

Generació d'un model de malaltia mitocondrial humana en *Drosophila melanogaster*

Tanit Guitart Rodés

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

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

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



FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA, BIENNI 2004-2006
TESI REALITZADA AL LABORATORI DE TRADUCCIÓ GENÈTICA
INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA

GENERACIÓ D'UN MODEL DE MALALTIA MITOCONDRIAL HUMANA EN
DROSOPHILA MELANOGASTER

Memòria presentada per Tanit Guitart Rodés
per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Director:

Tutor:

Doctoranda:

Lluís Ribas de Pouplana

Antonio Zorzano Olarte

Tanit Guitart Rodés

	INDEX
	ABREVIATURES
	1 INTRODUCCIÓ
	2 OBJECTIUS
3	MATERIAL I MÈTODES
	4 RESULTATS
	5 DISCUSSIÓ
	6 CONCLUSIONS
	BIBLIOGRAFIA
	APÈNDIX: PUBLICACIÓ

3 MATERIAL I MÈTODES

3.1 EINES BIOINFORMÀTIQUES

3.1.1 Anàlisi de seqüències *in silico*

Tant les seqüències proteiques, com les dels gens que les codifiquen, de *DmSRS1* (seril-ARNt sintetasa citoplasmàtica de *Drosophila melanogaster*; CG17259; FBgn0031497), *DmSRS2* (seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *Drosophila melanogaster*; CG4938; FBgn0021750) i *SLIMP* (*seryl-tRNA synthetase-like insect mitochondrial protein*; proteïna d'insecte similar a seril-ARNt sintetasa mitocondrial; CG31133; FBgn0051133) s'obtenen de la base de dades FlyBase (Tweedie et al., 2009). Les seqüències proteiques d'altres espècies emprades en l'estudi filogenètic es recuperen directament de les bases de dades d'UniProtKB (Apwiler et al., 2010), de les traduccions de regions codificadores anotades a GENE BANK (Benson et al., 2009) i RefSeq (Pruitt et al., 2007), o bé a través de cerques BLAST (Altschul et al., 1990) sobre seqüències d'ADN genòmic. El nivell de conservació dels dominis proteics es prediu amb la base de dades CDD (Marchler-Bauer et al., 2005).

Els gens, les seqüències, les estructures secundàries i les modificacions posttranscripcionals dels ARNt es descarreguen de les bases de dades tRNADB (Juhling et al., 2009) i tRNAscan-SE Genomic tRNA Database (Chan i Lowe, 2009). En alguns casos, la predicció d'estructura secundària es realitza utilitzant l'eina disponible en xarxa del programa tRNAscan-SE (Lowe i Eddy, 1997).

Els paràmetres fisicoquímics de les proteïnes d'interès es prediuen emprant les eines disponibles al servidor ExpASy (Gasteiger et al., 2003).

La localització subcel·lular i els pèptids de senyalització al mitocondri són predits per mitjà dels programes en xarxa MitoProt (Claros i Vincens, 1996), Predotar (Small et al., 2004), PSORT II (Horton i Nakai, 1997) i iPSORT (Bannai et al., 2002).

3.1.2 Estudi filogenètic

Les seqüències proteiques són alineades utilitzant CLUSTAL_X (Thompson et al., 1997) fent ús de la matriu de substitució BLOSUM 62. Les extensions N-terminals que formen estructures de *coiled-coil* són predites fent servir el programa COILS (Lupas et al., 1991), per mitjà d'alineament múltiple de seqüències i per modelització tridimensional. Aquestes regions N-terminals són posteriorment excloses de l'estudi per tal de centrar l'anàlisi en els dominis catalítics.

Les distribucions filogenètiques són calculades pels mètodes de màxima parsimònia, distàncies i màxima versemblança. L'anàlisi per màxima parsimònia s'efectua amb el programa PROTPARS que pertany al paquet informàtic PHYLIP 3.63 (Felsenstein, 1988). Els programes NEIGHBOR i PROTDIST del mateix programari són els que s'utilitzen per dur a terme el mètode de *neighbor-*

joining, fent servir la matriu de substitució Dayhoff 120. La distribució per màxima versemblança és calculada mitjançant el programa PhyML (Guindon i Gascuel, 2003), aplicant la matriu de substitució JTT. Els programes SEQBOOT i CONSENSE (Felsenstein, 1988) són posteriorment emprats per estimar els límits de confiança de cada grup a partir de 100 replicats *bootstrap* per cadascun dels mètodes utilitzats. Els arbres són finalment visualitzats i editats amb el programa TREEVIEW (Page, 1996).

3.1.3 Model estructural de proteïnes

Els models tridimensionals basats en homologia de les proteïnes *DmSRS2* i *SLIMP* són construïts utilitzant el servidor Phyre (Kelley i Sternberg, 2009). L'examen dels residus del centre catalític potencialment implicats en la interacció amb el seril adenilat es du a terme per anàlisi d'alineaments múltiples que inclouen les seqüències de *SLIMP*, *DmSRS2* i *SRS2* convencionals i, també, per projecció dels models tridimensionals obtinguts per a les dues proteïnes amb l'estructura cristal·lina de la seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *Bos taurus* (PDB ID: 1WLE) (Chimnaronk et al., 2005), que es realitza amb l'ajut del programa informàtic PyMOL Molecular Graphics System (DeLano, 2002).

3.2 PLASMIDIS, OLIGONUCLEÒTIDS I ANTICOSSOS

3.2.1 Vectors de clonatge i expressió

Taula 3.1 Vectors de clonatge i expressió

Vector	Descripció
pCR2.1-TOPO	Vector de clonatge comercial (Invitrogen) que permet clonar directament fragments obtinguts per PCR (<i>polymerase chain reaction</i> ; reacció en cadena de la polimerasa) per mitjà del sistema TOPO-TA. Conté gens de resistència a ampicilina i kanamicina per a la seva selecció en <i>E. coli</i> .
pET-30 Ek/LIC	Vector comercial (Novagen) d'expressió de proteïnes en <i>E. coli</i> . Permet la clonació directa de productes de PCR mitjançant el sistema LIC (<i>ligation independent cloning</i> ; clonatge independent de lligació) amb la possibilitat d'utilitzar una cua de 6 histidines tant a l'extrem C-terminal com a l'N-terminal. Conté el promotor de l'ARN polimerasa T7 i un gen de resistència a kanamicina per a la seva selecció en <i>E. coli</i> .
pQE-70	Vector comercial (Qiagen) d'expressió de proteïnes en <i>E. coli</i> . Permet el clonatge per mitjà de digestió amb els enzims de restricció SphI, BamHI i BglII i lligació estàndard. Permet l'expressió induïble de proteïnes sota el control del promotor T5/operó lac amb la possibilitat d'incloure una cua de 6 histidines a l'extrem C-terminal. Conté un gen de resistència a ampicilina per a la seva selecció en <i>E. coli</i> .

pUC19	Vector de clonació originàriament comercial (Fermentas). Permet clonar a través d'una àmplia varietat d'enzims de restricció i lligació estàndard. Conté un gen de resistència a ampicilina per a la seva selecció en <i>E. coli</i> .
pRmHa-3	Vector d'expressió induïble en cèl·lules S2 (<i>Drosophila Schneider 2</i>) cedit pel Dr. Thomas Stratmann (UB) i originàriament desenvolupat per Bunch et al. (Bunch et al., 1988). Permet clonar per digestió amb enzims de restricció i lligació estàndard sota el control del promotor de la metal·lotioneïna. Conté un gen de resistència a ampicilina per a la seva selecció en <i>E. coli</i> .
pWIZ	Vector d'expressió basat en el sistema UAS-GAL4 per tal d'induir la transcripció d'ARN de cadena doble que inhibeixen, via ARNi, l'expressió de determinats gens en <i>D. melanogaster</i> , desenvolupat per Lee et al. (Lee i Carthew, 2003) i cedit per la Dra. Ma Lluïsa Espinàs (IBMB-CSIC/IRB). Permet el clonatge per enzims de restricció i lligació estàndard d'un fragment d'ADN en forma d'IR (<i>inverted repeat</i> ; repetició invertida) flanquejant un intró funcional. Conté un gen de resistència a ampicilina per a la seva selecció en <i>E. coli</i> i el gen <i>white</i> ⁺ que permet la selecció de mosques transgèniques per presència del fenotip d'ulls vermells.
pUAST	Vector d'expressió basat en el sistema UAS-GAL4 per induir l'expressió de proteïnes en <i>D. melanogaster</i> i cedit pel Dr. Jordi Bernués (IBMB-CSIC/IRB). Permet el clonatge per enzims de restricció i lligació estàndard d'un ADNc (ADN complementari) sota el control de seqüències UAS. Conté un gen de resistència a ampicilina per a la seva selecció en <i>E. coli</i> i el gen <i>white</i> ⁺ que permet la selecció de mosques transgèniques per presència del fenotip d'ulls vermells.

3.2.2 Plasmidis construïts

3.2.2.1 Plasmidis construïts per a la transcripció *in vitro* d'ARNt

Els plasmidis per transcriure *in vitro* gens d'ARNt de *D. melanogaster* són construïts per mitjà de

lligació d'un fragment d'ADN sintètic al vector pUC19. Cada insert inclou el promotor de l'ARN polimerasa T7 seguit del gen d'ARNt d'interès (la informació dels oligonucleòtids i el protocol d'hibridació es troben detallats a la taula 3.7 i a l'apartat 3.5.1, respectivament).

Plasmidi	ARNt	Utilitat
pTGR-13	<i>DmARNt</i> ^{Ser} (GCU) citoplasmàtic	Transcripció <i>in vitro</i>
pTGR-14	<i>DmARNt</i> ^{Ser} (GCU) mitocondrial	Transcripció <i>in vitro</i>
pTGR-15	<i>DmARNt</i> ^{Ser} (UGA) mitocondrial	Transcripció <i>in vitro</i>
pTGR-29	<i>DmARNt</i> ^{Sec} (UCA)	Transcripció <i>in vitro</i>
pTGR-77	<i>DmARNt</i> ^{Arg} (UCU) citoplasmàtic	Transcripció <i>in vitro</i>

3.2.2.2 Plasmidis construïts per a l'expressió de proteïnes en *E. coli*

Les construccions en vectors d'expressió tenen com a objectiu la sobreexpressió induïble de les proteïnes d'interès per a una posterior purificació i caracterització d'aquestes *in vitro*.

Taula 3.3 Plasmidis construïts per a l'expressió de proteïnes en *E. coli*

Plasmidi	Insert	Utilitat, propietats i construcció
pTGR-17	DmSRS1	Plasmidi basat en el vector pQE-70 per expressar la proteïna DmSRS1 en <i>E. coli</i> per inducció amb IPTG (isopropil-β-D-tiogalactòsid). L'insert és la regió codificadora de la proteïna DmSRS1 amb una cua de 6 histidines a l'extrem C-terminal.
		El plasmidi es construeix partint de l'ADNc clonat en el vector pBD-GAL4 CAM (estoc CT35460-BD del DGRC (<i>Drosophila Genomics Resource Centre</i>)). Després de clonar l'ADNc directament al vector pET-30 Ek/LIC per PCR, se subclona al vector de clonatge pCR2.1-TOPO per PCR utilitzant un parell d'oligonucleòtids que introdueixen les dianes SphI i BamHI als extrems 5' i 3' de l'amplicó, respectivament. Per digestió amb els enzims SphI i BamHI i lligació estàndard se subclona al vector definitiu pQE-70.
pTGR-7	DmSRS2	Construcció basada en el vector induïble per IPTG pET30 Ek/LIC. L'objectiu inicial d'aquest plasmidi era la sobreexpressió de la DmSRS2 en <i>E. coli</i> . L'insert correspon a l'ADN que codifica la proteïna DmSRS2 amb una cua de 6 histidines a l'extrem N-terminal. L'ús final d'aquest plasmidi és la posterior generació d'altres construccions.
		El plasmidi es genera a partir de l'ADNc clonat en el vector pBD-GAL4 CAM (estoc CT15862-BD del DGRC) i es clona directament per PCR al vector pET-30 Ek/LIC.
pTGR-18	DmSRS2	Plasmidi basat en el vector d'expressió induïble per IPTG pQE-70. L'objectiu inicial d'aquesta construcció era la sobreexpressió de la DmSRS2 en <i>E. coli</i> . L'insert correspon a la seqüència que codifica la proteïna sencera DmSRS2 amb una cua de 6 histidines a l'extrem C-terminal. L'ús definitiu d'aquest plasmidi és la posterior generació d'altres construccions.
		El plasmidi es genera a partir de la construcció pTGR-7, s'elimina per mutagènesi dirigida una diana SphI interna i se subclona al vector de clonatge pCR2.1-TOPO per PCR utilitzant oligonucleòtids que introdueixen les dianes SphI i BamHI als extrems 5' i 3' de l'amplicó, respectivament. Per digestió amb els enzims SphI i BamHI i lligació estàndard es clona al vector definitiu pQE-70.
pTGR-32	SLIMP	Plasmidi basat en el vector pQE-70, inicialment dissenyat per a la sobreexpressió en <i>E. coli</i> de la proteïna SLIMP sencera per inducció amb IPTG. L'insert correspon a la proteïna SLIMP amb una cua de 6 histidines a l'extrem C-terminal. La funció definitiva d'aquest plasmidi és la generació posterior d'altres construccions.

		La construcció es realitza amplificant per PCR l'ADNc de SLIMP des del vector pOT2 (estoc LD24627 del DGRC) amb un parell d'oligonucleòtids que introdueixen les dianes SphI i BamHI als extrems 5' i 3', respectivament. El producte de PCR es clona directament al vector pCR2.1-TOPO per al posterior subclonatge al vector d'expressió pQE-70 per digestió amb SphI i BamHI i lligació estàndard.
pTGR-34	Δ Nt-SLIMP	<p>Construcció basada en el vector pQE-70 per a la sobreexpressió de ΔNt-SLIMP per inducció amb IPTG en <i>E. coli</i>. L'insert correspon a la proteïna SLIMP amb una deleció de 28 aminoàcids N-terminal que corresponen a la regió predita com a pèptid senyal al mitocondri. La seqüència conté una cua de 6 histidines a l'extrem C-terminal.</p> <p>La construcció es genera eliminant la regió de 84nt N-terminal per PCR, utilitzant com a motlle la construcció pTGR-32 i adaptant el protocol de mutagènesi dirigida.</p>

3.2.2.3 Plasmidis construïts per a la sobreexpressió de proteïnes en cèl·lules S2

Els plasmidis per expressar les dues versions de la proteïna SLIMP (sencera i truncada a l'extrem N-terminal) en la línia cel·lular *Drosophila* Schneider 2 (S2) tenen com a objectiu la determinació de la localització subcel·lular de la proteïna per tècniques d'immunofluorescència.

Taula 3.4 Plasmidis construïts per a la sobreexpressió de proteïnes en cèl·lules S2

Plasmidi	Insert	Utilitat, propietats i construcció
pTGR-42	SLIMP	Plasmidi basat en el vector pRmHa-3 per sobreexpressar la proteïna SLIMP en cèl·lules S2 per inducció amb CuSO ₄ . L'insert correspon a la regió codificadora de la proteïna SLIMP, incloent-hi el pèptid N-terminal de senyalització mitocondrial predit i una cua de 6 histidines a l'extrem C-terminal.
		El plasmidi es construeix subclonant l'ADNc de SLIMP des de la construcció pTGR-32 a pRmHa-3 per mitjà de digestió amb els enzims de restricció EcoRI i Sall. Prèviament s'ha introduït la diana de restricció Sall després del codó de terminació de la seqüència SLIMP en pQE-70 (pTGR-32) per mutagènesi dirigida.
pTGR-55	Δ Nt-SLIMP	Plasmidi basat en el vector pRmHa-3 per sobreexpressar la versió truncada de SLIMP (Δ Nt-SLIMP) per inducció amb CuSO ₄ en cèl·lules S2. L'insert correspon a SLIMP sense 28 aminoàcids de l'extrem N-terminal que corresponen al pèptid senyal al mitocondri predit, i amb una cua de 6 histidines C-terminal.
		La construcció es genera per subclonatge de la seqüència Δ Nt-SLIMP des de la construcció pTGR-34 a pRmHa-3 per mitjà de digestió amb els enzims de restricció EcoRI i Sall. Prèviament s'ha introduït la diana de restricció Sall després del codó de terminació de la seqüència SLIMP a pTGR-34 per mutagènesi dirigida.

3.2.2.4 Plasmidis construïts per a la generació de soques transgèniques ARNi en *D. melanogaster*

Les construccions ARNi per crear soques de *D. melanogaster* transgèniques es realitzen a partir del vector pWIZ (consulteu la taula 3.1). El vector permet el clonatge d'un fragment d'ADN en forma d'IR separat per l'intró funcional *white* de 74nt, sota el control de seqüències UAS (Lee i Carthew, 2003). La presència de l'intró entre les dues parts de la seqüència palindròmica garanteix l'estabilitat de la construcció en bacteris i la transcripció en *D. melanogaster* d'un ARN que, mitjançant l'*splicing* de l'intró *white*, forma una cadena doble d'ARN sense bucle separador. Les seqüències dissenyades per silenciar cada ARNm específicament corresponen a regions de 500-700pb que són clonades a banda i banda de l'intró en orientació oposada. Els fragments d'ADN escollits no contenen regions complementàries a seqüències 5' o 3' consens de *splicing*.

Taula 3.5 Plasmidis construïts per a la generació de soques transgèniques ARNi en *D. melanogaster*

Plasmidi	Insert	Utilitat, propietats i construcció
pTGR-65	Fragments de <i>DmSRS2</i> en IR	Plasmidi basat en el vector pWIZ per transcriure l'ARN de cadena doble dissenyat per degradar l'ARNm de <i>DmSRS2</i> en <i>D. melanogaster</i> . La inducció de la transcripció s'efectua per encreuament de la soca transgènica amb qualsevol soca que expressi el factor de transcripció GAL4. L'insert correspon a dues seqüències d'ADN de 543pb (per reconèixer de la posició 673 a la 1215 de l'ARNm de <i>DmSRS2</i>) disposades a l'entorn de l'intró <i>white</i> en forma d'IR sota el control de seqüències UAS de resposta a GAL4. Els individus transgènics són seleccionats per expressió del gen <i>white</i> ⁺ (ulls vermells).
		El plasmidi és construït partint de pTGR-18. Per PCR es clona directament el fragment de 543pb de <i>DmSRS2</i> escollit dins el vector pCR2.1-TOPO, incloent-hi la diana de restricció AvrII als dos extrems. El clonatge del fragment des de pCR2.1-TOPO a pWIZ té lloc per digestió amb AvrII, cosa que permet la lligació de la seqüència just abans de l'intró <i>white</i> (que dona lloc a la construcció intermèdia pWIZ-f.543 <i>DmSRS2</i>). El clonatge del mateix fragment en sentit oposat just després de l'intró s'efectua per digestió de l'insert present en pCR2.1-TOPO amb AvrII i digestió de la construcció intermèdia pWIZ-f.543 <i>DmSRS2</i> amb NheI (d'extrems compatibles amb AvrII). L'orientació oposada dels dos fragments es comprova per múltiples anàlisis de restricció.

pTGR-66	Fragments de SLIMP en IR	<p>Construcció basada en el vector pWIZ per a la transcripció de l'ARN de cadena doble emprat per degradar l'ARNm de SLIMP en <i>D. melanogaster</i>. La transcripció de l'ARN és induïda encreuant la soca transgènica amb qualsevol soca d'expressió de GAL4. L'insert correspon a dos fragments d'ADN de 566pb (per reconèixer de la posició 824 a la 1389 de l'ARNm de SLIMP) que flanquegen l'intró <i>white</i> en forma d'IR i precedit de seqüències UAS de resposta a GAL4. Els individus transgènics són seleccionats per expressió del gen <i>white</i>⁺ (ulls vermells).</p>
		<p>El plasmidi es construeix a partir de pTGR-32. El fragment de SLIMP de 566pb és clonat directament per PCR en el vector pCR2.1-TOPO, incloent-hi la diana de restricció AvrII als dos extrems del fragment amplificat. La clonació del fragment des de pCR2.1-TOPO a pWIZ es realitza digerint amb AvrII i lligant l'insert just abans de l'intró (generant, així, la construcció intermèdia pWIZ-f.566SLIMP). El clonatge de la mateixa seqüència en forma d'IR just després de l'intró es realitza digerint amb AvrII l'insert present en pCR2.1-TOPO i amb NheI la construcció intermèdia pWIZ-f.566SLIMP. L'orientació dels fragments de forma oposada és comprovada per anàlisis de restricció múltiples.</p>

3.2.2.5 Plasmidis construïts per a la sobreexpressió de proteïnes en *D. melanogaster*

Els plasmidis per generar soques transgèniques amb l'objectiu de sobreexpressar proteïnes, fent ús del sistema UAS-GAL4, es basen en el vector pUAST (Brand i Perrimon, 1993) (vegeu la taula 3.1). El vector permet la clonació d'un ADNc precedit per seqüències UAS de resposta al factor de transcripció GAL4.

Taula 3.6 Plasmidis construïts per a la generació de soques transgèniques de sobreexpressió de proteïnes en *D. melanogaster*

Plasmidi	Insert	Utilitat, propietats i construcció
pTGR-73	<i>DmSRS2_m</i>	<p>Plasmidi basat en el vector pUAST per tal de sobreexpressar una versió de la proteïna <i>DmSRS2</i>, resistent a l'ARNi, per inducció amb el factor de transcripció GAL4 en mosques (també emprat per a l'expressió en cèl·lules S2R+ (<i>Drosophila</i> Schneider 2 receptor plus)). L'insert correspon a l'ADNc de <i>DmSRS2</i> amb el fragment reconegut per l'ARN de cadena doble produït per la soca ARNi_{<i>DmSRS2</i>} estoc 23003 (vegeu el subapartat 3.3.4.2) modificat (<i>DmSRS2_m</i>) per tal d'evitar el reconeixement de l'ARNm i la seva degradació. Conté una cua myc a l'extrem C-terminal.</p>

		El plasmidi es construeix a partir de la construcció pTGR-7. Per PCR es clona l'ADNc al vector pCR2.1-TOPO, tot afegint-hi una diana de restricció NotI a l'extrem 5' del codó d'inici i una cua myc, seguida d'una diana XbaI abans del codó de terminació. Per mutagènesi dirigida múltiple s'hi afegeixen les dianes AatII i NheI que flanquegen el fragment intern de l'ADN, el qual serà substituït. Per digestió amb AatII i NheI i lligació estàndard s'elimina el fragment original i s'intercanvia amb el fragment modificat (sintetitzat per l'empresa Mr. Gene) que prové del vector pMA. Finalment, per digestió amb els enzims NotI i XbaI, es clona l'ADNc modificat (<i>DmSRS2_m</i>) dins el vector pUAST.
pTGR-75	SARS2	<p>Construcció basada en el vector pUAST per tal de sobreexpressar la proteïna SARS2 per inducció amb el factor de transcripció GAL4 en mosques (també usat per expressar en cèl·lules S2R+). L'insert correspon a l'ADNc de SARS2 que ha estat sintetitzat per l'empresa Mr. Gene per a l'òptima expressió en <i>D. melanogaster</i>. Conté una cua myc a l'extrem C-terminal.</p> <p>L'ADNc de SARS2 dins el plasmidi pMK_RQ, proporcionat per Mr. Gene, és subclonat al vector pUAST per digestió amb les dianes de restricció NotI i XbaI i lligació estàndard.</p>

3.2.3 Oligonucleòtids

Taula 3.7 Oligonucleòtids utilitzats per construir plasmidis per a la transcripció *in vitro* d'ARNt

Oligo	Seqüència 5'→3'	Utilitat
oTGR-50	AGCTTAATACGACTCACTATAGACGAGGTGGCCGA	Clonació del <i>DmARNt^{Ser}</i> (GCU) citoplasmàtic en el vector pUC19 per a la construcció del plasmidi pTGR-13.
oTGR-51	GAGGTTAAGGCGTTGGACTGCTAATCCAATGTGCT	
oTGR-52	CTGCACGCGTGGGTTTGAATCCCATCCTCGTCGCCAGGG	
oTGR-53	TTAACCTCTCGGCCACCTCGTCTATAGTGAGTCGTATTA	
oTGR-54	GCGTGACAGACACATTGGATTAGCAGTCCAACGCC	
oTGR-55	GATCCCCTGGCGACGAGGATGGGATTGAAACCCAC	
oTGR-38	AGCTTAATACGACTCACTATAGAAATATGA	Clonatge del <i>DmARNt^{Ser}</i> (GCU) mitocondrial en el vector pUC19 per generar el plasmidi pTGR-14.
oTGR-39	TGATCAAGTAAAAGCTGCTAACTTTTTCTTT	
oTGR-40	TAATGGTTAAATTCCATTTATATTTCTCCAGGG	
oTGR-41	TGATCATCATATTTCTATAGTGAGTCGTATTA	
oTGR-42	ACCATTAAGAAAAAGTTAGCAGCTTTTACT	
oTGR-43	GATCCCCTGGAGAAATATAATGGAATTA	
oTGR-44	AGCTTAATACGACTCACTATAAGTTAATGAG	Clonatge del <i>DmARNt^{Ser}</i> (UGA) mitocondrial en el vector pUC19 per generar la construcció pTGR-15.
oTGR-45	CTTGAATAAGCATATGTTTTGAAAACATAAG	
oTGR-46	ATAGAATTTAATTTCTATTAACCTCCAGGG	
oTGR-47	TTCAAGCTCATTAACTTATAGTGAGTCGTATTA	
oTGR-48	TTCTATCTTATGTTTTCAAACATATGCTTA	
oTGR-49	GATCCCCTGGAAGTTAATAGAAAATTA	

oTGR-78	AGCTTAATACGACTCACTATAGCCCCACTGAACTTCGG	Clonació del <i>DmARNt^{Sec}</i> (UCA) dins el vector pUC19 per construir el plasmidi pTGR-29.
oTGR-79	TGGTCCGGGGTGCGGACTTCAAATCCGTAGTCGAT	
oTGR-81	GGACCACCGAAGTTCAGTGGGGCTATAGTGAGTCGTATTA	
oTGR-82	ACGCAAATCGACTACGGATTTGAAGTCCGCACCCC	
oTGR-89	TTGCGTCGAAGTGGTTCGATTCCACCTGGGGGGCGCCACATGTG	
oTGR-90	GATCCACATGTGGCGCCCCCAGGTGGAATCGAACCCTTCG	
oTGR-182	AGCTTAATACGACTCACTATAGTCCCTTTGGCG	Clonació del <i>DmARNt^{Arg}</i> (UCU) dins el vector pUC19 per generar el plasmidi pTGR-77.
oTGR-183	CAGAGGATAGCGGTTGGACTTCTAATCCAAAG	
oTGR-184	GTCGCGGGTTCGATCCCCGCAAGGGATCCAGGG	
oTGR-185	CCTCTGCGCAAAGGGACTATAGTGAGTCGTATTA	
oTGR-186	CGCGACCTTTGGATTAGAAGTCCAACGCGCTAT	
oTGR-187	GATCCCCTGGATCCCTTGCGGGGATCGAACC	

Taula 3.8 Oligonucleòtids utilitzats per construir plasmidis d'expressió de proteïnes en *E. coli*

Oligo	Seqüència 5'→3'	Utilitat
oTGR-31	GACGACGACAAGATGGTGCTGGATCTGGATCTG	Oligonucleòtids usats en el procés de construcció de pTGR-17. Usats per amplificar per PCR l'ADNc de <i>DmSRS1</i> des del vector inicial pBD-GAL4 CAM al vector pET-30 Ek/LIK.
oTGR-32	GAGGAGAAGCCCGGTTTAACCGCGGCAGGGTC	
oTGR-56	GCATGCTGCTGGATCTGGATCTG	Oligonucleòtids emprats per generar el plasmidi pTGR-17. Usats per amplificar l'ADNc de <i>DmSRS1</i> en pET-30 Ek/LIC i subclonar-lo al vector pCR2.1-TOPO, incloent-hi les dianes SphI i BamHI.
oTGR-57	GGATCCGGCGGCAGGGTC	
oTGR-29	GACGACGACAAGATGAAATTGCCGACGAATTCTC	Oligonucleòtids usats a fi de construir pTGR-18 tot amplificant per PCR l'ADNc de <i>DmSRS2</i> des del vector inicial pBD-GAL4 CAM a pET-30 Ek/LIK.
oTGR-30	GAGGAGAAGCCCGGTCTAGGCCTTGATGAATTTG	
oTGR-58	GAATCTTGTGGTATGCGCACCGAGGG	Oligonucleòtids usats per a construir pTGR-18. Emprats per efectuar mutagènesi dirigida amb l'objectiu d'eliminar una diana de restricció SphI dins la regió codificadora de <i>DmSRS2</i> .
oTGR-59	CCCTCGGTGCGCATACCACAAGATTC	
oTGR-60	GCATGCAATTGCCGACG	Oligonucleòtids usats per a la construcció de pTGR-18. Utilitzats per amplificar per PCR la seqüència de <i>DmSRS2</i> de pET-30 Ek/LIC i inserir-la al vector pCR2.1-TOPO, incloent-hi les dianes de restricció SphI i BamHI.
oTGR-61	GGATCCCTTGATGAATTTGACC	
oTGR-91	GCATGCTGAGCCTGCGAAGTG	
oTGR-92	GGATCCGAAAAGTCCCTTAAACTGCTG	Oligonucleòtids per construir pTGR-32. Usats per amplificar l'ADNc de SLIMP des de la construcció inicial en el vector pOT2 a pCR2.1-TOPO, incloent-hi les dianes SphI i BamHI.

oTGR-99	CATTAAGAGGAGAAATTAAGCATGGATAAAGCG AACGAAAACCTATGTGAC	Oligonucleòtids utilitzats per a la construcció de pTGR-34. Usats per causar una deleció de 84nt a la regió 5' de l'ADNc de SLIMP des de la construcció pTGR-32.
oTGR-100	GTCACATAGTTTTTCGTTTCGCTTTATCCATGCTTAA TTTCTCCTCTTTAATG	

Taula 3.9 Oligonucleòtids usats per construir plasmidis de sobreexpressió de proteïnes en cèl·lules S2

Oligo	Seqüència 5'→3'	Utilitat
oTGR-101	CACCATCACTAAGTCGACTTAGCTGAGCTTG	Encebadors utilitzats en el procés de construcció de pTGR-42 i pTGR-55. Permeten la inserció d'una diana de restricció Sall per mutagènesi dirigida després del codó de terminació de la seqüència d'ADNc de SLIMP o ΔNt-SLIMP a les construccions pTGR-32 i pTGR-34.
oTGR-102	CAAGCTCAGCTAAGTCGACTTAGTGATGGTG	

Taula 3.10 Oligonucleòtids usats per a la construcció de plasmidis per crear soques transgèniques ARNi en *D. melanogaster*

Oligo	Seqüència 5'→3'	Utilitat
oTGR-130	CCTAGGCGTGCCGGACATACTGCC	Oligonucleòtids emprats per construir pTGR-65. Permeten amplificar un fragment de 543pb de l'ADNc de <i>DmSRS2</i> des de la construcció pTGR-18 per ser clonat a pCR2.1-TOPO. Introdueixen dianes AvrII als extrems de l'amplicó.
oTGR-131	CCTAGGAGGATCTGTCCGTCAGCGG	
oTGR-132	CCTAGGTTTCGAGAGCTACCTTGGTG	Oligonucleòtids usats a fi de generar el plasmidi pTGR-66. Permeten amplificar un fragment de 566pb de l'ADNc de SLIMP des de la construcció pTGR-32 per ser clonat en pCR2.1-TOPO. Permeten la introducció de dianes AvrII als extrems del producte de PCR.
oTGR-133	CCTAGGAGATCCTGCTGATGAACGG	

Taula 3.11 Oligonucleòtids usats per a la construcció de plasmidis per tal de crear soques transgèniques de sobreexpressió de proteïnes en *D. melanogaster*

Oligo	Seqüència 5'→3'	Utilitat
oTGR-142	GCGGCCGCATGAAATTGCCGACGAA	Oligonucleòtids emprats per amplificar l'ADNc de <i>DmSRS2</i> i clonar-lo des de la construcció pTGR-7 a la pTGR-73, passant pel vector pCR2.1-TOPO. Afegeixen la diana NotI a l'extrem 5' i una cua myc seguida d'una diana XbaI a l'extrem 3'.
oTGR-144	TCTAGAGATCCTCCTCGGAGATCAGCTT CTGCTCGGCCCTTGATGAATTTGACCAG	
oTGR-145	CCTCTGCTGCTGCTGAGACGTCAAAGGTC GCATGAC	Encebadors usats per inserir les dianes AatII i NheI flanquejant el fragment a intercanviar de l'ADN de <i>DmSRS2</i> en pCR2.1-TOPO, per mutagènesi dirigida múltiple.
oTGR-146	CCTTACTGGCCAGCTAGCAACTTTGGAGC AG	

Taula 3.12 Oligonucleòtids usats per realitzar PCR semiquantitativa

Oligo	Seqüència 5'→3'	Utilitat
oTGR-127	AGTATCCGGGCAGTCATC	Oligonucleòtids utilitzats per detectar un fragment de 282pb de l'ADNc de SLIMP.
oTGR-123	GTCCTTAAACTGCTGTAGATCCTG	
oTGR-134	TGAAGATCAAGATCATTGCC	Oligonucleòtids emprats per detectar un fragment de 244pb de l'ADNc de l'actina 5C de <i>D. melanogaster</i> .
oTGR-135	CTGCTGCTTCCTCGACTTC	

Taula 3.13 Oligonucleòtids utilitzats per realitzar PCR quantitativa

Oligo	Seqüència 5'→3'	Utilitat
oTGR-166	CCGTTCTGCGACCATTCAT	Oligonucleòtids usats per detectar un fragment de 71pb de l'ADNc de <i>DmSRS2</i> .
oTGR-167	CAGCTTCGTCTCCGGTATCC	
oTGR-158	GGCGATAAGCGAACGAAAAC	Oligonucleòtids utilitzats per detectar un fragment de 80pb de l'ADNc de SLIMP.
oTGR-159	AAAAATTGCCGCTCTCCAAA	
oTGR-162	TGCCACCGGATTCAAGA	Encebadors usats per detectar un fragment de 75pb de l'ADNc de Rp49 (<i>ribosomal protein 49</i> ; proteïna ribosòmica 49) de <i>D. melanogaster</i> .
oTGR-163	AAACGCGTTCTGCATGAG	

Taula 3.14 Oligonucleòtids utilitzats per a la quantificació relativa d'ADNmt per PCR quantitativa

Oligo	Seqüència 5'→3'	Utilitat
oTGR-172	CCCCTATTCTTATACCTTTTATAGT	Oligonucleòtids usats per amplificar un fragment de 104pb del gen de l'ATPasa6 codificat al genoma mitocondrial de <i>D. melanogaster</i> (seqüències proporcionades pel Dr. Aurelio Teleman (DKFZ)).
oTGR-173	TGTCCAGCAATTATATTAGCAGTTA	
oTGR-174	TCGAACAGGCGGTGAAGAA	Encebadors emprats per amplificar una regió de 66pb del gen nuclear que codifica la mRp110 de <i>D. melanogaster</i> (seqüències cedides pel Dr. Aurelio Teleman (DKFZ)).
oTGR-175	TGCAATGATTGGAGTGGAACA	

Taula 3.15 Oligonucleòtids usats com a sondes de *northern blot*

Oligo	Seqüència 5'→3'	ARNt diana	T(°C) d'hibridació
oTGR-147	TGGCGCCCCCAGGTGGAAT	<i>DmARNt^{Sec}</i> (UCA)	65°C
oTGR-150	TGGAGAAATATAAATGGAATTTAACC	<i>DmARNt^{Ser}</i> (GCU) mitocondrial	50°C
oTGR-151	TGGAAGTTAATAGAAAATTAATTCTATCTTATG	<i>DmARNt^{Ser}</i> (UGA) mitocondrial	50°C
oTGR-149	TGGTCATTAGAAGTAAGTGCTAATTTAC	<i>DmARNt^{Lys}</i> (CUU) mitocondrial	50°C

3.2.4 Anticossos i tincions

Taula 3.16 Anticossos primaris

Anticòs	Immunogen	Espècie	Propietats i dilució	Origen
Anti- <i>DmSRS2</i>	Pèptid sintètic intern de <i>DmSRS2</i>	Pollastre	IgY Policlonal WB (<i>western blot</i> ; immunodetecció de proteïnes): 1:200	Innovagen AB (vegeu l'apartat 3.6.6)
Anti-SLIMP	Pèptid sintètic intern de SLIMP	Conill	IgG Policlonal WB: 1:100	Innovagen AB (vegeu l'apartat 3.6.6)
Anti-Nt-SLIMP	Pèptid sintètic de SLIMP del senyal N-terminal predit de localització mitocondrial	Pollastre	IgY Policlonal WB: 1:200	Innovagen AB (consulteu l'apartat 3.6.6)
Anti-His(C-term)	6 histidines-COOH	Ratolí	IgG _{2b} Monoclonal Immunofluorescència: 1:200	Invitrogen
Anti-B-ATPasa	B-ATPasa de <i>D. melanogaster</i>	Conill	Immunosèrum WB: 1:1000	Proporcionat pel Dr. Rafael Garesse (IIB-UAM) (Peña i Garesse, 1993).
Cleaved caspase-3 (Asp175) Antibody	Pèptid sintètic corresponent als residus N-terminals adjacents a l'Asp175 de la caspasa-3 humana	Conill	IgG Policlonal Immunofluorescència: 1:100	Cell Signaling Technology
Myc-tag (9B11) Mouse mAb	Pèptid sintètic corresponent als residus 410-419 de la seqüència c-Myc humana	Ratolí	IgG _{2a} Monoclonal WB: dilució 1:1000 Immunofluorescència: 1:200	Cell Signaling Technology

Taula 3.17 Anticossos secundaris

Anticòs	Immunogen	Espècie	Propietats i dilució	Origen
Donkey anti-chicken IgY	IgY de pollastre	Ase	Unit a HRP (<i>horseradish peroxidase</i> ; peroxidasa de rave picant) WB: 1:50.000	Chemicon (Millipore)
Anti-rabbit IgG	IgG de conill	Ase	Unit a HRP WB: 1:25.000 (anti-SLIMP) o 1:50.000 (la resta)	GE Healthcare
Anti-mouse IgG	IgG de ratolí	Ovella	Unit a HRP WB: 1:50.000	GE Healthcare
Alexa Fluor® 488 anti-mouse	IgG de ratolí	Ase	Unit al fluoròfor Alexa Fluor® 488 Immunofluorescència: 1:600-1:400	Invitrogen
Alexa Fluor® 488 anti-rabbit	IgG de conill	Cabra	Unit al fluoròfor Alexa Fluor® 488 Immunofluorescència: 1:400	Invitrogen

Taula 3.18 Tincions utilitzades per a immunofluorescència

Anticòs	Diana	Làser	Origen
MitoTracker® Red CMXRos	Matriu mitocondrial	561nm	Invitrogen
DAPI	Nucli	405nm	Sigma

3.3 ORGANISMES I SOQUES EMPRATS I CONDICIONS DE CREIXEMENT

3.3.1 Soques d'*Escherichia coli*

Les soques d'*E. coli* utilitzades són NovaBlue® (Novagen) i XL1-Blue® (Stratagene), de genotip *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F[proAB lacI^qZΔM15::Tn10(Tet^r)]*.

El cultiu líquid de les esmentades soques s'efectua en medi LB (*Lennox Broth*) (Conda) en agitació a 250rpm i a 37°C. El cultiu en medi sòlid es realitza en plaques d'agar LB (Conda) incubades a 37°C sense agitació. El medi de les soques transformades amb vectors que confereixen resistència a ampicilina o kanamicina és suplementat amb 100µg/mL d'ampicilina o 50µg/mL de kanamicina, respectivament. Les soques transformades poden ser emmagatzemades a -80°C en glicerol al 15% (v/v).

3.3.2 Línies cel·lulars *Drosophila Schneider 2*

La línia cel·lular S2 (*Drosophila Schneider 2*) prové de cultius primaris d'estadis embrionaris tardans de *D. melanogaster* (Schneider, 1972). Són cèl·lules de morfologia esfèrica,

semiadherents que poden créixer en monocapa o en suspensió. Les cèl·lules S2 utilitzades en aquest treball van ser proporcionades pel Dr. Thomas Stratmann (UB).

La línia cel·lular S2R+ (*Drosophila* Schneider 2 receptor plus) (Yanagawa et al., 1998), proporcionada pel Dr. Jordi Bernués (IBMB-CSIC/IRB), és utilitzada en aquest treball perquè té una major capacitat d'adherència a superfícies, fet que facilita la realització d'immunofluorescències.

3.3.3 Espècies d'insectes i condicions de creixement

Taula 3.19 Espècies d'insectes utilitzades				
Espècie	Nom comú	Tàxon	Condicions de creixement	Origen
<i>Drosophila melanogaster</i>	Mosca del vinagre o drosòfila	Ordre: Diptera	Consulteu l'apartat 3.9.1.	Segons la soca (vegeu les taules 3.22, 3.23 i 3.24)
<i>Lepisma spp.</i>	Peixet de coure	Subclasse: Thysanura	-	Salvatge
<i>Tribolium castaneum</i> soca San Bernardino	Escarabat de la farina	Ordre: Coleoptera	En una barreja de farina de blat i segó, a 30°C i en condicions de foscor.	Dr. Xavier Bellés (CSIC-UPF)
<i>Blatella germanica</i>	Cuca molla	Ordre: Blattaria	-	Dr. Xavier Bellés (CSIC-UPF)
<i>Bombyx mori</i>	Cuc de seda	Ordre: Lepidoptera	En fulla de morera a RT.	Gloria Sanahuja

3.3.4 Soques de *Drosophila melanogaster* transgèniques

3.3.4.1 Marcadors i cromosomes balancejadors

Els cromosomes balancejadors eviten la recombinació genètica entre cromosomes i van associats a marcadors dominants (consulteu l'apartat 1.4.3 de la introducció).

Taula 3.20 Cromosomes balancejadors				
Abreviatura	Nom	Reorganitzacions cromosòmiques	Cromosoma	Marcadors dominants associats
CyO	<i>Curly of Oster</i>	<i>In(2LR)O, Cy dp^{lv1} pr cn²</i>	II	Cy
TM3-Sb	<i>Third multiply inverted 3-Sb</i>	<i>In(3LR)TM3, y⁺ Sb ri p^p sep bx^{34e} e</i>	III	Sb

TM6B	<i>Third multiply inverted 6B</i>	<i>In(3LR)TM6, Hu e Tb</i>	III	Hu i Tb
MKRS*	<i>MKRS</i>	<i>Tp(3,3)MRS M(3)76A kar ri Sb</i>	III	Sb

* Tot i ser classificat com a cromosoma balancejador per les múltiples insercions que conté, no s'utilitza com a tal, sinó com a marcador, perquè no impedeix totalment la recombinació.

Taula 3.21 Marcadors dominants			
Abreviatura	Nom	Cromosoma	Tret fenotípic
Cy	<i>Curly</i>	II	Ales corbades
If	<i>Irregular face</i>	II	Ulls rugosos i petits
Ly	<i>Lyra</i>	III	Ales amb els marges rectes
Sb	<i>Stubble</i>	III	Quetes toràciques curtes
Hu	<i>Humeral</i>	III	Quetes extres a les espatlles
Tb	<i>Tubby</i>	III	Larves i pupes arrodonides

3.3.4.2 Soques transgèniques ARNi

Totes les soques detallades a continuació contenen els transgens ARNi per silenciar l'expressió de *DmSRS2* o *SLIMP* sota el control de seqüències UAS de resposta al factor de transcripció GAL4. Les diferents línies han estat generades sobre un fons genètic *white*⁻ i algunes d'elles es troben en mescla d'homozigots pel transgèn o heterozigots sobre un cromosoma balancejador (consulteu l'apartat 3.9.2).

Taula 3.22 Soques transgèniques ARNi		
Soca	Genotip complet (X; II; III)	Origen
ARNi _{DmSRS2 estoc 1}	w; $\frac{\text{UAS - ARNi}_{DmSRS2 \text{ estoc } 1}}{\text{UAS - ARNi}_{DmSRS2 \text{ estoc } 1}/\text{CyO}}$; $\frac{+}{+/\text{TM3 - Sb}}$	Propi
ARNi _{DmSRS2 estoc 1-dcr2}	w; $\frac{\text{UAS - ARNi}_{DmSRS2 \text{ estoc } 1}}{\text{UAS - ARNi}_{DmSRS2 \text{ estoc } 1}/\text{CyO}}$; $\frac{\text{UAS - dcr2}}{\text{UAS - dcr2}/\text{TM3 - Sb}}$	Propi
ARNi _{DmSRS2 estoc 23003}	w; $\frac{\text{UAS - ARNi}_{DmSRS2 \text{ estoc } 23003}}{\text{UAS - ARNi}_{DmSRS2 \text{ estoc } 23003}}$; $\frac{+}{+}$	VDRC (<i>Vienna Drosophila RNAi Center</i>) (Dietzl et al., 2007)
ARNi _{SLIMP estoc 8}	w; $\frac{+}{+/\text{CyO}}$; $\frac{\text{UAS - ARNi}_{SLIMP \text{ estoc } 8}}{\text{UAS - ARNi}_{SLIMP \text{ estoc } 8}/\text{TM3 - Sb}}$	Propi
ARNi _{SLIMP estoc 8-dcr2}	w; $\frac{\text{UAS - dcr2}}{\text{UAS - dcr2}/\text{CyO}}$; $\frac{\text{UAS - ARNi}_{SLIMP \text{ estoc } 8}}{\text{UAS - ARNi}_{SLIMP \text{ estoc } 8}/\text{TM3 - Sb}}$	Propi
ARNi _{SLIMP estoc 33774}	w; $\frac{\text{UAS - ARNi}_{SLIMP \text{ estoc } 33774}}{\text{UAS - ARNi}_{SLIMP \text{ estoc } 33774}}$; $\frac{+}{+}$	VDRC (Dietzl et al., 2007)

3.3.4.3 Soques transgèniques de sobreexpressió de proteïnes

Les soques emprades per sobreexpressar les proteïnes *DmSRS2* modificada (*DmSRS2_m*) i *SARS2*, en el moment de la redacció d'aquest escrit, no estaven establertes com a soques homozigotes o balancejades ni s'havia pogut determinar la localització cromosòmica. Tot i així, es presenten en aquest treball alguns resultats preliminars de sobreexpressió de proteïnes fent ús de les soques provisionals no balancejades esmentades a la taula 3.23.

Taula 3.23 Soques transgèniques de sobreexpressió de proteïnes	
Soca	Origen
<i>DmSRS2_m</i> estoc 30.5	Propi
<i>SARS2</i> estoc 82.3	Propi

3.3.4.4 Altres soques transgèniques de *D. melanogaster* utilitzades

Taula 3.24 Soques de <i>D. melanogaster</i>			
Soca	Genotip complet (X; II; III)	Característiques	Origen
<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>w</i> ; $\frac{+}{+}; \frac{+}{+}$	Soca <i>wt</i> amb una mutació al gen <i>white</i> del cromosoma X que produeix el fenotip d'ulls blancs.	Cedida pel Dr. Jordi Bernués (IBMB-CSIC/IRB).
Doble balancejadora	<i>w</i> ; $\frac{lf}{CyO}; \frac{Ly}{TM3-Sb}$	Soca amb cromosomes balancejadors i marcadors als cromosomes II i III.	Cedida pel Dr. Jordi Bernués (IBMB-CSIC/IRB).
actina 5C-GAL4	<i>yw</i> ; $\frac{+}{+}; \frac{act5C-GAL4}{TM6B}$	Soca que expressa GAL4 seguint el patró d'expressió de l'actina 5C. Transgèn al cromosoma III.	Cedida pel Dr. Jordi Bernués (IBMB-CSIC/IRB).
nubbin-GAL4- UAS- <i>dcr2</i>	<i>yw</i> ; $\frac{nubb-GAL4; UAS-dcr2}{CyO^{TM6B}}$	Soca que expressa GAL4 sota el control del promotor del gen <i>nubbin</i> . També expressa el gen <i>dicer-2</i> en resposta a GAL4. Transgens als cromosomes II i III, respectivament.	Cedida pel Dr. Andreu Casali (IBMB-CSIC/IRB).
patched-GAL4	<i>w</i> ; $\frac{ptc-GAL4}{ptc-GAL4}; \frac{+}{+}$	Soca que expressa GAL4 sota el control del promotor del gen <i>patched</i> . Transgèn al cromosoma II.	Cedida pel Dr. Jordi Bernués (IBMB-CSIC/IRB).
UAS- <i>dicer-2</i>	<i>w</i> ; $\frac{UAS-dcr2}{UAS-dcr2/CyO}; \frac{+}{+}; \frac{+}{TM3-Sb}$	Soca transgènica doble balancejada que conté el gen <i>dicer-2</i> precedit de seqüències UAS al cromosoma II.	Cedida pel Dr. Daniel D. Shaye (IBMB-CSIC/IRB).

UAS- <i>dicer-2</i>	$y^w; \frac{UAS-Sp}{UAS-Sp/CyO}; \frac{UAS-dcr2}{UAS-dcr2/TM6B}$	Soca transgènica doble balancejada que conté el gen <i>dicer-2</i> sota el control de seqüències UAS al cromosoma III.	Cedida pel Dr. Andreu Casali (IBMB-CSIC/IRB).
UAS- <i>reaper</i>	$X^{UAS-rpr} X^{UAS-rpr} / Y; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$	Soca transgènica amb el gen <i>reaper</i> precedit de seqüències UAS al cromosoma X.	Cedida pel Dr. Jordi Bernués (IBMB-CSIC/IRB).

3.4 TÈCNiques BÀSIQUES DE MANIPULACIÓ D'ADN

La majoria de tècniques de biologia molecular utilitzades en aquest treball són protocols de laboratori rutinaris o bé derivats de procediments anotats per Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989). La majoria de protocols llistats a continuació són emprats per a la construcció dels plasmidis mencionats anteriorment (vegeu les taules 3.2-3.6).

3.4.1 PCR estàndard

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) estàndard és emprada per amplificar fragments d'ADN genòmic o plasmídic per al seu posterior clonatge. A 4°C, es preparen reaccions de 50µL en tubs de PCR de 0,2mL que contenen 5ng/µL d'ADN motlle, tampó de la *PfuUltra* (Stratagene) 1x, dNTP (*deoxyribonucleotides triphosphate*; desoxiribonucleòtids trifosfat) 1mM, encebador directe i revers 0,4µM, MgCl₂ 3mM i 0,25U/µL d'ADN polimerasa *PfuUltra High-Fidelity* (Stratagene). Els tubs són sotmesos al següent programa del termociclador *MyCycler*TM thermal cycler (Bio-Rad): un pas de desnaturalització inicial de 3min a 95°C, seguit de 30 cicles que inclouen un pas de desnaturalització de 45seg a 92°C, un pas d'hibridació de 45seg de 44°C a 68°C incrementant 0,8°C per cicle, i un últim pas d'elongació de 2min per cada Kb d'ADN a amplificar a 72°C. Després dels 30 cicles, té lloc un pas d'elongació de 10min a 72°C.

3.4.2 Electroforesi d'ADN

L'electroforesi d'ADN permet la separació de fragments d'ADN segons la seva grandària. Les mostres d'ADN carregades en un gel d'agarosa submergit en tampó són sotmeses a un camp elèctric que permet la migració de les molècules d'ADN (carregades negativament) cap al pol positiu.

Els gels d'agarosa estàndard es preparen dissolent un 1% (w/v) d'agarosa (Conda) en tampó TBE 0,5x (tampó tris-borat-EDTA 0,5x: Tris-base pH 8,3 44,5mM, àcid bòric 44,5mM i EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*; àcid etilendiamintetraacètic) 1mM). Per a la resolució de fragments d'ADN menors de 500pb es preparen els gels al 2% (w/v) amb agarosa de punt de fusió baix (Conda) en TBE 0,5x. La barreja s'aboca en un motlle horitzontal i es deixa polimeritzar. Les mostres d'ADN es barregen amb tampó de càrrega 10x (SDS (*sodium dodecyl sulfate*; dodecil

sulfat sòdic) 1% (w/v), glicerol 50% (v/v) i blau de bromofenol 0,05% (w/v)) i són carregades als pouets del gel. L'electroforesi d'ADN es du a terme en tancs d'electroforesi Horitzontal gel unit (Scie-Plas) en tampó TBE 0,5x a 90-120V, segons la mida del tanc. Posteriorment, els gels se submergeixen en una solució de bromur d'etidi 0,0001% (w/v) en TBE 0,5x durant 20min i els fragments d'ADN es visualitzen sota llum UV (ultraviolada) en un equip GeneGenius Bio Imaging System (Syngene) per a la seva anàlisi o purificació.

3.4.3 Purificació d'àcids nucleics

La purificació d'àcids nucleics de reaccions de PCR o de gels d'agarosa s'efectua per mitjà del kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) tot seguint les instruccions d'ús del fabricant.

3.4.4 Extracció amb fenol-cloroform

L'extracció amb fenol-cloroform permet la purificació d'àcids nucleics per eliminar restes proteiques. S'afegeix 1 volum de fenol a la mostra d'àcids nucleics en un tub de microcentrífuga d'1,5mL. Es barreja la mescla amb el vòrtex durant 15seg i es centrifuga a 16.000g durant 2min. Es recupera la fase superior aquosa evitant l'aspiració de la fase proteica i s'introdueix en un nou tub de microcentrífuga. S'hi afegeix 1 volum de fenol:cloroform:isoamil alcohol (25:24:1), es barreja amb el vòrtex durant 15seg i es centrifuga de nou a 16.000g durant 2min. Es recupera la fase superior aquosa en un nou tub de microcentrífuga per precipitar-la posteriorment amb etanol.

3.4.5 Precipitació amb etanol

L'objectiu de la precipitació amb etanol és la concentració d'àcids nucleics. S'afegeix acetat de sodi 0,3M pH 5,2 i 2,5 volums d'etanol 100% (v/v) fred a la mostra aquosa d'àcids nucleics en un tub de microcentrífuga d'1,5mL. La mescla es barreja amb el vòrtex 15seg i es col·loca a -20°C durant 1h. La mostra es centrifuga a 16.000g durant 15min a 4°C i s'elimina el sobrenedant. El pellet es resuspèn en 2,5 volums d'etanol 70% (v/v) amb el vòrtex durant 15seg. Es centrifuga la mostra a 16.000g durant 15min a 4°C i s'elimina completament el sobrenedant. El pellet es deixa assecar durant 10min i és resuspès en el volum desitjat d'aigua Milli-Q.

3.4.6 Digestió amb enzims de restricció

Les anàlisis de restricció es realitzen en tubs de PCR de 0,2mL que contenen 200ng de plasmidi en un volum de reacció final de 20µL. La digestió de plasmidis per al subclonatge es realitza amb 1-2µg d'ADN plasmídic en tubs de microcentrífuga d'1,5mL amb un volum final de reacció de 50µL. Segons l'enzim o enzims de restricció emprats s'hi afegeixen les quantitats de tampó de digestió i d'enzim de restricció indicades pels fabricants (Takara o New England Biolabs). La

digestió s'incuba durant 2h per a l'anàlisi de restricció o entre 2h i o/n (*over night*; durant la nit) per subclonar, a la temperatura indicada per a cada enzim de restricció (generalment a 37°C).

3.4.7 Lligació

3.4.7.1 Clonatge independent de lligació en pCR2.1-TOPO

El sistema TOPO-TA Cloning® (Invitrogen) permet el clonatge directe i eficient de productes de PCR en un vector linealitzat que presenta una desoxitimidina que sobresurt a cada extrem 3', unida covalentment a la topoisomerasa I. L'amplificació de fragments d'ADN per al clonatge en el vector pCR2.1-TOPO requereix un tractament de 10min a 72°C amb 1U de *Taq* polimerasa (recombinant, d'Invitrogen) que afegeix una desoxiadenosina a cada extrem 3' del producte de PCR. Així, l'acomodament de l'insert en el vector linealitzat té lloc directament per activació de la topoisomerasa I.

Les reaccions es preparen seguint les instruccions del fabricant, en tubs de 0,2mL que contenen entre 0,5 i 4µL de producte de PCR fresc, 1µL de solució salina, 1µL de vector i fins a 6µL d'aigua Milli-Q. Es barregen les reaccions amb cura i s'incuben durant 5min a RT.

3.4.7.2 Clonatge independent de lligació en pET-30 Ek/LIC

El kit pET-30 Ek/LIC Vector (Novagen) utilitza un vector linealitzat amb extrems protuberants de 13-14pb. El clonatge en aquest vector requereix que els oligonucleòtids encebadors dissenyats per amplificar l'ADN a clonar continguin seqüències 5' complementàries als extrems protuberants del vector linealitzat.

Els productes de PCR purificats (consulteu l'apartat 3.4.3) han de ser tractats amb ADN polimerasa T4 per generar extrems protuberants compatibles. Es mesclen en tubs de microcentrífuga d'1,5mL a 4°C: 14,6µL d'insert purificat, tampó de l'ADN polimerasa T4 1x, dATP (*deoxyadenosine triphosphate*; desoxiadenosina trifosfat) 2,5mM, DTT (ditiotretitol) 5mM, ADN polimerasa T4 0,05U/µL i fins a 20µL d'aigua lliure de nucleases. La reacció s'incuba durant 30min a 22°C i, finalment, s'inactiva l'enzim durant 20min a 75°C.

En un tub de microcentrífuga d'1,5mL es barregen 2µL d'insert tractat i 1µL de vector. S'incuba la reacció durant 5min a 22°C. Posteriorment, s'hi afegeix EDTA 6,25mM, es mescla amb la pipeta i s'incuba 5min a 22°C.

3.4.7.3 Lligació estàndard

La lligació estàndard s'utilitza per generar plasmidis a partir de vector i insert prèviament digerits amb enzims de restricció (vegeu l'apartat 3.4.6), que generen extrems cohesius compatibles, i purificats (vegeu l'apartat 3.4.3).

La reacció de lligació es realitza en tubs de microcentrífuga d'1,5mL que contenen vector linealitzat 0,1-0,2mM, insert 0,3-0,6mM, tampó de l'ADN lligasa T4 1x, ADN lligasa T4 (Roche) 0,1U/ μ L i fins a 10 μ L d'aigua Milli-Q. La lligació s'incuba 1h a RT (*room temperature*; temperatura ambient) i 1h a 37°C, o bé o/n a 16°C. Posteriorment, l'ADN lligasa T4 és inactivada durant 10min a 65°C.

3.4.8 Mutagènesi dirigida

El protocol de mutagènesi dirigida simple o múltiple s'ha utilitzat en aquest treball per introduir dianes de restricció als extrems d'un insert per ser clonat posteriorment, per eliminar dianes de restricció situades a la zona codificadora d'un gen o bé per deletar un fragment de 84nt a l'extrem N-terminal de SLIMP.

El procediment consisteix en una amplificació per PCR de cadena senzilla a partir d'un plasmidi motlle amb encebadors que contenen la mutació d'interès. Per a la mutagènesi dirigida simple és necessari el disseny d'un parell d'oligonucleòtids complementaris, mentre que per a la mutagènesi dirigida múltiple tan sols és necessari el disseny d'oligonucleòtids directes que continguin les mutacions desitjades. Els oligonucleòtids de 25-45nt han de contenir la mutació desitjada i una T_m (*melting temperature*; temperatura de fusió) per sobre de 75°C.

Els protocols de PCR es duen a terme amb els kits QuikChange® Site-Directed Mutagenesis o QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), tot seguint les instruccions del fabricant. La reacció de PCR és sotmesa a digestió amb 0,2U/ μ L d'enzim de restricció DpnI (Fermentas) durant 1h a 37°C per tal d'eliminar les restes de plasmidi motlle original.

3.4.9 Transformació de cèl·lules *E. coli*

Les cèl·lules competents per xoc tèrmic XL1-Blue® (Stratagene) i NovaBlue® (Novagen) es transformen seguint les instruccions dels fabricants. La manipulació de les cèl·lules s'efectua en condicions d'esterilitat. En termes generals, el procediment consisteix en barrejar les cèl·lules competents amb <200ng de solució d'ADN plasmídic i sotmetre-les a un xoc tèrmic a 42°C durant 30-45seg amb una posterior incubació a 4°C durant 2min.

Un cop realitzat el xoc tèrmic s'afegeixen 250 μ L de medi SOC (Novagen) a les cèl·lules i s'incuben en agitació a 250rpm durant 1h a 37°C abans de ser plaquejades en plaques d'agar LB amb l'antibiòtic de selecció adient en cada cas. Les plaques s'incuben o/n a 37°C.

3.4.10 Purificació d'ADN plasmídic

Les minipreparacions d'ADN es duen a terme amb el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) d'acord amb les instruccions del fabricant. Les maxipreparacions d'ADN que tenen com a objectiu el clonatge o la transcripció *in vitro* d'ARNt es realitzen amb el kit PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep (Invitrogen) i les maxipreparacions per transfectar cèl·lules S2 en cultiu es realitzen amb el kit EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

Tots tres sistemes de purificació es basen en un primer pas de lisi alcalina del cultiu bacterià, seguit d'un pas de neutralització del pH. La fase aquosa del lisat, que conté l'ADN plasmídic, és recuperada per centrifugació o filtració i els agregats, que contenen residus cel·lulars i ADN genòmic, són descartats. L'ADN plasmídic és seguidament purificat a través d'una membrana de sílice, precipitat amb etanol (en el cas de les maxipreps) i, finalment, eluït o resuspès en aigua Milli-Q.

3.4.11 Quantificació d'àcids nucleics

La quantificació de solucions aquoses d'àcids nucleics es realitza mesurant l'absorbància a 260nm d'1,5µL de mostra en un espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), el qual utilitza els factors de conversió següents: 40µg/mL per 1UA_{260nm} d'ARN de cadena senzilla, 50µg/mL per 1UA_{260nm} d'ADN de cadena doble i 33µg/mL per 1UA_{260nm} d'ADN de cadena senzilla.

3.4.12 Seqüenciació

Totes les construccions plasmídiques sotmeses a reaccions d'amplificació per PCR s'han comprovat per seqüenciació a través d'un servei extern (Macrogen Inc.).

3.5 MANIPULACIÓ, DETECCIÓ I SÍNTESI D'ARN

3.5.1 Transcripció *in vitro* d'ARNt

La transcripció *in vitro* d'ARNt permet produir els ARNt necessaris per als assaigs d'aminoacilació, d'EMSA (*electrophoretic gel mobility-shift assay*; assaig de mobilitat electroforètica) i controls de *northern blot*. Aquesta tècnica es basa en la síntesi de 6 oligonucleòtids (consulteu la taula 3.7) dissenyats perquè hibridin tot formant una cadena doble d'ADN que conté un extrem 5' cohesiu de HindIII i un extrem 3' cohesiu de BamHI. A part, la molècula d'ADN està dissenyada per contenir el promotor de l'ARN polimerasa T7, seguida de la seqüència d'ADN de l'ARNt d'interès finalitzada amb una diana de restricció que permeti la generació d'un extrem 3' de seqüència CCA (BstNI o NspI).

3.5.1.1 Construcció del plasmidi motlle

Els oligonucleòtids (sintetitzats per Sigma Genosys) es fosforilen individualment en tubs de microcentrífuga d'1,5mL. Les reaccions de 50µL que contenen 400pmol d'oligonucleòtid, ATP 1mM, tampó de fosforilació T4PNK 1x i T4PNK (*T4 polynucleotide kinase*; polinucleòtid cinasa T4) (Takara) 0,2U/µL són incubades durant 1h a 37°C i seguidament passen a ser inactivades 10min a 65°C. Es mesclen en un mateix tub: 16pmols de cada oligonucleòtid fosforilat, MgCl₂ 10mM i Tris-HCl pH 7,6 50µM en un volum de reacció de 40µL. Per tal d'hibridar els oligonucleòtids es col·loquen en un bany a 85°C que es deixa refredar progressivament durant

2h. La molècula d'ADN de cadena doble resultant se sotmet a lligació estàndard (consulteu el subapartat 3.4.7.3) amb el vector pUC19, prèviament linealitzat amb els enzims de restricció HindIII i BamHI. Els plasmidis resultants (detallats a la taula 3.2) es transformen en *E. coli* i es purifiquen (vegeu els apartats 3.4.9 i 3.4.10). 50µg del plasmidi motlle per a la transcripció es digereixen o/n amb un enzim de restricció que permet la formació de l'extrem 3' CCA de l'ARNt (a 60°C si s'utilitza BstNI o a 37°C si s'usa NspI). A continuació es purifica la mostra amb fenol-cloroform, es precipita amb etanol (vegeu els apartats 3.4.4 i 3.4.5) i es resuspèn en un volum final de 50µL d'aigua Milli-Q.

3.5.1.2 Reacció de transcripció in vitro

La reacció de transcripció es realitza en un volum final de 500µL en un tub de microcentrífuga d'1,5mL durant 4h a 37°C. La barreja de reacció conté: 50µg d'ADN motlle digerit, 20µg d'ARN polimerasa T7, Tris-HCl pH 8,1 40mM, MgCl₂ 22mM, espermidina 1mM, DTT 1,5mM, Triton X-100 0,01%, ATP 4mM, CTP (*cytidine triphosphate*; citidina trifosfat) 4mM, GTP 4mM, UTP (*uridine triphosphate*; uridina trifosfat) 4mM i GMP (*guanosine monophosphate*; guanosina monofosfat) 16mM. Un cop han transcorregut 2h d'incubació s'hi afegeixen 20µg extra d'ARN polimerasa T7.

3.5.1.3 Purificació de l'ARNt transcrit

L'ARNt transcrit *in vitro* se sotmet a electroforesi en gel de poliacrilamida sota condicions desnaturalitzants. Es prepara un gel amb: acrilamida:bisacrilamida 19:1 6,5% (w/v), urea 8M, tampó TBE 0,5x, APS (*ammonium persulfate*; persulfat amònic) 0,1% (w/v) i TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamino) 0,1% (w/v), s'aboca entre els vidres motlle de 16cm x 20cm i s'introdueix la pinta a la part superior. Les reaccions de transcripció de 500µL es barregen amb 0,1 volums de tampó de càrrega FDM 10x (EDTA 100mM, blau de bromofenol 1% (w/v) i xilen cianol FF 1% (w/v) en formamida) i 0,03 volums de glicerol. La mostra es carrega al gel i se sotmet a electroforesi a la cambra d'electroforesi PROTEAN® II Cell (Bio-Rad) en tampó TBE 0,5x a 350V durant 90min. Posteriorment, es desmunta el gel, s'embolica amb paper de film transparent i es visualitza l'ARNt sota llum UV damunt una placa de sílice coberta de fluor (Ambion). Les bandes es tallen i s'elueixen del gel per mitjà d'un sistema d'electroelució Elutrap® (Schleicher & Schüll) en TBE 0,5x durant 2h a 150V. L'ARN es precipita amb etanol (consulteu l'apartat 3.4.5) i es resuspèn en 200µL d'aigua Milli-Q.

3.5.2 Electroforesi d'ARN en gel de poliacrilamida estàndard

Els gels de poliacrilamida d'ARN desnaturalitzants, per detectar posteriorment determinats ARNt per *northern blot*, es preparen amb el sistema de vidres, separadors i pintes de 0,75mm de gruix Mini-PROTEAN® 3 (Bio-Rad). La mescla per preparar el gel consisteix en: acrilamida:bisacrilamida 19:1 8% (w/v), urea 8M, TBE 0,5x, APS 0,1% (w/v) i TEMED 0,1% (w/v). La barreja s'aboca entre els vidres motlle i s'introdueix la pinta a la part superior del gel. Les mostres es preparen en 0,1

volums de tampó de càrrega FDM 10x i 0,03 volums de glicerol 100%, es carreguen en el gel i es fan córrer en tampó TBE 0,5x durant 60min a 120V a RT.

3.5.3 Electroforesi d'ARN en gel de poliacrilamida àcid d'alta resolució

Per preservar la unió de l'ARNt amb l'aminoàcid és necessari mantenir les condicions àcides. Els gels d'acrilamida d'alta resolució àcids permeten conservar la interacció entre els aminoàcids i els ARNt i separar els ARNt aminoacilats dels desacilats (Ho i Kan, 1987; Varshney et al., 1991; Walker i Fredrick, 2008). La finalitat d'aquests gels és la posterior detecció específica d'ARNt per *northern blot* (consulteu l'apartat 3.5.4).

El gel de poliacrilamida àcid es prepara amb: acrilamida:bisacrilamida 19:1 6,5% (w/v), urea 8M, tampó NaOAc pH 5 0,1M, APS 0,1% (w/v) i TEMED 0,1% (w/v). El gel s'aboca entre dos vidres motlle de 20cm x 45cm amb separadors de 0,75mm de gruix i es col·loca la pinta a la part superior del gel. Les mostres d'ARN es preparen amb tampó de càrrega àcid (NaOAc pH 5 0,1M, sacarosa 20% (w/v), urea 7M, blau de bromofenol 0,1% (w/v) i xilen cianol FF 0,1% (w/v)) i es carreguen en el gel. L'electroforesi es fa córrer en tampó NaOAc pH 5 0,1M o/n a 4°C a 18W.

3.5.4 *Northern blot* d'ARNt

El mètode de *northern blot* és el sistema emprat per detectar específicament ARNt en fraccions totals, mitocondrials o citoplasmàtiques d'ARN, fent ús d'oligonucleòtids marcats radioactivament com a sonda.

3.5.4.1 *Marcatge de la sonda*

El disseny dels oligonucleòtids emprats com a sonda es basa en seqüències de més de 18nt amb T_m elevades (per sobre de 55°C) que continguin una G, A o T a la posició 5' per assolir la màxima eficiència de marcatge (van Houten et al., 1998) i que siguin complementàries, si és possible, a la regió 3' del braç acceptor i al braç T de l'ARNt. Els oligonucleòtids sintètics (detallats a la taula 3.15) es marquen amb ^{32}P a l'extrem 5' per ser usats com a sonda. La reacció de marcatge es du a terme en un tub de microcentrífuga d'1,5mL en un volum final de 20 μL que conté 10pmol d'oligonucleòtid, tampó de fosforilació T4PNK 1x, T4PNK (Takara) 0,75U/ μL , espermidina 10mM i $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Perkin Elmer, 3000Ci/mmol) 750Ci/mol. La reacció de marcatge s'incuba durant 1h a 37°C i, finalment, s'hi afegeixen 80 μL d'aigua Milli-Q. Els oligonucleòtids sonda s'extreuen per mitjà de fenol-cloroform (consulteu l'apartat 3.4.4) i poden ser emmagatzemats a -20°C fins al seu ús.

3.5.4.2 *Transferència a una membrana de niló*

Tant els gels de poliacrilamida d'ARN estàndards, com els àcids, poden ser transferits a una membrana de niló Hybond™ XL (GE Healthcare) per realitzar la detecció d'ARNt per *northern blot*, tanmateix, el sistema de transferència en cada cas és diferent.

Els gels de poliacrilamida estàndard (vegeu l'apartat 3.5.2) se sotmeten a electrotransferència. Es prepara un sandvitx fent ús del sistema Mini Trans-Blot[®] (Bio-Rad) en tampó TAE (Tris-base 40mM, àcid acètic 20mM i EDTA 1mM), en el següent ordre des del pol negatiu al pol positiu: una esponja, 3 papers Whatman[®], el gel, la membrana de niló, 3 papers Whatman[®] i una esponja. L'electrotransferència té lloc a la cambra del sistema Mini Trans-Blot[®] en tampó TAE fred a 600mA durant 2h a 4°C. Un cop transferit l'ARN, es fixen les unions d'aquest a la membrana per entrecreuament amb llum UV, tot irradiant la membrana dues vegades amb 120000µJ/cm² mitjançant un aparell Stratalinker[®] UV Crosslinker 1800 (Stratagene).

Els gels de poliacrilamida àcids d'alta resolució (vegeu l'apartat 3.5.3) es transfereixen per acció del buit a alta temperatura en un assecador de gels (Wilhelm et al., 1992). Després de l'electroforesi, es prepara un sandvitx en el següent ordre: dues capes de paper Whatman[®], la membrana de niló, el gel i film transparent; i es col·loca a l'assecador de gels (Savant) a 80°C durant 2h. Un cop transferit l'ARN, aquest resta fixat a la membrana per temperatura.

3.5.4.3 Hibridació i exposició

La membrana es prehibrida dins una ampolla d'hibridació en un forn a la temperatura adient per a cada sonda (detallada a la taula 3.15) durant un mínim de 30min en rotació amb 15mL de solució d'hibridació:

- tampó SSPE 6x (NaH₂PO₄ pH 7,4 60mM, NaCl 900mM i EDTA 6mM)
- solució Denhardt's 10x (Ficoll[™] PM400 0,2% (w/v), polivinilpirrolidona 0,2% (w/v), BSA (*bovine serum albumin*; albúmina de sèrum boví) Fracció V 0,2% (w/v))
- SDS 0,5% (w/v)

Entre 33 i 100µL de sonda marcada s'afegeixen al tampó d'hibridació i s'incuba la membrana o/n a la temperatura adient per la sonda en ús. Posteriorment, es recupera la solució d'hibridació amb la sonda marcada, que es pot emmagatzemar a -20°C per ser reutilitzada, i es realitzen 2 rentats de la membrana de 10min cadascun dins el forn, a la temperatura indicada per a cada sonda, en rotació, amb 50mL de solució de rentat (tampó SSPE 2x i SDS 0,5% (w/v)). La membrana es col·loca dins la casset d'exposició entre dos films transparents, es cobreix amb una pantalla d'emmagatzematge de fòsfor (Molecula Dynamics) i s'exposa de 3h a o/n. El senyal és digitalitzat en un aparell Typhoon[™] 8600 PhosphorImager (GE Healthcare) i quantificat, si és necessari, amb els softwares ImageJ (Abramoff et al., 2004) o ImageQuant[™] TL (GE Healthcare).

3.5.5 Transcripció inversa i PCR semiquantitativa

La sqPCR (*semiquantitative PCR*; PCR semiquantitativa) és una tècnica que permet estimar la quantitat relativa d'un ARNm d'interès en una mostra d'ARN total. Consta de dos passos: en primer lloc, la transcripció inversa de l'ARNm a ADNc i, en segon lloc, l'amplificació de l'ADNc d'interès per mitjà de PCR amb oligonucleòtids específics. Aquest protocol és emprat per detectar l'ARNm de la proteïna SLIMP en diferents estadis del cicle vital de *D. melanogaster*.

3.5.5.1 Transcripció inversa

S'extreu l'ARN total d'individus *w*¹¹¹⁸ en diferents estadis del cicle vital de *D. melanogaster* (consulteu l'apartat 3.9.7). L'ARN total resuspès en aigua tractada amb DEPC (dietilpirocarbonat) s'incuba amb ADNasa I (desoxiribonucleasa I) (Qiagen) per eliminar restes d'ADN genòmic de la mostra. La reacció de 100µL, que consta de 45µg d'ARN total, tampó RDD 1x, ADNasa I 0,15U/µL i fins a 100µL d'aigua tractada amb DEPC, s'incuba a RT durant 30-60min en un tub de microcentrífuga d'1,5mL. Seguidament es purifica i concentra l'ARN amb el kit RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) d'acord amb les instruccions del fabricant, i s'elueix en un volum final de 14µL d'aigua lliure de nucleases.

La transcriptasa inversa és capaç de sintetitzar cadenes senzilles d'ADN a partir d'ARN total (utilitzant com a encebadors oligonucleòtids aleatoris) o ARNm (emprant encebadors poli(T), que hibriden amb els ARN que presenten una cua 3' poli(A)). Previ a la transcripció inversa, 1µg d'ARN total es desnatura a 70°C durant 10min, se sotmet a un pols de centrífuga i es col·loca a 4°C. La reacció de transcripció inversa s'efectua per mitjà del kit Reverse Transcription System (Promega). Es prepara la reacció en un tub de PCR de 0,2µL que conté: 1µg d'ARN total, MgCl₂ 5mM, tampó de transcripció inversa 1x, barreja de dNTP a 1mM cadascun, inhibidor de ribonucleases RNasin[®] recombinant 1U/µL, 0,5µg d'oligo(dT)₁₅, transcriptasa inversa AMV 15U/µg i fins a 20µL d'aigua lliure de nucleases. La reacció de transcripció inversa s'incuba a 42°C durant 60min, s'escalfa a 95°C durant 5min i es manté a 4°C 5min més. En aquest punt es pot emmagatzemar a -20°C fins al seu ús.

Com a control per assegurar que l'amplificació només prové de l'ARNm inicial i no de contaminació d'ADN genòmic, també es preparen reaccions de transcripció inversa per mitjà del mateix procediment sense afegir-hi transcriptasa inversa AMV.

3.5.5.2 PCR semiquantitativa

Es dissenyen oligonucleòtids específics per amplificar una regió de 200-300pb de l'ADNc de SLIMP i de l'actina 5C que s'utilitza com a control intern (consulteu la taula 3.12).

Les reaccions de PCR es preparen en tubs de PCR de 0,2mL que contenen una dilució ajustada d'ADNc, dNTP 200µM, MgCl₂ 2mM, tampó de la polimerasa *Taq* 1x, 10pmols d'oligonucleòtid directe i revers, polimerasa *Taq* (Invitrogen) 0,025U/µL i fins a 20µL d'aigua Milli-Q. Els tubs són sotmesos al següent programa del termociclador MyCycler[™] thermal cycler (Bio-Rad): un pas de desnaturalització inicial d'1min a 94°C, seguit de 25 cicles que inclouen un pas de desnaturalització de 30seg a 94°C, un pas d'hibridació de 60seg a 56°C (pels encebadors oTGR-127 i 123) o 59°C (pels encebadors oTGR-134 i 135), i un últim pas d'elongació d'1min a 72°C. Després dels 25 cicles, té lloc un pas d'elongació de 10min a 72°C.

Com a control, també s'amplifiquen les reaccions de transcripció inversa sense transcriptasa inversa. Les reaccions de 20µL se sotmeten a electroforesi en gel d'agarosa (vegeu l'apartat

3.4.2) i es comprova que no hi ha amplificació procedent de contaminació d'ADN genòmic en les reaccions control.

3.5.6 PCR quantitativa en temps real

El mètode de qPCR (*quantitative PCR*; PCR quantitativa) en temps real permet determinar de forma absoluta o relativa la quantitat d'un determinat ADN en una mostra. Aquesta tècnica es basa en una PCR en què l'ADN amplificat és detectat en temps real mitjançant la mesura d'intensitat de fluorescència per unió d'un compost a les cadenes dobles d'ADN de nova síntesi. L'increment en intensitat de fluorescència al llarg dels cicles correspon a l'increment exponencial del producte de PCR i permet calcular el C_T (*threshold cycle*; cicle llindar) en cada reacció.

La quantificació relativa relaciona el senyal fluorescent, corresponent a l'ADN diana en la mostra experimental, amb el senyal en la mostra control. La tècnica de quantificació relativa s'ha utilitzat en aquest treball per determinar els nivells d'ARNm de *DmSRS2* i *SLIMP*, en larves on s'ha induït l'expressió d'un ARN de cadena doble per degradar els ARNm de les esmentades proteïnes de forma constitutiva i ubiqua, respecte als nivells d'aquests en larves control (w^{1118}). Les reaccions de qPCR parteixen d'una mostra d'ARN total (vegeu l'apartat 3.9.7), que és tractada amb ADNasa I per eliminar restes d'ADN genòmic i és sotmesa a transcripció inversa per generar l'ADNc (consulteu el subapartat 3.5.5.1).

3.5.6.1 Optimització dels oligonucleòtids encebadors

Els oligonucleòtids (detallats a la taula 3.13) són dissenyats amb el programa Primer Express® (Applied Biosystems). Tots ells tenen entre 18 i 21nt, una T_m al voltant de 60°C, un contingut en GC $\geq 40\%$, amplifiquen una regió de 70-80pb fora del fragment de l'ARNm diana per l'ARNi, no generen estructures secundàries i no formen dímers d'oligonucleòtids.

Per tal d'efectuar una quantificació relativa dels nivells d'ARNm cal garantir que els parells d'encebadors utilitzats durant l'experiment tinguin una eficiència d'amplificació elevada i semblant. Per assegurar una eficiència màxima de cada parell d'oligonucleòtids es realitzen reaccions de PCR amb dilucions seriades d'ADNc que prové de larves control per construir una recta estàndard. Les reaccions es preparen per triplicat en plaques de PCR de 96 tubs de 0,2mL que contenen *Power SYBR*® Green (Applied Biosystems) 1x, oligonucleòtid directe i revers 200nM, dilucions d'ADNc i fins a 20µL d'aigua Milli-Q. La PCR es realitza en un equip StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems), es normalitzen les dades amb ROX com a tint de referència, i se segueixen les condicions següents: un primer pas de 2min a 50°C, un segon pas de 10min a 95°C i un tercer pas de 40 cicles de 15seg a 95°C seguits d'1min a 60°C. Un cop finalitzada la PCR, les reaccions se sotmeten a electroforesi d'ADN (vegeu l'apartat 3.4.2) per comprovar la presència d'un sol fragment d'ADN amplificat de la mida esperada. S'analitzen els resultats amb el programa informàtic StepOnePlus (Applied Biosystems), que proporciona els

valors C_T de cada reacció i la corba de fusió per a cada parell d'oligonucleòtids. La presència d'un sol pic d'intensitat de fluorescència a una temperatura concreta permet descartar experimentalment la formació de dímers d'oligonucleòtids i confirmar l'especificitat del parell d'encebadors per una sola regió de l'ADNc. Es construeix una recta estàndard amb els valors de C_T respecte a la quantitat relativa d'ADNc de cada reacció. Per assegurar que no hi ha errors de manipulació, els valors C_T de les rèpliques no han de diferir en més de 0,3 unitats i la recta estàndard ha de tenir una $R^2 \geq 0,98$. Per assegurar una eficiència dels encebadors major a un 85%, el pendent de la recta ha d'estar entre -3,2 i -3,6, si no és així, cal testar diferents proporcions d'oligonucleòtid directe i revers per aconseguir les condicions que proporcionen un pendent adequat.

3.5.6.2 Quantificació relativa dels nivells d'ARNm

Les reaccions de PCR es preparen per triplicat, de la mateixa manera que s'ha detallat al subapartat anterior, tot utilitzant les concentracions finals òptimes d'oligonucleòtids següents: oTGR-166 1000nM i oTGR-167 250nM; oTGR-158 1000nM i oTGR-159 1000nM; oTGR-162 200nM i oTGR-163 200nM. S'empra el mateix equip i programa de PCR esmentat al subapartat previ. Com a control, també s'amplifiquen reaccions de transcripció inversa sense transcriptasa inversa (vegeu el subapartat 3.5.5.1). Si es detecta amplificació en aquestes reaccions, hi ha contaminació d'ADN genòmic i, es descarten els resultats.

Els canvis en els nivells d'ARNm es calculen amb el mètode $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak i Schmittgen, 2001), utilitzant la mostra control (w^{1118}) com a calibradora. $\Delta\Delta C_T$ és [el ΔC_T de les mostres experimentals (ARNi) o control (w^{1118}) - el ΔC_T de les mostres control (w^{1118})]. Cada ΔC_T correspon a [la mitjana de C_T de l'ARNm diana (*DmSRS2* o *SLIMP*) - la mitjana de C_T de l'ARNm de referència (*Rp49*)]. El $\Delta\Delta C_T$ de la mostra control o calibradora sempre és 0, per tant $2^0=1$, i la resta de valors es calculen relatius a aquest i es representen en percentatges. Els resultats de dos o tres experiments independents se sotmeten al test estadístic *t de Student*.

3.6 EXPRESSIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNES

3.6.1 Expressió i purificació de proteïnes recombinants en *E. coli*

L'expressió de les proteïnes *DmSRS1* i Δ Nt-*SLIMP* en *E. coli* té com a objectiu l'obtenció de proteïnes solubles i pures per a la realització d'assaigs *in vitro*.

Per a l'expressió i purificació de proteïnes es fan créixer 30-50mL de cèl·lules NovaBlue® transformades prèviament amb les construccions pTGR-17 o pTGR-34 en medi LB amb 100µg/mL d'ampicilina, en agitació a 250rpm o/n a 37°C. Es dilueix el cultiu en un volum final d'LB amb ampicilina d'1L. Es fa créixer el cultiu durant 3-4h fins que la densitat òptica assoleixi valors de $A_{600nm}=0,6-1UA$. Per induir l'expressió de les proteïnes s'afegeix IPTG 1mM al cultiu i s'incuba 12h a 20°C en agitació a 250rpm. El cultiu es centrifuga a 9.000g durant 10min a 4°C.

El pellet de cèl·lules es resuspèn en 30mL de tampó de lisi fred (Tris-HCl 50mM, NaCl 300mM, imidazol 20mM, pH 8 i filtrat amb un filtre de PVDF (*polyvinylidene fluoride*; fluorur de polivinilidè) de porus 0,2µm) amb inhibidors de proteases Complete Protease Inhibitor Tablet for HisTagged Proteins EDTA free (Roche) i és sonicat en un sonicador Branson-W250 a 4°C, a un 15% d'amplitud durant 10 cicles de sonicació de 15seg, seguits de 15seg de pausa. El lisat cel·lular és centrifugat durant 1h a 69.673g a 4°C per separar la fracció soluble (sobrenedant) de la fracció particulada (pellet). El sobrenedant es filtra amb un filtre de PVDF de 0,2µm.

La purificació de la proteïna té lloc per cromatografia d'afinitat en columna de níquel. Les proteïnes sintetitzades a partir de les construccions pTGR-17 i pTGR-34 contenen una extensió de 6 histidines a l'extrem C-terminal d'elevada afinitat pel níquel, que es troba unit a sefarosa dins la columna 1mL HisTrap HP (GE Healthcare).

La mostra és injectada a la columna de níquel prèviament equilibrada amb tampó de lisi fred. Es fa passar la mostra a un flux d'1mL/min per mitjà un equip de cromatografia FPLC (*fast protein liquid chromatography*; cromatografia líquida de separació ràpida) (Amersham). A mesura que la mostra entra a la columna, les cues d'histidines de les proteïnes s'uneixen al níquel de la columna i resten immobilitzades. Tot seguit, la columna es renta amb 300mL de tampó de rentat fred (Tris-HCl 50mM, NaCl 300mM, imidazol 40mM, pH 8 i filtrat amb un filtre de PVDF de porus 0,2µm) a un flux de 0,3-1mL/min. La proteïna és eluïda durant 20min a un flux d'1mL/min tot introduint a la columna concentracions creixents d'imidazol per injecció gradual de tampó d'elució fred (Tris-HCl 50mM, NaCl 300mM, imidazol 500mM, pH 8 i filtrat amb un filtre de PVDF de porus 0,2µm). L'imidazol, que és un intermediari de la síntesi d'histidina, desplaça les proteïnes unides al níquel per la cua d'histidines i aquestes poden ser recuperades.

Tant el nivell d'expressió com el grau de puresa de la proteïna en les fraccions d'1,35mL recol·lectades en el procés d'elució, són analitzats per SDS-PAGE (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*; electroforesi en gel de poliàcrilamida amb SDS) i tinció amb blau de Coomassie (consulteu l'apartat 3.6.5). Les fraccions enriquides en la proteïna d'interès són dialitzades en dos passos de 2h a 4°C amb 500mL de tampó de diàlisi (Tris-HCl 50mM, NaCl 200mM, pH 7,6 i filtrat amb un filtre de PVDF de porus 0,2µm) i un pas o/n a 4°C amb 1L de tampó d'emmagatzematge (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, glicerol 50% (v/v) i pH 7,6). Les proteïnes pures poden ser emmagatzemades a -20°C.

3.6.2 Quantificació de proteïnes

Les proteïnes pures són quantificades seguint el mètode Bradford (Bradford, 1976). Es realitzen dilucions seriades de BSA i diverses dilucions de la proteïna d'interès en un volum final de 20µL en una placa de 96 pouets (Nunc). S'hi afegeixen 180µL de reactiu Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) diluït 1:5 en aigua Milli-Q. Es llegeix la densitat òptica a 595nm en un espectrofotòmetre de microplaques PowerWave (BioTek) i amb els valors d'absorbància

obtinguts per a les dilucions seriades de BSA de concentració coneguda es construeix una recta de regressió de la qual és possible inferir la concentració de la proteïna d'interès.

3.6.3 Cromatografia de filtració en gel

La cromatografia de filtració en gel o d'exclusió molecular per grandària consisteix en una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) que permet separar els components d'una mescla de proteïnes segons el seu PM (pes molecular), segons la capacitat que tenen per travessar una matriu formada de dextrans i boles d'agarosa. La columna té un rang de resolució òptima entre 10 i 600KDa. Aquest procediment es du a terme per estimar el pes molecular de la proteïna Δ Nt-SLIMP en condicions natives i, per tant, determinar-ne la seva conformació.

Es prepara una mescla de proteïnes de pes molecular conegut que conté ferritina (PM ~440KDa), catalasa (PM ~232KDa), ADH (alcohol deshidrogenasa) (PM ~150KDa); BSA (PM ~67KDa), ovoalbúmina (PM ~43KDa) i ARNasa (ribonucleasa) A (PM ~13,7KDa). 200 μ L d'aquesta barreja s'injecta a un flux d'1mL/min a la columna Superdex, prèviament equilibrada amb 75mL de tampó de càrrega (Tris-HCl pH 8 40mM i NaCl 150mM), i es monitora el perfil d'elució de les proteïnes a una densitat òptica de 280nm.

Després de rentar la columna amb 25mL de tampó de càrrega, 400 μ g/mL de proteïna Δ Nt-SLIMP, prèviament dialitzada contra el tampó de càrrega de la columna Superdex, s'injecten a la columna i es determinen els pics de densitat òptica a 280nm.

El patró d'elució de la mescla de proteïnes estàndard es representa com a logaritme del pes molecular respecte al volum de retenció en la columna i es construeix una recta de regressió. De la funció resultant de la recta de regressió estàndard i tenint coneixement dels volums de retenció en què apareixen els pics d'absorbància de la proteïna d'interès, s'interpol·la el pes molecular aproximat d'aquesta.

3.6.4 Extracció total de proteïnes

L'obtenció d'extractes proteics per determinar l'expressió de proteïnes recombinants en *E. coli* es du a terme per centrifugació del cultiu bacterià a 16.000g durant 5min a RT. El pellet de cèl·lules es renta amb tampó Tris-HCl pH 7,6 50mM i es centrifuga novament a 16.000g durant 5min a RT. El pellet resultant es resuspèn en un volum de tampó de càrrega PLB 2x (2x *protein loading buffer*; tampó de càrrega de proteïnes: Tris-HCl pH 6,8 100mM, SDS 4% (w/v), glicerol 5% (v/v), blau de bromofenol 0,1% (w/v) i DTT 100mM) equivalent al volum inicial de cultiu i s'escalfa a 95°C durant 5min per tal de lisar les cèl·lules.

Tant els extractes proteics de larves, pupes i adults de *D. melanogaster*, com d'adults de *T. castaneum*, *B. germanica*, *B. mori* i *Lepisma spp.*, s'obtenen seguint el procediment següent: es recullen 5-10mg de teixit en un tub de microcentrífuga d'1,5mL i es renten en tampó PBS 1x (1x *phosphate buffered saline*; tampó fosfat salí: NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10mM i KH₂PO₄ 2mM, pH 7,4). S'elimina el PBS i s'hi afegeixen 300 μ L de PLB 5x (Tris-HCl pH 6,8 125mM, SDS 5%

(w/v), glicerol 21,75% (v/v), blau de bromofenol 0,25% (w/v) i β -mercaptoetanol 1,5M). Es disgrega la mostra amb un homogeneïtzador per a tubs de microcentrífuga d'1,5mL, s'escalfa 1min a 95°C i se sotmet a un pols de centrífuga. Aquest procediment es repeteix 5 vegades i finalment es centrifuga la mostra durant 5min a 16.000g. Es recupera el sobrenedant i se sonica a un 15% d'amplitud en un sonicador Branson-W250 durant 10seg.

L'obtenció d'extractes proteics d'embrions de *D. melanogaster* s'efectua recollint 50 μ L d'embrions i decorionant-los amb una dilució de lleixiu:aigua 1:3 durant 3min. Es filtren els embrions i es netegen amb una solució de PBS 1x amb Triton X-100 0,1% (v/v). Es recullen els embrions en un tub de microcentrífuga d'1,5mL, s'hi afegixen 300 μ L de PLB 5x i se segueix el protocol d'homogeneïtzació detallat anteriorment.

3.6.5 SDS-PAGE i tinció amb blau de Coomassie

L'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE) és un mètode de separació de proteïnes segons el seu pes molecular a través d'una matriu de poliacrilamida. La presència del detergent SDS en el gel provoca la desnaturalització de les proteïnes i que aquestes quedin cobertes de càrregues negatives. Aquest fet permet que la mobilitat electroforètica de les proteïnes depengui només de la seva mida i no de la càrrega o de la seva estructura tridimensional.

Els gels es preparen en el sistema de vidres, separadors i pintes de 0,75mm de gruix Mini-PROTEAN[®] 3 (Bio-Rad). El gel consisteix en una capa inferior de gel separador d'uns 4mL i una capa superior de gel apilador d'1mL:

Gel separador: acrilamida:bisacrilamida 29:1 10% (w/v), Tris-HCl 0,375M pH 8,8, SDS 0,1% (w/v), APS 0,1% (w/v), TEMED 0,04% (v/v) i fins a 4mL d'aigua Milli-Q.

Gel apilador: acrilamida:bisacrilamida 29:1 5% (w/v), Tris-HCl 0,125M pH 6,8, SDS 0,1% (w/v), APS 0,1% (w/v), TEMED 0,1% (v/v) i fins a 1mL d'aigua Milli-Q.

Un cop s'ha afegit el TEMED a la solució de gel separador, s'aboquen els 4mL de solució entre els dos vidres motlle i, a continuació, s'hi afegixen 0,5mL de butanol. Un cop el gel ha polimeritzat, s'elimina el butanol de la capa superior, s'afegeix la solució del gel apilador damunt el gel separador i s'introdueix la pinta a la part superior.

Les mostres de proteïnes es preparen en 0,5 volums de PLB 2x i es fan bullir 5min a 95°C (a excepció d'alguns protocols anotats en altres seccions).

El gel es fa córrer en un tanc d'electroforesi Mini-PROTEAN[®] 3 (Bio-Rad) en tampó Tris-glicina 1x (Tris 25mM, glicina 192mM i SDS 0,2% (w/v)) a 130V per al gel apilador i a 150V per al gel separador durant 90min.

Les proteïnes poden ser posteriorment visualitzades en el gel per mitjà de la tinció amb blau de Coomassie. El gel s'extreu dels vidres motlle i se submergeix en la solució de tinció (Coomassie Brilliant Blue (Panreac) 0,25% (w/v), metanol 50% (v/v) i àcid acètic 10% (v/v)) durant 45min en agitació. Seguidament es realitzen diversos rentats amb solució destenyidora (metanol 50% (v/v))

i àcid acètic 10% (v/v)). El gel es pot assecar en un assecador de gels (Savant) durant 75min a 80°C i emmagatzemar a RT.

3.6.6 Obtenció d'anticossos

Els anticossos utilitzats en aquest treball per detectar les proteïnes *DmSRS2* i SLIMP van ser generats per l'empresa Innovagen AB, per immunització d'animals amb pèptids sintètics de disseny propi per a cada una de les proteïnes d'interès (per veure la informació dels anticossos consulteu la taula 3.16).

Els pèptids emprats per immunitzar els animals van ser escollits en base al seu grau d'antegenicitat, que es pot estimar a partir del nivell d'hidrofilicitat, d'orientació a la superfície de la proteïna i de flexibilitat. Per reconèixer la proteïna *DmSRS2* es va generar l'anticòs anti-*DmSRS2*, escollint un pèptid intern (NH₂-₉₃LRDYGEETPRELA₁₀₄-COOH) de la proteïna. Per la detecció de la proteïna SLIMP sencera es va produir l'anticòs anti-Nt-SLIMP, seleccionant un pèptid a la regió N-terminal de la proteïna que forma part del senyal d'import al mitocondri predit (NH₂-₁MLSLRSVLKHC₁₁-COOH). Per reconèixer la proteïna SLIMP també processada, es va generar l'anticòs anti-SLIMP, escollint un pèptid intern (NH₂-₈₈VAEERERVTKRL₉₉-COOH) de la proteïna. Els pèptids sintètics, les IgY o IgG totals purificades i els sèrums preimmunes de pollastre o conill van ser proporcionats per Innovagen AB.

3.6.7 Purificació d'anticossos per afinitat

Els pèptids sintètics, proporcionats per Innovagen AB, tenen un residu Cys (cisteïna; C) a un dels seus extrems, els grups sulfhidril del qual poden unir-se covalentment als grups iodoacetil del gel SulfoLink® (Pierce) formant enllaços tioèter. Es dissolen 2mg de pèptid en 2,5mL de tampó d'unió 1x (Tris-HCl pH 8,5 50mM i EDTA 5mM), es carreguen en una columna amb SulfoLink®, prèviament equilibrada amb 10mL de tampó d'unió 1x, i s'incuben a 4°C en rotació o/n. Les restes de pèptid no unides al gel es renten amb 10mL de tampó d'unió 1x i es bloquen els grups iodoacetil lliures amb 2mL de solució de blocatge (Cys 50mM en tampó d'unió 1x) durant 30min a 4°C en rotació. La columna es renta dues vegades amb 10mL de NaCl 1M i s'equilibra amb 10mL de TBS 1x (1x *tris buffered saline*; tampó tris salí: Tris-base pH 7,6 50mM i NaCl 137mM) per iniciar la purificació per afinitat.

Es dilueixen 3mL de sèrum o 20mg d'IgG o IgY totals 1:1 en TBS 1x, es carreguen a la columna i s'incuben durant 4h a RT en rotació. Els anticossos que no s'han unit al pèptid es renten amb 20mL de PBS 1x i 5mL de PBS 0,1x. L'anticòs, finalment, s'elueix amb 360µL de tampó d'elució (glicina pH 2,5 100mM i BSA 100µg/mL) i, immediatament, es neutralitza amb 40µL de tampó de neutralització 10x (Tris-base pH 8,5 1M i NaCl 2M). La columna amb el gel SulfoLink® unit al pèptid sintètic es renta amb 8mL de NaCl 1M i es desa en tampó d'emmagatzematge (NaN₃ 0,02% (w/v) en PBS 1x) per tal de ser reutilitzada en un futur.

3.6.8 Immunodetecció de proteïnes

La immunodetecció de proteïnes o *western blot* és una tècnica analítica de detecció de proteïnes d'una mostra o extracte proteic, en la qual s'utilitzen anticossos que les reconeixen específicament.

En primer lloc, cal separar les proteïnes per mitjà de SDS-PAGE 10% (vegeu l'apartat 3.6.5) i transferir-les a una membrana de PVDF, tot emprant una cambra de transferència Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) durant 75min a 250mA a RT en tampó de transferència fred (Tris-HCl 10mM pH 8,3, glicina 150mM, metanol 20% (v/v) i SDS 0,01% (w/v)). La membrana es bloca amb solució de blocatge (llet en pols descremada 5% (w/v) en TBS-T (TBS-Tween: Tris-HCl 10mM pH 7,4, NaCl 140mM i Tween-20 0,1%)) a 4°C o/n en agitació. La membrana s'incuba amb l'anticòs primari diluït (consulteu la taula 3.16) en solució de blocatge durant 2h a RT en rotació. Es realitzen 3 rentats de 10min en TBS-T a RT en agitació i s'incuba la membrana amb l'anticòs secundari conjugat amb HRP, diluït en solució de blocatge (vegeu la taula 3.17) durant 1h a RT en rotació. La membrana es renta 3 vegades amb TBS-T durant 10min a RT en agitació i es col·loca en una casset de revelat entre dues capes de plàstic transparent. La detecció de l'anticòs té lloc en afegir el reactiu ECL™ Advance (Amersham) damunt la membrana i el senyal és retingut en un film de rajos X. Es realitzen diferents temps d'exposició segons l'anticòs emprat. Els films són revelats en un aparell Hyperprocessor™ Automatic Film Processor (Amersham).

3.7 ASSAIGS CINÈTICS I D'UNIÓ A SUBSTRAT

3.7.1 Assaig d'aminoacilació

L'assaig d'aminoacilació permet mesurar la capacitat de les aminoacil-ARNt sintetases per incorporar aminoàcids marcats radioactivament a molècules d'ARNt (Mans i Novelli, 1961).

Prèviament l'ARNt transcrit *in vitro* s'ha de plegar correctament i, per això, en un tub de microcentrífuga d'1,5mL, es prepara una barreja de volum final 12,5µL que conté Tris-HCl pH 7,6 100mM, MgCl₂ 50mM, KCl 40mM i ARNt 8µM i s'escalfa a 85°C en un bany d'aigua que seguidament es deixa refredar progressivament durant 2h.

Els assaigs enzimàtics es realitzen a 25°C en tubs de microcentrífuga d'1,5mL que contenen un volum final de 25µL per a cada punt en el temps que es vol determinar, amb 12,5µL de mescla d'ARNt, DTT 1mM, ATP 1mM, BSA 0,1mg/mL, L-[³H]serina 10µM 500Ci/mol (GE Healthcare), proteïna pura 0,5µM (*DmSRS1* o Δ Nt-SLIMP) i fins a 25µL d'aigua Milli-Q. Un cop s'ha afegit l'enzim al tub, es van recollint mostres de 22µL en discs de paper de filtre Whatman®, prèviament submergits en TCA (*trichloroacetic acid*; àcid tricloroacètic) 5% (w/v) i assecats. El TCA extingeix la reacció i precipita l'ARNt aminoacilat, que queda retingut en el filtre. Els discs es renten 3 cops en 200mL de TCA 5% (w/v) durant 10min en agitació, un cop en etanol 100% (v/v) i es deixen assecar. S'introdueixen els discs en vials de centelleig de 6mL amb 4mL de

líquid de centelleig i es mesura el senyal en un comptador de centelleig Tri-Carb 2900TR (Packard Bioscience Company).

3.7.2 Assaig d'intercanvi de pirofosfat

L'assaig d'intercanvi de pirofosfat (PPi) s'utilitza per mesurar la capacitat de les aminoacil-ARNt sintetases per activar aminoàcids. La tècnica detecta l'activitat del domini catalític de l'enzim en el primer pas de la reacció d'aminoacilació (vegeu l'apartat 1.2.1) tot mesurant la velocitat d'intercanvi de PPi a ATP (Calendar i Berg, 1966) i que, per tant, no requereix la participació de l'ARNt.

Els assaigs d'intercanvi de pirofosfat es realitzen a 25°C en tubs de microcentrífuga d'1,5mL que contenen 25µL de reacció per cada punt en el temps que es vol analitzar. Cada reacció de 25µL inclou HEPES pH 7,6 50mM, MgCl₂ 20mM, DTT 1mM, ATP 2mM, aa 5mM, [³²P]Na-PPi 2mM 2MBq/µmol (Perkin Elmer), *DmSRS1* o Δ Nt-SLIMP 0,2µM i fins a 25µL d'aigua Milli-Q. Un cop s'ha afegit l'enzim a la reacció, es recullen 22µL per cada punt en el temps en un tub de polipropilè de 10mL que conté 250µL de solució d'extinció (àcid perclòric 3,5% (w/v), carbó actiu 3% (w/v) i NaPPi (pirofosfat sòdic tetrabàsic) 100mM) i es filtra en discs de paper Whatman®, fent ús d'un sistema de filtrat 10-place filtration manifold system (Hoefer). El [³²P]ATP queda retingut al carbó actiu i, per tant, fixat al paper de filtre. Es realitza un rentat amb 5mL de solució de rentat (àcid perclòric 1,4% (w/v) i NaPPi 40mM), 2 rentats amb 5mL d'aigua Milli-Q i un rentat amb 5mL d'etanol 100% (w/v) mitjançant el sistema de filtrat. S'introdueixen els discs de paper en vials de centelleig de 6mL on es deixen assecar, s'hi afegeixen 4mL de líquid de centelleig i es mesura el senyal en un comptador de centelleig Tri-Carb 2900TR (Packard Bioscience Company).

3.7.3 Assaig d'unió a ATP

El protocol de l'assaig d'unió a ATP per entrecreuament amb llum UV és una adaptació de la tècnica descrita per Ludlam et al. (Ludlam et al., 2001). Cada reacció de 20µL es prepara en un tub de microcentrífuga d'1,5mL amb HEPES-KOH pH 7,6 25mM, EDTA 0,1mM, DTT 2mM, glicerol 15% (v/v), NaCl 50mM, MgCl₂ 10mM, [α -³²P]ATP 150nM 5µCi (Perkin Elmer), proteïna pura *DmSRS1*, Δ Nt-SLIMP o BSA (com a control negatiu) 2,4µM o bé extracte proteic d'*E. coli* (com a control positiu) i fins a 20µL d'aigua Milli-Q. Per augmentar l'afinitat de la seril-ARNt sintetasa per l'ATP es preparen reaccions que continguin també L-serina 5mM. Per efectuar assaigs de competició per determinar l'especificitat de la unió amb l'ATP, les mateixes reaccions es realitzen amb un excés d'ATP no radioactiu a 0,2mM. Les reaccions s'incuben a 30°C durant 1min i, immediatament, es traslladen a un bloc d'alumini damunt de gel cobert amb Parafilm. Les reaccions s'exposen durant 15min a llum UV de $\lambda=254\text{nm}$ per tal de fixar els enllaços de la proteïna amb l'ATP radioactiu. Es recuperen les mostres en tampó de càrrega PLB 2x, se sotmeten a SDS-PAGE, el gel es tenyeix amb blau de Coomassie i s'asseca (consulteu l'apartat

3.6.5). Posteriorment, es col·loca el gel dins una casset cobert amb una pantalla d'emmagatzematge de fòsfor (Molecular Dynamics) durant 3h i es digitalitza el senyal de la pantalla en un escàner Typhoon™ 8600 PhosphorImager (GE Healthcare).

3.7.4 Assaig de mobilitat electroforètica

L'assaig de mobilitat electroforètica (EMSA) permet determinar si existeix interacció entre proteïnes i àcids nucleics per mitjà l'electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions natives. En aquest treball s'ha utilitzat aquesta tècnica per determinar si existeix unió entre la proteïna Δ Nt-SLIMP i diferents *Dm*ARNt.

3.7.4.1 Marcatge radioactiu de l'ARNt

Els ARNt transcrits *in vitro* (consulteu l'apartat 3.5.1) *Dm*ARNt^{Ser} (GCU) citoplasmàtic, *Dm*ARNt^{Arg} (UCU) citoplasmàtic, *Dm*ARNt^{Ser} (GCU) i *Dm*ARNt^{Ser} (UGA) mitocondrials són desfosforilats individualment per tal de ser posteriorment marcats radioactivament a l'extrem 5' mitjançant fosforilació amb $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Cada reacció de desfosforilació conté ARNt 8 μM , tampó NEB3 1x (New England Biolabs), formamida 7% (v/v) i fins a 48 μL d'aigua. S'escalfa 2min a 80°C per desnaturalitzar l'ARNt i es col·loca a 4°C. S'hi afegeix 1 μL de CIP (*calf intestinal alkaline phosphatase*; fosfatasa alcalina d'intestí de vedella) (New England Biolabs) i s'incuba durant 15min a 37°C i, seguidament, s'hi afegeix 1 μL addicional de CIP i s'incuba de nou durant 15min a 37°C. S'hi afegeixen 200 μL d'aigua Milli-Q, es purifica l'ARNt per mitjà de dues extraccions consecutives amb fenol-cloroform i precipitació amb etanol (vegeu els apartats 3.4.4 i 3.4.5). El pellet d'ARNt es resuspèn en 50 μL d'aigua Milli-Q i se'n determina la concentració (vegeu l'apartat 3.4.11).

Es prepara la barreja pel marcatge radioactiu en un tub de microcentrífuga d'1,5mL amb 15-30ng/ μL d'ARNt desfosforilat, tampó de fosforilació T4PNK 1x, $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ (Perkin Elmer, 3.000Ci/mmol), T4PNK (Takara) 0,2U/ μL i fins a 50 μL d'aigua Milli-Q. S'incuba la reacció a 37°C durant 30min, s'inactiva l'enzim a 65°C durant 10min, es purifica l'ARNt marcat amb ^{32}P amb una columna Sephadex™ G50 (GE Healthcare) seguint les instruccions del fabricant, i s'elueix l'ARNt en 50 μL d'aigua Milli-Q. Es mesura la incorporació del ^{32}P a l'extrem 5' de l'ARNt mitjançant el càlcul de les cpm/ μL , tot barrejant 1 μL d'ARNt marcat amb 2mL de líquid de centelleig en un vial de 6mL i es quantifica el senyal en un comptador de centelleig Tri-Carb 2900TR (Packard Bioscience Company).

3.7.4.2 EMSA

Cada ARNt marcat (25.000cpm) s'incuba en un tub de microcentrífuga d'1,5mL amb tampó Tris pH 7 75mM, MgCl_2 15mM, KCl 15mM, DTT 0,5mM, glicerol 10% (v/v), oligo(dT)₂₅ 20ng/ μL , proteïna pura Δ Nt-SLIMP 5 μM i fins a 20 μL de tampó de diàlisi (Tris-HCl pH 7,6 50mM i NaCl 200mM), 20min a 4°C. Els assaigs de competició amb ARNt no radioactius de *D. melanogaster* es

realitzen afegint-hi 10x més (en concentració molar) de cada $DmARNt^{Ser/Arg}$ no radioactiu que de $DmARNt^{Ser/Arg}$ marcat radioactivament. L'assaig de competició amb ARNt heteròleg es realitza afegint-hi 10x més (en concentració molar) d' $ARNt^{Lys}$ d'*E. coli* (Sigma) no radioactiu que de $DmARNt^{Ser/Arg}$ marcat radioactivament.

Les reaccions es carreguen en un gel de poliàcrilamida natiu que conté acrilamida:bisacrilamida 19:1 6% (w/v), tampó TBE 0,5x, APS 0,1% (w/v) i TEMED 0,1% (w/v) i es fan córrer durant 3h a 150V a RT. El gel s'asseca en un assecador de gels (Savant) durant 90min a 80°C i es col·loca en una casset cobert d'una pantalla d'emmagatzematge de fòsfor (Molecular Dynamics) que queda exposada al senyal radioactiu durant 35min. El senyal de la pantalla es digitalitza amb l'aparell Typhoon™ 8600 PhosphorImager i es quantifica mitjançant el programa ImageJ (Abramoff et al., 2004).

El nivell d'afinitat de la proteïna per cada $DmARNt^{Ser/Arg}$ es representa com a $\Delta I DmARNt^{Ser/Arg} / \Delta I EcARNt^{Lys}$, on ΔI significa diferència d'intensitat. La $\Delta I DmARNt^{Ser/Arg}$ és [la intensitat de senyal de la reacció que conté $DmARNt^{Ser/Arg}$ radioactiu - la intensitat de senyal afegint-hi 10x $DmARNt^{Ser/Arg}$ no radioactiu] i la $\Delta I EcARNt^{Lys}$ és [la intensitat de senyal de la reacció que conté $DmARNt^{Ser/Arg}$ radioactiu - la intensitat de senyal afegint-hi 10x $EcARNt^{Lys}$ no radioactiu]. Si la ràtio $\Delta I DmARNt^{Ser/Arg} / \Delta I EcARNt^{Lys} \sim 1$, es considera que l'afinitat de la proteïna per l'ARNt és baixa i si és >1 , l'afinitat és major com més elevat sigui el valor de la ràtio.

3.8 TÈCNiques DE CULTIU CEL·LULAR S2

3.8.1 Manteniment de cèl·lules S2 i S2R+

Les cèl·lules es mantenen a 25°C sense necessitat de diòxid de carboni en flascons de 25cm². S'efectuen dilucions 1:5 cada 4 dies en medi de cultiu Schneider complet (Schneider's *Drosophila* medium (Lonza), suplementat amb FBS (*fetal bovine serum*; sèrum boví fetal) 10% (v/v) (Gibco) i L-Gln (glutamina; Q) 2mM (Invitrogen)). El medi de creixement de les cèl·lules transfectades amb vectors que confereixen resistència a puromicina ha de ser suplementat amb 5µg/mL de puromicina. La manipulació dels cultius cel·lulars es realitza sempre en condicions d'esterilitat.

3.8.2 Congelació i descongelació d'estocs de cèl·lules S2 i S2R+

Per generar estocs, es centrifuguen 5mL de cèl·lules confluents a 400g durant 5min, el pellet es resuspèn en 1mL de solució de congelació (FBS:DMSO (dimetil sulfòxid) 9:1) i es transfereix a un CryoTube (Nunc). Es mantenen els estocs 2h a -20°C, o/n a -80°C i es conserven definitivament en nitrogen líquid.

La descongelació d'estocs en nitrogen líquid es realitza escalfant el tub ràpidament amb les mans. Amb una pipeta Pasteur es transfereixen les cèl·lules en un tub de 15mL (Nunc) i s'hi afegeixen 5mL de medi Schneider. Es centrifuga el tub a 400g durant 2min i s'elimina el

sobrenedant. Es renten les cèl·lules amb 5mL de medi Schneider complet i es repeteix la centrifugació. Es resuspèn el pellet de cèl·lules amb 5mL de medi Schneider complet i es transfereixen en un flascó de 25cm².

3.8.3 Fraccionament cel·lular de cultius S2

El protocol de fraccionament cel·lular és una adaptació del procediment publicat per Yang et al. (Yang et al., 1997).

Es recuperen 5mL de cèl·lules S2 confluents en un tub de 15mL (Nunc), es centrifuguen a 400g durant 5min, s'elimina el sobrenedant i s'estima el volum que ocupa el pellet (uns 40µL). Es resuspenen les cèl·lules en 10 volums de tampó de lisi (HEPES-KOH pH 7,5 20mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, EDTA 1mM, EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*; àcid etilen glicol tetraacètic) 1mM, sacarosa 250mM, DTT 1mM, que s'afegeix en l'últim moment, i PMSF 1mM, que s'afegeix en l'últim moment). S'incuba el tub a 4°C durant 5' i es lisen les cèl·lules a 4°C per mitjà de 200 cops de morter en un homogeneïtzador de vidre de 2mL. El lisat es centrifuga dues vegades a 740g durant 10min a 4°C. El pellet correspon a cèl·lules senceres i nuclis, i el sobrenedant es centrifuga de nou a 10.000g durant 15min a 4°C. Se separa el sobrenedant que correspon a la fracció citoplasmàtica i el pellet que correspon a la fracció mitocondrial.

La detecció específica de proteïnes en les fraccions obtingudes es realitza per immunodetecció (vegeu l'apartat 3.6.8). Com a control s'utilitza un anticòs que reconeix la proteïna mitocondrial β-ATPasa (vegeu la taula 3.16) per garantir l'enriquiment en mitocondris de la fracció mitocondrial.

3.8.4 Transfecció estable de cèl·lules S2 i inducció de l'expressió per CuSO₄

Es dilueixen 1-2mL de cèl·lules S2 confluents en un volum final de 10mL de medi Schneider complet (Schneider's *Drosophila* medium (Lonza), suplementat amb FBS 10% (v/v) (Gibco) i L-Gln 2mM (Invitrogen)) en una placa de cultiu (Nunc). S'incuba la placa durant un mínim de 30min a RT. Es preparen les barreges de transfecció en tubs de 5mL (Falcon) en el següent ordre: 450µL d'aigua Milli-Q estèril, 500ng del vector pHSP70PL amb la casset que confereix resistència a la puromicina i 30µg de la construcció pTGR-42 o pTGR-55 (detallades a la taula 3.4). S'afegeixen 50µL de CaCl₂ pH 7,08 2,5M gota a gota dins el tub amb la mescla d'ADN tot sacsejant amb el vòrtex i s'incuba a 37°C durant 15min. Es prepara un altre tub de 5mL amb 500µL de tampó HBS 2x (2x *HEPES buffered saline*; tampó HEPES salí: HEPES 50mM, Na₂HPO₄ 1,5mM, NaCl 280mM, pH 7,1) i s'incuba 15min a 37°C.

S'afegeix la barreja d'ADN i CaCl₂ gota a gota dins el tub amb HBS 2x, mentre s'agita amb el vòrtex, i s'incuba la solució a 37°C durant 30min. Es comprova, a través del microscopi, que la densitat cel·lular sigui aproximadament un 10% de la placa. Es distribueix la barreja d'ADN-CaCl₂-HBS gota a gota damunt la placa de cèl·lules i s'incuba a 25°C durant 48h. Es centrifuguen les cèl·lules a 400g durant 5min a RT i es renten dues vegades amb 10mL de PBS 1x estèril.

Finalment, es resuspèn el pellet de cèl·lules en 10mL de medi Schneider complet amb 5µg/mL de puromicina i es transfereixen a un flascó de 75cm². Se seleccionen les cèl·lules transfectades mantenint sempre el cultiu en medi Schneider complet amb puromicina en flascons de 25cm².

Els cultius de cèl·lules S2 transfectats de forma estable amb les construccions pTGR-42 i pTGR-55 es dilueixen 1:5 en un nou flascó de 25cm² en medi Insect-XPRESS (Lonza) i es deixen créixer durant 2-3 dies. Quan les cèl·lules estan en fase logarítmica, s'indueix l'expressió de les proteïnes afegint CuSO₄·5H₂O 625µM al cultiu i incubant-les durant 3 dies a 25°C.

3.8.5 Transfecció transitòria de cèl·lules S2R+

Es dilueixen 2,5-3x10⁶ cèl·lules en 5mL de medi Schneider complet en una placa de cultiu de 60x15mm (BD Falcon). S'incuba la placa de 6 a 24h a 25°C. Es preparen les barreges de transfecció en tubs de microcentrífuga d'1,5mL estèrils: 2-7µg de les construccions pTGR-73 o 75 (detallades a la taula 3.6), 3µg del vector pActPPA que expressa GAL4 sota el control del promotor d'actina (cedit pel Dr. Jordi Bernués (IBMB-CSIC/IRB)), 15µg de vector pUC19 i fins a 125µL d'aigua Milli-Q. S'afegeix 1mL de CaCl₂ pH 7,08 0,5M dins el tub amb la mescla d'ADN. Es prepara un tub de 15mL (Falcon) amb 1mL de tampó HBS 2x.

S'afegeix la barreja d'ADN i CaCl₂, gota a gota, dins el tub amb HBS 2x, mentre s'agita amb el vòrtex, i s'incuba la solució a 25°C durant 35min. Es distribueixen 850µL de la barreja d'ADN-CaCl₂-HBS, gota a gota, damunt la placa de cèl·lules i s'incuba a 25°C durant 48h.

3.8.6 Immunofluorescència de cultius S2 i S2R+

Es preparen els cobreobjectes per a la immunofluorescència tot rentant-los amb etanol 100% i cobrint-los amb una capa de 20-30µL de concanavalina A 0,5mg/mL (Sigma) que es deixa assecar durant 15min a RT.

Si s'usen cèl·lules S2R+, cal resuspendre les cèl·lules adherides amb una rasqueta (*scraper*), en canvi, si es fa ús de cèl·lules S2 no és necessari. Es recullen els cultius en un tub de 15mL (Nunc), es centrifuguen a 200g durant 5min, s'elimina el sobrenedant i es renten les cèl·lules dues vegades amb PBS 1x estèril. Finalment es resuspèn el pellet de cèl·lules amb 1mL de PBS 1x estèril i s'inoculen 100µL de cèl·lules en 1mL de medi Schneider amb L-Gln 2mM per les cèl·lules S2R+ o en 1mL de medi Insect-XPRESS amb CuSO₄·5H₂O 625µM per les cèl·lules S2 sotmeses a inducció per CuSO₄. Es transfereix cada cultiu a un pouet de 2cm de diàmetre d'una placa de 12 pouets (Nunc) amb els cobreobjectes tractats amb concanavalina A al fons i es deixen adherir les cèl·lules durant 2-6h. Es comprova si les cèl·lules s'han adherit al cobreobjectes tot observant la placa al microscopi i a cada cultiu s'hi afegeix 200nM de MitoTracker[®] Red CMXRos (Invitrogen) durant 30min en condicions de foscor.

Tots els rentats i incubacions posteriors es realitzen a la placa de 12 pouets, en agitació a RT, i es preserven les mostres de la llum.

S'elimina el medi dels pouets i es renten els cobreobjectes amb 1mL de PBS 1x 10min. Es fixen les cèl·lules amb 300µL de paraformaldehid 4% diluït en PBS 1x durant 15min i, seguidament, s'efectua un rentat amb 1mL de PBS 1x de 15min i dos rentats de 10min amb la solució PBS-Triton-BSA (PBS 1x, Triton X-100 0,1% (v/v) i BSA Fracció V (lliure en àcids grassos, Roche) 0,1% (w/v)). S'incuben les cèl·lules amb 200-300µL d'anticòs primari diluït en PBS-Triton-BSA durant 1h i es fan 3 rentats de 10min amb 1mL de PBS-Triton-BSA. S'incuben les cèl·lules amb 300µL d'anticòs secundari diluït 1:400 en PBS-Triton-BSA 1h i es fan 2 rentats amb 1mL de PBS-Triton-BSA i 2 rentats amb PBS 1x, de 10min cadascun. S'incuben les cèl·lules amb 300µL de DAPI 0,04ng/µL diluït en PBS 1x durant 15min, seguit de 2 rentats amb PBS 1x de 10min i es munten els cobreobjectes en un portaobjectes amb 5µL de Mowiol 4-88 (Merck). Les preparacions són observades en un microscopi confocal SPE (Leica).

3.9 PROTOCOLS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

3.9.1 Manteniment de *D. melanogaster*

En tots els casos, els animals es fan créixer en tubs amb aliment, en un 60% d'humitat relativa i cicles de 12h de llum/foscor. Els estocs de *D. melanogaster* es mantenen a 18°C en tubs petits, els estocs en expansió es mantenen a 25°C i els encreuaments es fan créixer en tubs petits a 25°C o 29°C, segons l'experiment. En els experiments amb molècules antioxidants, l'aliment és suplementat amb la barreja K-PAX Immune Support Formula Capsules (proporcionada pel Dr. Jon D. Kaiser, K-PAX Inc.) a una concentració final de 6,9mg/mL i els encreuaments es mantenen, en aquest cas, a 25°C.

3.9.2 Generació de soques transgèniques UAS

Les soques transgèniques són generades per integració d'element P (Rubin i Spradling, 1982). S'injecten embrions de la soca w^{1118} (consulteu la taula 3.24) amb les construccions ARNi pTGR-65 i pTGR-66 (vegeu la taula 3.5), que contenen els transgens per silenciar *DmSRS2* i SLIMP respectivament, precedides per elements UAS, o bé amb les construccions de sobreexpressió de proteïnes pTGR-73 i pTGR-75 (vegeu la taula 3.6), que contenen els transgens per sobreexpressar les proteïnes *DmSRS2_m* i SARS2; juntament amb el vector *helper* pΔ2-3 que inclou la transposasa que permet la integració del transgèn a les cèl·lules de la línia germinal de l'embrió (injeccions dutes a terme per Ainoa Olza del *Drosophila* Injection Service de l'IRB). Totes les mosques adultes que apareixen (que hauran integrat o no el transgèn a la seva línia germinal) són encreuades individualment amb mosques w^{1118} . De la descendència d'aquests encreuaments, se seleccionen els adults que presenten ulls vermells (*white*⁺) i, per tant, han integrat el transgèn i el presenten a la línia somàtica.

La integració del transgèn pot haver tingut lloc en diferents *loci* d'un mateix cromosoma o en diferents cromosomes, per això cada mosca transgènica donarà lloc a una línia transgènica

diferent. Per tal d'evitar la pèrdua del transgèn per recombinació, s'encreuen les diferents mosques transgèniques individualment amb la soca doble balancejadora (vegeu la taula 3.24 i el subapartat 3.3.4.1).

Un cop balancejades les soques, per cadascuna d'elles es generen estocs per encreuament de la progènie i es determina el cromosoma en el qual s'ha inserit el transgèn encreuant cada soca doble balancejada amb mosques w^{1118} , i observant la cosegregació del gen *white*⁺ amb determinats marcadors a la descendència.

Per tal d'amplificar l'efecte del silenciament en les soques transgèniques ARNi, posteriorment, es generen estocs que, a part del transgèn UAS-ARNi, contenen una còpia extra del gen *dicer-2* de *D. melanogaster*, també, sota el control de seqüències UAS. Aquestes línies s'han obtingut per mitjà d'encreuaments múltiples amb soques UAS-*dicer-2* (consulteu la taula 3.24).

3.9.3 Encreuaments UAS-GAL4

El sistema UAS-GAL4 és l'eina emprada en aquest treball per a l'activació de l'expressió dels transgens en *D. melanogaster* (vegeu l'apartat introductor 1.4.3).

Els encreuaments es realitzen amb 5-15 individus, utilitzant femelles verges. Es mantenen els encreuaments a 25°C o 29°C, segons l'experiment, i es canvien a tubs d'aliment nous cada 3-4 dies.

3.9.3.1 Inducció constitutiva i ubiqua de l'expressió

Per tal d'induir l'expressió dels transgens ARNi d'una manera ubiqua i constitutiva a la progènie, es realitzen els encreuaments detallats a la figura 3.1. Es preparen diferents tipus d'encreuaments depenent de la soca utilitzada: per a les soques ARNi_{DmSRS2 estoc 1}, ARNi_{DmSRS2 estoc 23003} i ARNi_{SLIMP estoc 33774} es realitzen encreuaments de tipus 1, per a la soca ARNi_{SLIMP estoc 8} s'efectua l'encreuament de tipus 2, per a la soca ARNi_{DmSRS2 estoc 1-dcr2} es realitza l'encreuament de tipus 3 i per a la soca ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} es prepara l'encreuament de tipus 4. Per als estudis de viabilitat es mantenen els creuaments a 25°C o 29°C, es compta la descendència fins a una n >150 i les diferències en els nivells de viabilitat adulta en els diversos experiments es comproven amb el test estadístic χ^2 . Per als experiments amb antioxidants, els encreuaments es mantenen a 25°C. Per analitzar a nivell molecular, tissular i funcional l'efecte del silenciament de *DmSRS2* o *SLIMP*, s'utilitzen larves de tercer estadi que emergeixen dels encreuaments esmentats que no presenten el marcador *Tubby* (Tb) i que, per tant, posseeixen el transgèn actina 5C-GAL4. Aquests encreuaments es realitzen a 25°C o 29°C, segons l'experiment, per tots els estocs, excepte els encreuaments amb la soca ARNi_{DmSRS2 estoc 23003} que sempre es realitzen a 25°C, atès que a 29°C la viabilitat es veu compromesa ja en el segon estadi de larva.

Per a la inducció de l'expressió dels transgens *DmSRS2_m* i *SARS2* de forma constitutiva i ubiqua, s'encreuen les soques provisionals *DmSRS2_m estoc 30.5* i *SARS2 estoc 82.3* (vegeu el subapartat 3.3.4.3) amb la soca actina 5C-GAL4 a 25°C.

	Transgèn UAS-ARNi al cromosoma II	Transgèn UAS-ARNi al cromosoma III
Sense UAS- <i>dcr2</i>	$\begin{array}{l} \text{♂ } w; \frac{\text{UAS-ARNi}; +}{\text{UAS-ARNi}; +} \times \text{♀ } yw; \frac{+}{+}; \frac{\text{act5C-GAL4}}{\text{TM6B}} \\ \downarrow \\ w/yw; \frac{\text{UAS-ARNi}}{+}; \frac{\text{act5C-GAL4}}{+} \text{ ON} \\ \textcircled{1} \quad w/yw; \frac{\text{UAS-ARNi}}{+}; \frac{+}{\text{TM6B}} \text{ OFF} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{♂ } w; \frac{+}{+}; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{UAS-ARNi}} \times \text{♀ } yw; \frac{+}{+}; \frac{\text{act5C-GAL4}}{\text{TM6B}} \\ \downarrow \\ w/yw; \frac{+}{+}; \frac{\text{act5C-GAL4}}{\text{UAS-ARNi}} \text{ ON} \\ \textcircled{2} \quad w/yw; \frac{+}{+}; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{TM6B}} \text{ OFF} \end{array}$
Amb UAS- <i>dcr2</i>	$\begin{array}{l} \text{♂ } w; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{UAS-ARNi}}; \frac{\text{UAS-dcr2}}{\text{UAS-dcr2}} \times \text{♀ } yw; \frac{+}{+}; \frac{\text{act5C-GAL4}}{\text{TM6B}} \\ \downarrow \\ w/yw; \frac{\text{UAS-ARNi}}{+}; \frac{\text{act5C-GAL4}}{\text{UAS-dcr2}} \text{ ON} \\ \textcircled{3} \quad w/yw; \frac{\text{UAS-ARNi}}{+}; \frac{\text{UAS-dcr2}}{\text{TM6B}} \text{ OFF} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{♂ } w; \frac{\text{UAS-dcr2}}{\text{UAS-dcr2}}; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{UAS-ARNi}} \times \text{♀ } yw; \frac{+}{+}; \frac{\text{act5C-GAL4}}{\text{TM6B}} \\ \downarrow \\ w/yw; \frac{\text{UAS-dcr2}}{+}; \frac{\text{act5C-GAL4}}{\text{UAS-ARNi}} \text{ ON} \\ \textcircled{4} \quad w/yw; \frac{\text{UAS-dcr2}}{+}; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{TM6B}} \text{ OFF} \end{array}$

Figura 3.1. Encreuaments amb la soca actina 5C-GAL4. Per tal d'induir el silenciament de l'expressió de forma constitutiva i ubiqua, s'encreuen les soques UAS-ARNi amb la soca actina 5C-GAL4. Es realitzen quatre tipus d'encreuaments segons la localització cromosòmica dels transgens ARNi i de la presència del transgèn UAS-*dcr2*.

3.9.3.2 Inducció de l'expressió específica d'ala

Per expressar l'ARNi en teixits d'ala, s'empren dues soques GAL4 amb promotors d'expressió restringida a l'ala (detallades a la taula 3.24).

	Transgèn UAS-ARNi al cromosoma II	Transgèn UAS-ARNi al cromosoma III
Sense UAS- <i>dcr2</i>	$\begin{array}{l} \text{♂ } yw; \frac{\text{nub-GAL4}; \text{UAS-dcr2}}{\text{CyO} \wedge \text{TM6B}} \times \text{♀ } w; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{UAS-ARNi}}; \frac{+}{+} \\ \downarrow \\ w/yw; \frac{\text{nub-GAL4}}{\text{UAS-ARNi}}; \frac{\text{UAS-dcr2}}{+} \text{ ON} \\ \textcircled{1} \quad w/yw; \frac{\text{UAS-ARNi}; +}{\text{CyO} \wedge \text{TM6B}} \text{ OFF} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{♂ } yw; \frac{\text{nub-GAL4}; \text{UAS-dcr2}}{\text{CyO} \wedge \text{TM6B}} \times \text{♀ } w; \frac{+}{+}; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{UAS-ARNi}} \\ \downarrow \\ w/yw; \frac{\text{nub-GAL4}}{+}; \frac{\text{UAS-dcr2}}{\text{UAS-ARNi}} \text{ ON} \\ \textcircled{2} \quad w/yw; \frac{+; \text{UAS-ARNi}}{\text{CyO} \wedge \text{TM6B}} \text{ OFF} \end{array}$

Figura 3.2. Encreuaments amb la soca nubbin-GAL4-UAS-*dcr2*. S'indueix l'ARNi de manera restringida a l'ala per encreuament de les soques UAS-ARNi amb la soca nubbin-GAL4-UAS-*dicer-2*. Es realitzen dos tipus d'encreuaments diferents segons la posició cromosòmica dels transgens ARNi.

Els encreuaments de les soques ARNi amb la soca nubbin-GAL4-UAS-*dcr2* permeten la inducció localitzada de l'ARNi des del segon estadi de larva a la regió del disc imaginal d'ala que donarà lloc a l'ala adulta (Ng et al., 1995; Ng et al., 1996). Per a les soques ARNi_{DmSRS2} estoc 1, ARNi_{DmSRS2} estoc 23003 i ARNi_{SLIMP} estoc 33774 es realitzen encreuaments de tipus 1 i per a la soca ARNi_{SLIMP} estoc 8 s'efectua l'encreuament de tipus 2 (vegeu la figura 3.2).

Per restringir l'expressió de l'ARNi a la zona limitada entre les venes longitudinals L3 i L4 de l'ala adulta, es realitzen encreuaments de les soques ARNi amb la soca patched-GAL4, que expressa GAL4 des d'estadis embrionaris, i posteriorment es restringeix a la línia anteroposterior dels discs imaginals des de l'estadi de larva (Hooper i Scott, 1989; Phillips et al., 1990).

Es preparen diferents tipus d'encreuaments depenent de la soca ARNi utilitzada (consulteu la figura 3.3): per a les soques ARNi_{DmSRS2^{estoc 1}}, ARNi_{DmSRS2^{estoc 23003}} i ARNi_{SLIMP^{estoc 33774}} s'efectuen encreuaments de tipus 1, per a la soca ARNi_{SLIMP^{estoc 8}} s'efectua l'encreuament de tipus 2, per a la soca ARNi_{DmSRS2^{estoc 1-dcr2}} s'efectua l'encreuament de tipus 3 i per a la soca ARNi_{SLIMP^{estoc 8-dcr2}} es prepara l'encreuament de tipus 4.

	Transgèn UAS-ARNi al cromosoma II	Transgèn UAS-ARNi al cromosoma III
Sense UAS- <i>dcr2</i>	$\begin{array}{c} \text{♂ } w; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{UAS-ARNi}}; \frac{+}{+} \times \text{♀ } w; \frac{\text{ptc-GAL4}}{\text{ptc-GAL4}}; \frac{+}{+} \\ \downarrow \\ \text{① } w/yw; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{ptc-GAL4}}; \frac{+}{+} \text{ ON} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{♂ } w; \frac{+}{+}; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{UAS-ARNi}} \times \text{♀ } w; \frac{\text{ptc-GAL4}}{\text{ptc-GAL4}}; \frac{+}{+} \\ \downarrow \\ \text{② } w/yw; \frac{+}{\text{ptc-GAL4}}; \frac{\text{UAS-ARNi}}{+} \text{ ON} \end{array}$
Amb UAS- <i>dcr2</i>	$\begin{array}{c} \text{♂ } w; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{UAS-ARNi}}; \frac{\text{UAS-dcr2}}{\text{UAS-dcr2}} \times \text{♀ } w; \frac{\text{ptc-GAL4}}{\text{ptc-GAL4}}; \frac{+}{+} \\ \downarrow \\ \text{③ } w/yw; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{ptc-GAL4}}; \frac{\text{UAS-dcr2}}{+} \text{ ON} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{♂ } w; \frac{\text{UAS-dcr2}}{\text{UAS-dcr2}^+}; \frac{\text{UAS-ARNi}}{\text{UAS-ARNi}} \times \text{♀ } w; \frac{\text{ptc-GAL4}}{\text{ptc-GAL4}}; \frac{+}{+} \\ \downarrow \\ \text{④ } w/yw; \frac{\text{UAS-dcr2}}{\text{ptc-GAL4}}; \frac{\text{UAS-ARNi}}{+} \text{ ON} \end{array}$

Figura 3.3. Encreuaments amb la soca patched-GAL4. Per induir el silenciament a la regió entre les venes longitudinals L3-L4 de l'ala, s'encreuen les soques UAS-ARNi amb la soca patched-GAL4. Es realitzen quatre tipus d'encreuaments segons la localització cromosòmica dels transgens ARNi i de la presència del transgèn UAS-*dcr2*.

Com a control positiu de l'experiment d'apoptosi s'encreuen mascles de la soca patched-GAL4 amb femelles verges de la soca UAS-*reaper* i com a control negatiu s'empren individus patched-GAL4, mantinguts a 29°C.

Per a la inducció de l'expressió dels transgens *DmSRS2_m* i *SARS2*, seguint el patró del gen *patched*, s'encreuen les soques provisionals *DmSRS2_m^{estoc 30.5}* i *SARS2^{estoc 82.3}* (vegeu el subapartat 3.3.4.3) amb la soca patched-GAL4 a 25°C.

3.9.4 Immunofluorescència de discs imaginals

Es disseccionen i giren larves de tercer estadi que provenen de diversos encreuaments amb la soca patched-GAL4 en PBS 1x fred. El procediment d'immunofluorescència es realitza en tubs de PCR de 0,5mL, i tots els rentats i incubacions es realitzen en volums de 500µL i en rotació. Es fixen els teixits en 4% paraformaldehid diluït en PBS 1x durant 15min i, seguidament, s'efectuen 3 rentats ràpids i un rentat de 20min amb PBS-Triton (PBS 1x, Triton X-100 0,3% (v/v)). Es realitzen 3 rentats de 10min amb solució PBS-Triton-BSA (PBS 1x, Triton X-100 0,3% (v/v) i BSA Fracció V (lliure en àcids grassos, Roche) 2% (w/v)). S'incuben els teixits amb l'anticòs primari diluït en PBS-Triton-BSA o/n a 4°C. Es fan 3 rentats ràpids, seguits de 4 rentats de 10min amb

PBS-Triton-BSA. S'incuben els teixits amb l'anticòs secundari diluït 1:600 en PBS-Triton-BSA 2h a RT, tot protegint les mostres de la llum. Es fan 3 rentats ràpids, seguits de 4 rentats de 10min amb PBS-Triton-BSA i un rentat de 10min amb PBS 1x. S'incuben els teixits amb DAPI 0,02ng/ μ L diluït en PBS 1x durant 20min a RT, seguit de 3 rentats de 5min amb PBS-Triton, i es munten els discs imaginals d'ala en un portaobjectes amb 30 μ L de Mowiol 4-88 (Merck). Es cobreixen les mostres amb cobreobjectes quadrats i s'observen en un microscopi confocal SPE (Leica).

3.9.5 Muntatge d'ales i anàlisi d'imatges

Entre 6 i 10 adults procedents dels encreuaments a 25°C o 29°C, detallats a les figures 3.2 i 3.3, se submergeixen en medi SH (etanol:glicerol 3:1) durant un mínim de 24h. Els individus es rehidraten en tampó PBS 1x fred, se n'extirpen les ales sota una lupa SMZ-645 (Nikon) amb pinces de dissecció Dumont (FST), es munten damunt un portaobjectes en 30 μ L de medi Fauré (50g d'hidrat cloral, 30g de goma aràbiga, 20mL de glicerol i 50mL d'aigua Milli-Q), es cobreixen amb un cobreobjectes rectangular i es desen sota pes durant 12h. Les preparacions s'observen en un microscopi E600 (Nikon) amb una càmera DP72 (Olympus) acoblada. Les àrees de les ales dels adults que procedeixen d'encreuaments amb la soca patched-GAL4 es mesuren per separat en mascles i femelles, mitjançant el programa ImageJ (Abramoff et al., 2004), i s'analitzen els valors obtinguts amb el test estadístic *two-way* ANOVA. Per tal de mesurar la densitat cel·lular en ales es comptabilitza el nombre de pèls (que són reflex del nombre de cèl·lules) al llarg d'una línia recta des de la vena L3 fins la L4 a la part distal de l'ala.

Per capturar imatges d'individus adults, es recullen en un tub de microcentrífuga d'1,5mL i es mantenen a -20°C durant 30min. Es prenen les fotografies a 30X tot utilitzant una lupa MZ 16F (Leica) equipada amb una càmera DFC 300FX (Leica).

3.9.6 Fraccionament cel·lular de larves

El fraccionament cel·lular de larves de tercer estadi té com a objectiu la posterior detecció d'ARNt per *northern blot* (consulteu l'apartat 3.5.4). Per assegurar un enriquiment de mitocondris a la fracció mitocondrial, s'utilitza com a control un oligonucleòtid sonda específic que detecta l'ARNt^{Lys} mitocondrial de *D. melanogaster* (vegeu la taula 3.15).

Es recullen 50 larves *w¹¹¹⁸* de tercer estadi, es renten en PBS 1x, es transfereixen a un homogeneïtzador de vidre, s'hi afegeix 1mL de tampó de lisi i s'efectua el fraccionament cel·lular, tot seguint el protocol per cèl·lules S2 detallat a l'apartat 3.8.3.

3.9.7 Extracció d'ARN

Les extraccions d'ARN de fraccions cel·lulars (vegeu l'apartat 3.9.6) o bé totals de diferents estadis del cycle vital de *D. melanogaster* es realitzen amb TRIzol[®] (Invitrogen). S'inicia el protocol per lisi de cada fracció amb 500-1.000 μ L de TRIzol[®], es realitza un centrifugat inicial per eliminar polisacàrids, membranes extracel·lulars i ADN d'elevat pes molecular i es procedeix

d'acord amb les instruccions del fabricant. Al final, es resuspèn el pellet d'ARN amb el volum desitjat d'aigua tractada amb DEPC i es mesura la concentració d'ARN (consulteu l'apartat 3.4.11).

3.9.8 Extracció d'ADN genòmic

L'aïllament d'ADN genòmic es realitza per a la posterior determinació del nombre relatiu de còpies d'ADNmt (vegeu l'apartat 3.10.1). Es parteix de 5 larves de tercer estadi (que no presenten el marcador Tb) que apareixen dels encreuaments a 29°C de les soques ARNi_{DmSRS2 estoc 1-dcr2}, ARNi_{SLIMP estoc 8}, ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} i ARNi_{SLIMP estoc 33774} amb la soca actina 5C-GAL4, o a 25°C de la soca ARNi_{DmSRS2 estoc 23003} (els encreuaments estan detallats a la figura 3.1), i larves control (*w*¹¹¹⁸). L'extracció d'ADN genòmic s'efectua amb el PUREGENE® DNA Purification kit (Gentra, Qiagen), tot seguint el procediment del fabricant per a l'extracció d'ADN genòmic de mostres de 5-10mg de teixit sòlid. El protocol es basa en un primer pas d'homogeneïtzació física en tampó de lisi, un tractament amb proteïnasa K (Sigma), incubació amb ARNasa A (Fermentas), precipitació de proteïnes, precipitació d'ADN i hidratació final de l'ADN genòmic.

3.10 TÈCNiques DE CARACTERITZACIÓ DE LA MORFOLOGIA, BIOGÈNESI I FUNCIÓ MITOCONDRIALS

3.10.1 Determinació del nombre relatiu de còpies d'ADNmt

Per tal de determinar el nombre relatiu de còpies d'ADNmt s'utilitza la tècnica de qPCR en temps real. Es quantifica el nombre de còpies d'ADNmt relatiu al nombre de còpies d'ADNn fent servir dos parells d'oligonucleòtids específics per detectar gens codificats al genoma mitocondrial (ATPasa6) o al genoma nuclear (mRp110), respectivament (consulteu la taula 3.14), i s'usen, com a motlle, mostres d'ADN genòmic (vegeu l'apartat 3.9.8).

Les qPCR es realitzen amb Power SYBR® Green amb un aparell StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems), seguint exactament el mateix procediment d'optimització dels encebadors detallat al subapartat 3.5.6.1 (a excepció del disseny dels oligonucleòtids, que en aquest cas van ser proporcionats pel Dr. Aurelio Teleman (DKFZ)). La quantificació relativa del nombre de còpies d'ADNmt es va realitzar per triplicat seguint el protocol detallat al subapartat 3.5.6.2 amb concentracions finals d'oligonucleòtids de 125nM i d'ADN genòmic de 10pg/μL, en 20μL de reacció. Es normalitzen les dades amb ROX com a tint de referència, i se segueixen les condicions següents: un primer pas de 2min a 50°C, un segon pas de 10min a 95°C i un tercer pas de 40 cicles de 15seg a 95°C seguits d'1min a 60°C.

L'abundància relativa d'ADNmt es calcula amb l'equació $2^{-\Delta C_T}$, tant per a les mostres experimentals (ARNi) com per a la mostra control (*w*¹¹¹⁸). Cada ΔC_T és [la mitjana de C_T per l'ADNmt (ATPasa6) - la mitjana de C_T per l'ADNn de referència (mRp110)]. El valor obtingut per a la mostra control s'estableix com a 100 i els valors obtinguts per a les mostres experimentals

es representen relatiu a aquest. Els resultats de cinc experiments independents se sotmeten al test estadístic *t de Student*.

3.10.2 Microscòpia electrònica de transmissió

El procediment de preparació dels talls per tal de ser observats al microscopi electrònic de transmissió es va realitzar a la unitat de Reconeixement molecular *in situ* (SCT-UB).

Es dissectiona en medi Schneider el teixit adipós de 8-10 larves de tercer estadi control (w^{1118}) o que procedeixen dels encreuaments a 29°C de la soca actina 5C-GAL4 amb les soques ARNi_{DmSRS2} estoc 1-dcr2 i ARNi_{SLIMP} estoc 8-dcr2 i, immediatament, es fixa el teixit amb glutaraldehyd 2% en tampó cacodilat pH 7,2 0,1M o/n a RT. Es postfixa el teixit durant 2h a 4°C en agitació amb OsO₄ 2% i K₃Fe(CN)₆ 1,6% en tampó cacodilat pH 7,2 0,1M. Es deshidrata la mostra, tot efectuant 1-3 canvis de 10min en proporcions creixents d'acetona (50%, 70%, 90%, 96% i 100%). La inclusió en reïna EPON 12 s'efectua a RT en agitació en passos successius: un pas d'1h amb Eponate 12:dissolvent (1:3), un pas d'1h amb DDSA (enduridor):dissolvent (2:2), un pas o/n amb NMA (enduridor):dissolvent (3:1), seguidament s'efectuen dos passos de 12h i un de 2h amb reïna EPON 12 i dos cicles de 4h i o/n amb reïna EPON 12 + DMP-30 (accelerador). Es confeccionen els blocs en EPON 12 i es polimeritzen a 60°C durant 48h. Es realitzen talls semifins de ~500nm de gruix per observar el nivell de preservació del teixit en un microscopi òptic i, posteriorment, es realitzen talls ultrafins de ~50nm de gruix, que són contrastats amb acetat d'uranil per a ser observats al microscopi electrònic Jeol JEM 1010. Les àrees dels mitocondris es mesuren amb el programa ImageJ (Abramoff et al., 2004).

3.10.3 Mesura del consum mitocondrial d'oxigen

El consum mitocondrial d'oxigen es mesura mitjançant un detector d'oxigen Oxygraph-2k (OROBOROS), adaptant el protocol descrit per Kuznetsov et al. (Kuznetsov et al., 2008) al teixit de larva de *D. melanogaster*. Es dissectionen entre 4-8 larves de tercer estadi control (w^{1118}) i dels encreuaments a 29°C de la soca actina 5C-GAL4 amb les soques ARNi_{DmSRS2} estoc 1-dcr2, ARNi_{SLIMP} estoc 8-dcr2 i ARNi_{SLIMP} estoc 33774 o a 25°C amb la soca ARNi_{DmSRS2} estoc 23003 en 2mL de tampó BIOPS fred (CaK₂EGTA 2,77mM, K₂EGTA 7,23mM, Na₂ATP 5,77mM, MgCl₂·6H₂O 6,56mM, taurina 20mM, Na₂fosfo-creatina 15mM, imidazol 20mM, DTT 0,5mM i MES 50mM, pH 7,1). Els teixits es permeabilitzen amb digitonina 25µM en tampó BIOPS durant 15minuts a 4°C en agitació (Baltzer et al., 2009) i es renten en tampó d'incubació MiR05 (EGTA 0,5mM, MgCl₂·6H₂O 3mM, K-lactobionat 60mM, taurina 20mM, KH₂PO₄ 10mM, HEPES 20mM, sacarosa 110mM i BSA Fracció V (lliure en àcids grassos) 1g/l, pH 7,1) en agitació 10-60min a 4°C. S'introdueix el teixit permeabilitzat dins la cambra de l'Oxygraph-2k preequilibrada i calibrada en saturació d'oxigen a 25°C o 29°C, segons la mostra emprada, amb 2mL de tampó d'incubació MiR05 i es tanca la cambra perquè no hi quedi aire a l'interior. Es monitora el consum d'oxigen (en pmol d'O₂/seg · mL) al llarg d'addicions successives de substrats o inhibidors de la cadena respiratòria. En primer

lloc, s'hi incorporen els substrats del complex I glutamat 10mM i malat 2mM (GM_N ; estat 2); seguidament, s'hi introdueix $ADP + Mg^{+2}$ 2,5mM que és substrat de l'ATPasa (o complex V) que produeix ATP i injecta protons a la matriu mitocondrial per retroalimentar la cadena respiratòria (GM_D ; estat 3); després, s'hi afegeix citocrom c 10 μ M com a control d'una correcta permeabilització del teixit (GM_{c_D}); s'hi incorpora succinat 10mM que és substrat del complex II (GM_{Sc_D}); es realitzen dos passos amb FCCP (*carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*; carbonil cianida *p*-trifluorometoxifenilhidrazona) 0,5 μ M, que és un desacoblador de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa (GM_{Sc_U}); s'hi afegeix rotenona 0,5 μ M, que és un inhibidor del complex I ($Sc(Rot)_U$); i, finalment, antimicina A 2,5 μ M, que permet la mesura del consum independent de la respiració mitocondrial ($RotAma_U$; *rox*) per inhibició del complex III.

Els valors de la RCR (ràtio control respiratòria) es calculen tot dividint dels valors de l'estat 3 pels valors de l'estat 2, on l'estat 2 correspon al consum d'oxigen residual abans d'afegir ADP i l'estat 3 correspon a l'activació del consum un cop afegit l'ADP.

Els nivells de consum d'oxigen obtinguts són normalitzats, primerament, pel pes de teixit (pmol O_2 /seg \cdot mg), i, en segon lloc, per tal d'avaluar la capacitat respiratòria per mitocondri, es corregeixen tenint en compte el nombre de mitocondris tot dividint els valors obtinguts per la densitat mitocondrial obtinguda mitjançant la quantificació relativa de còpies d'ADNmt (consulteu l'apartat 3.10.1) (Boushel et al., 2007) o per mitjà de l'observació de teixit adipós larvari al microscopi electrònic. Es realitzen més de tres experiments independents que són sotmesos al test estadístic *t de Student*.

