

TESI DOCTORAL

CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEÏNA dSAP18 A

Drosophila melanogaster

Elisabet Costa i Cros

Barcelona setembre 2008

**Departament de Ciències Fisiològiques II
Programa de Doctorat de Biomedicina
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona**

CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEÏNA dSAP18 A
Drosophila melanogaster

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

Vist-i-plau de la directora

Vist-i-plau del tutor

Dra. M^a Lluïsa Espinàs Janer

Dr. Santi Ambrosio

**“Ciencia es todo aquello sobre
lo cual siempre cabe discusión”**

José Ortega y Gasset

ÍNDEX

ÍNDIX GENERAL

ÍNDIX GENERAL	i
ÍNDIX DE FIGURES	vii
ÍNDIX DE TAULES	ix
ABREVIATURES	xi
INTRODUCCIÓ	1
1. LA PROTEÏNA dSAP18	3
1.1 la proteïna dSAP18 i el complex Sin3-HDACs	3
1.2 Proteïnes d'interacció amb SAP18 a <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.2.1 dSAP18 i Bicoid	5
1.2.2 dSAP18 i Enhancer of zeste	5
1.2.3 dSAP18 i GAGA	7
1.3 Altres proteïnes d'interacció amb SAP18 a altres organismes model	8
1.4 SAP18 en altres complexos proteics: el complex ASAP	9
2. LA DEFENSA IMMUNE DE <i>Drosophila melanogaster</i>	11
2.1 Qui infecta <i>Drosophila melanogaster</i> : bacteris, fongs, paràsits i virus	11
2.2 La resposta del sistema immune a la infecció	13
2.2.1 els efectors immunes	13
2.2.2 Regulació dels AMPs	15
2.2.2.1 la ruta de Toll	16
2.2.2.2 la ruta de Imd	17
2.2.2.3 la ruta de JNK	18
2.2.2.4 la ruta de JAK/STAT	19
2.3 Patró de reconeixement i activació de la senyalització de Toll i Imd	19
2.4 La immunitat local a <i>Drosophila</i>	22
2.4.1 Expressió local d'AMPs	22
2.4.2 La producció de ROS	23
2.5 La resposta cel·lular a la infecció	24
2.5.1 Origen dels hemòcits o hematopoiesi	24
2.5.2 Tipus d'hemòcits a <i>Drosophila melanogaster</i>	26
2.5.2.1 Prohemòcits	26
2.5.2.2 Plasmatòcits	26

2.5.2.3 Crystal cells	27
2.5.2.4 Lamel·lòcits	28
2.5.3 Funcions de les cèl·lules hematopoètiques	28
2.5.3.1 Fagocitosi	28
2.5.3.2 Encapsulació	29
2.5.3.3 Coagulació i Melanització	29
2.5.3.3.1 La coagulació	29
2.5.3.3.2 La melanització	30
2.5.3.3.3 Els tumors melanòtics	31
OBJECTIUS	32
MATERIALS I MÈTODES	35
1. MATERIALS	37
1.1 DNAs plasmídics utilitzat en aquesta tesi	37
1.1.1 Vectors de clonatge	37
1.1.2 Plasmidis generats	37
1.2 Línies cel·lulars i soques de <i>Drosophila melanogaster</i>	38
1.2.1 Línies bacterianes	38
1.2.2 Línies cel·lulars	39
1.2.3 Línies de <i>Drosophila melanogaster</i>	39
1.3 Oligonucleòtids	40
1.4 Anticossos	41
2. MÈTODES	42
2.1 Tècniques de manipulació de DNA plasmídic	42
2.1.1 Transformació de cèl·lules competents	42
2.1.2 Mètodes d'obtenció de DNA plasmídic	42
2.1.2.1 Minipreparacions de DNA	42
2.1.2.2 Maxipreparacions de DNA	42
2.2 Tècniques amb cèl·lules eucariotes	43
2.2.1 Creixement de les cèl·lules	43
2.2.2 Transfecció de les cèl·lules amb <i>Effectene Transfection Reagent</i>	43
2.2.3 Tractament de les cèl·lules amb RNA d'interferència	43
2.2.3.1 Obtenció dels dsRNA	44
2.2.3.2 Tractament de els cèl·lules amb dsRNA	45

2.2.4	Citometria de flux a cèl·lules SL2	45
2.2.4.1	Tinció amb iodur de propidi	45
2.2.4.2	Tinció amb Hoechst	46
2.3	Assajos a <i>Drosophila melanogaster</i>	46
2.3.1	Manteniment de les diverses soques de <i>D. melanogaster</i>	46
2.3.2	Punxades a larves L3	47
2.3.3	Infecció de mosques adultes amb el fong <i>Aspergillus fumigatus</i>	47
2.3.3.1	Creixement del fong <i>Aspergillus fumigatus</i>	47
2.3.3.2	Infecció amb <i>Aspergillus fumigatus</i>	48
2.4	Tècniques de manipulació d'RNA	48
2.4.1	Extracció d'RNA	48
2.4.2	RT-PCR	48
2.4.3	Real-time PCR	49
2.4.4	Assajos de microarrays	50
2.4.4.1	Obtenció de la mostra	51
2.4.4.2	Hibridació de la mostra	51
2.5	Tècniques per a l'estudi de proteïnes	52
2.5.1	Expressió de proteïna recombinant dSAP18	52
2.5.2	Purificació d'anticòs α -dSAP18 per cromatografia d'afinitat	53
2.5.3	Extracció de proteïna a partir d'embrions i de larves de <i>Drosophila melanogaster</i>	54
2.5.4	Immunoprecipitació de dSAP18 a partir d'extractes d'embrions	54
2.5.5	Fraccionament subcel·lular de cèl·lules SL2	55
2.5.6	Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida-SDS	56
2.5.7	Tècniques d'immunodetecció	56
2.5.7.1	Western-blott	56
2.5.7.2	Immunodetecció a embrions	58
2.5.7.3	Immunodetecció a glàndules senceres	58
2.5.7.4	Immunodetecció a cromosomes politènics	59
2.5.7.5	Immunodetecció a neuroblastes	60
2.5.7.6	Immunodetecció a discos imaginals	61
2.5.7.7	Immunodetecció a ovaris	61
2.5.7.8	Immunodetecció a cèl·lules SL2	62

RESULTATS	63
1. EL MODEL: <i>Drosophila melanogaster</i>	65
1.1 Línies salvatges per l'expressió de la proteïna dSAP18	65
1.2 Al·lells mutants per a <i>dsap18</i>	65
1.2.1 al·lel <i>dsap18</i> ¹¹⁷ i al·lel <i>dsap18</i> ^{R7-18}	65
1.2.2 <i>Df(3R)sbd</i> ⁴⁵	66
1.2.3 RNAi de dSAP18	66
1.2.4 al·lel PB{WH}f0437	70
1.2.5 Obtenció d'una nova deficiència que no descobreix el gen GATAe	70
1.3 Línia que expressa una proteïna de fusió ectòpica dSAP18-HA	71
1.4 Combinació d'al·lells i letalitat	72
1.4.1 Línia <i>dsap18</i> ¹¹⁷ / <i>Df(3R)sbd</i> ⁴⁵	72
1.4.2 Línia <i>dsap18-HA; dsap18</i> ¹¹⁷ / <i>Df(3R)sbd</i> ⁴⁵	73
2. CARACTERITZACIÓ DEL PATRÓ D'EXPRESSIÓ DE LA PROTEÏNA dSAP18	
2.1 Localització nuclear de la proteïna dSAP18 a <i>D. melanogaster</i>	74
2.1.1 Localització de la proteïna dSAP18 a embrions de <i>D. melanogaster</i>	74
2.1.2 Localització de la proteïna dSAP18 a larva	76
2.1.3 Localització de la proteïna dSAP18 a l'adult	78
2.1.4 Localització de la proteïna dSAP18 a cèl·lules en cultiu SL2	79
2.2 Localització intranuclear de dSAP18	80
3. IDENTIFICACIÓ DE PROCESSOS FUNCIONALS ON PARTICIPA dSAP18	84
3.1 Assajos d'immunocol·localització de dSAP18 a cromosomes politènics	84
3.1.1 dSAP18 i els complexos polycomb	84
3.1.2 dSAP18 i el complex Sin3-HDACs	85
3.1.3 dSAP18 i la regulació transcripcional	86
3.1.4 dSAP18 i la resposta a <i>heat-shock</i>	89
3.2 Assajos de microarrays a embrions <i>dsap18-HA; dsap18</i> ¹¹⁷ / <i>Df(3R)sbd</i> ⁴⁵ i <i>dsap18</i> ¹¹⁷ / <i>Df(3R)sbd</i> ⁴⁵	92
3.2.1 Els <i>microarrays</i>	92

3.2.2 Anàlisi dels microarrays	94
3.2.2.1 Escaneig	94
3.2.2.2 Filtratge i normalització	95
3.2.2.3 Anàlisi dels resultats	97
3.2.2.4 Anàlisi de <i>clusters</i>	98
3.2.3 Gens regulats negativament per dSAP18: dSAP18 i el cicle cel·lular de <i>Drosophila melanogaster</i>	100
3.2.4 Gens regulats positivament per dSAP18: dSAP18 i la defensa immune de <i>Drosophila melanogaster</i>	103
3.2.5 Caracterització de la participació de la proteïna dSAP18 en la immunitat innata a <i>Drosophila melanogaster</i>	105
3.2.5.1 a embrions	105
3.2.5.2 a larva	109
3.2.6 Infecció a larves <i>dsap18-HA; dsap18117/Df(3R)sbd</i> ⁴⁵ i <i>dsap18117/Df(3R)sbd</i> ⁴⁵	111
3.2.7 infecció a adults <i>dsap18-HA; dsap18117/Df(3R)sbd</i> ⁴⁵ i <i>dsap18117/Df(3R)sbd</i> ⁴⁵	114
DISCUSSIÓ	117
CONCLUSIONS	129
BIBLIOGRAFIA	132

ÍNDEX DE FIGURES

Figura I.1. Els AMPs de <i>Drosophila melanogaster</i>	14
Figura I.2. Les rutes Toll i Imd a <i>Drosophila melanogaster</i>	17
Figura I.3. La resposta immune a l'estómac	23
Figura I.4. Hemòcits presents a la glàndula limfàtica	27
Figura M.1. Esquema dels plàsmids pBS-dSAP18 i pBS-GFP	44
Figura M.2. Plaques de cultiu del fong <i>Aspergillus fumigatus</i>	47
Figura M.3. Esquema de la transferència de proteïnes	57
Figura R.1. Esquema de la generació de l'al·lel dSAP18 ¹¹⁷	66
Figura R.2. Esquema de la orientació de les seqüències clonades per tal que al transcriure's formin un <i>hairpin</i>	67
Figura R.3 Funcionament de l'RNAi a les diferents línies obtingudes	69
Figura R.4. Esquema de les delecions basades en el sistema FLP-FRT	71
Figura R.5. Western-blott de la immunoprecipitació de la proteïna SAP18 a partir d'extractes proteics d'embrions SAP18-HA	72
Figura R.6. Localització de la proteïna dSAP18 a embrions de <i>Drosophila melanogaster</i>	75
Figura R.7. Localització de la proteïna dSAP18 a larva	77
Figura R.8. Localització de la proteïna dSAP18 a discos imaginals de larves <i>w</i> ¹¹¹⁸	78
Figura R.9. Localització de la proteïna dSAP18 a ovaris de femelles <i>w</i> ¹¹¹⁸	79
Figura R.10. Localització de la proteïna dSAP18 a cèl·lules en cultiu SL2	79
Figura R.11. Localització intranuclear de la proteïna dSAP18	80
Figura R.12. Localització de la proteïna dSAP18 a cromosomes politènics de larves <i>w</i> ¹¹¹⁸	82
Figura R.13. Fraccionament bioquímic de cèl·lules SL2	83
Figura R.14. Immunocol·localitzacions a cromosomes politènics	85
Figura R.15. Localització de dSAP18 i la histona H3 acetilada	86
Figura R.16. Col·localització de dSAP18, la histona H3 fosforilada a la Ser10 i la RNA polimerasa II a cromosomes politènics	88
Figura R.17. Col·localització de dSAP18 i la H3 fosforilada a la Ser 10 en	

Índex de figures

una situació de <i>heat-shock</i>	89
Figura R.18. Tumor melanòtics en una larva <i>dsap18¹¹⁷/dsap18¹¹⁷</i> en resposta a una situació de <i>heat-shock</i>	90
Figura R.19. El gràfic representa l'aparició de tumors melanòtics després d'un tractament d'estrès tèrmic a larves	90
Figura R.20. Dos experiments de <i>microarrays</i> diferents	93
Figura R.21. Les dues imatges corresponen a imatges escanejades amb el programa GenePix Pro 6.0 d'un dels nostres <i>microarrays</i>	94
Figura R.22. Resultats dels 4 <i>arrays</i> que hem realitzat abans i després de la normalització OLIN	97
Figura R.23. Fragment del full Excel amb els gens significatius ordenats segons el valor de \log_2 ratio	98
Figura R.24. Wetsern-blott de dSAP18 a cèl·lules SL2	101
Figura R.25. Distribució del cicle cel·lular de cèl·lules SL2 tractades amb dsRNA	101
Figura R.26. Cicle cel·lular de cèl·lules que han estat transfectades	102
Figura R.27. Diagrama on hem agrupat segons la seva funció els gens que els gens regulats positivament per la proteïna dSAP18	104
Figura R.28. RT-PCRs semiquantitatives a embrions 0-24h	105
Figura R.29. Quantificació de l'expressió de <i>drosomicina</i> i <i>IM2</i> a embrions 0-24h	106
Figura R.30. Resum dels diferents processos que configuren la defensa immune de <i>Drosophila melanogaster</i>	107
Figura R.31. RT-PCRs de diversos gens implicats en la resposta immune de <i>Drosophila melanogaster</i>	107
Figura R.32. RT-PCRs de diversos gens implicats en la resposta immune a larva	109
Figura R.33. Resposta a ferida	112
Figura R.34. Aparició de tumors melanòtics i mortalitat en resposta a la punxada en larves del tercer estadi	113
Figura R.35. Supervivència a la infecció per <i>A. fumigatus</i>	115
Figura D.1. Relació entre les rutes de defensa i les de resposta a estrès a <i>Drosophila melanogaster</i>	126

ÍNDEX DE TAULES

Taula M.1. Oligonucleòtids utilitzats en els assajos de RT-PCR	40
Taula M.2. Oligonucleòtids utilitzats en els assajos de <i>real-time</i> PCR	40
Taula M.3. Anticossos primaris i secundaris utilitzats	41
Taula R.1. La taula mostra els assajos que hem realitzat per analitzar el funcionament de l'RNAi de dSAP18 a les diferents línies obtingudes i amb els diferents <i>drivers</i> utilitzats	68
Taula R.2. Letalitat de la línia <i>dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵</i>	73
Taula R.3. Gens regulats negativament per dSAP18 implicats en el cicle cel·lular de <i>Drosophila melanogaster</i>	100
Taula R.4. La taula mostra els primers 25 gens per ordre de log2 ratio	103

Abreviatures

ABA: àcid abscísic
Abd-A: *Abdominal-A*
Abd-B: *Abdominal-B*
act: actina
AMPs: pèptids antimicrobians
Att: Attacina
Bc: *Black Cells*
Bcd: *Bicoid*
Bin1: *Bicoid interacting protein 1*
BSA: Albúmina Sèrica bovina
BX-C: complex Bithòrax
Cec: Cecropina
Crq: *Croquemort*
da: *daugtherless*
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol dicholrhidrat
DCV: Drosophila C virus
Def: Defensina
Dif: *Dorsal-related immunity factor*
DIM o IM: *Drosophila Immune Molecule*
dl: *dorsal*
DMSO: Dimetilsulfòxid
DNA: Àcid Desoxiribonucleic
ssDNA: DNA d'esperma de salmó
Dom: *Domless*
Dpt: Diptericina
Dredd: *Death related ced-3/Nedd2-like protein*
Dro: Drosocina
Drs: Drosomicina
DTT: Ditiotreitòl
EDTA: àcid etilen-diamin-tetraacètic
EGTA: Àcid etilen-glicol-tetracètic
ERFs: *Ethylene Responsive element binding Factors*
ESC: *Extra sex combs*
E(Z): *Enhancer of zeste*
Fab: element frontabdominal

Abreviatures

FADD: *Fas-associated death domain*

FBS: *Fetal Bovine Serum*, sèrum boví fetal

Gcm: *Glial-cells-missing*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

GNBP: *Gram-Negative Binding Proteins*

GST: Glutatió S-transferasa

HA: hemaglutinina

hb: *hunchback*

HDACs: *Histone Deacetylase*, desacetil·lasa d'histones

Hh: *Hedgehog*

Hml: *Hemolectin*

Hop: *Hopscotch*

Imd: *Immune Deficiency*

IP: Iodur de Propidi

IPTG: Isopropyl-B-D-Thiogalactopyranoside

IRC: *Immune Responsive Catalase*

JAK: *Janus Kinase*

JNK: *jun N-terminal kinase*

KDa: QuiloDalton

LB: medi de cultiu Luria-Bertrani

LPS: lipopolisacàrids

MEC: matriu extracel·lular

Mtk: *Metchnikowina*

NF- κ B: *Nuclear Factor-kappa B*

NP-40: Nonidet P-40

NURF: *Nucleosome Remodeling Factor*, Factor Remodelador del Nucleosoma

otd: *orthodenticle*

PAGE: Gel d'Electroforesi en Poliacrilamida

pb: parell de bases

PBS: Tampó fosfat salí

PcG: *Polycomb Group*

PCR: Reacció en cadena de la DNA polimerasa

PGRP: *Peptidoglycan Recognition Proteins*

PLB: *protein loading buffer*

PMSF: Fluorur de fenilmetil sulfònic

PO: fenol oxidasa

Pol II: RNA polimerasa II

PRC: *Polycomb Repressive Complex*
PRE: *Polycomb Response Element*
Pro-PO: pro-fenol oxidasa
PRR: *Pattern Recognition Receptor*
PSA: persulfat amònic
PSC: *Posterior Sex Combs*
Rel: *Relish*
RISC: *RNA-induced silencing*
RNA: Àcid Ribonucleic
RNAi: RNA d'interferència
siRNA: *small interfering RNA*
RNAsa: Ribonucleasa
RNPS1: *RNA binding protein S1*
ROS: *Reactive oxygen species*, espècies reactives d'oxigen
rpm: revolucions per minut
RT-PCR: Transcripció reversa i PCR
S2 o SL2: *Schenider Cell Line 2*, línia cel·lular Schneider 2
SAP18: *Sin3A Associated Protein* de 18 kDa
SDS: sodium dodecil sulfat
Sin3: *switch-independent 3*
Srp: *Serpent*
Sufu: *Supressor of fused*
SU(Z): *Supressor of zeste*
Tak1: *Transforming growth factor activated kinase 1*
TE: Tampó Tris-EDTA
TEMED: N,N,N,N'-(tetrametil)-etilendiamino
Tep1: *Thiolester containing protein 1*
Tig: *Tiggrin*
tot : *Turandot*
trl: *Trithorax-like*
TrxG: *Trithorax Group*
UAS: *Upstream Activating Sequence*
Ubx: *Ultrabithorax*
WB: *Western-Blott*

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. LA PROTEÏNA SAP18

El gen *bicoid interacting protein-1 (bin-1)*, localitzat en el cromosoma 3R de *Drosophila melanogaster*, codifica per un polipèptid de 153 aminoàcids d'una massa molecular aproximada de 18 kDa, anomenat **Sin3A-associated protein** o SAP18. La proteïna SAP18 es troba conservada al llarg de l'evolució, la proteïna de *Drosophila* és homòloga en un 49.3% a la humana i en un 66% a la de *C.elegans*.

La seqüència molecular de SAP18 no revela cap domini estructural excepte d'un *coiled coil* putatiu a l'extrem n-terminal a l'homòleg de *Drosophila* que no es trobaria conservat a mamífers.

1.1. SAP18 I EL COMPLEX Sin3-HDACs

La proteïna SAP18 va ser trobada a cèl·lules humanes per Zhang i col·laboradors com a membre del complex que forma el repressor transcripcional Sin3 (*switch-independent 3*) amb les desacetilases d'histones (HDACs), proposant així una funció de la proteïna SAP18 en la regulació de l'expressió gènica mitjançant la modulació de l'estructura de la cromatina (Zhang et al., 1997).

Les histones són les proteïnes que s'associen amb el DNA de les cèl·lules eucariotes per tal d'empaquetar-lo en una estructura que rep el nom de cromatina. Aquesta compactació permet que tot el genoma eucariota càpiga en el reduït espai del nucli cel·lular, però al mateix temps és una compactació suficientment dinàmica per permetre que la maquinària de transcripció, replicació i reparació del DNA tingui accés al genoma. Aquest compromís entre compactació i flexibilitat de la fibra cromatina s'aconsegueix mitjançant dos tipus d'activitats: la remodel·lació de la cromatina i la modificació post-traduccionals de les cues de les histones.

Les cues de les histones poden patir diverses modificacions post-traduccionals, algunes de les més conegudes són l'acetilació i metilació de les lisines (K) i arginines (R), la fosforilació de les serines (S) i treonines (T), ubiquitinació i sumoilació de les lisines i ribosilació.

Inicialment s'havia suggerit que les modificacions de les histones promourien per si mateixes canvis en la conformació de la cromatina, però la gran quantitat de modificacions que poden patir les cues de les histones, les múltiples combinacions d'aquestes modificacions i el descobriment de proteïnes amb dominis capaços d'interaccionar específicament amb els residus modificats han conduït a proposar l'existència d'un llenguatge codificat a les cues de les histones que és llegit per determinades proteïnes per modular tan l'expressió gènica com l'estructura de la cromatina: el codi de les histones (Strahl and Allis, 2000). Les proteïnes capaces d'interaccionar específicament amb els residus modificats s'han anomenat "lectors del codi". Aquestes proteïnes estan formades per dominis que poden reconèixer aquestes modificacions (bromodominis, cromodominis...) i són les responsables de la traducció en una funció determinada, ja sigui promovent canvis en l'estructura de la cromatina o mitjançant el reclutament d'altres complexos proteics (Mellor, 2006).

Zhang i col·laboradors demostren mitjançant experiments de cromatografia d'afinitat i assajos de transfecció transitòria, que en cèl·lules humanes la proteïna SAP18 forma part d'un complex repressor, i és més, proposen que mitjançant l'associació amb alguna altra proteïna amb dominis d'unió a DNA, SAP18 s'uniria al promotor i dirigiria la formació dels complexos Sin3-HDACs promovent la repressió de la transcripció del gen corresponent (Zhang et al., 1997).

1.2. PROTEÏNES D'INTERACCIÓ AMB SAP18 A *Drosophila melanogaster*

A partir d'aquest treball inicial han anat apareixent diferents articles que mitjançant crivellatge de doble híbrid, descriuen a diferents models la interacció de SAP18 amb altres proteïnes atribuint-li així funcions relacionades amb la regulació del desenvolupament embrionari, control de l'expressió gènica i replicació del DNA. Els diversos articles publicats proposen sempre a la proteïna SAP18 com una proteïna adaptadora que actuaria com a pont entre proteïnes d'unió a DNA i el complex repressor de la transcripció Sin3-HDACs.

1.2.1 dSAP18 i Bicoid

Una d'aquestes proteïnes és Bicoid (Bcd) (Zhu and Hanes, 2000). Bcd és una proteïna amb dominis d'unió al DNA que a l'embrió de *Drosophila* es troba present en un gradient de concentració al llarg de l'eix antero-posterior (A→P) de l'embrió (Driever and Nüsslein-Volhard, 1988) on estimula l'expressió de varis gens diana entre els que s'inclouen *hunchback* (*hb*) i *orthodenticle* (*otd*) (Driever and Nüsslein-Volhard, 1989; Gao and Finkelstein, 1998). La correcta expressió espacial de *bcd* i els seus gens diana al llarg de l'eix A→P és necessària pel correcte desenvolupament del cap i el tòrax (Driever et al., 1989; Schulz and Tautz, 1994). Durant l'estadi de cel·lularització, l'activitat de Bcd s'inhibeix a l'extrem més anterior de l'embrió provocant així una dilució en l'expressió dels gens diana, fenomen que rep el nom de retracció (Janody et al., 2000). Intentant entendre com té lloc el fenomen de la retracció Zhu i col·laboradors busquen mitjançant assajos de doble híbrid proteïnes capaces d'interaccionar amb Bcd, i anomenen a aquestes proteïnes: *bicoid interacting proteins* o Bin. Entre elles Bin1, que és la proteïna de *Drosophila* homòloga a SAP18. Confirmen aquesta interacció amb assajos de GST-pull down. Alhora, veuen que dSAP18 és capaç de reprimir l'activació transcripcional que indueix Bcd a cèl·lules S2, i que aquesta repressió és sensible al tractament amb *trichostatin A* (un inhibidor de les desacetilases d'histones). D'aquí que plantegin un model en el que, a l'extrem més anterior de l'embrió Bcd interaccionaria amb dSAP18 reclutant així el complex Sin3-HDACs al DNA i convertint així Bcd d'un activador a un repressor transcripcional (Zhu et al., 2001). En un treball posterior aquests autors veuen que embrions de mares dobles mutants per *bcd* i *bin-1* no tenen una correcta retracció de l'expressió del gen *hb* a l'extrem més anterior de l'embrió. El fet que no puguin inhibir *hb* porta a una falta d'expressió de *cap'n'collar*, provocant així importants defectes en la formació del cap. Aquest fenotip es troba estimulat si es disminueix la dosi de les desacetilases d'histones HDAC1/Rpd3, indicant que *in vivo*, aquestes també s'hi troben implicades (Singh et al., 2005).

1.2.2 dSAP18 i Enhancer of zeste

L'establiment del patró A→P té lloc a través de l'activació d'una cascada de gens zigòtics *gap* i *pair-rule* que en últim terme són els encarregats de

Introducció

l'activació o repressió dels gens homeòtics (Hox) (Akam, 1987). Els gens homeòtics són els que determinen la identitat de cada un dels segments en que es divideix el cos de la mosca al llarg de l'eix anteroposterior. A *Drosophila* aquests gens s'agrupen en dos complexos: el complex Antennapedia i el complex Bithorax.

L'expressió d'aquests gens homeòtics es manté al llarg de tot el desenvolupament, però els reguladors inicials que els activen o els reprimeixen només es troben presents en els primers estadis del desenvolupament embrionari. Això fa necessària l'existència d'altres gens per mantenir l'estat activat o reprimat d'aquests gens. Aquests gens de manteniment són els que codifiquen per les proteïnes del grup Polycomb (PcG) i les del grup Trithorax (trxG). Les proteïnes del grup trxG actuen de forma col·lectiva per mantenir l'activitat transcripcional, les proteïnes del grup PcG funcionen antagònicament mantenint el silenciament dels gens homeòtics en els llinatges cel·lulars on inicialment han estat reprimits. L'anàlisi molecular de les proteïnes PcG i trxG va posar de manifest que aquestes actuen com a grans complexos multimèrics a nivell de la modulació de l'estructura de la cromatina. La caracterització bioquímica de la seva funció va demostrar que estan implicats en fenòmens epigenètics, en concret en la modificació postraduccionals de les histones dels seus gens diana (Grimaud et al., 2006).

Per tal d'aprofundir en el coneixement dels complexos polycomb, Wang i col·laboradors realitzen un assaig de doble híbrid per identificar proteïnes capaces d'interaccionar amb la proteïna polycomb Enhancer of zeste (E(z)) (Wang et al., 2002). E(z) és juntament amb Extra Sex Combs (ESC) dues proteïnes polycomb que formen part del complex PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) (Ng et al., 2000). Aquest complex també inclou les proteïnes NURF-55 i *Supressor of zeste* (Su(Z)12) i pot associar-se a la desacetilasa d'histona RPD3 (Tie et al., 2001; Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002; Muller et al., 2002). La proteïna E(z) és la subunitat catalítica del complex PRC2 i s'encarrega de trimetil·lar la lisina 27 de la histona H3. Aquesta marca epigenètica es troba associada a l'estat reprimat dels gens homeòtics.

Wang i col·laboradors demostren que dSAP18 interacciona tan *in vitro* com *in vivo* amb E(z) (Wang et al., 2002). L'assaig de doble híbrid que permet

descriure aquesta interacció es va dissenyar amb els dominis conservats evolutivament de E(z): CXC i SET. Aquesta associació va ser confirmada *in vitro* mitjançant assajos de *pull down*, i *in vivo* per coimmunoprecipitació i per anàlisi de gel filtració a partir d'extractes d'embrions de *Drosophila*. A més, sembla que SAP18 podria unir-se a dues regions independents i no contigües de E(z). Una d'aquestes regions es trobaria localitzada en el domini CXC d'E(Z) i l'altra regió, compresa entre els aminoàcids 377-446 de la proteïna, no inclou ni el domini CXC ni el SET. Els autors proposen que aquesta unió contribueix en el correcte plegament i activitat de la proteïna (Wang et al., 2002). Tot i la interacció de la proteïna dSAP18 amb E(z), no sembla que dSAP18 formi part del complex PRC2.

1.2.3 dSAP18 i GAGA

La proteïna GAGA de *Drosophila*, codificada pel gen *Trithorax-like (trl)*, és una proteïna essencial per la viabilitat de la mosca i es troba implicada en múltiples processos. GAGA inicialment va ser definida com a membre del Trx-G ja que es comporta com a regulador positiu de l'expressió dels gens homeòtics (Farkas et al., 1994). Però posteriorment també s'ha vist que GAGA pot unir-se tan *in vitro* com *in vivo* a diversos elements de resposta a polycomb o PREs (regions reguladores on s'uneixen les proteïnes polycomb) del complex bithorax (BX-C), i que és necessària per la seva activitat silenciadora (Hagstrom et al., 1997; Strutt et al., 1997; Horard et al., 2000; Busturia et al., 2001; Hodgson et al., 2001; Mishra et al., 2001; Poux et al., 2002; Mahmoudi et al., 2003).

S'ha descrit que GAGA actua com a factor de transcripció activant l'expressió de gens tals com *hsp70*, *engrailed*, *fushi-tarazzu* i *Ultrabithorax* (Soeller et al., 1988; Granok et al., 1995; Hagstrom et al., 1997; Wilkins and Lis, 1997) i reprimint la seva pròpia expressió (Kosoy et al., 2002). Alhora, GAGA ha estat associada a processos de remodelació de la cromatina en els gens que codifiquen per les proteïnes de resposta a *heat-shock* suggerint que GAGA actuaria com a factor de transcripció mitjançant la regulació de l'estructura de la cromatina (Lehmann, 2004).

El nostre grup va descriure l'associació de dSAP18 i GAGA mitjançant crivellatge de doble híbrid i assajos de *pull down*. Alhora hem descrit que ambdues proteïnes col·localitzen a diverses regions de cromosomes politènics

de *Drosophila*. Una d'elles és la regió del complex Bithorax (BX-C), en concret a l'element Fab-7 que està implicat en la regulació de l'expressió del gen homeòtic *Abdominal-B* (Espinàs et al., 2000; Canudas et al., 2005).

Coincidint amb això també hem vist una interacció genètica: ambdues proteïnes són importants per la regulació de l'expressió del gen *Abd-B*, ja que mosques heterozigotes per una mutació de *trl*⁶⁷ i hemizigòtiques per una deficiència que descobreix el gen *bin-1* mostren una transformació homeòtica del sisè segment abdominal al cinquè, indicant que les cèl·lules del sisè segment han adquirit la identitat de les del cinquè. Aquesta transformació és el resultat d'una pèrdua parcial de la funció de *Abd-B* al segment A6, i per tant, indica una contribució de les proteïnes GAGA-dSAP18 en la regulació de l'expressió d'aquest gen (Espinàs et al., 2000).

En un treball posterior el nostre grup ha demostrat que les proteïnes GAGA, dSAP18 i dRPD3/HDAC1 col·localitzen a elements Fab-7 ectòpics i que mutacions que afecten a *trl*, *dsap18* i *drpd3/hdac1* afecten l'activitat d'aquest element (Canudas et al., 2005).

1.3 ALTRES PROTEÏNES D'INTERACCIÓ AMB SAP18 A ALTRES ORGANISMES MODEL

Un treball a ratolí, posa de manifest que en aquest organisme model s'expressen tres trànscrips de mSAP18 de 0.7 kb, 1.9 kb i 3.5 kb, respectivament (Boehmelt et al., 1998). Aquest estudi, proporciona un anàlisi detallat de l'expressió de mSAP18 en la línia hematopoiètica murina, en concret durant la diferenciació dels precursors hematopoètics (Boehmelt et al., 1998). Aquests autors plantegen que la inhibició dels trànscrips de mSAP18 és essencial per la maduració dels monòcits i els megacariòcits.

Els factors de transcripció Gli són els mediadors intracel·lulars de la proteïna Hedgehog (Hh). La ruta de Hh és clau en el control del creixement cel·lular i l'establiment del patró tissular durant el desenvolupament tan de vertebrats com d'invertebrats (Ingham, 1998). Se sap que la proteïna Suppressor of fused (Sufu) interacciona físicament amb Gli (Pearse et al., 1999) i que és el regulador negatiu de la ruta de Hh (Pham et al., 1995). Dos grups independents descriuen l'associació de SAP18 amb Sufu a ratolí (Cheng and Bishop, 2002; Paces-Fessy et al., 2004). Ambdós treballs proposen que

gràcies a aquesta interacció mSufu reprimiria l'expressió dels gens regulats per Gli perquè es reclutaria el complex Sin3-HDACs a aquests promotors (Cheng and Bishop, 2002; Paces-Fessy et al., 2004).

L'homòleg a *Arabidopsis thaliana* de Sin-3, AtSin3, comparteix una enorme homologia amb la proteïna de mamífers. AtSin3 es troba implicat en la regulació transcripcional dels gens de resposta a estrès per ABA (àcid abscísic) i sequera (Song et al., 2005). A *Arabidopsis* l'ortòleg de SAP18: AtSAP18, que s'expressa a la tija, les fulles i flors, s'indueix de manera important en resposta a estrès salí (Song and Galbraith, 2006). Alhora, mutants de AtSAP18 són hipersensibles al tractament amb NaCl. Aquests autors també demostren mitjançant assaig de doble híbrid que AtSAP18 i la desacetilasa d'histones HDA19 (homòloga de rpd3) interaccionen *in vitro* i *in vivo*, i d'acord amb això demostren que ambdues reprimeixen gens *reporters* en assajos de transfecció a planta. El treball de Song i col·laboradors planteja a *Arabidopsis* un model en el que els ERFs (o Ethylene Responsive element binding Factors) units als gens de resposta a estrès, reclutarien el complex repressor format per SAP18/Sin3-HDA19 a aquests gens produint la repressió transcripcional a través de la desacetilació de les histones (Song and Galbraith, 2006).

1.4 SAP18 EN ALTRES COMPLEXES PROTEICS: EL COMPLEX ASAP

Per caracteritzar l'existència d'altres complexos que incloguin la proteïna SAP18, el mateix grup que va descriure SAP18 en el context del complex Sin3-HDACs, purifica nous complexos a partir d'extractes nuclears de cèl·lules HeLa (Schwerk et al., 2003). Aïllen un nou complex proteic format per la proteïna RNPS1, diferents isoformes de la proteïna Acinus (Acinus-L i Acinus-S) i SAP18. RNPS1 és una proteïna d'unió a RNA implicada en regulació d'*splicing* (Mayeda et al., 1999; Le Hir et al., 2000). Alhora, Acinus és una proteïna que s'expressa en diferents isoformes i que durant l'apoptosi participa en la condensació de la cromatina prèvia a la fragmentació del DNA (Sahara et al., 1999).

Anàlisis funcionals suggereixen que ASAP es trobaria implicat tan en processament d'RNA com apoptosi, ja que la microinjecció del complex en cèl·lules de mamífer després d'un estímul apoptòtic accelera el procés de la mort cel·lular (Schwerk et al., 2003). I per tant, aquest treball planteja ASAP

Introducció

com a un candidat en la regulació de l'*splicing* durant l'execució de la mort cel·lular programada.

2. LA DEFENSA IMMUNE DE *Drosophila melanogaster*

La defensa immune innata constitueix la primera línia de defensa a la infecció. Aquest sistema immune relativament sofisticat es troba conservat evolutivament en plantes i animals. I alhora els vertebrats depenen totalment d'aquest sistema innat, fins que la immunitat adaptativa, la que es caracteritza per la recombinació somàtica dels receptors de les cèl·lules B i T, no s'activa (Hultmark, 2003). *Drosophila* com la resta d'invertebrats només disposa d'immunitat innata i és un dels models on millor s'ha caracteritzat les rutes que configuren aquesta immunitat.

La immunitat innata inclou la utilització de barreres físiques juntament amb respostes immunes locals i sistèmiques. Les primeres, fan referència als epitelis, com els que es troben sota la cutícula, en els conductes alimentaris o traqueals, i que actuen com a barreres físiques a la infecció i com a llocs de defensa local contra patògens produint pèptids antimicrobians i espècies reactives d'oxigen (ROS). En segon lloc, hemòcits especialitzats encarregats de fagocitar i encapsular partícules alienes, però també responsables de la coagulació de l'hemolimfa i de la melanització importants per la cicatrització de ferides, però alhora aquesta última, també per a la inactivació dels patògens. I finalment el *fat body*, un òrgan funcionalment equivalent al fetge dels mamífers, que produeix molècules de resposta humoral entre les que s'inclouen els pèptids antimicrobians (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

2.1 QUI INFECTA *Drosophila melanogaster*: BACTERIS, FONGS, PARÀSITS I VIRUS

Drosophila melanogaster coexisteix a la biosfera amb multitud de microorganismes. Les larves d'aquests insectes es desenvolupen en matèria orgànica en descomposició, alhora, els adults poden actuar com a vectors pels microorganismes provocant malalties a plantes i animals. Això ha provocat que aquests insectes hagin desenvolupat mecanismes suficientment sensibles per reconèixer aquests patògens, i tota una sèrie d'estratègies per defensar-se de l'atac de bacteris, fongs, paràsits i virus (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Entre els bacteris que infecten de forma natural *Drosophila* trobem soques de

Serratia marcescens, *Erwinia carotovora* i *Pseudomonas entomophila* (Flyg et al., 1980; Tzou et al., 2000; Vodovar et al., 2006).

L'estudi de la resposta immune de *Drosophila* a la infecció per fongs s'ha centrat bàsicament en dos microorganismes: *Beauveria bassiana* i *Candida albicans*. La infecció natural per aquests fongs, que s'inicia pel contacte de les espores sobre la cutícula de l'animal, provoca una ràpida activació de les rutes de defensa de l'insecte i la producció de pèptids antifúngics (Lemaitre et al., 1997; De Gregorio et al., 2001; Alarco et al., 2004).

Els *Parasitària* representen la majoria dels himenòpters, i és un grup compost per espècies paràsits d'altres insectes (Carton et al 1986). Com a part del seu cicle de vida, els *parasitària* ponen els embrions en l'hoste (sigui un embrió, una larva o una pupa) i després les larves viuen com a endoparàsits o ectoparàsits segons l'espècie. L'hoste mor quan el paràsit s'apropa a la maduresa. De les aproximadament, 50 espècies conegudes de parasitària de *Drosophila* les que han estat estudiades de manera més extensa són les pertanyents als gèneres: *Leptopilina*, *Asobara* i *Ganapsis* (Carton et al 1986).

Els virus són patògens naturals importants de *D. melanogaster*: el 40% de totes les mosques estan infectades per virus de transmissió horitzontal, tot i que la transmissió vertical també existeix en aquesta espècie (Ashburner M. et al 2005; Brun G. et al 1980). Han estat identificats més de 25 virus diferents que poden infectar *Drosophila*, tots són virus d'RNA (Ashburner M. et al 2005; Habayeb MS et al 2006). Tot i aquesta extensa bibliografia sobre l'associació entre virus i *Drosophila*, la defensa immune a virus només ha estat caracteritzada en resposta als virus *Sigma* i *Drosophila C virus* (DCV), i és clarament diferent a la implicada en la defensa contra microbis o paràsits. Fins avui, l'RNAi i la ruta de JAK/STAT són els únics mecanismes efectors identificats en la defensa immune d'aquest insecte a virus (Dostert et al., 2005; Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Les anteriorment citades són algunes les espècies més importants de bacteris, fongs, paràsits i virus que infecten *Drosophila* de manera natural, però el coneixement que tenim sobre la resposta immune de *Drosophila* està basada principalment en l'anàlisi de la reacció de l'hoste a la injecció de microorganismes no patogènics. És a dir, els treballs que han permès l'estudi i la caracterització de la defensa immune de *Drosophila*, han utilitzat

majoritàriament soques bacterianes d'*Escherichia coli* i *Micrococcus luteus* que són bacteris que no infecten l'insecte de manera natural, però que si són injectats directament a l'organisme activen els mecanismes naturals de defensa (Vodovar et al., 2004). Aquest fenomen rep el nom de ferida sèptica, i una de les principals limitacions que presenta és que la injecció del microorganisme no és la forma habitual d'entrada dels patògens (com seria la infecció oral mitjançant la ingesta) i per tant supera un dels primers mecanismes de defensa que presenta la immunitat innata: les barreres epitelials.

2.2 LA RESPOSTA DEL SISTEMA IMMUNE A LA INFECCIÓ

Tal i com hem dit, la injecció de bacteris en la cavitat corporal indueix activitat antimicrobiana en l'hemolimfa de *Drosophila*. Aquesta activitat persisteix durant diversos dies i pot conferir protecció contra una segona infecció bacteriana (Boman, 1972). Aquesta reacció consisteix en la producció de pèptids antimicrobians (AMPs) per part del *fat body*, el major teixit de resposta immunitària constituint el que s'ha anomenat la resposta sistèmica a la infecció. El *fat body* s'origina a partir del mesoderm durant l'embriogènesi i adquireix la seva competència immunitària a l'inici del primer estadi larvari. Degut a la seva mida i a la seva localització dins el sistema circulatori obert de l'insecte, el *fat body* representa un òrgan poderós per la síntesi i la secreció a l'hemolimfa dels pèptids antimicrobians (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

2.2.1 els efectors immunes

Els AMPs són les molècules més ben caracteritzades que produeix el *fat body* en resposta a la infecció sistèmica. Han estat identificats uns 20 AMPs diferents, que s'agrupen en 7 classes (**Figura I.1**).

Introducció





pèptid	# de gens	principal activitat	concentració	estructura 3D
Diptericina	2	bacteris gram negatiu	0.5 μ M	nd
Attacina	4	bacteris gram negatiu	nd	nd
Drosocina	1	bacteris gram negatiu	40 μ M	
Cecropina	4	bacteris gram negatiu	20 μ M	
Defensina	1	bacteris gram positius	1 μ M	
Drosomicina	7	fongs	100 μ M	
Metchnikowina	1	fongs	10 μ M	nd

Figura I.1. Els AMPs de *Drosophila melanogaster*. Extret de Lemaitre i Hoffmann 2007.

Tots els AMPs són petits (<10 kDa), a excepció d'Attacina (Att) de 25 kDa, catiónics i demostren una àmplia activitat contra bacteris i/o fongs (Imler and Bulet, 2005). Dipetericina (Dpt), Drosocina (Dro) i Attacina són molt efectives contra la infecció de bacteris gram negatius (Wicker et al., 1990; Bulet et al., 1993; Asling et al., 1995). Defensina (Def) és activa contra gram positius (Dimarcq et al., 1994), mentre que Drosomicina (Drs) i Metchnikowina (Mtk) són sobretot agents antifúngics (Fehlbaum et al., 1994; Levashina et al., 1995). Defensina i Cecropina (Cec) han estat descrites en molts insectes, però Drosomicina i Metchnikowina només han estat identificats en els Drosophilidae (Imler and Bulet, 2005). La majoria dels AMPs actuen alterant la membrana bacteriana, tot i que el mecanisme concret en què ho fan es desconeix (Bulet et al., 1999; Meister et al., 2000). Alguns d'aquests AMPs són molt estables, degut a la presència de ponts disulfurs intramoleculars, i poden ser detectats en

l'hemolimfa diverses setmanes després de la infecció (Uttenweiler-Joseph et al., 1998).

Treballs de transcriptòmica i de proteòmica recents han demostrat que després d'una infecció, a més dels AMPs, també s'estimula la producció d'altres pèptids i proteïnes (De Gregorio et al., 2001; Irving et al., 2001; Boutros et al., 2002; Levy et al., 2004a; Levy et al., 2004b; Vierstraete et al., 2004). Alguns d'aquests estan implicats en la regulació del sistema immune pròpiament (components de senyalització). Un altre grup de proteïnes participen en diferents mecanismes de defensa (opsonines, components de melanització i del sistema de coagulació), i un grup addicional inclouria putatius efectors immunes. Entre aquests últims trobem petits pèptids de funció desconeguda secretats pel *fat body*, com són els 17 membres de la família DIM o IM (*Drosophila Immune Molecule*) i les 8 proteïnes Turandot (Uttenweiler-Joseph et al., 1998; Ekengren and Hultmark, 2001; Ekengren et al., 2001; Levy et al., 2004b). Igualment s'ha suggerit la importància de la producció de ROS i del segrest de ferro en el control del desenvolupament microbià (Yoshiga et al., 1999; De Gregorio et al., 2001). El ferro és essencial per la majoria dels microorganismes invasors durant el transcurs de la infecció, i tan les plantes com els animals han desenvolupat estratègies immunes per tal de limitar el ferro disponible als microorganismes (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

2.2.2 Regulació dels AMPs

L'expressió de tots aquests pèptids que es produeix en resposta a la infecció es troba regulada a nivell transcripcional. El clonatge dels gens que codifiquen pels AMPs, seguit pel mapatge dels promotors dels gens de la Cec A1 i Dpt, va revelar la presència de dominis de DNA necessaris per la inducció d'aquests gens en resposta a la infecció. Aquests inclouen una combinació de llocs d'unió a NF- κ B, llocs d'unió GATA i un motiu menys conegut anomenat R1 (Kadalayil et al., 1997; Petersen et al., 1999; Tingvall et al., 2001; Uvell and Engstrom, 2003; Senger et al., 2004). D'entre aquests, els més importants són els lloc d'unió a κ B (Engstrom et al., 1993; Kappler et al., 1993; Meister et al., 1994). El genoma de *Drosophila* codifica per tres proteïnes NF- κ B: Dorsal (Dl), Dif i Relish (Rel). El paper d'aquestes proteïnes en la resposta a la infecció de la mosca va quedar demostrat quan es va veure que mutants de falta de funció

per Dif i Relish morien per infeccions bacterianes (Hedengren et al., 1999; Meng et al., 1999; Rutschmann et al., 2000b). Alhora assajos de *gel shift* demostren que aquestes tres proteïnes s'uneixen a llocs κB i que poden activar alguns gens AMPs en cultius cel·lulars (Ip et al., 1993; Reichhart et al., 1993; Petersen et al., 1995; Gross et al., 1996). Experiments genètics han demostrat que aquests activadors, claus en la regulació dels gens AMPs, formen part de dues rutes de senyalització diferents: la ruta de Toll i la ruta de Imd.

Els factors GATA implicats en la regulació de l'expressió dels gens AMPs són Serpent (Srp) i GATAe. Srp és el principal factor GATA que s'expressa en el *fat body*, i existeixen evidències d'una sinergia entre Rel-Srp per a l'expressió dels gens immunes tals com CecA1 (Petersen et al., 1999). Existeixen evidències de la importància de GATAe en la resposta immune a l'estòmac (Senger et al., 2006). L'expressió ectòpica d'aquest factor al *fat body* indueix l'expressió de gens implicats en la defensa immune (Senger et al., 2006).

2.2.2.1 la ruta de Toll

La ruta de Toll és una via de senyalització conservada evolutivament i que és imprescindible durant el desenvolupament ja que juga un paper clau en l'establiment de l'eix dorso-ventral de l'embrió de *Drosophila* (Belvin and Anderson, 1996). Toll també participa en la resposta immune a gram positius i fongs.

Toll, és una proteïna transmembrana amb dominis rics en leucina a la part extracel·lular, i amb un domini de senyalització intracel·lular semblant al del receptor de l'interleuquina 1 (Schneider et al., 1991). El lligand de Toll, és una citoquina extracel·lular, Spätzle, que es veu activada proteolíticament per una cascada de proteases en resposta a la infecció (Weber et al., 2003) (**figura I.2**). La unió d'aquest lligand a Toll activa una cascada citoplasmàtica que implica els adaptadors Tube i MyD88, i la quinasa Pelle. Això provoca la degradació de Cactus (l'homòleg a *Drosophila* de IκB) via proteosoma permetent així la translocació nuclear de les proteïnes NF-κB: Dif i Dorsal activant la transcripció de gens diana (Belvin and Anderson, 1996; Tauszig-Delamasure et al., 2002). Dif i Dorsal jugarien papers redundants en el control de Drosomicina durant l'estadi larvari, però en canvi no semblaria que Dorsal tingui cap funció en la

resposta immune de l'adult (Lemaitre et al., 1996b). Per tant, probablement el paper principal de Dorsal es trobi en el desenvolupament i el de Dif en la immunitat.

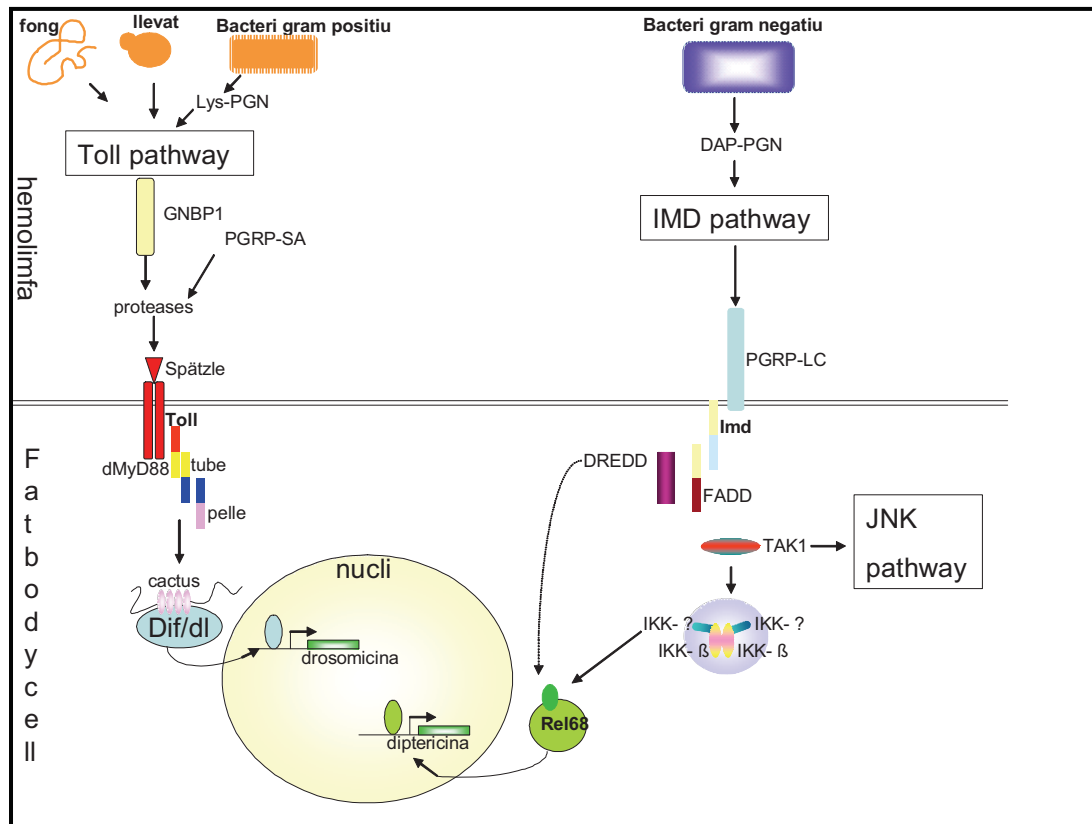


Figura I.2. Les rutes Toll i Imd a *Drosophila melanogaster*

El descobriment que *Drosophila* utilitzi els motius κB i els factors NF- κB per la inducció dels gens AMP va ser importantíssim, ja que va posar de manifest que la resposta immune en mosques i en humans utilitza tan motius reguladors comuns com factors de transcripció NF- κB homòlegs per regular l'activació dels gens immunes (Uvell and Engstrom, 2007).

2.2.2.2 La ruta Imd

La ruta Imd estimula la inducció de Dipterocina i altres pèptids antibacterians en el *fat body* en resposta a la infecció per gram negatius. Això fa que les mosques mutants per aquesta ruta es vegin afectades per bacteris gram negatius però en canvi siguin més resistents a la infecció de gram positius i de fongs que les mutants de Toll (Lemaitre et al., 1995).

La ruta s'inicia amb l'activació del receptor Imd (veure **figura I.2**) i culmina amb l'activació de la proteïna NF- κ B Relish. En resposta a la infecció, la proteïna Relish és processada proteolíticament en dues parts. La part amino (N)-terminal REL-68, capaç d'entrar al nucli i unir-se a elements enhancers κ B dels promotors de gens antimicrobians, entre els que s'inclou Diptericina. L'altre fragment, REL-49, es manté en el citoplasma sense inhibir l'activitat de REL-68. El processament de Relish és independent del proteosoma i requereix la caspasa Dredd (Schneider et al., 1991; Stoven et al., 2000). Dredd actua formant un complex amb la proteïna FADD (*Fas-associated death domain*) un altre component essencial de la ruta (Hu and Yang, 2000; Leulier et al., 2000).

Anàlisis de mutants han identificat una altra quinasa, Tak1 (*transforming growth factor activated kinase 1*), també necessària per l'activació de Relish (Vidal et al., 2001). Anàlisis epistàtics demostren que Tak1 és necessari per l'activació de l'homòleg a *Drosophila* del complex IKK de mamífers. A *Drosophila* existeixen dos membres d'aquest complex, *ird5* i *kenny*, els homòlegs a *Drosophila* de IKK- β i IKK- γ , necessaris per l'activació de Relish (Silverman et al., 2000). L'activació que realitza Tak1 es creu que és la fosforilació de IKK- β . I un cop IKK- β és activa pot fosforilar Relish. Relish fosforilat pot ser processat per la caspasa Dredd i per tant és actiu (Rutschmann et al., 2000a; Lu et al., 2001).

Mutacions que afecten a tots aquests factors generen una deficiència similar a la imd. Mosques mutants per imd no infectades són perfectament viables, i fins ara, no s'ha atribuït a aquesta ruta una funció relacionada amb el desenvolupament (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

2.2.2.3. La ruta JNK

La ruta JNK (jun N-terminal Kinase) també regula varis processos del desenvolupament de *Drosophila* i alhora és important en defensa ja que participa en la cicatrització de les ferides de l'epidermins (Ramet et al., 2002a; Galko and Krasnow, 2004). Mitjançant experiments de *microarrays* a cèl·lules S2, s'ha vist que la quinasa Tak1 necessària per l'activació de Relish activa també la ruta de JNK en resposta a la infecció bacteriana (Boutros et al., 2002).

JNK regula gens implicats en l'organització del citoesquelet necessària per l'activació dels hemòcits (Boutros et al., 2002), i participa en la regulació de l'expressió dels AMPs en el *fat body* (Kallio et al., 2005; Delaney et al., 2006).

2.2.2.4. la ruta JAK/STAT

La ruta JAK/STAT va ser identificada originàriament per la seva implicació en la segmentació de l'embrió, i consta principalment de tres components cel·lulars: el receptor Domeless (Dom), la quinasa Janus (JAK) Hopscotch (Hop), i el factor de transcripció STAT (Agaisse and Perrimon, 2004). La primera evidència de la implicació d'aquesta ruta en la immunitat dels insectes va sorgir d'estudis fets en el mosquit *Anopheles*, indicant que després d'una infecció la proteïna STAT s'acumula en el nucli (Barillas-Mury et al., 1999).

Mosques mutants per aquesta ruta són resistents a la infecció de bacteris i fongs, i expressen un perfil normal d'AMPs. Però, en canvi, són més sensibles a la infecció pel virus DCV, per tant, semblaria que seria una ruta més important per la defensa contra aquests agents infecciosos i no tan per la resposta a bacteris o fongs. Alhora, s'ha suggerit que aquesta ruta participaria en la producció de molècules de senyalització del sistema immune (citoquines) que promourien la fagocitosi (opsonines) i la proliferació i la diferenciació d'hemòcits (Agaisse and Perrimon, 2004). La ruta JAK/STAT realitzaria aquestes funcions a *Drosophila* induint en el *fat body* l'expressió de diversos gens, com és el cas del gen de resposta a estrès *totA*, així com *Tep1*, un gen que codifica per una proteïna que actuaria com a una opsonina (Boutros et al., 2002).

2.3 PATRÓ DE RECONeixEMENT I ACTIVACIÓ DE LA SENYALITZACIÓ DE Toll I Imd

El fet que la infecció de bacteris gram positius, gram negatius i fongs doni lloc, en cada cas, a l'expressió de diferents AMPs, indica que ha d'existir un mecanisme de reconeixement microbià que pugui diferenciar entre aquests diferents tipus d'agents invasors i activar de manera selectiva les rutes de Toll i de Imd (Lemaitre et al., 1997). En els darrers anys hem anat obtenint coneixements sobre com diferents microorganismes són reconeguts i com

promouen l'activació de la ruta adequada. Aquesta tasca s'assigna als receptors de reconeixement (PRRs o *pattern recognition receptor*) que reconeixen diferents components microbians (Janeway, 1989). Existeixen dues famílies de PRRs a *Drosophila*: les proteïnes de reconeixement de peptidoglicans (PGRPs o *peptidoglycan recognition proteins*) i les proteïnes d'unió a gram negatiu (GNBPs o *gram-negative binding protein*).

El genoma de *Drosophila* codifica per 13 PGRPs (Werner et al., 2000), i tres d'aquests han estat implicats fins ara en l'activació de respostes immunes específiques, els anomenats PGRP-SA, PGRP-LC i PGRP-LE. En *screenings* de mutants de sistema immune, Michel i col·laboradors (Michel et al., 2001) van aïllar un mutant anomenat *semmelweis* (*seml*). Aquest mutant és extremadament sensible a la infecció per gram positius, i és incapaç d'induir l'expressió de drosomicina. En canvi, la resposta d'aquest mutant a bacteris gram negatiu i a fongs és la mateixa que mosques salvatges. *Semmelweis* és portador d'una mutació a un dels receptors PGRP: PGRP-SA, i per tant aquesta proteïna de *Drosophila* és important per l'activació de la ruta de Toll en resposta a la infecció per bacteris gram positius. Aquest descobriment plantejava una idea molt interessant: existeixen mecanismes alternatius capaços de reconèixer patògens diferents i induir l'activació de rutes de defensa específiques contra aquests patògens. Aquesta idea va ser confirmada amb l'anàlisi d'un altre membre de la família, PGRP-LC. Mitjançant experiments genètics es va veure que PGRP-LC actua per sobre la proteïna Imd i que mutants per aquesta proteïna són sensibles a la infecció per bacteris gram negatiu però no per bacteris gram positius o fongs. Així doncs, PGRP-LC és necessària per l'activació de la ruta Imd en resposta a la infecció per gram negatiu (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002; Ramet et al., 2002b).

Alhora, l'efecte de la mutació PGRP-LC no és tan dramàtica com per altres components de la ruta de Imd (Gottar et al., 2002), això implica l'existència d'altres receptors pel reconeixement de gram negatiu. La sobreexpressió de PGRP-LE provoca l'activació de la ruta Imd però no la de Toll (Takehana et al., 2002). Això confirma la hipòtesi de l'existència de diversos PGRPs que cooperarien alhora de reconèixer els microorganismes que infecten *Drosophila* (Leclerc and Reichhart, 2004).

Els peptidoglicans, els lligands dels PGRPs, són polímers de glicans que alternen molècules de N-acetilglucosamina i àcid N-acetilmuràmic *crosslinkades* per petits pèptids. La majoria de peptidoglicans de gram positius contenen L-Lys en aquests pèptids (Lys-PGN), en canvi, els PGN de gram negatius contenen àcid diaminopimèlic (DAP-PGN). El sistema immune de *Drosophila* és capaç de discriminar entre aquests dos tipus de PGN, en concret, PGRP-SA reconeix els de tipus Lys i PGRP-LC i PGRP-LE reconeixen els de tipus DAP, activant en cada cas la ruta Toll o Imd respectivament (Takehana et al., 2002; Gobert et al., 2003; Leulier et al., 2003; Kaneko et al., 2004; Stenbak et al., 2004; Takehana et al., 2004).

Aquests resultats van ser molt sorprenents, ja que a vertebrats el reconeixement dels bacteris gram negatius té lloc a través dels lipopolisacàrids (LPS), els component majoritari de la membrana externa d'aquests bacteris (Beutler and Rietschel, 2003). I per tant, aparentment és diferent a insectes, on els DAP-PGN és el principal inductor de la resposta immune innata després de la infecció per bacteris gram negatius.

L'existència de PGRP-SA, PGRP-LC i PGRP-LE és suficient per explicar la resposta de *Drosophila* a bacteris gram positius i gram negatius, i els fenotips de mutants no estarien a favor d'una possible redundància amb la resta de membres de la família PGRP. Per tant, encara no és massa coneguda la funció de la resta de membres de la família PGRP, però alguns sembla que estarien implicats en la resposta immune local que explicarem més tard (Leclerc and Reichhart, 2004).

Altres PRRs identificats a *Drosophila* són la família GGBP (*gram negative binding protein*) (Kim and et al., 2000). Van ser anomenats així perquè assajos *in vitro* mostren que GGBP1 s'uneix eficientment a lipopolisacàrids (LPS) i β -1,3-glucans (un component de la paret cel·lular fúngica) i no a Lys-PGN (Kim and et al., 2000). D'aquí, que s'hipotetitzés que GGBP1 seria una proteïna capaç de detectar fongs o potser bacteris gram negatius. Malgrat això el mutant de GGBP1 anomenat osiris, mostra una resposta normal a bacteris gram negatius i a la infecció per fongs, però és incapaç de sobreviure a la infecció per bacteris gram positius i d'activar la ruta de Toll (Leclerc and Reichhart, 2004).

Les molècules responsables del reconeixement fúngic són encara desconegudes. Estudis recents també proposen a altres proteïnes GGBP com les implicades en la detecció fúngica (Bangham et al., 2006). En concret, mutants per GGBP3 són més sensibles a la infecció fúngica i són incapaços d'activar la ruta de Toll (Gottar et al., 2006) en comparació amb mosques salvatges. Per tant aquest és un bon candidat per ser el PRR que promou la resposta antifúngica a *Drosophila*.

2.4 LA IMMUNITAT LOCAL A *Drosophila*

Degut al fet que les barreres epitelials es troben en contacte constant amb un elevat nombre de microorganismes, aquestes superfícies han d'estar equipades amb sistemes suficientment eficients de reconeixement i control microbià. A *Drosophila*, tan l'estómac com la tràquea que són dues vies importants d'infecció, es troben alineades amb la matriu de quitina. Al mateix temps, el lumen de l'estómac, és un lloc hostil pel creixement de microorganismes degut a les seves particularitats físiques i fisiològiques i a la secreció de lisozim (Hultmark, 1996). A més, la producció local d'AMPs i de ROS proporciona dos mecanismes induïbles complementaris a l'estómac (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

2.4.1 Expressió local d'AMPs

A *Drosophila*, l'anàlisi de mosques transgèniques portadores de *reporters* GFP ha demostrat que els gens AMPs s'expressen en les diverses superfícies epitelials que es troben en contacte amb l'exterior (Ferrandon et al., 1998; Tzou et al., 2000). Entre aquestes trobem l'epidermis, el sistema reproductor, el tracte respiratori i el tracte digestiu. A diferència de la resposta sistèmica que produeix el *fat body* aquesta síntesi d'AMPs rep el nom de resposta immune local. Els epitelis poden tenir una expressió d'AMPs constitutiva o induïble. En el primer cas, el gen AMP s'expressa constitutivament, i la seva transcripció no es veu alterada en resposta a la infecció microbiana. És el cas de Drosomicina a les glàndules salivals i a l'espermateca de les femelles, i de la Cecropina en el conducte ejaculador dels mascles (Tzou et al., 2000). Aquesta expressió constitutiva no es troba regulada per rutes NF- κ B, sinó per diversos factors de transcripció específics

de teixit, tals com la proteïna Caudal (Han et al., 2004; Ryu et al., 2004).
 Alhora, en femelles verges, l'aparellament indueix l'expressió d'alguns gens AMP (Peng et al., 2005).

La inducció de l'expressió local de gens AMP té lloc després de la infecció per Gram negatius i ve regulada per la ruta Imd (Tzou et al., 2000; Onfelt Tingvall et al., 2001). Per exemple, Drosomicina i Diptericina s'indueixen tan a la tràquea com a l'estómac a través de la ruta Imd en resposta a la infecció local per bacteris tals com *Erwinia carotovora* (Basset et al., 2000). Igual com la resposta sistèmica, la resposta local ve activada a través del reconeixement de PGN de gram negatius per PGRP-LC (Zaidman-Remy et al., 2006).

Fins ara, no s'ha demostrat la implicació de la ruta Toll en la resposta immune local (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

2.4.2 La producció de ROS

A *Drosophila*, tal i com passa a mamífers, la infecció natural per bacteris indueix una síntesi ràpida de ROS (veure figura I3).

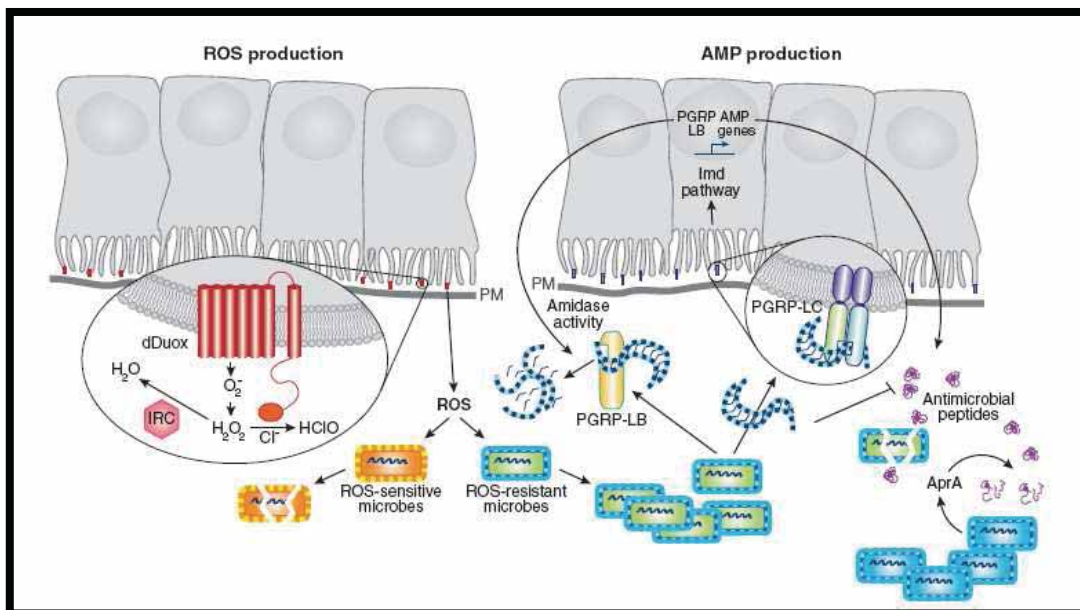


Figura I.3. La resposta immune a l'estómac. A l'esquerra veiem la producció de ROS i a la dreta la producció d'AMPs, els dos mecanismes s'indueixen alhora de combatre la infecció. De Lemaitre i Hoffmann 2007.

Les proteïnes Duox formen una família conservada de molècules que contenen, a part d'un domini NADPH, un domini N-terminal extracel·lular amb activitat peroxidasa (PHD) que pot produir ROS de manera regulada (Ritsick et al., 2004). La inactivació del gen Duox per RNAi bloqueja la producció de ROS a l'estómac de mosques infectades, suggerint que aquest enzim és l'únic implicat en la síntesi de ROS a l'epiteli (Ha et al., 2005a). Mosques amb RNAi de Duox moren ràpidament al infectar-se amb el bacteri gram negatiu *E.carotovora*, i aquesta letalitat s'associa a la incapacitat per controlar el creixement bacterià.

La producció excessiva de ROS, que resulta mortal per l'hoste, s'evita a *Drosophila* per la catalasa IRC (*immune responsive catalase*). El silenciament de IRC per RNAi provoca una producció major de ROS i la letalitat de la mosca, indicant que IRC proporciona el sistema de defensa antioxidant a la mosca (Ha et al., 2005b).

Els fenotips de IRC i Duox demostren que un equilibri redox fi és crític pel control dels microorganismes en el lumen de l'estómac. Aquesta immunitat dependent de ROS no es veu afectada per la ruta de Imd, i per tant, proporciona una barrera addicional contra els microorganismes ingerits (Ryu et al., 2006).

2.5 LA RESPOSTA CEL·LULAR A LA INFECCIÓ

La cavitat corporal de *Drosophila*, igual com la d'altres artròpodes, es troba plena d'una hemolimfa circulant que conté tan cèl·lules lliures com cèl·lules sèssils que reben el nom d'hemòcits. Els hemòcits, entre altres funcions, també participen en la resposta immune de *Drosophila*.

2.5.1 Origen dels hemòcits o hematopoiesi

Diversos treballs han demostrat les similituds entre el desenvolupament hematopoietic de *Drosophila melanogaster* i de vertebrats, posant de manifest que les rutes de senyalització i els factors de transcripció que regulen la proliferació, la diferenciació i el compromís de llinatge es troben conservades. Degut a aquest fenomen, *Drosophila* ha estat i continua sent un sistema interessant per descriure els mecanismes genètics i moleculars bàsics que regulen aquest procés (Evans et al., 2003).

L'hematopoesi de *Drosophila* pot ser descrita com un procés de desenvolupament bifàsic que serveix per poblar l'embrió, la larva i l'adult amb cèl·lules sanguínies madures. Les cèl·lules sanguínies de *Drosophila*, o hemòcits, estan implicades almenys en dos grans processos: el desenvolupament i la immunitat. Durant el desenvolupament, els hemòcits són els encarregats de localitzar i eliminar les cèl·lules mortes i alhora secretar i restaurar la matriu extracel·lular (MEC) de components crítics per la morfogènesi (Fessler et al., 1994; Murray et al., 1995; Franc et al., 1996). En la immunitat, els hemòcits medien la resposta humoral, on aquests actuen com a sentinelles monitoritzant els patògens de l'ambient i senyalitzant al *fat body* (de la larva) per tal que aquest teixit produeixi els AMPs (Tzou et al., 2002; Agaisse et al., 2003; Hetru et al., 2003). Els hemòcits també contribueixen a la immunitat, tan sistèmica com cel·lular, secretant AMPs i fagocitant i encapsulant invasors estranys (Nappi, 1975; Samakovlis et al., 1990; Franc et al., 1996; Elrod-Erickson et al., 2000).

Alhora, han estat identificades diverses mutacions que a *Drosophila* provoquen la proliferació aberrant i fenotips de diferenciació que recorden als desordres sanguinis que coneixem de vertebrats (Dearolf, 1998). A més, aquests desordres sovint s'associen amb la producció de masses cel·lulars que són negres degut a la melanització i que reben el nom de tumors melanòtics (Ghelelovitch, 1969; Gateff, 1994).

El desenvolupament dels hemòcits segueix dues fases diferenciades tan temporal com espacialment. L'hematopoesi a *Drosophila* s'inicia durant el desenvolupament de l'embrió quan els hemòcits deriven del mesoderm procefàlic i migren al llarg de l'embrió. Tot això és degut a l'expressió de *Serpent* (*Srp*), un factor de transcripció GATA necessari pel desenvolupament hematopoiètic (Tepass et al., 1994; Rehorn et al., 1996; Lebestky et al., 2000). L'expressió de *Srp* i la posició relativa dins l'embrió defineix a aquestes cèl·lules com a prohemòcits.

Una segona onada hematopoiètica s'inicia durant l'estadi larvari en un òrgan especialitzat, que s'anomena la glàndula limfàtica, que es forma durant l'embriogènesi i es manté fins a l'inici de la metamorfosi (Rugendorff et al., 1994). Durant l'estadi de pupa, aquest òrgan degenera i allibera tots els

hemòcits a la circulació (Robertson, 1936). Tot i que l'adult té hemòcits, no s'ha descrit cap òrgan hematopoiètic per aquest estadi del desenvolupament.

2.5.2 Tipus d'hemòcits a *Drosophila melanogaster*

La classificació dels hemòcits es base en característiques morfològiques i funcionals (Cuento, Hollande, Wigglesworth, Yeager, Gupta). La nomenclatura específica dels hemòcits madurs de *Drosophila* va ser utilitzada per primer cop al voltant dels anys 50 per T.M. Rizki (1956).

2.5.2.1 Prohemòcits

Els prohemòcits són les cèl·lules precursors dels hemòcits, i tan els del mesoderm del cap igual com els d'estadis més tardans de l'embrió o de la glàndula limfàtica de la larva, es caracteritzen per ser cèl·lules d'entre 4-6 µm de diàmetre i amb pocs trets característics. Generalment, tenen poc volum citoplasmàtic però tenen ribosomes i moltes gotes lipídiques (Tepass et al., 1994; Lanot et al., 2001). Igualment són cèl·lules poc definides pel que fa a marcadors genètics.

2.5.2.2 Plasmatócits

Els plasmatócits representen els hemòcits més abundants en tots els estadis del desenvolupament, representant entre el 90-95% de tots els hemòcits circulants (**figura I.4**) (Rizki, 1956). Requereixen per la seva correcta diferenciació l'expressió dels factors de transcripció Gcm (Glial-cells-missing) i generalment apareixen com a cèl·lules relativament rodones d'entre 8-10 µm de diàmetre amb més volum citoplasmàtic que els prohemòcits (Bernardoni et al., 1997; Lebestky et al., 2000; Lanot et al., 2001). El citoplasma dels plasmatócits sovint conté un elevat nombre de lisosomes i de reticle endoplasmàtic, la qual cosa concorda amb les seves funcions fagocítiques i secretores. La funció principal dels plasmatócits és la fagocitosis, i són equivalents als macròfags de mamífers (Tepass et al., 1994; Bangs et al., 2000; Lanot et al., 2001). En aquest sentit, els plasmatócits fagociten i degraden cèl·lules mortes així com patògens invasors. La capacitat d'aquestes cèl·lules de reconèixer cèl·lules apoptòtiques ve mediada per Croquemort (Crq), un membre de la família de receptors CD36 que també reconeix cèl·lules apoptòtiques en mamífers (Franc

et al., 1996). El reconeixement de patògens implicaria varis receptors, d'entre aquests PGRP-LC, que reconeix bacteris gram negatius (Ramet et al., 2002b). Els plasmatoïcits també secreten pèptids antimicrobians, com la Cecropina A1, la Drosomicina i la Dipterocina, contribuint així en la funció del *fat body* en la immunitat sistèmica (Samakovlis et al., 1990; Dimarcq et al., 1997; Roos et al., 1998). Alhora, els hemòcits madurs també són capaços de senyalitzar al *fat body* a través de la secreció de Unpaired-3, un lligand que activa la ruta de JAK-STAT i que promou la síntesi de pèptids antimicrobians (Agaisse et al., 2003).

2.5.2.3 Crystal cells

Les *crystal cells* són cèl·lules més grans que els plasmatoïcits (10-12 μm) i el seu nom deriva de les inclusions cristal·lines que contenen (**figura I.4**) (Rizki et al., 1980; Shrestha and Gateff, 1982; Lanot et al., 2001). Les *crystal cells* representen la resta dels hemòcits circulants, no són cèl·lules fagocítiques sinó que funcionen en el procés de la melanització, aquest procés facilita la immunitat innata i la cicatrització de les ferides (De Gregorio et al., 2002; Ramet et al., 2002a). Al contrari que pels plasmatoïcits, no trobem cap equivalència d'aquestes cèl·lules a mamífers. Molecularment, aquestes cèl·lules es caracteritzen perquè expressen els factors de transcripció Lozenge i profenoloxidasa A1 (Lebestky et al., 2000; Duvic et al., 2002; Fossett et al., 2003).

Es creu, que les inclusions de les *crystal cells* consisteixen en masses d'un o més components de la cascada enzimàtica de la melanització, anomenats enzims de la profenoloxidasa, que són semblants als enzims tirosinasa de vertebrats (Soderhall and Cerenius, 1998) (Ridky and Ridky, 1985).

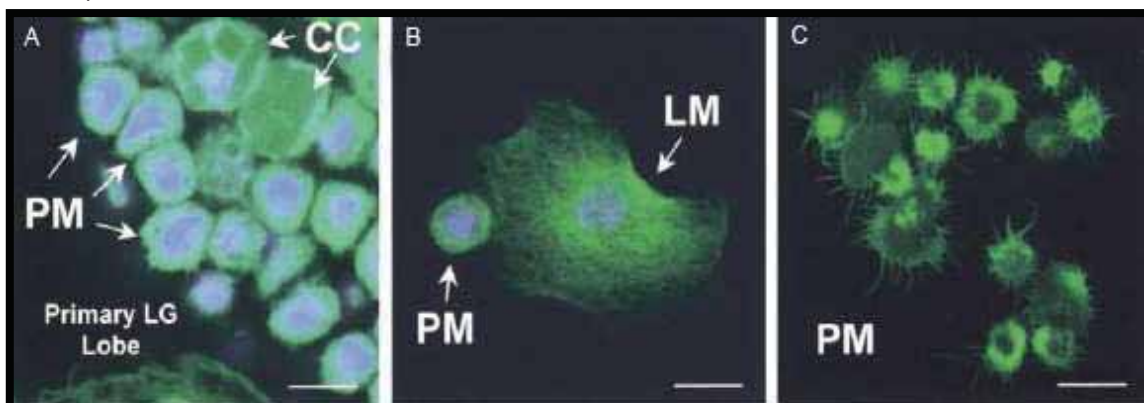


Figura I.4. Hemòcits presents a la glàndula limfàtica. Imatges de confocal en les quals els hemòcits expressen GFP. A) En aquesta imatge es pot veure la diferència en la morfologia dels plasmàtòcits (PM) i les *crystal cells* (CC). B) els lamel·lòcits (LM) són molt més grans que els plasmàtòcits. C) els plasmàtòcits són cèl·lules adhesives i poden presentar projeccions filamentoses. La barra correspon a 10 µm.

Imatges de Evans CJ. et al. (2003).

2.5.2.4 Lamel·lòcits

Els lamel·lòcits són cèl·lules grans (d'entre 15-40 µm de llarg), sense inclusions, i són cèl·lules adherents que participen principalment en l'encapsulació i la neutralització d'objectes massa grans per ser eliminats pels plasmàtòcits (**figura I.4**) (Nappi, 1975; Rizki and Rizki, 1992). No són cèl·lules fagocítiques (Lanot et al., 2001). Els lamel·lòcits poden ser fàcilment identificats per la seva gran mida i per l'expressió d'un antigen que és reconegut per l'anticòs monoclonal L1 (Asha et al., 2003).

En situacions normals, l'hemolimfa de *Drosophila* disposa de pocs lamel·lòcits (Luo et al., 2002), tot i això, quan és necessària una resposta immune el nombre de lamel·lòcits ràpidament augmenta. Per exemple, la parasitosi per la vespa *Leptopilina boulardi* inicia una ràpida diferenciació dels lamel·lòcits (Nappi, 1975; Rizki and Rizki, 1992; Carton and Nappi, 2001).

2.5.3 Funcions de les cèl·lules hematopoiètiques

2.5.3.1 Fagocitosi

La fagocitosi és un procés conservat evolutivament per a l'eliminació dels patògens invasors i els cossos apoptòtics. Durant el desenvolupament és important per la correcta remodelació tissular (Aderem and Underhill, 1999). A *Drosophila* els plasmàtòcits són els fagòcits professionals de la resposta immune. Per tal que tingui lloc la fagocitosi, receptors de la superfície de la cèl·lula han de reconèixer el patògen invasor o el cos apoptòtic. Alguns estudis han demostrat diferents proteïnes conservades, entre les que s'inclouen factors similars als del complement, receptors de reconeixement de patògens i proteïnes del citoesquelet necessàries per la correcta fagocitosi (Ramet et al., 2001; Pearson et al., 2003; Kocks et al., 2005; Moita et al., 2005; Ulvila et al.,

2006). L'activació dels receptors de la superfície indueixen rutes de senyalització intracel·lulars que porten a la remodelació del citoplasma necessària per a la internalització, la maduració del fagosoma i la dissolució de la partícula (Williams, 2007).

2.5.3.2 Encapsulació

A *Drosophila* quan un agent invasor és reconegut com a estrany els hemòcits circulants l'han d'eliminar per fagocitosi i/o per encapsulament. Les cèl·lules encarregades de realitzar aquest encapsulament són, com ja hem dit anteriorment els lamel·lòcits. Aquests, quan detecten un cos susceptible de ser encapsulat indueixen en poques hores, a través de molècules de senyalització desconegudes, una reacció cel·lular intensa a la glàndula limfàtica que es tradueix amb un increment en la proliferació i una massiva diferenciació dels prohemòcits a lamel·lòcits (Jung et al., 2005). Els lamel·lòcits són alliberats i formen una càpsula al voltant de l'invasor i la seva posterior melanització. Dins aquesta càpsula el paràsit mor possiblement degut a la producció local de productes citotòxics tals com ROS i intermediaris de la cascada de melanització (Nappi et al., 1995).

2.5.3.3 Coagulació i Melanització

El trencament físic de la cutícula dels artròpodes indueix de manera immediata la coagulació de l'hemolimfa i la melanització.

2.5.3.3.1 La coagulació

La coagulació és crítica alhora de limitar la pèrdua de l'hemolimfa i iniciar la curació de la ferida en insectes i vertebrats. També és una important defensa immune, ja que es forma ràpidament una segona barrera a la infecció, s'immobilitzen els bacteris i es promou la seva mort. A *Drosophila* quan es produeix una ferida ràpidament es genera en aquest lloc un coàgul compost de fibres que atrapen hemòcits. Aquesta reacció és independent de melanització perquè també es produeix en absència dels enzims implicats en aquesta ruta (pro-fenol oxidases o pro-PO) (Scherfer et al., 2004). Passos posteriors de la coagulació inclouen melanització i moviments epitelials (Ramet et al., 2001; Galko and Krasnow, 2004). Un gen que s'expressa als plasmatòcits,

Hemolectin (Hml), és necessari per la correcta formació del coàgul a *Drosophila* (Goto et al., 2003; Scherfer et al., 2004). La proteïna Hemolectin és gran, amb diversos dominis que comparteix amb altres proteïnes implicades en la coagulació i és el component principal de les fibres. Existeixen altres proteïnes implicades en la formació del coàgul, com Fondue, que és una proteïna molt abundant a l'hemolimfa i que es troba regulada per la ruta de Toll. Fondue, al contrari que Hemolectin no estaria implicat en la formació de les fibres, sinó en el posterior entrecruament d'aquestes.

2.5.3.3.2 La melanització

Una resposta immune immediata de *Drosophila* és la reacció de melanització que s'observa a la cutícula al lloc de la ferida o a la superfície dels paràsits que envaeixen l'hemocel. Aquesta reacció és el resultat de la síntesi *de novo* i la posterior deposició de melanina. La melanització és molt important en la defensa immune d'artròpodes, tan en la curació de les ferides, l'encapsulació i el segrest dels microorganismes com en la producció d'intermediaris tòxics que es creu que maten els microorganismes invasors (Ashida, 1990; Nappi and Vass, 1993; Soderhall and Cerenius, 1998). La melanització requereix l'activació de proPO, un enzim que catalitza l'oxidació dels mono- i difenols a ortoquinones, les quals polimeritzen donant lloc a la melanina. La proPO inactiva és activada proteolíticament per una cascada enzimàtica que en altres insectes s'ha vist que pot venir promoguda per ferides o pel reconeixement dels PRRs de lligands microbians (Ochiai and Ashida, 1999; Ma and Kanost, 2000; Ochiai and Ashida, 2000; Lee et al., 2003).

El genoma de *Drosophila* codifica per tres pro-PO: DoxA1 (Difenol oxidasa A1), DoxA3 (Difenol oxidasa A3) i CG8193. DoxA1 i CG8193 s'expressen a les *crystal cells*, mentre que DoxA3 s'expressa exclusivament a lamel·lòcits i com a conseqüència participarà a la melanització que es produeix després de l'encapsulació (Irving et al., 2005). En canvi, la melanització als llocs on s'ha produït una ferida ve mediada exclusivament per les *crystal cell* i es troba afectada en tres mutants clàssics d'hemòcits: *domino*, que no té hemòcits (Braun et al., 1998), *black cells* que tenen *crystal cells* aberrants i lozenge que no presenten *crystal cells* (Rizki et al., 1980). Cap de les rutes del sistema immune clàssiques (Toll, Imd, JAK-STAT) es troben implicades en

l'alliberació ràpida de PO (fenol oxidasa) per les *crystal cells* (Bangham et al., 2006).

2.5.3.3.3 Els tumors melanòtics

Els tumors melanòtics es caracteritzen per l'aparició de cossos negres, tan en suspensió com adherits dins la cavitat corporal, o units als òrgans interns (Sparrow, 1978; Minakhina and Steward, 2006). Aquests tumors no invasius són rars en mosques salvatges però poden ser habituals en alguns fons genètics. Les càpsules melanòtiques comparteixen molts trets amb les càpsules que es formen al voltant dels paràsits, ja que contenen capes de lamel·lòcits melanitzats. Watson proposa una classificació dels tumors melanòtics en dos grups (Watson et al., 1991). La primera classe inclouria mutants en que els tumors melanòtics són el resultat d'una "resposta autoimmune" o la resposta d'un sistema immune aparentment normal a un teixit diana anormal. La segona classe inclou mutants que presenten una sobreactivació dels hemòcits responsables de la formació de les càpsules. Moltes mutacions que activen el sistema immune de la mosca (tals com Toll o JAK) pertanyen a aquesta classe (Hanratty and Dearolf, 1993; Lemaitre et al., 1996a).

OBJECTIUS

OBJECTIUS

Els objectius que ens hem plantejat en aquesta tesi són:

- 1) Determinar el patró d'expressió de la proteïna dSAP18 al llarg del cicle de vida de *Drosophila melanogaster* i la seva localització.
- 2) Identificar processos funcionals en els quals participi la proteïna dSAP18 en aquest organisme model.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1 DNAs plasmídics utilitzats en aquesta tesi

1.1.1 Vectors de clonatge

- a) pActPPA: Conté la seqüència del promotor mínim de l'actina 5C que és un promotor constitutiu, i una seqüència terminadora.
- b) pBluescript SK(+/-) (Stratagene)
- c) pCaSpeR4 (Dr. Pirrotta)
- d) pET14b (Novagen) Aquest plasmidi porta incorporat la seqüència de l'6XHis-tag, permet la seva fusió a l'extrem N-terminal de la proteïna recombinant.
- e) pTOPO-TA (Invitrogen) per a clonar productes de PCR amb adenines protuberants.
- f) pUASP (Rorth, 1998)
- g) pWiz (Lee and Carthew, 2003)

1.1.2 Plasmidis generats

- a) pActPPA-SAP: es va digerir la construcció pBS-SAP amb Bam HI i Kpn I i l'insert corresponent a la regió codificant per dSAP18 es va clonar en un vector act-PPA digerit també amb Bam HI i Kpn I.
- b) pBS-GFP: s'ha clonat tota la seqüència codificant per GFP al vector pBS digerit amb Xba I i Pst I.
- c) pBS-SAP18: s'ha clonat el producte de PCR de tota la seqüència codificant per dSAP18 introduint un lloc Nde I a l'inici de transcripció al vector pBS digerit amb Eco RV i Hind III.

Materials i Mètodes

d) pCaSpeR-SAP18-HA: es digereix la construcció pGEM-SAP-HA (prèviament generada al laboratori) amb Eco RI amb el que s'allibera l'insert corresponent al promotor i la seqüència codificant per dSAP18 fusionada a un *tag* d'hemaglutinina. Això es clona a un vector pCASPER linealitzat amb Eco RI.

e) pET14b-SAP: es va digerir la construcció pBS-SAP18 amb Nde I i Xho I, i l'insert corresponent a dSAP18 es va clonar a un vector pET14b digerit amb Nde I i Xho I.

f) pUASP-RNAi dSAP18: es digereix la construcció pWIZ-RNAi dSAP18 amb Xba I i Not I per alliberar l'insert i es clona a un vector pUASP digerit amb Xba I.

g) pWIZ-RNAi dSAP18: s'amplifica la seqüència codificant per dSAP18 introduint dianes Xba I a ambdós extrems a partir del vector pBS-SAP18 i es clona a un vector pTOPO-TA. Es digereix aquest vector pTOPO-dSAP18 amb Xba I i es clona l'insert (que correspon a dSAP18) a un vector pWIZ digerit amb Nhe I. Un cop clonat i comprovada la orientació de l'insert es digereix la construcció pWIZ-SAP amb Avr II i tornem a clonar l'insert corresponent a dSAP18. Hem comprovat amb Bam HI que s'han clonat els dos inserts a ambdós costats de l'intró de pWIZ i en les orientacions correctes.

1.2 Línies cel·lulars i soques de *Drosophila melanogaster*

1.2.1 Línies bacterianes

Les soques bacterianes d'*Escherichia coli* utilitzades per la transformació i amplificació de DNA plasmídic han estat:

- DH5 α (*deoR endA1 gyrA96 hsdR17 (r_K⁻m_K⁺)recA1 relA1 supE44 thi1F'* [*traD36 proAB⁺ lac1^q lacZ Δ M15*]).
- HB101 (*supE44 hsdS20 (r_Bm_B⁻) recA13 ara14 proA2 lacY1 galk2 rpsL20 xyl-5 mtl-1*).

La soca bacteriana d'*Escherichia coli* utilitzada per l'expressió de proteïnes ha estat:

- BL21 (DE3) (*BF⁻ dcm ompT hsdS (r_Bm_B⁻) gal λ (DE3)*).

1.2.2 Línies cel·lulars eucariotes

En alguns dels experiments que hem realitzat hem utilitzat cèl·lules en cultiu de *Drosophila melanogaster*, en concret cèl·lules SL2. Aquestes deriven de teixits embrionaris de la mosca, tenen un aspecte esfèric i creixen tan enganxades a la superfície del recipient on es troben com en suspensió.

1.2.3 Soques de *Drosophila melanogaster*

Les diferents línies utilitzades en aquest treball es descriuen amb detall a l'apartat 1 dels resultats d'aquesta tesi.

1.3 Oligonucleòtids

En aquesta tesi s'han utilitzat oligonucleòtids sintetitzats per SIGMA, la seqüència dels quals es relaciona en les següents taules:

OLIGOs RT-PCR	SEQÜÈNCIA (5'→3')
actin-U	GCTCTGGCGGGGCAATGAT
actin-L	TCTGGCACCCACACCTTCTACAATG
Bc-U	GTCACCTTGAGGAATTCG
Bc-L	CAGGCACCAAATCAACTG
Dif-U	GATCCCTTCAATGCCAAATTC
Dif-L	CTCCATCTTGATATCCTGCAC
dl-U	CGAAAAATGTGCGAAAGAAGC
dl-L	CTCGCTCTCCATGAATACTTG
Drs-U	ACTTGTTGCGCCCTCTTCGCT
Drs-L	GCACACACGACGACAGGTCTC
Dpt-U	ATATGGACAGCACTTGGGAGGA
Dpt-L	GAAGGTTCTCTCGACAGTTTAC
GATAe-U	CCCAAGTTACCAATTTTCGTC
GATAe-L	TGCTGCTCCTGCTGCTCATC
Hml-U	CATCCAAGTTTATTTCGCACA
Hml-L	TCCGTGAACATTATCGCAAG
IM2-U	GCTGTTCCCCTGTCCGCC
IM2-L	CTTTCCTACTTTCCTACTTTC
Mtk-U	GCCACCGAGCTAAGATGCAAC
Mtk-L	CATCAGCAGTGTGAATTTCCC
Tig-U	GGATTTGACGAGGTGAAGAA
Tig-L	ACACCAACTTTCCTCGTCTGC

Taula M.1. Oligonucleòtids utilitzats en els assajos de RT-PCR.

OLIGOs <i>real time</i>-PCR	SEQÜÈNCIA (5'→3')
actin-U	ATGTCACGGACGATTTACAG
actin-L	GCGCGGTTACTCTTTCACCA
Drs-U	ACTTGTTGCGCCCTCTTCGCT
Drs-L	CGTTGGCTCCCAGGACC
IM2-U	GCTGTTCCCCTGTCCGCC
IM2-L	GCAGTCCCCGTTGATTACCA
tubulin-U	GCAGAGAGGCGGTAATCGAG
tubulin-L	ACCTGAACCGTCTGATTGGC

Taula M.2. Oligonucleòtids utilitzats en els assajos de *real-time* PCR

1.4 Anticossos

En aquesta tesi s'ha utilitzat diferents anticossos per als assajos d'immunolocalització i de Western-Blott. A la taula següent (veure **taula M.2**) s'indiquen tots els anticossos utilitzats així com la seva procedència i la dilució a la que s'han utilitzat.

Anticossos primaris	Anticòs	Característiques	Fabricant i referència	Dilució per immunotinció	Dilució per Western-blott
	dSAP18	Anticòs policlonal de conill purificat per cromatografia d'afinitat	Generat al laboratori	1:50 o 1:100	1:2000
	HA	Anticòs monoclonal.	Roche (1666606)	1:200	1:2000
	Trimetil-H3k27	Anticòs policlonal. Reconeix el residu k27 de la H3 trimetilat.	Upstate (07-449)	1:500	
	Psc	Anticòs monoclonal contra la proteïna de <i>Drosophila</i> .	DSHB (6E8-s)	1:500	
	H3	Anticòs policlonal de conill.	Cell Siganling Technology (9715)		1:1000
	Ac-H3	Anticòs policlonal de conill. Reconeix la histona H3 acetilada als residus K9 i K14.	Upstate (06-599)	1:500	
	fosfo H3Ser10	Anticòs policlonal de conill contra la H3 fosforilada en aquest residu.	Upstate (06-570)	1:200	
	Lamin	Anticòs monoclonal contra la proteïna de <i>Drosophila</i>	DHSB (ADL67.10)	1:500	1:5000
	Pol II H14	Anticòs monoclonal contra la polimerasa II fosforilada a la serina 5.	Abcam (ab24759)	1:50	
	Pol II H5	Anticòs monoclonal contra la polimerasa II fosforilada a la serina 2.	Abcam (ab24758)	1:50	

Anticossos secundaris	Anticòs	Característiques	Fabricant i referència	dilució	
	anti-rabbit	Conjugat amb peroxidasa.		Amersham (NA934)	1:5000
		Conjugat amb Cy2.		Jackson ImmunoResearch	1:400
		Conjugat amb Cy3.		Jackson ImmunoResearch	1:400
	anti-mousse	Conjugat amb peroxidasa.		Jackson ImmunoResearch	1:10000
		Conjugat amb Cy2.		Jackson ImmunoResearch	1:400
Conjugat amb Cy3.			Jackson ImmunoResearch	1:400	

Taula M.3. Anticossos primaris i secundaris utilitzats.

2. MÈTODES

2.1 Tècniques de manipulació de DNA plasmídic

Les tècniques de DNA recombinant utilitzades en aquesta tesi són tècniques bàsiques de Biologia Molecular descrites per Sambrook i col·laboradors (Sambrook and Russell, 1989).

2.1.1 Transformació de cèl·lules competents

Per a la transformació de cèl·lules competents s'incuben les cèl·lules amb 5 µl de lligació durant 20 minuts en gel. Passat aquest temps, es fa xoc tèrmic durant 2 minuts a 42 °C. Les cèl·lules es recuperen durant 10 minuts amb 400 µl de medi Luria-Bertrani Broth (LB) (triptona 10 g/l, extracte de llevat 5 g/l, NaCl 10 g/l, NaOH 1mM) sense presència d'antibiòtic. Es plaquegen les cèl·lules en plaques d'LB (LB + agar 15 g/l) i el corresponent antibiòtic (100 µg/ml d'ampicil·lina o 50 µg/ml de kanamicina). S'incuba tota la nit a 37 °C.

2.1.2 Mètodes d'obtenció de DNA plasmídic

2.1.2.1 Minipreparacions de DNA

Per a petites quantitats de plasmidis s'ha utilitzat el mètode de la lisi alcalina (Sambrook and Russell, 1989). El DNA es resuspèn en 50 µl de tampó TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH8) en presència d'1 µg de RNAsa A i s'incuba 15 minuts a 37 °C.

2.1.2.2 Maxipreparacions de DNA

Per la obtenció de grans quantitats de DNA plasmídic hem utilitzat columnes comercials de Quiagen seguint les instruccions del fabricant. Hem resuspès el DNA amb tampó TE.

La concentració de DNA es determina per espectrometria llegint l'absorbància a 260 nm en un espectrofotòmetre UV-1603 (Shimadzu).

La puresa i la integritat del DNA es comprova carregant 200 ng de la mostra amb tampó de càrrega Orange (50% glicerol, 20 mM EDTA, Orange G

(punta d'espàtula)) en un gel d'agarosa 1% i TBE 1X (Tris base 90 mM, EDTA 24 mM, àcid bòric 0.8M).

2.2 Tècniques amb cèl·lules eucariotes

2.2.1 Creixement de les cèl·lules

Les cèl·lules en cultiu SL2 s'han fet créixer en medi Schenider (Sigma) complementat amb un 10% de sèrum boví fetal (FBS, Gibco) i 50 µg/ µl de penicil·lina/estreptomina (Gibco) a 25°C.

2.2.2 Transfecció de les cèl·lules amb *Effectene Transfection Reagent*®

Per aconseguir la sobreexpressió a cèl·lules SL2 de la proteïna dSAP18 hem realitzat experiments de transfecció amb un vector d'expressió per a la proteïna dSAP18 (pAct-PPA-dSAP18). Aquesta transfecció transitòria de les cèl·lules amb DNA plasmídic l'hem realitzat utilitzant *Effectene Transfection Reagent*® (Quiagen).

Aquest *kit* utilitza el reactiu *effectene* amb combinació amb un *enhancer* i un tampó de condensació del DNA (tampó EC) i permet unes eficiències de transfecció més elevades que altres mètodes com el del fosfat càlcic. En el primer pas d'aquest procés el DNA es condensa perquè interacciona amb l'*enhancer* en el tampó EC. A continuació s'afegeix el reactiu *effectene* per tal que es produeixin els complexos DNA-*effectene* que són els complexos de transfecció. Posteriorment, aquests es mesclen amb el medi de cultiu i s'afegeixen a les cèl·lules.

Seguint les instruccions del fabricant hem transfectat 3×10^6 cèl·lules SL2 en plaques de cultiu de 60 mm² (Corning) amb 1 i 2 µg de DNA plasmídic (pAct-PPA GFP /pAct-PPA SAP18) i s'han incubat a 25 °C durant 24 hores abans de procedir en l'anàlisi del seu cicle cel·lular.

2.2.3 Tractament de les cèl·lules amb RNA d'interferència

Per a l'obtenció de cèl·lules SL2 que no expressin la proteïna dSAP18 hem incubat cèl·lules amb dsRNA de seqüència homòloga al gen. Aquest dsRNA és capaç de difondre a l'interior de les cèl·lules del cultiu, activant la

maquinària de l'RNA d'interferència i provocant la desaparició de la proteïna. Com a control hem utilitzat un dsRNA de GFP.

2.2.3.1 Obtenció dels dsRNA

Per a la obtenció dels dsRNAs de dSAP18 i de GFP hem partit de les construccions pBS-dSAP18 i pBS-GFP que inclouen la regió codificant d'aquests gens entre els promotors de les RNA polimerasa T3 i T7.

Es digereixen 1 µg d'aquests plàsmids per tal d'aconseguir fragments lineals que continguin únicament el promotor de T7 o el promotor de T3 en una banda i extrems 5' protuberants en l'altre (veure **figura M1**).

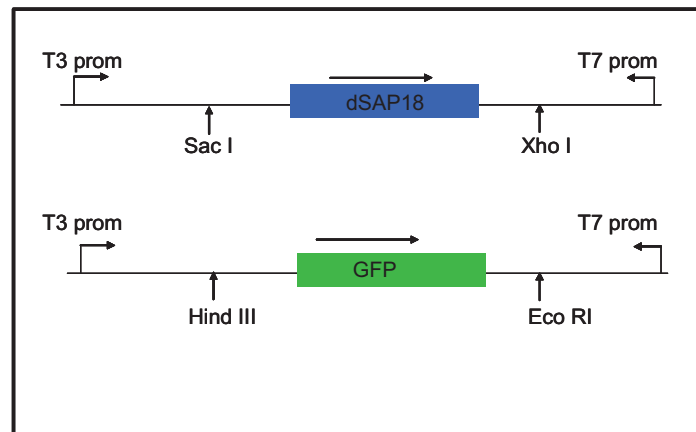


Figura M.1. Esquema dels plàsmids pBS-dSAP18 i pBS-GFP.

En concret, aquestes digestions han estat :

- pBS-dSAP18 + Xho I: per obtenir el fragment lineal de dSAP18 amb el promotor de T3.
- pBS-dSAP18 + Sac I: per obtenir el fragment lineal de dSAP18 amb el promotor de T7.
- pBS-GFP + Eco RI: per obtenir el fragment lineal de GFP amb el promotor de T3.
- pBS-GFP + Hind III: per obtenir el fragment lineal de GFP amb el promotor de T7.

Un cop digerits aquests fragments s'han realitzat transcripcions *in vitro* seguint la següent reacció durant 2 hores a 37°C.

- 0.5 µg/ µl de DNA digerit
- 10 µl de buffer de transcripció 5X (Ambion)
- 10 µl rNTPs (Amersham)
- 1.5 µl T3 o T7 RNA polimerasa (Ambion)
- 1 µl anti-RNAsa (Ambion)

Passat aquest temps s'ajunten els trànscripts i es desnaturalitzen 5 minuts en un bany a 95 °C i es deixa que es refredin fins temperatura ambient lentament dins el mateix bany. A continuació es realitza digestió del DNA amb (DNAsal) i s'eliminen les restes d'RNAs amb (RNAsal). Es fa fenol/cloroform i precipitació, i es resuspèn amb 25 µl d'aigua. Es comprova la integritat i la qualitat dels dsRNA corrent 1 µl de les mostres en gel d'agarosa a l'1%.

2.2.3.2 Tractament de les cèl·lules amb dsRNA

Pel tractament de cèl·lules amb dsRNA de dSAP18 i de GFP s'han plaquejat 3×10^6 cèl·lules SL2 en plaques de cultiu de 60 mm² i es tracten amb 10 µl dels dsRNA. S'incuben a 25 °C durant 48 hores. A les 48 hores i a les 72 hores es torna a afegir la mateixa quantitat de dsRNA al cultiu cel·lular. Es recullen les cèl·lules a les 96 hores.

2.2.4 Citometria de flux a cèl·lules SL2

2.2.4.1 Tinció amb iodur de propidi

L'anàlisi del contingut de DNA utilitzant iodur de propidi proporciona informació sobre la distribució de les cèl·lules en les fases del cicle cel·lular (la fracció de cèl·lules en G0/1, S i G2+M) i la poliploïdia.

El mètode utilitzat és el descrit per Doyle (Doyle et al., 1995) amb algunes modificacions:

- es recullen les cèl·lules i es centrifuguen a 800 g durant 5 minuts i es renten amb 5 ml de PBS.
- Centrifuguem de nou a 800 g durant 5 minuts i resuspenem amb 0.5 ml de PBS.
- La fixació de les cèl·lules té lloc agitant-les al vòrtex afegint 4.5 ml d'etanol al 70% fred i es deixen a 4 °C almenys durant un parell d'hores.

Materials i Mètodes

- Es centrifuguen de nou les cèl·lules a 800 g durant 5 minuts i es tornen a rentar amb 5 ml de PBS.
- S'elimina el sobrenedant i s'afegeix 0.5 ml de PBS amb 0.5 mg/ml RNAsa A i 50 µg/ml de iodur de propidi.
- Incubem a 37 °C durant 30 minuts,
- Es deixen a 4 °C i a la foscor fins al moment de l'anàlisi.

Les mostres s'han analitzat amb el citòmetre de flux (Serveis Científicotècnics, Universitat de Barcelona) utilitzant un làser d'argó blau (488 nm, 15 mW). La fluorescència s'ha detectat a 665-685 nm.

2.2.4.2 Tinció amb Hoechst

La fixació provoca la pèrdua de la fluorescència corresponent a GFP. Per tant, quan és necessari l'anàlisi del cicle cel·lular a partir de cèl·lules que expressen GFP s'analitza el cicle "*in vivo*" realitzant una tinció amb el colorant Hoechst.

En aquests casos, s'ha utilitzat el citòmetre de flux *MoFlo* (Serveis Científicotècnics, Universitat de Barcelona). Aquest citòmetre és un FACS (*Fluorescence Analyzer Cell Sorter*) que permet purificar poblacions de cel·lulars d'unes determinades característiques, en el nostre cas hem separat les cèl·lules que expressaven GFP (i per tant les que havien estat transfectades) i se n'ha analitzat el cicle cel·lular.

La tinció del DNA amb el colorant Hoechst 33528 (Sigma) s'ha realitzat a una concentració de 10 µM durant 30 minuts a 25 °C.

2.3 Assajos a *Drosophila melanogaster*

2.3.1 Manteniment de les diverses soques de *Drosophila melanogaster*

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

2.3.2 Punxades a larves L3

Pels assajos de punxades a larves del tercer estadi hem utilitzat agulles de xeringa 25A. Hem mullat l'agulla amb PBS1X preparat al moment i hem punxat les larves sota la lupa.

2.3.3 Infecció de mosques adultes amb el fong *Aspergillus fumigatus*

2.3.3.1 Creixement del fong *Aspergillus fumigatus*

El fong *Aspergillus fumigatus* és un fong filamentós del grup dels Deuteromicets o fongs imperfectes. El seu aspecte al microscopi és típic i es caracteritza per unes estructures esporífiques o reproductores anomenades caps conidials. Té un genoma estable i haploide, i no es coneix que tingui cicle sexual. La reproducció té lloc a través de les conidisporos que són alliberades a l'ambient. *Aspergillus fumigatus* és una de les espècies d'*Aspergillus* que pot infectar a humans i provoca malalties nosocomials a individus immunodeprimits.

La soca 2071 d'*Aspergillus fumigatus* va ser adquirida a la *Colecció Espanyola de cultivos tipo* (CECT) i s'ha fet créixer en plaques d'agar amb extracte de patata i dextrosa (patato dextrose broth (DIFCO) 24 g/l + agar 15 g/l) a temperatura ambient.

Els micelis d'aquest fong són blanquinosos i canvien a verd fosc o a marró quan esporulen (veure **figura M2**).

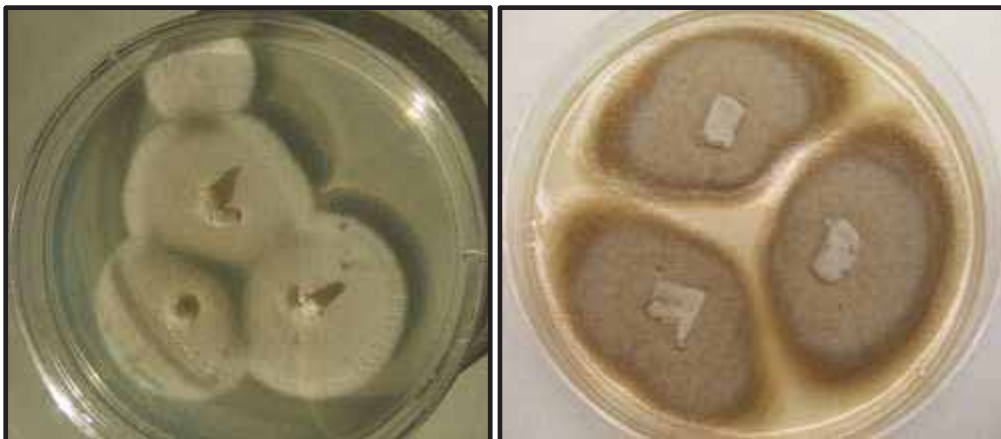


Figura M.2. Plaques de cultiu del fong *Aspergillus fumigatus*. A la part esquerra el fong d'un color blanquinos i a la dreta el fong esporulat d'un color més fosc.

La recollida de les espores s'ha realitzat aplicant 5 ml d'aigua estèril sobre les plaques del fong esporulat i raspant amb suavitat utilitzant una nansa

estèril. La solució obtinguda ha estat filtrada per tal de recollir únicament les espores i no els conidis. La solució filtrada és la que s'ha utilitzat per a la infecció dels adults.

2.3.3.2 Infecció amb *Aspergillus fumigatus*

Per a la infecció de mosques adultes hem separat mascles i femelles de la mateixa edat dels diferents *stocks* a infectar. La infecció s'ha realitzat utilitzant agulles d'injecció (com les que s'utilitzen per obtenir embrions transgènics) prèviament sucades a una solució rica en espores d'*Aspergillus fumigatus*. Un cop infectades les mosques han continuat creixent a 30 °C i s'ha analitzat la seva viabilitat diàriament.

2.4 Tècniques de manipulació d'RNA

2.4.1 Extracció d'RNA

Les extraccions d'RNA utilitzades en aquest treball s'han realitzat sempre amb el *kit* d'extracció *RNeasy Mini Kit* de Quiagen®, seguint les instruccions del fabricant.

Per les extraccions a embrions hem partir d'un volum aproximat de 50 µl d'embrions 0-24 hores. Per a les extraccions a larves i adults hem partit de almenys 10 individus, i en aquests casos hem congelat les mostres per començar l'extracció d'RNA amb la mostra congelada.

La concentració d'RNA s'ha determinat llegint l'absorbància a 260 nm.

2.4.2 RT-PCR

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

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

Per tal que la transcriptasa reversa pugui afegir dNTPs, cal que hi hagi uns encebadors units a la cadena d'RNA que es vol amplificar. En aquest

treball hem utilitzat oligonucleòtids que hibriden específicament amb l'RNA que es vol analitzar.

Ahora, l'enzim que s'utilitza en els assajos d'RT-PCR presenta una funció dual: per una banda, presenta activitat retrotranscriptasa, i per l'altra, presenta activitat DNA polimerasa / DNA dependent (DNA polimerasa convencional). Aquestes dues activitats no es troben solapades, de manera que quan l'enzim actua com a transcriptasa reversa no ho fa com a DNA polimerasa, i quan actua com a DNA polimerasa no presenta activitat retrotranscriptasa. Això es deu al fet que la temperatura òptima per la retrotranscripció és de 50 °C. L'activitat retrotranscriptasa s'inactiva amb un pas de 15 minuts a 95 °C en el qual s'activa la DNA polimerasa /DNA dependent.

Per tal de poder realitzar RT-PCRs semiquantitatives hem utilitzat sempre quantitats creixents d'RNA i s'ha realitzat controls de contaminació de DNA genòmic. Els productes d'aquestes RT-PCRs s'han visualitzat en gels d'agarosa a l'1% tenyits amb bromur d'etidi.

2.4.3 Real-time PCR

La tècnica de la PCR a temps real es basa en l'habilitat per monitoritzar el progrés de la PCR mentre la reacció s'està produint ja que l'amplificació i la detecció es combinen en un mateix pas. Per a la detecció del DNA s'utilitza fluorescència, en concret SYBRGreen, una molècula petita i amb capacitat per unir-se al DNA de cadena doble sense inhibir la reacció de PCR i que al unir-se al DNA de doble cadena emet fluorescència. Per tant la fluorescència que es detecta és directament proporcional al nombre d'amplicons generats i com més gran sigui el nombre de molècules de partida més aviat s'observarà un increment de la fluorescència. Per tant la fluorescència detectada ens permetrà calcular la concentració de DNA de la nostra mostra. El valor C_t (*cycle threshold*) és el cicle de la PCR en el qual la fluorescència detectada és més gran que la fluorescència *background*.

El primer pas és la retrotranscripció. En aquest pas es retrotranscriu l'mRNA a cDNA. En el nostre cas s'ha utilitzat el *kit* Omniscript RT de Quiagen® que conté dues transcriptases reverses amb alta afinitat per RNA permetent la reacció fins i tot quan el transcrit es troba en baixa còpia. I on s'utilitza un oligo dT per tal de retrotranscriure inespecíficament tots els mRNA.

El segon pas és l'amplificació i quantificació d'aquest cDNA utilitzant Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen) i 300 nM de primer upper i primer lower específics pels gens que es volen analitzar. Aquest pas s'ha realitzat a l'aparell ABI prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems). I les condicions de la PCR han estat 2 minuts d'incubació amb UDG a 50 °C, 2 minuts d'activació de la polimerasa i 40 cicles de 15 segons a 95 °C i 30 segons a 60 °C. No és necessària l'extensió a 72 °C perquè les regions a amplificar són molt curtes (50 bp). Cada assaig cal que inclogui corbes patró amb diverses dilucions seriades per cada punt (per triplicat) i controls sense DNA (NTC o *non-template control*). També s'analitzen mostres sense el pas previ de retrotranscripció per descartar contaminació de DNA. Els resultats s'han analitzat amb el *software* ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems) i amb Microsoft Excel.

2.4.4 Assajos de microarrays

Els *microarrays* que hem utilitzat han estat *microarrays* d'oligonucleòtids sintetitzats per **Operon** que inclouen un total de 16416 *spots*, la majoria del quals representen gens o trànscrits de *Drosophila melanogaster*. Però alhora també inclouen controls positius i controls negatius per tal d'assegurar la fiabilitat de l'experiment. Els controls positius són de dos tipus, per una banda gens *housekeeping*, és a dir gens que des d'un punt de vista teòric no han de variar entre les mostres que es comparen, són gens tals com tubulina, actina i gens ribosomals. I el que s'anomena *spikes*. Aquests *spikes* són gens d'una espècie diferent a la que s'analitza (en el nostre cas són gens d'*Arabidopsis thaliana*) que s'afegeixen a una concentració coneguda a la nostra mostra i es processen exactament igual que aquesta, de manera que serveixen com a control de que el procés d'amplificació, marcatge i quantificació ha estat correcte.

Entre els controls negatius trobem oligonucleòtids generats bioinformàticament a l'atzar i que no presenten homologia amb el transcriptoma de *Drosophila*, alhora *spots* buits i *spots* amb tampó d'hibridació. Cap d'aquests punts ha de donar senyal quan s'hibrida amb la mostra.

Un cop escollides les mostres que hem volgut comparar ens hem plantejat com podem controlar la variabilitat que comporta qualsevol experiment

de *microarrays*, tan des d'un punt de vista biològic com tècnic. Per corregir la variabilitat biològica s'ha repetit l'experiment amb diferents extraccions d'RNA. Per tal de controlar la variabilitat tècnica una de les estratègies seguides ha estat l'intercanvi de fluorocroms o *dye swap*. Això significa que si en un cas hem marcat una mostra amb Cy3 i l'altra amb Cy5, repetim l'experiment invertint aquest marcatge però utilitzant les mateixes mostres biològiques. Això permet, l'obtenció de noves dades i alhora corregeix el problema de l'esbiaix de fluorocroms.

2.4.4.1 Obtenció de la mostra

L'obtenció de l'RNA ha estat tal i com hem descrit a l'apartat 2.4.2. La quantificació i la determinació de la qualitat de la mostra s'ha realitzat utilitzant Bioanalyzer 2100 de Agilent (Serveis Científicotècnics, Universitat de Barcelona).

La quantitat necessària d'RNA per realitzar l'experiment de *microarrays* és de 1.5 µg.

L'amplificació i el marcatge de la mostra s'ha realitzat amb el *AminoAlyll MessageAmp II aRNA Amplification kit* (Ambion).

2.4.4.2 Hibridació de la mostra

Es prehibriden els *slides* amb solució de prehibridació (SSC1X, BSA 1% i SDS 1%) dos cops a 42 °C durant 25 minuts.

Després de la prehibridació, els *slides* es renten amb SSC 0.1X dos cops durant 5 minuts.

La solució d'hibridació està composta per:

75 µl SSC 20X
75 µl formamida
3 µl SDS 10%

A aquesta solució d'hibridació s'hi afegeixen les mostres marcades amb Cy3 i Cy5 i es desnatura bullint a 95 °C durant 5 minuts. S'afegeix a aquesta mescla 1 µl de ssDNA desnatura, i es manté a 42 °C fins al moment de la injecció sobre l'*slide*. La hibridació s'ha realitzat utilitzant el programa Lucidea SlidePro.

2.5 Tècniques per a l'estudi de proteïnes

2.5.1 Expressió de proteïna recombinant dSAP18

L'expressió de proteïnes clonades als vectors pET14 es troba sota el control de senyals de transcripció i traducció del bacteriòfag T7. La soca d'*Escherichia coli* emprada per expressar proteïnes, BL21, conté una còpia cromosomal del gen de la T7 RNA Polimerasa sota el control del promotor *lacUV5*, el qual és induïble per Isopropyl-B-D-Thiogalactopyranoside (IPTG). Gràcies a l'elevada activitat de l'RNA Polimerasa T7, després d'unes poques hores d'inducció la proteïna que volem expressar pot constituir més del 50% del contingut proteic bacterià.

En el nostre cas s'ha expressat la proteïna dSAP18 fusionada a una cua d'histidines amb l'objectiu de purificar-la i utilitzar-la per la purificació d'un anticòs policlonal α -dSAP18. Per aquest motiu es va construir el plasmidi d'expressió pET-dSAP18 (veure apartat 1.1.2 e) i es va utilitzar per transformar la soca d'*E.coli* BL21 que creix a 37°C i en agitació en 500 ml de LB amb ampicil·lina fins que la densitat òptica és de 0.8.

L'expressió de la proteïna s'indueix amb 1mM d'IPTG (Apollo Scientific LTD) durant 2-3 hores també a 37°C i en agitació. Les cèl·lules es centrifuguen a 4000 rpm durant 10 minuts i es renten amb tampó STE (0.1M NaCl, 10mM Tris pH8, 1mM EDTA). Es tornen a centrifugar a 4000 rpm durant 10 minuts i es lisen amb 10 ml de tampó de lisi (0.5M NaCl, 20% glicerol, 20mM Hepes pH7.9, 1mM EDTA, 20mM β -mercaptoetanol, 0.1% NP-40, 1mM PMSF). Posteriorment es soniquen, al sonicador Digital Sonifier® (Branson), al 40% en 10 cicles de 30 segons. La proteïna dSAP18 es troba majoritàriament a la fracció insoluble i per tan després cal ultracentrifugar a 35000 rpm durant 45 minuts i es deixa el precipitat en resuspensió durant tota la nit amb tampó de clorur de guanidina (6M de clorur de guanidina, 20mM d'Hepes pH 7.9, 100mM NaCl, 10mM β -mercaptoetanol) a temperatura ambient. L'endemà es centrifuga aquesta suspensió a 11000 rpm durant 1 hora.

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

En el nostre cas hem utilitzat una reïna *Ni-NTA Agarose* (Quiagen) que es va utilitzar per empaquetar una columna *Econocolumn* (Biorad). La purificació de la proteïna es realitza a temperatura ambient. La columna s'equilibra amb 10 ml de tampó de clorur de guanidina. Aquest pas i els posteriors es realitzen amb l'ajut d'una bomba peristàltica *LKB Pump P-1* (Pharmacia) Es passa la mostra per la columna i es recull la fracció *Flow Through* (FT). Posteriorment, es renta amb 10 ml de clorur de guanidina (fracció R1) i amb 10 ml de tampó d'urea (100mM KCl, 20mM Hepes pH 7.9, 8M Urea) (fracció R2).

Finalment, es pot eluir la proteïna per competició amb imidazol en un procés de dos passos. Primer es fa una preelució amb 3 ml de tampó d'urea amb 20 mM d'imidazol. Aquest pas amb una baixa concentració d'imidazol serveix per eliminar contaminants que s'uneixen a la reïna amb una afinitat menor que les histidines. Després s'elueix amb 5 ml de tampó d'urea amb 100 mM imidazol, recollint fraccions d'1ml. S'analitza el funcionament de la cromatografia analitzant les diferents fraccions per SDS-PAGE.

2.5.2 Purificació d'anticòs α -dSAP18 per cromatografia d'afinitat

Per aconseguir un anticòs específic contra la proteïna dSAP18 es va purificar per afinitat el sèrum obtingut de la immunització dels conills. El procés es base en unir l'antigen utilitzat a un suport sòlid sobre el qual s'aplica el sèrum policlonal. D'aquesta manera només són retinguts a la columna els anticossos específics, els quals poden ser eluïts posteriorment.

En concret, s'uneix la proteïna de fusió recombinant dSAP18-His (veure apartat 2.5.1) a la reïna *Ni-NTA Agarose* (Quiagen). I es renta la columna amb 10 ml de clorur de guanidina (6M de clorur de guanidina, 20mM d'Hepes pH 7.9, 100mM NaCl, 10mM β -mercaptoetanol) i amb 10 ml de tampó A (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.4) i es passen 1.5 ml del sèrum del conill. Posteriorment es fan un rentat amb 10 ml del tampó A i un altre rentat amb 10 ml del tampó B (2M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.4).

Finalment s'elueix amb una solució de MgCl₂ 4M. La solució eluïda, que és la que porta l'anticòs específic α -dSAP18, es dialitza amb PBS1X per tal d'eliminar l'excés de MgCl₂ 4M i es guarda a 4°C amb azida sòdica al 0.02% i 1 mg/ml de BSA.

2.5.3 Extracció de proteïnes a partir d'embrions i de larves de *Drosophila melanogaster*

Per a l'obtenció d'extractes de proteïnes partim d'uns 50 µl d'embrions decorionats o bé de 6 larves. Afegim a aquestes mostres 300 µl de PLB 5X (Tris-HCl 125mM pH 6.8, glicerol 21.75%, SDS 5%, blau de bromofenol 0.25%) i β-mercaptoetanol a una concentració final de 1.5M. S'homogeneïtza el teixit amb l'ajut d'un homogeneïtzador per a *ependorf*. Es bull la mostra a 95°C durant 1 minut i es fa un pols de centrifuga. Es torna a homogeneïtzar i es repeteix tot el procés un total de 5 cops. Es centrifuga la mostra 5 minuts a 14000 rpm i es separa la meitat de l'extracte. L'altre meitat es torna a homogeneïtzar seguint el mateix procés d'abans. S'ajunten els dos extractes i es centrifuga de nou 5 minuts a 14000 rpm. Es recupera el sobrenedant i es sonica 10 segons al 15%. Aquests extractes són analitzats per electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS.

2.5.4 Immunoprecipitació (IP) de dSAP18 a partir d'extractes d'embrions

Per a la immunoprecipitació de la proteïna dSAP18 a partir d'embrions de *Drosophila* es parteix d'una placa de posta d'embrions 0-24 hores (aproximadament). Es decorionen els embrions amb lleixiu i es resuspenen amb 1 ml de tampó ENB (sacarosa 10%, Tris-HCl pH8 10mM, CaCl₂ 1mM, PMSF 0.1mM, leupeptina 1µg/ µl i Aprotinina 1µg/ µl). Els embrions es disgreguen amb l'ajut d'un *dounce* i es filtra entre dues gasses. Es centrifuga a 5000 rpm durant 5 minuts per tal de precipitar els nuclis que es resuspenen amb 300 µl de tampó d'IP (Hepes 20mM, glicerol 25%, NaCl 420mM, MgCl₂ 1.5mM, EDTA 0.2 mM, PMSF 0.1mM, leupeptina 1µg/ µl i Aprotinina 1µg/ µl).

Es realitza un pre-rentat dels extractes a immunoprecipitar amb 30 µl de proteïna A-sefarosa durant almenys 1 hora en agitació constant i a 4 °C. Es centrifuga durant 2 minuts a 3000 rpm i es recupera el sobrenedant. La proteïna dSAP18 s'immunoprecipita a partir d'aquest sobrenedant afegint 5 µl d'anticòs α-dSAP18 i deixant a la roda a 4°C tota la nit.

L'endemà s'afegeixen 50 µl de proteïna A-sefarosa i s'incuba 2.5 hores en agitació a 4°C. En aquest punt, la proteïna A s'uneix als anticossos que hi ha a l'extracte, molts dels quals es trobaran units a la proteïna dSAP18 dels embrions de l'extracte. Seguidament, es fan 5 rentats de 10 minuts cadascun

amb el tampó d'immunoprecipitació també en agitació a 4 °C, per tal d'eliminar les proteïnes no unides a la proteïna A-sefarosa. I finalment es resuspenen els complexos de proteïna A+anticòs+dSAP18 amb 20 µl de PLB 5X i β-mercaptoetanol a una concentració final de 1.5M. S'analitza per electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS.

2.5.5 Fraccionament subcel·lular de cèl·lules SL2

El fraccionament subcel·lular de cèl·lules en cultiu SL2 es va dur a terme seguint el protocol de Reyes i col·laboradors (Reyes et al., 1997).

Per obtenir la fracció citoplasmàtica es lisen les cèl·lules amb tampó C (Hepes pH 7.9 10mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.1mM, Aprotinina 1mg/ml i Leupeptina 1mg/ml). Un cop lisades es centrifuga 5 minuts a 5000 rpm a 4 °C per tal de precipitar els nuclis centrifugant que s'incuben amb tampó CSK (sacarosa 0.3M, Hepes pH 7.9 10mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 3mM, 0.05mM CaCl₂, 0.5mM DTT, PMSF 0.1mM, Aprotinina 1mg/ml i Leupeptina 1mg/ml) que conté 1 mg /ml de DNAsal (RNAsa-free) durant 15 minuts a 37 °C.

Passat aquest temps d'incubació s'afegeix sulfat amònic a una concentració final de 0.25M i es centrifuga 3 minuts a 5000 rpm per tal d'obtenir la fracció nuclear soluble de baixa concentració salina. Els precipitats es resuspenen amb tampó CSK amb 2M de NaCl per tal de solubilitzar les proteïnes associades a la cromatina entre les que s'inclouen les histones (fracció d'alta concentració salina). Cal fer diversos rentats centrifugant 3 minuts a 5000 rpm i resuspenent amb més tampó CSK amb NaCl 2M per tal d'eliminar totes les histones. El pellet que s'obté al final d'aquests rentats és el corresponent a la matriu nuclear i es solubilitza amb tampó urea (urea 8M, Na H₂PO₄ 0.1M, Tris-HCl pH 8 10mM).

S'analitzen alíquotes equivalents de cada fracció per SDS-PAGE i per western-blott amb els anticossos pertinents.

2.5.6 Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

L'electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida-SDS permet la separació de les proteïnes a través d'una matriu de poliacrilamida en funció del seu pes molecular. El tractament amb SDS de les proteïnes provoca la seva desnaturalització. Alhora aquest detergent cobreix la superfície de les proteïnes de càrregues negatives enmascarant així la seva càrrega endògena. Per tant, sota un camp elèctric les proteïnes migraran totes cap el pol positiu i es separaran segons el pes molecular.

Els gels de poliacrilamida-SDS estan formats per dues parts: una part apiladora superior i una part separadora inferior. Aquestes dues fases es diferencien segons el pH i el percentatge d'acrilamida. El gel apilador sempre té un percentatge d'acrilamida del 5%. El percentatge del gel separador pot ser d'entre 10% i 18% segons el pes molecular de les proteïnes que es vulguin analitzar. Per l'anàlisi de la proteïna dSAP18, el percentatge d'acrilamida que hem utilitzat en el gel separador ha estat del 12%.

Gel apilador

acrilamida:bisacrilamida 29:1 (5%)

Tris-HCl 0.125M pH 6.8

SDS 0.1%

6µl PSA 10% / ml solució

3µl TEMED / ml solució

Gel separador

acrilamida:bisacrilamida 29:1 (12%)

Tris-HCl 0.4M pH 8.7

SDS 0.1%

6µl PSA 10% / ml solució

3µl TEMED / ml solució

A les mostres se'ls hi afegeix també de càrrega desnaturalitzant de proteïnes PLB 5X (Tris-HCl 125mM pH 6.8, glicerol 21.75%, SDS 5%, blau de bromofenol 0.25%) i un 10% de β-mercaptoetanol, i s'escalfen 5 minuts a 95°C.

Com a també d'electroforesi s'utilitza Laemmli 1X (SDS 0.1%, glicina 200mM, Tris base 25mM pH 8.3-8.5) i es corre a 25 mA.

2.5.7 Tècniques d'immunodetecció

2.5.7.1 Western-blott

La tècnica del Western-blott permet la identificació de proteïnes específiques presents en un extracte proteic. S'inicia amb la separació de les proteïnes mitjançant electroforesi en gel d'acrilamida (veure apartat 2.5.6) i la

seva transferència a una membrana de nitrocel·lulosa que és posteriorment incubada amb un anticòs específic contra la proteïna que es vol identificar.

Aquesta transferència es realitza seguint l'esquema de la **figura M3** i tenint sempre en compte que les proteïnes van cap al pol positiu. Per a la transferència s'utilitza tampó de transferència (Tris base 25mM, glicina 40mM, SDS 0.05% i metanol 20%) aplicant un voltatge de 80V durant 2 hores a 4°C i amb agitació constant.

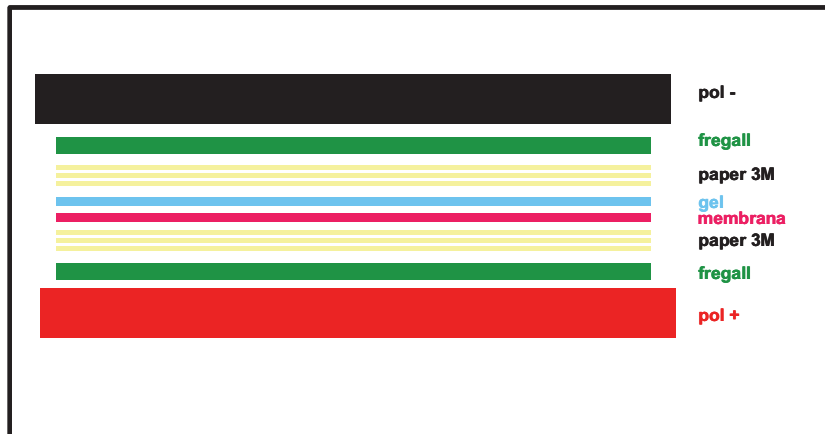


Figura M.3. Esquema de la transferència de proteïnes.

Un cop transferida la membrana es bloqueja amb una solució amb llet en pols (PBS1X, Tween 0.1% i llet en pols 5%) durant 2 hores a T° ambient. I posteriorment s'incuba amb l'anticòs primari diluït en PBS-Tween 0.1% durant 1.5 hores i es fan tres rentats de 10 minuts amb PBS-Tween 0.1%. S'incuba durant 1 hora amb un anticòs secundari (conjugat amb peroxidasa) i es torna a rentar 3 cops amb PBS1X-Tween 0.1%.

Per la detecció de l'anticòs secundari fusionat a la peroxidasa de rave (HRP) es barregen 10 ml de solució de luminol (Tris-HCl 0.1M pH 8.6, luminol sòdic 1.25 mM, H₂ O₂ 2.7mM) amb 10 µl de solució *enhancer* (àcid p-hidroxycumarínic 0.1% en DMSO) i s'aplica sobre la membrana durant 1 minut. Posteriorment s'asseca la membrana s'exposa a un film d'autoradiografia Agfa Curix RP2 el temps necessari per obtenir un senyal òptim. El film es revela en un Hyperprocessor (Amersham).

2.5.7.2 Immunodetecció a embrions

Per a aquestes immunodeteccions es recullen embrions de l'estadi desitjat, en el nostre cas normalment d'entre 1-5 hores, i es decorionen amb lleixiu durant 2-3 minuts. Seguidament, es renten amb PBS1X-0.1% Tritó. La fixació es realitza amb 2 ml de PEM (0.1M PIPES pH 6.9, 1mM EGTA, 2mM MgSO₄), 2 ml d'Heptà i 0.25 ml de formaldehid 37% durant 20 minuts en agitació constant. Passat aquest temps s'elimina la fase inferior, s'afegeixen 2ml de metanol i es vorteja. Els embrions que han quedat al fons del tub són els aptes per la immunodetecció, ja que són els fecundats i que han perdut la membrana vitel·lina. Es recullen amb pipeta *pasteur* i es transfereixen a un tub *ependorf* amb metanol. Es deixen a 4°C almenys una nit abans de fer la immunodetecció.

Per a la immunodetecció cal rentar els embrions almenys 3 cops amb PBS1X-1% Tritó en agitació per assegurar que s'elimina tot el metanol. Es bloquegen amb solució de bloqueig (PBS1X-1% Tritó- 2%BSA) durant 2x20 minuts a la roda. S'incuben tota la nit a 4°C i amb agitació constant, amb l'anticòs o els anticossos primaris desitjats en solució de bloqueig a la dilució que correspongui. Al matí es recupera la solució d'anticòs primari i es fan tres rentats de 10 minuts amb solució de bloqueig a T° ambient i en agitació a la roda. A continuació, s'incuba durant 1.5 h amb l'anticòs o els anticossos secundaris corresponents a una dilució de 1:400 i amb 2ng/μl de DAPI en la solució de bloqueig, a la foscor i amb agitació. Quan finalitza aquesta incubació es fan 3 rentats de 10 minuts amb PBS1X-1% Tritó i un rentat curt amb PBS1X abans de muntar amb el medi de muntatge antiFADE Mowiol (Calbiochem-Novabiochem). Les mostres s'han analitzat per microscopia confocal (Leica).

2.5.7.3 Immunodetecció a glàndules senceres

Per tal d'obtenir unes bones preparacions de glàndules salivals és important partir d'unies larves de final del 3r estadi i que aquestes estiguin molt grosses. És per això que es fan créixer les larves amb presència de llevat amb pols, i si es pot a 18°C, per tal que el creixement sigui més lent i s'obtinguin unes larves grans.

Les glàndules salivals es disseccionen a partir d'aquestes larves en tampó PBS1X-0.1% Tritó i s'intenten deixar el màxim de netes possibles, és a

dir, sense restes d'altres teixits (cervell, discos...) ni tampoc del teixit adipós que les envolta. Un cop disseccionades s'incubem durant 1 minut en solució fixativa A (3.7% formaldehid i 1% Tritó en PBS1X) i durant 8 minuts en solució fixativa B (50% àcid acètic i 3.7% formaldehid en aigua). Un cop fixades es renten 3 cops amb PBS1X-0.1% Tritó. Es bloquegen almenys dos cops 20 minuts amb PBS1X-0.1% Tritó- 1% BSA. I s'incubem tota la nit amb l'anticòs primari diluït en la solució de bloqueig a 4°C i en agitació. Al matí es fan tres rentats de 10 minuts amb solució de bloqueig a T° ambient i en agitació a la roda. A continuació, s'incubem durant 1 hora amb l'anticòs o els anticossos secundaris corresponents a una dilució de 1:400 i amb 2ng/µl de DAPI en la solució de bloqueig, a la foscor i amb agitació. Quan finalitza aquesta incubació es fan 3 rentats de 10 minuts amb PBS1X-0.1% Tritó i un rentat curt amb PBS1X abans de muntar amb el medi de muntatge antiFADE Mowiol. Les mostres de glàndules també s'analitzen per microscopia confocal (Leica).

2.5.7.4 Immunodetecció a cromosomes politènics

Per obtenir unes bones preparacions de cromosomes politènics és importantíssim partir d'un es bones glàndules salivals. És per això que només s'utilitzaran larves del 3r estadi i que siguin molt grosses, per tant, igual com per la immunodetecció a glàndules senceres es faran créixer les larves a 18°C (sempre que es pugui) i s'afegirà llevat en pols als tubs. Partir d'un es bones larves és un dels punts crítics per obtenir unes bones preparacions de cromosomes politènics.

En aquest cas la dissecció de les larves es fa en medi Cohen-Gotchell o medi G (25mM di-Na glicerofosfat, 10mM K H₂PO₄, 30mM KCl, 10mM MgCl, 3mM CaCl₂, 160mM de sacarosa i 0.5% Nonidet P-40) i es deixen totalment netes d'altres teixits i també del teixit adipós que les acompanya. A continuació es fixen durant 2 minuts amb la solució fixativa 1 (1.6% formaldehid en PBS1X) i durant 3 minuts exactes amb la solució fixativa 2 (2% formaldehid i 45% àcid acètic en aigua). Sobre un cobreobjectes siliconitzat net s'hi col·loca una gota d'àcid acètic al 45% i s'hi col·loquen les glàndules salivals. Es deixa caure un portaobjectes net sobre el cobreobjectes i amb una agulla emmanegada es donen copets secs damunt aquest cobreobjectes per tal d'anar trencant els nuclis d'aquestes glàndules. Quan el trencament és satisfactori, es pressiona la

preparació amb força amb el dit polze vigilant que el cobreobjectes no es mogui. Seguidament, es submergeix la preparació en nitrogen líquid i quan està congelada es treu el cobreobjectes i es submergeix la preparació en medi PBS1X.

Per a la immunodetecció es renten les preparacions 3 cops durant 5 minuts amb PBS1X-0.05% Tween en agitació. Es bloquegen les preparacions 2 cops durant 20 minuts amb solució de bloqueig (en aquest cas, PBS1X-0.05% Tween-1% BSA) dins d'una cambra humida per tal que les preparacions no s'assequin. S'incuben tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari diluït en la solució de bloqueig i també dins la cambra humida. L'endemà es renten les preparacions 3 cops durant 10 minuts amb PBS1X-0.05% Tween en agitació. S'incuba durant 1 hora amb l'anticòs secundari diluït 1:400 en solució de bloqueig. A continuació es renten les preparacions 3 cops durant 10 minuts amb PBS1X-0.05% Tween i un cop amb PBS1X. Finalment, es munten les preparacions amb una barreja de DAPI-Mowiol (50 µl de DAPI 2 ng/ µl en 500 µl de Mowiol) i s'analitzen amb microscopi confocal (Leica).

2.5.7.5 Immunodetecció a neuroblastes

Es disseccionen els cervells de larves de tercer estadi en 50 µl de medi salí NaCl 0.7% i es renten amb aquest mateix medi durant uns 5 minuts. Per tal de poder observar cèl·lules en metafase es tracten els cervells durant 1-2 hores amb 100 µl de colcemida (Roche) 5 µg/µl en medi salí a les fosques i en cambra humida a temperatura ambient. Passat aquest temps, es fa xoc hipotònic amb citrat sòdic 0.5% a temperatura ambient durant 10 minuts i es fixen els cervells durant 30 minuts amb formaldehid al 3.7%. Seguidament, es transfereixen els cervells a un cobreobjectes siliconitzat que conté 16 µl d'àcid acètic al 60% i s'hi deixa caure el portaobjectes. Es pica sobre el cobreobjectes amb un punxó i després es pressiona fort amb el dit polze tal i com hem descrit per la preparació de cromosomes politènics. Es submergeix la preparació en nitrogen líquid i es guarden les mostres en PBS1X fins el moment de realitzar la immunodetecció.

Per a la immunodetecció es renten les preparacions tres cops amb PBS1X- 1% Tritó. A continuació es bloquegen amb PBS1X- 1% Tritó i 1% llet en pols. S'incuba tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari diluït en la solució de

bloqueig i dins cambra humida. L'endemà es renten les preparacions 3 cops durant 10 minuts amb la solució de bloqueig i s'incuben 1 hora també en cambra humida a T° ambient amb una dilució 1:400 en PBS1X- 1% Tritó de l'anticòs secundari. Es renten les preparacions 3 cops durant 10 minuts amb PBS1X-1% Tritó i un cop més amb PBS1X. Es munten les preparacions amb una barreja de DAPI-Mowiol. S'analitzen les mostres al microscopi confocal.

2.5.7.6 Immunodetecció a discos imaginals

Per a la immunodetecció a discos imaginals el protocol que hem seguit és el mateix que per la immunodetecció a glàndules salivals. La única diferència és que quan es dissecciona la larva es recull tot el que segueix a les mandíbules i que inclou a part dels discos, les glàndules salivals i el cervell. Amb tot aquests teixits es realitza el protocol de fixació i immunodetecció que hem descrit per les glàndules salivals. Al final, en l'últim rentat amb PBS1X, es separen a la lupa els discos i aquests són els que es munten en Mowiol. S'analitzen també per microscòpia confocal.

En el cas en concret que hem volgut realitzar immunotincions a discos imaginals que expressen GFP la fixació l'hem feta amb paraformaldehid al 4% durant 20 minuts. Tan durant la fixació com durant tota la immunotinció és important mantenir aquestes mostres protegides de la llum per evitar que es perdi la fluorescència endògena del GFP.

2.5.7.7 Immunodetecció a ovaris

Per obtenir preparacions d'ovaris s'escullen entre 5-10 ♀ verges i es deixen en un tub durant 1-2 dies amb uns pocs mascles per tal que s'activi la maduració dels ovaris i amb llevat en pols perquè les mosques creixin. S'extreuen els ovaris de les mosques en PBS1X i es fixen en paraformaldehid al 4% durant 10 minuts en agitació. Passat aquest temps els ovaris es renten amb PBS1X-0.1% Tritó i es bloquegen dos cops durant 30 minuts amb solució de bloqueig (PBS1X-0.1% Tritó- 1% BSA). S'incuben tota la nit a 4°C i en agitació amb la solució d'anticòs primari diluït en la solució de bloqueig. L'endemà es renten els ovaris 3 cops durant 5 minuts amb solució de bloqueig i s'incuben durant 1.5h amb l'anticòs secundari diluït 1:400 en solució de bloqueig i 2ng/μl de DAPI. S'elimina l'excés d'anticòs secundari rentant 3 cops

durant 5 minuts amb PBS1X-0.1% Tritó) es renta amb PBS1X i es munta amb Mowiol. S'analitza per microscòpia confocal.

2.5.7.8 Immunodetecció a cèl·lules SL2

Per a la immunodetecció de cèl·lules, aquestes es fan créixer sobre cobreobjectes tractats amb concanavalina (Sigma) 0.5 mg/ml. La fixació de les cèl·lules es realitza amb paraformaldehid al 4% durant 20 minuts. A continuació es renten les preparacions amb PBS1X-0.1% Tween i es bloquegen dos cops durant 20 minuts amb PBS1X-0.1% Tween- 1%BSA. La incubació amb l'anticòs primari té lloc a la dilució corresponent en la solució de bloqueig durant tota la nit a 4°C. L'endemà es renten els cobreobjectes on es fa la immunodetecció 3 cops durant 10 minuts amb PBS1X-0.1% Tween. A continuació s'incuba amb l'anticòs secundari diluït 1:400 i 2ng/µl de DAPI en solució de bloqueig durant 45 minuts a T° ambient. Es renta 3 cops durant 5 minuts amb PBS1X-0.1% Tween i un cop amb PBS1X abans de muntar amb Mowiol. L'observació de les cèl·lules es realitza en el microscopi de fluorescència Eclipse E-800 (Nikon) i les fotografies es fan amb una càmera *Colorview 12* utilitzant el *software Analysis*.

RESULTATS

RESULTATS

1. EL MODEL: *Drosophila melanogaster*

Per tal de desenvolupar els diversos resultats que hem obtingut en aquesta tesi es fa necessari abans aprofundir en el model utilitzat.

Drosophila melanogaster, o la mosca de la fruita, constitueix un dels models animals de la Genètica i la Biologia molecular. Algunes de les característiques que el fan un model tan interessant són la seva mida reduïda, el seu fàcil i econòmic manteniment, el temps de generació curt i la seva descendència considerable, així com el fet que gran part dels mecanismes cel·lulars es troben conservats evolutivament.

A *Drosophila*, la proteïna dSAP18 es troba codificada pel gen *bin1* localitzat en el cromosoma 3R, a la posició citogenètica 89B7.

En aquesta tesi hem treballat amb diverses línies de *Drosophila melanogaster*.

1.1 Línies salvatges per l'expressió de la proteïna dSAP18

En aquesta tesi hem utilitzat mosques salvatges per l'expressió de dSAP18, tan mosques de la línia *white* (w^{1118}) com *yellow-white* (*yw*).

1.2 Al·lels mutants per a *dsap18*

Al mateix temps hem treballat amb diversos al·lels mutants per l'expressió de la proteïna dSAP18.

1.2.1 al·lel *dsap18*¹¹⁷ i al·lel *dsap18*^{R7-18}

L'al·lel *dsap18*¹¹⁷ ens va ser cedit pel grup del Dr. Hanes (Singh et al., 2005). I és el resultat d'una escissió imprecisa de l'element transposable EP(3R)3462 inserit a la regió 5'-UTR del gen *dsap18* (veure **figura R.1**). Aquesta escissió ha deixat un fragment del transposó original de 1.7 Kb i s'ha emportat un fragment de 601 pb que conté la regió 5' UTR i part de l'ORF (*open reading frame*) de *dsap18*. L'al·lel *dsap18*¹¹⁷ és un al·lel nul per dSAP18 i alhora és letal en homozigosi.

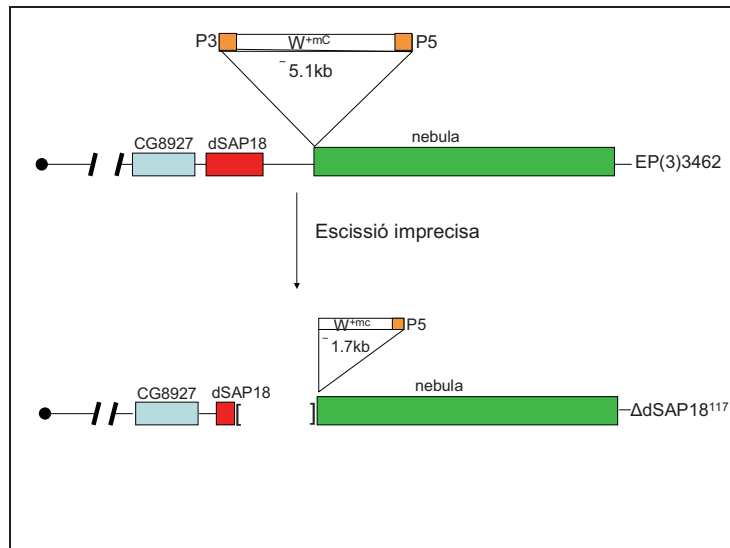


Figura R.1. Esquema de la generació de l'al·lel dSAP18¹¹⁷

L'al·lel *dsap18*^{R7-18} va ser obtingut a partir de l'al·lel *dsap18*¹¹⁷ per recombinació meiótica per tal d'eliminar possibles mutacions recessives residuals degut al salt de l'element transposable. *dsap18*^{R7-18} també és un al·lel letal en homozigosi.

1.2.2 *Df(3R)sbd*⁴⁵

La *Df(3R)sbd*⁴⁵ és una deficiència que afecta a unes 25 gens entre els que s'inclou *bin-1*. Aquesta deficiència també és letal en homozigosi

1.2.3 RNAi de dSAP18

Per tal d'obtenir un model alternatiu de falta d'expressió de la proteïna ens hem plantejat obtenir mosques transgèniques que expressessin un RNA d'interferència de dSAP18.

L'RNA d'interferència (RNAi) és un mecanisme que es base en la degradació d'un RNA missatger (mRNA). S'inicia a partir d'un RNA llarg de doble cadena, que l'enzim Dicer processa en petits fragments d'entre 20-25 pb: els siRNA (*small interfering RNA*). Aquests siRNA són les molècules claus de la ruta de l'RNAi, i es caracteritzen per tenir seqüències nucleotídiques complementàries a les de l'mRNA diana. Aquests siRNA són incorporats en el complex RISC (*RNA-induced silencing*) on té lloc el reconeixement i la

fragmentació de l'mRNA diana en petits fragments que no són traduïts a proteïna. D'aquesta manera es produeix el silenciament del gen en qüestió.

L'RNA de doble cadena s'obté clonant una mateixa seqüència genòmica als dos costats d'un intró en orientacions invertides (veure **figura R.2**). Després de la transcripció, l'RNA que en resulta consta de dues cadenes complementàries que poden plegar-se sobre si mateixes i degut a la presència de l'intró formen un *hairpin*. A *Drosophila* es pot induir l'expressió d'aquest *hairpin* mitjançant el sistema GAL4/UAS (Brand et al., 1994), de manera que podem interferir l'expressió d'un gen en qualsevol teixit i qualsevol moment del desenvolupament.

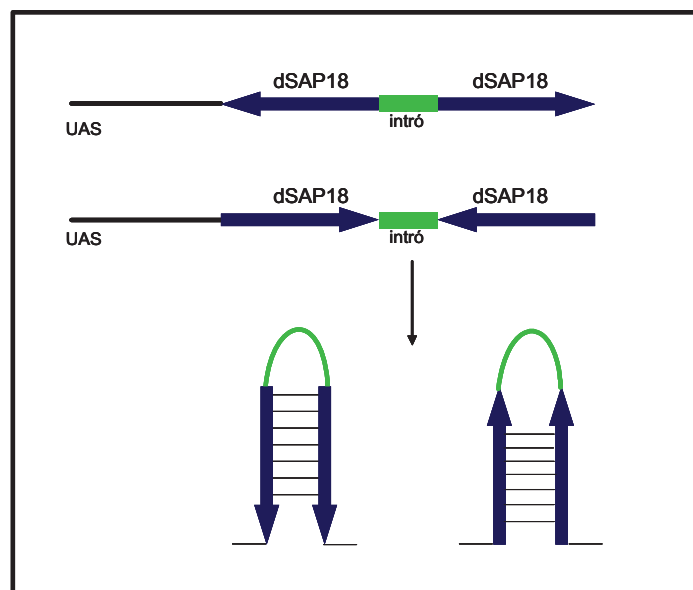


Figura R.2. Esquema de la orientació de les seqüències clonades per tal que al transcriure's formen un *hairpin*.

En el nostre cas, per aconseguir la degradació específica de l'RNA de *dsap18*, hem clonat la seqüència codificant pel cDNA de *dsap18* en dos vectors diferents: pUASP i pWiz. Aquestes vectors tenen promotors i terminadors diferents, això fa que el transgèn pugui expressar-se a la línia germinal en el cas de pUASP però no en el cas de pWiz. Tan pUASP com pWiz contenen llocs UAS que recluten l'activador transcripcional GAL4. Aquesta proteïna pot expressar-se sota el control de múltiples promotors, tan generals com induïbles, que anomenem *drivers*. Per obtenir individus que expressessin l'RNAi de dSAP18 hem creuat les diverses línies transgèniques obtingudes tan

Resultats

de pUASP- RNAidSAP18 com de pWiz- RNAidSAP18 amb mosques portadores de diferents *drivers*.

Hem comprovat els nivells de dSAP18 en els individus obtinguts d'aquests creuaments per *Western-Blott* o per immunotincions. Resumim els anàlisis que hem realitzat a la **Taula R.1**.

vector	línia	driver	anàlisi
pUASP	totes	<i>daugtherless (da)</i>	W.B. a embrions
	105	<i>da</i>	immunotinció a ovaris
		69B	immunotinció a ovaris
	92	69B	W.B. a larves immunotinció a glàndules i discos
		actina	W.B. a embrions W.B. a larves
		<i>nanos (nos)</i>	immunotinció a ovaris
		<i>patched (ptc)</i>	immunotinció a discos
		Totes	<i>engrailed (en)</i>
vector	línia	driver	anàlisi
pWiz	87.1	actina	W.B. a larva
		<i>da</i>	
		<i>en</i>	immunotinció a discos
	1.3	actina	W.B. a larva
		<i>da</i>	
		<i>en</i>	immunotinció a discos

Taula R.1. La taula mostra els assajos que hem realitzat per analitzar el funcionament de l'RNAi de dSAP18 a les diferents línies obtingudes i amb els diferents *drivers* utilitzats. (W.B. significa *Western-blott*).

En l'anàlisi de les línies que inclouen la construcció pUASP-RNAi *dsap18* en cap cas hem observat disminucions en els nivells de la proteïna dSAP18. En les línies pWiz-RNAi *dsap18* 1.3 i pWiz- RNAi *dsap18* 87.1 hem observat lleugeres disminucions en els nivells de proteïna en immunolocalitzacions a discos utilitzant el driver en-GAL4. A la **imatge R.3** es mostren els resultats més representatius que hem obtingut.

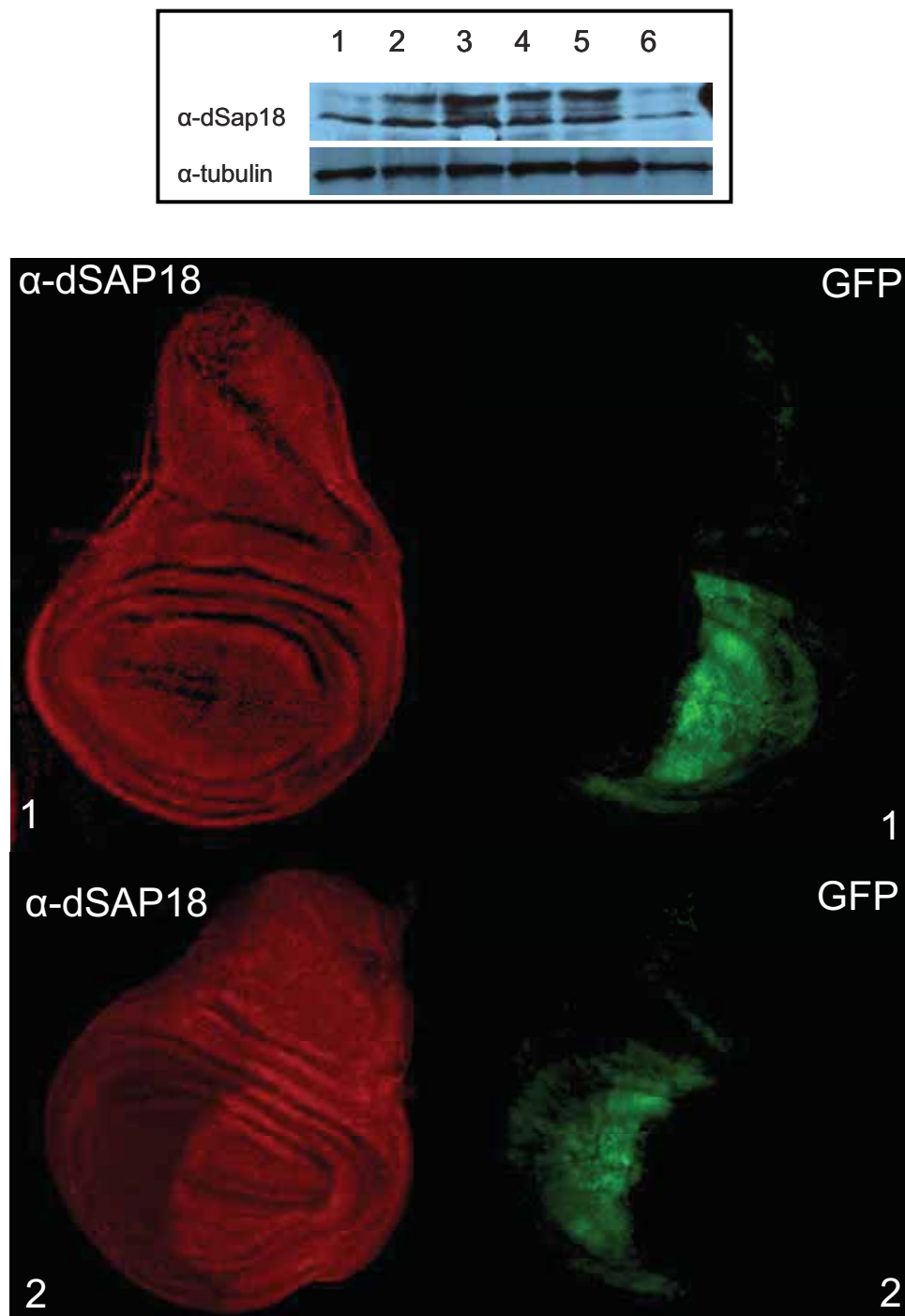


Figura R.3 Funcionament de l'RNAi a les diferents línies obtingudes. A la imatge superior es mostra un W.B. fet a larves da-GAL4; UAS-pUASP. RNAi *dsap18* línies 53 (punt 2), 86 (punt 3), 87 (punt 4), 103 (punt 5) i 105 (punt 6). El punt 1 correspon a larves control da-Gal4;+. A la part inferior trobem immunolocalitzacions de la proteïna dSAP18 a discos de larves en-GAL4-GFP; pUASP RNAi *dsap18* línia 105 (1) i en-GAL4-GFP; pWiz RNAi *dsap18* línia 87.1 (2). En aquesta última és on s'observa que l'RNAi funciona a la part del disc on s'expressa *en*.

Amb aquests resultats es posa de manifest que l'RNAi només funciona quan utilitzem el vector pWiz. Malauradament però només hem observat disminució dels nivells de dSAP18 a larva, però no als primers estadis del desenvolupament utilitzant *drivers* generals com actina. Actualment estem generant un *stock act*; pWiz- RNAi *dsap18* línia 87.1 per veure si quan les mares expressen el dsRNA de *dsap18* s'observa disminució dels nivells de dSAP18 al llarg de tot el desenvolupament.

1.2.4 Al·lel PB {WH}f0437

Actualment al laboratori estem caracteritzant un nou mutant de dSAP18. Aquest nou mutant s'ha obtingut per la inserció d'un element transposable *P-bac* (PBac) a la regió del gen *bin1*. Aquest al·lel en homozigosi també és letal. Al laboratori hem comprovat que aquest element es troba inserit dins l'intró del gen *bin1*. Actualment estem analitzant si l'expressió de la proteïna dSAP18 es veu afectada per la inserció d'aquest element.

1.2.5 Obtenció d'una nova deficiència que no descobreix el gen *GATAe*

La deficiència *Df(3R)sbd*⁴⁵ que descobreix el gen *bin1* consisteix en una deleció que avarca la regió genòmica 89B4-89B10. Aquesta deficiència afecta a uns 25 gens, entre ells el gen *GATAe*. Degut a alguns dels resultats que més tard mostrarem, ens va semblar interessant obtenir una deficiència similar a la *Df(3R)sbd*⁴⁵ però sense afectar el gen *GATAe*.

Existeixen col·leccions de línies mutants de *Drosophila* amb elements transposons amb seqüències FRT inserits en punts coneguts del genoma. Si es combinen dos elements FRT propers i en la orientació adequada, en presència de la flipasa FLP aquests elements recombinen generant la deleció de la regió compresa entre ells. La recombinació es detecta per la pèrdua del marcador *white*⁺ que porten associats aquests elements FRT i posteriorment es confirma per PCR (Parks et al., 2004) (veure **figura R4**).

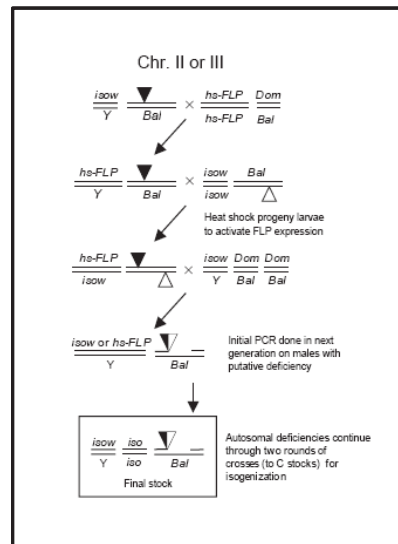


Figura R.4. Esquema de les deleccions basades en el sistema FLP-FRT. Els triangles indiquen les insercions del transposons amb elements FRT. Extret de Parks et al. 2004.

Hem creuat mascles portadors d'un d'aquests elements (en concret XPCG6126/TM6B) amb femelles verges portadores del transgèn de la recombinasa (P{hsFLP} y w^{1118} ; DrMio/TM3 Sb). Els mascles que resulten d'aquest creuament, i que són portadors d'un element FRT i de la recombinasa FLP (hsFLP/y; XPCG6126/TM3) es creuen amb femelles verges portadores de l'altre element FRT (w^{1118} ; wH pnr). Després de dos dies es sotmet la progènie (entre la que es troben individus que contenen els dos FRTs i la flipasa) a 1h de *heat-shock* a 37°C per induir l'expressió de la recombinasa. Es repeteix aquest *heat-shock* durant quatre dies més. Les femelles verges que en resultin es creuen amb mascles doble balancejats. Els mascles que neixen d'aquest creuament i que tenen els marcadors adequats i els ulls blancs són els que han patit la recombinació desitjada. Després d'ampliar la línia es confirma la delecció per PCR.

Aquesta nova deficiència que hem creat l'anomenem Def+G (deficiència portadora de *GATAe*).

1.3 Línia que expressa una proteïna de fusió ectòpica *dsap18-HA*

La línia *dsap18-HA* conté una còpia ectòpica de la regió genòmica del gen *bin-1* amb la incorporació d'un *tag* d'hemaglutinina (HA) per tal d'expressar

Resultats

una proteïna de fusió dSAP18-HA (els detalls d'aquesta construcció s'especifiquen en l'apartat de materials i mètodes d'aquesta tesi). Tenim dues línies que expressen aquesta proteïna ectòpica, una que ha incorporat aquest transgèn al cromosoma X i l'altra al cromosoma II.

Assajos d'immunoprecipitació a embrions homozigots per l'al·lel *dsap18-HA* mostren la presència d'aquesta proteïna de fusió encara que els nivells d'expressió són inferiors als de la proteïna endògena (veure **figura R5**).

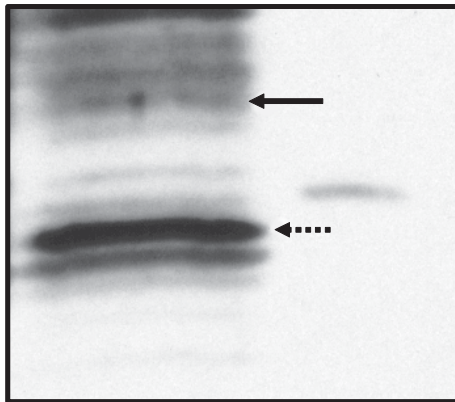


Figura R.5. Western-blott de la immunoprecipitació de la proteïna SAP18 a partir d'extractes proteics d'embrions SAP18-HA. A la figura es mostra la proteïna ectòpica fusionada a hemaglutinina (HA) (fletxa contínua) i la proteïna endògena (fletxa discontinua). L'altra carril és la proteïna dSAP18 recombinant que porta unit un tag d'histidines. La senyal de la banda

corresponent a la proteïna dSAP18-HA ha estat determinada amb un anticòs comercial α -HA.

1.4. Combinacions d'al·lels i letalitat

1.4.1 Línia *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*

La línia *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* s'ha obtingut del creuament de mosques portadores de l'al·lel *dsap18¹¹⁷* amb mosques portadores de la deficiència *Df(3R)sbd⁴⁵*. Com hem comentat anteriorment, ambdós al·lels són letals en homozigosi però no quan es combinen. Per tant del creuament de mosques *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* els únics adults que s'obtenen són *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*. Aquesta línia no expressa la proteïna dSAP18, i tot i que són mosques viables existeix certa letalitat. Per tal de quantificar el grau de letalitat hem realitzat el següent creuament:

$$\text{♀ dSAP18-HA /+; dSAP18}^{117} / \text{TM6} \times \text{♂ Df(3R)sbd45 / TM6}$$

Hem realitzat tres creuaments independents i hem analitzat totes les mosques obtingudes. Els resultats obtinguts els esquematitzem en la següent taula (veure **Taula R.2**):

freqüència esperada	individus cromosoma 2; cromosoma 3	freqüència obtinguda
1/6	<i>dsap18-HA/+;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵</i>	88/549 ($\approx 1/6$)
2/6	<i>dsap18-HA/+;TM6/Df(3R)sbd⁴⁵</i> o <i>dsap18¹¹⁷</i>	197/549 ($\approx 2/6$)
1/6	<i>+/+; dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵</i>	52/549 ($\approx 0.5/6$)
2/6	<i>+/+; TM6/ Df(3R)sbd⁴⁵</i> o <i>dsap18¹¹⁷</i>	212/549 ($\approx 2/6$)

Taula R.2. Letalitat de la línia *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*. En la taula s'indiquen el número d'individus obtinguts per a cada un dels genotips.

Mentre que quan s'expressa el transgèn corresponent a la proteïna dSAP18-HA la freqüència de mosques obtingudes és similar a la freqüència esperada, quan no hi ha el transgèn la freqüència d'individus *+/+;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* és significativament inferior a l'esperada cosa que indica que la falta de la proteïna dSAP18 provoca certa letalitat.

1.4.2 línia *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*

Del creuament de la línia *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* amb la línia *dsap18-HA* obtenim la línia *dsap18-HA; dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*. Aquestes mosques no expressen la proteïna SAP18 endògena, però en canvi si que expressen la proteïna de fusió ectòpica dSAP18-HA.

2. CARACTERITZACIÓ DEL PATRÓ D'EXPRESSIÓ DE LA PROTEÏNA dSAP18

2.1 LOCALITZACIÓ NUCLEAR DE LA PROTEÏNA dSAP18 a *Drosophila melanogaster*

2.1.1 Localització de la proteïna dSAP18 a embrions de *Drosophila melanogaster*

Els primers estadis del desenvolupament embrionari de *Drosophila* consisteixen en 13 divisions sincròniques rapidíssimes en que mai es forma membrana cel·lular completa entre els nuclis, l'embrió és per tant un sinciti. A partir de la setena divisió els nuclis comencen a migrar cap a la perifèria, i entre les divisions 10 i 13 gairebé tots es troben a la perifèria de l'embrió, és l'estadi de blastoderm sincitial. Després de la divisió 13, es produeix la cel·lularització, en el que les membranes cel·lulars entre els nuclis es tanquen totalment, aquest estadi rep el nom de blastoderm cel·lular. A partir de la divisió 14, es perd la sincronia, ja no es divideixen totes les cèl·lules de manera sincrònica sinó que només entren en mitosi determinants grups de cèl·lules de l'embrió anomenats dominis mitòtics. Es comencen a produir també diverses invaginacions, que permeten la formació de diferents estructures; tot aquest procés es coneix com a gastrulació. Posteriorment es produeixen els processos d'organogènesi i diferenciació. En l'estudi de la localització de la proteïna dSAP18 durant el desenvolupament de l'embrió, ens hem centrat bàsicament en els estadis de pre-blastoderm, blastoderm sincitial i cel·lular, i gàstrula (**Figura R6**).

Durant el primer estadi del desenvolupament embrionari o estadi de pre-blastoderm, la proteïna dSAP18 no té una localització concreta, sinó que es troba ocupant tot l'embrió (**Figura R6.1**). Aquest patró és característic de proteïnes maternes. A mesura que avancen les divisions nuclears, dSAP18 esdevé una proteïna nuclear (**Figura R6.2 i R6.3**) i manté aquesta localització durant la resta del desenvolupament embrionari.

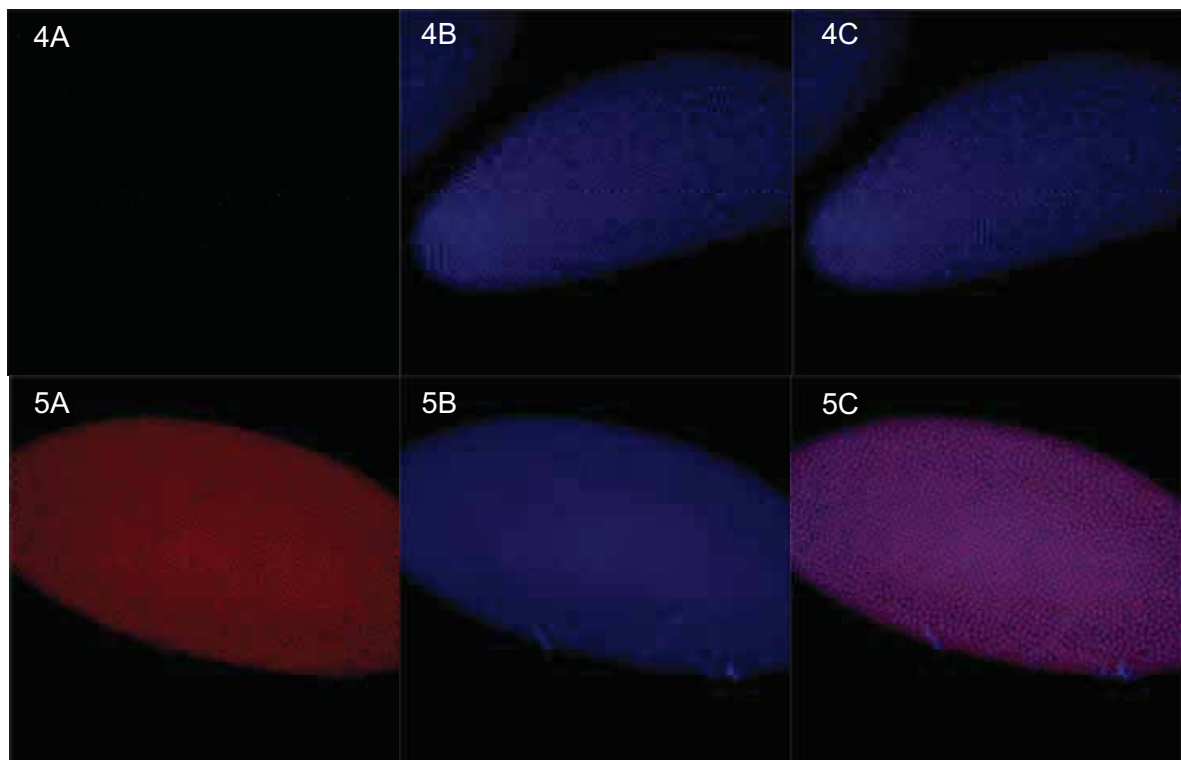
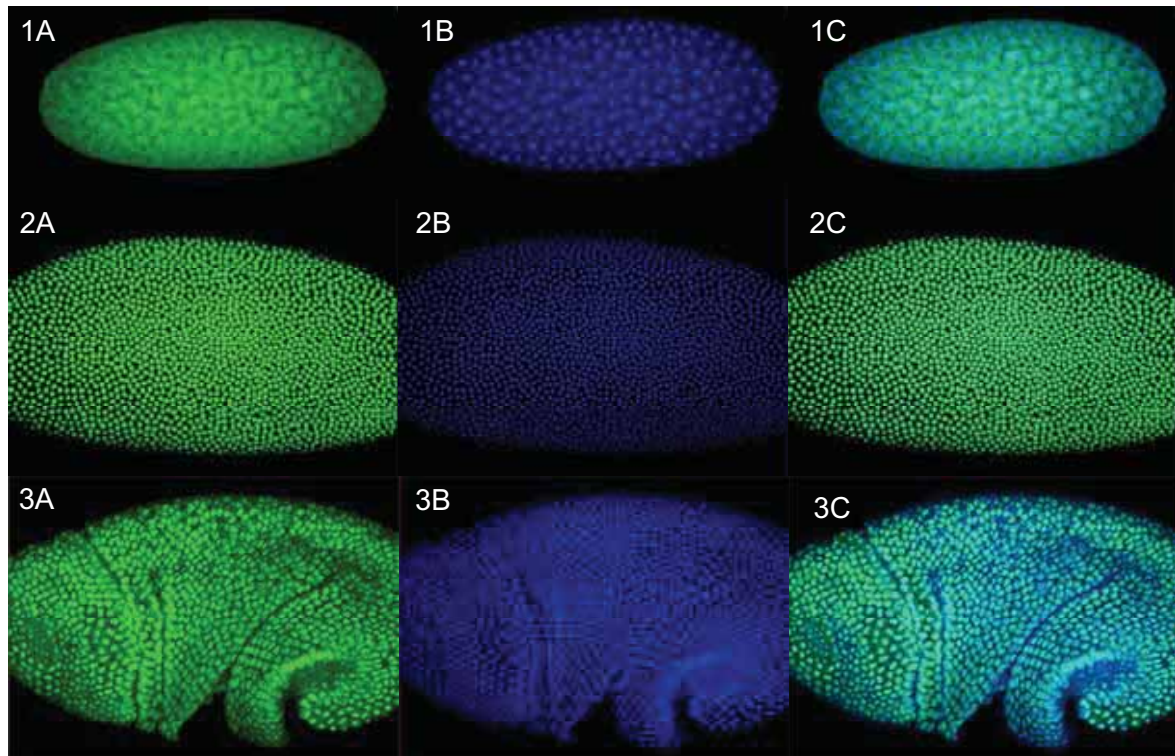


Figura R.6. Localització de la proteïna dSAP18 a embrions de *Drosophila melanogaster*. (1-3) embrions salvatges (w^{118}), (4) embrió $dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$ i (5) embrió $sap18-HA$. Les figures A) corresponen a la immunotinció de la proteïna dSAP18 amb un anticòs α -dSAP18 (1-4) α -HA (5), B) correspon al DNA i C) correspon al solapament de A i B.

La detecció de l'anticòs és específica, ja que en embrions *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* que no expressen la proteïna dSAP18, no obtenim cap tipus de marcatge al realitzar aquestes immunolocalitzacions (**Figura R6.4**). I alhora, en embrions que contenen una còpia ectòpica de la regió genòmica de dSAP18 fusionada a un *tag* d'hemaglutinina (HA), i que per tant expressen una proteïna de fusió SAP18-HA, la immunodetecció amb un anticòs anti-HA dóna el mateix marcatge que hem vist en els embrions salvatges (**Figura R6.5**).

Podem concloure per tant, que durant el desenvolupament embrionari de *Drosophila*, la proteïna dSAP18 és una proteïna nuclear.

2.1.2 Localització de dSAP18 a larva

S'ha estudiat la localització de dSAP18 a diferents teixits larvaris: glàndules salivals, cervell i discos imaginals.

Les glàndules salivals participen en la digestió de la larva i per tant són unes estructures importants pel creixement i el desenvolupament d'aquest organisme. En aquestes estructures, la proteïna dSAP18 també té una localització nuclear (**Figura R7.1**).

Els neuroblastes són els progenitors neuronals de *Drosophila*, generant la majoria de les cèl·lules del sistema nerviós central d'aquest organisme. Són cèl·lules que es divideixen de manera asimètrica, donant lloc a dues cèl·lules filles de diferent mida i diferent destí. La més gran és un nou neuroblast que continuarà dividint-se de manera asimètrica i la més petita, anomenada cèl·lula mare ganglionar (*ganglion mother cell* o GMC), es veu compromesa a la diferenciació cap a neurona o cèl·lula glial (Chia et al., 2008). En neuroblasts la proteïna dSAP18 és nuclear durant la interfase. En mitosi, es veu un molt subtil i difús marcatge de la proteïna a la zona nuclear, però sense que hi hagi una concentració sobre els cromosomes mitòtics (**Figura R7.3**).

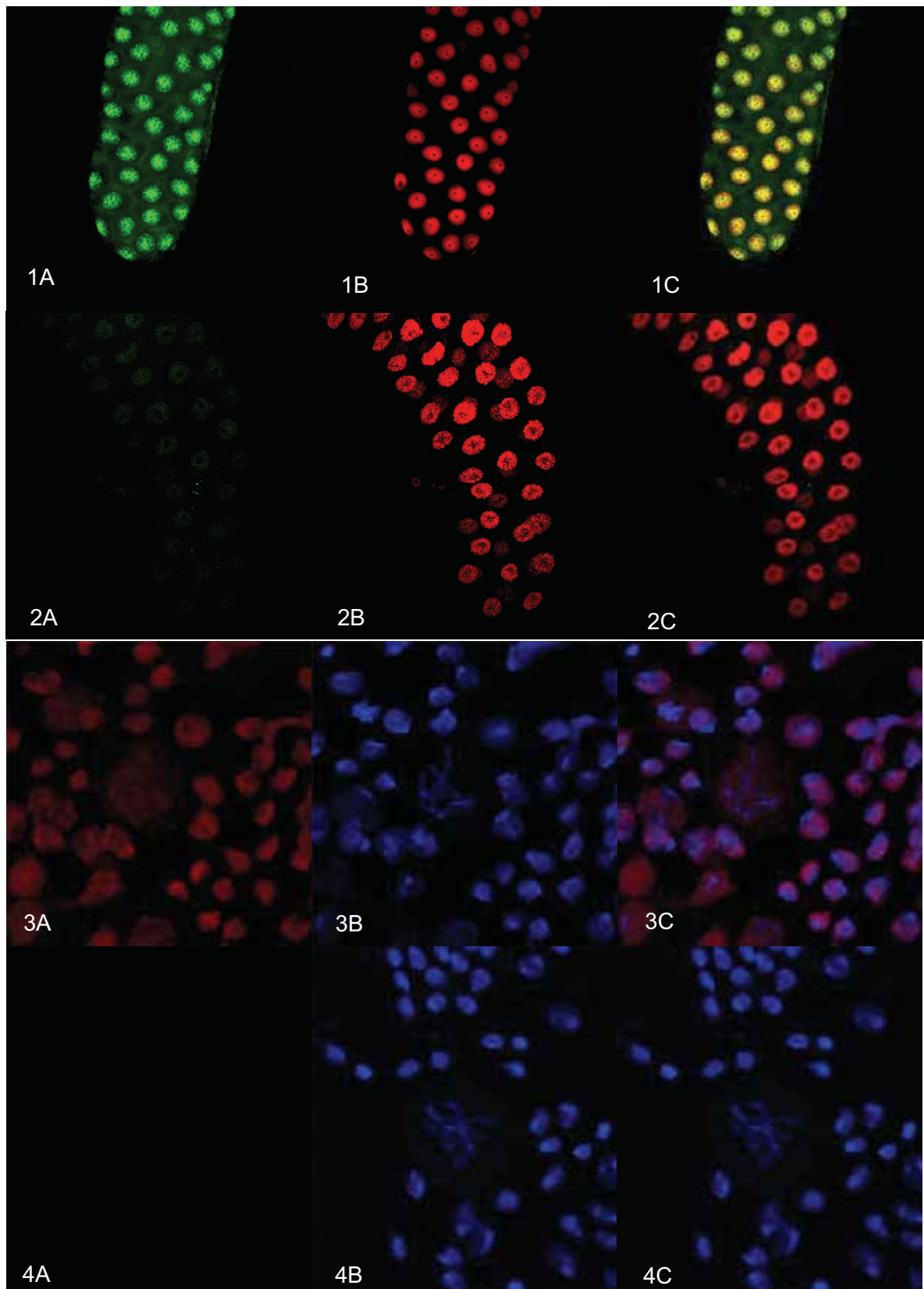


Figura R.7. Localització de la proteïna dSAP18 a larva. (1 i 2) corresponen a glàndules salivals, (3 i 4) corresponen a neuroblastes. 1 i 3 és a larves w^{1118} , 2 i 4 és a larves $dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$. En tots els casos (A) correspon a dSAP18, (B) al DNA, i (C) solapament de dSAP18 i DNA.

Resultats

També a larves, la senyal de l'anticòs és específica perquè en immunotincions de glàndules salivals i neuroblastes e larves *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* no observem cap tipus de marcatge (**Figura R7.2 i R7.4** respectivament).

Finalment, dSAP18 també és nuclear a discs imaginals (**Figura R8**). Els discs imaginals són les parts de l'insecte que originaran, durant el procés de metamorfosi, estructures externes de l'adult tals com les ales, els alteris o les potes entre altres. Els discs es determinen en l'epiteli embrionari i augmenten de mida, mitjançant divisions cel·lulars, durant l'estadi larvari. Durant la metamorfosi, els discs imaginals pateixen processos de reorganització i les seves cèl·lules es divideixen per tal de donar lloc a l'estructura adulta per la qual havien estat determinats.

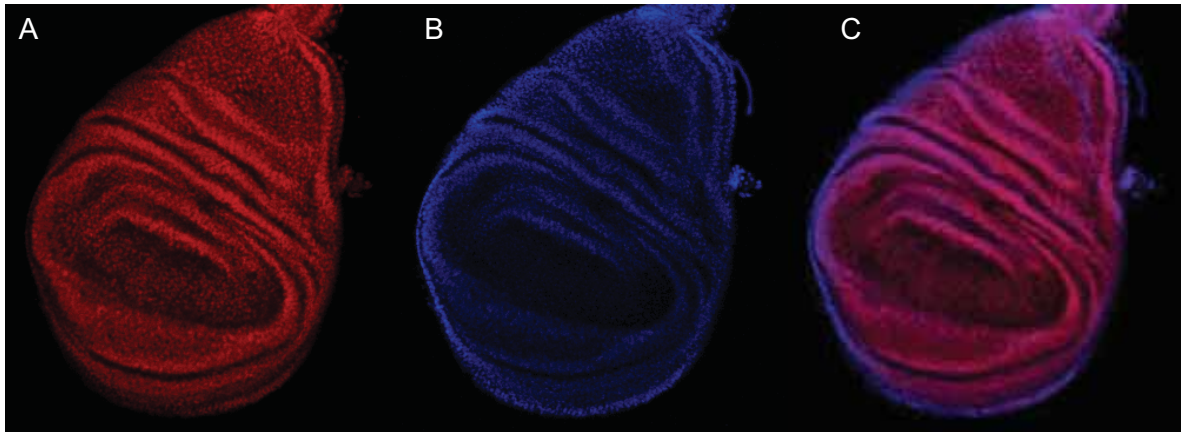


Figura R.8. Localització de la proteïna dSAP18 a discos imaginals de larves *w¹¹¹⁸*. (A) correspon a dSAP18, (B) al DNA, i (C) solapament de dSAP18 i DNA.

2.1.3 Localització de dSAP18 a l'adult

S'ha estudiat la localització de dSAP18 a ovaris ja que la proteïna dSAP18 és una proteïna materna.

Els ovaris són uns dels teixits més ben estudiats de les mosques adultes. Són unes estructures particulars que inclouen l'oòcit i cèl·lules accessòries (les cèl·lules fol·liculars i les *nurse cells*). Les cèl·lules fol·liculars són les que formen les parets de l'ovari i per tant envolten a l'oòcit i les *nurse cells*. Les *nurse cells*, són cèl·lules poliploides encarregades de nodrir l'oòcit proporcionant-li macromolècules i fins i tot orgànuls al llarg del procés de l'oogènesi. Al final d'aquest procés el citoplasma residual de les *nurse cells* es transfereix a l'oòcit que ha experimentat un important creixement durant aquest

procés. En experiments d'immunolocalitzacions a ovaris veiem que dSAP18 apareix tan a l'oòcit, en les cèl·lules fol·liculars com en les *nurse cells*, i que en tots tres tipus cel·lulars dSAP18 és una proteïna nuclear (**Figura R9.1**). De nou, l'anticòs anti-dSAP18 no dóna cap tipus de marcatge a ovaris de mosques que no expressen la proteïna dSAP18 (**Figura R9.2**).

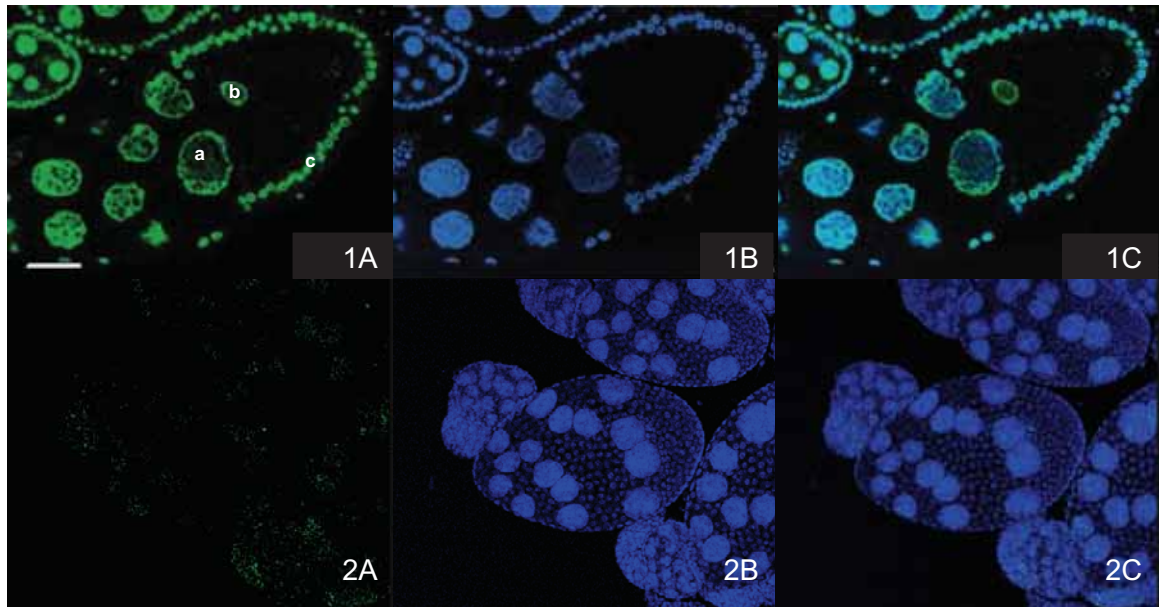


Figura R.9. Localització de la proteïna dSAP18 a ovaris de femelles w^{118} (1) i $dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$ (2). (A) dSAP18, (B) DNA i (C) solapament de dSAP18 i DNA. (a) indica el nucli d'una cèl·lula *nurse*, (b) indica el nucli de l'oòcit i (c) indica les cèl·lules fol·liculars.

2.1.4 Localització de la proteïna dSAP18 a cèl·lules en cultiu SL2

En cèl·lules embrionàries en cultiu, cèl·lules SL2, dSAP18 també mostra una localització nuclear (**Figura R10**).

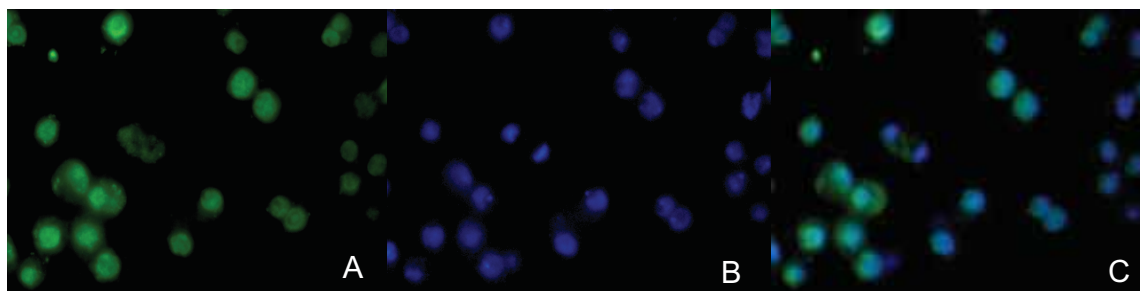


Figura R1.0. Localització de la proteïna dSAP18 a cèl·lules en cultiu SL2. (A) dSAP18, (B) DNA i (C) solapament de dSAP18 i DNA.

2.2 LOCALITZACIÓ INTRANUCLEAR DE dSAP18

Al llarg del desenvolupament, la proteïna dSAP18 mostra un patró de localització nuclear. En alguns dels teixits analitzats, com per exemple a ovaris, dSAP18 presenta una distribució dins el nucli no uniforme amb un particular enriquiment a la membrana nuclear (**Figura R9.1**) Aquesta senyal perinuclear s'observa també en immunotincions a glàndules. Dobles tincions de dSAP18 i lamina, la proteïna constituent de la matriu nuclear, confirmen aquesta localització perinuclear (**Figura R11.1**).

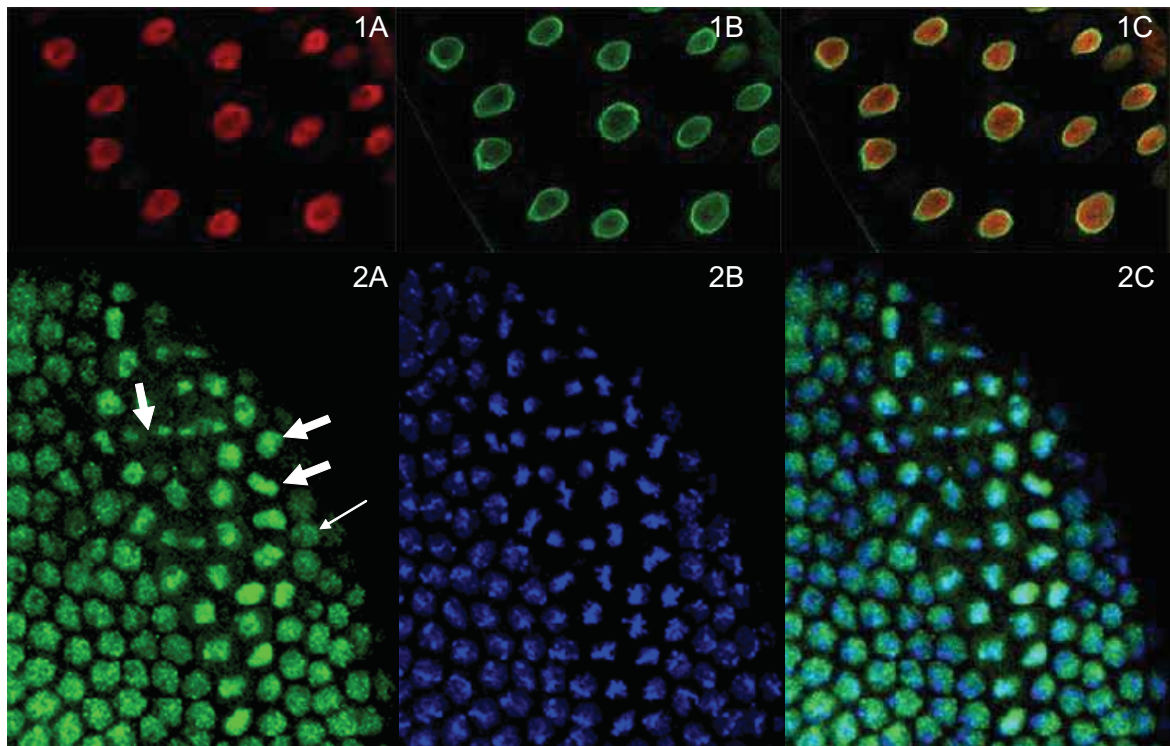


Figura R.11. Localització intranuclear de la proteïna dSAP18. (1) localització perinuclear de dSAP18 a glàndules salivals de larves w^{1118} (A) correspon a dSAP18, (B) a lamina i (C) és el solapament de A i B. (2) domini mitòtic d'una gàstrula w^{1118} , les fletxes indiquen diferents estadis del cicle cel·lular: les gruixudes indiquen cèl·lules en prometafase, metafase i telofase i la fletxa més prima indica una cèl·lula en interfase. (A) correspon a dSAP18, (B) al DNA i (C) és el solapament de A i B.

D'altra banda, hem observat canvis en els nivells de dSAP18 al llarg del cicle cel·lular en embrions. Això s'observa clarament a gàstrula on hi ha cèl·lules en les diferents fases del cicle. Com ja hem mencionat anteriorment, a la gàstrula les divisions cel·lulars deixen de ser sincròniques i anomenem dominis mitòtics als grupets de cèl·lules que es troben en mitosi. Doncs bé, les

cèl·lules que es troben en profase i metafase presenten sempre uns nivells de dSAP18 superiors als de les cèl·lules interfàsiques veïnes (veure **figura R11.2**). Posteriorment, durant l'anafase i la telofase, els nivells de dSAP18 disminueixen sent semblants als de les cèl·lules interfàsiques. A més dSAP18 apareix sempre sobre els cromosomes. Aquest fenomen en canvi, no té lloc en els cromosomes mitòtics de neuroblastes. En aquest teixit no observem la proteïna associada sobre els cromosomes sinó de manera difusa en l'espai nuclear (veure **figura R7.3**). I tampoc observem canvis pel que fa als nivells globals de proteïna en les diferents fases de la divisió cel·lular.

Per tal d'analitzar la capacitat de dSAP18 d'associar-se al DNA hem realitzat assajos d'immunolocalitzacions a cromosomes politènics de *Drosophila*. Aquests cromosomes s'obtenen a partir de les glàndules salivals de larves de tercer estadi del desenvolupament i són cromosomes interfàsics gegants que han patit un elevat nombre d'endoreplicacions sense posterior divisió cel·lular. La finalitat d'aquest fenomen és aconseguir una major transcripció gènica. Al fer immunolocalitzacions de la proteïna sobre aquests cromosomes dSAP18 apareix associada a loci concrets (**Figura R12.1 i R12.2**). La tinció d'aquests cromosomes amb un marcador de DNA com és el DAPI ofereix un patró de bandes i interbandes que obeeix a l'estat de compactació de la cromatina. Les bandes, que són les zones tenyides més intensament amb DAPI, corresponen a les zones d'heterocromatina. En canvi, les interbandes són les zones eucromàtiques. El patró de bandes corresponent a dSAP18 apareix sempre en aquestes zones d'interbanda, és a dir a les regions d'aquests cromosomes menys condensades. Al mateix temps, dSAP18 també apareix associada al que es coneix com a *puffs*. Els *puffs* són engruiximents dels cromosomes politènics que van canviant al llarg del temps i que es correlacionen amb zones d'una elevada transcripció (Spradling et al., 1975) (**Figura R12.1 i R12.2**). I en canvi la proteïna no es veu a regions heterocromàtiques com el cromocentre ni a les regions més condensades.

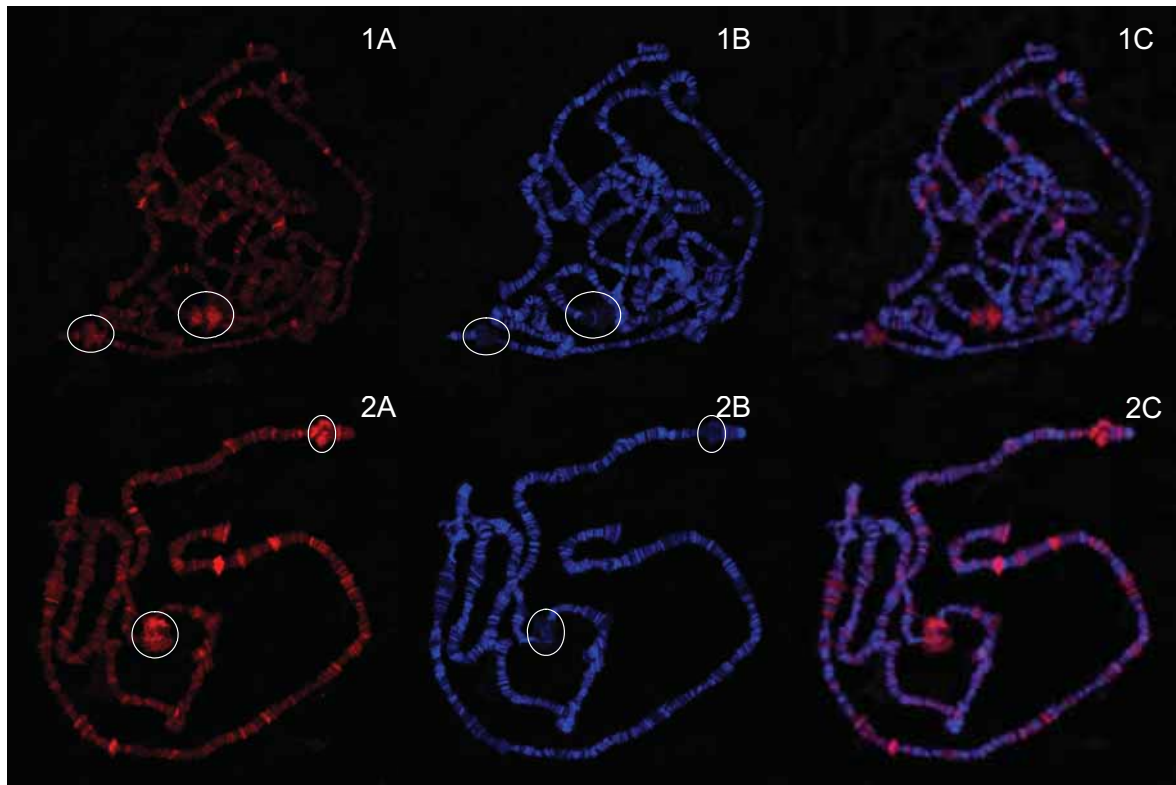


Figura R.12. Localització de la proteïna dSAP18 a cromosomes politènics de larves w^{1118} (A) dSAP18, (B) DNA i (C) és el solapament de A i B.

Aquesta localització de dSAP18 en regions concretes del nucli l'hem caracteritzada en assajos “*in vitro*” de fraccionament cel·lular. Amb aquest assaig es lisen hipotònicament les cèl·lules per obtenir-ne la fracció citoplasmàtica. Seguidament, els nuclis són tractats amb DNAsal per extreure a una baixa concentració salina les proteïnes nuclears lliures o unides dèbilment a la cromatina, i posteriorment amb una elevada concentració salina s'extreuen les proteïnes unides fortament al DNA. El precipitat insoluble que s'obté després de l'extracció amb elevada concentració salina correspon a la fracció de matriu nuclear.

Tal i com mostra el *Western-blott* de la **figura R13**, no s'observa presència de dSAP18 a la fracció citoplasmàtica. En canvi, dSAP18 apareix tan a la fracció de baixa com d'alta concentració salina, cosa que confirma la seva associació amb el DNA. Alhora una part significativa de dSAP18 s'associa a la matriu nuclear. Els controls utilitzats per confirmar que no existeixen contaminacions entra les diferents fraccions són la histona H3 (que només

apareix a la fracció d'elevada concentració salina) i lamina (que només apareix a matriu nuclear).

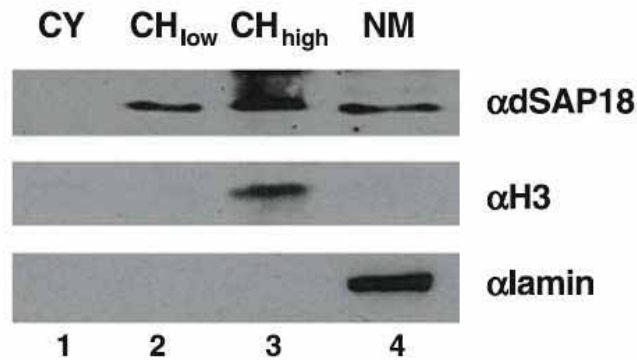


Figura R.13. Fraccionament bioquímic de cèl·lules SL2. La columna 1 correspon a la fracció citoplasmàtica (CY), la columna 2 a l'extracció amb baixa concentració salina (CH_{low}), la columna 3 a l'extracció amb alta concentració salina (CH_{high}), i finalment la columna 4 correspon a la fracció de matriu nuclear (NM). Les diferents fraccions van ser separades en gel d'acrilamida i analitzades per *Western-blott* amb els anticossos que s'indiquen.

Amb aquests resultats demostrem que la proteïna dSAP18 és una proteïna nuclear durant tot el desenvolupament de *Drosophila melanogaster*. Alhora, dSAP18 és capaç d'associar-se amb el DNA i la matriu nuclear.

3. IDENTIFICACIÓ DELS PROCESSOS FUNCIONALS ON PARTICIPA dSAP18

3.1 ASSAJOS D'IMMUNOCOL·LOCALITZACIÓ DE dSAP18 A CROMOSOMES POLITÈNICS

3.1.1 dSAP18 i els complexos polycomb

El nostre grup ha descrit la presència de la proteïna dSAP18 sobre la regió del BX-C a cromosomes politènics de *Drosophila*. El complex Bithorax (BX-C) de *Drosophila* és un *cluster* format per tres gens homeòtics: *Ultrabithorax (Ubx)*, *Abdominal-A (Abd-A)* i *Abdominal-B (Abd-B)* amb la funció de controlar la identitat dels segments que donaran lloc al tòrax posterior i l'abdomen de la mosca. Els nostres estudis mostren que la proteïna es troba implicada en la regulació de l'expressió del gen *Abd-B*, ja que la falta de dSAP18 potencia la transformació homeòtica del segment abdominal A6 a A5.

Alhora, en línies transgèniques portadores d'un gen reporter *white* sota el control de l'element regulador Fab-7 del complex Bithorax de *Drosophila*, la proteïna dSAP18 es troba sobre la còpia ectòpica de l'element regulador Fab-7. Aquest element es troba format per un element *boundary* i un element de resposta a polycomb (o PRE). Els PREs són elements reguladors implicats en el manteniment del silenciament gènic al llarg del desenvolupament. Els *boundary* són regions de DNA que separen dominis de cromatina conferint-los identitat i autonomia, i són crucials per a la correcta regulació de l'expressió dels gens homeòtics a cada segment al llarg del desenvolupament (Mihaly et al., 1998; Zhou et al., 1999; Barges et al., 2000; Belozarov et al., 2003). Alhora, els boundaries del BX-C presenten també activitat *enhancer-blocking*, és a dir, eviten el contacte entre *enhancer* i promotor quan es troben en còpies ectòpiques. Els nostres anàlisis mostren que la falta de dSAP18 altera l'expressió del gen *reporter*, indicant una participació de la proteïna dSAP18 en la funció *boundary* o en el silenciament degut a polycomb de l'element regulador Fab-7.

Per esbrinar si dSAP18 pot trobar-se associada a complexos polycomb hem realitzat assajos d'immunolocalització a cromosomes politènics de dSAP18 i la proteïna membre del complex polycomb PRC1 Posterior sex combs (Psc). Tal i com es veu a la **figura R14.1** dSAP18 no col·localitza amb aquesta proteïna. Tampoc es produeix col·localització amb la marca epigenètica que s'associa a aquests complexos repressors: la trimetil·lació de la lisina 27 de la histona H3 (veure **figura R14.2**). Aquests resultats indiquen que la proteïna dSAP18 no forma part del complex PRC1 ni es troba associada a la marca epigenètica que reconeixen els complexos polycomb.

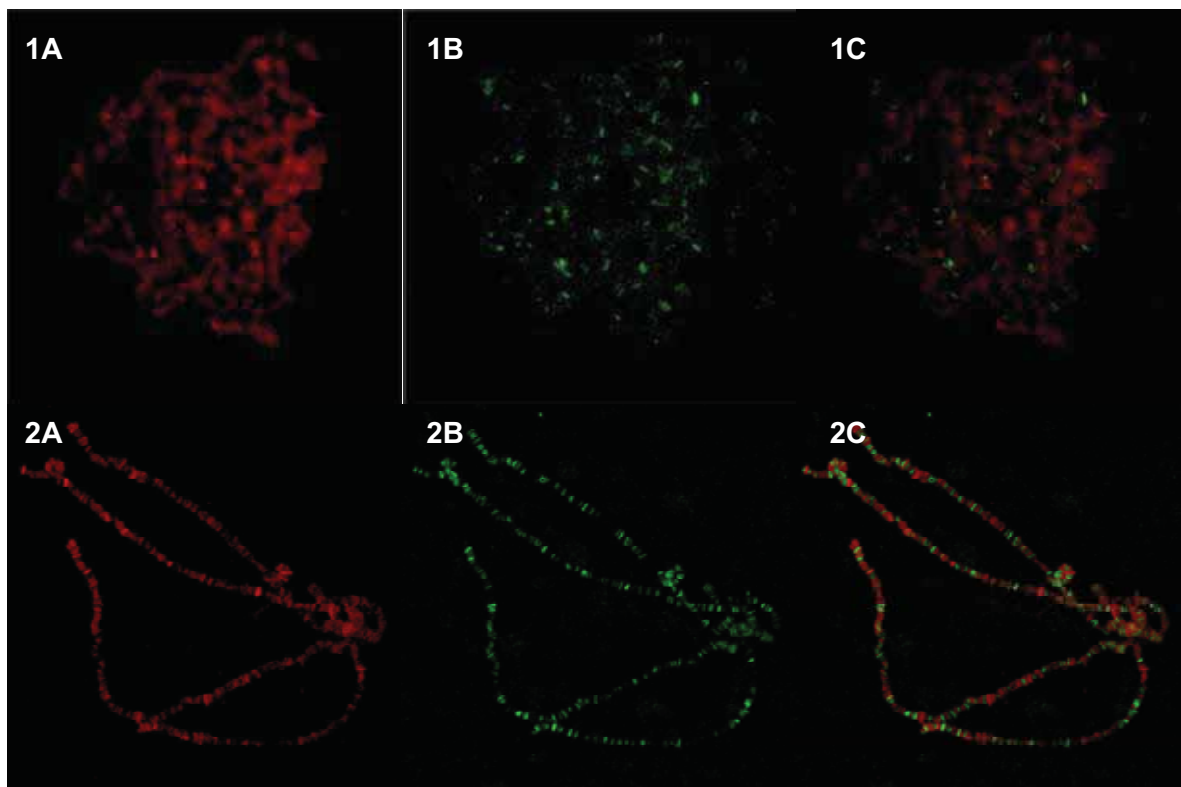


Figura R.14. Immunocol·localitzacions a cromosomes politènics. (1) dSAP18 i Psc, (2) dSAP18 i la trimetilació de la lisina 27 de la histona H3. (A) correspon a dSAP18, (B) Psc en (1) o trimetil-K27H3 en (2), (C) solapament de A i B.

3.1.2 dSAP18 i el complex Sin3-HDACs

Com hem dit a la introducció, la proteïna SAP18 va ser descrita per primer cop a mamífers com a membre del complex repressor de la transcripció Sin3-HDACs (Zhang et al., 1997). Per esbrinar si a *Drosophila melanogaster* dSAP18 també forma part d'aquest complex, en el nostre laboratori s'han realitzat a partir d'extractes de cèl·lules SL2, assajos de co-immunoprecipitació

Resultats

de la proteïna dSAP18 amb els homòlegs a *Drosophila* de Sin-3 i de la desacetilasa HDAC1 (Rpd3). Aquestes co-immunoprecipitacions però no han donat mai un resultat positiu.

Tot i això, per comprovar si dSAP18 pot associar-se a complexos desacetiladors de la cromatina hem realitzat assajos de col·localització de la proteïna dSAP18 i l'acetilació de la histona H3 a cromosomes politènics (**Figura R15**). Aquestes immunolocalitzacions no mostren una col·localització total de la proteïna dSAP18 ni amb la histona acetilada ni amb la histona desacetilada (veure **figura R15**). Per tant, tot això suggereix que a *Drosophila* la proteïna dSAP18 no es troba formant un complex estable amb Sin-3/HDACs.

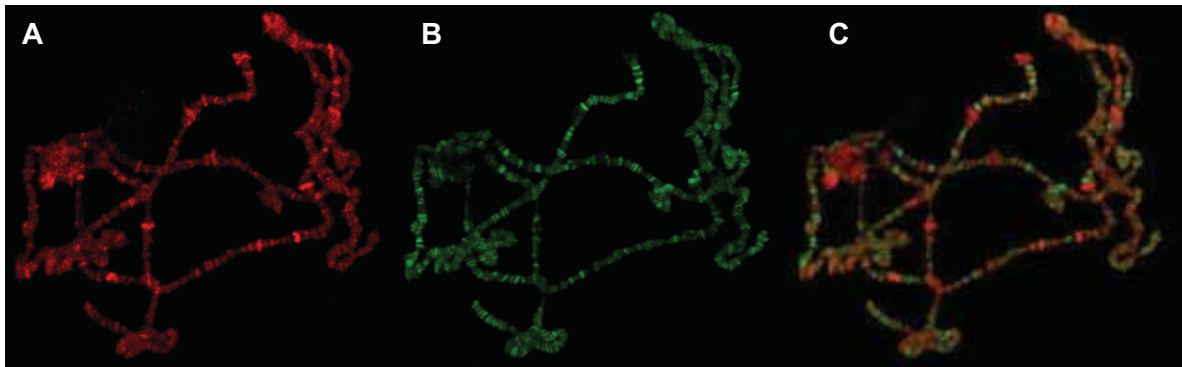


Figura R.15. Localització de dSAP18 i la histona H3 acetilada. (A) dSAP18, (B) histona ac-H3, (C) solapament de A i B.

3.1.3 dSAP18 i la regulació transcripcional

Com hem vist a l'apartat 2.5 la proteïna dSAP18 es localitza a les zones transcripcionalment actives dels cromosomes politènics, les interbandes i els puffs, i degut a que la fosforilació de la Ser10 de la histona H3 es troba associada a aquestes estructures (Nowak and Corces, 2000), ens hem preguntat si dSAP18 col·localitza amb aquesta modificació. Tal i com veiem a la **figura R16** efectivament es produeix una col·localització important entre dSAP18 i aquesta modificació epigenètica, no només als puffs sinó també en molts dels loci que s'observen al llarg dels cromosomes.

Per esbrinar, si dSAP18 s'associa directament amb la maquinària transcripcional, hem realitzat assajos d'immunocol·localització amb la RNA polimerasa II. Quan aquest enzim és reclutat a un promotor, abans que s'iniciï

la transcripció, es troba hipofosforilat. Per tal que la transcripció s'iniciï, cal que l'enzim es fosforili a la serina 5 (Pol II^{ser5}), en aquest estat de fosforilació la RNA polimerasa II només pot progressar entre 20 i 40 pb. Per tal que la transcripció continuï cal que l'enzim torni a ser fosforilat, en aquest cas a la serina 2 (Pol II^{ser2}). Existeixen anticossos específics que reconeixen aquests dos estats de fosforilació de la RNA polimerasa II, i nosaltres els hem utilitzat per esbrinar si la proteïna dSAP18 col·localitza amb alguna d'aquestes dues variants. La **figura R16** mostra el resultat d'aquestes col·localitzacions: dSAP18 col·localitza de manera discreta amb aquestes dues variants de la Pol II. Si comparem la col·localització entre les dues, semblaria que amb la Pol II^{ser2} la col·localització és lleugerament més important, ja que les bandes més intenses de dSAP18 (en verd a la imatge) col·localitzen amb la Pol II^{ser2} (en vermell a la imatge). Això no passa en canvi per la Pol II^{ser5}, on la col·localització tindria lloc en les bandes més sotils. En tots dos casos però, la col·localització és menys important que amb la histona H3 fosforilada.

Amb aquests resultats podem concloure que la proteïna dSAP18 es troba associada als llocs transcripcionalment més actius dels cromosomes politènics. Però el paper que juga la proteïna en aquests loci no es pot associar ni amb l'inici de la transcripció ni amb la fase d'elongació.

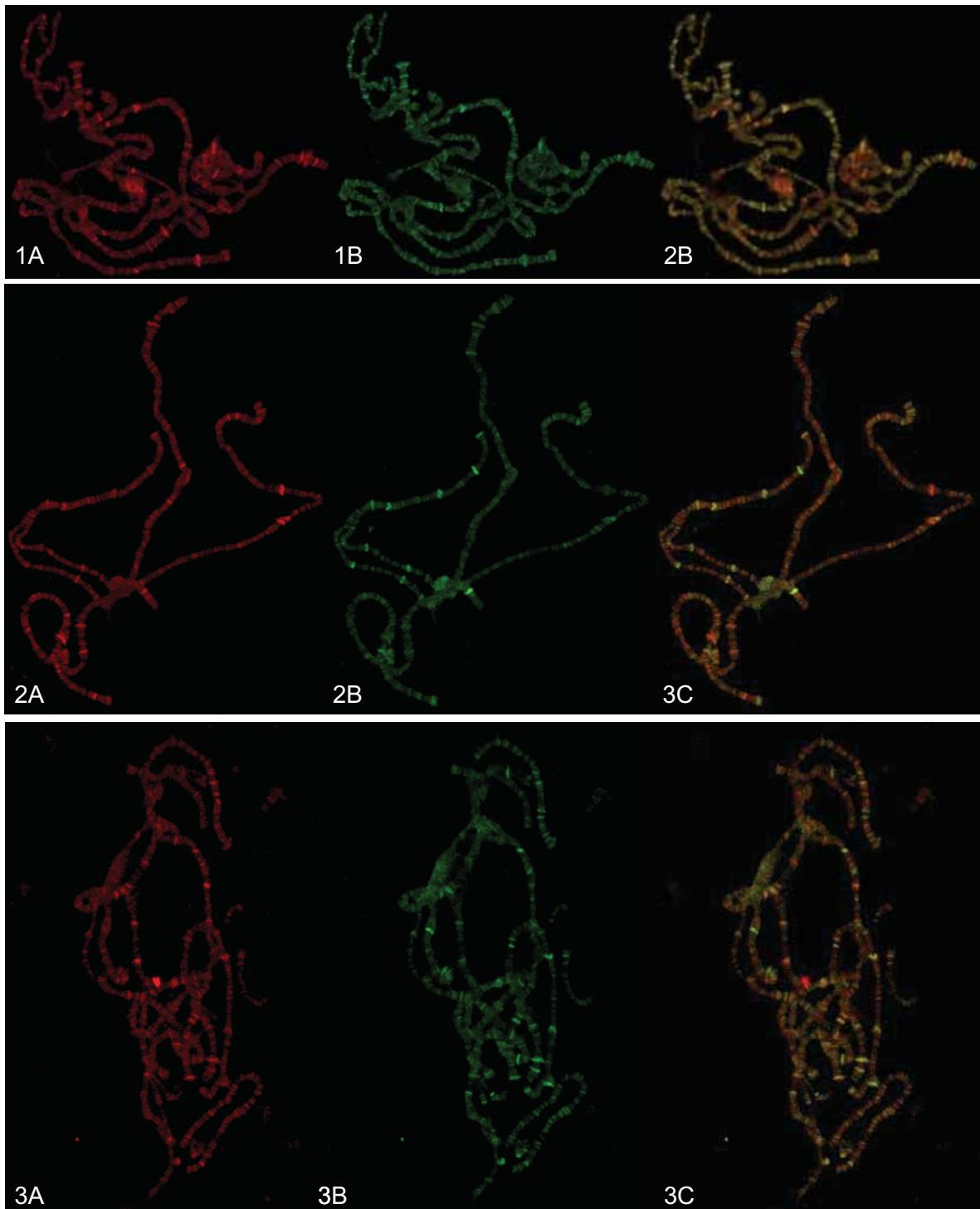


Figura R.16. Col·localització de dSAP18, la histona H3 fosforilada a la Ser10 i la RNA polimerasa II a cromosomes politènics. (1) col·localització amb p-S10H3, (2) correspon a la col·localització amb Pol II^{ser5} i (3) amb Pol II^{ser2}, (A) correspon a dSAP18 (1) i a RNA polimerasa II (2-3), (B) a la p-ser10H3 (en 1) i a dSAP18 (en 2-3) i (C) al solapament de (A) i (B).

3.1.4 dSAP18 i la resposta a *heat-shock*

Es coneix que en una situació d'estrès tèrmic la fosforilació de la serina 10 de la histona H3 es redistribueix en els cromosomes politènics. La histona H3 es fosforila als loci que codifiquen per les proteïnes de *heat-shock* mentre que es desfosforila als loci que abans es trobaven actius i ara són reprimits. Aquesta redistribució no es produeix per l'acetilació, d'aquí que es suggereixi que aquesta marca epigenètica és la responsable de l'activació transcripcional dels gens de resposta a *heat-shock* (Nowak and Corces, 2000).

Per esbrinar si la proteïna dSAP18 també pateix aquesta redistribució, hem sotmès larves del tercer estadi a un estrès tèrmic de 30 minuts a 37°C. Al fer immunocol·localitzacions de dSAP18 i la histona fosforilada en els cromosomes politènics d'aquestes larves, observem que la senyal de dSAP18 també pateix un cert canvi (**figura R17**). S'observa una disminució en la quantitat de bandes, i la proteïna es localitza als loci dels gens de resposta a *heat-shock*, tal i com passa amb la histona fosforilada. Tot i això la senyal de la proteïna dSAP18 en aquests *puffs* no és tan intensa com la de la histona fosforilada.

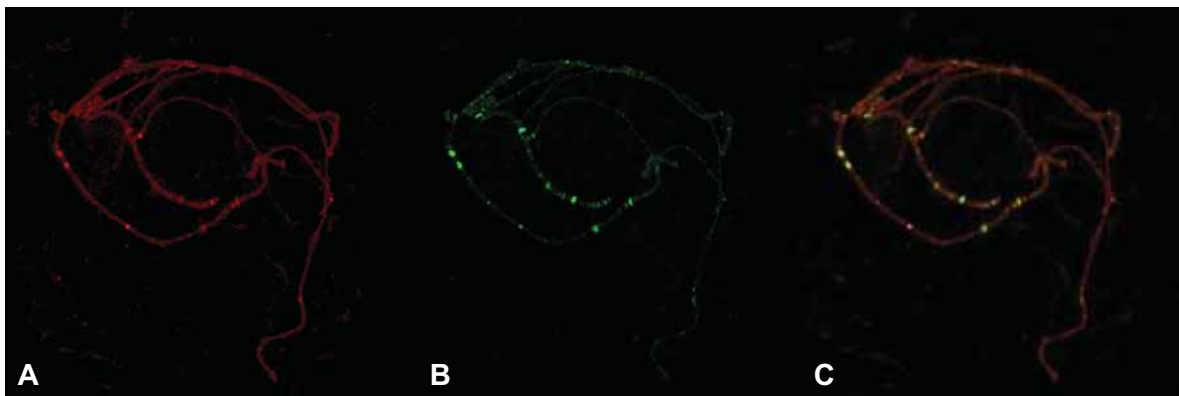


Figura R.17. Col·localització de dSAP18 i la H3 fosforilada a la Ser 10 en una situació de *heat-shock*. (A) dSAP18, (B) p-ser10H3 i (C) solapament de A i B.

Després de veure que en una situació de *heat-shock* la proteïna dSAP18 es localitza en els loci que codifiquen per les proteïnes de resposta a *heat-shock* i per tal d'analitzar si dSAP18 és important per la resposta a estrès tèrmic, hem sotmès larves que no expressen dSAP18 a condicions de *heat-shock*. En concret hem utilitzat larves que no expressen la proteïna dSAP18, *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*, i larves homozigotes per l'al·lel *dsap18¹¹⁷* (obtingudes a partir de l'*stock dsap18¹¹⁷/TM3-GFP*) que hem comparat amb larves control

Resultats

dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵ i *w¹¹¹⁸* respectivament. Després d'una situació de *heat-shock* les larves que no expressen dSAP18 presenten tumors melanòtics, tal i com el de la **figura R.18**. Aquests tumors apareixen després d'unes 4-5 hores d'haver provocat l'estrès tèrmic i en alguns casos es generalitzen fins a provocar la mort de la larva.



Figura R.18. Tumor melanòtics en una larva *dsap18¹¹⁷/ dsap18¹¹⁷* en resposta a una situació de *heat-shock*.

Hem representat la incidència d'aquests tumors en les diferents línies analitzades en la següent gràfica.

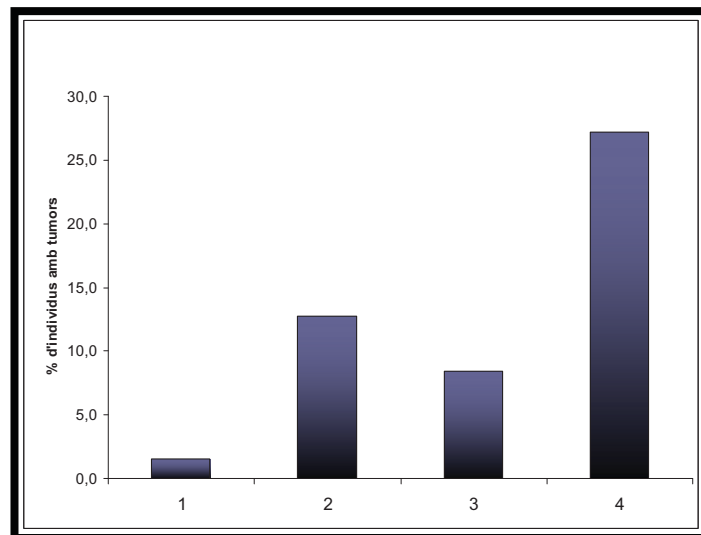


Figura R.19. El gràfic representa l'aparició de tumors melanòtics després d'un tractament d'estrès tèrmic a larves (1) *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*, (2) *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*, (3) *w¹¹¹⁸* i (4) *dsap18¹¹⁷/ dsap18¹¹⁷*

La falta de dSAP18 provoca una clara sensibilitat a l'aparició de tumors melanòtics en resposta a un estrès tèrmic (veure **figura R.19**, comparar 1 amb 2, i 3 amb 4). Això s'observa tan a les larves *dsap18¹¹⁷/dsap18¹¹⁷* que

presenten una incidència d'aparició d'aquests tumors del 27.2% respecte a un 8% de larves *w¹¹¹⁸*. I en les larves *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* que presenten una incidència en l'aparició d'aquests tumors del 12.8 % respecte a l'1.5% de les larves *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*. Les diferències entre els percentatges d'aparició d'aquests tumors entre les diferents línies de larves analitzades també suggereixen que la deficiència *Df(3R)sbd⁴⁵* protegeix les larves de l'aparició d'aquests tipus de tumors. Caldrien assajos moleculars per esbrinar els mecanismes pels quals la proteïna dSAP18 participa en la resposta a *heat-shock*.

3.2 ASSAJOS DE MICROARRAYS A EMBRIONS dSAP18-HA;dSap18¹¹⁷/Df(3R)sbd45 i dSap18¹¹⁷/Df(3R)sbd45

3.2.1 Els microarrays

Per tal d'analitzar els processos funcionals en els quals es troba implicada la proteïna dSAP18 hem comparat els transcriptomes d'embrions 0-24 hores que expressen dSAP18 *versus* embrions del mateix període que no expressen la proteïna mitjançant assajos de *microarrays* de DNA.

La tecnologia de xips o *microarrays* de DNA permet l'anàlisi simultani de milers de gens en un únic experiment i per tant, ofereix la possibilitat de monitoritzar el patró d'expressió de milers de gens entre dues mostres diferents per tal d'identificar-ne les diferències a nivell transcripcional. Això ha revolucionat l'estudi de l'expressió gènica, ja que s'ha passat de l'anàlisi d'un únic gen a l'avaluació de l'expressió gènica del genoma complet. Existeixen dos tipus principals de microarrays que es diferencien en funció del mètode de fabricació i la naturalesa de l'àcid nucleic immobilitzat, són els microarrays de DNA i els microarrays d'oligonucleòtids.

En el nostre experiment en concret hem utilitzat microarrays d'oligonucleòtids sintetitzats per l'empresa **Operon** que es descriuen amb detall a l'apartat de materials i mètodes d'aquesta tesi. Una de les primeres decisions a prendre va ser quines mostres utilitzar. Respecte als embrions mutants que no expressessin dSAP18, la decisió ha estat fàcil: hem utilitzat l'*stock dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* on cap dels embrions d'aquest *stock* expressa la proteïna dSAP18. Alhora d'escollir amb quins embrions que expressen dSAP18 comparàvem aquest mutant, se'ns oferien dues possibilitats: o bé embrions *w¹¹⁸* o bé embrions com el mutant però que expressen una proteïna ectòpica dSAP18-HA. En qualsevol assaig de *microarrays* és necessari que la majoria dels *spots* que s'obtinguin siguin grocs, és a dir, que la gran majoria de gens s'expressin d'igual manera entre les dues mostres que es comparen, i que els canvis només afectin un reduït nombre de gens. Al fer *microarrays* comparant embrions 0-24h mutants respecte embrions 0-24h *w¹¹⁸* resultava que la gran majoria dels *spots* que s'obtenien eren o verds o vermells (veure **figura R20**). Això indicava que les mostres que estàvem comparant eren massa diferents genèticament per poder-les comparar mitjançant aquesta tècnica. Això és degut

al fet que els embrions $dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$ són portadors d'una deficiència que descobreix el gen *bin-1* però que alhora afecta a un 25 gens més, que en aquests embrions es troben per tant en heterozigosi. Els embrions w^{1118} no tenen aquesta deficiència, i per tant tenen més diferències amb els embrions $dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$ que l'expressió de dSAP18. Els embrions $dsap18-HA; dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$ en canvi, si tenen la deficiència. Al fer assajos de microarrays entre embrions $dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$ i $dsap18-HA; dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$, la majoria dels spots són grocs, i per tant si que són mostres que poden ser comparades mitjançant experiments de *microarrays* (veure **figura R20**).

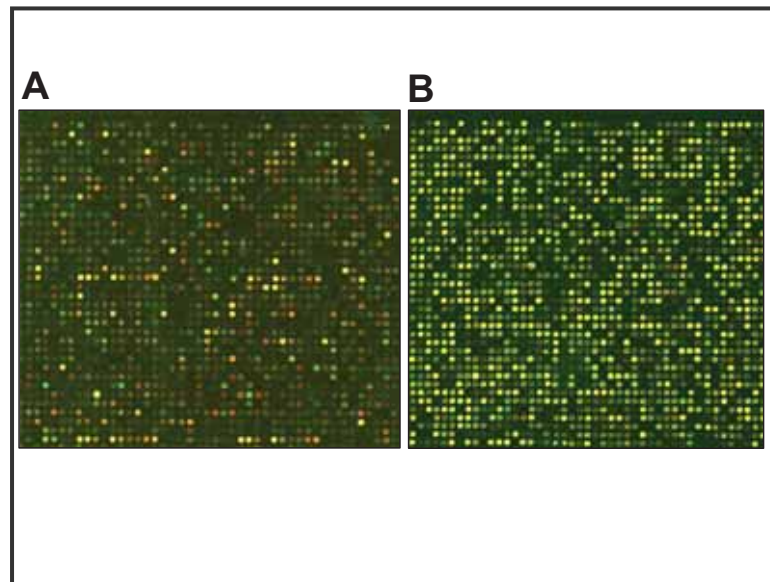


Figura R.20. A la figura es mostra una porció de dos experiments de *microarrays* diferents, a la part (A) es comparen els transcriptomes d'embrions $dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$ versus embrions w^{1118} . A la figura (B) es comparen embrions $dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$ versus embrions $dsap18-HA; dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$. Mentre que en la figura (A) la majoria dels spots són verds o vermells, en (B) la majoria són grocs.

Hem realitzat un total de 4 *arrays*. En tots ells hem comparat l'RNA d'embrions 0-24h $dsap18-HA; dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$ amb RNA d'embrions del mateix període $dsap18^{117}/Df(3R)sbd^{45}$. Hem realitzat rèpliques tècniques (*dye swap*) i rèpliques biològiques (utilitzant extraccions d'RNA noves). Un cop

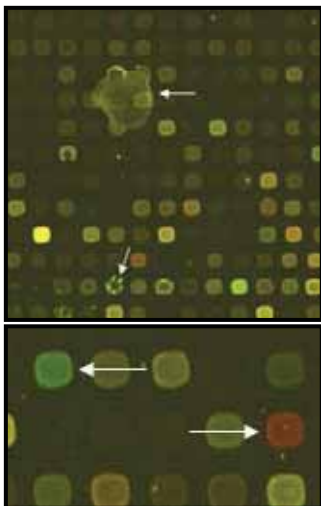
hibridats cada un d'aquests *microarrays* hem realitzat el seu anàlisi amb la col·laboració del Dr. Sergi Beltran.

3.2.2 Anàlisi dels microarrays

3.2.2.1 Escaneig

L'anàlisi dels microarrays comença en la transformació d'una imatge en una taula numèrica amb la qual començar l'anàlisi estadístic per extreure'n conclusions biològiques. La primera part de l'anàlisi és l'**escaneig** que en el nostre cas hem realitzat amb el programa GenePix Pro 6.0. La imatge típica que coneixem dels microarrays, un cúmulo de punts grocs, verds i vermells, s'obté d'escanejar la senyal emesa per cada un dels fluorocroms al excitar-los amb els làsers. En concret, l'escaneig dóna dues imatges independents, una corresponent al fluorocrom Cy3 i l'altra al Cy5.

El mateix programa enganxa a aquesta imatge una plantilla que conté tota la informació de la situació dels punts dels *microarrays*. És a dir, assigna a cada punt de l'*array* les seves coordenades i si correspon a un gen concret, un *spike* o un control positiu o negatiu. Tot i que l'ajustament d'aquesta plantilla a la imatge es fa de manera automàtica, cal comprovar manualment que s'hagi realitzat d'una manera correcta i alhora cal marcar com a *dolents* els punts on hi ha hagut una mala impressió o una mala hibridació i marcar com a *bons* els



punts que són molt verds o molt vermells (veure **figura R21**).

Figura R.21. Les dues imatges corresponen a imatges escanejades amb el programa GenePix Pro 6.0 d'un dels nostres *microarrays*. A la imatge superior les fletxes mostren *spots* on hi ha hagut una mala hibridació de la sonda. A la imatge inferior es mostren dos *spots* que hem marcat com a *good*.

A partir d'aquesta imatge escanejada el programa GenePix calcula més de 50 variables per a cada punt, entre aquestes trobem la intensitat de cada canal, el *background*, el número de píxels, la circularitat de l'*spot*... i representa totes

aquestes dades en una taula. És així com passem de la imatge dels *spots* a la taula de números amb la qual podem començar l'anàlisi bioinformàtic. De totes aquestes variables la més important és el \log_2 de la ratio de les intensitats pels dos canals ($\log_2 I(A)/I(B)$), perquè és la mesura que ens diu quant groc/verd/vermell és cada punt.

3.2.2.2 Filtratge i normalització

Tot i això encara no podem treure conclusions d'aquestes dades: cal filtrar-les i normalitzar-les. El **filtratge** de les dades consisteix en eliminar els punts que no són bons. Per decidir quins punts són bons i quins no ho són hem utilitzat dos criteris:

- 1) **Utilització de flags.** La utilització de *flags* implica que els valors que hem marcat durant l'escaneig amb el GenePix com a dolents (perquè tenien una mala impressió o una mala hibridació) no s'utilitzin en el procés de normalització. El programa permet convertir aquests punts en NA (valors perduts) en l'arxiu final. Alhora, els punts que hem marcat com a *bons* passen directament a la normalització.
- 2) **Substracció del background.** Definim un punt dolent com aquell que té una baixa intensitat o un elevat soroll de fons (*background*). En concret, considerem un punt com a bo si té un valor d'intensitat com a mínim el doble del valor de *background* en cada un dels canals. Per això és important haver marcat abans els punts verds o vermells com a *bons* ja que sinó aquests serien eliminats amb aquest criteri de filtració.

Existeixen diversos punts de variabilitat sistemàtica que provoquen alteracions en els valors d'expressió gènica, entre aquests podem trobar: diferents eficiències en el procés de marcatge i en la detecció de la fluorescència dels dos canals, així com, diferències en la quantitat inicial d'ARNm o problemes en la manipulació. Anomenem normalització al procés pel qual es corregeix aquesta variació. El procés de normalització es base en l'existència d'algun punt de referència que pot ser externa, quan s'utilitzen *spikes*, o bé interna quan es base en l'assumpció de que la majoria de gens no canvien de manera diferencial i que el nombre de gens que augmenten els seus nivells d'expressió és similar al nombre de gens que els disminueixen. Per

tant, assumint que la quantitat d'RNAm afegida és la mateixa, la intensitat total dels canals verd i vermell han de ser iguals. Aquesta és l'aproximació més senzilla, però n'hi ha d'altres, com per exemple utilitzar com a valors normalitzadors els gens *housekeeping*, l'expressió dels quals teòricament no canvia. Una vegada escollit el mètode de normalització és important utilitzar el mateix mètode per a tots els *arrays*. Malgrat que el programa GenePix permet també la normalització de les dades, en el nostre cas hem utilitzat el programa TIGR.Midas. Nosaltres hem seguit els següents criteris de normalització:

- 1) **Paràmetre de normalització LOWESS.** La funció de normalització LOWESS normalitza les intensitats del canal A i del canal B de tots els *spots* aplicant un algoritme i ajusta aquestes intensitats pels dos canals a partir del factor LOWESS obtingut.
- 2) **Normalització segons la desviació estàndard:** Aquesta normalització es base en l'assumpció que tots els *spots* dins el mateix bloc de *l'array* es mouen dins el mateix rang de $\log_2 I(A)/I(B)$. La funció de regularització segons la desviació estàndard ajusta les intensitats del canal A i del canal B de cada *spot* per tal que els *spots* dins el mateix bloc tinguin la mateixa desviació estàndard per la distribució $\log_2 I(B)/I(A)$.
- 3) **Normalització OLIN.** Aquesta normalització utilitza un mètode molt semblant al LOWESS però amb la diferència que l'usuari no escull els paràmetres a ajustar sinó que el propi algoritme compara els resultats derivats de donar diferents valors a aquests paràmetres i escull els més adequats. (Veure **figura R22**)

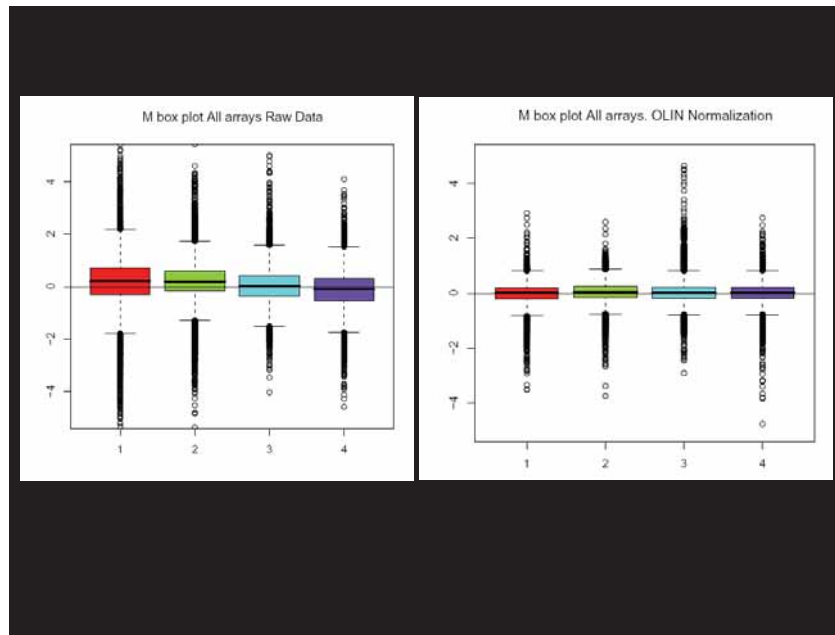


Figura R.22. A la figura es mostren els resultats dels 4 *arrays* que hem realitzat abans i després de la normalització OLIN.

3.2.2.3 Anàlisi dels resultats

L'últim pas de l'anàlisi és el test de significança, en el nostre cas hem utilitzat el t-test. Aquest test calcula un valor p pels diferents gens dels tenint en compte tots els microarrays per tal d'identificar els gens que són significatius. Considerem que són gens significatius els que tinguin un valor $p < 0.05$.

Aquest test de significança l'hem calculat utilitzant el programa **Limma**. Limma és un paquet informàtic per l'anàlisi de l'expressió diferencial de diferents valors que s'obtenen a partir d'experiments de *microarrays*. Està dissenyat per tal d'analitzar experiments complexos que impliquin comparar diferents *targets* d'RNA de manera simultània. La idea central d'aquest paquet informàtic és ajustar els valors d'expressió dels diferents gens a un model lineal, i els valors d'expressió que hem analitzat són les \log_2 ratios.

Al final de l'anàlisi Limma ens dona un arxiu d'*Excel* amb tots els gens de l'*array*, les seves \log_2 ratios, el valor de p i el pes d'aquest gen en cada un dels *arrays* (veure CD adjunt). A partir d'aquí nosaltres hem eliminat tots els gens no significatius ($p \geq 0.05$) i els *spikes*. Si ordenem els gens que queden segon el seu valor de \log_2 ratio obtenim els gens que es troben regulats positivament i els que es troben regulats negativament per dSAP18. Els gens significatius amb una \log_2 ratio superior a 0.5 seran aquells gens que s'expressen almenys

Resultats

el doble en els embrions dSAP18-HA;dSAP18¹¹⁷/Df(3R)sbd45 respecte els dSAP18¹¹⁷/Df(3R)sbd45, i que per tant, es trobarien regulats positivament per dSAP18. Els gens amb una log₂ ratio inferior a -0.5 seran gens que s'expressen almenys la meitat en embrions dSAP18-HA;dSAP18¹¹⁷/Df(3R)sbd45 respecte els embrions dSAP18¹¹⁷/Df(3R)sbd45, i per tant estarien reprimits quan s'expressa dSAP18. Com a control de que hem realitzat tot el procés d'anàlisi correctament, observem que un dels gens significatius amb una diferència d'expressió més gran entre les dues mostres d'embrions és, tal i com s'espera, el gen *bin-1* (veure **figura R23**).

Finalment: EXCEL

UID	Name	Mean log2ratio fit	P.Value	DOO_20 6 log2	DOO_2 07 log2	DOO_21 1 log2	DOO_2 12 log2	DOO_206 weigh s	DOO_207 weigh s	DOO_211 weigh s	DOO_212 weigh s	GOO D IN
15833	Drs	3,059848	0,033731	1,970694	-1,89265	4,437058	-3,93899	1	1	1	1	4
2941	IM4	2,862762	0,03321	2,077169	-1,69037	4,388614	-3,29489	1	1	1	1	4
6665	Bin1	2,827289	0,019845	2,649708	-1,74185	4,033343	-2,88425	1	1	1	1	4
960	IM1	2,772037	0,025026	1,766203	-1,99865	3,807984	-3,51532	1	1	1	1	4
5091	CG18754	2,730311	0,026029	2,820998	-1,57734	NaN	-3,78231	1	1	0,01	1	3
3692	IM2	2,393723	0,020579	1,960993	-1,57396	3,440483	-2,59945	1	1	1	1	4
6856	CG2233	1,964253	0,023874	1,255437	-1,45878	2,743913	-2,39888	1	1	1	1	4
1955	CG16844	1,916756	0,018662	1,541205	-1,30393	2,674519	-2,14737	1	1	1	1	4
13123	Rab-RP1	1,881109	0,006829	NaN	-1,93247	NaN	NaN	0,01	1	0,01	0,01	1
14569	CG15066	1,870078	0,022556	1,826577	-1,21225	2,792345	-1,64914	1	1	1	1	4
3384	CG18279	1,849545	0,007714	2,145185	-1,53971	NaN	NaN	1	1	0,01	0,01	2
14291	CG32744	1,586309	0,027712	0,909356	NaN	2,225933	-1,63236	1	0,01	1	1	3
3371	CG18180	1,577056	0,029277	1,106771	-1,00971	2,353827	-1,83791	1	1	1	1	4
584	CG16713	1,558419	0,025297	0,951961	-1,16104	2,081524	-2,03915	1	1	1	1	4
12782	CG6156	1,341879	0,01195	NaN	-1,39075	NaN	NaN	0,01	1	0,01	0,01	1
...												

Figura R.23. Fragment del full Excel amb els gens significatius ordenats segons el valor de log₂ ratio. La fletxa indica el gen *bin-1*.

3.2.2.4 Anàlisi de *clusters*

L'objectiu final després del processat de les dades és l'obtenció d'informació i característiques biològiques comunes dels gens que s'expressen significativament de manera diferent entre les mostres que es comparen. Aquesta anàlisi no es pot fer manualment gen per gen, ja que la quantitat de gens que s'analitzen és generalment massa gran. Existeixen diversos programes que faciliten aquests anàlisis, la majoria dels quals utilitzen el termes de **Gene Ontology**. Gene Ontology (GO) és un projecte col.laboratiu amb l'objectiu de generar un vocabulari comú i dinàmic per a les descripcions

dels productes gènics en les diferents bases de dades. Els tres principis organitzatius del terme GO (ontologies) són la funció molecular, el procés biològic i el component cel.lular. Un producte gènic pot tenir més d'una funció molecular i pot ser utilitzat en un o més processos biològics, fins i tot, podria estar associat amb més d'un component cel.lular. Un cop escollit un *ontology* específic (funció, procés o component) existeixen dins de cada grup fins a 5 nivells descriptius. Nosaltres també ens hem basat en el GeneOntology alhora de presentar els resultats dels nostres *arrays*.

Degut a la gran quantitat de dades generades i obtingudes i la dificultat per presentar-les en aquesta memòria de tesi, les hem agrupat totes en un CD al final; aquí tan sols mostrarem els resultats amb els quals hem treballat.

3.2.3 Gens regulats negativament per dSAP18: dSAP18 i el cicle cel·lular de *Drosophila melanogaster*

Al analitzar els gens que expressen significativament en major grau els embrions *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* respecte als *dsap18-HA*; *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*, i per tant es troben reprimits quan s'expressa dSAP18, veiem que un 10% d'aquests gens es relacionen amb diferents aspectes del cicle cel·lular (veure **Taula R.3**).

símbol	log₂ratio	Gene Ontology
ssp1	-1.01	elongació del fus mitòtic
pim	-0.98	segregació cromàtides germanes
grp	-0.97	checkpoint cicle cel·lular
plu	-0.88	regulació de la progressió a través del cicle cel·lular
CG31232	-0.86	regulador de cdk _s
mei-s332	-0.74	anafase I de la meiosi
twe	-0.74	fase M del cicle cel·lular
CG10648	-0.73	elongació del fus mitòtic
mre-11	-0.72	transició G2/M
CG10648	-0.72	cicle cel·lular
CG17462	-0.71	cohesió cromàtides germanes
tef	-0.68	meiosis
Nuf-2	-0.68	organització del fus mitòtic
geminin	-0.68	regulació de la progressió a través del cicle cel·lular
cdk1	-0.67	transició G2/M
U2af38	-0.66	organització del fus mitòtic
Spc25	-0.66	organització del fus mitòtic
Set	-0.63	unió a ciclins
alien	-0.6	cicle cel·lular
Sld5	-0.6	regulació de la fase S del cicle cel·lular
Bub3	-0.6	checkpoint mitòtic
fzy	-0.599	regulació de la sortida de mitosis
Hus-1	-0.598	regulació de la progressió a través del cicle cel·lular
CG32955	-0.59	moviment dels microtúbuls durant l'anafase
Mcm-10	-0.58	segregació cromosòmica

Taula R.3. Gens regulats negativament per dSAP18 implicats en el cicle cel·lular de *Drosophila melanogaster*.

Per analitzar si la proteïna dSAP18 participa en la regulació del cicle cel·lular l'aproximació que hem seguit ha estat la d'analitzar per citometria de flux si cèl·lules embrionàries SL2 que sobreexpressen o bé que no expressen la proteïna dSAP18 presenten alteracions dels cicles cel·lulars.

Per aconseguir cèl·lules SL2 que no expressin dSAP18, hem incubat aquestes cèl·lules amb un dsRNA de seqüència homòloga al gen, aquest dsRNA és capaç de difondre a l'interior de totes les cèl·lules del cultiu, activant la maquinària de l'RNA d'interferència i provocant la desaparició de la proteïna dSAP18 a les 96 hores (veure **figura R24**).

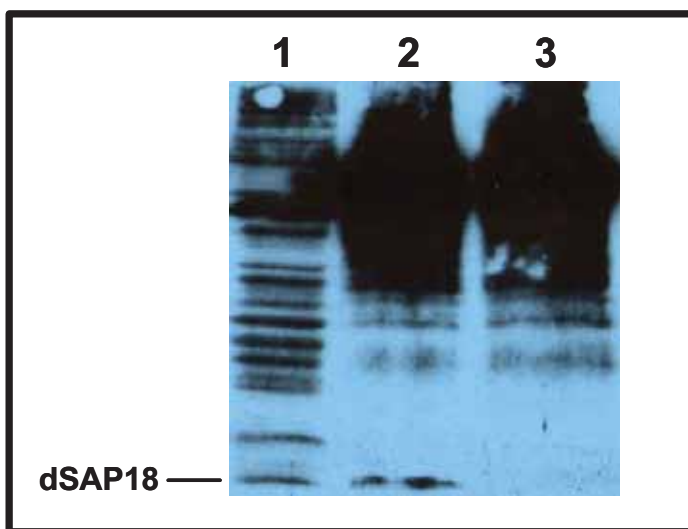


Figura R.24. Western-blott de dSAP18 a cèl·lules SL2. El punt 1 correspon a un extracte de proteïnes de cèl·lules SL2. 2 i 3 corresponen a immunoprecipitacions de la proteïna dSAP18 a partir d'extractes de cèl·lules tractades amb dsRNA de GFP (2) o de dSAP18 (3).

Al analitzar el cicle de cèl·lules tractades amb dsRNA de dSAP18 i que per tant no expressen la proteïna, respecte cèl·lules SL2 tractades amb un dsRNA control no s'observen diferències en la distribució de les fases del cicle cel·lular (**figura R25**). Per tant no sembla que la falta de proteïna dSAP18 afecti el cicle d'aquestes cèl·lules.

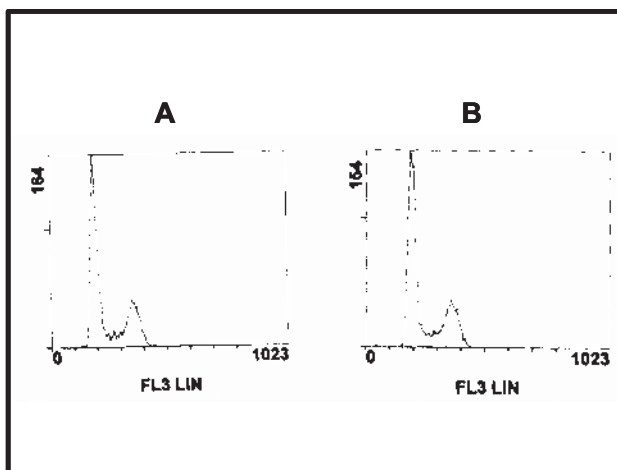


Figura R.25. Distribució del cicle cel·lular de cèl·lules SL2 tractades amb dsRNA. La figura A mostra el cicle de cèl·lules tractades amb dsRNA de GFP, la figura B mostra el cicle de cèl·lules tractades amb dsRNA de dSAP18.

Resultats

Alhora hem analitzat el cicle cel·lular de cèl·lules SL2 que sobreexpressen la proteïna dSAP18. La sobreexpressió de la proteïna l'hem aconseguida mitjançant la transfecció transitòria d'un vector d'expressió portador de la seqüència que codifica per la proteïna dSAP18 sota el control del promotor de l'actina. La transfecció transitòria no és tan eficient com la incubació amb el dsRNA, és a dir, en aquest cas no totes les cèl·lules incorporen el vector d'expressió. És per això que alhora aquestes cèl·lules també es transfecten amb un vector d'expressió per la proteïna GFP, per tal que el citometre pugui discriminar les cèl·lules que han estat transfectades de les que no ho han estat. Si comparem el perfil del cicle cel·lular de les cèl·lules transfectades amb dSAP18 i GFP amb cèl·lules control que han estat transfectades només amb GFP, no s'observen diferències en la distribució de les fases del cicle cel·lular (veure **figura R26**). Per tant, no sembla tampoc que la sobreexpressió de la proteïna dSAP18 provoqui canvis importants en el cicle cel·lular de cèl·lules SL2.

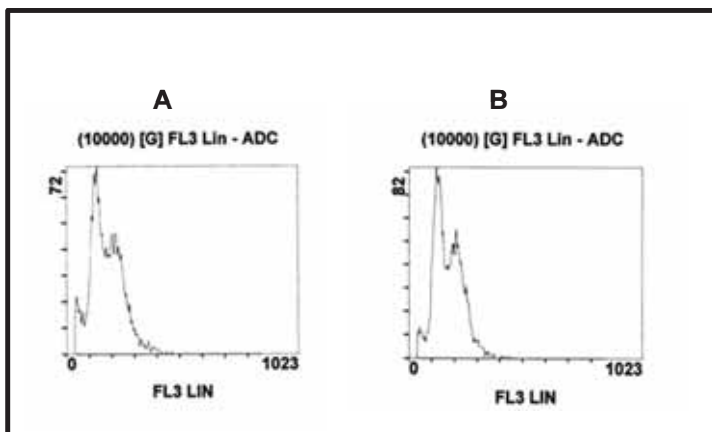


Figura R.26. Cicle cel·lular de cèl·lules que han estat transfectades amb GFP (A) i de les cèl·lules que han estat transfectades amb dSAP18 i GFP (B). No hi ha diferències en la distribució de les fases del seu cicle cel·lular.

3.2.4 Gens regulats positivament per dSAP18: dSAP18 i la defensa immune de *Drosophila melanogaster*.

Al analitzar els gens que estan regulats positivament per dSAP18 veiem que en gran part són gens implicats en la resposta immune de *Drosophila melanogaster* (veure **Taula R.4**).

símbol	log ₂ ratio	Gene Ontology
Drs	3.06	defensa immune
IM4	2.86	defensa immune
Bin1	2.83	gen que estem analitzant
IM1	2.77	defensa immune
CG18754	2.73	proteolisi
IM2	2.39	defensa immune
CG2233	1.96	desconeguda
CG16844	1.92	defensa immune
Rab-RP1	1.88	quinasa
CG15066	1.87	defensa immune
CG18279	1.85	defensa immune
CG32744	1.59	cicle ubiquitina
CG18180	1.58	defensa immune
CG16713	1.56	defensa immune
CG6156	1.34	desconegut
PGRP-SC1b	1.32	defensa immune
IM2-like	1.31	defensa immune
CG17752	1.30	prot de membrana
BG:BACR44L22.2	1.21	proteolisi
CG4362	1.19	component viral
PGRP-SC1a	1.19	defensa immune
CG4759	1.17	prot ribosomal
CG31918	1.17	proteolisi
CG11700	1.17	desconeguda
CG30091	1.16	proteolisi

Taula R.4. La taula mostra els primers 25 gens per ordre de log₂ ratio. Ombrejats en gris tots els gens relacionats amb la defensa immune i en groc el gen *bin1*.

A la **figura R27** hem representat, segons la funció molecular, la totalitat dels gens obtinguts en els nostres *arrays* que s'expressen almenys dos cops més en els embrions *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* versus els *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*. Tal i com es mostra en el diagrama més de la meitat dels gens que es troben regulats positivament per dSAP18 estan implicats en la defensa immune. També trobem un grup important de gens que participen en

Resultats

proteòlisi o metabolisme en general de les proteïnes i podrien també estar implicats en defensa.

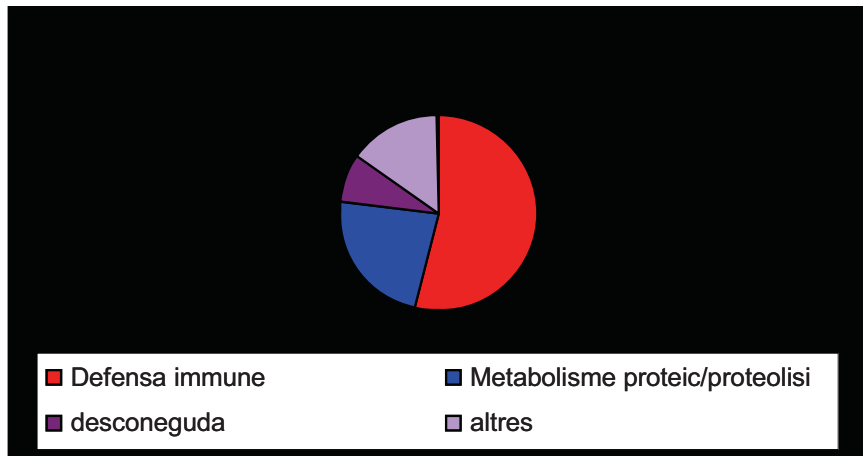


Figura R.27. En aquest diagrama hem agrupat segons la seva funció els gens que els gens regulats positivament per la proteïna dSAP18.

Els resultats dels *arrays* indiquen una implicació de la proteïna dSAP18 en la resposta immunitària de *Drosophila melanogaster*.

3.2.5 Caracterització de la participació de la proteïna dSAP18 en la immunitat innata a *Drosophila melanogaster*.

3.2.5.1 A embrions

Tal i com hem descrit a la introducció, *Drosophila melanogaster* depèn de la immunitat innata per sobreviure a les infeccions. La immunitat innata inclou la utilització de barreres físiques per evitar l'entrada de patògens i de cèl·lules especialitzades, els hemòcits, que participen en la fagocitosi de partícules alienes i en la coagulació i cicatrització de les ferides. Finalment també del *fat body*, l'òrgan encarregat de la producció de pèptids antimicrobians.

Drosomicina i la família dels *IMs* (*immune induced molecule*) són els gens que, segons els resultats dels *microarrays*, presenten una diferència d'expressió més gran entre embrions que expressen la proteïna dSAP18, respecte als que no l'expressen. *Drosomicina* és un AMP regulat per la ruta de Toll en resposta a la infecció fúngica. Els gens IM formen un *cluster* genètic localitzat a la regió 55C que codifiquen per proteïnes que es secreten en resposta a la infecció i que es trobarien també regulats per la via de Toll.

Per confirmar aquestes diferències d'expressió hem realitzat RT-PCRs semiquantitatives. Aquest experiment s'ha realitzat per triplicat partint d'extraccions d'RNA diferents i a la **figura R28** es mostra un d'aquests experiments. I tal i com es mostra a la **figura R28**, efectivament tan *drosomicina* com *IM2* s'expressen significativament menys en els embrions que no expressen dSAP18.

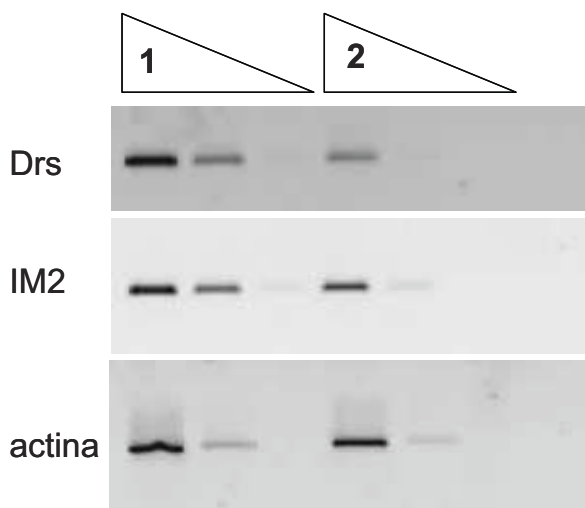


Figura R.28. RT-PCRs semiquantitatives de *drosomicina*, *IM2* i *actina* a embrions 0-24h. **(1)** correspon a embrions *dsap18-HA; dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* mentre que **(2)** correspon a embrions *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*. Les concentracions d'RNA analitzades corresponen a 50-5-0.5 ng/μl d'RNA

Resultats

total per Drs i IM2 i 5-0.5-0.05 ng/μl per l'actina.

Alhora, aquestes diferències observades en els *arrays* i confirmades per RT-PCR les hem quantificat mitjançant experiments de PCR quantitativa (*real-time PCR*). A la **figura R29**, podem veure que tan per *drosomicina* com per *IM2* existeix una diferència d'expressió del 80% entre embrions *dsap18-HA; dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* i embrions *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*.

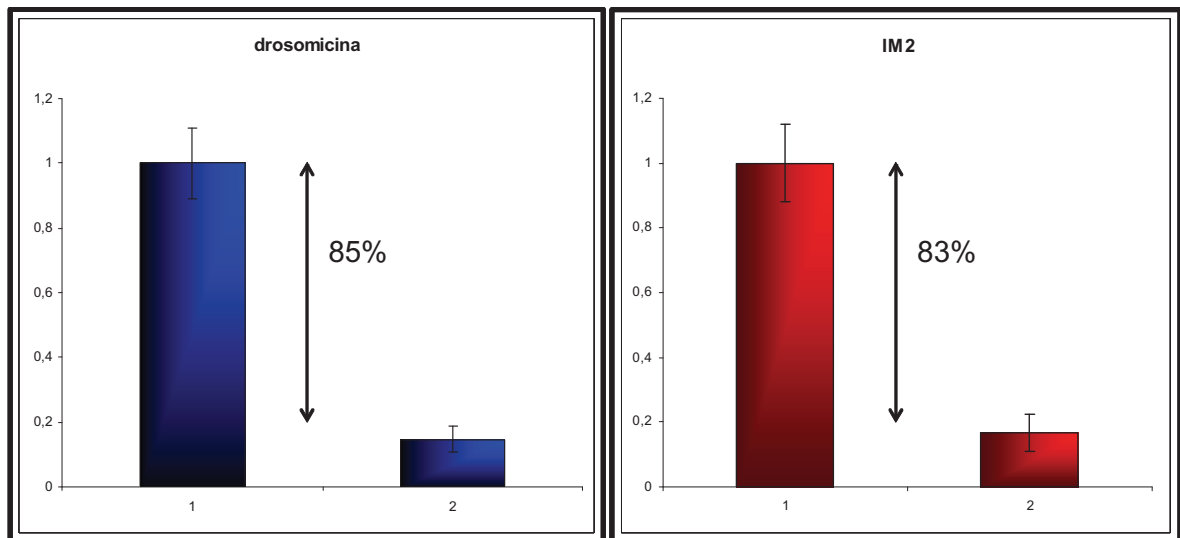


Figura R.29. Quantificació de l'expressió de *drosomicina* i *IM2* a embrions 0-24h *dsap18-HA; dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* (1) i *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* (2) per PCR quantitativa. El gràfic és el resultat de la mitjana de tres experiments independents.

Per intentar caracteritzar a quin nivell de les diferents vies implicades en la defensa immune actua dSAP18, hem fet RT-PCRs de una sèrie de gens que participen en diferents aspectes de la defensa innata de *Drosophila* (veure esquema **figura R30**).

Dels gens que mostrem a la **figura R30**, Bc i Tig surten també als *arrays* com a gens que s'expressen significativament més en els embrions *dsap18-HA; dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* que en els *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*, amb uns valors de log₂ ratio de 1.037 i 1.05 respectivament.

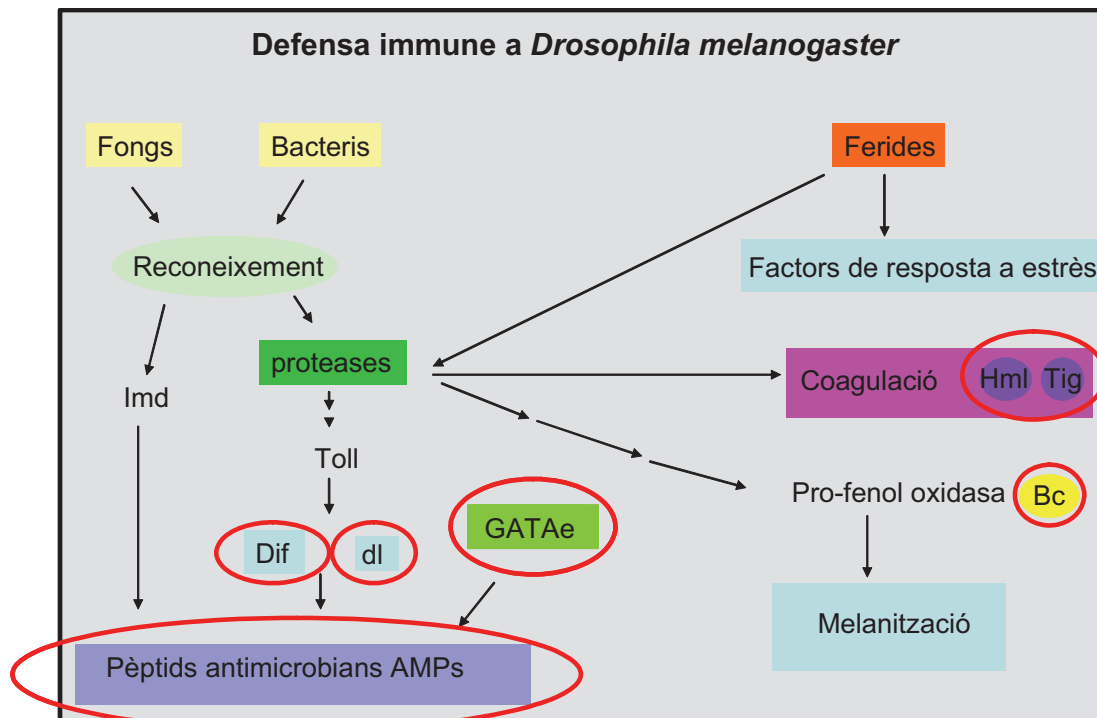


Figura R.30. En el següent esquema hem resumit els diferents processos que configuren la defensa immune de *Drosophila melanogaster* i s'indiquen amb cercles vermells els gen que hem analitzat per RT-PCR semiquantitatives.

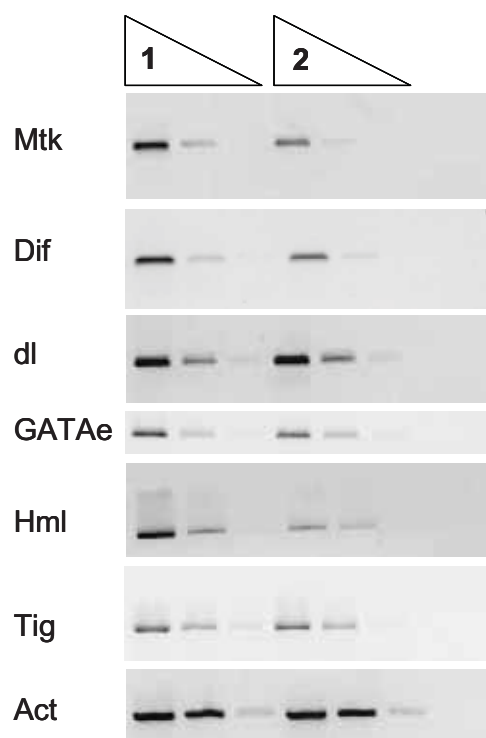


Figura R.31. RT-PCRs de diversos gens implicats en la resposta immune de *Drosophila melanogaster* a (1) embrions 0-24h *dsap18-HA*; *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* i (2) embrions *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*.

Els resultats de les RT-PCRs mostren que alguns d'aquests components de les vies de defensa a *Drosophila* presenten diferències d'expressió entre embrions *dsap18-HA*; *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* i embrions *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* mentre que altres no (veure **figura R31**). Un d'aquests gens és el que codifica per *Mtk*, un altre dels AMPs regulats per la ruta de Toll en resposta a la infecció fúngica. *Dpt* en canvi, no s'expressa en cap de les nostres mostres d'embrions. *Dif* i *dl* són factors de transcripció NF-κB d'aquesta ruta responsables de la inducció d'AMPs. L'expressió de *Dif*, però no la de *dl*, també es veu disminuïda en absència de la proteïna dSAP18. El factor de transcripció de la família GATA *GATAe* també ha estat relacionat amb la regulació de l'expressió d'AMPs. *GATAe* no presenta diferències d'expressió entre els embrions que expressen i els que no expressen la proteïna dSAP18.

Alhora, dSAP18 pot participar també en la regulació dels gens implicats en la coagulació, ja que *Hml* s'expressaria menys en els embrions mutants per dSAP18 que en els embrions que expressen la proteïna. *Tig* en canvi, en aquests assajos a diferència del que indiquen els *arrays* no mostra diferències d'expressió entre les dues línies d'embrions (veure **figura R31**). Això pot ser degut a que les extraccions d'RNA amb les que hem fet les RT-PCRs són diferents de les que vam utilitzar per fer els *arrays*, i podrien existir diversos factors externs que provoquen variabilitat en els nivells d'expressió d'aquesta proteïna. Pel que fa a l'expressió de *Bc* hem obtingut variabilitat durant l'anàlisi per RT-PCR. Mentre que en alguns assajos semblava que l'expressió de *Bc* era inferior als embrions que no expressaven dSAP18 confirmant així el que havíem observat en els assajos de *microarrays*, en altres en canvi, semblava que l'expressió era superior en aquests embrions.

Aquests resultats suggereixen que la proteïna dSAP18 pot participar en la resposta immune a embrions de *Drosophila* ja que en el mutant de dSAP18 existeixen diferències en els nivells d'expressió de diverses proteïnes implicades en diferents aspectes d'aquesta resposta, encara que hem observat una certa variabilitat en alguns d'aquests valors.

3.2.5.2 A larva

L'embrió de *Drosophila* es troba protegit del medi on viu i és per això que s'han realitzat pocs estudis sobre els processos d'immunitat innata a embrions, encara que sembla que a embrions durant els últims estadis del desenvolupament les cèl·lules de l'epidermis poden expressar AMPs i fagocitar bacteris (Franc et al., 1999; Tingvall et al., 2001).

En canvi la larva si que es troba en contacte directa amb multitud de patògens i és per això que hem repetit les RT-PCRs que hem fet a embrions a larves del tercer estadi (L3) que expressen la proteïna, *dsap18-HA*; *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*, i que no l'expressen *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* (**figura R32**).

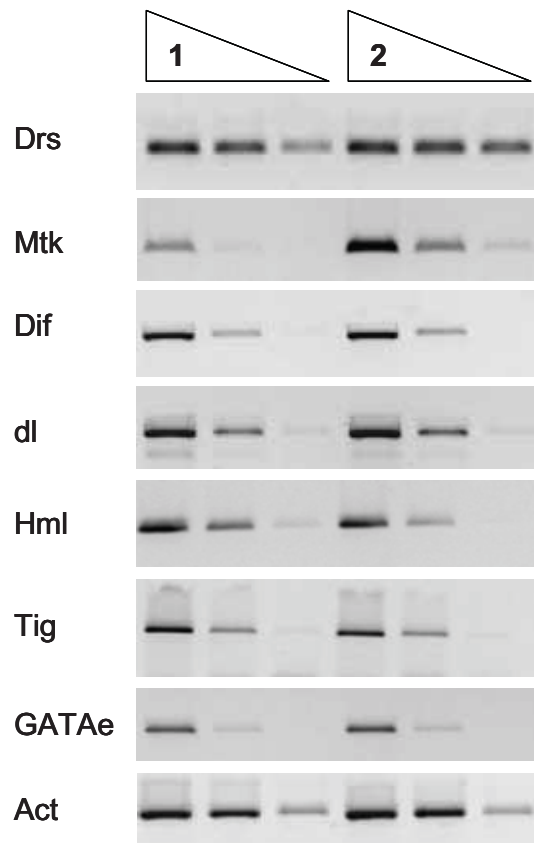


Figura R.32. RT-PCRs de diversos gens implicats en la resposta immune de *Drosophila* a (1) larves L3 *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* i (2) larves L3 *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*.

Resultats

Les RT-PCRs a larva mostren una situació diferent a la que hem observat a embrions. Mentre que *Hml* i *Tig* mostren el mateix comportament que hem vist abans, *Drs* i *Mtk* es comporten totalment a la inversa: s'expressen més a les larves que no expressen dSAP18 que a les que si expressen la proteïna. Això suggereix que el paper que juga la proteïna dSAP18 en la regulació d'aquests gens varia al llarg del desenvolupament.

Tots aquests resultats indiquen que la proteïna dSAP18 participa en els processos d'immunitat innata però per esbrinar si és crítica alhora de proporcionar resposta a la infecció hem decidit infectar larves i mosques adultes, i caracteritzar la supervivència a la infecció en absència de dSAP18.

3.2.6 Infecció a larves *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* i *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*

Alhora d'infectar *Drosophila melanogaster* al laboratori una de les estratègies utilitzades és la **ferida sèptica**. Tal i com hem descrit a la introducció, la ferida sèptica consisteix en injectar a l'interior de la cavitat corporal de l'organisme un agent infecciós. Aquest no sol ser un paràsit natural de *Drosophila*, però un cop dins l'animal és capaç d'induir els mecanismes propis de la defensa. Aquesta estratègia ofereix un avantatge important, ja que una mala manipulació dels paràsits naturals podria provocar la pèrdua de les col·leccions. Però també ofereix algunes limitacions, una d'elles és que introduïm una nova variable: la punxada.

El trencament físic de la cutícula dels artròpodes provoca de manera immediata el tancament de l'hemolimfa mitjançant la formació d'un coàgul i la posterior melanització de la ferida que és visible externament. Mitjançant l'assaig de *microarrays* hem vist que l'expressió d'*Hml*, un dels gens que regulen la coagulació a *Drosophila*, es veu disminuïda quan no s'expressa dSAP18. I hem confirmat aquest canvi per RT-PCRs a embrions i a larva.

Per això, per comprovar si la punxada comporta algun efecte sobre la viabilitat de les larves i que l'efecte que observem si realitzem ferida sèptica es deu únicament a la infecció, hem realitzat punxades control a larves del tercer estadi amb PBS1X enlloc d'agent infecciós. En aquest cas hem utilitzat larves *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* i *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*, però també larves homozigotes per l'al·lel *dsap18¹¹⁷* (obtingudes a partir de l'stock *dsap18¹¹⁷/TM3-GFP*) que moren a l'estadi de pupa, i larves *w¹¹¹⁸*. En les 24 hores posteriors a la punxada hem analitzat si aquestes larves són capaces de coagular i melanitzar correctament la ferida, o si en canvi generen tumors melanòtics (**figura R33**) o moren. A la **figura R33** trobem imatges de dues larves, la de la part superior és una larva *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* que presenta una cicatrització perfecta del punt de la punxada. La de la part inferior és una larva *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* on la cicatrització no ha estat correcta i s'ha generat un tumor melanòtic.



Figura R.33. Resposta a ferida. La larva de la imatge superior és una larva dSAP18-HA; dSAP18¹¹⁷ /Df(3R)sbd45. La imatge inferior és d'una larva dSAP18¹¹⁷/Df(3R)sbd45.

Tal i com hem representat a la **figura R34** més del 90% de les larves salvatges per l'expressió de dSAP18, és a dir larves *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* i *w¹¹¹⁸* coagulen perfectament i continuen el desenvolupament de manera normal. En canvi, un 18% de les larves *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*, desenvolupen tumors melanòtics en el lloc de la punxada. Aquest percentatge és més elevat encara per les larves *dsap18¹¹⁷/dsap18¹¹⁷* (un 25%) on a més, un 17% de les larves moren pocs minuts després de la punxada perquè no pot formar-se cap tipus de coàgul i perden la major part de l'hemolimfa.

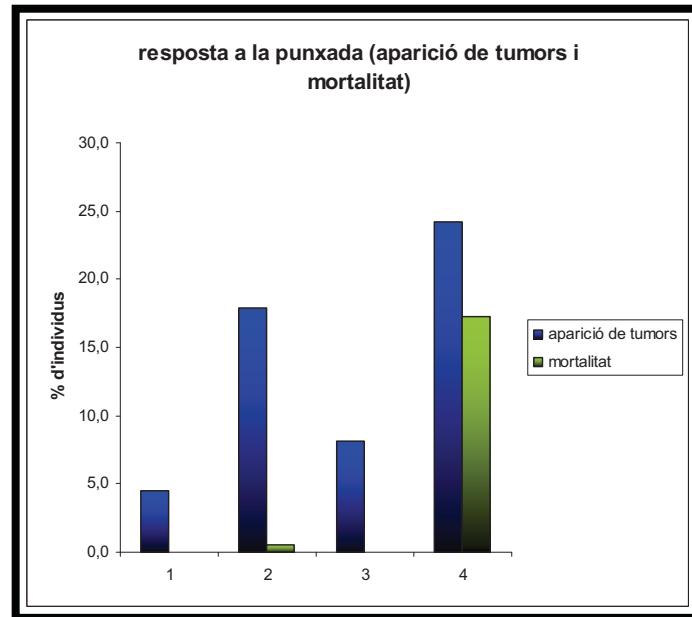


Figura R.34. Aparició de tumors melanòtics i mortalitat en resposta a la punxada en larves del tercer estadi *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* (1), *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* (2), *w¹¹¹⁸* (3) i *dsap18¹¹⁷/dsap18¹¹⁷* (4). En blau hem representat el percentatge de larves que desenvolupen tumors melanòtics i en verd el percentatge de larves que moren immediatament.

Aquests resultats indiquen que dSAP18 juga un paper molt important en coagulació. La falta de la proteïna afecta l'expressió del gen *Hml*, la proteïna constituent principal dels coàguls i larves que no expressen dSAP18 són incapaces de produir cap tipus de coàgul en el lloc de la ferida i moren perquè perden la major part de l'hemolimfa. Aquest fenomen no es produeix en les larves *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*, com si la presència de la *Df(3R)sbd⁴⁵* compensés la falta de dSAP18.

L'efecte que té la simple punxada sobre les larves mutants de dSAP18 pot complicar l'anàlisi de la infecció amb microorganismes i per tant hem decidit traslladar l'estudi de la infecció a individus adults.

3.2.7 Infecció a adults *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* i *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*

Tan els assajos de *microarrays* com les RT-PCRs a embrions i a larves, han posat de manifest que els individus *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* expressen uns nivells alterats de *Drs* i de *Mtk*. Ambdós gens tenen en comú que codifiquen per AMPs regulats per la ruta de Toll en resposta a la infecció fúngica.

En canvi Dpt, un dels AMPs que regula la ruta de Imd en resposta a la infecció per bacteris gram negatius no mostra diferències d'expressió entre les diferents línies (**veure CD**). Amb aquests resultats presents, semblaria que si un agent infeccios ha de provocar diferències de viabilitat entre les línies que expressen i les que no expressen dSAP18 són els fongs i no tan els bacteris.

A més, assajos preliminars que hem realitzat mostren que tan la infecció amb *E.coli* (bacteri gram negatiu) com amb *Micrococcus luteus* (bacteri gram positiu) no provoquen diferències significatives en la supervivència de mosques que expressen i no expressen la proteïna dSAP18. Aquests assajos i assajos de punxades control amb aigua també mostren que la punxada a les mosques adultes que no expressen la proteïna no provoca els mateixos efectes que hem observat a la larva.

És per això que hem realitzat els assajos d'infecció mitjançant ferida sèptica amb el fong *Aspergillus fumigatus*. Per infectar mosques adultes, hem injectat una solució rica en espores del fong a la cavitat interna de mosques adultes *dsap18-HA;dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* i *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵* i hem incubat les mosques a 30°C. Hem eliminat les mosques que morien en les 5 hores següents a la injecció al considerar que morien degut a la punxada.

Hem representat la supervivència a la infecció per *Aspergillus fumigatus* de les diferents línies de mosques en la gràfica de la **figura R35**.

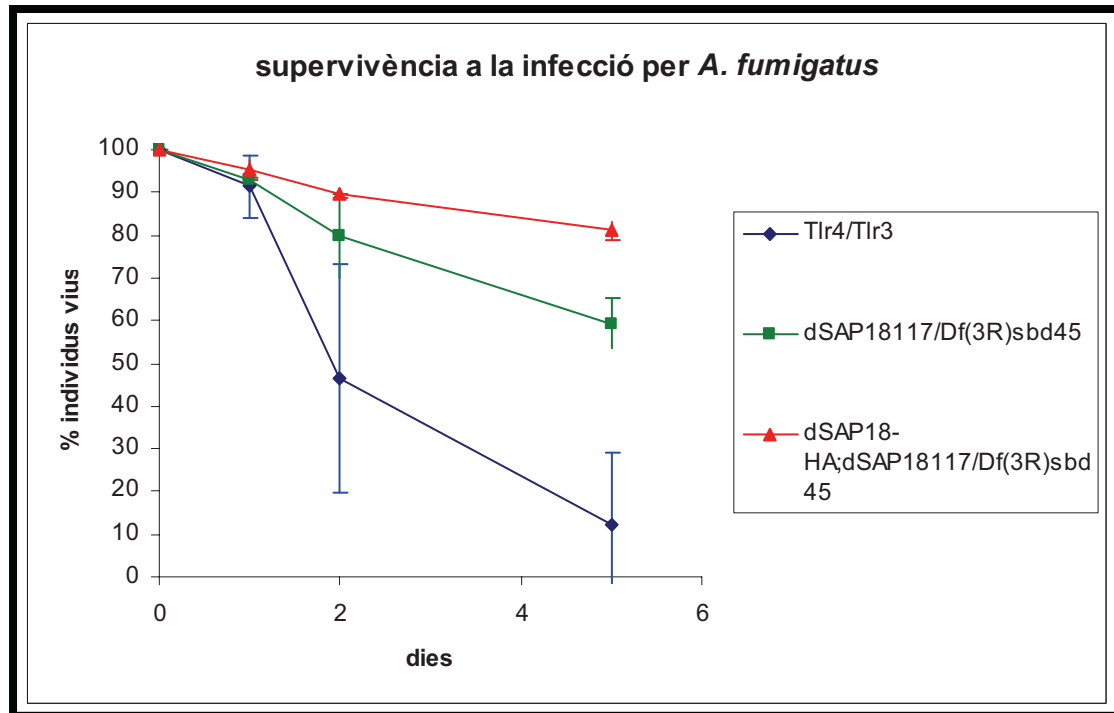


Figura R.35. La gràfica mostra la supervivència a la infecció per *A. fumigatus* de les línies mutants per Toll (en blau), *dsap18*¹¹⁷/*Df(3R)sbd*⁴⁵ en verd i *dsap18-HA; dsap18*¹¹⁷/*Df(3R)sbd*⁴⁵ en vermell. El temps 0 correspon a les 5 hores després de la punxada.

Hem infectat en paral·lel mosques mutants per la proteïna Toll, que han de manifestar una elevada susceptibilitat a la infecció del fong. Tal i com està descrit les mosques mutants de Toll presenten una elevada susceptibilitat a la infecció per *A. fumigatus*, més del 80% de les mosques moren als 5 dies després de la infecció. En el nostre cas, aquesta infecció és un control que el procés infectiu funciona, és a dir que hem processat correctament el microorganisme i que hem injectat una dosi correcta d'espores.

Com mostra la **figura R35**, hi ha diferències en la supervivència a la infecció per *A. fumigatus* entre les mosques que expressen i les que no expressen dSAP18. Les mosques que no expressen dSAP18 presenten una major susceptibilitat a la infecció per *A.fumigatus*, ja que als 5 dies, han mort el 41% de les mosques *dsap18*¹¹⁷/*Df(3R)sbd*⁴⁵, i en canvi només un 20% de les mosques *dsap18-HA;dsap18*¹¹⁷/*Df(3R)sbd*⁴⁵ han mort en aquest període. Tot i que la letalitat no és tan acusada com per les mosques que no expressen Toll, el nombre de mosques que moren quan les infectem amb el fong és el doble si no expressen dSAP18.

Resultats

Aquests resultats permeten concloure que a *Drosophila*, dSAP18 es troba implicada en la resposta a la infecció fúngica.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat caracteritzar la proteïna SAP18 a *Drosophila melanogaster*. En concret, caracteritzar el patró d'expressió de la proteïna al llarg del cicle de vida de la mosca i alhora descriure les rutes o els processos moleculars en els quals participa dSAP18. Per acomplir aquests objectius hem utilitzat diverses línies de *Drosophila melanogaster* portadores de diferents al·lels de dSAP18.

L'al·lel *dsap18*¹¹⁷ és el resultat de l'escissió imprecisa de l'element transposable EP(3R)3462 que al saltar s'ha emportat la major part de la regió codificant del gen *bin-1*, de manera que és un al·lel nul per dSAP18. Aquest al·lel és letal en homozigosi. També és letal en homozigosi l'al·lel *dsap18*^{R7-18} obtingut per recombinació meiótica a partir de l'al·lel *dsap18*¹¹⁷ per tal d'eliminar altres possibles mutacions degudes al salt de l'element transposable. Actualment al laboratori estem caracteritzant un nou mutant per dSAP18 obtingut per la inserció d'un pBac (pBac{WH}f04637) a la regió codificant del gen *bin1*, l'al·lel *WH f04637*. Aquest al·lel també és letal en homozigosi. La letalitat d'aquests tres al·lels, suggereix que dSAP18 és important per la viabilitat. Ara bé, la letalitat d'aquests al·lels no es rescata amb el transgèn dSAP18-HA cosa que ofereix dues possibilitats. En primer lloc, que existeixin altres mutacions que causin aquesta letalitat tot i l'al·lel obtingut per recombinació meiótica també és letal. O bé que el transgèn dSAP18-HA no rescata la letalitat perquè no aconsegueixi expressar nivells suficients de la proteïna ja que hem vist que el transgèn SAP18-HA s'expressa a nivells inferiors als que s'expressa la proteïna endògena.

Les mosques *dsap18*¹¹⁷/*Df(3R)sbd*⁴⁵ són el resultat del creuament de mosques portadores de l'al·lel *dsap18*¹¹⁷ i mosques portadores de la deficiència *Df(3R)sbd*⁴⁵ que descobreix el gen *bin1*. Per tant aquestes mosques no expressen la proteïna dSAP18. Tot i això és un *stock* viable encara que amb una certa letalitat que si que es recupera en gran part amb el transgèn dSAP18-HA. Aquest fet suggereix que la deficiència *Df(3R)sbd*⁴⁵ compensa part de la letalitat associada a la falta de dSAP18 i en aquest fons mutant

nivells baixos de la proteïna dSAP18 ectòpica poden compensar totalment la letalitat.

La deficiència *Df(3R)sbd⁴⁵* també sembla compensar altres dels fenotips associats a la falta de dSAP18. Un d'aquests fenotips és el que hem vist al sotmetre les larves a un estrès tèrmic. La falta de dSAP18 fa que aquestes larves desenvolupin tumors hematopoiètics quan els hi apliquem un tractament amb temperatura. Ara bé, aquest efecte es veu suavitzat quan les larves són portadores de la deficiència *Df(3R)sbd⁴⁵*. La deficiència també compensa el fenotip que observem al provocar ferides a larves del tercer estadi. Quan punxem larves homozigotes per l'al·lel *dsap18¹¹⁷* un percentatge important de les larves no és capaç de coagular l'hemolimfa i moren al poc temps després d'haver patit la punxada. Això no passa a les larves *dsap18¹¹⁷/Df(3R)sbd⁴⁵*. Per tant, sembla com si la mortalitat i els fenotips de resposta a l'estrès tèrmic o a la punxada fossin més dramàtics quan no s'expressa dSAP18 i no hi ha la deficiència.

La deficiència descobreix uns 25 gens entre els que s'inclouen dos gens de la família *GATA*.

Els factors de transcripció *GATA* són una família de proteïnes conservades evolutivament i que es troben implicades en la gènesi de diferents cèl·lules i tipus cel·lulars durant el desenvolupament. En el genoma de *Drosophila* s'han identificat cinc gens *GATA*. La deficiència *Df(3R)sbd⁴⁵* descobreix dos gens d'aquesta família: *pannier (pnr)* i *GATAe*. Existeixen varis treballs que relacionen *pnr* amb el desenvolupament del cor de la mosca. Mutants de falta de funció de *pnr* mostren absència de cardioblasts i mutants de guany de funció per aquest gen també demostren la seva implicació en la cardiogènesi de *Drosophila* (Gajewski et al., 1999). Tot i això es desconeix si aquest factor participa en la proliferació o diferenciació dels hemòcits o en la resposta immune en general.

En canvi, com ja hem comentat anteriorment *GATAe* si ha estat relacionat amb la resposta immune en concret a l'estómac de larves (Senger et al., 2006). Al mateix temps, l'expressió ectòpica d'aquest factor al *fat body* indueix l'expressió de gens implicats en la defensa immune (Senger et al., 2006). Per esbrinar si la falta de *GATAe* pot compensar la letalitat associada a la falta de dSAP18 hem generat una nova deficiència on no es veu afectat el

gen *GATAe* (Def+*GATAe*). Els individus portadors d'aquesta nova deficiència i de l'al·lel *dsap18*¹¹⁷ són individus viables, cosa que suggereix que no és la falta parcial de *GATAe* qui compensa aquesta letalitat. Aquesta deficiència també descobreix altres gens que s'han relacionat amb resposta immune. Caldren assajos per determinar quin o quins dels gens presents a la deficiència compensen aquesta letalitat com hem fet amb *GATAe*.

La deficiència *Df(3R)sbd*⁴⁵ també descobreix el gen *ird5*. Aquest gen codifica per l'homòleg a *Drosophila* d'IKK-β que juntament amb IKK-γ (*kenny* a *Drosophila*) formen el complex IKK necessari per l'activació de Relish (Silverman et al., 2000). Els nostres resultats indiquen que la proteïna dSAP18 es trobaria implicada en la ruta de Toll però no en la ruta de Imd. Tot i això no es descarta que existeixi certa co-regulació entre aquestes rutes i que per tant la falta d'una còpia de *ird5* pugui compensar la falta de dSAP18.

Akt/PKB és una Ser/Thr quinasa regulada per factors de creixement que actua per sota de la quinasa PI3K i que a mamífers s'ha relacionat amb la regulació del metabolisme de la glucosa, la transcripció i la traducció proteica. Alhora també en inhibició de l'apoptosi (Downward, 1998). A *Drosophila* mutants d'aquest gen (*Dakt1*) mostren apoptosi durant l'embriogènesi, que es manifesta amb el trencament de la membrana i la fragmentació del DNA, i que és rescatada per la supressió de caspases (Staveley et al., 1998). A mamífers la ruta de PI3K/Akt i de Ras es troben interrelacionades (Vivanco and Sawyers, 2002; Sebolt-Leopold and Herrera, 2004). A *Drosophila* la ruta de Ras participa, juntament amb la de JAK/STAT, en la regulació de la proliferació i diferenciació dels hemòcits. En aquesta tesi hem demostrat que dSAP18 participa en la regulació de varis processos que afecten als hemòcits com són la coagulació i la melanització. Si la ruta de Ras i la d'Akt es troben també interconectades a *Drosophila*, la falta d'una còpia d'Akt podria compensar la falta de la proteïna dSAP18.

Per tal de caracteritzar els processos funcionals en els que participa la proteïna dSAP18, hem seguit diverses aproximacions.

En primer lloc cal mencionar que al laboratori s'han realitzat treballs previs de purificació de complexes proteics que inclouen la proteïna dSAP18 a

partir d'extractes nuclears de cèl·lules SL2 (Costa et al., 2006). Aquests experiments han posat de manifest que dSAP18 s'associa a la proteïna Pinina (dPnn). Pnn és una proteïna que a mamífers participa en la maduració dels pre-mRNA. Alhora, s'ha descrit la interacció de la proteïna hPnn amb RNPS1 (Li et al., 2003; Sakashita et al., 2004). A mamífers, SAP18 ha estat descrita en el complex ASAP que també participa en *splicing* d'RNA i apoptosi (Schwerk et al., 2003), cosa que reforça un possible paper de la proteïna dSAP18 en *splicing* d'RNAs. El complex ASAP conté també la proteïna RNPS1 però no s'ha descrit si conté Pnn.

Mitjançant assajos de *GST-pull down* i de co-immunoprecipitació s'ha determinat que l'associació de dSAP18 i dPnn és directa i es dona també a embrions. Per aprofundir en l'anàlisi d'aquesta associació es van intentar aconseguir anticossos específics contra dPnn, en concret a ratolí i a rata. Malauradament però, cap d'aquests anticossos ha resultat ser suficientment específic en assajos d'immunotinció per poder avançar en l'estudi d'aquesta associació i la seva funció.

D'altra banda, mitjançant assajos d'immunolocalització i de fraccionament *in vitro*, hem demostrat que dins el nucli dSAP18 és capaç d'associar-se al DNA i a la matriu nuclear. L'associació de dSAP18 amb el DNA és clara quan es realitzen assajos d'immunolocalització a cromosomes politènics. En aquestes estructures la proteïna dSAP18 apareix sempre localitzada als loci que es troben transcripcionalment més actius: les interbandes i els *puffs*. Els *puffs* són engruïments dels cromosomes politènics que es correlacionen amb una elevada transcripció i que s'associen amb la modificació epigenètica de la histona H3 fosforilada a la serina 10 (Nowak and Corces, 2000). En aquesta tesi hem demostrat que dSAP18 i aquesta modificació epigenètica col·localitzen i que després d'una situació de *heat-shock* la proteïna dSAP18 es localitza a cromosomes politènics en els loci que codifiquen per les proteïnes de resposta a *heat-shock*, tal i com passa també per la histona H3 fosforilada a la serina 10. Això suggereix que dSAP18 pot participar en la regulació de l'expressió d'aquests loci i hem mostrat que les larves homozigotes per l'al·lel *dsap18*¹¹⁷, que no expressen la proteïna, mostren un fenotip alterat quan les sotmetem a estrès tèrmic.

De fet, la proteïna SAP18 ha estat relacionada amb la resposta a estrès a altres organismes models. A *Arabidopsis thaliana* s'ha descrit que l'homòleg de SAP18, AtSAP18, participa en la regulació transcripcional dels gens de resposta a estrès per ABA (àcid abscísic) i sequera (Song et al., 2005). AtSAP18, que s'expressa a la tija, les fulles i flors, s'indueix de manera important en resposta a estrès salí (Song and Galbraith, 2006). Alhora, mutants de AtSAP18 són hipersensibles al tractament amb NaCl. A *Saccharomyces cerevisiae* l'homòleg de SAP18, *Apg16p*, s'ha descrit formant part d'un complex que participaria en autofàgia (Kuma et al., 2002). L'autofàgia és una resposta d'estrès cel·lular a la supervivència de la falta de nutrients i és important en el desenvolupament i en la diferenciació cel·lular.

Actualment al laboratori estem analitzant l'expressió dels gens que codifiquen per les proteïnes de resposta a *heat-shock* a individus que expressen i que no expressen dSAP18 per caracteritzar, a nivell molecular, el mecanisme pel que la proteïna realitza aquesta funció.

Els experiments d'immunocol·localització a cromosomes politènics suggereixen la participació de la proteïna dSAP18 en la regulació de la transcripció gènica. Per esbrinar si això és cert i quins gens regula transcripcionalment dSAP18 hem realitzat assajos de *microarrays* comparant els transcriptomes d'embrions que expressen o no la proteïna dSAP18. Aquests experiments han posat de manifest gens que es troben regulats tan positivament com negativament per la proteïna dSAP18.

Un 10% dels gens que es trobarien regulats negativament per dSAP18, tenen funcions relacionades amb cicle cel·lular com són el control del cicle, la segregació de les cromàtides germanes i el funcionament del fus mitòtic. Per confirmar la implicació de dSAP18 en la regulació del cicle cel·lular de *Drosophila* hem analitzat el cicle de cèl·lules en cultiu SL2 que sobreexpressen o bé que no expressen la proteïna. Ni la sobreexpressió ni la falta d'expressió de dSAP18 mostra canvis en la distribució de les fases del cicle cel·lular respecte cèl·lules control. Per tant no sembla que a cèl·lules SL2 dSAP18 tingui una implicació clara en cicle cel·lular.

A la mosca, la única observació que suggereix una participació de la proteïna dSAP18 en el cicle cel·lular la trobem als dominis mitòtics de gàstrules. Al fer immunotincions de dSAP18 a aquests estadi embrionari s'observa un clar augment dels nivells de proteïna a les cèl·lules que es troben en profase i metafase, respecte les cèl·lules interfàsiques veïnes. Els nivells de proteïna disminuirien a l'anafase i a la telofase. Ara bé, aquests canvis en els nivells de dSAP18 al entrar a mitosi no es reproduïxen a neuroblastes a on pràcticament no s'observa senyal de la proteïna en les cèl·lules que es troben en mitosi.

Alhora, mutants per dSAP18 no presenten alteracions en les divisions cel·lulars. A gàstrules i neuroblastes d'aquests individus observem unes divisions cel·lulars normals i una correcta segregació cromosòmica. Per tant, no sembla que la proteïna dSAP18 tingui una clara implicació en la divisió cel·lular durant el desenvolupament i a diversos teixits de la mosca.

Molts dels gens dels *arrays* participen en meiosis i per tant dSAP18 podria estar implicada en aquest tipus de divisió cel·lular. En relació amb això cal tenir present que el transgèn dSAP18-HA inclou 5Kb de la regió 5' del gen *bin1* per tal d'incloure'n la regió promotora. En aquestes 5Kb s'inclou el primer exó no traduït i part d'un intró del gen *sarah* (*sra*) (també conegut com a *nebula*) (Singh et al., 2005). Està descrit que *sra* té funcions relacionades amb la meiosi tan de mascles com de femelles però la regulació de la seva expressió es desconeix. Aquesta regió "addicional" de *sra*, en els *arrays*, només està present en els embrions portadors del transgèn però no en els embrions mutants per dSAP18. I per tant, en el cas que participi en la regulació de *sra* podria estar interferint en els resultats dels *arrays* donant com a candidats de ser regulats per dSAP18 però que en realitat no ho serien gens implicats en mitosi/meiosi.

Entre els gens que es trobarien regulats positivament per dSAP18 els resultats dels *arrays* suggereixen que la proteïna dSAP18 participa en la resposta a la infecció fúngica, ja que entre els gens que presenten una diferència d'expressió més gran trobem l'AMP *Drs* i diversos pèptids de la família *IMs* suggerint una funció de la proteïna dSAP18 en la defensa immune específica contra fongs. Hem vist també que mutants per dSAP18 presenten

una supervivència més reduïda a la infecció amb el fong *Aspergillus fumigatus* que les mosques que si expressen la proteïna.

Existeixen diversos treballs que mostren, a mamífers i a *Drosophila*, que la resposta immune està molt controlada. Si és insuficient no permet superar la infecció, però si és excessiva pot ser fatal per l'individu. S'ha descrit que algunes proteïnes que participen en aquests processos són necessàries per realitzar una regulació negativa de la resposta a la infecció, com és el cas de PGRP-SC1a i PGRP-SC1b que surten com a gens alterats en els nostres *arrays*. Això potser podria explicar els aparents canvis al llarg del desenvolupament en els nivells d'AMPs en absència de dSAP18.

En resum, en aquesta tesi hem descrit la participació de la proteïna dSAP18 en tres processos: la resposta a estrès tèrmic, la resposta immune i la cicatrització de ferides.

A *Drosophila melanogaster* aquests processos es troben interconnectats (veure figura D1). Un exemple el trobem en la via de JAK-STAT. Com hem descrit a la introducció, a *Drosophila* aquesta ruta es troba implicada en el desenvolupament i en la diferenciació d'hemòcits (Dearolf, 1999; Agaisse and Perrimon, 2004). Aquesta ruta no regula l'expressió d'AMPs però en canvi si que regula l'expressió d'un petit nombre de gens que s'indueixen en el *fat body* després d'una ferida sèptica i que codifiquen per proteïnes d'elevada homologia al complement, són la família de gens *Tep* (Lagueux et al., 2000). Aquesta ruta també regula l'expressió dels gens de la família *Turandot* (Agaisse et al., 2003), aquests gens són exclusius de *Drosophila* i s'expressen en resposta a la infecció per ferida sèptica (Brun et al., 2006). Però alhora, tenen funcions relacionades amb la resposta a diferents estressos com són els causats per elevada temperatura, tractament amb llum U.V., pressió mecànica i agents oxidatius (Ekengren and Hultmark, 2001; Ekengren et al., 2001).

La ruta MAPK de JNK s'activa en resposta a l'estimulació microbiana (Sluss et al., 1996) però alhora és necessària per la correcta curació de les ferides (Ramet et al., 2002a). En plantes, a *C.elegans* i a vertebrats, l'altra ruta MAPK, la de p38, està implicada en la regulació de la resposta immune i la resposta a estrès (Asai et al., 2002; Kim et al., 2002).

Discussió

El que és més clar a *Drosophila* és que p38 s'activa en resposta a estrès. Mosques mutants per p38 són viables però susceptibles a l'estrès ambiental (com el provocat pel tractament amb temperatura, la falta d'aliments i el tractament amb peròxid d'hidrogen) (Han et al., 1998; Zhuang et al., 2005). Mosques mutants per Mekk1, una de les MAPKKK que activen p38, mostren una activitat reduïda de p38 *in vivo* i també són hipersensibles a estressos ambientals, confirmant que la ruta de Mekk1-p38 és crítica per la resposta a l'estrès ambiental de *Drosophila* (Inoue et al., 2001). Finalment, Mekk1 també pot participar en defensa ja que activa l'expressió de gens *Turandot* (Brun et al., 2006).

La implicació d'aquesta ruta en la defensa immune de *Drosophila* es coneix poc, els treballs que existeixen suggereixen que p38 actuaria com a regulador negatiu de la resposta immune tal i com passa a mamífers (Martín-Blanco, 2000).

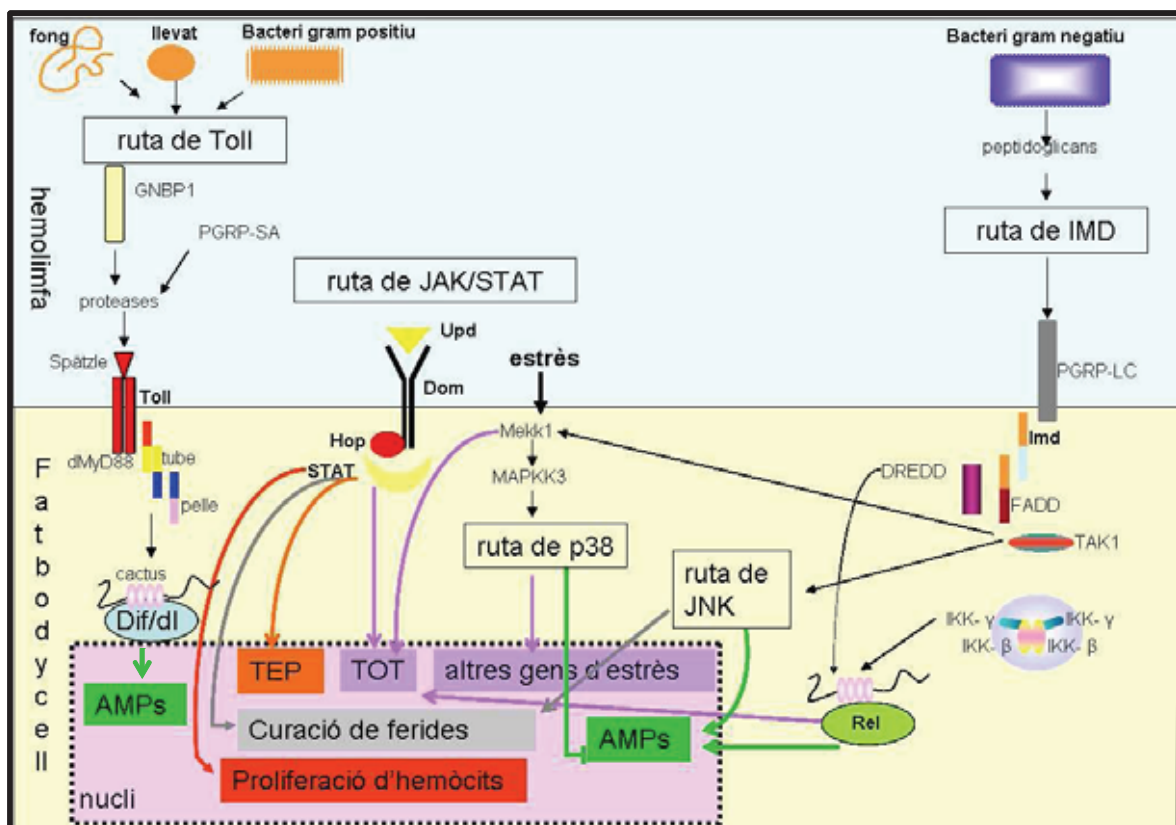


Figura D.1. Relació entre les rutes de defensa i les de resposta a estrès a *Drosophila melanogaster*.

Recentment s'ha posat de manifest que aquestes diferents rutes es poden reprimir mútuament, afegint un punt major de complexitat i de regulació en la defensa immune de *Drosophila*. Un dels exemples més clars és el que es

produeix entre les rutes de JNK i del factor NF- κ B Relish. Ambdues rutes s'inhibeixen de forma mútua (Park et al., 2004). En concret, la inhibició que exerceix JNK sobre Rel té lloc mitjançant la formació d'un *represosoma* i implica el factor de transcripció diana de la ruta de JNK dAP-1, la proteïna Stat92E i la proteïna Dsp1 (Kim et al., 2007). Aquest complex recluta la desacetilasa d'histona HDAC1 provocant la hipoacetilació, i per tant la repressió, de promotors que activa el factor Rel, tals com AttA, AttB, Cec, Dro i Mtk (Kim et al., 2005). Per tant, l'efecte inhibidor que exerceix el complex *represosoma* sobre l'activitat NF- κ B, juntament amb la modificació de les histones és important per la regulació de la resposta immune.

Tots aquests treballs suggereixen que a *Drosophila* existeix una interacció complexa entre les rutes d'estrès i les rutes de defensa i per tant una proteïna podria tenir funcions compartides entre la regulació transcripcional de gens de defensa i de resposta a estrès i aquest és el marc funcional que podem proposar per dSAP18 a partir dels resultats que hem presentat en aquesta tesi.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1) La proteïna dSAP18 és una proteïna nuclear durant el desenvolupament embrionari de *Drosophila*, i a diversos teixits larvaris i a estructures de l'adult.
- 2) Dins el nucli la proteïna dSAP18 està associada al DNA i a la matriu nuclear tal i com hem vist mitjançant experiments d'immunolocalitzacions i assajos de fraccionament nuclear.
- 3) dSAP18 no forma un complex estable amb el complex polycomb PRC1 ni es troba associada a la histona H3 trimetilada a la lisina 27 que és la marca epigenètica que introdueix el complex polycomb PRC2.
- 4) dSAP18 es troba associada a loci transcripcionalment actius com són les interbandes i els *puffs* de cromosomes politènics on col·localitza amb la histona H3 fosforilada a la serina 10. També col·localitza, tot i que en menor grau, amb l'enzim responsable de la transcripció: la RNA polimerasa II.
- 5) Assajos de *microarrays* i experiments de RT-PCR a embrions i larves indiquen que dSAP18 participa en la regulació de l'expressió de gens implicats en la defensa immune de *Drosophila melanogaster*. Dins aquests gens s'inclouen tan gens que codifiquen per AMPs (*Drs* i *Mtk*), com proteïnes NF- κ B (*Dif*) i proteïnes de reconeixement com són PGRP-SC1a i PGRP-SC1b.
- 6) dSAP18 participa en la defensa immune de *Drosophila* a la infecció per fongs ja que mosques mutants per dSAP18 mostren un reducció de la supervivència a la infecció per *Aspergillus fumigatus*.
- 7) dSAP18 participa en la regulació de gens implicats en la coagulació de ferides (*Hml*) i larves mutants que no expressen la proteïna no poden produir coàguls en resposta a ferides.
- 8) dSAP18 participa en la resposta a estrès tèrmic. Ja que en una situació de *heat-shock* la proteïna canvia la seva distribució i s'associa als loci que codifiquen per les proteïnes de resposta a aquest estrès. Alhora, larves mutants per dSAP18 generen tumors hematopoiètics en resposta a elevada temperatura.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aderem, A., and Underhill, D.M.** (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. of Immunol.* **17**, 593-623.
- Agaisse, H., and Perrimon, N.** (2004). The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev* **198**, 72-82.
- Agaisse, H., Petersen, U.M., Boutros, M., Mathey-Prevo, B., and Perrimon, N.** (2003). Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* **5**, 441-450.
- Akam, M.** (1987). The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* **101**, 1-22.
- Alarco, A.M., Marcil, A., Chen, J., Suter, B., Thomas, D., and Whiteway, M.** (2004). Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: a model for the innate immune response to human fungal pathogens. *J Immunol* **172**, 5622-5628.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I., and Dearolf, C.R.** (2003). Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* **163**, 203-215.
- Ashida, M.** (1990). The prophenoloxidase cascade in insect immunity. *Res. Immunol.* **141**, 908-910.
- Asling, B., Dushay, M.S., and Hultmark, D.** (1995). Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. *Insect Biochem Mol Biol* **25**, 511-518.
- Bangham, J., Jiggins, F., and Lemaitre, B.** (2006). Insect immunity: the post-genomic era. *Immunity* **25**, 1-5.
- Bangs, P., Franc, N., and White, K.** (2000). Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. *Cell Death Differ* **7**, 1027-1034.
- Barges, S., Mihaly, J., Galloni, M., Hagstrom, K., Muller, M., Shanower, G., Schedl, P., Gyurkovics, H., and Karch, F.** (2000). The Fab-8 boundary defines the distal limit of the bithorax complex *iab-7* domain and insulates *iab-7* from initiation elements and a PRE in the adjacent *iab-8* domain. *Development* **127**, 779-790.
- Barillas-Mury, C., Han, Y.S., Seeley, D., and Kafatos, F.C.** (1999). *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *Embo J* **18**, 959-967.
- Basset, A., Khush, R.S., Braun, A., Gardan, L., Bocard, F., Hoffmann, J.A., and Lemaitre, B.** (2000). The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3376-3381.
- Belozerov, V.E., Majumder, P., Shen, P., and Cai, H.N.** (2003). A novel boundary element may facilitate independent gene regulation in the Antennapedia complex of *Drosophila*. *Embo J* **22**, 3113-3121.
- Belvin, M.P., and Anderson, K.V.** (1996). A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 393-416.

- Bernardoni, R., Vivancos, V., and Giangrande, A.** (1997). glide/gcm is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Dev Biol* **191**, 118-130.
- Beutler, B., and Rietschel, E.T.** (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* **3**, 169-176.
- Boehmelt, G., Antonio, L., and Iscove, N.** (1998). Cloning of the murine transcriptional corepressor component SAP18 and differential expression of its mRNA in the hematopoietic hierarchy. *Gene* **207**, 267-275.
- Boman, H.G.** (1972). Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature* **237**, 232-235.
- Boutros, M., Agaisse, H., and Perrimon, N.** (2002). Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**, 711-722.
- Brand, A.H., Manoukian, A.S., and Perrimon, N.** (1994). Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol* **44**, 635-654.
- Braun, A., Hoffmann, J.A., and Meister, M.** (1998). Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae which are devoid of hemocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**.
- Brun, S., Vidal, S., Spellman, P., Takahashi, K., Tricoire, H., and Lemaitre, B.** (2006). The MAPKKK Mekk1 regulates the expression of Turandot stress genes in response to septic injury in *Drosophila*. *Genes Cells* **11**, 397-407.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., and Hoffmann, D.** (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* **23**, 329-344.
- Bulet, P., Dimarcq, J.L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorselaer, A., and Hoffmann, J.A.** (1993). A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem* **268**, 14893-14897.
- 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.
- Canudas, S., Pérez, S., Fanti, L., Pimpinelli, S., Singh, N., Hanes, S., Azorin, F., and Espinas, M.** (2005). dSap18 and dHDAC1 contribute to the functional regulation of the *Drosophila* Fab-7 element. *Nucleic Acids Res* **33**, 4857-4864.
- Cao, R., Wang, L., and Wang, H.** (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039-1043.
- Carton, Y., and Nappi, A.J.** (2001). Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics* **52**, 157-164.
- Cheng, S., and Bishop, J.** (2002). Suppressor of fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5442-5447.
- Chia, W., Somers, W., and Wang, H.** (2008). *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions: cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and tumorigenesis
The Journal of cell biology **180**, 267-272.

- Choe, K.M., Werner, T., Stoven, S., Hultmark, D., and Anderson, K.V.** (2002). Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science* **296**, 359-362.
- Costa, E., Canudas, S., Garcia-Bassets, I., Perez, S., Fernandez, I., Giral, E., Azorin, F., and Espinas, M.L.** (2006). *Drosophila* dSAP18 is a nuclear protein that associates with chromosomes and the nuclear matrix, and interacts with pinin, a protein factor involved in RNA splicing. *Chromosome Res* **14**, 515-526.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., and Pirrota, V.** (2002). *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal polycomb sites. *Cell* **111**, 185-196.
- De Gregorio, E., Spellman, P.T., Rubin, G.M., and Lemaitre, B.** (2001). Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12590-12595.
- De Gregorio, E., Han, S.J., Lee, W.J., Baek, M.J., Osaki, T., Kawabata, S., Lee, B.L., Iwanaga, S., Lemaitre, B., and Brey, P.T.** (2002). An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**, 581-592.
- Dearolf, C.R.** (1998). Fruit fly "leukemia". *Biochim Biophys Acta* **1377**, M13-23.
- Dearolf, C.R.** (1999). JAKs and STATs in invertebrate model organisms. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1578-1584.
- Delaney, J.R., Stoven, S., Uvell, H., Anderson, K.V., Engstrom, Y., and Mlodzik, M.** (2006). Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF-kappaB signaling pathways. *Embo J* **25**, 3068-3077.
- Dimarcq, J.L., Hoffmann, D., Meister, M., Bulet, P., Lanot, R., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A.** (1994). Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *Eur J Biochem* **221**, 201-209.
- Dimarcq, J.L., Imler, J.L., Lanot, R., Ezekowitz, R.A., Hoffmann, J.A., Janeway, C.A., and Lagueux, M.** (1997). Treatment of l(2)mbn *Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. *Insect Biochem Mol Biol* **27**, 877-886.
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L.** (2005). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat Immunol* **6**, 946-953.
- Downward, J.** (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 262-267.
- Doyle, A., Griffiths, J., and Newell, D.** (1995). *Cell & Tissue culture: laboratory procedures*. (New York).
- Driever, W., and Nüsslein-Volhard, C.** (1988). A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* **54**, 83-93.
- Driever, W., and Nüsslein-Volhard, C.** (1989). The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the *Drosophila* embryo. *Nature* **337**, 138-143.

- Driever, W., Thoma, G., and Nüsslein-Volhard, C.** (1989). Determination of spatial domains of zygotic gene expression in the *Drosophila* embryo by the affinity of binding sites for the bicoid morphogen. *Nature* **340**, 363-367.
- Duvic, B., Hoffmann, J.A., Meister, M., and Royet, J.** (2002). Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Curr Biol* **12**, 1923-1927.
- Ekengren, S., and Hultmark, D.** (2001). A family of Turandot-related genes in the humoral stress response of *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* **284**, 998-1003.
- Ekengren, S., Tryselius, Y., Dushay, M.S., Liu, G., Steiner, H., and Hultmark, D.** (2001). A humoral stress response in *Drosophila*. *Curr Biol* **11**, 1479.
- Elrod-Erickson, M., Mishra, S., and Schneider, D.** (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr Biol* **10**, 781-784.
- Engstrom, Y., Kadalayil, L., Sun, S.C., Samakovlis, C., Hultmark, D., and Faye, I.** (1993). kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. *J Mol Biol* **232**, 327-333.
- Espinàs, M., Canudas, S., Fanti, L., Pimpinelli, S., Casanova, J., and Azorin, F.** (2000). The GAGA factor of *Drosophila* interacts with SAP18, a Sin3-associated polypeptide. *Embo rep* **1**, 253-259.
- Evans, C.J., Hartenstein, V., and Banerjee, U.** (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* **5**, 673-690.
- Farkas, G., Janos, G., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H., and Karch, F.** (1994). The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* **371**, 806-808.
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W.F., Hetru, C., and Hoffmann, J.A.** (1994). Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J Biol Chem* **269**, 33159-33163.
- Ferrandon, D., Jung, A.C., Criqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J., and Hoffmann, J.A.** (1998). A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *Embo J* **17**, 1217-1227.
- Fessler, L.I., Nelson, R.E., and Fessler, J.H.** (1994). *Drosophila* extracellular matrix. *Methods Enzymol* **245**, 271-294.
- Flyg, C., Kenne, K., and Boman, H.G.** (1980). Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J Gen Microbiol* **120**, 173-181.
- Fossett, N., Hyman, K., Gajewski, K., Orkin, S.H., and Schulz, R.A.** (2003). Combinatorial interactions of serpent, lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during *Drosophila* hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11451-11456.
- Franc, N.C., Heitzler, P., Ezekowitz, R.A., and White, K.** (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* **284**, 1991-1994.

- Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., and Ezekowitz, R.A.** (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**, 431-443.
- Gajewski, K., Fossett, N., Molkentin, J.D., and Schulz, R.A.** (1999). The zinc finger proteins Pannier and GATA4 function as cardiogenic factors in *Drosophila*. *Development* **126**, 5679-5688.
- Galko, M.J., and Krasnow, M.A.** (2004). Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol* **2**, E239.
- Gao, Q., and Finkelstein, R.** (1998). Targeting gene expression to the head: the *Drosophila* orthodenticle gene is a direct target of the Bicoid morphogen. *Development* **125**, 4185-4193.
- Gateff, E.** (1994). Tumor-suppressor genes, hematopoietic malignancies and other hematopoietic disorders of *Drosophila melanogaster*. *Ann N Y Acad Sci* **712**, 260-279.
- Ghelelovitch, S.** (1969). Melanotic tumors in *Drosophila melanogaster*. *Natl Cancer Inst Monogr* **31**, 263-275.
- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A.A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D.** (2003). Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science* **302**, 2126-2130.
- Goto, A., Kadowaki, T., and Kitagawa, Y.** (2003). *Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev Biol* **264**, 582-591.
- Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J.A., Ferrandon, D., and Royet, J.** (2002). The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* **416**, 640-644.
- Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A.A., Reichhart, J.M., Wang, C., Butt, T.M., Belvin, M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D.** (2006). Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell* **127**, 1425-1437.
- Granok, H., Leibovitch, B., Shaffer, C., and Elgin, S.** (1995). Chromatin. GAGA over GAGA factor. *Curr Biol* **5**, 238-241.
- Grimaud, C., Nègre, N., and Cavalli, G.** (2006). From genetics to epigenetics: the tale of polycomb group and trithorax group genes *Chromosome research* **14**, 363-375.
- Gross, I., Georgel, P., Kappler, C., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A.** (1996). *Drosophila* immunity: a comparative analysis of the Rel proteins dorsal and Dif in the induction of the genes encoding diptericin and cecropin. *Nucleic Acids Res* **24**, 1238-1245.
- Ha, E.M., Oh, C.T., Bae, Y.S., and Lee, W.J.** (2005a). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* **310**, 847-850.
- Ha, E.M., Oh, C.T., Ryu, J.H., Bae, Y.S., Kang, S.W., Jang, I.H., Brey, P.T., and Lee, W.J.** (2005b). An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. *Dev Cell* **8**, 125-132.
- 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.
- Han, S.H., Ryu, J.H., Oh, C.T., Nam, K.B., Nam, H.J., Jang, I.H., Brey, P.T., and Lee, W.J.** (2004). The moleskin gene product is essential for

- Caudal-mediated constitutive antifungal Drosomycin gene expression in *Drosophila epithelia*. *Insect Mol Biol* **13**, 323-327.
- Han, S.J., Choi, K.Y., Brey, P.T., and Lee, W.J.** (1998). Molecular cloning and characterization of a *Drosophila* p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 369-374.
- Hanratty, W.P., and Dearolf, C.R.** (1993). The *Drosophila* tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *Mol Gen Genet* **238**, 33-37.
- Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M.S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M., and Hultmark, D.** (1999). Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol Cell* **4**, 827-837.
- Hetru, C., Troxler, L., and Hoffmann, J.A.** (2003). *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J Infect Dis* **187 Suppl 2**, S327-334.
- Hodgson, J., Argiropoulos, B., and Brock, H.** (2001). Site-specific recognition of a 70-base-pair element containing d(GA)(n) repeats mediates bithoraxoid polycomb group response element-dependent silencing. *Mol Cell Biol* **21**, 4528-4543.
- Horard, B., Tatout, C., Poux, S., and Pirrota, V.** (2000). Structure of a polycomb response element and in vitro binding of PcG complexes containing GAGA factor. *Mol Cell Biol* **20**, 3187-3197.
- Hu, S., and Yang, X.** (2000). dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the *Drosophila* caspase DREDD. *J Biol Chem* **275**, 30761-30764.
- Hultmark, D.** (1996). Insect lysozymes. *Exs* **75**, 87-102.
- Hultmark, D.** (2003). *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol* **15**, 12-19.
- Imler, J.L., and Bulet, P.** (2005). Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem Immunol Allergy* **86**, 1-21.
- Ingham, P.** (1998). *Embo J* **17**, 3505-3511.
- Inoue, H., Tateno, M., Fujimura-Kamada, K., Takaesu, G., Adachi-Yamada, T., Ninomiya-Tsuji, J., Irie, K., Nishida, Y., and Matsumoto, K.** (2001). A *Drosophila* MAPKKK, D-MEKK1, mediates stress responses through activation of p38 MAPK. *Embo J* **20**, 5421-5430.
- Ip, Y.T., Reach, M., Engstrom, Y., Kadalayil, L., Cai, H., Gonzalez-Crespo, S., Tatei, K., and Levine, M.** (1993). Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell* **75**, 753-763.
- Irving, P., Ubeda, J.-M., Doucet, D., Troxler, L., and Lagueux, M.** (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell. Microbiol.* **7**, 335-350.
- Irving, P., Troxler, L., Heuer, T.S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., and Hetru, C.** (2001). A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15119-15124.
- Janeway, C.A., Jr.** (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**, 1-13.
- Janody, F., Reischl, K., and Dostatni, N.** (2000). Persistence of hunchback in the terminal region of the *Drosophila* blastoderm embryo impairs anterior development. *Development* **127**, 1573-1582.

- Jung, S.H., Evans, C.J., Uemura, C., and Banerjee, U.** (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* **132**, 2521-2533.
- Kadalayil, L., Petersen, U.M., and Engstrom, Y.** (1997). Adjacent GATA and kappa B-like motifs regulate the expression of a *Drosophila* immune gene. *Nucleic Acids Res* **25**, 1233-1239.
- Kallio, J., Leinonen, A., Ulvila, J., Valanne, S., Ezekowitz, R.A., and Ramet, M.** (2005). Functional analysis of immune response genes in *Drosophila* identifies JNK pathway as a regulator of antimicrobial peptide gene expression in S2 cells. *Microbes Infect* **7**, 811-819.
- Kaneko, T., Goldman, W.E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., Harley, W., Fox, A., Golenbock, D., and Silverman, N.** (2004). Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* **20**, 637-649.
- Kappler, C., Meister, M., Lagueux, M., Gateff, E., Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.M.** (1993). Insect immunity. Two 17 bp repeats nesting a kappa B-related sequence confer inducibility to the dipterin gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila*. *Embo J* **12**, 1561-1568.
- Kim, D.H., Feinbaum, R., Alloing, G., Emerson, F.E., Garsin, D.A., Inoue, H., Tanaka-Hino, M., Hisamoto, N., Matsumoto, K., Tan, M.W., and Ausubel, F.M.** (2002). A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science* **297**, 623-626.
- Kim, L.K., Choi, U.Y., Cho, H.S., Lee, J.S., Lee, W.B., Kim, J., Jeong, K., Shim, J., Kim-Ha, J., and Kim, Y.J.** (2007). Down-regulation of NF-kappaB target genes by the AP-1 and STAT complex during the innate immune response in *Drosophila*. *PLoS Biol* **5**, e238.
- Kim, T., Yoon, J., Cho, H., Lee, W.B., Kim, J., Song, Y.H., Kim, S.N., Yoon, J.H., Kim-Ha, J., and Kim, Y.J.** (2005). Downregulation of lipopolysaccharide response in *Drosophila* by negative crosstalk between the AP1 and NF-kappaB signaling modules. *Nat Immunol* **6**, 211-218.
- Kim, Y.S., and et al.** (2000). Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **275**, 32721-32727.
- Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., and Stuart, L.M.** (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* **123**, 335-346.
- Kosoy, A., Pagans, S., Espinas, M.L., Azorin, F., and Bernues, J.** (2002). GAGA factor down-regulates its own promoter. *J Biol Chem* **277**, 42280-42288.
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., and Ohsumi, Y.** (2002). Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* **277**, 18619-18625.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D.** (2002). Histone methyltransferase activity associated with

- a human multiprotein complex containing the Enhancer of zeste protein. 16.
- Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E.A., Capovilla, M., and Hoffmann, J.A.** (2000). Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11427-11432.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., and Meister, M.** (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **230**, 243-257.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L., and Moore, M.** (2000). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junction. *Embo J* **19**, 6860-6869.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., and Banerjee, U.** (2000). Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* **288**, 146-149.
- Leclerc, V., and Reichhart, J.M.** (2004). The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol Rev* **198**, 59-71.
- Lee, M., Osaki, T., Lee, J., Back, M., and Zhang, R.** (2003). Peptidoglycan recognition proteins involved in 1,3-B-D-glucan-dependent prophenoloxidase activation system of insect. *J. Biol. Chem.* **279**, 3218-3227.
- Lee, Y.S., and Carthew, R.W.** (2003). Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* **30**, 322-329.
- Lehmann, M.** (2004). Anything else but GAGA: a nonhistone protein complex reshapes chromatin structure. *Trends Genet* **20**, 15-22.
- Lemaitre, B., and Hoffmann, J.** (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* **25**, 697-743.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A.** (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14614-14619.
- Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., and Steward, R.** (1996a). Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *Embo J* **14**, 536-545.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A.** (1996b). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A.** (1995). A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9465-9469.
- Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R.S., Abrams, J.M., and Lemaitre, B.** (2000). The *Drosophila* caspase *Dredd* is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep* **1**, 353-358.
- Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J.H., Caroff, M., Lee, W.J., Mengin-Lecreulx, D., and Lemaitre, B.** (2003). The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol* **4**, 478-484.
- Levashina, E.A., Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J.M., Hetru, C., and Hoffmann, J.A.** (1995). *Metchnikowin*, a novel immune-inducible proline-

- rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur J Biochem* **233**, 694-700.
- Levy, F., Bulet, P., and Ehret-Sabatier, L.** (2004a). Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. *Mol Cell Proteomics* **3**, 156-166.
- Levy, F., Rabel, D., Charlet, M., Bulet, P., Hoffmann, J.A., and Ehret-Sabatier, L.** (2004b). Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*. *Biochimie* **86**, 607-616.
- Li, C., Lin, R.I., Lai, M.C., Ouyang, P., and Tarn, W.Y.** (2003). Nuclear Pnn/DRS protein binds to spliced mRNPs and participates in mRNA processing and export via interaction with RNPS1. *Mol Cell Biol* **23**, 7363-7376.
- Lu, Y., Wu, L.P., and Anderson, K.V.** (2001). The antibacterial arm of the *Drosophila* innate immune response requires an I κ B kinase. *Genes Dev* **15**, 104-110.
- Luo, H., Rose, P.E., Roberts, T.M., and Dearolf, C.R.** (2002). The Hopscotch Jak kinase requires the Raf pathway to promote blood cell activation and differentiation in *Drosophila*. *Mol Genet Genomics* **267**, 57-63.
- Ma, C., and Kanost, M.** (2000). A B-1,3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **275**, 7505-7514.
- Mahmoudi, T., Zuijderduijn, L., Mohd-Sarip, A., and Verrijzer, C.** (2003). GAGA facilitates binding of pleiohomeotic to a chromatinized polycomb response element. *Nucleic Acids Res* **31**, 4147-4156.
- Martín-Blanco, E.** (2000). p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays* **22**, 637-645.
- Mayeda, A., Badolato, J., Kobayashi, R., Zhang, M., Gardiner, E., and Krainer, A.** (1999). Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing. *Embo J* **18**, 4560-4570.
- Meister, M., Hetru, C., and Hoffmann, J.A.** (2000). The antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol* **248**, 17-36.
- Meister, M., Braun, A., Kappler, C., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A.** (1994). Insect immunity. A transgenic analysis in *Drosophila* defines several functional domains in the dipterin promoter. *Embo J* **13**, 5958-5966.
- Mellor, J.** (2006). It takes a PHD to read the histone code. *Cell* **126**, 22-24.
- Meng, X., Khanuja, B.S., and Ip, Y.T.** (1999). Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF- κ B factor. *Genes Dev* **13**, 792-797.
- Michel, T., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., and Royet, J.** (2001). *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* **414**, 756-759.
- Mihaly, J., Hogga, I., Barges, S., Galloni, M., Mishra, R.K., Hagstrom, K., Muller, M., Schedl, P., Sipos, L., Gausz, J., Gyurkovics, H., and Karch, F.** (1998). Chromatin domain boundaries in the Bithorax complex. *Cell Mol Life Sci* **54**, 60-70.
- Minakhina, S., and Steward, R.M.** (2006). Melanotic mutants in *Drosophila*: pathways and phenotypes. *Genetics* **174**, 253-263.
- Mishra, R., Mihaly, J., Barges, S., Spierer, A., Karch, F., Hangstrom, K., Schweinsberg, S., and Schedl, P.** (2001). The *iab-7* polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and

- requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol Cell Biol* **21**, 1311-1318.
- Moita, L.F., Wang-Sattler, R., Michel, K., Zimmermann, T., Blandin, S., Levashina, E.A., and Kafatos, F.C.** (2005). In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A.gambiae*. *Immunity* **23**, 65-73.
- Muller, J., Hart, C., and Francis, N.** (2002). Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* polycomb group repressor complex. *Cell* **111**, 197-208.
- Murray, M.A., Fessler, L.I., and Palka, J.** (1995). Changing distributions of extracellular matrix components during early wing morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **168**, 150-165.
- Nappi, A.J.** (1975). Inhibition by parasites of melanotic tumour formation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **255**, 402-404.
- Nappi, A.J., and Vass, E.** (1993). Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Res* **6**, 117-126.
- Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., and Carton, Y.** (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol.* **68**, 450-456.
- Ng, J., Hart, C., Morgan, K., and Simon, J.** (2000). A *Drosophila* ESC-E(Z) protein complex is distinct from other polycomb group complexes and contains covalently modified ESC. *Mol Cell Biol* **20**, 3069-3078.
- Nowak, S., and Corces, V.** (2000). Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes Dev* **14**, 3003-3013.
- Ochiai, M., and Ashida, M.** (1999). A pattern recognition protein for peptidoglycan. Cloning the cDNA and the gene of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* **274**, 11854-11858.
- Ochiai, M., and Ashida, M.** (2000). A pattern-recognition protein for peptidoglycan. Cloning of cDNA and the gene of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **274**, 11854-11858.
- Onfelt Tingvall, T., Roos, E., and Engstrom, Y.** (2001). The imd gene is required for local Cecropin expression in *Drosophila* barrier epithelia. *EMBO Rep* **2**, 239-243.
- Paces-Fessy, M., Boucher, D., Petit, E., Paute-Briand, S., and Blanchet-Tournier, M.** (2004). The negative regulator of Gli, Suppressor of fused (Sufu), interacts with Sap18, Galectin3 and other nuclear proteins. *Biochem J.* **378**, 353-362.
- Park, J.M., Brady, H., Ruocco, M.G., Sun, H., Williams, D., Lee, S.J., Kato, T., Jr., Richards, N., Chan, K., Mercurio, F., Karin, M., and Wasserman, S.A.** (2004). Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* **18**, 584-594.
- Parks, A.L., Cook, K.R., Belvin, M., Dompe, N.A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L.R., Winter, C.G., Bogart, K.P., Deal, J.E., Deal-Herr, M.E., Grant, D., Marcinko, M., Miyazaki, W.Y., Robertson, S., Shaw, K.J., Tabios, M., Vysotskaia, V., Zhao, L., Andrade, R.S., Edgar, K.A., Howie, E., Killpack, K., Milash, B., Norton, A., Thao, D., Whittaker, K., Winner, M.A., Friedman, L., Margolis, J., Singer, M.A., Kopczynski, C., Curtis, D., Kaufman, T.C., Plowman, G.D., Duyk, G., and Francis-Lang, H.L.** (2004). Systematic generation of high-resolution

- deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet* **36**, 288-292.
- Pearse, R., Collier, L., Scott, M., and Tabin, C.** (1999). Vertebrate homologs of *Drosophila* suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators. *Dev Biol* **212**, 323-336.
- Pearson, A.M., Baksa, K., Ramet, M., Protas, M., McKee, M., Brown, D., and Ezekowitz, R.A.** (2003). Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect.* **5**, 815-824.
- Peng, J., Zipperlen, P., and Kubli, E.** (2005). *Drosophila* sex-peptide stimulates female innate immune system after mating via the Toll and Imd pathways. *Curr Biol* **15**, 1690-1694.
- Petersen, U.M., Bjorklund, G., Ip, Y.T., and Engstrom, Y.** (1995). The dorsal-related immunity factor, Dif, is a sequence-specific trans-activator of *Drosophila* Cecropin gene expression. *Embo J* **14**, 3146-3158.
- Petersen, U.M., Kadalayil, L., Rehorn, K.P., Hoshizaki, D.K., Reuter, R., and Engstrom, Y.** (1999). Serpent regulates *Drosophila* immunity genes in the larval fat body through an essential GATA motif. *Embo J* **18**, 4013-4022.
- Pham, A., Therond, P., Alves, G., Blanchet-Tournier, M., Busson, D., Lamour-Isnard, C., Bouchon, B., Preat, T., and Tricoire, H.** (1995). The Suppressor of fused gene encodes a novel PEST protein involved in *Drosophila* segment polarity establishment. *Genetics* **140**, 587-598.
- Poux, S., Horard, B., Sigrist, C., and Pirrota, V.** (2002). The *Drosophila* trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing. *Development* **129**, 2483-2493.
- Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D., and Manfrulli, P.** (2002a). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol* **241**, 145-156.
- Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., and Ezekowitz, R.A.** (2002b). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* **416**, 644-648.
- Ramet, M., Pearson, A., Manfrulli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M., and Ezekowitz, R.A.** (2001). *Drosophila* scavenger receptor Cl is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* **15**, 1027-1038.
- Rehorn, K.P., Thelen, H., Michelson, A.M., and Reuter, R.** (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* **122**, 4023-4031.
- Reichhart, J.M., Georgel, P., Meister, M., Lemaitre, B., Kappler, C., and Hoffmann, J.A.** (1993). Expression and nuclear translocation of the rel/NF-kappa B-related morphogen dorsal during the immune response of *Drosophila*. *C R Acad Sci III* **316**, 1218-1224.
- Reyes, J.C., Muchardt, C., and Yaniv, M.** (1997). Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J Cell Biol* **137**, 263-274.
- Ritsick, D.R., Edens, W.A., McCoy, J.W., and Lambeth, J.D.** (2004). The use of model systems to study biological functions of Nox/Duox enzymes. *Biochem Soc Symp*, 85-96.
- Rizki, T.M.** (1956). Blood cells of *Drosophila* as related to metamorphosis.

- Rizki, T.M., and Rizki, R.M.** (1992). Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Dev Comp Immunol* **16**, 103-110.
- Rizki, T.M., Rizki, R., and Grell, E.** (1980). A mutant affecting the crystal cells in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **188**, 91-99.
- Roos, E., Bjorklund, G., and Engstrom, Y.** (1998). In vivo regulation of tissue-specific and LPS-inducible expression of the *Drosophila* Cecropin genes. *Insect Mol Biol* **7**, 51-62.
- Rorth, P.** (1998). Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mech Dev* **78**, 113-118.
- Rutschmann, S., Jung, A.C., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D.** (2000a). Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response. *Nat Immunol* **1**, 342-347.
- Rutschmann, S., Jung, A.C., Hetru, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D.** (2000b). The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity* **12**, 569-580.
- Ryu, J.H., Ha, E.M., Oh, C.T., Seol, J.H., Brey, P.T., Jin, I., Lee, D.G., Kim, J., Lee, D., and Lee, W.J.** (2006). An essential complementary role of NF-kappaB pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. *Embo J* **25**, 3693-3701.
- Ryu, J.H., Nam, K.B., Oh, C.T., Nam, H.J., Kim, S.H., Yoon, J.H., Seong, J.K., Yoo, M.A., Jang, I.H., Brey, P.T., and Lee, W.J.** (2004). The homeobox gene *Caudal* regulates constitutive local expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* epithelia. *Mol Cell Biol* **24**, 172-185.
- Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y.** (1999). Acinus is a caspase-3 activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* **401**, 168-173.
- Sakashita, E., Tatsumi, S., Werner, D., Endo, H., and Mayeda, A.** (2004). Human RNPS1 and its associated factors: a versatile alternative pre-mRNA splicing regulator in vivo. *Mol Cell Biol* **24**, 1174-1187.
- Samakovlis, C., Kimbrell, D.A., Kylsten, P., Engstrom, A., and Hultmark, D.** (1990). The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity. *Embo J* **9**, 2969-2976.
- Sambrook, J., and Russell, D.** (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*
- Scherfer, C., Karlsson, C., Loseva, O., Bidla, G., and Goto, A.** (2004). Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. *Curr Biol* **14**, 625-629.
- Schneider, D.S., Hudson, K.L., Lin, T.Y., and Anderson, K.V.** (1991). Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **5**, 797-807.
- Schulz, C., and Tautz, D.** (1994). Autonomous concentration-dependent activation and repression of *krüpel* by *hunchback* in the *Drosophila* embryo. *Development* **120**, 3043-3049.
- Schwerk, C., Prasad, J., Degenhardt, K., Erdjument-Bromage, H., White, E., Tempst, P., Kidd, V., Manley, J., Lahti, J., and Reinberg, D.** (2003). ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 2981-2990.

- Sebolt-Leopold, J.S., and Herrera, R.** (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 937-947.
- Senger, K., Harris, K., and Levine, M.** (2006). GATA factors participate in tissue-specific immune responses in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15957-15962.
- Senger, K., Armstrong, G.W., Rowell, W.J., Kwan, J.M., Markstein, M., and Levine, M.** (2004). Immunity regulatory DNAs share common organizational features in *Drosophila*. *Mol Cell* **13**, 19-32.
- Shrestha, R., and Gateff, E.** (1982). Ultrastructure and cytochemistry of the cell types in the larval hematopoietic organs and hemolymph of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Growth Differ.* **24**, 65-82.
- Silverman, N., Zhou, R., Stoven, S., Pandey, N., Hultmark, D., and Maniatis, T.** (2000). A *Drosophila* I κ B kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev* **14**, 2461-2471.
- Singh, N., Zhu, W., and Hanes, S.** (2005). Sap18 is required for the maternal gene bicoid to direct anterior patterning in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **278**, 242-254.
- Sluss, H., Han, Z., Barret, T., Davis, R., and Ip, Y.T.** (1996). A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* **10**, 2745-2758.
- Soderhall, K., and Cerenius, L.** (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* **10**, 23-28.
- Soeller, W., Poole, S., and Kornberg, T.** (1988). In vitro transcription of the *Drosophila* engrailed gene. *Gene Dev.* **2**, 68-81.
- Song, C., and Galbraith, D.** (2006). AtSAP18, a orthologue of human SAP18, is involved in the regulation of salt stress and mediates transcriptional repression in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **60**, 241-257.
- Sparrow, J.C.** (1978). Melanotic "tumors" . In *The Genetic and Biology of Drosophila*. (London: M. Ashburner, TRF Wright).
- Spradling, A., Penman, S., and Pardue, M.** (1975). Analysis of *Drosophila* mRNA by in situ hybridization: Sequences transcribed in normal and heat shocked cultured cells. *Cell* **4**, 395-404.
- Staveley, B.E., Ruel, L., Jin, J., Stambolic, V., Mastronardi, F.G., Heitzler, P., Woodgett, J.R., and Manoukian, A.S.** (1998). Genetic analysis of protein kinase B (AKT) in *Drosophila*. *Curr Biol* **8**, 599-602.
- Stenbak, C.R., Ryu, J.H., Leulier, F., Pili-Floury, S., Parquet, C., and Herve, M.** (2004). Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by the *Drosophila* immune deficiency pathway. *J Immunol* **173**, 7339-7348.
- Stoven, S., Ando, I., Kadalayil, L., Engstrom, Y., and Hultmark, D.** (2000). Activation of the *Drosophila* NF- κ B factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO Rep* **1**, 347-352.
- 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.
- Sullivan, W., Ashburner, M., and Hawley, R.** (2000). *Drosophila* Protocols.
- Takehana, A., Yano, T., Mita, S., Kotani, A., Oshima, Y., and Kurata, S.** (2004). Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *Embo J* **23**, 4690-4700.

- Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T., and Kurata, S.** (2002). Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13705-13710.
- Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L.** (2002). *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nat Immunol* **3**, 91-97.
- Tepass, U., Fessler, L.I., Aziz, A., and Hartenstein, V.** (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 1829-1837.
- Tie, F., Furuyama, T., Prasad-Sinha, J., Jane, E., and Harte, P.** (2001). The *Drosophila* polycomb group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. *Development* **128**, 275-286.
- Tingvall, T.O., Roos, E., and Engstrom, Y.** (2001). The GATA factor Serpent is required for the onset of the humoral immune response in *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3884-3888.
- Tzou, P., De Gregorio, E., and Lemaitre, B.** (2002). How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* **5**, 102-110.
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.M., Lemaitre, B., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L.** (2000). Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* **13**, 737-748.
- Ulvila, J., Parikka, M., Kleino, A., Sormunen, R., Ezekowitz, R.A., Kocks, C., and Ramet, M.** (2006). Double-stranded RNA is internalized by Scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 14370-14375.
- Uttenweiler-Joseph, S., Moniatte, M., Lagueux, M., Van Dorselaer, A., Hoffmann, J.A., and Bulet, P.** (1998). Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11342-11347.
- Uvell, H., and Engstrom, Y.** (2003). Functional characterization of a novel promoter element required for an innate immune response in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* **23**, 8272-8281.
- Uvell, H., and Engstrom, Y.** (2007). A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet* **23**, 342-349.
- Vidal, S., Khush, R.S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M., and Lemaitre, B.** (2001). Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev* **15**, 1900-1912.
- Vierstraete, E., Verleyen, P., Baggerman, G., D'Hertog, W., Van den Bergh, G., Arckens, L., De Loof, A., and Schoofs, L.** (2004). A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 470-475.

- Vivanco, I., and Sawyers, C.L.** (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489-501.
- Vodovar, N., Acosta, C., Lemaitre, B., and Boccard, F.** (2004). *Drosophila*: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* **12**, 235-242.
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., Vacherie, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Lemaitre, B., Medigue, C., and Boccard, F.** (2006). Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotechnol* **24**, 673-679.
- Wang, L., Ding, L., Jones, C.A., and Jones, R.** (2002). *Drosophila* Enhancer of zeste protein interacts with dSAP18. *Gene* **285**, 119-125.
- Watson, K.L., Johnson, T.K., and Denell, R.E.** (1991). Lethal(1) aberrant immune response mutations leading to melanotic tumor formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genet.* **12**, 173-187.
- Weber, A.N., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J.A., Lelievre, E., Gascan, H., Ray, K.P., Morse, M.A., Imler, J.L., and Gay, N.J.** (2003). Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nat Immunol* **4**, 794-800.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D.** (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13772-13777.
- Wicker, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, D., Hultmark, D., Samakovlis, C., and Hoffmann, J.A.** (1990). Insect immunity. Characterization of a *Drosophila* cDNA encoding a novel member of the dipterin family of immune peptides. *J Biol Chem* **265**, 22493-22498.
- Wilkins, R., and Lis, J.** (1997). Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock gene regulation. *Nucleic Acids Res* **25**, 3963-3968.
- Williams, M.J.** (2007). *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *The journal of immunology* **178**, 4711-4715.
- Yoshiga, T., Georgieva, T., Dunkov, B.C., Harizanova, N., Ralchev, K., and Law, J.H.** (1999). *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. *Eur J Biochem* **260**, 414-420.
- Zaidman-Remy, A., Herve, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M.S., Blanot, D., Oh, B.H., Ueda, R., Mengin-Lecreulx, D., and Lemaitre, B.** (2006). The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity* **24**, 463-473.
- 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.
- Zhou, J., Ashe, H., Burks, C., and Levine, M.** (1999). Characterization of the transvection mediating region of the abdominal-B locus in *Drosophila*. *Development* **126**, 3057-3065.
- Zhu, W., and Hanes, S.** (2000). Identification of *Drosophila* Bicoid-interacting proteins using a custom two-hybrid selection. *Gene* **245**, 329-339.

Bibliografia

- Zhu, W., Foehr, M., Jaynes, J., and Hanes, S.** (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.
- Zhuang, Z.H., Zhou, Y., Yu, M.C., Silverman, N., and Ge, B.X.** (2005). Regulation of Drosophila p38 activation by specific MAP2 kinase and MAP3 kinase in response to different stimuli. *Cell Signal* **18**, 441-448.

