**, 213-224.

- Choy, B. and Green, M.** (1993). *Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly*. *Nature* **366**, 531-536.
- Chung, Y.-T. and Keller, E.B.** (1990). *Regulatory elements mediating transcription from the Drosophila melanogaster Actin 5C proximal promoter*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 206-216.
- Colgan, J. and Manley, J.L.** (1992). *TFIID can be rate limiting in vivo for TATA-containing, but not TATA-lacking RNA polymerase II promoters*. *Genes & Dev.* **6**, 304-315.
- Colgan, J., Ashali, H. and Manley, J.L.** (1995). *A direct interaction between a glutamine-rich activator and the N-terminus of TFIIB can mediate transcriptional activation in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2311-2320.
- Collins, T., Stone, J.R. and Williams, A.J.** (2001). *All in the family: the BTB/POZ, KRAB and SCAN domains*. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3609-3615.
- Corona, D.F.V., Längst, G., Clapier, C.R., Bonte, E.J., Ferrari, S., Tamkun, J. W. and Becker, P.B.** (1999). *ISWI is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor*. *Mol. Cell* **3**, 239-245.
- Cosma, M.P., Tanaka, T., and Nasmyth, K.** (1999). *Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter*. *Cell* **97**, 299-311.
- Courey, A.T. and Jia, S.** (2001). *Transcriptional repression: the long and the short of it*. *Genes & Dev.* **15**, 2786-2796.
- Courey, A.T.** (2002). *Cooperativity in transcriptional control*. *Current Biology* **10**, 250-252.
- Croston, G.E., Kerrigan, L.A., Lira, L.M., Marshak, D.R. and Kadonaga, J.T.** (1991). *Sequence-specific antirepression of Histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription*. *Science* **251**, 643-649.
- Croston, G.E., Laybourn, P.J., Paranjape, S.M. and Kadonaga, J.T.** (1992). *Mechanism of transcriptional antirepression by GAL4-VP16*. *Genes & Dev.* **6**, 2270-2281.
- Czermin, B., Schotta, G., Hülsmann, B.B., Brehm, A., Becker, P.B., Reuter, G. and Imhof, A.** (2001). *Physical and functional association of Su(var)3-9 and HDAC1 in Drosophila*. *EMBO Rep.* **2**, 915-919.

Daniel, J.M. and Reynolds, A.B. (1999). *The Catenin p120^{ctn} interacts with kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor.* Mol. Cell. Biol. **19**, 3614-3623.

David, G., Alland, L., Hong, S.-H., Wong, C.-W., DePinho, R.A. and Dejean, A. (1998). *Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein.* Oncogene **16**, 2549-2556.

Deltour, S., Guerardel, C. and Leprince, D. (1999). *Recruitment of SMRT/NCo-R-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: The case of HIC-1 and γ FBP-B.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 14831-14836.

Deltour, S., Pinte, S., Guerardel, C., Wasyluk, B. and Leprince, D. (2002). *The human candidate tumor suppressor gene HIC1 recruits CtBP through a degenerate GLDLSKK motif.* Mol. Cell. Biol. **22**, 4890-4901.

Deuring, S., Fanti, L., Armstrong, J.A., Sarte, M., Papoulas, O., Prestel, M., Daubresse, G., Verardo, M., Moseley, S.L., Berlocolo, M., Tsukiyama, T., Wu, C., Pimpinelli, S. and Tamkun, J.W. (2000). *The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo.* Mol. Cell **5**, 355-365.

Dhordain, P., Albagli, O., Lin, R.L., Ansieau, S., Quief, S., Leutz, A., Kerckaert, J.-P., Evans, R.M. and Leprince, D. (1997). *Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 10762-10767.

Dong, S., Zhu, J., Reid, A., Strutt, P., Guidez, F., Zhong, H.-J., Wang, Z.-Y., Licht, J., Waxman, S., Chomienne, C., Chen, Z., Zelent, A. and Chen, S.-J. (1996). *Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor- α fusion protein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 3624-3629.

Eberharter, A. and Becker, P.B. (2002). *Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin.* EMBO Rep. **3**, 224-229.

Ellwood, K., Huang, W., Johnson, R. and Carey, M. (1999). *Multiple layers of cooperativity regulate enhanceosome-responsive RNA polymerase II transcription complex assembly.* Mol. Cell Biol. **19**, 2613-2623.

Emerson, B. (2002). *Specificity of gene regulation.* Cell **109**, 267-270.

Espinás, M.L., Jiménez-García, E., Vaquero, A., Canudas, S., Bernués, J. and Azorín, F. (1999). *The N-terminal POZ domain of GAGA mediates the formation of oligomers that bind DNA with high affinity and specificity.* J. Biol. Chem. **274**, 16461-16469.

Espinás, M.L., Canudas, S., Fanti, L., Pimpinelli, S., Casanova, J. and Azorín, F. (2000). *The GAGA factor of Drosophila interacts with SAP18, a Sin3-associated polypeptide.* EMBO Rep. **1**, 253-259.

Evans, R., Fairley, J.A., and Roberts, S.G. (2001). *Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB.* Genes & Dev. **15**, 2945-2949.

Fairall, L., Harrison, S.D., Travers, A.A. and Rhodes, D. (1992). *Sequence-specific DNA binding by a two zinc finger peptide from the Drosophila melanogaster Tramtrack protein.* J. Mol. Biol. **226**, 349-366.

Fairall, L., Schwabe, J.W.R., Chapman, L., Finch, J.T. and Rhodes, D. (1993). *The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition.* Nature **366**, 483-487.

Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H. and Karch, F. (1994). *The Thritorax-like gene encodes the Drosophila GAGA factor.* Nature **371**, 806-808.

Farkas, G., Leibovitch, B.A., and Elgin, S.C.R. (2000). *Chromatin organization and transcriptional control of gene expression in Drosophila.* Gene **253**, 117-136.

Featherstone, M. (2002). *Coactivators in transcription initiation: here are your orders.* Curr. Op. Gen. & Dev. **12**, 149-155.

Fischle, W., Dequiedt, F., Fillion, M., Hendzel, M.J., Voelter, W. and Verdin, E. (2001). *Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo.* J. Biol. Chem. **276**, 35826-35835.

Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M.J., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Voelter, W. and Verdin, E. (2002). *Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/NCo-R.* Mol. Cell **9**, 45-57.

Flores-Saaib, R.D., and Courey, A.T. (2000). *Analysis of Groucho-histone interactions suggests mechanistic similarities between Groucho- and Tup1-mediated repression.* Nucleic Acids Res. **28**, 4189-4196.

Flores-Saaib, R.D., Jia, S. and Courey, A.T. (2001). *Activation and repression by the C-terminal domain of Dorsal*. *Development* **128**, 1869-1879.

Francstel, C., Schübeler, D., Martin, D.I.K. and Groudine, M. (2000). *Nuclear compartmentalization and gene activity*. *Nat. Rev. in Mol. Cell Biol.* **1**, 137-143.

Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H. and Levine, M. (1987). *Characterization and localization of the even-skipped protein of Drosophila*. *EMBO J.* **6**, 749-759.

Fujioka, M., Emi-Sarker, Y., Yusibova, G.L., Goto, T. and Jaynes, J.B. (1999). *Analysis of an even-skipped rescue transgene reveals both composite and discrete neuronal and early blastoderm enhancers, and multi-stripe positioning by gap gene repressor gradients*. *Development* **126**, 2527-2538.

Goll, M.G. and Bestor, T.H. (2002). *Histone modification and replacement in chromatin activation*. *Genes & Dev.* **16**, 1739-1742.

Goto, T., Macdonald, P. and Maniatis, T. (1989). *Early and late periodic patterns of even skipped expression are controlled by distinct regulatory elements that respond to different spatial cues*. *Cell* **57**, 413-422.

Granok, H., Leibovitch, B.A., Shaffer, C.D., and Elgin, S.C.R. (1995). *Ga-ga over GAGA factor*. *Current Biology* **5**, 238-241.

Greenberg, A.J. and Schedl, P. (2001). *GAGA factor isoforms have distinct but overlapping functions in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8565-8574.

Grewal, S.I. and Elgin, S.C.R. (2002). *Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure*. *Curr. Op. Gen. & Dev.* **12**, 178-187.

Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Ciocco, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F.F., Zamir, I., Seiser, C., Grignani, F., Lazar, M.A., Minucci, S. and Pelicci, P.G. (1998). *Fusion proteins of the retinoic acid receptor- α recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia*. *Nature* **391**, 815-818.

Gromoller, A. and Lehming, N. (2000). *Srb7p is a physical and physiological target of Tup1p*. *EMBO J.* **19**, 6845-6852.

Guenther, M.G., Lane, W.S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M.A. and Shiekhatter, R. (2000). *A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD-repeat protein linked to deafness*. *Genes & Dev.* **14**, 1048-1057.

Hagstrom, K., Muller, M. and Schedl, P. (1997). *A Polycomb and GAGA dependent silencer adjoins the Fab-7 boundary in the Drosophila Bithorax complex*. *Genetics* **146**, 1365-1380.

Hampsey, M. and Reinberg, D. (1999). *RNA polymerase as a control panel for multiple coactivator complexes*. *Curr. Op. Gen. & Dev.* **9**, 132-139.

Han, K. and Manley, J.L. (1993). *Transcriptional repression by the Drosophila Even-skipped protein: definition of a minimal repression domain*. *Genes & Dev.* **7**, 491-503.

Han, W., Yu, Y., Altan, N. and Pick, L. (1993). *Multiple proteins interact with the fushi tarazu proximal enhancer*. *Mol. Cel. Biol.* **13**, 55449-5559.

Han, W., Yu, Y., Su, K., Kohanski, R.A. and Pick, L. (1998). *A binding site for multiple transcriptional activators in the fushi tarazu proximal enhancer is essential for gene expression in vivo*. *Mol. Cel. Biol.* **18**, 3384-3394.

Harding, K., Hoey, T., Warrior, R. and Levine, M. (1989). *Autoregulatory and gap genes response elements of the even-skipped promoter of Drosophila*. *EMBO J.* **8**, 1205-1212.

Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Harrison, S.D. and Travers, A.A. (1990). *The tramtrack gene encodes a Drosophila finger protein that interacts with the ftz transcriptional regulatory region and shows a novel embryonic expression pattern*. *EMBO J.* **9**, 207-216.

Hassan, A., Neely, K. and Workman, J.L. (2001). *Histone acetyltransferase complexes stabilize SWI/SNF binding to promoter nucleosomes*. *Cell* **104**, 817-827.

He, L.-Z., Guidez, F., Tribioli, C., Peruzzi, D., Ruthardt, M., Zelent, A. and Pandolfi, P.P. (1998). *Distinct interactions of PML-RAR α and PLZF-RAR α with co-repressors determine differential responses to RA in APL*. *Nat. Gen.* **18**, 126-135.

Hirose, Y. and Manley, J.L. (2000). *RNA polymerase II and the integration of nuclear events*. *Genes & Dev.* **14**, 1415-1429.

Hong, S.-H., David, G., Wong, C.-H., Dejean, A. and Privalsky, M.L. (1997). *SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor α (RAR α) and PLZF-RAR α oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 9028-9033.

Horard, B., Tatout, C., Poux, S. and Pirrota, V. (2000). *Structure of a Polycomb response element and in vitro binding of Polycomb group complexes containing GAGA factor*. Mol. Cel. Biol. **20**, 3187-3197.

Huynh, K.D. and Bardwell, V.J. (1998). *The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT*. Oncogene. **17**, 2473-2484.

Huynh, K.D., Fischle, W., Verdin, E. and Bardwell, V.J. (2000). *BCoR, a novel corepressor involved in Bcl-6 repression*. Genes & Dev. **14**, 1810-1823.

Imbalzano, A.N., Zaret, K. S. and Kingston, R.E. (1994). *Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA*. J. Biol. Chem. **11**, 8280-8286.

Jackson, S.P. and Tjian, R. (1988). *O-glycosilation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation*. Cell **55**, 125-133.

Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001). *Translating the Histone Code*. Science **293**, 1074-1080.

Jiang, J., Hoey, T. and Levine, M. (1991). *Autoregulation of a segmentation gene in Drosophila: combinatorial interaction of the even-skipped homeo box protein with a distal enhancer element*. Genes & Dev. **5**, 265-277.

Jiménez, G., Paroush, Z. and Ish-Horowicz, D. (1997). *Groucho acts as a corepressor for a subset of negative regulators, including Hairy and Engrailed*. Genes & Dev. **11**, 3072-3082.

Jiménez-Garcia, E. (1998). *Interacción de la proteína GAGA de Drosophila con las secuencias homopurina-homopirimidina d(GA·TC)_n*. Tesi doctoral. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

Johnson, A.D. (1995). *The price of repression*. Cell **81**, 655-658.

Johnson, K.M., Wang, J., Smallwood, A., Arayata, C. and Carey, M. (2002). *TFIID and human mediator coactivator complexes assemble cooperatively on promoter DNA*. *Genes & Dev.* **16**, 1852-1863.

Kadosh, D., and Struhl, K. (1998). *Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo*. *Mol. Cel. Biol.* **18**, 5121-5127.

Kamashev, D.E., Balandina, A.V. and Karpov, V.L. (2000). *Tramtrack Protein-DNA interactions*. *J. Biol. Chem.* **275**, 36056-36061.

Kao, H.-Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kinter, C.R., Evans, R.M. and Kadesch, T. (1998). *A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway*. *Genes & Dev.* **12**, 2269-2277.

Katsani, K.R., Nasser Hajibagheri, M.A., and Verrijzer, C.P. (1999). *Co-operative DNA binding by GAGA transcription factor requires the conserved BTB/POZ domain and reorganizes promoter topology*. *EMBO J.* **18**, 698-708.

Kehle, J., Beuchle, D., Treuheit, S., Christen, B., Kennison, J.A., Bienz, M. and Müller, J. (1998). *dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression*. *Science* **282**, 1897-1900.

Keller, S.A., Mao, Y., Struffi, P., Margulies, C., Yurk, C.E., Anderson, A.R., Amey, R.L., Moore, S., Ebels, J.M., Foley, K., Corado, M. and Arnosti, D.N. (1998). *dCtBP-dependent and -independent repression activities of the Drosophila Knirps protein*. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7247-7258.

Kerrigan, L.A., Croston, G.E., Lira, L.M. and Kadonaga, J.T. (1991). *Sequence-specific transcriptional antirepression of the Drosophila Krüppel gene by the GAGA factor*. *J. Biol.Chem.* **266**, 574-582.

Khochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C. and Seigneurin-Berny, D. (2001). *Functional significance of histone deacetylase diversity*. *Curr. Op. Gen. & Dev.* **11**, 162-166.

Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M., and Studitsky, V.M. (2002). *Nucleosome remodeling induced by RNA Polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription*. *Mol. Cell* **9**, 541-552.

Knoepfler, P.S. and Eisenman, R.N. (1999). *Sin meets NuRD and other tails of repression*. *Cell* **99**, 447-450.

Kobayashi, A., Yamagiwa, H., Hoshino, H., Muto, A., Sato, K., Morita, M., Hayashi, N., Yamamoto, M. and Igarashi, K. (2000). *A combinatorial code for gene expression generated by transcription factor Bach2 and MAZR (MAZ-related factor) through the BTB/POZ domain.* Mol. Cell. Biol. **20**, 1733-1746.

Koipally, J. and Georgopoulos, K. (2000). *Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity.* J. Biol. Chem. **275**, 19594-19602.

Kornberg, R.D. (1974). *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA.* Science **183**, 868-871.

Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999). *Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome.* Cell **98**, 285-294.

Kosoy, A., Pagans, S., Espinás, M.L., Azorín, F. and Bernués, J. (2002). *GAGA factor down regulates its own promoter.* J. Biol. Chem. **277**, 422280-42288.

Kouzarides, T. (2002). *Histone methylation in transcriptional control.* Curr. Op. Gen. & Dev. **12**, 198-209.

Kuras, L. and Struhl, K. (1999). *Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme.* Nature **399**, 609-613.

Laherty, C.D., Billin, A.N, Lavinsky, R.M., Yochum, G.S., Bush, A.C., Sun, J.M., Mullen, T.M., Davie, J.R., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Ayer, D.E. and Eisenman, R.M. (1998). *SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors.* Mol. Cell **2**, 33-42.

Lai, Z.-C., Fetchko, M. and Li, Y. (1997). *Repression of Drosophila photoreceptor cell fate through cooperative action of two transcriptional repressors Yan and Tramtrack.* Genetics **147**, 1131-1137.

Lai, Z.-C. and Li, Y. (1999). *Tramtrack69 is positively and autonomously required for Drosophila photoreceptor development.* Genetics **152**, 299-305.

Längst, G., Bonte, E.J., Corona, D.F.V., and Becker, P.B. (1999). *Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer.* Cell **97**, 843-852.

Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D., and Wolffe, A.P. (1993). *A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA.* Cell **72**, 73-84.

Lee, D.-K., Suh, D., Edenberg, H.J. and Hur, M.-W. (2002). *POZ-domain transcription factor, FBI-1, repress transcription of ADH5/FDH by interfering DNA binding activity of Sp1*. J. Biol. Chem. **277**, 26761-26768.

Lehembre, F., Badenhorst, P., Müller, S., Travers, A.A., Schweisguth, F. and Dejean, A. (2000). *Covalent modification of the transcriptional repressor Tramtrack by the Ubiquitin-related protein Smt3 in Drosophila Flies*. Mol. Cel. Biol. **20**, 1072-1082.

Leibovitch, B.A., Lu, Q., Benjamin, L.R., Liu, Y., Gilmour, D.S. and Elgin, S.C.R. (2002). *GAGA factor and the TFIID complex collaborate in generating an open chromatin structure at the Drosophila melanogaster hsp26 promoter*. Mol. Cel. Biol. **22**, 6148-6157.

Lemercier, C., Brocard, M.-P., Puvion-Dutilleul, F., Kao, H.-Y., Albagli, O. and Khochbin, S. (2002). *Class II Histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor*. J. Biol. Chem. **277**, 22045-22052.

Lemon, B. and Tjian, R. (2000). *Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control*. Genes & Dev. **14**, 2551-2569.

Levine, M. and Manley, J.L. (1989). *Transcriptional repression of eukaryotic promoters*. Cell **59**, 405-408.

Li, X., Lopez-Guisa, J.M., Ninan, N., Weiner, E.J., Rauscher III, F.J. and Marmorstein, R. (1997a). *Overexpression, purification, characterization and crystallization of the BTB/POZ domain from the PLZF oncoprotein*. J. Biol. Chem. **272**, 27324-27329.

Li, S., Li, Y., Carthew, R.W. and Lai, Z.-C. (1997b). *Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack*. Cell **90**, 469-478.

Li, X., Peng, H., Schultz, D.C., Lopez-Guisa, J.M., Rauscher III, F.J. and Marmorstein, R. (1999a). *Structure-function studies of the BTB/POZ transcriptional repression domain from the promyelocytic leukemia zinc finger oncoprotein*. Cancer Research **59**, 5275-5282.

Li, X.-Y., Virbasius, A., Zhu, X. and Green, M.R. (1999b). *Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors*. Nature **399**, 605-609.

Li, J., Wang, J., Li, J., Nawaz, Z., Liu, J.M., Qin, J. and Wong, J. (2000). *Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3*. EMBO J. **19**, 4342-4350.

Li, J., Lin, Q., Wang, W., Wade, P. and Wong, J. (2002). *Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression.* Genes & Dev. **16**, 687-692.

Lin, R.J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W.H. and Evans, R.M. (1998). *Role of histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia.* Nature **391**, 811-814.

Lintermann, K.-G., Roth, G.E., King-Jones, K., Korge, G. and Lehmann, M. (1998). *Comparison of the GAGA factor genes of Drosophila melanogaster and Drosophila virilis reveals high conservation of GAGA factor structure beyond the BTB/POZ and DNA binding domains.* Dev. Genes Evol. **208**, 447-456.

MacDonald, P.M., Ingham, P. and Struhl, G. (1986). *Isolation, structure and expression of even-skipped: a second pair-rule gene of Drosophila containing a homeo box.* Cell **47**, 721-734.

MacDonald, G.H., Itoh-Lindstrom, Y. and Ting, J.P.-Y. (1995). *The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA Promoter.* J. Biol. Chem. **270**, 3527-3533.

Mahmoudi, T., Katsani, K.R. and Verrijzer, C.P. (2002). *GAGA can mediate enhancer function in trans by linking two separate DNA molecules.* EMBO J. **21**, 1775-1781.

Makowski, A.M., Dutnall, R.N. and Annunziato, A.T. (2001). *Effects of acetylation on histone H4 at lysine 8 and 16 on the activity of the Hat1 histone acetyltransferase.* J. Biol. Chem. **276**, 43499-43502.

Maldonado, E., Hampsey, M. and Reinberg, D. (1999). *Repression: targeting the heart of the matter.* Cell **99**, 455-458.

Mannervik, M., Nibu, Y., Zhang, H. and Levine, M. (1999). *Transcriptional coregulators in development.* Science **284**, 606-609.

Marmorstein, R. (2001). *Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation.* Nat. Rev. in Mol. Cell Biol. **2**, 422-432.

Marmorstein, R. and Roth, S.Y. (2001). *Histone acetyltransferases: function, structure and catalysis.* Curr. Op. Gen. & Dev. **11**, 155-161.

Melnick, A., Ahmad, K.F., Arai, S., Polinger, A., Ball, H., Borden, K.L., Carlile, G.W., Privé, G.G. and Licht, J.D. (2000). *In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional functions*. Mol. Cell Biol. **20**, 6550-6557.

Melnick, A., Carlile, G.W., Ahmad, K.F., Kiang, C.-L., Corcoran, C., Bardwell, V.J., Privé, G.G. and Licht, J.D. (2002). *Critical residues within the BTB domain of PLZF and Bcl-6 modulate interaction with corepressors*. Mol. Cell Biol. **22**, 1804-1818.

Merika, M., and Thanos, D. (2001). *Enhanceosomes*. Curr. Op. Gen. & Dev. **11**, 205-208.

Mishra, R.K., Mihaly, J., Barges, S., Spierer, A., Karch, F., Hagstrom, K., Schweinsberg, S.E. and Schedl, P. (2001). *The iab-7 Polycomb response element maps to a nucleosome-free region and requires both GAGA and Pleihomeotic for silencing activity*. Mol. Cell. Biol. **21**, 1311-1318.

Mizuguchi, G., Tsukiyama, T., Wisniewski, J. and Wu, C. (1997). *Role of nucleosome remodeling factor NURF in transcriptional activation of chromatin*. Mol. Cell **1**, 141-150.

Moazed, D. (2001). *Common themes in mechanisms of gene silencing*. Mol. Cell **8**, 489-498.

Morel, V., Lecourtois, M., Massiani, O., Maier, D., Preiss, A. and Schweisguth, F. (2001). *Transcriptional repression by Suppressor of Hairless involves the binding of a Hairless-dCtBP complex in Drosophila*. Current Biology **11**, 789-792.

Murawsky, C.M., Brehm, A., Badenhorst, P., Lowe, N., Becker, P.B. and Travers, A.A. (2001). *Tramtrack69 interacts with the dMi-2 subunit of the Drosophila NuRD chromatin remodelling complex*. EMBO Rep. **2**, 1089-1094.

Narlikar, G.J., Fan, H.-Y. and Kingston, R.E. (2002). *Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription*. Cell **108**, 475-487.

Ng, H.-H. and Bird, A. (1999). *DNA methylation and chromatin modification*. Curr. Op. Gen. & Dev. **9**, 158-163.

Ng, H.-H. and Bird, A. (2000). *Histone deacetylases: silencers for here*. TIBS **25**, 121-126.

Nibu, Y., Zhang, H. and Levine, M. (1998a). *Interaction of short-range repressors with Drosophila dCtBP in the embryo*. Science **280**, 101-104.

Nibu, Y., Zhang, H., Bajor, E., Barolo, S., Small, S. and Levine, M. (1998b). *dCtBP mediates transcriptional repression by Knirps, Krüppel and Snail in the Drosophila embryo*. EMBO J. **17**, 7009-7020.

Nibu, Y. and Levine, M. (2001). *CtBP-dependent activities of the short-range Giant repressor in the Drosophila embryo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 6204-6208.

Nibu, Y., Zhang, H. and Levine, M. (2001). *Local action of long-range repressors in the Drosophila embryo*. EMBO J. **20**, 2246-2253.

Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herreara, R.E. and Kouzarides, T. (2001). *Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters*. Nature **412**, 561-565.

Nightingale, K.P., Wellinger, R.E., Sogo, J.M., and Becker, P.B. (1998). *Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the Drosophila hsp26 gene in chromatin*. EMBO J. **17**, 2865-2876.

Nishioka, K., Cuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P. and Reinberg, D. (2002). *Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation*. Genes & Dev. **16**, 479-489.

O'Brien, T., Wilkins, R.C., Giardina, C. and Lis, J.T. (1995). *Distribution of GAGA protein on Drosophila genes in vivo*. Genes & Dev. **9**, 1098-1110.

Oelgeschlager, T., Tao, Y., Kang, Y.K. and Roeder, R.G. (1998). *Transcription activation via enhanced preinitiation complex assembly in a human cell-free system lacking TAFIIIs*. Mol. Cell **1**, 925-931.

Ohtsuki, S. and Levine, M. (1998). *GAGA mediates the enhancer blocking activity of the eve promoter in the Drosophila embryo*. Genes & Dev. **12**, 3325-3330.

Okabe, M., Imai, T., Kurusu, M., Hiromi, Y. and Okano, H. (2001). *Translational repression determines a neuronal potential in Drosophila asymmetric cell division*. Nature **411**, 94-98.

Okada, M. and Hirose, S. (1998). *Chromatin remodeling mediated by Drosophila GAGA factor and ISWI activates fushi tarazu gene transcription in vitro*. Mol. Cell Biol. **18**, 2455-2461.

Omichinski, J.G., Pedone, P.V., Felsenfeld, G., Gronenborn, A.M. and Clore, G.M. (1997). *The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode.* Nat. Struct. Biol. **4**, 122-132.

Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. (1996). *The general transcription factors of RNA polymerase II.* Genes & Dev. **10**, 2657-2683.

Orphanides, G. and Reinberg, D. (2000). *RNA polymerase II elongation through chromatin.* Nature **407**, 471-475.

Orphanides, G. and Reinberg, D. (2002). *A unified theory of gene expression.* Cell **108**, 439-451.

Pagans, S., Ortiz-Lombardía, M., Espinás, M.L., Bernués, J. and Azorín, F. (2002). *The Drosophila transcription factor tramtrack (TTK) interacts with Trithorax-like (GAGA) and represses GAGA-mediated activation.* Nucleic Acids Res. **30**, 4406-4413.

Pedone, P.V., Ghirlando, R., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Felsenfeld, G. and Omichinski, J.G. (1996). *The single Cys₂-His₂ zinc finger domain of GAGA protein flanked by basic residues is sufficient for high affinity specific DNA binding.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 2822-2826.

Peterson, C.L. (2002). *Chromatin remodeling enzymes: taming the machines.* EMBO Rep. **3**, 319-322.

Phippen, T.M., Sweigart, A.L., Moniwa, M., Krumm, A., Davie, J.R. and Parkhurst, S.M. (2000). *Drosophila C-terminal binding protein functions as a context-dependent transcriptional co-factor and interferes with both Mad and Groucho transcriptional repression.* J. Biol. Chem. **275**, 37628-37637.

Pile, L.A. and Cartwright, I.L. (2000). *GAGA factor-dependent transcription and establishment of DNase hypersensitivity are independent and unrelated events in vivo.* J. Biol. Chem. **275**, 1398-1404.

Platero, J.S., Csink, A.K., Quintanilla, A. and Henikoff, S. (1998). *Changes in chromosomal localization of heterochromatin-binding proteins during cell cycle in Drosophila.* J. Cell Biol. **140**, 1297-1306.

Pointud, J.-C., Larsson, J., Dastugue, B., and Couderc, J.-L. (2001). *The BTB/POZ domain of the regulatory proteins Bric à brac 1 (BAB1) and Bric à brac 2 (BAB2) interacts with the novel Drosophila TAF_{II} factor BIP2/dTAF_{II}155.* Dev. Biol. **237**, 368-380.

Poortinga, G., Watanabe, M. and Parkhurst, S.M. (1998). *Drosophila dCtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and Hairy-mediated transcriptional repression*. EMBO J. **17**, 2067-2078.

Poux, S., Melfi, R. and Pirrotta, V. (2001) *Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC*. Genes & Dev. **15**, 2509-2514.

Pritchard, D.K. and Schubiger, G. (1996) *Activation of transcription in Drosophila embryos is a gradual process mediated by the nucleocytoplasmatic ratio*. Genes & Dev. **10**, 1131-1142.

Proudfoot, N.J., Furger, A. and Dye, M.J. (2002). *Integrating mRNA processing with transcription*. Cell **108**, 501-512.

Ptashne, M. and Gann, A. (1997). *Transcriptional activation by recruitment*. Nature **386**, 569-577.

Raff, J.W., Kellum, R. and Alberts, B. (1994). *The Drosophila GAGA transcription factor is associated with specific regions of heterochromatin throughout the cell cycle*. EMBO J. **13**, 5977-5983.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.-W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T. (2000). *Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases*. Nature **406**, 593-599.

Read, D., Nishigaki, T. and Manley, J.L. (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**, 4334-4344.

Read, D. and Manley, J.L. (1992). *Alternatively spliced transcripts of the Drosophila tramtrack gene encode zinc finger proteins with distinct DNA binding specificities*. EMBO J. **11**, 1035-1044.

Read, D., Levine, M. and Manley, J.L. (1992). *Ectopic expression of the Drosophila tramtrack gene results in multiple embryonic defects, including repression of even-skipped and fushi-tarazu*. Mech. Dev. **38**, 183-196.

Read, D., Butte, M.J., Dernburg, A.F., Frasch, M. and Kornberg, T.B. (2000). *Functional studies of the BTB domain in the Drosophila GAGA and Mod(mdg4) proteins*. Nucleic Acids Res. **28**, 3864-3870.

Reines, D., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1996). *The RNA polymerase II elongation factors*. TIBS **21**, 351-356.

Richards, E.J., and Elgin, S.C.R. (2002). *Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects*. Cell **108**, 489-500.

Rice, J.C. and Allis, C.D. (2001). *Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation*. Curr. Op. Gen. & Dev. **13**, 263-273.

Roberts, S.G.E. and Green, M. (1994). *Activator-induced conformational change in general transcription factor TFIIB*. Nature **371**, 717-720.

Robinson, D.N. and Cooley, L. (1997). *Drosophila kelch is an oligomeric ring canal actin organizer*. J. Cell. Biol. **138**, 799-810.

Roeder, R.G. (1996). *The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II*. TIBS **21**, 327-334.

Rosenberg, M.I. and Parkhurst, S. (2002). *Drosophila Sir2 is required for heterochromatic silencing and by euchromatic Hairy/E(Spl) bHLH repressors in segmentation and sex determination*. Cell **109**, 447-458.

Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Miklos, L.G., Nelson C.R. et al. (2000). *Comparative genomics of the eukaryotes*. Science **287**, 2204-2215.

Sackerson, C.M., Fujioka, M. and Goto, T. (1999). *The even-skipped locus is contained in a 16-kb chromatin domain*. Dev. Biol. **211**, 39-52.

Sali, A. and Blundell, T.L. (1993). *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J. Mol. Biol. **234**, 779-815.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition . Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schaeper, U., Boyd, J.M., Verma, S., Uhlmann, E., Subramanian, T. and Chinnadurai, G. (1995). *Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1a involved in negative modulation of oncogenic transformation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 10467-10471.

Schneider, I. (1972). *Cell line derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster*. J. Embryol. Exp. Morphol. **27**, 353-365.

Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G. and Rauscher III, F.J. (2002). *SETDB1: a novel KAP-1 associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins.* Genes & Dev. **16**, 919-932.

Schwendemann, A. and Lehmann, M. (2002). *Pipsqueak and GAGA factor act in concert as partners at homeotic and many other loci.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 12883-12888.

Selleck, W., Howley, R., Fang, Q., Podolny, V., Fried, M.G., Buratowski, S. and Tan, S. (2001). *A histone fold TAF octamer within the yeast TFIID transcriptional coactivator.* Nat. Struct. Biol. **8**, 695-700.

Shopland, L.S., Hirayoshi, K., Fernandes, M. and Lis, J. (1995). *HSF acces to heat shock elements in vivo depends critically on promoter architecture defined by GAGA factor, TFIID and RNA pol II binding sites.* Genes & Dev. **9**, 2756-2769.

Siegmund, T. and Lehmann, M. (2002). *The Drosophila Pipsqueak protein defines a new family of helix-turn-helix DNA binding proteins.* Dev. Genes Evol. **212**, 152-157.

Smale, S. (2001). *Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation.* Genes & Dev. **15**, 2503-2508.

Small, S., Kraut, R., Hoey, T., Warrior, R. and Levine, M. (1991). *Transcriptional regulation of a pair-rule stripe in Drosophila.* Genes & Dev. **5**, 827-839.

Small, S., Blair, A. and Levine, M. (1992). *Regulation of even-skipped stripe 2 in the Drosophila embryo.* EMBO J. **11**, 4047-4057.

Soeller, W.C., Poole, S.J. and Kornberg, T.B. (1988). *In vitro transcription of the Drosophila engrailed gene.* Genes & Dev. **2**, 68-81.

Soeller, W.C., Oh, C.E. and Kornberg, T.B. (1993). *Isolation of cDNAs encoding the Drosophila GAGA transcription factor.* Mol. Cell Biol. **13**, 7961-7970.

Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000). *The language of covalent histone modifications.* Nature **403**, 41-45.

Strutt, H., Cavalli, G. and Paro, R. (1997). *Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression.* EMBO J. **16**, 3621-3632.

Svejstrup, J.Q., Vichi, P. and Egly, J.-M. (1996). *The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH*. *TIBS* **21**, 346-350.

Svejstrup, J.Q. (2002). *Chromatin elongation factors*. *Curr. Op. Gen. & Dev.* **12**, 156-161.

Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H. and Shinkai, Y. (2002). *G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis*. *Genes & Dev.* **16**, 1779-1791.

Tang, A.H., Neufeld, T.P., Kwan, E. and Rubin, G. (1997). *PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism*. *Cell* **90**, 459-467.

Tanny, J.C., Dowd, G.J., Huang, J., Hilz, H. and Moazed, D. (1999). *An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing*. *Cell* **99**, 735-745.

Thummel, C.S. (1989). *The Drosophila E74 promoter contains essential sequences downstream from the start site of transcription*. *Genes & Dev.* **3**, 782-792.

Topol, J., Dearolf, C.R., Prakash, K. and Parker, C.S. (1991). *Synthetic oligonucleotides recreate Drosophila fushi tarazu zebra-stripe expression*. *Genes & Dev.* **3**, 855-867.

Travers, A.A. (1999). *An engine for nucleosome remodeling*. *Cell* **96**, 311-314.

Tsukiyama, T., Becker, P.B. and Wu, C. (1994). *ATP-dependent nucleosome disruption at a heat shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor*. *Nature* **367**, 525-531.

Tsukiyama, T. and Wu, C. (1995). *Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor*. *Cell* **83**, 1011-1020.

Turner, J. and Crossley, M. (2001). *The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors*. *BioEssays* **23**, 683-690.

Tyler, J. and Kadonaga, J.T. (1999). *The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription*. *Cell* **99**, 443-446.

Vaquero, A. (2000). *Caracterización funcional de la proteína GAGA como factor activador de la transcripción*. Tesi doctoral. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

Vaquero, A., Espinás, M.L., Azorín, F. and Bernués, J. (2000). *Functional mapping of the GAGA factor assigns its transcriptional activity to the C-terminal glutamine-rich domain*. *J. Biol. Chem.* **275**, 19461-19468.

Vaquero, A., Espinás and Bernués, J. (2002). *Activation properties of the Drosophila GAGA factor*. submitted.

Vaute, O., Nicolas, E., Vandell, L. and Trouche, D. (2001). *Functional and physical interaction between the histone methyltransferase Suv39H1 and histone deacetylases*. *Nucleic Acids Res.* **30**, 475-481.

Veenstra, G.J.C. and Wolffe, A.P. (2001). *Gene-selective developmental roles of general transcription factors*. *TIBS* **26**, 665-671.

Verrijzer, C.P. and Tjian, R. (1996). *TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity*. *TIBS* **21**, 338-342.

Wall, G., Varga-Weisz, P.D., Sandaltzopoulos, R. and Becker, P.B. (1995). *Chromatin remodeling by GAGA factor and heat shock factor at the hypersensitive Drosophila hsp26 promoter in vitro*. *EMBO J.* **14**, 1727-1736.

Wang, X.M., Moore, S.C., Laszczak, M. and Ausio, J. (2000). *Acetylation increases the alpha-helical content of the histone tails of the nucleosome*. *J. Biol. Chem.* **275**, 35013-35020.

Wang, L., Ding, L., Jones, C.A. and Jones, R.S. (2002). *Drosophila Enhancer of zeste protein interacts with dSAP18*. *Gene* **285**, 119-125.

Wen, Y., Nguyen, D., Li, Y. and Lai, Z.-C. (2000). *The N-terminal BTB/POZ domain and C-terminal sequences are essential for Tramtrack69 to specify cell fate in the developing Drosophila eye*. *Genetics* **156**, 195-203.

Wheeler, J.C., VanderZwan, C., Xu, X., Swantek, D., Tracey, W.D. and Gergen, J.P. (2002). *Distinct in vivo requirements for establishment versus maintenance of transcriptional repression*. *Nat. Genetics* **32**, 206-210.

Wilkins, R.C. and Lis, J.T. (1997). *Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock regulation*. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3963-3968.

Wilkins, R.C. and Lis, J.T. (1998). *GAGA factor binding to DNA via a single trinucleotide sequence element*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2672-2678.

Wilkins, R.C. and Lis, J.T. (1999). *DNA distortion and multimerization: novel functions of the glutamine rich domain of GAGA factor*. *J. Mol. Biol.* **285**, 515-525.

Willy, P.J., Kobayashi, R. and Kadonaga, J.T. (2000). *A basal transcription factor that activates or represses transcription*. *Science* **290**, 982-984.

Winkler, G.S., Kristjuhan, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (2002). *Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 3517-3522.

Woodcock, C.L. and Dimitrov, S. (2001). *Higher-order structure of chromatin and chromosomes*. *Curr. Op. Gen. & Dev.* **11**, 130-135.

Wong, C.-W. and Privalsky, M.L. (1998). *Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RAR α , and Bcl-6*. *J. Biol. Chem.* **273**, 27695-27702.

Workman, J.L. and Kingston, R.E. (1998). *Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation*. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 545-579.

Woychik, N.A. and Hampsey, M. (2002). *The RNA Polymerase II machinery: structure illuminates function*. *Cell* **108**, 453-463.

Wu, W.H. and Hampsey, M. (1999). *Common cofactors and cooperative recruitment*. *Curr. Op. Gen. & Dev.* **108**, 453-463.

Xiao, H., Sandaltzopoulos, R., Wang, H.-M., Hamiche, A., Ranallo, R., Lee, K.-M., Fu, D. and Wu, C. (2001). *Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions*. *Mol. Cell* **8**, 531-543.

Xiong, W.-C. and Montell, C. (1993). *Tramtrack is a transcriptional repressor required for cell fate determination in the Drosophila eye*. *Genes & Dev.* **7**, 1085-1096.

Yew, P.R., Liu, X. and Berk, A.J. (1994). *Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53*. *Genes & Dev.* **8**, 190-202.

Yu, Y., Yussa, M., Song, J., Hirsch, J. and Pick, L. (1999). *A double interaction screen identifies positive and negative ftz gene regulators and Ftz-interacting proteins*. *Mech. Dev.* **83**, 95-105.

Yu, X., Li, P., Roeder, R.G. and Wang, Z. (2001). *Inhibition of androgen receptor-mediated transcription by amino-terminal enhancer of split*. Mol. Cell Biol. **21**, 4614-4625.

Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Reinberg, D. (1997). *Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex*. Cell **89**, 357-364.

Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.-P., Lane, W. and Reinberg, D. (1998). *The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities*. Cell **95**, 279-289.

Zhang, Y., Ng, H.-H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. and Reinberg, D. (1999). *Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation*. Genes & Dev. **13**, 1924-1935.

Zhang, H. and Levine, M. (1999). *Groucho and dCtBP mediate separate pathways of transcriptional repression in the Drosophila embryo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 535-540.

Zhang, Y. and Reinberg, D. (2001). *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. Genes & Dev. **15**, 2343-2360.

Zhang, C.L., McKinsey, T.A., Lu, J.R. and Olson, E.N (2001). *Association of COOH-terminal binding Protein (CtBP) and MEF2-interacting transcription repressor (MITR) contributes to transcriptional repression of the MEF2 transcription factor*. J. Biol. Chem. **276**, 35-39.

Zhu, W., Foehr, M., Jaynes, J.B. and Hanes, S.D. (2001). *Drosophila SAP18, a member of the Sin3/Rpd3 histone deacetylase complex, interacts with Bicoid and inhibits its activity*. Dev. Genes Evol. **211**, 109-117.

Zollman, S., Godt, D., Privé, G.G., Couderc, J.-L. and Laski, F.A. (1994). *The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionary conserved family that includes several developmentally regulated genes in Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 10717-10721.

IX.-APÈNDIX

Seqüència promotor *eve* stripe 2**-1759**

TTGAACCTTTCCCGGGGCAAGAAGGCTTGCATGTGGGCCTTTTCCAGGTCCGGCCAGTAGGTA
 GAGTTGTTGCGATGCGGCTATGCCGGGCGAGTTAATGCCAATGCAAATTGCGGGCGCAATAT
 AACCCAATAATTTGAAGTAACTGGCAGGAGCGAGGTATCCTTCCTGGTTACCCGGTACTGCA
 TAACAATGGAACCCGAACCGTAACTGGGACAGATCGAAAAGCTGGCCTGGTTTCTCGCTGTG
 TGTGCCGTGTTAATCCGTTTGCCATCAGCGAGATTATTAGTCAATTGCAGTTGCAGCGTTTC
 GCTTTCGTCCCTCGTTTCACTTTCGAGTTAGACTTTATTGCAGCATCTTGAACAATCGTCGCA
 GTTTGGTAACACGCTGTGCCATACTTTCATTTAGACGGAATCGAGGGACCCTGGACTATAAT
 CGACAACGAGACCGGGTTGCGAAGTCAGGGCATTCGCGCGATCTAGCCATCGCCATCTTCT
 GCGGGCGTTTGTGTTTGTGTTTGTGCTGGGATTAGCCAAGGGCTTGACTTGGAATCCAATCCTG
 ATCCCTAGCCCGATCCCAATCCCAATCCCAATCCCTTGTCTTTTCATTAGAAAGTCATAAA
 AACACATAATAATGATGTGCAAGGGATTAGGGG

-1079

CGCGCAGGTCCAGGCAACGCAATTAACGGACTAGCGAACTGGGTATTTTTTTTGGCCGACT
 TAGCCCTGATCCGCGAGCTTAACCCGTTTTGAGCCGGGCAGCAGGTAGTTGTGGGTGGACCC
 CACGACTTTTTTGGCCGAACCTCCAATCTAACTTGCGCAAGTGGCAAGTGGCCGGTTTTGCTG
 GCCAAAAGAGGAGGCACTATCCCGTCTGGTACAGTTGGTACGCTGGGAATGATTATATC
 ATCATAATAAATGTTTTGCCCAACGAAACCGAAAACTTTTCAAATTAAGTCCCGGCAACTGG
 GTTCCCATTTTTCCATTTTTCCATGTTCTGCGGCCAGGGCGGCCATTATCTCACTACAGCAGT
 TCCCAAATGGTTATGGCTGGACACCCTGCCGCCGCTCCAACGGGGTGGATGAAGCCCCAA
 AACCCGAAAGTCATGGCAGCCATGGCAGTGTGGGGCTGTAAACGTGCGGCATAATATTAAG
 ACTTCATAAAAGCGCAAATAATTCGCTGGCAGGCGATCGATAATACATACATAAAATATAT
 AGTGGGATACACACACTCTCTGCCGCAAACACACACCACCCGACCCGACTGAGCGGCATAA
 TGCCATATCATTCTTGATGAAGCCAATAAAATCCCATTTAAGGG

-413

GGCCCGCCCGTCCCGCTCGCTCCTGCGGAGCAACCGCCTGCGGGCGGGCGAGACAAAAGATT
 CGCTCATCCGCTATGAATACCAAATCGGAACTCTCTCTCTCCAGCTCGGGAGTGCCATGG
 CCAGCATGGCCAGGACCTCCTCATGGTCTGCGGAGCAGAGAACGCGGCTCCATCCCGCTGC
 TCCGGGTCTGCTCCTCCGCTTTGTCCCGCCTCGTTATCGCCGCTCAGCACCCGAGAGCACAG
 CAGCGCATCCACTCTCAGCACCCGCACGATTAGCACCGTTCCGCTCAGGCTGTCCCGCTCGCA
 CCTGCCTGGGTGCTGCGATTGGCCGCTCCAGCGACGGCGGCCATTTGCCTGCAGAGCGCA
 GCGGTATATAAAGGGCGCGGGGTGGCTGAGAG

+1

CAGCACACTCGAGCTGTGACCGCCGCACAGTCAACAATACTGCCTTCGTTAATATCCTCT
 GAATAAGCCAACTTTGAATCACAAGACGCATACCAAACATGCACGGATACCGAACCTACAAC
ATGGAGAGCCACCATGCCACCACGACGCCAGTCCCGTGGACCAGAAGCCCCTGGTTGTGGA
 CCTCTTGGCCACCAGTACGGCAAGCCCCAGACACCGCCT

