



Caracterització del cicle de vida dels retrotransposons telomèrics *HeT-A* i *TART* de *Drosophila melanogaster*

Elisenda López Panadès

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.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.



Programa de Doctorat en Biomedicina
Universitat de Barcelona

Institut de Biologia Evolutiva (IBE; CSIC-UPF)

TESI DOCTORAL

**Caracterització del cicle de vida
dels retrotransposons telomèrics *HeT-A* i *TART*
de *Drosophila melanogaster***

Memòria presentada per Elisenda López Panadès
per optar al títol de Doctora per la Universitat de Barcelona

Barcelona, Setembre 2014

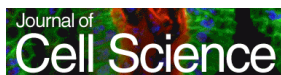
Directora de tesi:

Tutora de tesi:

Doctorant:

Dra. Elena Casacuberta Suñer Dra. Carme Caelles Franch Elisenda López Panadès

Aquesta tesi doctoral s'ha realitzat al grup de *Telòmers de Drosophila* sota la supervisió de la Dra. Elena Casacuberta a l'Institut de Biologia Evolutiva (IBE; CSIC-UPF) de Barcelona. A més, s'ha dut a terme una col·laboració, amb una estada de sis mesos de durada, amb la Universitat de Princeton (New Jersey, USA), al laboratori de la Dra. Elizabeth R Gavis del Departament de Biologia Molecular.



ÍNDEX

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Els telòmers.....	3
1.2. La Telomerasa.....	6
1.3. Els telòmers de <i>Drosophila</i>	7
1.4. El mecanisme d'elongació telomèrica de <i>Drosophila</i>	11
1.5. El <i>Targeting</i> telomèric a <i>Drosophila</i>	16
1.6. Proteïnes que interaccionen amb els telòmers	19
1.6.1. El complex de <i>capping</i> telomèric	21
1.6.2. Proteïnes que s'uneixen a l' <i>array</i> de retrotransposons telomèrics (HTT).....	24
1.7. Cèl·lules amb replicació telomèrica a <i>Drosophila</i>	27
1.7.1. Els neuroblasts de <i>Drosophila</i>	28
1.7.2. Els ovaris de <i>Drosophila melanogaster</i>	28
1.7.3. L'endoreplicació a ovaris de <i>Drosophila</i>	34
1.7.4. Les <i>border cells</i>	38
1.7.5. L'embrió de <i>Drosophila melanogaster</i>	40
1.8. Regulació de la transposició d'elements mòbils	42
1.9. Expressió de <i>HeT-A</i> i <i>TART</i> a ovaris	52
2. OBJECTIUS.....	57

3. MATERIALS I MÈTODES.....	61
3.1. MATERIALS	63
3.1.1. ENCEBADORS (<i>PRIMERS</i>).....	63
3.1.1.1. Seqüències d'encebadors emprats per a PCR convencional per generar RNAs de doble cadena.....	63
3.1.1.2. Seqüències d'encebadors emprats per a <i>Real-time</i> PCR.....	64
3.1.1.3. Seqüències d'encebadors emprats per generar línies cel·lulars estables amb el TAP <i>tag</i>	64
3.1.1.4. Seqüències d'encebadors emprats per generar les línies mutants RNAi de <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	65
3.1.1.5. Seqüències emprades per generar les sondes de les hibridacions <i>in situ</i> d'RNA.....	66
3.1.1.6. Clonatges emprats	66
3.1.2. PLÀSMIDS	67
3.1.3. ANTICOSSOS	67
3.1.4. LÍNIES DE <i>DROSOPHILA</i>	70
3.1.4.1. <i>Drosophila virilis</i>	70
3.1.4.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	71
3.1.5. SOQUES BACTERIANES.....	75
3.1.6. LÍNIES CEL·LULARS	75

3.2. MÈTODES.....	76
3.2.1. TÈCNIQUES EMPRADES PER AL DNA.....	76
3.2.1.1. Extracció de DNA genòmic	76
3.2.1.2. Reacció de PCR convencional (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	76
3.2.1.3. Lligació del producte de PCR a un vector	77
3.2.1.4. Transformació de cèl·lules competents.....	78
3.2.1.5. Minipreparacions de DNA plasmídic	78
3.2.1.6. Midipreparacions de DNA plasmídic	79
3.2.2. TÈCNIQUES EMPRADES PER A L'RNA	79
3.2.2.1. Extracció d'RNA	79
3.2.2.2. Síntesi de cDNA	81
3.2.2.3. PCR quantitativa o <i>Real-time PCR</i>	81
3.2.2.4. Síntesi d'RNA de doble cadena	82
3.2.3. HIBRIDACIONS <i>IN SITU</i> D'RNA.....	83
3.2.3.1. Clonatge de les seqüències de DNA per sintetitzar-ne les sondes	83
3.2.3.2. Síntesi de sondes d'RNA per a hibridació <i>in situ</i>	84
3.2.3.3. Hibridació <i>in situ</i> d'RNA fluorescent pel mètode de la tiramida.....	85
3.2.4. TÈCNIQUES DE CULTIUS CEL·LULARS	85

3.2.4.1. Manteniment de línies cel·lulars de <i>Drosophila melanogaster</i>	85
3.2.4.2. Transfecció de cèl·lules S2 de <i>Drosophila</i>	86
3.2.4.3. Generació i manteniment de línies cel·lulars estables	86
3.2.4.4. Re-transfecció de línies cel·lulars estables	87
3.2.4.5. Inducció de línies cel·lulars estables	87
3.2.4.6. Fixació de cèl·lules transfectades	88
3.2.4.7. Tractament de cèl·lules S2 amb dsRNAs per difusió	88
3.2.4.8. Preparació de cromosomes metafàsics de cèl·lules S2	89
3.2.5. TÈCNiques D'EXTRACCIÓ I DETECCIÓ DE PROTEÏNES	89
3.2.5.1. Generació d'anticossos primaris	89
3.2.5.2. Extracció de proteïnes de cèl·lules S2, larves o cervells	89
3.2.5.3. Extracció de proteïnes d'ovaris	90
3.2.5.4. Electroforesi de proteïnes en gel d'acrilamida	90
3.2.5.5. <i>Western Blot</i>	91
3.2.5.6. Co-Immunoprecipitació	92
3.2.6. PURIFICACIÓ DE COMPLEXES PROTEICS	92

3.2.6.1. Obtenció del pellet cel·lular d'S2 estables induïdes per a la purificació de complexos proteics	92
3.2.6.2. Preparació de les boles magnètiques d'IgGs	93
3.2.6.3. Tècnica de purificació de complexos proteics <i>Tandem Affinity Purification</i> (TAP) seguida d'una anàlisi per espectrometria de masses (MS).....	93
3.2.7. IMMUNODETECCIONS	95
3.2.7.1. Immunolocalització d'ovaris.....	95
3.2.7.2. Immunolocalització d'embrions	96
3.2.7.3. Immunodetecció de cèl·lules S2	97
3.2.7.4. Immunodetecció de cromosomes metafàsics	98
3.2.7.5. Immunolocalització de neuroblasts.....	99
3.2.8. OBTENCIÓ D'IMATGES MITJANÇANT MICROSCÒPIA.....	100
3.2.9. ANÀLISI D'IMATGES OBTINGUDES PER MICROSCÒPIA CONFOCAL AMB EL SOFTWARE <i>IMAGE J</i> : Quantificació dels nivells de fluorescència dels punts intranuclears de la proteïna <i>TART Pol</i>	100
4. RESULTATS.....	103
4.1. CARACTERITZACIÓ DE LA RNP TELOMÈRICA: PROTEÏNES I RNAs DELS RETROTRANSPOSONS TELOMÈRICS <i>HET-A</i> I <i>TART</i>	105
4.1.1. Caracterització de les proteïnes telomèriques <i>HeT-A</i> Gag i <i>TART Pol</i>	106

4.1.2. Caracterització dels RNAs de <i>HeT-A</i> i <i>TART</i> a ovaris.....	132
4.1.3. Resum de les localitzacions de les proteïnes i els RNAs de <i>HeT-A</i> i <i>TART</i> a ovaris salvatges i mutants GIII i d' <i>aubergine</i>	143
4.2. ALTRES PROTEÏNES QUE FORMEN LA RNP TELOMÈRICA: Proteïnes cel·lulars que interaccionen amb <i>HeT-A</i> Gag i <i>TART</i> Pol.....	148
4.2.A. Primera aproximació amb proteïnes candidates a formar part de la RNP telomèrica	149
4.2.B. Purificació de complexos proteics mitjançant el mètode del TAP <i>tag</i>	157
4.2.B.1. Caracterització de les proteïnes Lost i Trailer hitch.....	170
4.2.B.2. Caracterització de la proteïna Nap-1	184
5. DISCUSSIÓ.....	195
5.1. CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES I ELS RNAs TELOMÈRICS DE <i>DROSOPHILA</i> A DIFERENTS TEIXITS CEL·LULARS	197
5.1.1. Caracterització de les proteïnes <i>HeT-A</i> Gag i <i>TART</i> Pol.....	197
5.1.2. Caracterització dels trànscrips de <i>HeT-A</i> i <i>TART</i>	209
5.2. IDENTIFICACIÓ D'ALTRES PROTEÏNES CEL·LULARS IMPLICADES EN EL CICLE DE VIDA TELOMÈRIC DE <i>DROSOPHILA</i>	225

5.3. MODEL PROPOSAT DEL CICLE DE VIDA DELS RETROTRANSPOSONS TELOMÈRICS <i>HET-A</i> I <i>TART</i>	239
5.4.RELACIONS AMB ALTRES PROTEÏNES IDENTIFICADES A LES PURIFICACIONS DE COMPLEXES PROTEICS	242
6. CONCLUSIONS	245
7. BIBLIOGRAFIA.....	249
8. ANNEXOS.....	271
8.1. Annex 1. Estudi fenotípic de línies mutants RNAi de <i>HeT-A</i> i <i>Jockey</i>	273
8.2. Annex 2. Publicacions durant l'elaboració d'aquesta tesi doctoral	289

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Els telòmers

L'any 1938, Müller va definir per primera vegada els telòmers. La paraula telòmer prové del grec, on *telos* significa final i *meros* vol dir part .

Els telòmers són estructures formades per DNA i proteïnes als extrems dels cromosomes lineals d'eucariotes. Estan constituïts per seqüències repetitives en tàndem riques en G/T, d'una llargada d'entre 6 i 10 bp cadascuna, i d'un número de repeticions que varia segons cada espècie (Blackburn EH 1984; Greider CW 1996; Blackburn EH 2001). Els telòmers de vertebrats estan formats per repeticions TTAGGG, i els de la majoria d'insectes per TTAGG (Craig NL 2002; Melnikova L i Georgiev P 2005; De Lange et al 2006).

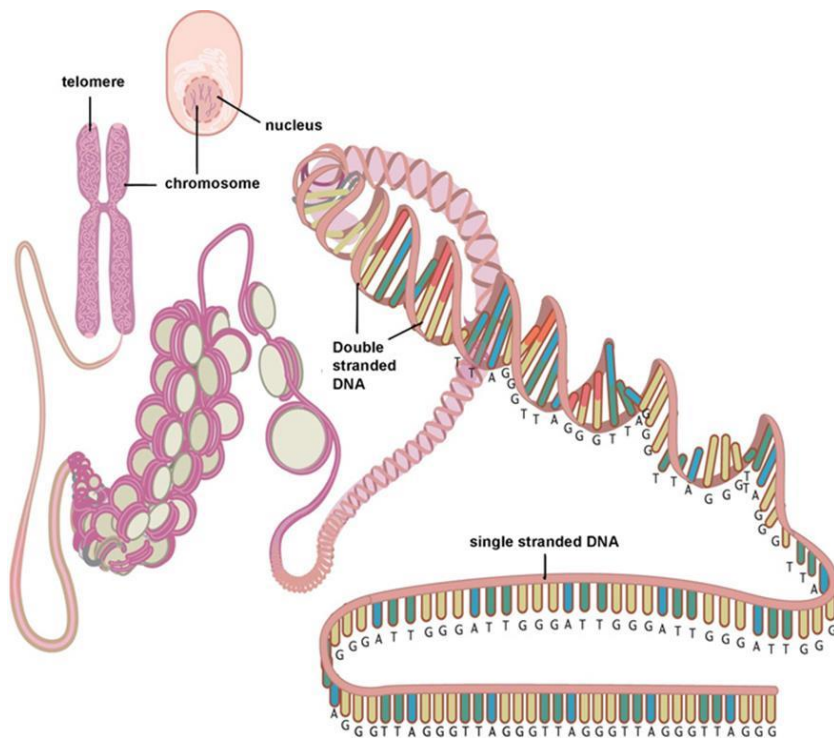


Figura 1. Representació d'un telòmer i la seva localització en el cromosoma i dins la cèl·lula (Zhu H et al 2011).

A mamífers, quan la cadena simple de repeticions telomèriques que ressurta al final del cromosoma envaeix el dúplex anterior pot generar un bucle cap enrere anomenat *t-loop*. La funció principal del *t-loop* és protegir i mantenir l'extrem final del cromosoma (Griffith JD et al 1999).

S'ha descrit que les repeticions telomèriques funcionen com una base o estructura per a l'assemblatge de grans complexos de proteïnes que són imprescindibles per al manteniment dels telòmers (Cenci G et al 2005). Aquests complexos recluten altres proteïnes formant així una xarxa de complexos proteics que revesteix els finals dels cromosomes. Aquest "tap proteic" que protegeix els telòmers s'anomena sovint *cap*, i és el responsable de regular l'elongació telomèrica i evitar que els finals dels cromosomes siguin reconeguts com a DNA de doble cadena trencat i siguin sotmesos a processos de reparació del DNA com el NHEJ (*Non-Homologous End Joining*). S'ha suggerit que les proteïnes associades als telòmers medien la formació i l'estabilització del *t-loop*, regulant l'acció de la Telomerasa (de la qual es parlarà a continuació) i protegint els extrems cromosòmics de fusions telomèriques.

El complex que forma i manté el *t-loop* s'anomena Shelterin (o Telosoma) i és l'encarregat de protegir i mantenir la longitud dels telòmers, així com de regular-hi l'accés de la Telomerasa (De Lange T 2005; De Lange T et al 2006). El complex Shelterin està format per 6 proteïnes: TRF1 (*Telomeric Repeat binding Factor 1*), TRF2 (*Telomeric Repeat binding Factor 2*), POT1 (*Protection Of Telomeres 1*), RAP1 (*Repressor/Activator Protein 1*), TIN2 (*TRF1 INteracting protein 2*), i TPP1 (*TINT1/PIP1/PTOP 1*) (Liu D et al 2004). Les proteïnes TRF1 i TRF2 s'uneixen a les repeticions telomèriques de DNA de doble cadena i són les responsables de regular l'accés de la Telomerasa i la longitud telomèrica (Smogorzewska A et al 2000). En canvi, POT1 interacciona amb les repeticions de DNA de cadena simple fent possible el tancament del *t-loop*. Totes tres (TRF1, TRF2 i POT1) serveixen

com a lloc d'unió de la resta de proteïnes que componen el complex Shelterin (Martínez P i Blasco MA 2011).

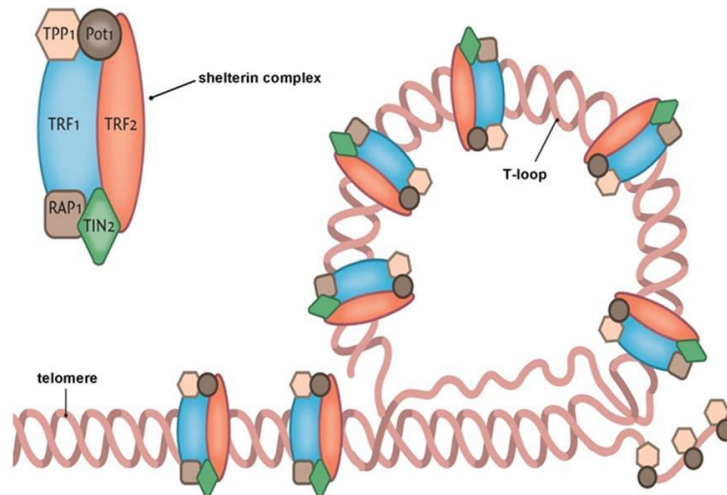


Figura 2. Dibuix de l'extrem final d'un telòmer on s'observa la formació del *t-loop* gràcies al complex Shelterin (Zhu H et al 2011).

Els telòmers juguen un paper important en diverses funcions cel·lulars. No obstant, la seva principal funció és protegir l'extrem final del cromosoma de ser degradat per enzims cel·lulars. Contribueixen a distingir entre finals de cromosomes veritables i extrems produïts per trencament de doble cadena (McClintock B 1931). A més eviten la fusió dels extrems cromosòmics, i participen en algunes cèl·lules en el posicionament dels cromosomes dins el nucli cel·lular (Kierszenbaum AL 2000). Ofereixen també un lloc d'unió per a proteïnes que actuen als telòmers o que s'hi queden fins ser requerides a un altre lloc (Pardue ML i Debaryshe PG 2002).

A cada divisió cel·lular, els telòmers s'escurcen a conseqüència de la replicació incompleta o semiconservativa del DNA per part de les Polimerases, ja que són incapaces de sintetitzar en sentit 3'-5' (Olovnikov AM 1971; Watson JD 1972). L'allargament i escurçament telomèrics s'han associat amb tumorogènesi, envelliment cel·lular i senescència (Blackburn

EH 2001; Pardue ML i Debyarshe PG 2002). Per evitar la pèrdua d'informació genètica codificant, les cèl·lules necessiten un mecanisme amb què compensar l'escurçament telomèric. La majoria d'organismes eucariotes allarguen els seus telòmers mitjançant l'enzim Telomerasa (Greider CW i Blackburn EH 1985; Blackburn EH et al 1989), no obstant existeixen mecanismes alternatius.

1.2. La Telomerasa

La Telomerasa és un complex format per una Transcriptasa Reversa (TERT) i una cadena motlle d'RNA (TERC) (Blackburn EH et al 1989). A més, la proteïna Diskyerin s'uneix al TERC per estabilitzar-lo (Cohen SB et al 2007).

Aquest enzim s'associa al final del DNA del telòmer. L'RNA motlle TERC s'alinea a l'extrem 3' del DNA telomèric i una seqüència curta del centre d'aquest RNA es retrotranscriu a DNA de forma repetida en el cromosoma mitjançant la TERT (Blackburn EH 1991). D'aquesta manera s'afegeixen les repeticions telomèriques necessàries per elongar el telòmer.

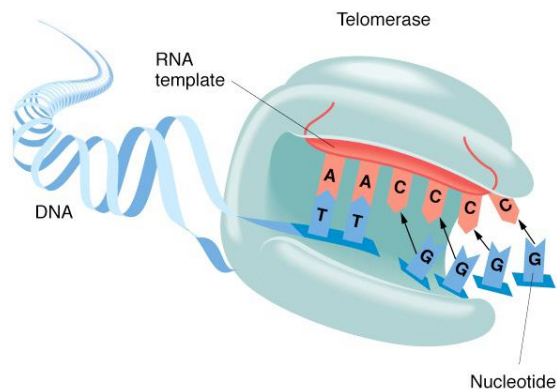


Figura 3. Representació de l'enzim Telomerasa. El DNA cromosòmic es troba dibuixat en blau, i l'RNA motlle de la Telomerasa (TERC) en vermell. (Al dibuix no hi apareix la proteïna Diskyerin que l'estabilitza).

La Telomerasa només estén una de les cadenes del DNA amb aquest mecanisme, i es creu que la cadena complementària és replicada per síntesi convencional amb una DNA Polimerasa.

Tot i que la Telomerasa es troba altament conservada a eucariotes, aquesta s'ha perdut diverses vegades de manera independent al llarg de l'evolució (veure la Figura 9) (Pardue ML i Debaryshe PG 2008). Per tant, existeixen mecanismes alternatius a la Telomerasa per elongar els telòmers. De fet, un d'aquests mecanismes és el que presenta *Drosophila*.

1.3. Els telòmers de *Drosophila*

Drosophila no té Telomerasa i utilitza tres retrotransposons de tipus no-LTR per elongar els seus telòmers: *HeT-A* (*Healing Transposon*), *TART* (*Telomere Associated RetroTransposon*) i *TAHRE* (*Telomere Associated element HeT-A RElated*) (Melnikova L i Georgiev P 2005). Aquest mecanisme de manteniment telomèric es troba conservat a totes les espècies de *Drosophila* (Casacuberta E i Pardue ML 2005).

Els elements mòbils poden dividir-se en dos classes diferents (Figura 4). Els de classe II s'anomenen transposons o elements mòbils de DNA. Són fragments de DNA que poden transposar directament mitjançant un mecanisme d'escissió del DNA de doble cadena i la seva posterior reinserció en una altra regió del genoma; o bé repliquen el DNA de cadena simple i l'insereixen en un altre punt del genoma (Feschotte C i Pritham EJ 2007). D'altra banda, els de classe I s'anomenen retrotransposons ja que són transcrits a un intermediari d'RNA que és posteriorment retrotranscrit a DNA i inserit al genoma, incrementant-ne el número de còpies (Mesnard JM i Lebeurier G 1991). A més, els de classe I poden subdividir-se en dos tipus: els LTR que tenen *Long Terminal Repeats* als extrems, i els no-LTR que no en tenen. És en aquest últim grup, al de classe I no-LTR, on pertanyen els retrotransposons telomèrics de *Drosophila* (Pardue ML i Debaryshe PG

2008). És interessant a més que pertanyin a aquest mateix grup els retrotransposons telomèrics d'altres organismes, com ara *SART* i *TRAS* de *Bombyx mori* (Fujiwara H et al 2005).

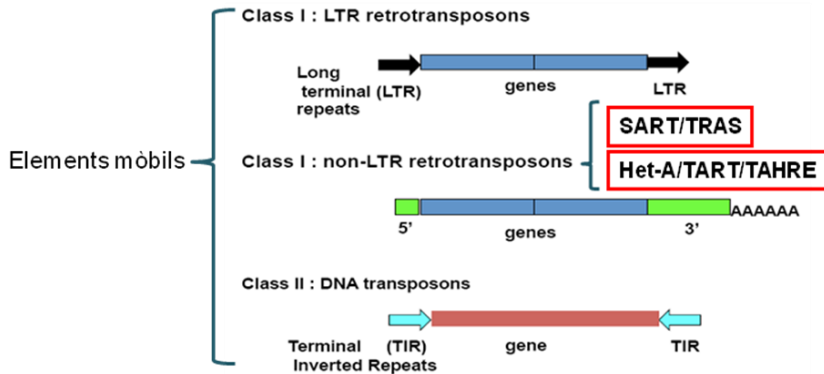


Figura 4. Esquema dels diferents tipus d'elements mòbils. (Adaptat de Pardue ML i Debaryshe PG 2008).

És important destacar que *HeT-A*, *TART* i *TAHRE* només es troben als telòmers de *Drosophila*, és a dir, que en són específics. A la Figura 5 es troben representats els tres retrotransposons telomèrics de *Drosophila melanogaster*.

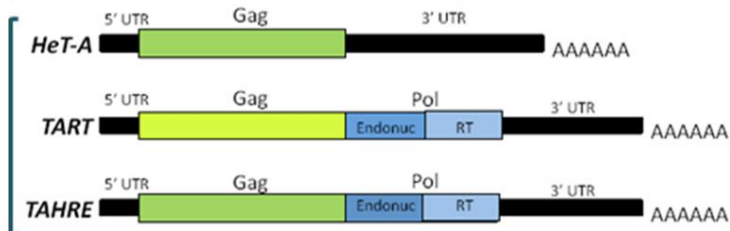


Figura 5. Representació dels retrotransposons no-LTR dels telòmers de *Drosophila melanogaster*.

HeT-A és el més abundant dels tres retrotransposons ja que transposa més freqüentment (Pardue ML i Debaryshe PG 2008). Només disposa d'un marc de lectura que codifica per a la proteïna estructural Gag, la qual presenta similituds amb proteïnes de càpsides virals. *HeT-A* doncs és defectiu per a Pol (Melnikova L i Georgiev P 2005). El promotor de *HeT-A* es troba al seu 3'UTR i transcriu l'element que es troba situat *downstream* d'ell (Pardue ML i Debaryshe PG 2008). D'altra banda, al seu 3'UTR també s'hi troba un promotor per transcriure'n l'RNA *antisense*, el qual tot i no ser codificant és probable que dugui a terme una funció important en la regulació de l'elongació telomèrica (Shpiz S et al 2009; Piñeyro D et al 2011).

TART en canvi té dos marcs de lectura: Gag i Pol. Aquest últim codifica per als dominis Transcriptasa Reversa (RT) i Endonucleasa (EN) (Figura 5). A *Drosophila melanogaster* existeixen 3 subfamílies diferents de *TART* (A, B i C) en funció del seu UTR (Sheen FM i Levis RW 1994). L'mRNA de *TART* és transcrit a partir del promotor que té al seu 5'UTR, mentre que al seu 3'UTR es troba el promotor del seu trànscrip *antisense*, el qual s'ha observat que s'expressa a nivells més elevats que l'mRNA (Danilevskaya ON et al 1999). Els trànscrips *antisense* de *HeT-A* i *TART* contenen llocs d'*splicing* que es troben altament conservats en les seves subfamílies (Maxwell PH et al 2006; Piñeyro D et al 2011), suggerint una possible funció d'aquests encara desconeguda.

TAHRE (*Telomere-Associated and HeT-A-Related Element*) és el retrotransposó trobat més recentment i el menys abundant dels tres. El seu gen *gag* té una alta similitud de seqüència amb el de *HeT-A* però, a diferència d'aquest, també conté un segon marc de lectura que codifica per a la Pol (Melnikova L i Georgiev P 2005; Pardue ML i Debaryshe PG 2008). El fet que *TAHRE* contingui una Gag tan similar a la de *HeT-A* (i uns UTRs també de seqüència molt semblant) juntament amb una Pol (com té *TART*) fa pensar que aquest retrotransposó hauria de poder transposar més

eficientment que els altres dos, no obstant la Gag de *TAHRE* no és capaç d'entrar dins el nucli (Fuller AM et al 2010). És segurament per això que *TAHRE* és molt poc abundant al genoma i, de fet, se n'han trobat únicament 4 còpies a línies salvatges i només una d'elles està sencera, les altres són defectives (Abad JP et al 2004b; George JA et al 2006). A més, algunes línies no presenten cap còpia de *TAHRE*. És per aquesta raó que aquest treball s'ha centrat únicament en l'estudi de *HeT-A* i *TART*.

Tots tres retrotransposons telomèrics es troben alternats/intercalats a l'atzar exclusivament als telòmers al llarg de 75-100 kb, contenen regions no traduïdes (5' UTR i 3' UTR) força llargues, i es troben sempre orientats en sentit *head-to-tail*, és a dir amb el poli(A) orientat cap al centròmer. Les principals característiques particulars que distingeixen els retrotransposons telomèrics de *Drosophila* són que es troben únicament als telòmers i que tenen una regió 3'UTR no codificant de llargada major a l'habitual. El retrotransposó *HeT-A* té una longitud aproximada de 6 kb, *TART* ocupa entre 10 i 13 kb; i *TAHRE* 10,5 kb (Pardue ML i Debaryshe PG 2008). No obstant, la seva longitud i composició varia força entre diferents cromosomes, i fins i tot entre diferents línies. De fet, les seqüències de *HeT-A* i *TART* accepten força variabilitat sense patir canvis de funció (Pardue ML i Debaryshe PG 2008; Piñeyro D et al 2011), però es desconeix encara si succeeix el mateix amb *TAHRE*.

Estudis previs de transfecció transitòria de les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Gag fusionades a proteïnes fluorescents mostren que la proteïna Gag de *HeT-A* localitza per sí sola als telòmers (procés que s'anomena *targeting* telomèric; veure l'apartat 1.5. *El targeting telomèric a Drosophila*). En canvi, la Gag de *TART* no hi localitza si no es co-transfecta amb la Gag de *HeT-A* (Rashkova S et al 2002a; Rashkova S et al 2002b). Aquest fet suggereix que els dos retrotransposons podrien estar col·laborant per dur a terme la seva transposició telomèrica, ja que *HeT-A* requereix de l'activitat

enzimàtica de la Pol de *TART* per transposar i *TART* necessita la Gag de *HeT-A* per poder localitzar als telòmers.

1.4. El mecanisme d'elongació telomèrica de *Drosophila*

S'ha suggerit que *HeT-A* i *TART* per dur a terme el seu cicle de vida telomèric empren el mecanisme que s'explica a continuació. No obstant, cap dels passos que s'han hipotetitzat d'aquest cicle de vida no han estat demostrats encara per als retrotransposons telomèrics de *Drosophila* i, a més, es desconeix quines proteïnes o factors cel·lulars poden estar-hi participant.

Els trànscrips de la cadena *sense* dels retrotransposons funcionen com a mRNAs i també com a intermediaris de transposició (Figura 6). Per tant, la transcripció dels elements telomèrics produeix un RNA que ha de ser transportat al citoplasma, on les regions codificants poden ser traduïdes a proteïnes (Gag i Pol). Es creu que aquestes proteïnes s'associen amb els seus RNAs i formen un complex o ribonucleoproteïna (RNP) que entra de nou al nucli. Allà, possiblement la proteïna Gag de *HeT-A* és l'encarregada de dirigir la RNP fins les regions telomèriques, realitzant el procés anomenat *targeting* telomèric (del qual es parla en més detall a continuació). No obstant, es desconeix el mecanisme mitjançant el qual es produeix aquesta localització als telòmers. Per últim, es creu que la RT (de *TART*) emprà els RNAs dels retrotransposons telomèrics com a motlle per generar-ne la primera cadena de DNA i afegir així una nova còpia de *HeT-A* o *TART* a l'extrem final del cromosoma, elongant-ne el telòmer (Pardue ML i Debaryshe PG 2008).

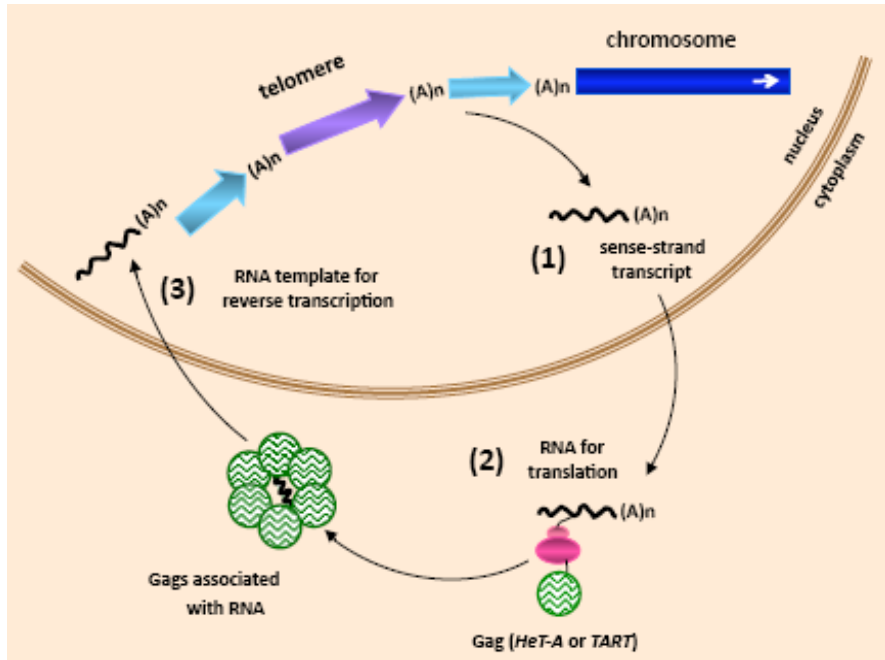


Figura 6. Dibuix esquemàtic del mecanisme de manteniment telomèric per retrotransposons (Pardue ML i DeBaryshe PG 2008).

Es creu que *HeT-A*, *TART* i *TAHRE* utilitzen un mètode de retrotransposició característic dels retrotransposons de tipus no-LTR anomenat TPRT (*Target-primed reverse transcription*) (Figura 7). En aquest mètode l'Endonucleasa s'uneix a la cadena del DNA diana i la talla. Aleshores, la Transcriptasa Reversa utilitza l'extrem 3'OH del DNA tallat internament per retrotranscriure l'RNA del retrotransposó (intermediari de transposició) a DNA, començant pel 3'poli(A) de l'RNA. Per últim, la cadena complementària de DNA pot ser generada també pel mateix mecanisme o bé per síntesi convencional del DNA. S'ha suggerit doncs que els retrotransposons telomèrics empen aquest mateix mecanisme per elongar els telòmers, però que usen l'extrem del final del cromosoma com a encebador per iniciar la TPRT (Mason JM et al 2008).

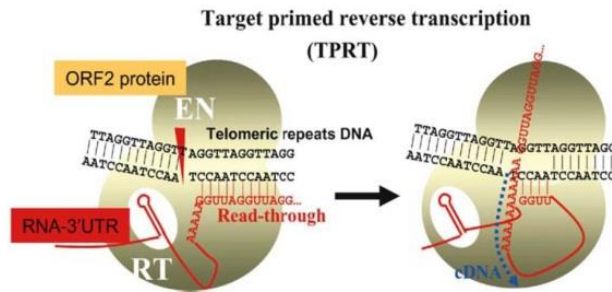


Figura 7. Representació del mecanisme general de retrotransposició TPRT (*Targeted-primed reverse transcription*). Pol (“ORF2 protein”) codifica per a dos dominis: Transcriptasa Reversa (RT) i Endonucleasa (EN) (Fujiwara H et al 2005).

Com s’observa a la Figura 8 l’allargament dels telòmers mitjançant el TPRT presenta força similituds amb el que duu a terme la Telomerasa. En ambdós casos la unitat catalítica associa el seu propi RNA motlle a l’extrem final del cromosoma. La Telomerasa alinea els primers nucleòtids de la seqüència a copiar amb la seva complementària i en copia la seqüència al final, d’aquesta manera a cada addició d’una nova repetició telomèrica es produeix una replicació precisa. En canvi, *HeT-A* i els altres retrotransposons telomèrics no necessiten la seqüència complementària per alinear-se (la seqüència motlle és de 6-13 kb a *Drosophila*) ja que els primers nucleòtids de timina (T) poden afegir-se a qualsevol seqüència inicial. Això fa que l’aparellament de seqüència sigui menys precís que al sistema de la Telomerasa i permet que no causi efectes perjudicials greus, quelcom especialment important quan la cadena motlle té una llargada de pocs nucleòtids. L’addició de retrotransposons copia a cada transposició un número variable d’As a la cua poli(A) i cada unió s’inicia amb un número variable d’As (Pardue ML i Debaryshe PG 2008).

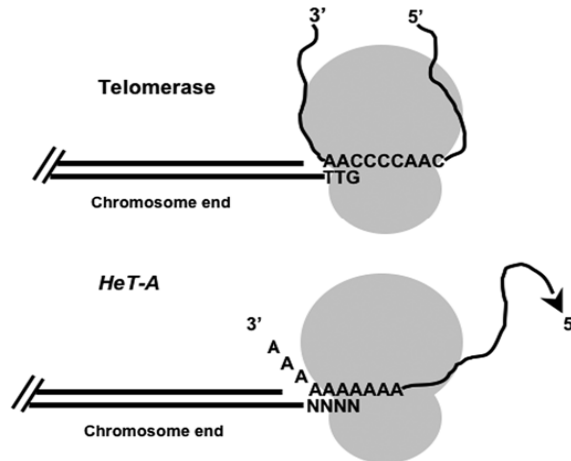


Figura 8. Dibuix esquemàtic que compara els sistemes de manteniment telomèric de la Telomerasa i dels retrotransposons telomèrics (Pardue ML i Debaryshe PG 2008).

No obstant, com s'ha esmentat abans, es desconeix si el TPRT és realment el mecanisme que duen a terme *HeT-A*, *TART* i *TAHRE* per transposar i s'han proposat altres mètodes alternatius per a l'elongació telomèrica de *Drosophila* (De Lange T et al 2006). Per una banda, podria tenir-hi lloc la recombinació gènica, un mecanisme que també empran les cèl·lules humanes tumorals alternativament a la Telomerasa (Bojovic B et al 2014). Una altra opció és la TGC (*Conversió Gènica Terminal*) que replica la seqüència terminal del telòmer emprant com a seqüència motlle el mateix cromosoma o el seu cromosoma homòleg (Mikhailovsky S et al 1999; Melnikova L i Georgiev P 2002).

Tot i desconèixer-se encara amb exactitud com té lloc l'elongació telomèrica de *Drosophila*, sí que sabem que *HeT-A* i *TART* transposen únicament als telòmers, com s'ha comentat ja anteriorment. No obstant, la Pol de *TART* codifica pel domini endonucleasa que talla la doble cadena de DNA i es troba altament conservat a altres espècies (Pardue ML i Debaryshe PG 2008). Per tant, tot i haver-se suggerit que la transposició de *HeT-A* i *TART*

es dóna al final del cromosoma, la conservació de l'endonucleasa suggereix la possibilitat que per allargar correctament els telòmers de *Drosophila* sigui necessari que l'endonucleasa talli el DNA en una regió propera a l'extrem final del cromosoma (però interna) dins de la seqüència HTT que conté els *arrays* telomèrics i per a la qual probablement té una alta afinitat.

Com s'ha comentat anteriorment, la Telomerasa s'ha perdut diverses vegades al llarg de l'evolució. De fet, la utilització d'un mecanisme d'elongació telomèrica alternatiu al de la Telomerasa es dóna a totes les espècies de *Drosophila* (Casacuberta E i Pardue ML 2002; Casacuberta E i Pardue ML 2005), així com també a altres insectes. A la Figura 9 es pot observar un arbre filogenètic de diferents ordres d'insectes, on el signe (+) indica que totes les espècies estudiades tenen repeticions telomèriques TTAGG; el (-) que no en tenen; i el (+/-) que algunes espècies en tenen i d'altres no. Les més estudiades han estat les espècies de 3 gèneres de Dípters: *Drosophila*, *Chironomus* i *Anopheles* (Pardue ML i Debaryshe PG 2008).

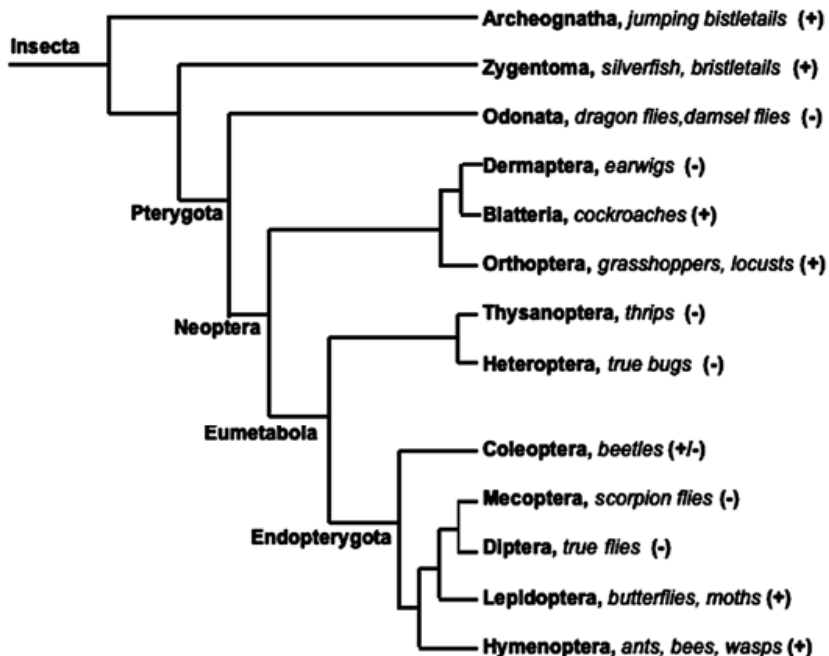


Figura 9. Arbre filogenètic de diferents ordres d'insectes on s'indica la presència (+) o no (-) de repeticions telomèriques TTAGG (Pardue ML i Debaryshe PG 2008).

Un cas especialment interessant és el de *Bombyx mori*, el cuc de seda, ja que presenta els dos sistemes de manteniment telomèric: repeticions TTAGG característiques de la Telomerasa, i retrotransposons telomèrics no-LTR anomenats *SART1* i *TRASI* (Fujiwara H et al 2005). A *Trybolium castaneum* s'han trobat també repeticions telomèriques TCAGG (poc usuals) i l'ortòleg de *SART1* de *B. mori* (anomenat *SARTTc1*) que és més proper filogenèticament al *SART1* de *B. mori* que al *TRASI* dels telòmers del cuc de seda (Osanai M et al 2006). No obstant, s'ha observat que la TERT de *B. mori* presenta uns nivells de transcripció molt baixos i que no es detecta a tots els seus teixits (Sasaki T i Fujiwara H 2000; Osanai M et al 2006). Tots dos organismes són doncs possibles intermediaris evolutius entre ambdós mecanismes de manteniment telomèric.

1.5. El Targeting telomèric a *Drosophila*

Les proteïnes Gag són un dels productes principals dels retrotransposons *HeT-A* i *TART*, i es creu que juguen un paper important en el seu *targeting* o localització telomèrica durant la transposició.

S'ha observat que la proteïna Gag de *HeT-A* es dirigeix eficientment als telòmers de nuclis diploides en interfase (Rashkova S et al 2002b; Pardue ML et al 2005). A la Figura 10 s'observa la localització intracel·lular de *HeT-A* Gag al final dels telòmers. A la imatge es pot veure que aquesta proteïna forma punts dins el nucli anomenats *HeT-dots*, i sovint crea també una acumulació citoplasmàtica de mida considerable anomenada *HeT-body*. A més, s'ha observat que a altres espècies de *Drosophila* filogenèticament

Il·lunyanes a *Drosophila melanogaster* la localització nuclear de la proteïna Gag de *HeT-A* és força similar a aquesta (Casacuberta E et al 2007).

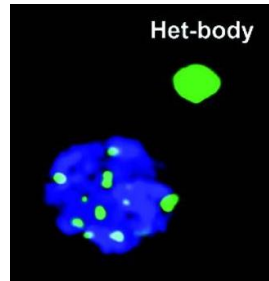


Figura 10. Imatge presa per microscòpia de fluorescència d'una cèl·lula S2 de *Drosophila melanogaster* transfectada transitòriament amb el constructe *HeT-A* Gag-GFP. El DNA està tenyit amb DAPI (en blau). S'observa en verd la localització de la proteïna *HeT-A* Gag-GFP al *HeT-body* (acumulació citoplasmàtica) i als *HeT-dots* (punts intranuclears). (Rashkova S et al 2002b).

La proteïna Gag de *TART* també és transportada eficientment als nuclis interfàsics. Com s'observa a la Figura 11, *TART* Gag forma petits clústers escampats pel nucli.

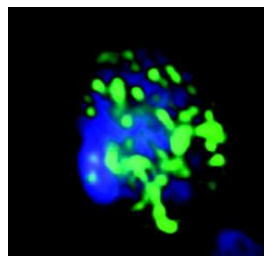


Figura 11. Imatge presa per microscòpia de fluorescència d'una cèl·lula S2 transfectada transitòriament amb el constructe *TART* Gag-GFP. Tinció del DNA amb DAPI (blau) (Rashkova S et al 2002b).

No obstant, a diferència de *HeT-A*, la Gag de *TART* no s'associa per sí mateixa als telòmers. Només quan hi ha *HeT-A* Gag les dues Gags (la de *HeT-A* i la de *TART*) poden co-localitzar als telòmers (Rashkova S et al 2002b). Aquest fet suggereix, com s'ha esmentat abans, que els dos elements col·laboren entre ells: *HeT-A* proveiria l'especificitat per als telòmers i *TART* proporcionaria la Transcriptasa reversa. Per aquesta raó sembla raonable que els dos elements es trobin junts a la cèl·lula (Pardue ML i Debaryshe PG 2008).

S'ha pogut observar a més que les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Gag co-localitzen al nucli, tal com ho indiquen els resultats de co-transfecció a cèl·lules S2 amb les seves proteïnes de fusió, publicats a Rashkova S et al 2003 (Figura 12).

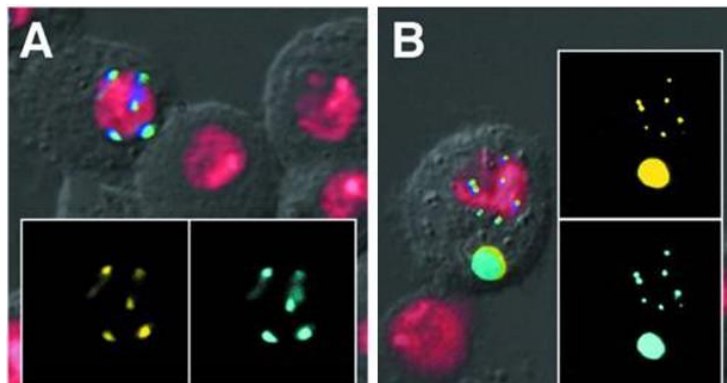


Figura 12. Localització intracel·lular de les proteïnes *HeT-A* Gag-YFP (groc) i *TART* Gag-CFP (blau clar) co-transfectades a cèl·lules S2. El DNA està marcat amb DAPI (vermell). (A) Co-localització de *HeT-A* Gag i *TART* Gag als *HeT-dots*; (B) Co-localització d'ambdues proteïnes als *HeT-dots* i al *HeT-body* (Rashkova S et al 2003). La co-localització de *HeT-A* Gag-YFP i *TART* Gag-CFP es visualitza de color verd.

Val a dir a més, que aquest *targeting* telomèric de la proteïna *HeT-A* Gag de *Drosophila melanogaster* es troba conservat a *Drosophila virilis*, i que la

Gag del retrotransposó *HeT-A* de *Drosophila virilis* és capaç de localitzar correctament als telòmers de *Drosophila melanogaster* i a la inversa (Casacuberta E et al 2007).

Tot i haver-se comprovat experimentalment el *targeting* telomèric de *HeT-A* Gag a *Drosophila melanogaster*, es desconeix encara quines altres proteïnes podrien estar-hi implicades i quins són els mecanismes específics pels quals es dona.

1.6. Proteïnes que interaccionen amb els telòmers

El *capping* telomèric és un procés vital dut a terme per múltiples proteïnes amb l'objectiu de protegir els extrems terminals dels cromosomes, evitant que els telòmers siguin reconeguts com a trencaments de DNA de doble cadena. A les repeticions telomèriques dels telòmers d'humà i llevat es recluten complexos de proteïnes que controlen l'accés de la Telomerasa, el silenciament de gens i les estructures *t-loop* (Wei C i Price M 2003). A *Drosophila* el complex proteic de *capping* s'uneix de manera independent de seqüència (Fanti L et al 1998). A la Figura 13 es poden observar les principals diferències de proteïnes associades als telòmers de mamífer i *Drosophila*.

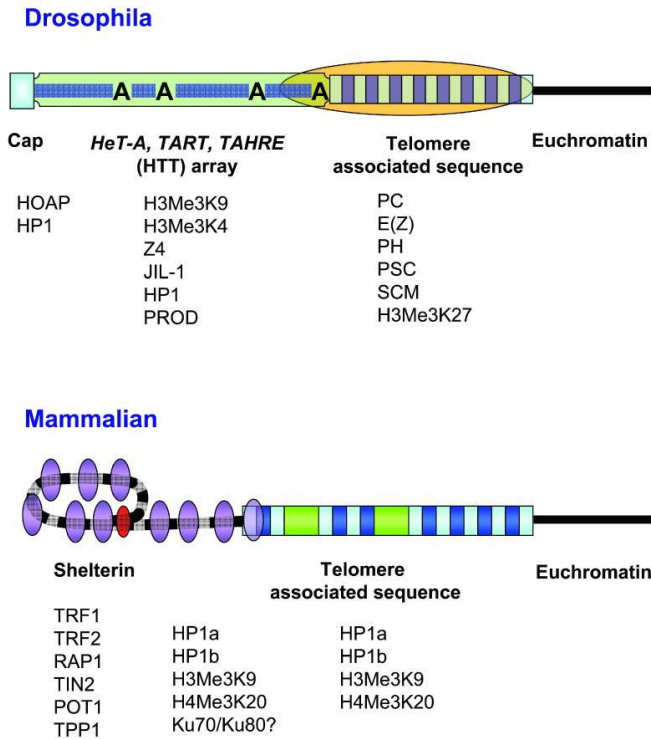


Figura 13. Representació de les estructures telomèriques de *Drosophila* i mamífer, i les diferents proteïnes que s'hi associen. A *Drosophila*, el complex de *capping* (rectangle blau clar) està format per proteïnes que s'uneixen a l'heterocromatina de forma independent de seqüència. L'*array* HTT format pels retrotransposons *HeT-A*, *TART* i *TAHRE* té marcades les cues d'oligo(A)s situades en direcció cap al centròmer, té propietats d'euromatina i s'hi uneixen proteïnes que es troben tant en euromatina com en heterocromatina. A les repeticions subtelomèriques (TAS) (rectangles liles i verds alternats) s'hi associen uns complexos de silenciament diferents (oval taronja) que s'expandeixen fins la regió proximal de l'*array* HTT. Les funcions de *capping* del final del cromosoma estan doncs clarament separades del domini heterocromatínic i de silenciament TAS. En canvi, a cèl·lules humanes, les repeticions TTAGGG generades per la Telomerasa (línia de trams negres i grisos alternats) formen l'estructura de *t-loop*, la qual és estabilitzada per proteïnes específiques (oval vermell). La unió de proteïnes a les repeticions telomèriques crea

l'assemblatge d'un complex de silenciament heterocromatínic anomenat Telosoma o Shelterin (ovals violetes) que arriba fins la regió del TAS. Per tant, el *capping* i el silenciament a mamífers es centren en les repeticions telomèriques. Les proteïnes associades es troben escrites a sota de cada estructura. A la figura però no s'hi observa que el *cap* i el Shelterin estan mantinguts per proteïnes de resposta a danys en el DNA, ATM i el complex MRN. (Tret de Mason JM et al 2008).

1.6.1. El complex de *capping* telomèric

S'han pogut identificar diverses proteïnes que formen part del complex de *capping* telomèric de *Drosophila* observant que les mutacions dels seus gens provoquen fusions dels telòmers. Aquestes corresponen als gens: *su(var)-2,5* (HP1), *caravaggio* (Hoap), *tefu* (l'homòleg a *Drosophila* de la quinasa ATM); *ubcD1*, *rad50* i *mre11* (que codifiquen per a proteïnes de reparació del DNA, imprescindibles per a la localització d'HP1 i Hoap a telòmers); *woc*, *umbrea*, i *HipHop* (HP1-HOAP-interacting protein) (Cenci G et al 2005; Raffa GD et al 2005; Casacuberta E et al 2007; Joppich C et al 2009; Gao G et al 2010).

La proteïna **HP1** (*Heterochromatin Protein 1*), codificada pel gen *su(var)2-5*, presenta tres isoformes diferents a *Drosophila* (a, b i c). Totes tres tenen un domini *chromo* (CD) a l'extrem amino-terminal, un domini *chromo shadow* (CSD) al carboxi-terminal, i un *hinge* (H) a la part central (Cenci G et al 2005). L'isoforma HP1a és la que s'ha relacionat amb telòmers (Fanti L et al 1998; Cenci G et al 2005; Casacuberta E et al 2007), i és per tant l'isoforma a la qual es farà referència d'ara en endavant en parlar de manera general d'HP1. A més, s'ha trobat que l'isoforma HP1c interacciona amb la proteïna Woc (Font-Burgada J et al 2008).

Tal com s'exposa a Fanti L et al 1998, HP1 localitza als telòmers de *Drosophila* i la seva mutació provoca l'aparició de fusions telomèriques. Als

telòmers, HP1 interacciona amb diverses proteïnes, entre elles Hoap (*HP1/ORC-associated protein*), formant el complex de *capping* telomèric (Cenci G et al 2003a).

Com el seu nom indica, l'*Heterochromatin Protein 1* (HP1) es troba a regions heterocromatíniques. No obstant, tal com s'explica a Piacentini L et al 2009, HP1a s'uneix als RNAs de diversos gens amb transcripció activa i en regula l'expressió juntament amb altres proteïnes amb les quals interacciona, anomenades hnRNP (*Ribonucleoproteïnes nuclears heterogènies*). Les hnRNP estan relacionades amb heterocromatina i processament d'RNAs. Entre aquestes proteïnes s'hi troba PEP (*Protein on Ecdysone Puffs*), de la qual es parlarà més endavant. La proteïna HP1a interacciona amb PEP i s'ha observat que ambdues co-localitzen a cromosomes politènics (Piacentini L et al 2009).

La proteïna **Hoap** (*HP1/ORC-associated protein*), codificada pel gen *caravaggio (cav)*, s'uneix als telòmers i la seva mutació en causa fusions (Cenci G et al 2003a; Cenci G et al 2005). A la Figura 14 s'observa la co-localització de les proteïnes *HeT-A* Gag i Hoap als telòmers, no obstant, s'ha comprovat que no interaccionen directament entre elles (Rashkova S et al 2002b).

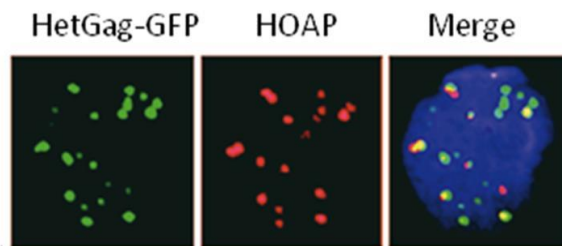


Figura 14. Imatges preses per microscòpia de fluorescència d'una cèl·lula S2 transfectada transitòriament amb el constructe *HeT-A* Gag-GFP (en verd) i marcada per a Hoap (en vermell). El DNA es troba marcat amb DAPI (en blau) (Rashkova S et al 2002b). La co-localització d'ambdues proteïnes es visualitza en groc.

Ku és una proteïna heterodimèrica formada per les subunitats Ku70 i Ku80. Principalment activa la via de reparació de trencaments del DNA de doble cadena, anomenada NHEJ (*nonhomologous end-joining*), reclutant als telòmers els diferents enzims que hi participen (Melnikova L et al 2005). S'ha demostrat que diverses proteïnes de reparació són vitals per a la funció dels telòmers (Melnikova L i Georgiev P 2005). De fet, Ku regula la longitud telomèrica controlant-hi l'accés de la Telomerasa en alguns casos (Melnikova L et al 2005; Wu TJ et al 2009). La seva deficiència provoca fusions telomèriques a mamífers, i a *Drosophila* incrementa la transposició de *HeT-A* i *TART* contribuint a l'elongació dels telòmers (Melnikova L et al 2005). S'ha proposat que Ku70 i Ku80 podrien tenir funcions diferents als telòmers de *Drosophila* i que probablement Ku70 no participi en el complex de *capping* telomèric ja que la seva deficiència no provoca fusions dels telòmers (M. Gatti, comunicació personal). No obstant, no s'ha demostrat encara si alguna de les dues subunitats ho fa. Sí que s'ha vist però que Ku forma aquest complex en llevats i això, sumat al fet que la manca de Ku causa la desprotecció dels extrems cromosòmics, fa pensar que aquesta podria ser la principal reclutadora/assembladora del complex de *capping* terminal als telòmers de *Drosophila* (Melnikova L et al 2005).

La proteïna **Woc** (*Without children*) de *Drosophila* localitza als telòmers i les regions del genoma que es transcriuen activament. Té també una funció de *capping* telomèric, però independent a la d'HP1, Hoap, Tefu o Rad50 (Raffa GD et al 2005). El seu homòleg a humà està implicat en síndromes de leucèmia i retard mental. A *Drosophila* en canvi evita l'aparició de fusions telomèriques, però es desconeix encara el mecanisme amb què ho fa. S'han plantejat dues possibles hipòtesis: que Woc participi directament en l'organització estructural de la cromatina telomèrica; o que controli la transcripció dels gens que codifiquen per a proteïnes del *capping* telomèric. Woc és necessària per a un correcte desenvolupament de la mosca, ja que els seus mutants tenen afectada la síntesi de l'ecdisona (hormona imprescindible

per poder dur a terme la metamorfosi) i són incapaços de pupar (Wismar J et al 2000).

Umbrea ve codificada per un gen de poc més de 300 bp i interacciona amb Hoap, HP1 i HipHop (Joppich C et al 2009). HipHop participa en el silenciament epigenètic de la transcripció de gens i en la formació d'heterocromatina. Totes tres proteïnes generen un complex proteic, colocalitzen a l'heterocromatina i regulen els telòmers de *Drosophila*. S'ha vist que els mutants d'*umbrea* presenten fusions telomèriques. Umbrea està formada quasi exclusivament per un domini *chromo shadow* similar al que conté HP1 i que permet que ambdues heterodimeritzin. Així és com HP1 controla el *targeting* genòmic d'Umbrea. La interacció d'Umbrea amb Hoap i HP1 és de tipus proteïna-proteïna. La unió a estructures telomèriques no implica necessàriament que una proteïna formi part del *cap* telomèric (Joppich C et al 2009), no obstant com que HP1 i HOAP formen part del complex de *capping* i Umbrea interacciona tant amb HP1 com amb Hoap, pot especular-se que Umbrea també localitzi a la regió del *cap* telomèric.

1.6.2. Proteïnes que s'uneixen a l'array de retrotransposons telomèrics (HTT)

A la Figura 13 es poden observar les proteïnes que s'uneixen a l'array de retrotransposons telomèrics, anomenat HTT ja que està format per *HeT-A*, *TART* i *TAHRE*. Als cromosomes politènics de mosques mutants *Tel* (*Telomere elongation*) amb telòmers més llargs s'han pogut identificar les proteïnes Jil-1 i Z4 associades específicament a la seqüència HTT però no al complex de *capping* telomèric, així com les modificacions d'histones H3Me3K9 (implicada en heterocromatina) i H3Me3K4 (d'eucromatina) (Andreyeva EN et al 2005). També s'ha observat la unió de la proteïna Prod a la seqüència HTT de *Drosophila* però no al seu *cap* telomèric (Török T et al 2007). A més la proteïna HP1, la qual forma part del *capping complex*,

localitza també a l'*array* HTT (Frydrychova RC et al 2008), concordant amb els resultats publicats anteriorment on es va observar que els seus mutants presentaven un increment d'expressió de *HeT-A* i telòmers més llargs (Perrini B et al 2004).

Les proteïnes Z4 i Jil-1 localitzen a les interbandes dels cromosomes politènics i ajuden a mantenir-ne l'estructura (Eggert H et al 2004; Deng H et al 2005). De fet va suggerir-se a Gan M et al 2011 que ambdues proteïnes podrien estar interaccionant entre elles.

La proteïna **Z4** s'ha anomenat també Putzig. Z4 realitza una funció tant d'activació com de repressió de la transcripció en funció de les proteïnes amb què interacciona, afectant l'estat de la cromatina dels gens als quals s'associa. S'ha trobat que forma part de tres complexos remodeladors de la cromatina diferents. Per una banda, Z4 s'associa al complex activador de la transcripció de gens relacionats amb la replicació anomenat TRF2/DREF (*TATA-binding protein-Related Factor 2/DNA Replication-related Element Factor*) (Kugler SJ i Nagel AC 2007). Z4 però també fa d'activador de la transcripció de gens de la via de Notch quan forma part del complex NURF (Kugler SJ i Nagel AC 2007; Kugler SJ i Nagel AC 2010). En canvi, quan s'associa a la proteïna Ken (unida a NURF) fa de co-repressor de la via de JAK/STAT (Kugler SJ et al 2011). Per tant havent-se trobat aquesta proteïna a la seqüència HTT, podria suggerir-se que Z4 està regulant l'expressió dels retrotransposons telomèrics (així com potser també ho farien les proteïnes amb les quals interacciona). De fet, com s'explica en més detall a continuació, hem pogut comprovar al nostre laboratori que Z4 és una proteïna reguladora de l'expressió de *HeT-A* (Silva-Sousa R et al 2012).

Jil-1 és una quinasa de la Serina 10 de la histona H3 que durant la interfase activa la transcripció de diversos gens (Wang Y et al 2001; Deng H et al 2008). Jil-1 interacciona amb H3 (Bao X et al 2008), així com amb la Lamina (Bao X et al 2005), i la proteïna Chromator o Chriz que localitza al

fus mitòtic durant la mitosi (Rath U et al 2006). A més, Jil-1 participa en la correcta segregació cromosòmica (Rath U et al 2004) i està implicada en la regulació de l'estructura de la cromatina (Eggert H et al 2004).

Jil-1 podria ser doncs una proteïna que vinculés *HeT-A* Gag amb la Lamina (fent de vincle amb la membrana nuclear, ja que els telòmers de *Drosophila* hi localitzen molt propers) en el cas que aquestes dues (Lamina i *HeT-A* Gag) no interaccionessin directament entre elles. D'altra banda, Jil-1 també podria estar activant la transcripció dels retrotransposons telomèrics com s'ha vist que fa amb determinats gens.

Un treball publicat al nostre laboratori durant la realització d'aquesta tesi, i en el qual he participat, descriu el paper de les proteïnes Jil-1 i Z4 com a reguladores de la transcripció de *HeT-A*, essent-ne Jil-1 un activador d'expressió i Z4 un repressor. Concretament, els mutants de Jil-1 presenten una reducció de l'expressió de *HeT-A* i un increment de marques de silenciament de la cromatina com H3K9me3 i HP1a al promotor de *HeT-A* (Silva-Sousa R et al 2012). A més, hem pogut observar que també participen en la regulació de *HeT-A* i *TART* les proteïnes DREF, TRF2 i Ken, les quals interaccionen amb Z4 (Silva-Sousa R et al 2013). Els resultats presentats per un altre treball del nostre grup suggereixen que Jil-1 podria estar actuant com una barrera evitant l'escampament de l'heterocromatina subtelomèrica fins a la regió telomèrica eucromatínica (HTT) de *Drosophila* (Silva-Sousa R i Casacuberta E 2013).

D'altra banda, s'ha descrit que la proteïna **Prod** s'uneix als telòmers al 3'UTR de *HeT-A* (Török T et al 2007). Els mutants de *prod* tenen incrementada l'expressió de *HeT-A*, però no presenten cap afectació a nivell de longitud telomèrica (Török T et al 2007). La proteïna Prod és doncs una reguladora negativa de l'expressió de *HeT-A*.

A *Drosophila* la metilació d'H3K9 (H3me3K9) que contribueix a la formació d'heterocromatina la duen a terme tres metilases diferents: Su(var)3-9, dSETDB1 i dG9a (Schotta G et al 2004; Seum C et al 2007a); no obstant, no totes elles tenen un efecte en els transposons telomèrics de *Drosophila*. S'ha comprovat que la mutació de *su(var)3-9* no altera el silenciament de *HeT-A* (Perrini B et al 2004), però en canvi els mutants de *dSetdb1* sí que tenen incrementada l'expressió d'aquest retrotransposó (Phalke S et al 2009; Gou D et al 2010). Per tant, dSETDB1 participa en el silenciament de *HeT-A*.

D'altra banda, al domini subtelomèric TAS (*Telomere Associated Sequence*) de *Drosophila* s'hi han pogut identificar també diverses proteïnes repressores (veure la Figura 13). Per una banda s'hi observen proteïnes que reprimeixen la transcripció del grup *Polycomb* (PcG) com són E(Z) (*Enhancer of Zeste*), Pc (*Polycomb*) o Brm (*Brahma*); així com la marca d'heterocromatina H3me3K27 (Boivin A et al 2003; Andreyeva EN et al 2005; Doheny JG et al 2008; Frydrychova RC et al 2008).

1.7. Cèl·lules amb replicació telomèrica a *Drosophila*

Les transposicions dels retrotransposons telomèrics de *Drosophila* es troben altament controlades per evitar l'aparició de mutacions que causin danys greus al genoma (veure l'apartat 1.8. *Regulació de la transposició d'elements mòbils*). Dins d'aquesta regulació cal tenir en compte però que també es requereix l'expressió dels retrotransposons telomèrics quan cal replicar els telòmers. La majoria de teixits no necessiten replicar-los, a excepció dels òrgans que realitzen una divisió cel·lular activa, com són la línia germinal a l'adult (ovarís i testicles), i el cervell i els discos imaginals a la larva. És per aquesta raó que aquests teixits són els que permeten estudiar millor els retrotransposons telomèrics i són els que hem emprat per a la caracterització de *HeT-A* i *TART* (a l'apartat 4. *Resultats*).

1.7.1. Els neuroblasts de *Drosophila*

Al cervell de les larves de *Drosophila* s'hi troben els precursors de les neurones de l'adult, anomenats neuroblasts. Els neuroblasts es formen entre els estadis 9 i 11 embrionaris a partir del neuroepiteli que es troba situat a la regió ventrolateral de l'embrió. Poc després de la seva formació comencen a dividir-se, realitzant diverses mitosis cel·lulars fins l'estadi de pupa. Aquestes divisions tenen lloc en dues fases de neurogènesi diferents, la primera es dona a l'embrió i la segona durant l'estadi de larva (Homem CC i Knoblich JA 2012). Les nombroses divisions que han de dur a terme aquestes cèl·lules fan doncs necessària la replicació dels seus telòmers. A més a més, hem pogut comprovar al nostre laboratori que la replicació telomèrica és necessària a neuroblasts (Silva-Sousa R et al 2012), així com també ha estat possible visualitzar les proteïnes telomèriques de *Drosophila* mitjançant immunodetecció a cervells de larves (Zhang L et al 2014).

1.7.2. Els ovaris de *Drosophila melanogaster*

Cada femella de *Drosophila* disposa de dos ovaris simètrics connectats entre sí per un oviducte comú. Els ovaris de femelles adultes consten de diversos estadis de desenvolupament consecutius (6-8 cambres ovàriques) dins de cada ovariol, i tots els ovaris d'un mateix ovari (12-18 ovaris/ovari) es troben agrupats en forma de flor o raïm (veure la Figura 15).

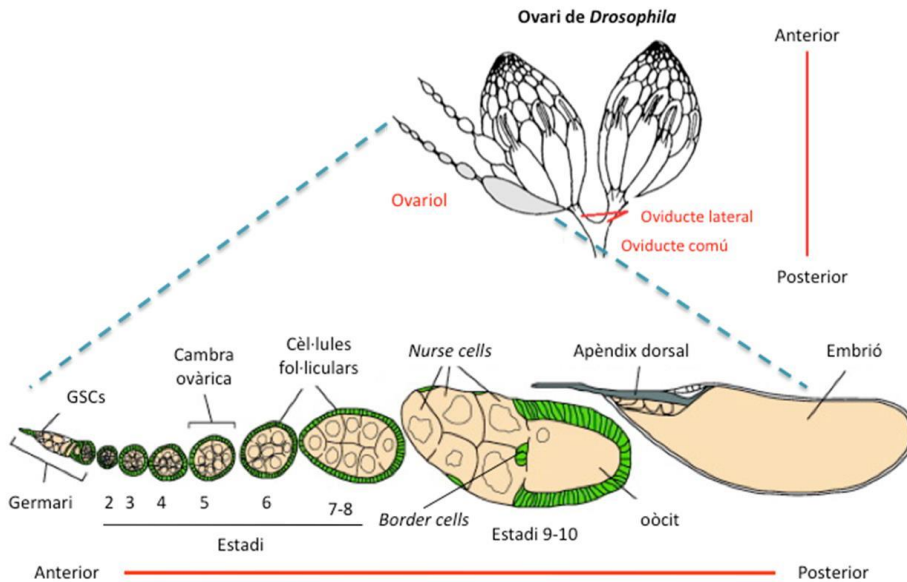


Figura 15. Dibuix esquemàtic d'un ovari de *Drosophila* i ampliació d'un dels seus ovariols. En verd es troben marcades les cèl·lules somàtiques, i en salmó les cèl·lules de línia germinal: les *nurse cells* i l'oòcit. (Adaptat de Frydman HM i Spradling AC 2001).

A l'ovariol, el desenvolupament s'inicia al germari i segueix de l'estadi 1 fins al 14 (on es forma ja l'embrió temprà). L'orientació de les cambres ovàriques sempre és la mateixa, amb el pol posterior orientat en el sentit contrari al del germari (Bilder D i Haigo SL 2012). La cambra ovàrica té forma esfèrica de l'estadi 2 al 7, i s'elonga entre els estadis 8 i 14 (Spradling AC 1993; Bilder D i Haigo SL 2012).

Cada estadi de desenvolupament d'un ovariol està format per una cambra ovàrica o fol·licle que conté dos tipus cel·lulars ben diferenciats. Per una banda, les cèl·lules de línia germinal que componen el cist (és a dir, les *nurse cells* i l'oòcit); i per una altra, les cèl·lules somàtiques anomenades fol·liculars.

Un fol·licle conté 16 cèl·lules de línia germinal al seu interior. Poc després

de la formació de la cambra ovàrica al germari, una de les cèl·lules de línia germinal es diferencia a oòcit i duu a terme meiosis, mentre que les altres 15 cèl·lules s'anomenen *nurse cells* i realitzen endoreplicacions (veure'n l'explicació més endavant a l'apartat 1.7.3. *L'endoreplicació a ovaris de Drosophila*) (Spradling AC 1993).

Les *nurse cells* són cèl·lules germinals poliploides que envolten l'oòcit (localitzat al pol posterior del fol·licle), i són les responsables d'aportar-li les proteïnes i RNAs necessaris per al seu correcte desenvolupament. Estan connectades entre elles i amb l'oòcit a través de *ring channels*, a conseqüència de les citocinesis incompletes que tenen lloc en les 4 mitosis inicials que duen a terme. Les *nurse cells* contenen els RNAs d'origen matern que l'oòcit necessitarà durant els primers estadis de desenvolupament, ja que el zigot no realitza encara cap transcripció (Bilder D i Haigo SL 2012).

Les cèl·lules fol·liculars són cèl·lules somàtiques formades a partir de les seves precursoras (SSCs) a l'estadi 2b del germari (on creen un nínxol que manté les GSCs; veure'n l'explicació a continuació). Les cèl·lules fol·liculars migren per envoltar cada fol·licle de 16 cèl·lules germinals (Frydman HM i Spradling AC 2001). Són una monocapa simple epitelial que contacta per la superfície apical amb la línia germinal i per la basal amb la membrana basal (Bilder D i Haigo SL 2012). Envoltent tota la cambra ovàrica fins l'estadi 8 i a partir de l'estadi 9 es troben només a la seva meitat posterior, envoltant-ne únicament l'oòcit. En aquest estadi últim, les cèl·lules fol·liculars passen de tenir una forma cuboïdal a columnar (Montell DJ 2003). Són cèl·lules poliploides (com les *nurse cells*) i envolten l'oòcit en desenvolupament per permetre la vitel·logènesi i la formació de la closca de l'embrió (*eggshell*) (Lee HO et al 2009).

L'estadi més temprà de l'oogènesi, com s'ha esmentat ja anteriorment, és el germari (situat a la part més anterior de l'ovariol). Conté les cèl·lules mare

(amb capacitat de regenerar-se a sí mateixes) i es troba unit a l'estadi 1 de desenvolupament per la seva part més posterior (Figura 15). El germari alberga tres tipus diferents de cèl·lules mare: cèl·lules mare de línia germinal (*Germline Stem Cells*; GSCs), cèl·lules mare escorta (*Escort Stem Cells*; ESCs), i cèl·lules mare somàtiques (*Somatic Stem Cells*; SSCs) (Dansereau DA i Lasko P 2008; Dufourt J et al 2014).

Les GSCs són les úniques cèl·lules de línia germinal mitòticament actives a l'ovari i es troben vora l'extrem anterior del germari, on un petit grup de cèl·lules somàtiques que no es divideixen anomenades *cap cells* les hi tenen ancorades (Dansereau DA i Lasko P 2008). Quan una GSC es divideix se n'obtenen dues cèl·lules filles: una d'elles serà una nova GSC idèntica que romandrà al nínxol, i l'altra anomenada *cistoblast* durà a terme quatre cicles de divisions mitòtiques que generaran els cists de 2, 4, 8 i 16 cèl·lules germinals respectivament, interconnectades entre elles a conseqüència de les citocinesis incompletes que duen a terme (Dufourt J et al 2014). De fet, les GSCs deriven de les *Primordial Germ Cells* (PGCs), les quals provenen de les *pole cells* que són el primer tipus cel·lular que es defineix a l'embrió (Dansereau DA i Lasko P 2008).

Les *pole cells* es generen després de la primera cel·lularització que té lloc a l'embrió en estadi de sinciti (*syncytial embryo*) (veure l'apartat 1.7.5. *L'embrió de Drosophila melanogaster*). Quan les *pole cells* es formen adquireixen el citoplasma del *pole plasm* o *germplasm* d'origen matern, fent que quedi marcat així el seu destí com a línia germinal de la futura mosca adulta.

El *pole plasm* s'assembla i estableix al pol posterior de l'oòcit en desenvolupament abans que sigui fecundat. Està constituït per grànuls polars (*polar granules*) i és essencial per a la correcta localització de Nanos, un morfogen posterior. Els grànuls polars són agregats fibrosos carregats d'electrons que contenen RNAs i proteïnes. Els components del *pole plasm* són produïts per les *nurse cells* durant l'oogènesi i passen a l'oòcit a través

dels *ring channels*. Un component imprescindible dels grànuls polars és l'RNA d'*oskar*, el qual s'acumula a la regió posterior del citoplasma de l'oòcit i és necessari per reclutar les proteïnes Vasa i Tudor, fent possible que s'iniciï la via d'assemblament dels grànuls polars (Dansereau DA i Lasko P 2008). Un altre component important del *pole plasm* és Piwi, una proteïna de la via dels PIWI/piRNAs implicada en el silenciament de gens (veure l'apartat 1.8. *Regulació de la transposició d'elements mòbils*). Així és com els grànuls polars podrien estar regulant doncs la traducció d'mRNAs d'origen matern. A més de Vasa i Aubergine (reguladors de la traducció, també de la via dels PIWI/piRNAs), els grànuls polars comparteixen diversos components amb l'estructura *nuage* de la qual es parlarà més endavant (veure l'apartat 1.8. *Regulació de la transposició d'elements mòbils*).

Als primers estadis de l'oogènesi es defineixen tres poblacions cel·lulars diferents a partir de les cèl·lules fol·liculars primerenques (Figura 16): les cèl·lules polars (que són centres de senyalització molt importants); les *stalk cells* (que formen un pont curt que connecta dues cambres ovàriques veïnes); i les cèl·lules del fol·licle principal (les quals formen l'epiteli que envolta el cist o fol·licle de cèl·lules germinals) (Assa-Kunik E et al 2007). A partir del moment en què el fol·licle se separa físicament del germari (a l'estadi 2), les cèl·lules precursors de les cèl·lules polars se separen simultàniament, i ràpidament dos parells de cèl·lules polars es desplacen cap a cada pol (anterior i posterior) de l'epiteli fol·licular (Frydman HM i Spradling AC 2001). Els parells de cèl·lules polars dels pols anterior i posterior (Figura 16; en verd) envien senyals que orienten l'actina alineant-la en direcció de circumferència. Les cèl·lules polars són doncs les responsables de polaritzar l'actina en les cèl·lules fol·liculars d'estadi 5-6 (Frydman HM i Spradling AC 2001). Cada cambra ovàrica es troba connectada amb les cambres ovàriques veïnes a través de les "tiges" interfol·liculars (*interfollicular stalks*) formades per les *stalk cells* (Figura 16; en vermell), i va desplaçant-se

posteriorment a mesura que es va desenvolupant.

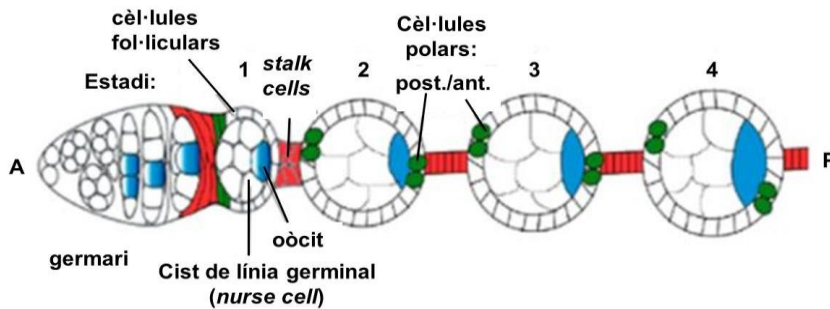


Figura 16. Oogènesi primerenca de *Drosophila*. Representació de l'extrem anterior d'un ovariol salvatge de *Drosophila*: el germari i les 4 primeres cambres ovàriques (estadis 1 a 4). Les cèl·lules polars (en verd) i les *stalk cells* (en vermell) es troben tant a l'estadi precursor (vora el germari) com en els estadis posteriors a la seva diferenciació. L'oòcit està marcat en blau. (Adaptat de Assa-Kunik E et al 2007).

Al final de l'estadi 10, al citoplasma de les *nurse cells* es formen cabdells de filaments d'actina que irradien des de la membrana cel·lular fins al seu nucli. Aquestes gàbies de cabdells d'actina retenen els nuclis de les *nurse cells* al seu lloc, lluny dels *ring channels*. A continuació es perfora l'embolcall nuclear creant-hi forats que permetran que el citoplasma i el plasma nuclear es mesclin més endavant quan s'iniciï el ràpid transport plasmàtic anomenat *dumping* (Matova N et al 1999). Així, a l'estadi 11 es dona la contracció de les *nurse cells*, dirigida per la miosina i emprant la xarxa d'actina filamentosa subcortical, fent que s'alliberi ràpidament tot el contingut de les *nurse cells* a l'oòcit (Matova N et al 1999; Bilder D i Haigo SL 2012). Aquesta ràpida transferència d'uns trenta minuts de durada (*dumping*) provoca que l'oòcit doblí el seu volum fins al final de l'estadi 12 (Mahajan-Miklos S i Cooley L 1994). A partir d'aquest moment, les *nurse cells* van en retrocés i duen a terme apoptosi. És durant les últimes hores de l'oogènesi

quan les cèl·lules fol·liculars produeixen finalment la closca de l'embrió (*eggshell*) (Montell DJ 2003).

1.7.3. L'endoreplicació a ovaris de *Drosophila*

L'endoreplicació és la replicació del genoma nuclear en absència de divisió cel·lular, fet que incrementa el contingut de DNA dins del nucli. Per tant, les cèl·lules que realitzen endoreplicacions són poliploides, ja que disposen de còpies extra de DNA genòmic. A més, les cèl·lules en endoreplicació tenen estretament associades les cromàtides germanes i se les anomena politèniques. L'exemple més conegut de cromosomes politènics es el de les glàndules salivals de *Drosophila*, les quals tenen fins a 2048 còpies del genoma eucromatínic alineades en *arrays* paral·lels (Edgar BA i Orr-Weaver TL 2001).

Una mitosi consta de 4 fases del cicle cel·lular: $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$. Durant l'endoreplicació se succeeixen els cicles S i G, sense passar per l'M, constituint el que s'anomena "endocicle". Per tant a l'endoreplicació no es duu a terme la citocinesi cel·lular, pròpia de l'última fase de la mitosi (Figura 17). L'endoreplicació és un mecanisme que fa possible la diferenciació i morfogènesi de diferents tipus cel·lulars i juga un paper important en el desenvolupament de diverses espècies (Edgar BA i Orr-Weaver TL 2001; Lee HO et al 2009).

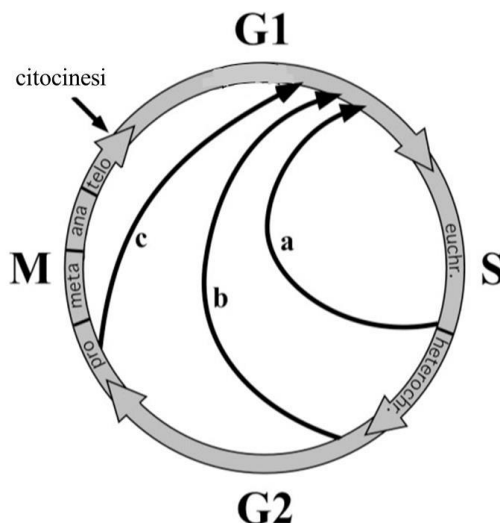


Figura 17. Aspectes de la divergència d'endocicles de la fase S i mitosis de diversa extensió a *Drosophila*. El cercle gris indica el cicle cel·lular d'una mitosi genèrica, i les fletxes negres mostren els cicles cel·lulars truncats en diferents tipus cel·lulars que realitzen endoreplicacions. **a)** teixits larvaris i *nurse cells* d'ovaris després del cicle cel·lular 6; **b)** cicles cel·lulars 1 a 4 de les *nurse cells*; **c)** cicle cel·lular 5 de les *nurse cells*. (Adaptat d'Edgar BA i Orr-Weaver TL 2001).

Després de la formació de la cambra ovàrica, l'únic creixement que es dona és el de la línia germinal mitjançant les endoreplicacions que realitzen les *nurse cells* (que fan incrementar més de cinc mil vegades el seu volum). Paral·lelament, les cèl·lules fol·liculars proliferen fins al final de l'estadi 6, moment en què aturen les mitosis cel·lulars (a conseqüència de la via de senyalització Notch) i comencen a realitzar endoreplicacions que en permetran el creixement (Bilder D i Haigo SL 2012; Lee HO et al 2009) (veure la Figura 18).

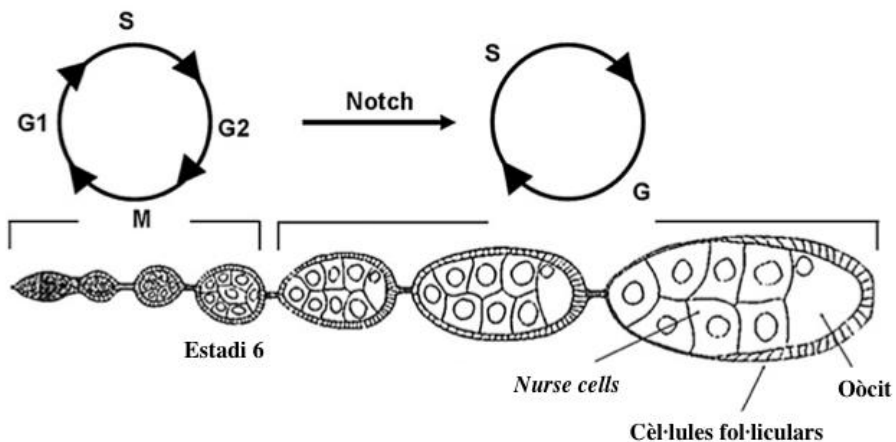


Figura 18. Representació d'un ovariol de *Drosophila* on es troben indicades les diferents fases del cicle cel·lular de les cèl·lules fol·liculars en funció de l'estadi de desenvolupament de la cambra ovàrica. (Adaptat de Lee HO et al 2009).

La via de senyalització Notch és una important reguladora de la transició de mitosis a endocicles de les cèl·lules fol·liculars. Notch és un receptor transmembranal que quan s'uneix als seus lligands (Delta o Serrate) activa el tall del seu domini intranuclear, permetent que aquest pugui entrar dins del nucli i reguli l'expressió de diversos gens a través de diferents factors de transcripció. A la meitat de l'oogènesi (veure la Figura 18) s'inicia la diferenciació terminal de les cèl·lules fol·liculars quan la via de Notch reprimeix els gens necessaris per a la mitosi i activa els que promouen l'endoreplicació (Lee HO et al 2009). La senyalització de Hedgehog (Hh), en canvi, duu a terme una funció antagònica a la de Notch ja que promou la proliferació mitòtica de les cèl·lules fol·liculars.

Les variacions dels nivells d'activació de la via de Notch juntament amb el continu equilibri entre les vies de Notch i JAK/STAT (de funció també antagonista a la de Notch) són els responsables de l'especificació dels diferents tipus de cèl·lules fol·liculars (cèl·lules polars, *stalk cells* o cèl·lules fol·liculars principals) i ajuden a establir la polaritat de la cambra ovàrica (Assa-Kunik E et al 2007). D'altra banda durant els estadis tardans de l'oogènesi, la via de Notch juntament amb l'hormona ecdisona estan implicades en provocar que les cèl·lules fol·liculars passin de realitzar endoreplicacions a amplificar específicament gens implicats en la formació del còrion o closca de l'embrió (Lee HO et al 2009).

Com mostra la Figura 19 s'ha pogut observar que des del germari fins l'estadi 5 els nuclis de les *nurse cells* contenen cromosomes politènics, i que és a partir de l'estadi 6 quan la cromatina es troba per primera vegada descondensada (Dej KJ i Spradling AC 1999).

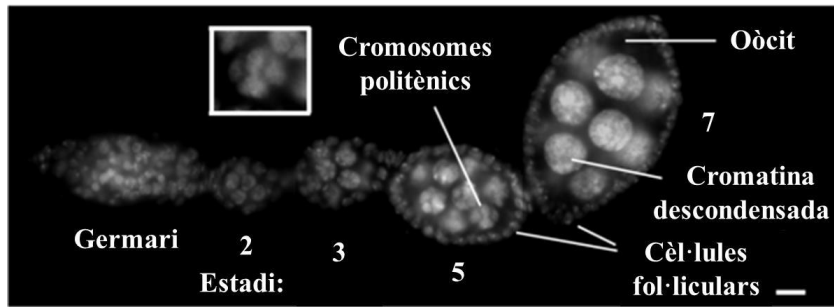


Figura 19. Imatge d'un ovariol format per cambres ovàriques de diferents estadis de desenvolupament. S'hi observen els nuclis cel·lulars mitjançant el marcatge del DNA. La imatge ampliada en un requadre mostra el nucli d'una *nurse cell* d'estadi 5 d'aparença borrosa i amb forma de bulbs ja que conté cromosomes politènics. En canvi, els nuclis de les *nurse cells* d'estadi 7 presenten la cromatina descondensada. La barra representa 10 µm. (Adaptat de Dej KJ i Spradling AC 1999).

Per tant, durant els 5 primers endocicles de les *nurse cells* (que coincideixen amb els 5 primers estadis de desenvolupament) els cromosomes són politènics, amb les cromàtides germanes estretament associades (Dej KJ i Spradling AC 1999). En aquests cicles cel·lulars la replicació del genoma és completa i l'heterocromatina replica tard a la fase S (veure la Figura 17). Després de la fase S del 5è endocicle, els cromosomes es condensen i se separen els uns dels altres. A partir de llavors, als cicles següents, els nuclis presenten aparença de poliploides, no obstant es mantenen associades les cromàtides replicades (Dej KJ i Spradling AC 1999). A més, l'heterocromatina i algunes regions eucromatíniques, com per exemple els gens d'histones, es troben sub-replicats a partir del cicle 6 en endavant (Figura 20).

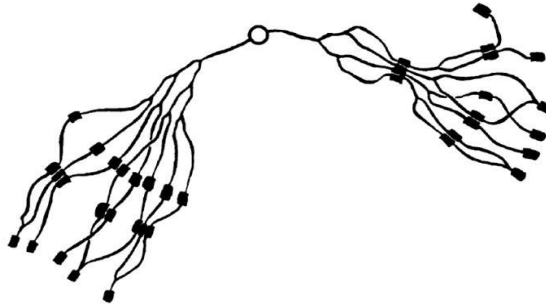


Figura 20. Configuració hipotètica de l'estructura d'un cromosoma politènic d'una *nurse cell* de *Drosophila* en endoreplicació. L'extensió de replicació i l'aparellament de cromàtides germanes es troba indicat amb un requadre negre i varia segons cada regió. El centròmer està representat amb un cercle obert (Edgar BA i Orr-Weaver TL 2001).

1.7.4. Les *border cells*

Les cèl·lules polars deixen de dividir-se poc temps després de passar de ser cèl·lules fol·liculars a polars, mentre que la resta de cèl·lules fol·liculars segueixen dividint-se per mitosis fins l'estadi 6 (Montell DJ 2003). A l'inici de l'estadi 9 les cèl·lules polars anteriors recluten entre 4 i 8 cèl·lules fol·liculars del seu voltant, les quals adopten capacitat migratòria, esdevenint el que es coneix com a *border cells*. Així es forma un clúster compost per dues cèl·lules polars al centre i 4-8 *border cells* al seu voltant (Montell DJ 2003; Rorth P 2009). Les *border cells* més externes es desenganxen de l'epiteli, esdevenen invasives i duen les cèl·lules polars (sense capacitat migratòria) cap al centre de la cambra ovàrica. Es dona llavors la migració de les *border cells* mitjançant quimiotaxi des de la part més anterior de la cambra ovàrica, a través de les *nurse cells*, fins l'òocit, recorrent una distància d'uns 150 μm (veure la Figura 21). Per adherir-se correctament a les *nurse cells* i poder migrar, les *border cells* utilitzen la molècula d'adhesió E-cadherina (Rorth P 2009).

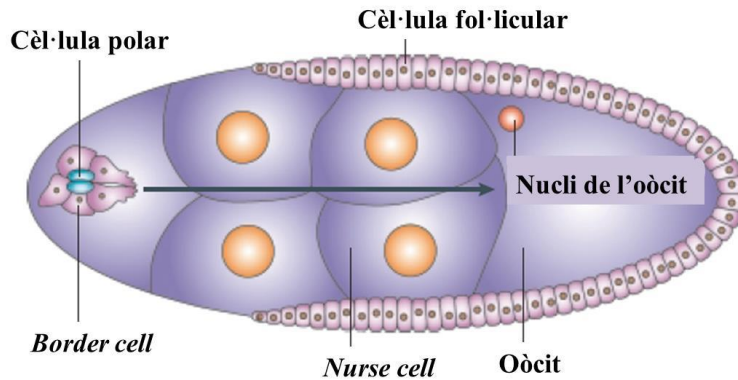


Figura 21. Dibuix dels diferents tipus cel·lulars d'una cambra ovàrica d'estadi 9. En aquest estadi l'epiteli monocapa de cèl·lules fol·liculars està recol·locant-se ja cap a la meitat posterior. La migració de les *border cells* es troba indicada amb una fletxa negra (adaptat de Montell DJ 2003).

Les cèl·lules fol·liculars epitelials necessiten l'activació d'almenys 3 vies de senyalització diferents per esdevenir migratòries i invasives. La primera és la senyalització per part de l'hormona esteroide ecdisona que fa possible la migració cel·lular en el moment adient del desenvolupament. La segona és el senyal de citoquines que defineix quines cèl·lules migraran. I l'última són els senyals provinents de l'oòcit que asseguren que les cèl·lules migrin al lloc correcte, gràcies als receptors de les *border cells* EGFR (*Receptor del factor de creixement de l'epidermis*) i PVR (*Receptor relacionat amb PDGF/VEGF*) que detecten els atraients produïts per l'oòcit (Montell DJ 2003; Rorth P 2009).

La via de senyalització Jak-Stat juga un paper important en el reclutament de les *border cells* fins al clúster i en la seva posterior migració (Montell DJ 2003). De fet aquesta mateixa via es troba activa permanentment en diversos càncers humans, ja que regula la proliferació i supervivència de les cèl·lules tumorals.

A l'inici de l'estadi 10, les *border cells* es troben ja arran l'oòcit, a la frontera entre aquest i les *nurse cells*. És al final d'aquest estadi quan acaben desplaçant-se dorsalment fins situar-se en front del nucli de l'oòcit.

En darrera instància, les *border cells* seran les responsables de formar el pil·li que farà possible l'entrada de l'espermatozou dins l'oòcit per fecundarlo (Rorth P 2009).

1.7.5. L'embrió de *Drosophila melanogaster*

Com s'observa a la Figura 22, quan l'oòcit és fecundat l'embrió replica ràpidament el seu DNA i es donen 13 divisions nuclears fins que s'acumulen un total de 5000-6000 nuclis al citoplasma de l'embrió, el qual encara és comú. Al final de la vuitena divisió, la majoria de nuclis han migrat ja cap a la perifèria de l'embrió i els pocs nuclis que no ho fan s'anomenen nuclis de *yolk* ja que envolten el sac de *yolk* (*yolk sac*). Després de la desena divisió, es formen les *pole cells* al pol posterior de l'embrió. Durant les 13 primeres mitosis embrionàries de *Drosophila* es donen cariocinesis, és a dir, divisions nuclears sense cap citocinesi que generen una cèl·lula multinucleada anomenada sinciti (Foe VE i Alberts BM 1983). Les *pole cells* (cèl·lules precursors de la línia germinal embrionària de la mosca) tenen aquest nom perquè són les primeres cèl·lules mononuclears que es creen al pol posterior de l'embrió. A continuació, després de la tretzena divisió, les membranes cel·lulars invaginen lentament, dividint el sinciti en cèl·lules somàtiques individuals (Foe VE i Alberts BM 1983). Després d'això, s'inicia ja la gastrulació.

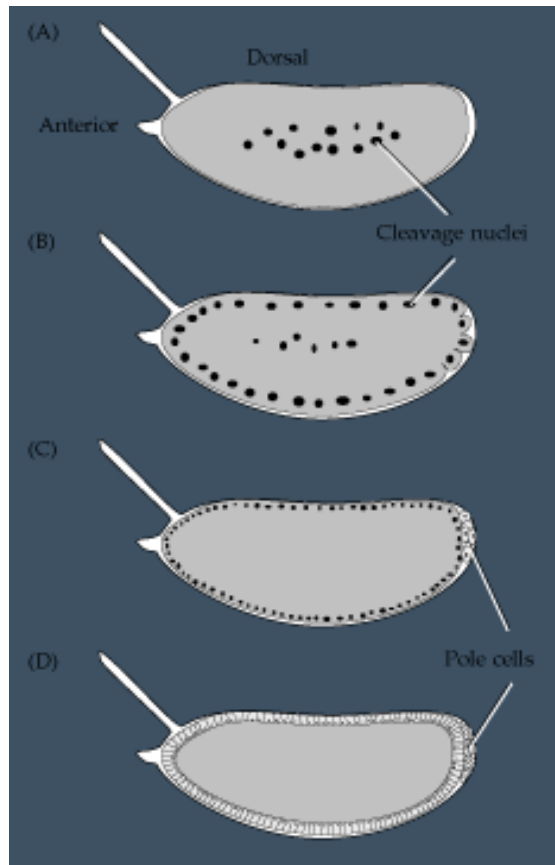


Figura 22. Primers estadis de desenvolupament de l'embrió de *Drosophila melanogaster*. (A) Embrió en estadi d'escissió temprana o *early cleavage* (15 min–1,5 h): els nuclis s'estan dividint a la regió central (*cleavage nuclei*). (B) Migració dels nuclis dividits (1,5 h): els nuclis migren cap a la perifèria. (C) Formació de la blastoderma en fase de sinciti o *syncytial blastoderm* (2 h): les *pole cells* es formen al pol posterior. (D) Blastoderma cel·lular (2,5 h): es formen les membranes cel·lulars entremig dels nuclis. (Imatge treta de: <http://www.developmentalbiology.net/>).

1.8. Regulació de la transposició d'elements mòbils

Les transposicions d'elements mòbils poden causar greus mutacions al genoma de l'hoste, per aquesta raó existeixen diferents mecanismes que les regulen. Aquesta regulació és encara més important a la línia germinal ja que les modificacions de la informació genètica d'aquestes cèl·lules seran transmeses a la següent generació. Així, els retrotransposons telomèrics de *Drosophila* es troben altament controlats al genoma però, com s'ha comentat abans, també es requereix la seva expressió quan cal replicar els telòmers.

Els RNAs petits són importants per al control de l'expressió gènica així com en molts processos biològics que tenen lloc dins les cèl·lules: diferenciació i manteniment de cèl·lules mare, desenvolupament de l'embrió, desenvolupament de la línia germinal, i fins i tot en determinats càncers (Mani SR i Juliano CE 2013).

Existeixen tres tipus d'RNAs petits que participen en vies diferents: miRNAs (microRNAs), siRNAs (RNAs d'interferència petits), i piRNAs (RNAs que interaccionen amb PIWI). A la línia germinal tots tres mecanismes participen a reprimir els retrotransposons, no obstant, el més actiu de tots ells és el de la maquinària dels piRNAs (Aravin AA et al 2001; Brennecke J et al 2007). També s'hi han relacionat altres mecanismes generals de degradació d'mRNAs cel·lulars que tenen lloc en unes estructures citoplasmàtiques anomenades *Processing bodies (P-bodies)* (Lim AK et al 2009).

Les proteïnes PIWI formen part del mecanisme de silenciament de retrotransposons anomenat "via dels PIWI/piRNAs (*PIWI interacting RNAs*)" que es troba majoritàriament a línia germinal, tot i no ser-ne exclusiva ja que recentment s'ha trobat que Piwi localitza també al cervell (Perrat PN et al 2013). Com s'ha esmentat anteriorment, les cambres ovàriques de *Drosophila* presenten unes estructures a les cèl·lules de la línia

germinal anomenades *nuage* que estan especialitzades en el processament d'RNAs mitjançant les proteïnes PIWI. El *nuage* és una estructura perinuclear situada vora el porus nuclear de les *nurse cells* que està composta per ribonucleoproteïnes i és rica en electrons (Lim AK i Kai T 2007).

Les proteïnes Argonata es troben dividides en dues subfamílies: AGO i PIWI. Aquestes proteïnes són imprescindibles per a la regulació de la transcripció mediada per RNAs petits (Mani SR et al 2014). Les proteïnes AGO participen en les vies dels miRNAs i siRNAs a tots els teixits (Mani SR i Juliano CE 2013).

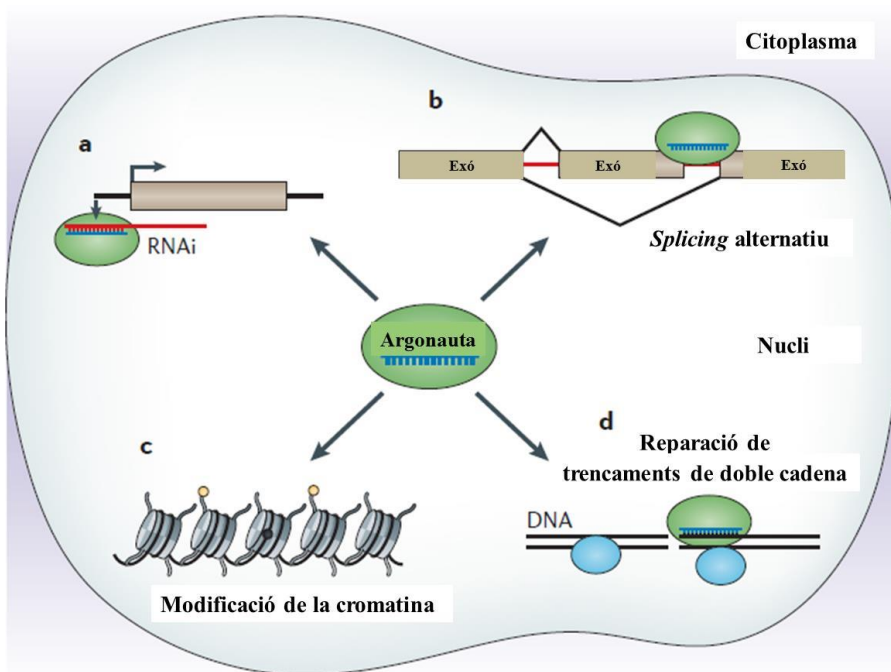


Figura 23. Possibles funcions nuclears de les proteïnes AGO. a) Les proteïnes AGO al nucli són capaces de tallar els RNAs diana complementaris pel mecanisme clàssic d'RNA d'interferència (RNAi). Quan els RNAs són llargs, no codificants i regulen la transcripció gènica, el tall d'aquestes molècules podria activar o reprimir gens segons la funció

d'aquests RNAs no codificants. b) Les proteïnes AGO poden participar també en processos alternatius d'*splicing*. c) A molts organismes, les proteïnes nuclears AGO contribueixen a les modificacions de la cromatina, permetent el silenciament transcripcional. d) S'han identificat RNAs petits generats a partir de regions amb trencaments de doble cadena, i sembla que les proteïnes AGO podrien estar ajudant en processos de reparació d'aquests trencaments del DNA de doble cadena. (Adaptada de Meister G 2013).

En canvi, les proteïnes PIWI s'uneixen només als piRNAs i s'expressen majoritàriament a línia germinal i cèl·lules mare de l'adult (Mani SR i Juliano CE 2013). A *Drosophila*, hi ha tres proteïnes PIWI: Piwi, Aubergine (Aub), i Argonauta 3 (Ago3) (Brennecke J et al 2007; Li C et al 2009). Piwi localitza al nucli i es troba a l'ovari tant a cèl·lules somàtiques (fol·liculars) com germinals, i és vital per mantenir les GSCs. Aub i Ago3 són citoplasmàtiques i estan especialment enriquides a la regió perinuclear del *nuage*, com s'observa a la Figura 24. En principi, Aub i Ago3 es troben únicament a línia germinal, i són necessàries per formar les *pole cells* (Brennecke J et al 2007; Li C et al 2009; Mani SR i Juliano CE 2013; Saito K 2013).

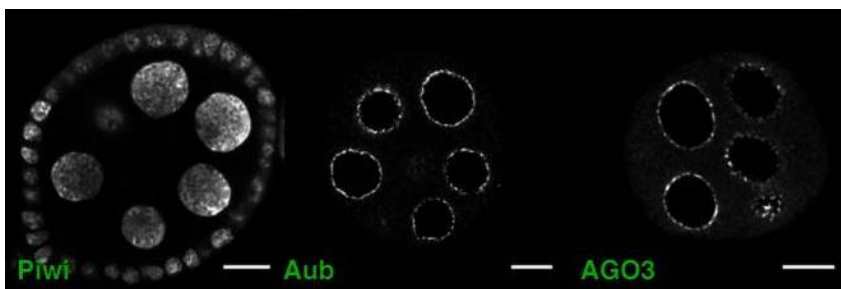


Figura 24. Seccions confocals d'immunodeteccions de cambres ovàriques salvatges on es troben marcades les localitzacions de les proteïnes Piwi, Aub i AGO3 (barres a escala, 10 μ m). (Handler D et al 2013).

S'ha descrit que les proteïnes Vasa, Maelstrom, Armitage i Squash localitzen a l'estructura perinuclear *nuage*, i es creu que també podrien estar implicades en la producció de piRNAs i el silenciament de transposons (Dufourt J et al 2014).

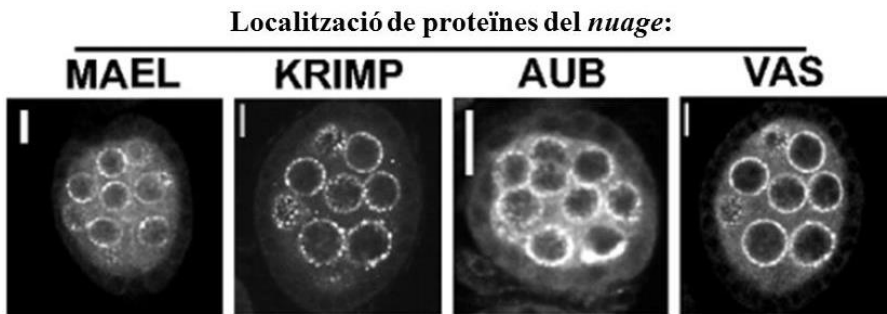


Figura 25. Immunolocalització d'ovaris salvatges de *Drosophila* amb diferents components del *nuage*. Localització de les proteïnes: Maelstrom (MAEL), Krimp (KRIMP), Aubergine (AUB), i Vasa (VAS). (Adaptada de Lim AK i Kai T 2007).

La via dels **siRNA** (*RNA d'interferència petit*) o RNAi (*RNA d'interferència*) l'inicia l'enzim *Dicer*, el qual s'uneix a les molècules d'RNA de doble cadena (dsRNA) i les talla en fragments petits d'uns 20 nucleòtids (siRNA). Una de les dues cadenes de cada fragment, anomenada cadena guia, s'incorpora al complex RISC (*Complex de Silenciament Induït per RNA*). Les bases de la cadena guia s'aparellen amb la seva seqüència complementària, la qual forma part de l'mRNA diana, induint la degradació d'aquest transcrit per part de la proteïna Argonata, el component catalític del complex RISC (Li C et al 2009; Saito K 2013). D'aquesta manera es dona el silenciament post-transcripcional de l'RNA diana. Habitualment, aquest procés s'estén de forma sistemàtica per tot l'organisme encara que la concentració inicial d'siRNA sigui baixa. A les cèl·lules somàtiques i germinals de *Drosophila melanogaster* i als cultius de cèl·lules S2, els

siRNAs endògens provenen d'un conjunt de retrotransposons o RNAs estructurats en forma de *stem-loop* (Meister G 2013). Val a dir també que aquesta és precisament la via que s'activa a les cèl·lules en què s'afegeix *in vitro* un *dsRNA* per difusió o mitjançant procediments de transfecció, així com en mosques mutants RNAi (veure Figura 26).

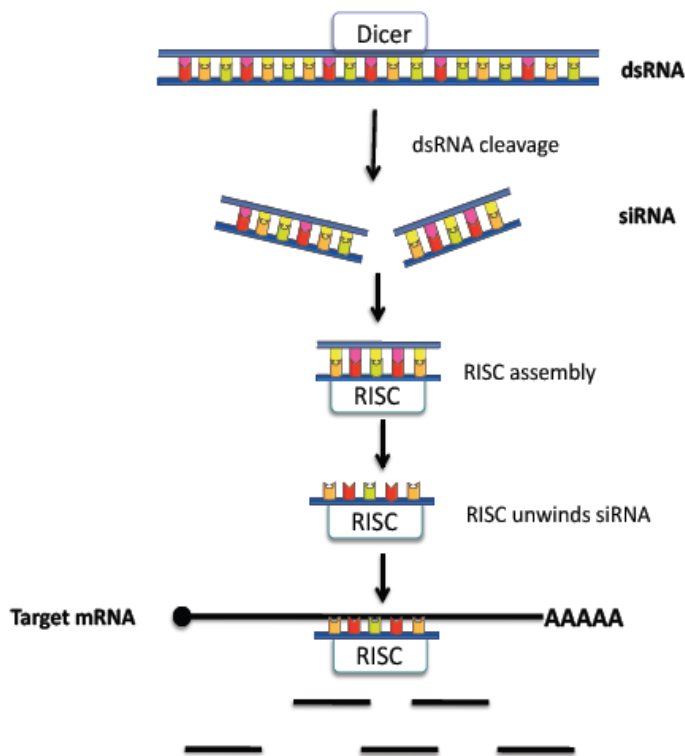


Figura 26. Esquema de la via de silenciament de l'expressió gènica mitjançant RNA d'interferència.

Els **piRNAs** es troben altament expressats a la línia germinal de *Drosophila* i tenen una mida d'entre 21 i 31 nucleòtids. Aquests RNAs estan compostos per moltes seqüències diferents que abasten la seqüència sencera del transposó diana (Saito K 2013). La funció de la via dels PIWI/piRNAs és molt complexa i encara no es coneix del tot bé, però es creu que està

implicada en la regulació de gens i transposons a nivell epigenètic (transcripcional), post-transcripcional, i de traducció (Saito K 2013; Dufourt J et al 2014; Mani SR et al 2014). Estudis recents suggereixen que els piRNAs heretats de la mare són un mecanisme de transmissió d'informació a la descendència sobre els transposons silenciats (Saito K 2013). Un exemple d'això es la Disgènesi híbrida (*hybrid dysgenesis*). La Disgènesi híbrida és un fenomen que provoca esterilitat, trencaments cromosòmics i un increment significatiu de mutacions genòmiques a la descendència, com a resultat de creuar un mascle d'una línia que conté els transposons *P-element* i *I-element* (presentes en línies salvatges lliures a la naturalesa) amb una femella d'una línia que no en té (línia salvatge de laboratori) (Kidwell MG et al 1977). S'ha vist que els *P-* i *I-elements* transmesos per via germinal materna permeten generar piRNAs que protegeixen la descendència de transposicions deletèries (com les de la Disgènesi híbrida) des de la gametogènesi fins l'edat adulta (Brennecke J et al 2008). Per tant, les femelles podrien transmetre a les seves filles aquesta capacitat de regulació a través del citoplasma de l'embrió, probablement mitjançant piRNAs generats per la mare (Simmons MJ et al 2007).

Els piRNAs provenen de diferents seqüències genòmiques, especialment riques en heterocromatina. Existeixen diversos *loci* al genoma anomenats *piRNA clusters* que contenen llargues seqüències de transposons. Aquestes seqüències estan compostes principalment per transposons fragmentats, ja que són el resultat de diverses insercions successives de diferents elements mòbils seguits, que es transcriuen en bloc. Els piRNAs de cada *locus* es caracteritzen per ser una mescla de seqüències molt complexa i variada que abasta enormes regions riques en transposons sencers o truncats (Brennecke J et al 2007; Lu J i Clark AG 2010; Meister G 2013; Saito K 2013). Els *loci* de *piRNA clusters* poden transcriure's tant en sentit *sense* com *antisense* en funció del tipus cel·lular (Saito K 2013). A la línia germinal d'ovaris de *Drosophila* els clústers de piRNAs es transcriuen bidireccionalment (Mani

SR i Juliano CE 2013; Dufourt J et al 2014). No obstant, les seqüències genòmiques de *HeT-A* i *TART* no es troben a cap clúster de piRNAs, sinó que probablement provenen de l'*array* de transposons dels telòmers (HTT), els quals hem pogut detectar que s'expressen també en ambdós sentits (Piñeyro D et al 2011).

La via de síntesi dels PIWI/piRNAs es dona en tres passos. Primer, es transcriuen els clústers de piRNAs obtenint-ne trànscripats de cadena simple molt llargs, precursors dels piRNAs (Saito K 2013). Després, té lloc la biogènesi primària en què es processen aquests precursors obtenint-ne els piRNAs (s'ha trobat aquest procés a cèl·lules somàtiques però es creu que podria donar-se també a cèl·lules germinals) (veure la Figura 27). I per últim, es dona la biogènesi secundària de piRNAs, anomenada *cicle de ping-pong*, on participen les proteïnes Aub i Ago3, i que amplifica exponencialment els piRNAs sintetitzats a la línia germinal (veure la Figura 28) (Brennecke J et al 2007; Li C et al 2009; Mani SR i Juliano CE 2013).

La biogènesi primària de piRNAs té lloc en un compartiment o grànul citoplasmàtic anomenat *Yb body*, mentre que la secundària es dona al *nuage*. D'altra banda, com s'ha esmentat anteriorment, també es dona la degradació post-transcripcional de transposons en els *Processing bodies (P-bodies)*, unes estructures citoplasmàtiques on tenen lloc mecanismes generals de degradació d'mRNAs cel·lulars (Lim AK et al 2009; Mani SR i Juliano CE 2013). A més, com s'ha comentat abans, també es reprimeixen els transposons a nivell transcripcional de forma directa mitjançant els complexos PIWI/piRNA al nucli (regulació de la cromatina) (Mani SR i Juliano CE 2013).

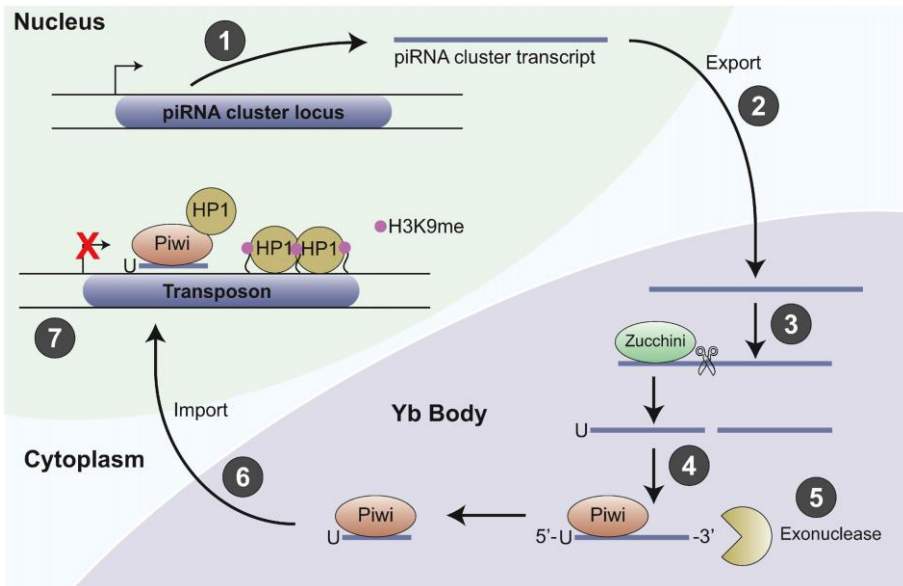


Figura 27. Processament primari dels piRNAs a les cèl·lules somàtiques d'ovaris de *Drosophila*, el qual sembla estar també conservat a cèl·lules de línia germinal d'ovari. El processament es dona en l'ordre següent: 1) El processament primari comença quan es transcriuen els clústers de piRNAs del genoma donant lloc a transcrits precursors llargs de cadena simple. 2) Els transcrits primaris s'exporten fora del nucli mitjançant un mecanisme encara desconegut i són processats als *Yb bodies* del citoplasma. 3) Es tallen els transcrits primaris mitjançant l'endonucleasa Zucchini i se n'obtenen RNAs de mida intermitja. 4) La proteïna Piwi s'uneix llavors als RNAs processats que tenen al 5' una Uridina, mentre que la resta d'intermediaris d'RNA es creu que són inestables. 5) Una exonucleasa desconeguda talla l'extrem 3' (procés que s'anomena *trimming*) fins a generar-ne un piRNA madur. 6) El complex Piwi/piRNA s'importa de nou al nucli mitjançant un mecanisme encara desconegut. 7) Dins del nucli, Piwi s'uneix directament a la proteïna HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) reclutant-la a la cromatina, així com també es dona la metilació d'H3K9, donant com a resultat final el

silenciament transcripcional del transposó en qüestió (Tret de Mani SR i Juliano CE 2013).

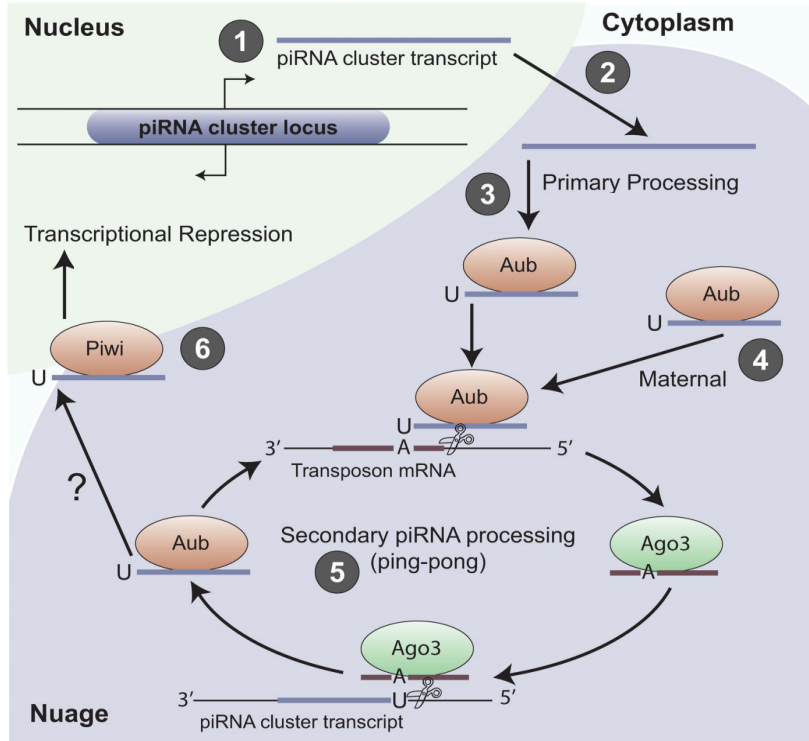


Figura 28. Processament secundari de piRNAs a les cèl·lules germinals d'ovaris de *Drosophila*. El cicle es dona en l'ordre següent: 1) Els transcrits primaris es sintetitzen transcrivint els clústers de piRNAs, els quals tenen els promotors actius bidireccionalment a les cèl·lules germinals d'ovaris de *Drosophila*. Aquests RNAs primaris són per tant llargues seqüències transcrites en sentit *sense* i *antisense*. 2) S'exporten els transcrits fora del nucli. 3) Es processen per obtenir-ne els piRNAs primaris, els quals són *antisense* respecte als transposons actius (Figura 27). A *Drosophila*, tant Piwi com Aubergine poden unir-se als piRNAs primaris. El processament secundari o *ping-pong* necessita que es formin complexos de Piwi amb piRNAs madurs provinents del processament primari o obtinguts per via materna (4). Es desconeix encara quin pes té cadascuna d'aquestes fonts i es

creu que depenent del tipus de transposó a silenciar té més pes una o altra. 5) Els complexos Aub/piRNA s'uneixen als mRNAs dels transposons actius i els tallen (activitat anomenada *slicing*) obtenint-ne nous piRNAs. El nou piRNA obtingut és *sense* respecte a l'mRNA del transposó actiu i s'uneix a la proteïna Ago3. Aquest complex pot llavors dirigir la formació de nous piRNAs del clúster de piRNAs reforçant la naturalesa *antisense* dels piRNAs units a Aub. 6) Els piRNAs primaris units a Piwi són transportats dins del nucli per silenciar transcripcionalment els transposons (com a la Figura 27), tot i que es desconeix si aquests piRNAs són generats mitjançant la via de *ping-pong* o simplement amb el processament primari de piRNAs. (Tret de Mani SR i Juliano CE 2013).

En resum doncs, el processament de l'mRNA d'un transposó fa possible el seu silenciament a nivell post-transcripcional i, alhora, permet amplificar la quantitat generada de piRNAs *sense* i *antisense* d'aquell determinat transposó (*cicle de ping-pong*) podent detectar d'aquesta manera les seqüències diana d'ambdues cadenes de l'element mòbil (Li C et al 2009). A més, tot això permet que diversos complexos específics de silenciament remodelin la cromatina silenciant transcripcionalment el transposó en qüestió.

Concretament, a Lim AK et al 2009, es demostra que el silenciament post-transcripcional de *HeT-A* depèn dels piRNAs. En aquest article observen mitjançant FISH (*Fluorescence In situ Hybridization*) que els piRNAs *antisense* de *HeT-A* co-localitzen amb el transcrit *sense* de *HeT-A* (GFP-(mS2)₆-*HeT-A*) a ovaris salvatges, mentre que a ovaris mutants per a *aubergine* els piRNAs *antisense* de *HeT-A* no es detecten i l'mRNA de *HeT-A* és estable durant llargs períodes de temps ja que no s'hi troba reprimat.

D'altra banda, un altre estudi mostra que els mutants d'*aubergine* tenen afectat el complex de protecció telomèrica de *Drosophila* ja que presenten una reducció de la quantitat de proteïnes HOAP i HP1 (dues de les principals

proteïnes del complex de *capping*) unides al 5'UTR i l'ORF (*marc de lectura codificant*) de *HeT-A*, suggerint una possible relació entre la síntesi dels piRNAs de *HeT-A* i l'assemblament del complex de *capping* telomèric (Khurana JS et al 2010). Cal destacar a més que hem identificat al nostre laboratori una seqüència de 28 nucleòtids al 3'UTR de *HeT-A* que es troba altament conservada i que és precisament una seqüència diana per a piRNAs (Petit N et al 2012).

1.9. Expressió de *HeT-A* i *TART* a ovaris

Segons la literatura publicada, els mRNAs de *HeT-A* i *TART* (intermediaris de transposició) només poden detectar-se per hibridació *in situ* d'RNA a ovaris mutants de la via dels piRNAs. A la Figura 29 s'observa la localització dels trànscrips *sense* dels retrotransposons telomèrics a ovaris mutants per a *piwi*. Els mRNAs de *TART* i *HeT-A* localitzen al citoplasma de les *nurse cells*, i només el trànscrip de *HeT-A* ho fa a l'oòcit (Shpiz S et al 2007).

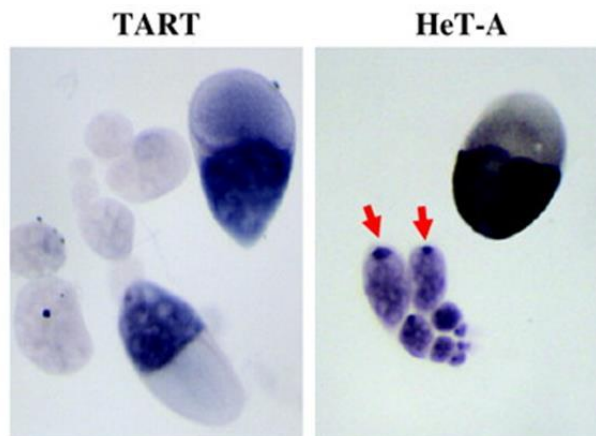
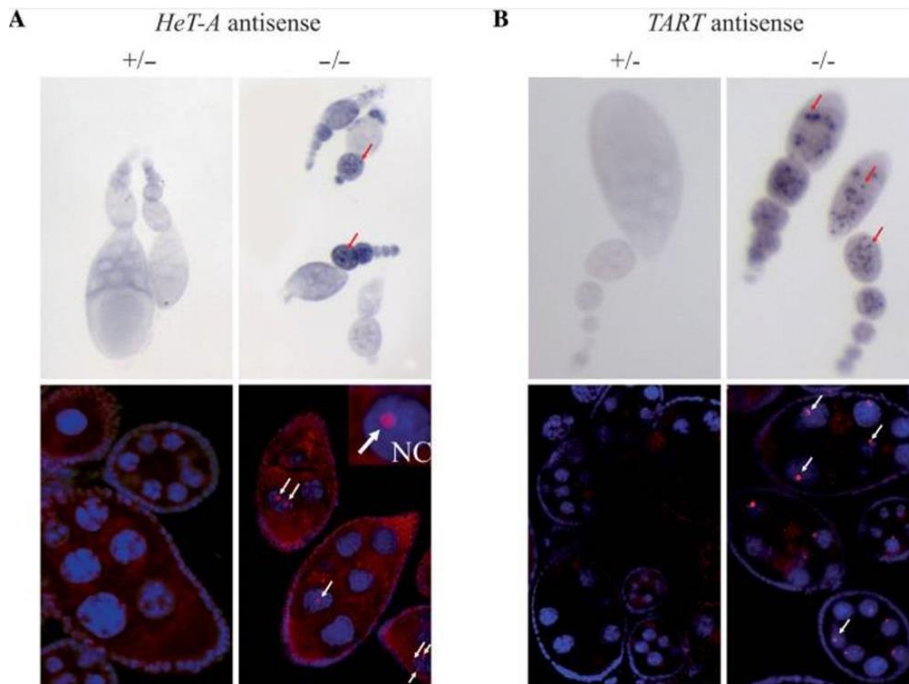


Figura 29. Localització dels trànscrips *sense* de *TART* (esquerra) i *HeT-A* (dreta) a ovaris mutants transheterozigots de *piwi* ($piwi^2/piwi^3$). Hibridació *in situ* d'RNA realitzada pel mètode de la fosfatasa alcalina. Les

fletxes vermelles indiquen la presència de senyal a l'oòcit. (Shpiz S et al 2007).

S'ha descrit també la presència dels trànscrips de *HeT-A* i *TART* a ovaris mutants per a *Spn-E* (implicat també en la via dels piRNAs) mitjançant hibridacions *in situ* emprant ribosondes de *HeT-A* i *TART* i revelant-les amb anticossos conjugats amb AP (fosfatasa alcalina) o rodamina que reconeixen la DIG (Digoxigenina) (Shpiz S et al 2009). Pot observar-se la localització dels trànscrips *sense* i *antisense* de *HeT-A* i *TART* d'aquest article a la Figura 30. És interessant remarcar que en aquest cas els resultats mostren la presència dels trànscrips telomèrics principalment dins el nucli de les *nurse cells* en forma de punts o acumulacions, a més de la localització de l'mRNA de *HeT-A* dins l'oòcit com s'havia descrit ja al treball anterior.



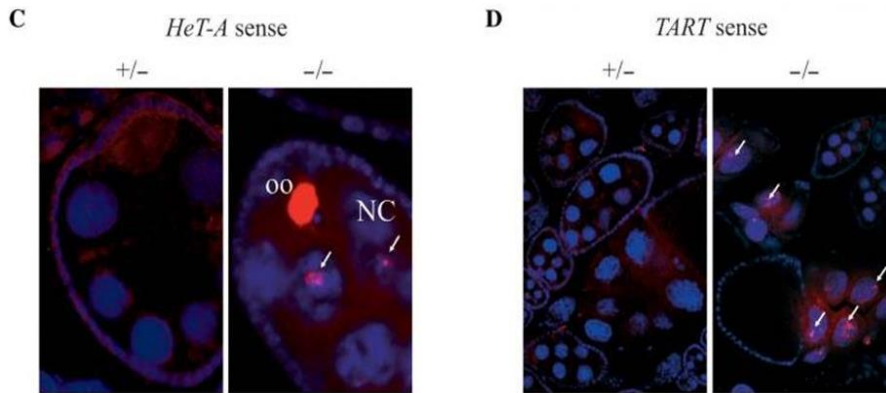


Figura 30. Trànscrits *sense* i *antisense* de *HeT-A* i *TART* a ovaris mutants d'*Spn-E*. Els signes +/- indiquen que són ovaris mutants heterozigots per a *Spn-E* i els -/- que en són homozigots. Les fletxes blanques indiquen la presència d'acumulacions de tràncrits als nuclis de les *nurse cells*. Els tràncrits *antisense* de *HeT-A* (A) i *TART* (B) s'acumulen als nuclis de les *nurse cells*. (C) Els tràncrits *sense* de *HeT-A* s'acumulen a l'òocit (concretament al seu citoplasma a mutants homozigots; imatge no mostrada) i al nucli de les *nurse cells*. (D) Els tràncrits *sense* de *TART* s'acumulen al citoplasma i al nucli de les *nurse cells* a estadis tardans de l'oogènesi. (Shpiz S et al 2009).

És interessant recalcar que, tot i que treballs anteriors com el de Danilevskaya ON et al 1999 només han estat capaços de detectar l'RNA *sense* de *HeT-A*, al nostre laboratori hem pogut detectar una expressió lleu de l'RNA *antisense* de *HeT-A* (del seu 3'UTR) per RT-PCR (Piñeyro D et al 2011). En canvi, *TART* presenta nivells molt més elevats del tràncrit *antisense* que del seu *sense* (Danilevskaya ON et al 1999).

El més rellevant però dels estudis anteriors de localització dels tràncrits dels retrotransposons telomèrics de *Drosophila* és que mai no s'han pogut detectar mitjançant hibridacions *in situ* d'RNA a ovaris salvatges. No obstant, el fet que al nostre laboratori haguem pogut detectar els diferents

trànscrits telomèrics a ovaris salvatges mitjançant RT-PCR (Petit N et al 2012), així com que es detectés anteriorment l'mRNA de *HeT-A* mitjançant *Northern blot* d'RNA d'ovaris salvatges al treball de George JA i Pardue M-L 2003, fa pensar que hauríem de ser capaços de visualitzar-los també en aquests teixits salvatges.

2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

Com s'ha explicat, treballs anteriors han hipotetitzat com podria estar-se realitzant el cicle de vida dels retrotransposons telomèrics *HeT-A* i *TART* a *Drosophila melanogaster*, no obstant, aquest mecanisme mai ha estat demostrat ni es coneixen quines proteïnes estan participant-hi. A més, s'ha suggerit que les proteïnes i els trànscrips de *HeT-A* i *TART* formen part d'un mateix complex o ribonucleoproteïna (RNP), però aquests components no s'han caracteritzat mai en detall en els teixits de *Drosophila* amb replicació telomèrica activa.

Per aquestes raons, els objectius d'aquesta tesi doctoral han consistit a entendre millor el cicle de vida dels retrotransposons telomèrics de *Drosophila melanogaster*. Concretament, els objectius principals d'aquest treball poden resumir-se en els dos següents:

- Caracteritzar els diferents components de la Ribonucleoproteïna telomèrica (RNP): les proteïnes *HeT-A* Gag, *TART* Gag i *TART*-RT, així com els trànscrips de *HeT-A* i *TART*, a teixits amb replicació telomèrica activa.
- Identificar i analitzar les proteïnes cel·lulars que interaccionen amb les proteïnes dels retrotransposons *HeT-A* Gag i *TART*-RT.

Per fer-ho es duran a terme dues estratègies diferents. Per una banda, es realitzarà una primera aproximació buscant interaccions amb proteïnes candidates a participar en el *targeting* telomèric de *HeT-A* Gag; i per una altra, s'aïllaran complexos proteics mitjançant el mètode del TAP tag per identificar proteïnes cel·lulars que interaccionen amb *HeT-A* Gag i *TART*-RT.

3. MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. MATERIALS

3.1.1. ENCEBADORS (PRIMERS)

3.1.1.1. Seqüències d'encebadors emprats per a PCR convencional per generar dsRNAs:

a) dsRNA de HOAP (seqüència amplificada del gen *caravaggio*: 478 bp; número d'accés del gen: CG6219, del nt 1689 al nt 2166):

HOAP_RNAi_F GCCGAGACTAAGAAGCAGAAC

HOAP_RNAi_R CCTGATCGTCAGGCTCTTG

b) dsRNA de *HeT-A* Gag (seqüència amplificada: 550 bp; número d'accés del gen: X68130, del nt 2701 al nt 3255):

HeT-AGag_RNAi_F CTAGCGGCAAACAACATCG

HeT-AGag_RNAi_R GGGATTGCAGATTCTTGGC

c) dsRNA de *SART1* (seqüència amplificada: 490 bp; número d'accés del gen: D85594, del nt 1943 al nt 2432):

SART1_RNAi_F CAACGGCAGCAGAATCAATG

SART1_RNAi_R CGTAATTTCTCCGCCAGCAA

d) dsRNA de Nap-1: es va amplificar el gen *nap-1* usant els encebadors:

Nap-1-EcoRI_F TAATGAATTCATGGACGCCCCAGCCGAA

Nap-1-AgeI_R ACCGGTTCTGATTCGGGCAGTCGTT

Es va clonar al vector pSTBlue-1, es va digerir amb els enzims de restricció ApaI i BamHI, i el fragment de 417 nt de *nap-1* es va lligar a un nou vector digerit amb els mateixos enzims per sintetitzar-ne el dsRNA.

e) dsRNA de Z4 (seqüència amplificada de *z4*: 338 bp; número d'accés del gen: CG7752 del nt 3046 al nt 3383):

Z4-RNAi_F TAATTATCCAGCAGGGACAG

Z4-RNAi_R CAATCAGATCTGGTCTTTGTCTCCGTA AAC

3.1.1.2. Seqüències d'encebadors emprats per a *Real-time* PCR:

a) Actina:

Actina-RealTime_F GCGCCCTTACTCTTTCACCA

Actina-RealTime_R ATGTCACGGACGATTTACAG

b) *HeT-A* 3'UTR:

HeT-A3'UTR-RealTime_F CCCC GCCAGAAGGACGGA

HeT-A3'UTR-RealTime_R TGTTGCAAGTGGCGCGCA

3.1.1.3 Seqüències d'encebadors emprats per generar línies cel·lulars estables amb el TAP tag:

a) *TART-RT-CTAP*:

TARTRT_BamHI_F GGATCCATGGACGCCTGGAAACATGCC

TARTPol_BamHI_R(nonstop)
GGATCCGTCACCTTCGTAGTCGGGTAG

b) *TART* Pol-CTAP

TARTPol_BamHI_F GGATCCATGACTCGGGCGTGCAACAG

TARTPol_BamHI_R(nonstop)

GGATCCGTCACCTTCGTAGTCGGGTAG

c) *HeT-A* Gag-CTAP:

HeT-AGag_BamHI_F GGATCCATGTCCATGTCCGACAACCT

HeT-AGag_BamHI_R GGATCCTCTATTAGCTAAGCTTGTTG

3.1.1.4 Seqüències d'encebadors emprats per generar les línies mutants RNAi de *Drosophila melanogaster*:

a) *HeT-A* Gag RNAi:

HeT-AGag_XbaI_F TCTAGACAGCAGGAGTCTCCAGCTA

HeT-AGag_XbaI_R TCTAGACGGCGCCATTTATTCAGACG

b) *TART* Pol RNAi:

TARTPol_XbaI_F TCTAGAGACCAAGCTGGAGAGACTT

TARTPol_XbaI_R TCTAGAGCTGCTATGGCATACTGCC

c) *Jockey* RNAi:

Jockey_XbaI_F

GGCCTCTAGGAGGAAAGTAGCAGGTGTTGAG

Jockey_XbaI_R GGCCTCTAGGGATCGCTTACACTTGGTACG

3.1.1.5. Seqüències emprades per generar les sondes de les hibridacions *in situ* d'RNA:

a) **Seqüència de la sonda de *HeT-A* per a la hibridació *in situ* d'RNA:** del nucleòtid 3037 al 4406 (1370 bp) de la seqüència amb número d'accés: gb|U06920.2|DMU06920.

b) **Seqüència de la sonda de *TART* per a la hibridació *in situ* d'RNA:** del nucleòtid 7670 al 9822 (2153 bp) de la seqüència amb número d'accés: emb|AJ566116.1|.

3.1.1.6. Clonatges emprats:

a) ***HeT-A* Gag-GFP:** Clon obtingut de fusionar la seqüència codificant del gen *HeT-A gag* (2.766 bp) de l'element 23Zn-1 (número d'accés del *GenBank*: U06920) a la seqüència de la EGFP del vector ppL17 (descriu a Rashkova S et al 2002a).

b) **Jil-1-GFP:** Clon obtingut de fusionar la seqüència codificant de Jil-1 (ID a *Flybase*: CG6297) a tres proteïnes de fusió EGFP (generat per la Dra. Rute Silva-Sousa).

c) **Growl-GFP** (o Lost-GFP): Clon obtingut de fusionar la seqüència codificant del gen *growl* o *lost* (ID a *Flybase*: CG14648; de 1638 bp) a la seqüència de la EGFP del vector ppL17. Els encebadors emprats per a la PCR (amb dianes de restricció incloses per facilitar-ne el posterior clonatge al vector ppL17) són:

Growl-BamHI-F	CCGGGGATCCATGGAGGACCAAAGCAAC
Growl-AgeI-R	ACCGGTTCTACTGTGGTGGTGTTCGAC

3.1.2. PLÀSMIDS

Els vectors emprats per als clonatges han estat els següents:

- *pGEM-Teasy* (casa comercial Promega, 3 kb, Amp^R, promotors de transcripció Sp6 i T7).
- *pSTBlue-1* (casa comercial Novagen, 3,8 kb, Amp^R i Kan^R, promotors de transcripció Sp6 i T7).
- *TOPO II* (casa comercial Invitrogen, 3,5 kb, Kan^R, promotors de transcripció Sp6 i T7).
- *TOPO 2.1* (casa comercial Invitrogen, 3,9 kb, Amp^R i Kan^R).
- ppL17: vector derivat del pEGFP-N1 (4,7 kb, Kan^R, P_{CMV IE}) que conté el promotor d'Armadillo.
- pMK33-CTAP (Clontech, Amp^R, Higromicina^R, promotor induïble per sulfat de coure)
- vector *pWiz* (9,1 kb, Amp^R): vector emprat per a la generació de mosques mutants RNAi. Aquest vector es va generar col·locant els 74 bp del segon intró del gen *white* al vector pUAST. Conté seqüències 5' i 3' d'*splicing* a les regions que flanquegen l'intró 2 de *white* (Lee YS i Carthew RW 2003).
- vector *pUASp* (casa comercial Addgene; 9,9 kb, Amp^R): vector emprat per a la generació de mosques transgèniques.
- *pAc5-EGFP*: vector amb el promotor de l'actina de *Drosophila melanogaster* regulant l'expressió del gen de la GFP.

3.1.3. ANTICOSSOS

- anti-*HeT-A* Gag de conill generat al nostre laboratori (usat a 1:1000 amb llet per a *western blot* i a 1:50 per a immunolocalització)
- anti-*HeT-A* Gag de *Guinea pig* obtingut del laboratori del Dr. Yikang (usat a 1:1000 per a immunolocalització)

- anti-*TART* Pol de conill generat al nostre laboratori (usat a 1:1000 amb llet per a *western blot* i a 1:50 per a immunolocalització)
- anti-*Lost* de conill obtingut del laboratori de la Dra. Elizabeth R. Gavis (usat a 1:1000 per a *western blot* i 200 µl per a cada immunoprecipitació)
- anti-*Growl* de conill obtingut del laboratori del Dr. Paul M Macdonald (usat a 1:5000 per a *western blot* i a 1:500 per a immunolocalització)
- anti-*Tral* de conill obtingut del laboratori del Dr. Paul M Macdonald (usat a 1:2000 per a *western blot* i a 1:500 per a immunolocalització)
- anti-*Nap-1* de conill obtingut del laboratori del Dr. Jim Kadonaga (usat a 1:40000 per a *western blot* i a 1:500 per a immunolocalització; se n'ha emprat 10 µl per a cada immunoprecipitació)
- anti-*Lamina* de ratolí (DSHB, ADL67.10) (usat a 1:200 per a immunolocalització, a 1:1000 per a *western blot*, i se n'usen 5 µl per a cada immunoprecipitació)
- anti-*Z4* de ratolí per a immunoprecipitació obtingut del Dr. Saumweber (150 µl per a cada IP)
- anti-*Z4* de ratolí per a *western blot* obtingut de la Dra. Kristen Johansen (usat a 1:500 sense llet).
- anti-*HP1* de ratolí (DSHB, C1A9-c) (usat a 1:5000 per a *western blot* i 3 µl per a cada immunoprecipitació)
- anti-*Jil-1* de conill obtingut de la Dra. Kristen Johansen (usat a 1:1000 per a *western blot*)
- anti-*Jil-1* de ratolí (a-*Jil1* mAb 5C9) obtingut de la Dra. Kristen Johansen; per a immunoprecipitació (200 µl per a cada IP). (Emprat a l'article Jin Y et al 2000).

- anti-GFP de ratolí de la casa comercial Roche (usat a 1:1000 per a *western blot*)
- anti-GFP de ratolí de la casa comercial Invitrogen (A11120) (10 µl per a cada immunoprecipitació)
- anti-Flag de ratolí de la casa comercial Sigma (usat a 1:2000 per a *western blot* i 2 µl per a cada immunoprecipitació)
- anti-TAP de conill de la casa comercial Thermo Scientific (usat a 1:500 per a *western blot*)
- anti-LacI de conill (usat a 1:1000 per a *western blot* i a 1:200 per a immunolocalització)
- IgGs de ratolí de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology [usat com a control negatiu de les immunoprecipitacions, el volum usat per a cada IP és el que iguala la quantitat d'anticòs emprada (µg) per a la IP d'interès]
- IgGs de conill de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology [usat com a control negatiu de les immunoprecipitacions, el volum usat per a cada IP és el que iguala la quantitat d'anticòs emprada (µg) per a la IP d'interès]
- anti-Histona H2B de conill de la casa comercial Abgent (usat per a immunolocalització a 1:50)
- anti-HOAP de *guinea pig* obtingut de la Dra. Rebecca Kellum (usat per a immunolocalització a 1:100)
- anti-HOAP de conill obtingut del Dr. Yikang Rong (usat per a immunolocalització a 1:250)
- anti-Integrina de *guinea pig* (generat contra la Integrina 3 de *capsaspora owczarzaki*) obtingut del laboratori del Dr. Iñaki Ruiz-Trillo (usat a 1:2000 per a *western blot*)

- anti-ratolí (*AlexaFluor goat-anti-mouse* - 488 o 555 o 633) de la casa comercial Invitrogen usat com a anticòs secundari per a immunolocalització a 1:500
- anti-conill (*AlexaFluor goat-anti-rabbit* - 488 o 555 o 633) de la casa comercial Invitrogen usat com a anticòs secundari per a immunolocalització a 1:500
- anti-guinea pig (*AlexaFluor goat-anti-guinea pig* - 633) de la casa comercial Invitrogen usat com a anticòs secundari per a immunolocalització a 1:500
- anti-conill de GE Healthcare (*ECLTM Anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase-linked whole antibody from donkey*) usat com a anticòs secundari per a *western blot* a 1:20000
- anti-ratolí-HRP de la casa comercial Pierce (*goat-anti-mouse*) usat com a anticòs secundari per a *western blot* a 1:20000
- anti-guinea pig-HRP de la casa comercial Pierce (*goat-anti-guinea pig, PA1-28679*) usat com a anticòs secundari per a *western blot* a 1:20000
- anti-Digoxigenina d'ovella (Roche) (*α -Digoxigenin-POD antibody from sheep*) usat a 1:20 per a les hibridacions *in situ* fluorescents d'RNA

3.1.4. LÍNIES DE *DROSOPHILA*

Les línies de mosca es mantenen a 25°C amb papilla de blat estàndard per a l'alimentació de *Drosophila*.

3.1.4.1. *Drosophila virilis*

- *Drosophila virilis Tokyo* (obtinguda del Departament de Genètica de la Universitat Autònoma de Barcelona).

3.1.4.2. *Drosophila melanogaster*

- S'ha emprat com a línia control la w^{1118} , anomenada també **white**.
- **GIII**: línia *Gaiano III*. Duu el cromosoma III de la línia *Gaiano*, la qual conté la mutació *Tel-1*, en un *background* d'*Oregon-R* (FBsn0000005). Línia emprada a l'article Siriaco GM et al 2002.
- **Aub^{QC42}** (4968): línia mutant d'*aubergine* [w^{1118} ; $aub^{QC42} cn^1 bw^1/CyO$, P{sevRas1.V12}FK1] adquirida del *Bloomington Stock Center*.
- **Aub^{HN}** (8517): línia mutant d'*aubergine* [$aub^{HN2} cn^1 bw^1/CyO$] obtinguda també del *Bloomington Stock Center*.
- **Aub-GFP**: línia que sintetitza la proteïna endògena Aubergine fusionada a la GFP. Línia emprada a l'article Snee MJ i Macdonald PM 2004.
- **vasa-GFP**: línia que sintetitza la proteïna endògena Vasa fusionada a la GFP. Línia emprada a l'article Johnstone O i Lasko P 2004. S'ha obtingut aquesta línia del laboratori de la Dra. Elizabeth R. Gavis (Princeton University, USA).
- **SpnE⁶¹⁶** (3327): línia $ru^1 st^1 spn-E^1 e^1 ca^1/TM3, Sb^1 Ser^1$ (cromosoma III). Obtinguda del laboratori de la Dra. Elizabeth R. Gavis (Princeton University, USA).
- **Hoap-GFP HipHop^{mCherry}**: línia generada i obtinguda del laboratori del Dr. Yikang Rong (NIH, USA).
- **Lost-GFP**: línia $yw; Lost^{ZCL3169}/TM3$ (cromosoma III) (M3058). Línia anomenada originalment com a CG14648^{ZCL3169}. El CG14648 apareix citat al *FlyBase* com a *growl*. La inserció de la GFP (*GFP gene-trap P element insertion*) no afecta la funció de Lost. No se n'ha trobat cap efecte fenotípic. Aquesta línia s'ha obtingut de la Dra. Elizabeth R Gavis (Princeton

University, USA).

- **Lost¹ Rump¹**: doble mutant generat pel laboratori de la Dra. Elizabeth R Gavis mitjançant recombinació meiótica. L'al·lel *rump¹* es va generar mitjançant l'escissió imprecisa de P{SUPor-P} CG9373^{KG02834}. Aquesta línia s'ha obtingut de la Dra. Gavis (Princeton University, USA).

- **Lost¹ (K.O.)/TM3** (cromosoma III): línia obtinguda per escissió imprecisa de P{PTT-GA}lost[ZCL3169], creant una deleció de ~4 kb que elimina tots els llocs d'inici transcripcionals predits de Lost (CG14648) i el primer exó que conté el lloc d'inici de traducció de Lost. L'al·lel *lost¹* va ser generat pel laboratori de la Dra. Elizabeth R Gavis mitjançant una escissió de la *GFP gene-trap P element insertion*. [FBal0263648]. Línia emprada a l'article Sinsimer KS et al 2011.

- **Tral RNAi** (28542): línia *y¹ v¹*; P{y^{tt7.7} v^{tt18}=TRiP, HM05028} attP2. Expressa el dsRNA per generar l'RNAi de *tral* (FBgn0041775) sota el control de l'UAS, TRiP (cromosoma III).

- **Tral Hypomorphic** (14933): línia *y¹*; P{SU Por-P} *tral*^{KG08052} *ry⁵⁰⁶* / TM3 *Sb¹ Ser¹* (cromosoma III). S'ha obtingut del *Bloomington Stock Center*.

- **NAP-1 K.O.** (8537): línia mutant *w¹¹¹⁸*; *Dp(3;3)Nap1^{KO1}*, *Nap1^{KO 1.5'}* *Nap1^{KO1.3}* / T(2;3) SM6b-TM6B, *ap^{Rk} Tb¹*. S'ha generat aquesta línia amb una recombinació de tipus *ends-in* de diana específica que resulta en una duplicació en tàndem marcada per *miniwhite* de les dues còpies del gen *nap-1* que contenen una mutació de pèrdua de pauta de lectura. Aquesta línia s'ha adquirit del *Bloomington Stock Center*.

- **NAP-1 RNAi** (35445): línia mutant *y¹ sc* v¹*; P{ *y^{tt7.7}* *v^{tt1.8}*=TRiP.GL00370}attP2. Expressa el dsRNA per a l'RNAi de *nap-1* {FBgn0015268} sota el control de l'UAS, TRiP (cromosoma III). Línia

obtinguda del *Bloomington Stock Center*.

- **4-1 pWiz *HeT-A Gag RNAi*** (cromosoma II): línia RNAi de *HeT-A* generada al nostre laboratori. Conté el constructe RNAi d'un fragment del gen *HeT-A gag* clonat al vector pWiz (que conté la seqüència UAS). El seu creuament amb una línia que conté el *driver Gal4* permet generar una progènie que produeix el *hairpin* d'RNA de *HeT-A gag* (Lee YS i Carthew RW 2003).

- **69-1 pWiz *HeT-A Gag RNAi*** (cromosoma III): línia RNAi de *HeT-A* generada al nostre laboratori. Conté el constructe RNAi d'un fragment del gen *HeT-A gag* clonat al vector pWiz (que conté la seqüència UAS). El seu creuament amb una línia que conté el *driver Gal4* permet generar una progènie que produeix el *hairpin* d'RNA de *HeT-A gag* (Lee YS i Carthew RW 2003).

- **151-1 pUASp *HeT-A Gag RNAi*** (cromosoma II): línia RNAi de *HeT-A* generada al nostre laboratori. Conté el constructe RNAi d'un fragment del gen *HeT-A gag* clonat al vector pUASp (que conté la seqüència UAS). El seu creuament amb una línia que conté el *driver Gal4* permet generar una progènie que produeix el *hairpin* d'RNA de *HeT-A gag* (Lee YS i Carthew RW 2003).

- **138-1 pUASp *HeT-A Gag RNAi*** (cromosoma III): línia RNAi de *HeT-A* generada al nostre laboratori. Conté el constructe RNAi d'un fragment del gen *HeT-A gag* clonat al vector pUASp (que conté la seqüència UAS). El seu creuament amb una línia que conté el *driver Gal4* permet generar una progènie que produeix el *hairpin* d'RNA de *HeT-A gag* (Lee YS i Carthew RW 2003).

- **65-9 pWiz *TART RNAi*** (cromosoma X): línia RNAi de *TART* generada al nostre laboratori. Conté el constructe RNAi d'un fragment del gen *TART pol*

clonat al vector pWiz (que conté la seqüència UAS). El seu creuament amb una línia que conté el *driver* Gal4 permet generar una progènie que produeix el *hairpin* d'RNA de *TART pol* (Lee YS i Carthew RW 2003).

- **57-3 pWiz Jockey RNAi** (cromosoma II): línia RNAi de *Jockey* generada al nostre laboratori. Conté el constructe RNAi d'un fragment del gen *Jockey* clonat al vector pWiz (que conté la seqüència UAS). El seu creuament amb una línia que conté el *driver* Gal4 permet generar una progènie que produeix el *hairpin* d'RNA de *Jockey* (Lee YS i Carthew RW 2003).

- **17-1 pUASp Jockey RNAi** (cromosoma II): línia RNAi de *Jockey* generada al nostre laboratori. Conté el constructe RNAi d'un fragment del gen *Jockey* clonat al vector pUASp (que conté la seqüència UAS). El seu creuament amb una línia que conté el *driver* Gal4 permet generar una progènie que produeix el *hairpin* d'RNA de *Jockey* (Lee YS i Carthew RW 2003).

- **33-1 pUAsp Jockey RNAi** (cromosoma III): línia RNAi de *Jockey* generada al nostre laboratori. Conté el constructe RNAi d'un fragment del gen *Jockey* clonat al vector pUASp (que conté la seqüència UAS). El seu creuament amb una línia que conté el *driver* Gal4 permet generar una progènie que produeix el *hairpin* d'RNA de *Jockey* (Lee YS i Carthew RW 2003).

- **Da-Gal4** (Daughterless-Gal4) (cromosoma III): línia *driver* de línia germinal. w1118; P{da-GAL4.w-}3. S'ha obtingut del *Bloomington Stock Center* (8641).

- **MataTub-Gal4** (Maternal α -Tubulin-Gal4) (cromosoma II o III): línia *driver* de línia germinal. w*; P{mata4-GAL-VP16}V2Hw*. S'ha obtingut del *Bloomington Stock Center* (7062).

- **Nos-Gal4** (Nanos-Gal4) (FBgn0002962) (cromosoma II o III): línia *driver* de línia germinal. S'ha obtingut del *Bloomington Stock Center* (4442; 32563).

- **Actin-Gal4** (Actina-Gal4) (cromosoma II o III): línia *driver* per a l'actina. S'ha obtingut del *Bloomington Stock Center* (4414; 3954).

3.1.5. SOQUES BACTERIANES

S'han emprat diverses soques de cèl·lules bacterianes competents per transformar-hi diferents constructes de DNA: *NovaBlue Singles™ Competent Cells* (Novagen), *XL-1 Blue competent cells* (Stratagene) o *NovaBlue competent cells* (EMD Millipore) o *MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells* (Invitrogen).

3.1.6. LÍNIES CEL·LULARS

S'ha emprat una línia cel·lular embrionària de *Drosophila melanogaster* anomenada *Schneider 2*, abreviada com a cèl·lules S2. Aquesta línia cel·lular deriva d'un cultiu primari d'embrions de *Drosophila melanogaster* en estadi tardà (d'entre 20 i 24 h). És una línia cel·lular que creix idealment a 24°C i presenta un creixement de monocapa semi-adherent o en suspensió.

3.2. MÈTODES

3.2.1. TÈCNIQUES EMPRADES PER AL DNA

3.2.1.1. Extracció de DNA genòmic

S'extreu el DNA genòmic de cèl·lules pelletejades (10^7 cèl·lules totals) o de mosques adultes (5 mascles i 5 femelles) homogeneïtzant-les en una solució de lisi que conté 0.1 M Tris-HCl pH 9.0; 0.1 M EDTA; 1% SDS i s'incuba a 70°C durant 30 min. S'hi afegeix KAc 8M i es deixa en gel 30 min. Després de centrifugar-ho a velocitat màxima durant 15 min a 4°C, es recull el sobrenedant i se'n precipita el DNA afegint-hi 0.5 volums d'isopropanol. Se centrifuga a màxima velocitat 5 min i es renta el pellet de DNA en 1 volum d'etanol al 70%. Es deixa assecar el pellet i es resuspèn en TE 1x (solució 10 mM Tris-HCl que conté 1 mM EDTA•Na₂, i té un pH de 8.0) durant tota la nit a 4°C en rotació. (És convenient el tractament posterior de les mostres amb RNasa per tal d'eliminar-ne l'RNA present).

3.2.1.2. Reacció de PCR convencional (*Polymerase Chain Reaction*)

Es dissenyen encebadors (*Forward* i *Reverse*) d'uns 20 nucleòtids de longitud cadascun, d'un percentatge de bases GC de la seva seqüència proper al 50%, de temperatures de fusió (T_m) similars entre elles i que amplifiquin únicament la regió del gen d'interès. A més, cal que no formin dímers entre ells ni estructures secundàries per sí mateixos. Per a la tria dels encebadors més adients per a cada gen s'ha emprat el *software ApE*. Els encebadors escollits per a cada reacció es troben especificats a l'apartat 3.1.1. *Encebadors (Primers)*.

La reacció de PCR es realitza emprant 50 ng de DNA genòmic (o d'un vector), 10 mM d'encebador *Forward*, 10 mM d'encebador *Reverse*, 10 mM de dNTPs, Tampó de reacció a 1x, 50 mM d'MgCl₂ i la Polimerasa de DNA

Taq (Biotools), en un volum final de 50 µl.

El programa de la reacció de PCR consta de 5 minuts inicials a 95°C per desnaturalitzar el DNA; 30 cicles de: 45 segons a 95°C (desnaturalització), 30 segons a la temperatura d'hibridació o *annealing* adient, i 30 segons a 72°C (extensió); i per últim una extensió final de 10 minuts a 72°C. Aquest programa és el que s'ha emprat més habitualment. No obstant, en alguns casos s'ha vist modificat en funció de la llargada i característiques de la seqüència a amplificar.

En clonatges de seqüència llarga amb fàcil generació d'errors per part de la Polimerasa convencional s'ha utilitzat la DNA Polimerasa *High-Fidelity* (*KOD Hot Start DNA Polymerase*, Novagen) seguint-ne també el protocol indicat per la casa comercial. Un cop realitzada tota la reacció de PCR, s'hi ha afegit la DNA Polimerasa convencional (Biotools) a 72°C durant 10 min per addicionar-hi les "A"s finals que en permetran la lligació posterior amb un vector de clonació.

Abans de fer la lligació del producte de la PCR a un vector és necessari comprovar que l'amplificació realitzada ha estat específica (1 única banda) i de la mida desitjada (bp) fent-ne una electroforesi en gel d'agarosa a l'1% (o del % més idoni) i visualitzant-ne les bandes amb *SYBR Safe Green* (Invitrogen). En cas contrari cal variar la temperatura d'hibridació fins assolir-ho.

3.2.1.3. Lligació del producte de PCR a un vector

Després de comprovar que l'amplificació del DNA realitzada per PCR és específica, es clona el producte de la reacció de PCR (l'insert) al vector desitjat, seguint el protocol de lligació indicat per la seva casa comercial (veure els vectors de clonació emprats a l'apartat 3.1.2. *Plasmids*).

3.2.1.4. Transformació de cèl·lules competents

Es transformen les cèl·lules bacterianes competents (veure l'apartat 3.1.5. *Soques bacterianes* on s'indiquen les cèl·lules emprades) amb el DNA desitjat mitjançant el mètode del *heat-shock* descrit a continuació. Es transformen 50-100 µl de cèl·lules competents amb la quantitat necessària del clon generat (normalment: 1 - 10 µl), seguint el protocol indicat per la seva casa comercial.

El procediment general de transformació pel mètode de *heat-shock* consta d'una primera fase en què el clon s'afegeix a les cèl·lules i es deixen en gel durant 15 min. Se'ls efectua llavors un *heat-shock* d'1 min a 42°C, seguit de 2 min en gel. A continuació s'hi afegeixen 800 µl de medi LB (en el cas de voler recuperar les cèl·lules) i es deixen en agitació a 250 rpm durant 30 min - 1 h a 37°C. Seguidament, se centrifuguen les cèl·lules 1 min a 8000 rcf, se n'elimina la major part del sobrenedant i es resuspèn el pellet en el volum restant. Se sembra en condicions estèrils en una placa d'agar amb o sense resistència a antibiòtic (Ampicil·lina, Kanamicina o Cloramfenicol, depenent de la resistència del clon transformat) i s'estén uniformement amb l'ajuda d'una nansa de vidre esterilitzada. Es deixa créixer la placa O.N. (*Over Night*; tota la nit) en un incubador de 37°C.

3.2.1.5. Minipreparacions de DNA plasmídic

Es piquen les colònies crescudes a les plaques on s'havia transformat anteriorment el clon d'interès i s'incuben en 4 ml de medi LB amb una concentració adient d'antibiòtic (Ampicil·lina, Kanamicina o Cloramfenicol, depenent de la resistència que presenti el vector transformat) a 37°C O.N. en agitació (250 rpm).

Realització de “Mini Preps” pel mètode de la fosfatasa alcalina (mètode manual):

Se centrifuguen 1.5 ml de cultiu bacterià, se'n resuspèn el pellet en *GTE* (50 mM Glucosa, 10 mM EDTA i 25 mM Tris; autoclavat) i se'n lisen les membranes amb una solució que conté 0.2 M d'NaOH i 1% d'SDS. S'atura la lisi mitjançant una solució d'NaAc a 3 M (pH 4.8-5.2) i se'n fa una extracció amb fenol-cloroform. Es precipita el DNA amb etanol absolut, seguit d'etanol al 70% (centrifugant-lo a 13000 rpm i 4°C). Es deixa assecar el pellet i es resuspèn en *TE* 1x. A continuació, es digereix amb RNasa A i es comprova que el DNA obtingut és el desitjat digerint-lo amb els enzims de restricció adients i fent-ne una electroforesi en gel d'agarosa a l'1% (o al % més idoni). Com a mesura de seguretat, es congelen a -80°C els bacteris transformats amb el clon d'interès fent-ne estocs de glicerol (750 µl de cultiu + 250 µl de glicerol estèril al 50%). Aquests estocs serveixen de reservori de les bactèries transformades amb el clon d'interès evitant haver de repetir un clonatge ja realitzat amb èxit en el cas de necessitar-ne més DNA en un futur.

3.2.1.6. Midipreparacions de DNA plasmídic

La preparació dels cultius per a midipreparacions o *midipreps* és la mateixa que per a les *minipreps* però incrementant-ne el volum de cultiu: enlloc de 4ml se'n fa créixer 100 ml (també amb la concentració i tipus d'antibiòtic adients). L'obtenció del DNA del clon transformat es duu a terme mitjançant el *Plasmid midi kit* (Qiagen), seguint les instruccions indicades per la seva casa comercial. Mitjançant l'espectrofotometria del *NanoDrop* s'analitza la qualitat i concentració del DNA purificat.

3.2.2. TÈCNIQUES EMPRADES PER A L'RNA

3.2.2.1. Extracció d'RNA

S'ha obtingut l'RNA de 10 ovaris de mosques femella adultes, prèviament alimentades amb llevat durant 2-3 dies, mitjançant el *GenElute Mammalian total RNA Miniprep Kit* (Sigma) seguint les instruccions del seu fabricant.

En el cas de l'extracció d'RNA de cèl·lules (S2), l'RNA s'ha extret a partir de $5 \cdot 10^7$ cèl·lules totals mitjançant el *High Pure RNA Tissue Kit* (Roche) seguint el protocol indicat per la casa comercial.

En tots dos casos s'ha usat la DNasa I, anomenada *RNase Free DNase Set* (Qiagen), per eliminar possibles contaminacions amb DNA genòmic, en dos passos: es realitza una primera DNasa en columna durant l'extracció d'RNA segons indica el protocol de la casa comercial (15 min a temperatura ambient), seguida de dues DNases més en solució un cop acabada l'extracció d'RNA (de 2 hores cadascuna i a 37°C). Tot seguit, l'RNA es precipita i se'n resuspèn el pellet en aigua *mil-liQ RNase-free*. Per últim, se n'analitza la qualitat i concentració mitjançant l'espectrofotometria del *NanoDrop*.

Extracció d'RNA cel·lular (mètode manual)

Es resuspèn el *pellet* de cèl·lules (prèviament congelat a -80°C per facilitar-ne la lisi) amb 320 µl de solució 2x LET (50 ml 2x LET: 2 ml EDTA 0,5M; 1 ml Tris 1M pH 8,0; 0,424 g LiCl; aigua *mil-liQ*). S'hi afegeixen 80 µl d'SDS 10% i es mescla bé. S'hi afegeix 1 volum de fenolcloroform (400 µl) i es barreja de nou. Se centrifuga 5 min a 13000 rpm a temperatura ambient i se'n recull el sobrenedant en un nou tub. Es repeteixen dos cops més les extraccions amb fenolcloroform, i es precipita el sobrenedant total de les tres extraccions afegint-hi 12 µl de LiCl 5M i 3 volums d'etanol absolut. S'hi fa vòrtex i es deixa a -20°C un mínim de 30 min. Es renta amb etanol 70% i es deixa assecar el pellet a temperatura ambient. Es resuspèn en aigua *mil-liQ RNase-free* i s'hi afegeixen 10 µl de tampó RDD i 2,5 µl de DNasa (Qiagen) en un volum final de 100 µl durant 45 min a 37°C. Es precipita amb 1 volum de LiCl 5M i 3 volums d'etanol absolut a -20°C un mínim de 30 min. Se centrifuga 15 min a 13000 rpm i 4°C, i es renta amb etanol 70%. Es deixa assecar el *pellet* final a l'aire i es resuspèn en 40 µl d'aigua *mil-liQ RNase-free*. Per últim es mira la qualitat i concentració de l'RNA extret al

Nanodrop.

3.2.2.2. Síntesi de cDNA

Es retrotranscriu 1 µg d'RNA a cDNA emprant el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) mitjançant els encebadors *oligo(dT)primers*, seguint el protocol indicat per la casa comercial. Es realitzen dues reaccions per a cada RNA extret: una que conté l'enzim transcriptasa reversa (+RT), i l'altra que no el conté (-RT) com a control de la quantitat de DNA genòmic residual.

3.2.2.3. PCR quantitativa o *Real-time PCR*

L'expressió dels transcrits s'analitza mitjançant PCR quantitativa o *Real-time PCR*. Per a cada línia de mosques o cèl·lules tractades amb unes determinades condicions, es realitzen dues extraccions d'RNA independents seguides de tres anàlisis independents mitjançant PCR quantitativa per a cada RNA extret. Per a la reacció de *Real-time PCR* s'usen uns encebadors *Forward* i *Reverse* de característiques similars als d'una reacció de PCR convencional (20 nts de longitud, 50% de GCs, T_m semblants, i que no formin dímers entre ells ni estructures secundàries ells mateixos). Una diferència important respecte la PCR convencional és que els encebadors per a PCR quantitativa només han d'amplificar una regió de 50 - 150 bp del gen, i tenir una T_m propera a 60°C (pel programa de PCR específic que s'usa). S'utilitza l'aparell de PCR Quantitativa *iCYCLER iQ5* (Bio-Rad) que treballa amb plaques de 96 pouets. S'empren per a cada reacció: 10 µM de cada encebador (*Forward* i *Reverse*) i *SYBR Green Mix* a 1x (el qual conté tots els reactius necessaris per a la reacció i és subministrat per la pròpia casa comercial a 2x), juntament amb 2 µl de la mostra de cDNA a analitzar. El volum total de reacció és de 20 µl.

El programa de la reacció de *Real-time PCR* realitzat consta de: 3 minuts inicials a 95°C; 40 cicles en què es realitza 1 minut a 60°C + 1 minut a 95°C + 1 minut a 55°C; i 30 segons finals a 55°C.

S'analitzen els resultats de la reacció de PCR quantitativa mitjançant el programa *iQ5 Optical System Software* (versió 2.0). Els nivells relatius d'expressió es determinen emprant el *threshold cycle* i normalitzant-los als nivells d'*actina* (gen constitutiu), normalitzant-ho a més al número de còpies genòmiques quan és necessari. El número de còpies genòmiques es determina mitjançant el mateix protocol de PCR quantitativa però usant 2 ng de DNA genòmic per a cada reacció enlloc de cDNA.

3.2.2.4. Síntesi d'RNA de doble cadena

S'utilitza un clon que contingui un fragment d'uns 500 bp (insert) del gen a silenciar clonat en un vector [*pSTBlue-1* (Novagen), *pGEM-Teasy* (Promega) o *TOPO II* (Life Technologies)] que contingui dos promotors per a diferents Polimerases d'RNA (Sp6 i T7) al 5' i 3' del lloc d'inserció de l'insert, per poder realitzar-ne la transcripció en ambdós sentits.

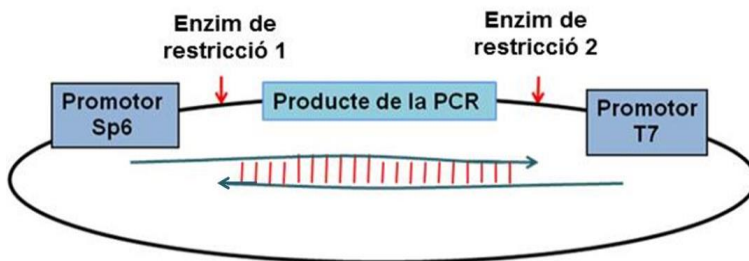


Figura 31. Representació d'un clon usat per a la síntesi d'un RNA de doble cadena (dsRNA).

Protocol de síntesi d'un dsRNA

Es digereix el clon amb un dels dos enzims de restricció adients per linealitzar el vector (Enzim de restricció 1 o 2 de la Figura 31) durant 3 hores a 37°C (es duen a terme dues reaccions de digestió diferents en paral·lel). A continuació es realitzen les transcripcions d'RNA de cadena simple (ssRNA) en els dos sentits mitjançant les *RNA Polimerases Sp6* i *T7* (Fermentas o Promega) seguint les instruccions de la casa comercial, durant 3h a 37°C. S'hibriden les dues cadenes complementàries d'ssRNA durant 5 minuts en un bany a 90°C i es deixen refredar lentament fins assolir la temperatura ambient o assolir 4°C en el cas de realitzar-se a la cambra freda. Es precipita el dsRNA amb etanol absolut i LiCl, i es tracta amb DNasa (Qiagen) i RNasa A (Roche) durant 15 min a 37°C. Després d'una extracció amb fenol-cloroform, es precipita i renta el dsRNA amb etanol absolut i etanol 70%. Se'n resuspèn el pellet final en aigua *mil·liQ*. Per últim es mesura la qualitat i concentració del dsRNA mitjançant l'espectrofotòmetre *NanoDrop ND1000*. A més se'n comprova la mida amb una electroforesi en gel d'agarosa al percentatge més adient.

3.2.3. HIBRIDACIONS *IN SITU* D'RNA

3.2.3.1. Clonatge de les seqüències de DNA per sintetitzar-ne les sondes

Les seqüències de DNA per a la síntesi de les sondes emprades en la hibridació *in situ* d'RNA s'obtenen digerint els clons de seqüència sencera o *full-length* de *HeT-A* Gag i *TART* Pol, i reclonant-les al vector *pSTBlue-1* prèviament digerit amb els mateixos enzims de restricció. La lligació es realitza amb la *T4 DNA Ligase* (Fermentas) a temperatura ambient durant 2h o a 16°C O.N., seguint les instruccions de la casa comercial.

La seqüència *full-length* de *HeT-A* Gag usada per al clonatge de les sondes *sense* i *antisense* de *HeT-A* és la *HeT-A 23ZnK*. Aquesta seqüència s'ha digerit amb els enzims de restricció PstI i HindIII per obtenir-ne un fragment

de 1370 bp que ha estat re-clonat (en sentit 5'→3') al vector *pSTBlue-1* prèviament digerit amb els mateixos enzims. Les sondes *sense* i *antisense* s'han sintetitzat usant els promotors T7 i Sp6 respectivament.

La seqüència *full-length* de *TART* Pol que s'ha emprat per al clonatge de les sondes *sense* i *antisense* de *TART* correspon al clon *TART-A* 17G23. Aquesta seqüència s'ha digerit amb els enzims de restricció PstI i SacI per obtenir-ne un fragment de 2153 bp que ha estat re-clonat (en sentit 5'→3') al vector *pSTBlue-1* prèviament digerit amb els mateixos enzims. Les sondes *sense* i *antisense* s'han sintetitzat utilitzant els promotors T7 i Sp6 respectivament.

3.2.3.2. Síntesi de sondes d'RNA per a hibridació *in situ*

Els clons de DNA es linealitzen digerint-los amb els enzims de restricció adients, i s'incuben amb 50µM de dNTPs i la concentració adient de *T4 DNA Polymerase* durant 30 min a 37°C. Tot seguit, s'inactiva l'enzim afegint-hi EDTA i TE 1x, s'hi fa una extracció amb fenol i es precipita amb etanol. S'empren durant tot el protocol puntes amb filtre i reactius *RNase-free* per evitar que l'RNA es contami ni o degradi. La transcripció del DNA motlle linealitzat es duu a terme usant: *NTP labeling mix* (mix amb *digoxigenin-UTP*) i el seu tampó de transcripció 10x (Boehringer), *RNasin* (Promega), i *Sp6* o *T7 Polymerase* (Fermentas o Promega) durant 2 h a 37°C. Després de la síntesi de l'RNA s'afegeix a la reacció de transcripció el *2x carbonate buffer* (120 mM Na₂CO₃, 80mM NaHCO₃, pH 10.2) i s'incuba durant 40 min a 65°C, per disminuir la mida de la sonda. S'atura la reacció amb l'addició de 0.2 M NaOAc pH 6.0, i es precipita afegint-hi una solució 4 M de LiCl *RNase-free*, 20 mg/ml tRNA (extret amb *phenol/CHCl3*), i etanol absolut. Se centrifuga i renta el pellet amb etanol 70%, es deixa assecar i es resuspèn en *RNase-free Hybridization Buffer* desionitzat [50% *formamide*, 5x *SSC*, 100 µg/ml de DNA d'esperma de salmó sonicat i extret amb fenol, 50 µg/ml d'*heparin* (Sigma H3125), 0.1% Tween-20] (HB). Per últim, es desen les sondes a -20°C.

3.2.3.3. Hibridació *in situ* d'RNA fluorescent pel mètode de la tiramida

Es disseccionen en PBS 1x els ovaris de femelles adultes engreixades amb llevat durant 2-3 dies, i es fixen durant 30 min en 4% *methanol-free Ultra Pure EM-grade formaldehyde* (Polysciences). Es realitzen diversos rentats amb PBST (PBS 1x; 0,1% Tween-20). Es pre-hibriden amb *RNase-free* HB a 55°C durant 1 h i s'hibriden O.N. a 55°C amb sondes prèviament desnaturalitzades diluïdes en *RNase-free* HB. A continuació realitzen diversos rentats a 55°C amb HB durant 2h, un rentat de 20 min amb HB/PBST (1:1) a 55°C, i diversos rentats amb PBST a 55°C durant 1h. Es bloquegen els ovaris en PBTB (PBST + 5% NGS + 0.2% BSA) 1 h a temperatura ambient i s'incuben amb una dilució 1:20 de l'anticòs *α -Digoxigenin-POD antibody from sheep* (Roche) en PBTB durant 1 h a temperatura ambient. Es revelen les mostres durant 30 min amb el kit d'amplificació del senyal de la tiramida *Tyramide Signal Amplification kit - Alexa Fluor 568 Tyramide* (Invitrogen-Molecular Probes) seguint les instruccions del fabricant. Tot seguit, es tenyeix el DNA amb *To-Pro-3* (dilució 1:1000) durant 30 min i es munten les mostres en *Vectashield* (Vector laboratories). Per últim, s'observen les mostres i se n'obtenen imatges mitjançant el microscopi confocal SPE2.

3.2.4. TÈCNIQUES DE CULTIUS CEL·LULARS

3.2.4.1. Manteniment de línies cel·lulars de *Drosophila melanogaster*

S'ha emprat la línia cel·lular embrionària de *Drosophila melanogaster*: *Schneider 2* o S2. Aquestes cèl·lules es mantenen en medi *Schneider* (Sigma): medi en pols, preparat seguint les instruccions de la seva casa comercial i esterilitzat mitjançant l'ús dels filtres *Stericup&Steritop* (0.22 μ m, Millipore). El medi se suplementa amb un 10% de iFBS [*Fetal Bovine*

Serum (Gibco) inactivat a 56°C durant 30 min], i un 1% de P/S (penicil·lina i estreptomina). Les cèl·lules es passen cada 5-7 dies sembrant-les a una densitat d' $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml.

3.2.4.2. Transfecció de cèl·lules S2 de *Drosophila*

Se sembren les cèl·lules S2 a $3 \cdot 10^6$ cells/ml i es fan créixer en medi Schneider (Sigma) amb 10% d'iFBS a 25°C. Es transfecten les cèl·lules amb 1 µg de DNA [*HeT-A* Gag-GFP (clonat al plàsmid ppL17), *HeT-A* Gag-Flag, Woc-Flag, Z4-Flag, Jil-1-GFP o Lost-GFP]. En el cas de transfectar dos vectors alhora s'afegeix 1 µg de cadascun d'ells (2 µg totals). La transfecció de les cèl·lules S2 es realitza mitjançant el reactiu de transfecció *Effectene* (Qiagen) seguint les instruccions del seu fabricant. Es deixen créixer a 25°C, i 48 h després de la seva transfecció es recullen i centrifuguen, es renten amb PBS 1x, i se'n congela el pellet a -80°C.

3.2.4.3. Generació i manteniment de línies cel·lulars estables

La generació de les línies cel·lulars estables C-TAP, *HeT-A* Gag-CTAP i *TART-RT-CTAP* va ser duta a terme per la Dra. Rute Silva-Sousa.

Clonatge dels vectors per generar les línies cel·lulars estables S2

S'amplifiquen la transcriptasa reversa (RT) de *TART* i la Gag de *HeT-A* a partir de DNA genòmic de *Drosophila melanogaster* fent ús d'encebadors que inclouen llocs de tall per a l'enzim de restricció BamHI, i es clonen al vector TOPO (Invitrogen). Després de la seva digestió amb BamHI, es lliga l'insert al vector pMK33-CTAP (Veraksa A et al 2005) prèviament tallat amb el mateix enzim de restricció. Els encebadors emprats per clonar *TART-RT-CTAP* han estat:

TARTRT_BamHI_F (GGATCCATGGACGCCTGGAAACATGCC) i
TARTPol_BamHI_R(nonstop)
(GGATCCGTCACCTTCGTAGTCGGGTAG).

I per al clonatge de *HeT-A* Gag-CTAP els encebadors han estat:

HeT-AGag_BamHI_F (GGATCCATGTCCATGTCCGACAACCT) i
HeT-AGag_BamHI_R (GGATCCTCTATTAGCTAAGCTTGTTG).

Les cèl·lules S2 es fan créixer a 25°C en medi *Schneider* (Sigma) amb un 10% d'iFBS (medi de cultiu habitual). Es transfecten les cèl·lules amb 2 µg del constructe clonat al vector pMK33 (*TART-RT-CTAP*, *HeT-A* Gag-CTAP o el vector buit CTAP) i el reactiu *Effectene transfection reagent* (Qiagen), seguint les indicacions del seu fabricant. Tres dies després, se seleccionen les cèl·lules fent-les créixer en el medi de cultiu habitual suplementat amb *Hygromycin B* (Sigma) a 300 µg/ml. El medi es canvia cada setmana sense pertorbar les cèl·lules seleccionades. Les línies cel·lulars estables s'estableixen aproximadament després d'1 mes. Les cèl·lules transfectades establement es passen cada 5-7 dies sembrant-les a una densitat de $3 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml en medi *Schneider* (Sigma) suplementat amb 10% d'iFBS i 0,6% d'Higromicina.

3.2.4.4. Re-transfecció de línies cel·lulars estables

Se sembren les cèl·lules S2 estables a $3 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml en medi *Schneider* (Sigma) suplementat amb 10% iFBS i es transfecten amb 1 µg de DNA plasmídic amb *Effectene Transfection Reagent* (Qiagen) seguint les instruccions del seu fabricant. S'incuben a 25°C durant 24 h, i a continuació s'indueixen (veure l'apartat següent: 3.2.4.5. *Inducció de línies cel·lulars estables*). El clon *HeT-A* Gag-GFP i el plàsmid control *pPL17*, el qual conté únicament la GFP, són els DNAs emprats per re-transfectar aquestes línies cel·lulars estables.

3.2.4.5. Inducció de línies cel·lulars estables

Les cèl·lules S2 estables s'indueixen amb la concentració adient de sulfat de coure durant 24 hores. Les cèl·lules control C-TAP i les *TART-RT* C-TAP

s'indueixen a una concentració de 200 μM de CuSO_4 , mentre que les cèl·lules *HeT-A* Gag C-TAP s'indueixen a 100 μM de CuSO_4 . Després d'induir-les durant 24 hores, es recullen i es renten amb PBS 1x, se centrifuguen 5 min a 1800 rpm, i es congelen en nitrogen líquid. Per últim, es pesen els pellets a la balança de precisió i es desen a -80°C .

3.2.4.6. Fixació de cèl·lules transfectades

Es fixen 20 μl de cèl·lules transfectades (aproximadament 10^4 cèl·lules totals) a cada cobreobjectes circular col·locat dins d'un pouet d'una placa de 24 pous rodons. Es realitzen tres preparacions per a cada tipus de transfecció per tenir-ne triplicats idèntics. Es deixa que les cèl·lules s'adhereixin al cobreobjectes durant 20 minuts i es fixen durant 15 min amb formaldehid al 3,7%. Es renten amb PBT (PBS 1X + 0,1% Tween), seguit de PBS 1x, i es tenyeixen amb DAPI durant 15 min. Es renten de nou amb PBS 1x, i es col·loca cada cobreobjectes cap per avall amb les cèl·lules adherides en contacte amb una gota de *Mowiol* situada sobre un portaobjectes. Per últim se sella la preparació i s'observa per microscòpia.

3.2.4.7. Tractament de cèl·lules S2 amb dsRNAs per difusió

Es dilueixen 50 μg del dsRNA d'interès en 1 ml de medi *Schneider* suplementat i s'afegeix aquesta solució gota a gota en un flascó de 5 ml de cèl·lules S2 prèviament sembrades a $3 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml i incubades a 25°C . S'hi afegeixen 50 μg nous de dsRNA d'igual manera a les 24 i 48 hores després d'haver-hi afegit per difusió la primera dosi de dsRNA. A les 48 i 72 h de l'inici de l'experiment es recullen les cèl·lules per realitzar-hi els experiments posteriors necessaris.

3.2.4.8. Preparació de cromosomes metafàsics de cèl·lules S2

Es recullen 500 µl de cèl·lules S2 i es tracten amb 500 µl de *colcemid* (10 µg/ml; Roche) durant 2–3 hores protegides de la llum. A continuació se centrifuguen les cèl·lules durant 3 min a 1500 rpm i se'n renta el *pellet* amb PBS 1x. Un cop centrifugades de nou, se'n resuspèn el *pellet* amb 500 µl de citrat de sodi al 0,5% i es deixa a temperatura ambient durant 10 min. Se centrifuguen les cèl·lules, es resuspenen en 1 ml de *solució de fixació* (metanol : àcid acètic; 3 : 1) i s'hi incuben durant 10 min. Se centrifuguen, i es resuspèn el *pellet* final en 50 µl de *solució de fixació*. El volum final s'afegeix gota a gota en un portaobjectes i es deixa assecar a l'aire. S'hi col·loca a sobre una gota de *Mowiol* amb DAPI incorporat i es tapa amb un cobreobjectes. Se sella i se n'obtenen imatges mitjançant el microscopi de fluorescència *Zeiss Axio Imager.Z2*.

3.2.5. TÈCNIQUES D'EXTRACCIÓ I DETECCIÓ DE PROTEÏNES

3.2.5.1. Generació d'anticossos primaris

S'han generat anticossos a partir de dos conills immunitzats, després de la inoculació del pèptid sintetitzat. El pèptid emprat per a l'anticòs anti-*HeT-A* Gag és AAIKIVNSLSHKKKEC; i el pèptid per a l'anticòs anti-*TART* Pol, el qual pertany al domini Transcriptasa Reversa (RT), és FSETIKSHPNIAVRRC.

3.2.5.2. Extracció de proteïnes de cèl·lules S2, larves o cervells

Es lisen les cèl·lules S2 en 1 ml de tampó de lisi SB (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% Tritó X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, i *Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* de Roche), s'incuben 20 min en gel i se centrifuguen a 13000 rpm durant 10 min a 4°C.

Alternativament, es lisen les cèl·lules amb el tampó de lisi RIPA: 49% TE 1x, 1% Tritó X-100, 0.1% *Sodium Deoxycholate*, 140 mM NaCl, 5 mM Tris HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, i *Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* de Roche.

Les larves senceres o els cervells de larves prèviament congelats a -80°C s'aixafen mitjançant un *pestle* en 1 ml de tampó de lisi SB. Se n'obtenen els extractes proteics d'igual manera que amb les cèl·lules S2.

3.2.5.3. Extracció de proteïnes d'ovaris

Les mosques adultes s'engreixen durant 2-3 dies amb llevat i se'n disseccionen els ovaris en PBS 1x. Es congelen a -80°C uns 75-130 ovaris per a cada immunoprecipitació. Els extractes proteics es preparen aixafant els ovaris amb un *pestle* en 1 ml del tampó de lisi: 25 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.01% *Triton X-100*, 1 pastilla de *Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* de Roche, i 200U de *Protector RNase Inhibitor* (Roche). S'incuben en gel durant 20 min, i se centrifuguen durant 10 min a 13000 rpm a 4°C.

3.2.5.4. Electroforesi de proteïnes en gel d'acrilamida

Es prepara un gel vertical, també anomenat *SDS-PAGE*, compost de dues parts: el gel separador i el gel concentrador. El gel separador està compost per: Acrilamida (40% *acrylamide/Bis 29:1*) al 7-12%, Tris 1,5 M pH 8,8, SDS 10%, aigua, TEMED i APS 10%. El gel separador conté la mateixa Acrilamida però al 5% i Tris 1 M pH 6,8. Aquest últim es fa solidificar amb una pinta de diversos pous a la seva part superior per poder carregar-hi les mostres.

Es carreguen les diferents mostres (prèviament bullides 10 min a 99°C en *tampó de càrrega* 1x) als pous i es corren amb una font de pas de corrent elèctric al màxim de volts i 40 mA per a cada gel (80 mA si es corren dos

gels en paral·lel) durant 1h 20 min amb tampó *running* (25 mM Tris-HCl, 192 mM *Glycine*, 0,1% SDS). (Composició del *Tampó de càrrega 5x*: 10% SDS, 10mM β -mercaptoetanol, 20% glicerol, 0,2M Tris-HCl pH 6,8, 0,05% Blau de Bromofenol).

3.2.5.5. *Western Blot*

Es transfereixen les proteïnes del gel d'acrilamida a la membrana *Immobilon-P Transfer Membrane* (porus de 0,45 μ m, Millipore) durant 1h a 100V (i màxim de mA) a 4°C en agitació mitjançant el *tampó de transferència* (25mM Tris Base, 40mM *Glycine*, 0,05% SDS, 20% metanol). Després, pot tenyir-se la membrana amb *Ponceau* (0.1% Ponceau S en 5% àcid acètic) durant 1 minut per comprovar que la transferència s'ha realitzat amb èxit i que les proteïnes s'han carregat i han corregut pel gel correctament. A continuació es bloqueja la membrana amb TTBS-llet 5% (TTBS: 25 mM Tris HCl, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1% Tween-20, pH 7,4) durant 1h a temperatura ambient en agitació o O.N. a 4°C. Tot seguit, s'incuba a la concentració adient amb l'anticòs primari desitjat (veure l'apartat 3.1.3. *Anticossos*) en TTBS-llet 5% o únicament TTBS (segons l'anticòs) durant 1h a temperatura ambient o O.N. a 4°C en agitació. Es renta amb TTBS i s'incuba amb l'anticòs secundari corresponent durant 45 min – 1 h a la dilució adient en TTBS-llet 5% o TTBS. Es renta diverses vegades amb TTBS i per últim amb TBS 1x (TBS: 25mM Tris HCl, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, pH 7,4). Finalment, es revela la membrana amb el reactiu *Luminata Forte Western HRP Substrate* (Millipore) o *Luminata Classico Western HRP Substrate* (Millipore) (en funció de la intensitat de revelat desitjada) i el film fotogràfic *CURIX RP2 PLUS Medical X-Ray Film* (Agfa HealthCare), a les fosques i a diferents temps d'exposició.

3.2.5.6. Co-Immunoprecipitació

S'incuben els lisats proteics recent extrets durant 2 h a 4°C amb rotació amb 50 µl de les boles magnètiques *PureProteome Protein A and Protein G Magnetic Beads* (Millipore) que tenen ja unit l'anticòs específic. S'empra el mateix volum d'extracte proteic als controls negatius que a les immunoprecipitacions (IPs) a analitzar. Les boles magnètiques han estat prèviament unides als anticossos necessaris (veure'n volums i tipus a l'apartat 3.1.3. *Anticossos*) en 1 ml de tampó de lisi durant 1 h a 4°C en una roda, i s'han rentat diverses vegades amb tampó de lisi abans d'incubar-se amb els lisats proteics. El tipus de tampó utilitzat depèn de les mostres emprades, essent l'SB l'emprat de forma habitual, i usant-se per a ovaris el mateix tampó que l'utilitzat per a la seva extracció proteica.

Es renten els immunocomplexes diverses vegades amb el tampó de lisi, es resuspenen en 40 µl de *tampó de càrrega* 1x i es bullen 10 min a 99°C. Es carreguen les immunoprecipitacions juntament amb els extractes proteics inicials (abans de la IP), i en cas de ser necessari també els seus *pellets*, en un gel *SDS-PAGE* i s'analitza per *western blot* (veure els apartats 3.2.5.4. *Electroforesi de proteïnes en gel d'acrilamida* i 3.2.5.5. *Western Blot*).

3.2.6. PURIFICACIÓ DE COMPLEXES PROTEICS

3.2.6.1. Obtenció del pellet cel·lular d'S2 estables induïdes per a la purificació de complexos proteics

Se sembren 32 flascs de 50 ml amb les línies cel·lulars S2 estables a $3 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml sense Higromicina i s'indueixen amb la concentració adient de CuSO_4 durant 24 h (veure l'apartat 3.2.4.5. *Inducció de línies cel·lulars estables*). Es recullen totes les cèl·lules, se centrifuguen 5 min a 1800 rpm i es renten amb PBS 1x. Se'n congela el pellet en nitrogen líquid i es pesa amb una balança de precisió. El pes mínim de pellet cel·lular és de 6 g per a

cada purificació de complexos proteics. Per últim, es desa el pellet a -80°C fins la seva utilització.

3.2.6.2. Preparació de les boles magnètiques d'IgGs

Per a cada purificació es renten 40 mg de boles magnètiques *Dynabeads M-270 Epoxy* (Invitrogen) amb el tampó 0.1 M *Sodium Phosphate Buffer* pH 7.1 durant 10 min a temperatura ambient en una roda giratòria. S'hi uneix l'anticòs *Pierce Rabbit IgG whole Molecule* (Thermo Scientific) mitjançant 0.1 M *Sodium Phosphate Buffer* pH 7.1 i *Ammonium Sulphate* durant 48 h a la roda giratòria, a les fosques i a temperatura ambient. Es renten les boles diverses vegades amb PBS 1x, i a continuació es renten durant 10 min amb la solució PTT (PBS 1x, 0.5% Tween-20, 0.5% Tritó X-100). Després d'un últim rentat amb PBS, es desen les boles en PSA (PBS-0.02% *Sodium Azide*) a 4°C protegides de la llum fins la seva utilització.

3.2.6.3. Tècnica de purificació de complexos proteics *Tandem Affinity Purification* (TAP) seguida d'una anàlisi per espectrometria de masses (MS)

Per lisar les cèl·lules S2 estables C-TAP i *TART-RT* C-TAP (prèviament induïdes) s'usa el *Tampó A*, mentre que per a *HeT-A* Gag C-TAP s'empra el *Tampó B*. El *Tampó A* conté: 75 mM HEPES pH 7,5; 150 mM KCl; 1,5 mM EGTA; 1,5 mM MgCl_2 ; 7,5% Glicerol; 0,5% NP-40; 0,5 mM DTT; 0,1 mM PMSF i *Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* (Roche). El *Tampó B* està compost per: 5 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM KCl; 5 mM MgCl_2 ; 1% (p/v) àcid deoxicòlic; 1% (v/v) Tritó X-100 i *Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* (Roche).

Es resuspèn el pellet cel·lular (de mínim 6 g) en *Tampó A* o *B* durant 20 min en gel, i després se submergeix en nitrogen líquid. Es descongelen ràpidament les cèl·lules en un bany de 30°C i es congelen de nou en nitrogen líquid. Aquest últim pas de descongelació-congelació es repeteix fins un

total de 6 vegades per lisar completament les cèl·lules. A continuació se centrifuguen a 27300 rcf durant 1 h a 4°C per a C-TAP i *TART-RT* C-TAP, o a 18500 rcf durant 30 min a 4°C per a *HeT-A* Gag C-TAP.

Es renten les boles magnètiques unides a IgGs amb el tampó IPP150 (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,5% NP-40; 1mM PMSF) durant 10 min a 4°C a la roda giratòria, i s'incuben amb l'extracte cel·lular O.N. a 4°C a la roda.

Es llença l'eluït de la incubació i es renten les boles 3 vegades amb IPP150 durant 10 min a 4°C. A continuació, es renten les boles amb el tampó *TEV Cleavage* (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT) durant 10 min, i es digereixen amb 100U de la *TEV Protease* (Invitrogen) en 1 ml de tampó *TEV Cleavage* durant 1 h a temperatura ambient. L'eluït de la digestió es recull i es realitza una segona digestió afegint a les boles 1 ml nou de tampó *TEV Cleavage* i 100U més de *TEV Protease* durant 30 min a temperatura ambient. Es recull de nou l'eluït de la segona digestió i s'ajunta amb la primera.

Es renten les boles de Calmodulina (Stratagene) amb el tampó *Calmodulin Binding* (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM Acetat de Magnesi; 1 mM Imidazol; 2 mM CaCl₂; 0,1% NP-40; 10 mM β-mercaptoetanol) a 4°C durant 10 min, se centrifuguen a 2000 rpm 1 min a 4°C i se n'elimina el sobrenedant final.

Les boles de Calmodulina s'incuben juntament amb: 6 ml de tampó *Calmodulin Binding*, 6 µl d'1M CaCl₂, i els dos eluïts de les digestions de la proteasa *TEV* (2 ml); durant 2 h a 4°C a la roda giratòria. Es renten 4 vegades les boles de Calmodulina amb el tampó *Calmodulin Binding* a 4°C, i es bullen durant 10 min en *tampó de càrrega*. Es carreguen les mostres en un gel de poliacrilamida de gradient 8-16%, es corre a l'amperatge adient, i es tenyeix amb Nitrat de Plata o Blau de *Coomassie (Brilliant Blue G-Colloidal*

Concentrate, Sigma-Aldrich) seguint les instruccions de la seva casa comercial. Es talla el gel amb les mostres d'interès i s'envien a analitzar al servei d'Espectrometria de Masses (MS) (Departament de Proteòmica de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron).

Al servei d'MS preparen i digereixen pertinentment les mostres rebudes, les analitzen mitjançant un espectròmetre de masses MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*) i n'obtenen un espectre o empremta peptídica. A la tècnica MALDI-TOF la mostra es col·loca en una matriu sòlida que la protegeix i en facilita la vaporització i ionització. Mitjançant l'aplicació d'un làser polsat s'alliberen ions de la mostra. Els ions són detectats al detector i generen un patró específic d'aquell pèptid concret. Per últim, emprant el *software Mascot*, se cerquen a diverses bases de dades específiques d'MS les seqüències o empremtes peptídiques obtingudes i se n'identifiquen les proteïnes purificades.

3.2.7. IMMUNODETECCIONS

3.2.7.1. Immunolocalització d'ovaris

Es disseccionen en PBS 1x els ovaris de femelles engrèixades amb llevat durant 2-3 dies, i es fixen amb formaldehid 4% *methanol-free Ultra Pure EM-grade formaldehyde* (Polysciences) durant 15 min. Es renten els ovaris fixats amb PBST (PBS-0.1% Tween-20) i es tracten amb l'*Image-iT FX Signal Enhancer* (Molecular Probes-Invitrogen) durant 30 min protegits de la llum. A continuació, es bloquegen durant 1h amb BBT [PBST + 0.1% *globulin-free BSA (Bovine Serum Albumin)*]. S'incuben amb la dilució adient d'anticòs primari en BBT O.N. a 4°C en agitació. Es bloquegen de nou els ovaris durant 1h amb BBT + 2% NGS (*Normal Goat Serum*), i s'incuben després 1h amb l'anticòs secundari necessari diluït a 1:500 en BBT + 2% NGS. Es tenyeix el DNA incubant els ovaris durant 30 min amb una dilució 1:1000 de To-Pro-3 i es munten en *Vectashield* (Vector laboratories) sobre

un portaobjectes. S'hi col·loca un cobreobjectes a sobre i se sella la mostra. Per últim se n'obtenen imatges mitjançant microscòpia confocal (SPE2).

3.2.7.2. Immunolocalització d'embrions

Es recol·lecten embrions durant diversos dies i a diferents hores del dia (en funció de la fase de desenvolupament que es desitgi estudiar), recollint sempre embrions posats posteriorment a les 12:00 p.m. fins obtenir-ne la quantitat necessària per a un experiment. La majoria de recol·leccions s'han realitzat a les 2:30 p.m., 5:00 p.m. i 7:30 p.m., i s'han ajuntat en un mateix *pool* per obtenir-ne embrions d'entre 0 i 2,5 h de vida. Es mantenen les mosques d'interès en gàbies situades cap per avall sobre plaques compostes d'agar i suc de poma on es col·loca a sobre una pasta de llevat que es renova cada dia. Es recullen els embrions amb l'ajuda d'un pinzellet humitejat amb aigua destil·lada i se situen en una mini-cistella amb reixeta metàl·lica que no deixa passar els embrions a través seu. Es renten els embrions amb aigua destil·lada i es descorionen amb una dilució de lleixiu al 50% durant 3-4 min. Es renten agitant-los amb aigua destil·lada abundant. A continuació s'aboquen els embrions en un petit vial de vidre que conté la solució de fixació composta per: 2 ml de paraformaldehid al 4% (preparat fresc diluint-lo en PBS 1x) + 8 ml d'heptà. S'hi incuben durant 20 min amb agitació suau. Se n'elimina la fase inferior completament amb ajuda d'una pipeta Pasteur de vidre amb la punta estreta a la flama. S'hi afegeix 10 ml de metanol i s'agita amb força durant 1 min. Amb una pipeta Pasteur de vidre amb punta normal es transfereixen els embrions desvitel·linitzats (els que precipiten al fons del vial) en un *ependorf*. Es renten diverses vegades amb metanol, i per últim s'ajunten amb altres embrions recol·lectats anteriorment per formar un únic *pool* d'embrions d'aquella línia (en el cas d'anar-los recollint en diverses vegades). Es desen els embrions a 4°C en metanol fins la seva utilització.

Una vegada obtinguda la quantitat d'embrions totals necessària per a la realització de l'experiment desitjat, caldrà rehidratar els embrions abans d'utilitzar-los. Per rehidratar els embrions se n'aspira tot el metanol amb una pipeta Pasteur i es renten durant 5 min amb una dilució 7:3 de Metanol:PBST. (La dilució PBST conté PBS 1x + 0,1% Tween-20). Després, es renten amb 1:1 Metanol:PBST durant 5 min. A continuació es fa un altre rentat de 5 min amb 3:7 Metanol:PBST. I, finalment, es realitza un últim rentat amb PBST.

Els embrions, ja fixats i rehidratats, es renten de nou amb PBST i es tracten amb *Image-iT FX Signal Enhancer* (Molecular Probes-Invitrogen) durant 30 min protegits de la llum. Es bloquegen durant 1 h amb BBT [PBST + 0.1% *globulin-free BSA* (*Bovine Serum Albumin*)], i s'incuben O.N. a 4°C amb la dilució adient d'anticòs primari en BBT. Es bloquegen de nou durant 1h amb BBT + 2% NGS (*Normal Goat Serum*), i s'incuben després durant 1h amb l'anticòs secundari necessari diluït a 1:500 en BBT + 2% NGS. Es tenyeix el DNA incubant els embrions durant 30 min amb una dilució 1:1000 de To-Pro-3. Es munten els embrions en *Vectashield* (Vector laboratories) sobre un portaobjectes, es cobreix la mostra amb un cobreobjectes i se sella. Per últim, se n'obtenen imatges mitjançant microscòpia confocal (SPE2).

3.2.7.3. Immunodetecció de cèl·lules S2

Es fixen 20 µl de cèl·lules transfectades (aproximadament 10^4 cèl·lules totals) a cada cobreobjectes circular situat dins d'un pouet d'una placa de 24 pous rodons. Es fan tres preparacions per a cada tipus de transfecció realitzada per tenir-ne triplicats idèntics. Es deixa que les cèl·lules s'adhereixin al cobreobjectes durant 20 minuts. Es fixen incubant-les durant 15 min amb formaldehid al 3,7%. Es renten dues vegades amb PBT (PBS 1X + 0,1% Tritó) i es bloquegen fent-hi 2 rentats de 20 min amb PBT + 1% BSA (*Bovine Serum Albumina*). A cada pou s'hi afegeixen 200 µl de la dilució adient d'anticòs primari diluït en PBT + 1% BSA i s'incuba O.N. a

4°C. S'hi fan diversos rentats amb PBT + 1% BSA, i s'incuben amb 100 µl d'una dilució 1:500 de l'anticòs secundari adient durant 1 h a temperatura ambient. Es renten les cèl·lules diverses vegades amb PBT, i per últim amb PBS 1x. Es col·loquen les cèl·lules adherides al cobreobjectes cap per avall en contacte amb una gota de Mowiol-DAPI situada sobre un portaobjectes. Se sella la mostra adientment i s'observa per microscòpia.

3.2.7.4. Immunodetecció de cromosomes metafàsics

Es recullen 500 µl de cèl·lules i es tracten amb 500 µl de *colcemid* (10 µg/ml; Roche) durant 2–3 hores resguardades de la llum. A continuació se centrifuguen les cèl·lules durant 3 min a 1500 rpm i se'n renta el *pellet* amb PBS 1x. Se centrifuguen de nou, se'n resuspèn el pellet en 500 µl de citrat de sodi 0,5% (xoc hipotònic) i s'hi incuben durant 10 min a temperatura ambient. Se centrifuguen les cèl·lules, se n'elimina tot el sobrenedant i s'incuben durant 20 min amb 1 ml de formaldehid 2% a temperatura ambient. Se centrifuguen una vegada més i se n'elimina el sobrenedant. S'hi afegeix 1 ml de metanol 100% fred i s'hi incuben durant 10 min. Se centrifuguen i se n'elimina el sobrenedant (sense apurar en excés). Es resuspèn el pellet cel·lular en el volum de sobrenedant restant i es col·loca sobre un portaobjectes net. Es deixa assecar a l'aire i se situa el portaobjectes en un suport vertical de vidre específic per a portaobjectes. Es renten els portaobjectes amb PBS 1x i s'incuben amb PBST-llet (PBS-Tritó 0,1%+1% llet en pols) durant 1 h a temperatura ambient o O.N. a 4°C. Es col·loquen els portaobjectes dins d'una *cambrà humida* (capsa tapada que protegeix de la llum i manté la humitat interior). Es posen 20-40 µl de la dilució desitjada de l'anticòs primari (en PBST-llet) a sobre de cada portaobjectes i es tapa cadascun d'ells amb un cobreobjectes, procurant que no hi quedi cap bombolla. S'incuben O.N. a 4°C dins la *cambrà humida*. Es llencen els cobreobjectes i es realitzen diversos rentats dels portaobjectes amb PBST-llet dins del suport vertical amb agitació i a temperatura ambient. Es

col·loquen els portaobjectes a la *cambra humida* de nou i s'hi incuben amb l'anticòs secundari adient a una dilució 1:500 en PBST-llet durant 1 h a temperatura ambient coberts amb els cobreobjectes i protegits de la llum. Es llencen els cobreobjectes i es realitzen diversos rentats amb PBS-Tritó 0,1%, seguits de rentats amb PBS 1x. Es deixen assecar els portaobjectes a l'aire. Es col·loca una gota de Mowiol-DAPI a sobre cada mostra i es tapen amb un cobreobjectes. Un cop sellades les mostres, s'observen mitjançant el microscopi de fluorescència *Zeiss Axio Imager.Z2*.

3.2.7.5. Immunolocalització de neuroblasts

Es dissecionen els cervells de larves d'estadi 3 (*third instar larvae*) en 0.7% NaCl, i s'incuben durant 10 min en 0.5% *Trisodium citrate*. A continuació, es fixen durant 8 min amb una solució del 3,7% de formaldehid + 45% d'àcid acètic sobre un cobreobjectes pre-tractat amb *Silanization Solution II* (Fluka). Es col·loca un portaobjectes sobre el cobreobjectes que conté la mostra, s'esclafen els cervells mitjançant la tècnica d'*squash*, i se submergeixen en nitrogen líquid durant uns segons. Se n'elimina el cobreobjectes amb l'ajuda d'un bisturí i es renten les mostres (els portaobjectes) amb 0,1% PBT (PBS 1x + 0,1% Tritó X-100) al suport vertical de vidre. Tot seguit, es bloquegen incubant-les amb PBTM (PBT + 1% llet en pols descremada) durant 1h. S'incuben amb l'anticòs primari desitjat a la dilució adient en PBTM a la *cambra humida* O.N. a 4°C (cobrint cada portaobjectes amb un cobreobjectes enmig dels quals es troba la dilució amb l'anticòs, lliure de bombolles). Es renten una vegada amb PBT i diversos cops amb PBTM. S'incuben amb l'anticòs secundari adient diluït 1:500 en PBTM durant 1h a temperatura ambient (també cobertes amb un cobreobjectes i sense bombolles) dins la *cambra humida*, protegides de la llum. Es renten els portaobjectes amb PBT al suport vertical, i per últim amb PBS 1x. S'afegeix una gota de Mowiol-DAPI sobre el portaobjectes i s'hi col·loca a sobre un cobreobjectes. Per últim, se sellen les preparacions i se n'obtenen imatges mitjançant el microscopi *Zeiss Axio Imager.Z2*.

3.2.8. OBTENCIÓ D'IMATGES MITJANÇANT MICROSCÒPIA

S'observen les immunolocalitzacions de cèl·lules, neuroblasts, o cromosomes metafàsics amb el microscopi de fluorescència *Imager.Z1* de *Zeiss*. S'obtenen fotografies a diferents augments emprant el microscopi i el sistema *ApoTome* de disminució del *background* (soroll de fons) de fluorescència. Es visualitzen i processen les imatges mitjançant el software *AxioVision (release 4.6)* del propi microscopi i, posteriorment, amb *Adobe Photoshop CS2* quan és necessari.

En el cas d'immunolocalitzacions o hibridacions *in situ* d'RNA fluorescents s'utilitza el microscopi confocal SPE o SPE2.

Per a fotografies en camp clar s'empra el microscopi *Imager.Z1* de *Zeiss*, o la lupa *Discovery.V8 SteREO* de *Zeiss* juntament amb el software d'anàlisi i millora de la qualitat de les imatges *Combine Z4*.

Les fotografies obtingudes *in vivo* de cèl·lules transfectades s'obtenen mitjançant el microscopi invertit de fluorescència *Nikon Eclipse TS100*.

3.2.9. ANÀLISI D'IMATGES OBTINGUDES PER MICROSCÒPIA CONFOCAL AMB EL SOFTWARE *IMAGE J*: Quantificació dels nivells de fluorescència dels punts intranuclears de la proteïna *TART Pol*

S'han realitzat prèviament immunolocalitzacions d'ovaris salvatges (Lost-GFP), Lost¹ homozigots, Lost¹ Rump¹/TM3, Tral Hypomorphic/TM3 i Aub^{QC42}/CyO amb l'anticòs primari anti-*TART Pol* (1:50) i l'anticòs secundari *anti-rabbit Alexa Fluor-555* (Invitrogen) (1:500), tal com s'indica a l'apartat 3.2.7.1. *Immunolocalització d'ovaris*.

A continuació, s'han obtingut imatges a 80x augments de diversos *stacks* (talls realitzats pel microscopi) d'amplada igual a 0,8 μm mitjançant el microscopi confocal *SPE* i *SPE2*. Per a totes les línies de *Drosophila melanogaster* analitzades s'han emprat les mateixes condicions i paràmetres de presa d'imatges (intensitat dels làsers, escombrats de les imatges, etc).

Tot seguit, s'han processat totes les imatges obtingudes de totes les línies de *Drosophila* d'igual manera mitjançant el *software Image J*. Emprant aquest programa, s'han obtingut els valors d'intensitat màxima de fluorescència de cadascun dels punts que forma la proteïna *TART Pol* als estadis 2-3 de desenvolupament a tots els *stacks* que componen les *nurse cells* de tota la cambra ovàrica per a cadascuna de les línies analitzades. S'han analitzat un mínim de 140 punts de la proteïna *TART Pol* per a cadascuna de les línies en cada experiment. Els resultats que es presenten (Figura 68) mostren la mitjana dels valors obtinguts en dos o tres experiments independents (indicat en cada cas). A cada experiment s'han relativitzat els valors d'intensitat de fluorescència de cada mutant pels valors de la línia salvatge (Lost-GFP) per tal de poder comparar experiments independents entre sí. Així, els valors finals presentats a l'apartat 4. *Resultats* són un percentatge de la intensitat de fluorescència dels mutants respecte a la línia salvatge (la qual s'ha considerat com el 100%).

4. RESULTATS

4. RESULTATS

4.1. CARACTERITZACIÓ DE LA RNP TELOMÈRICA: PROTEÏNES I RNAs DELS RETROTRANSPOSONS TELOMÈRICS *HET-A* I *TART*

Per a l'estudi dels retrotransposons telomèrics s'han analitzat els teixits de la mosca que tenen una major expressió dels RNAs de *HeT-A* i *TART* així com una major síntesi de les proteïnes que codifiquen. Aquests teixits són els que presenten major replicació telomèrica, és a dir, aquells on es dona una divisió cel·lular activa. En el cas de *Drosophila* aquests teixits són el cervell i els discos imaginals de la larva, així com la línia germinal de l'adult (George JA i Pardue ML 2003).

Concretament, per als estudis que es presenten a continuació sobre els retrotransposons telomèrics de *Drosophila* s'han analitzat neuroblasts de larves d'estadi 3 de desenvolupament (*third instar larvae*), així com ovaris i embrions de femelles adultes.

Línies de mosca emprades per a l'estudi dels retrotransposons telomèrics

Les línies de mosques analitzades per a l'estudi de *HeT-A* i *TART* han estat, per una banda, mosques salvatges (*wild-type*) *white* (w), i per una altra, diverses línies mutants (veure l'apartat 3. *Materials i mètodes*).

A continuació es descriuen breument les línies mutants que sobreexpressen els retrotransposons telomèrics i que per tant en faciliten l'estudi.

- **GIII**: Mosques mutants amb telòmers deu vegades més llargs que les salvatges. Aquesta línia amb *background Oregon* (salvatge) conté una mutació al cromosoma III anomenada *Tel-1*. La posició citològica de la

mutació *Tel-1* és coneguda (3L (69)), però es desconeix encara la causa molecular responsable de l'increment telomèric que provoca (Siriaco GM et al 2002). L'anàlisi d'aquesta línia permet observar resultats que podrien passar inadvertits a la línia salvatge pel fet de tenir incrementada la mida dels telòmers i tenir també una major expressió dels retrotransposons telomèrics.

- **Aubergine:** Mosques mutants per al gen *aubergine*. Els mutants analitzats són concretament: *aub*^{QC42} i *aub*^{HN} (veure l'apartat 3. *Materials i mètodes*). Aubergine és una de les proteïnes principals de la via dels PIWI/piRNAs, responsable del silenciament d'elements mòbils a la línia germinal. L'estudi d'aquest mutant és útil al nostre sistema ja que com s'ha explicat abans *HeT-A* i *TART* estan regulats per piRNAs. La desrepressió de *HeT-A* i *TART* als mutants d'*aubergine* permet observar els efectes de la sobreexpressió dels retrotransposons telomèrics a ovaris.

4.1.1. Caracterització de les proteïnes telomèriques *HeT-A* Gag i *TART*Pol

4.1.1.A. Detecció de les proteïnes endògenes i recombinants de *HeT-A* Gag i *TART*Pol

S'han generat al nostre laboratori anticossos de conill, a partir de pèptids, que reconeixen les proteïnes Gag de *HeT-A* i Pol de *TART*. Aquests anticossos reconeixen específicament les proteïnes d'interès tant per *western blot* (Figura 32) com per immunodetecció.

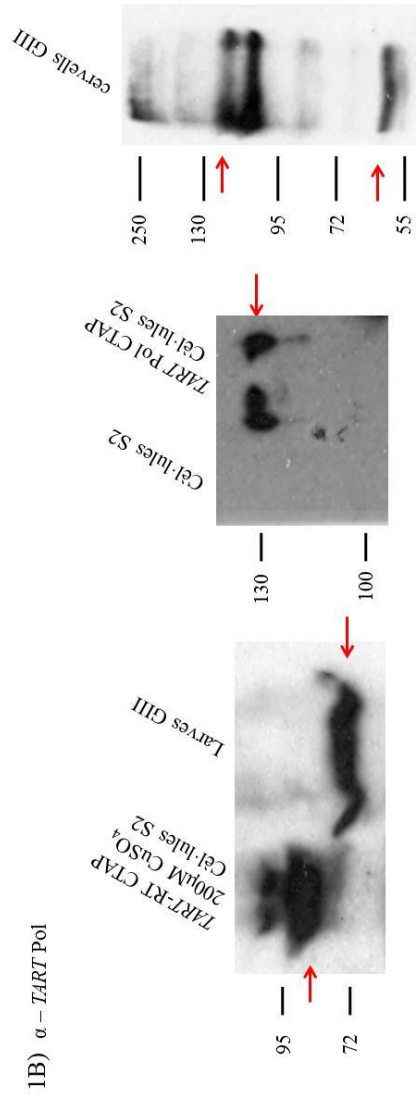
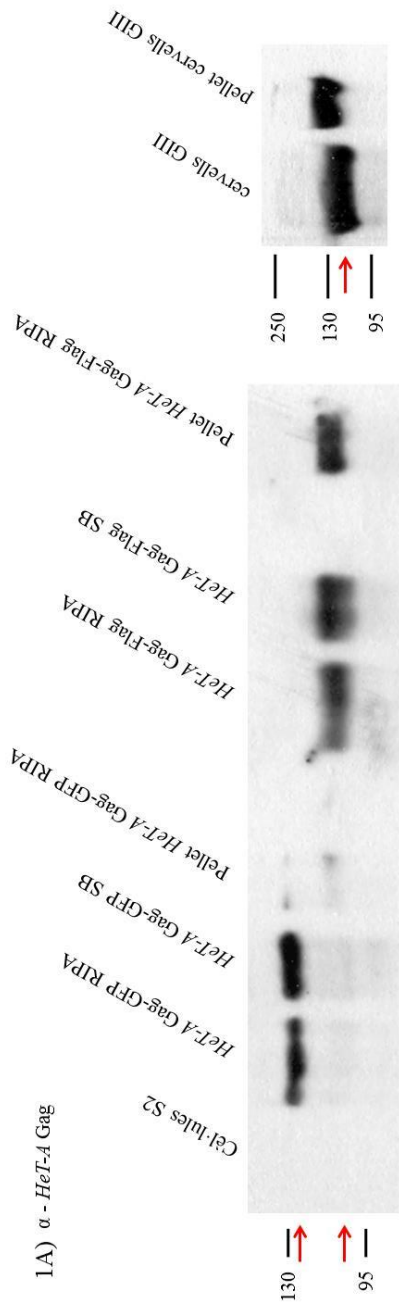


Figura 32. Western blot de l'extracte proteic de cèl·lules S2, cervells i larves GIII d'estadi 3 revelats amb els anticossos α -*HeT-A* Gag i α -*TART* Pol. 1A) Western blot revelats amb l'anticòs anti-*HeT-A* Gag. A l'esquerra: cèl·lules S2 normals (primera columna), cèl·lules S2 transfectades amb *HeT-A* Gag-GFP fent-ne l'extracció proteica amb diferents tampons de lisi i el seu *pellet* (columnes segona, tercera i quarta), i cèl·lules S2 transfectades amb *HeT-A* Gag-Flag fent-ne l'extracció proteica amb diversos tampons de lisi i el seu *pellet* (columnes cinquena, sisena i setena). A la dreta: cervells de larves G3 d'estadi 3. A la primera columna s'observa l'extracte proteic del sobrenedant resultant de la lisi dels cervells, i a la segona columna s'hi troba el seu *pellet*. A cervells d'ovaris G3 s'observa una mida lleugerament major de l'habitual per a la proteïna *HeT-A* Gag endògena. 1B) Western blot revelats amb l'anticòs α -*TART* Pol. A l'esquerra: cèl·lules S2 transfectades establement amb *TART*-RT-CTAP induïdes amb 200 μ M de CuSO_4 (a la primera columna) i larves GIII d'estadi 3 (*3rd instar larvae*). S'observa la transcriptasa reversa transfectada i endògena de *TART*, respectivament. Al centre: cèl·lules S2 normals (primera columna) i cèl·lules S2 transfectades establement amb *TART* Pol CTAP (segona columna). A la dreta: cervells de larves GIII d'estadi 3. En tots els casos, les fletxes vermelles indiquen la localització de les proteïnes d'interès (de diferent mida en funció de les *tags* a què es troben unides i el tipus d'extracte proteic).

Concretament, l'anticòs de *TART* reconeix una regió de la transcriptasa reversa (RT), i és per aquesta raó que en alguns casos en què la Pol de *TART* no ha estat encara processada l'anticòs pot reconèixer la seva forma *full-length* (sencera), mentre que quan ja s'han escindit la RT i l'endonucleasa es detectarà únicament la seva RT. La RT de *TART* pesa 63 kDa, mentre que la Pol sencera (RT+Endonucleasa) té un pes molecular de 124 kDa. Només poden observar-se les dues variants de mida de *TART* per *western blot* quan

es detecten amb l'anticòs anti-*TART* Pol les proteïnes endògenes de cervells de larves de *Drosophila* (veure la Figura 32).

D'altra banda, la proteïna Gag de *HeT-A* té un pes molecular d'uns 100 kDa.

Les proteïnes recombinants emprades són *HeT-A* Gag-GFP i *HeT-A* Gag-Flag, així com *TART*-RT-CTAP i *TART* Pol C-TAP. La proteïna verda fluorescent (GFP) consta de 27 kDa, mentre que Flag és una *tag* recombinant composta únicament per 8 aminoàcids. D'altra banda, el TAP *tag* pesa 21 kDa.

Hem realitzat també immunolocalitzacions amb els anticossos α -*HeT-A* Gag i α -*TART* Pol a ovaris de *Drosophila virilis*. Aquests funcionen com a control negatiu ja que la similitud a nivell d'aminoàcids entre les proteïnes telomèriques d'ambdues espècies és molt reduïda. És per aquesta raó doncs que no detectem les proteïnes *HeT-A* Gag ni *TART* Pol a ovaris de *Drosophila virilis* (Figura 33) mitjançant els anticossos generats a partir d'antígens de *Drosophila melanogaster*.

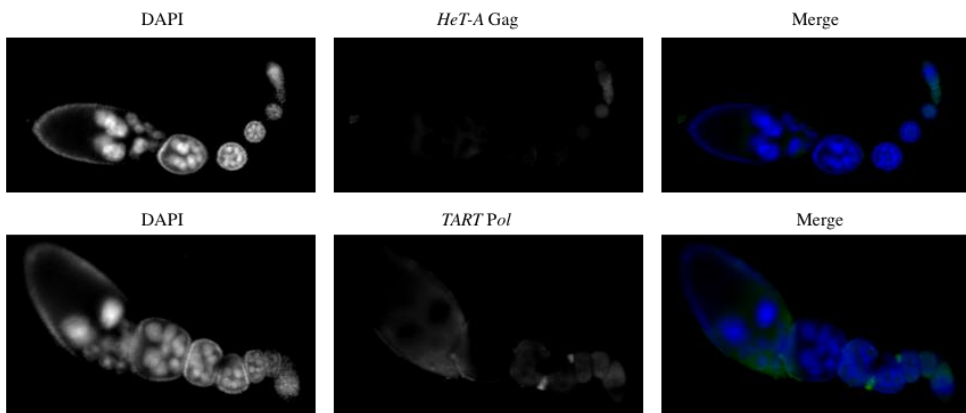


Figura 33. Immunolocalització d'ovaris de *Drosophila virilis* amb els anticossos primaris anti-*HeT-A* Gag (fila superior) i anti-*TART* Pol (fila inferior). La primera columna correspon al marcatge del DNA amb DAPI,

la segona a la localització de la proteïna en qüestió (*HeT-A* Gag o *TART* Pol), i la tercera al solapament dels dos canals (*Merge*).

Mitjançant la tècnica d'immunodetecció, emprant els anticossos mostrats, i fent ús de microscòpia confocal, s'han obtingut imatges d'alta resolució d'ovaris de *Drosophila melanogaster* que mostren una localització ben definida de les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol. S'han estudiat els ovaris de mosques salvatges (*wild-type*, w) així com dels mutants GIII (dels quals mai abans s'havia mirat la localització de cap dels retrotransposons telomèrics) i de mutants d'*aubergine* (Figures 34 i 36).

Tots aquells senyals dels marcatges tant d'immunolocalitzacions de proteïnes com d'hibridacions *in situ* d'RNA que no presenten una localització ben definida o que tenen una intensitat poc elevada s'han considerat com a *background* o soroll de fons.

En conjunt, hem pogut comprovar l'especificitat dels anticossos anti-*HeT-A* Gag i anti-*TART* Pol mitjançant els *western blot* realitzats de les proteïnes telomèriques endògenes i recombinants (Figura 32), així com amb les immunolocalitzacions dutes a terme amb línies que tenen incrementada l'expressió de *HeT-A* i *TART* (Figures 34 i 36) o que no en tenen per ser de diferent espècie (control negatiu) (Figura 33).

4.1.1.B. Localització de la proteïna *HeT-A* Gag a ovaris

A la Figura 34 s'observa la localització endògena de la proteïna *HeT-A* Gag a ovaris de *Drosophila melanogaster* mitjançant immunodeteccions amb l'anticòs anti-*HeT-A* Gag.

- A ovaris **salvatges** (w) (Figura 34; A-E) la proteïna *HeT-A* Gag localitza principalment al germari (Fig. 34A) i al nucli de les *nurse cells* de forma difosa fins l'estadi 4 (Fig. 34; A-C), així com en menor grau al seu citoplasma. Aquesta proteïna també està present a les cèl·lules fol·liculars, concentrada vora la membrana nuclear, a tots els estadis de desenvolupament (Fig. 34; A-E).

- A ovaris mutants **GIII** (Figura 34; F-J) *HeT-A* Gag localitza igual que als salvatges però amb major intensitat a les cèl·lules fol·liculars des de l'estadi 1 fins al 6 (Fig. 34; F-I).

- Als mutants transheterozigots d'**Aubergine**, *aub^{QC42}/aub^{HN}*, *HeT-A* Gag localitza (Figura 34; K - T) com a ovaris salvatges únicament durant els primers estadis de desenvolupament (estadis 1-3) (Fig. 34; K i L). Així, als estadis 4-6 *HeT-A* Gag es detecta ja dins l'oòcit (Fig. 34M i 34N). A l'estadi 8, localitza formant punts dins el nucli de les *nurse cells* (Fig. 34Q) i s'acumula com un únic punt al seu citoplasma (Fig. 34T), o bé es troba a la regió anterior de l'oòcit (Fig. 34P) o al seu nucli (Fig. 34S). Igual que a *wild-type*, localitza a les cèl·lules fol·liculars durant tots els estadis de desenvolupament, especialment al seu citoplasma, com pot observar-se a la Fig. 34S.

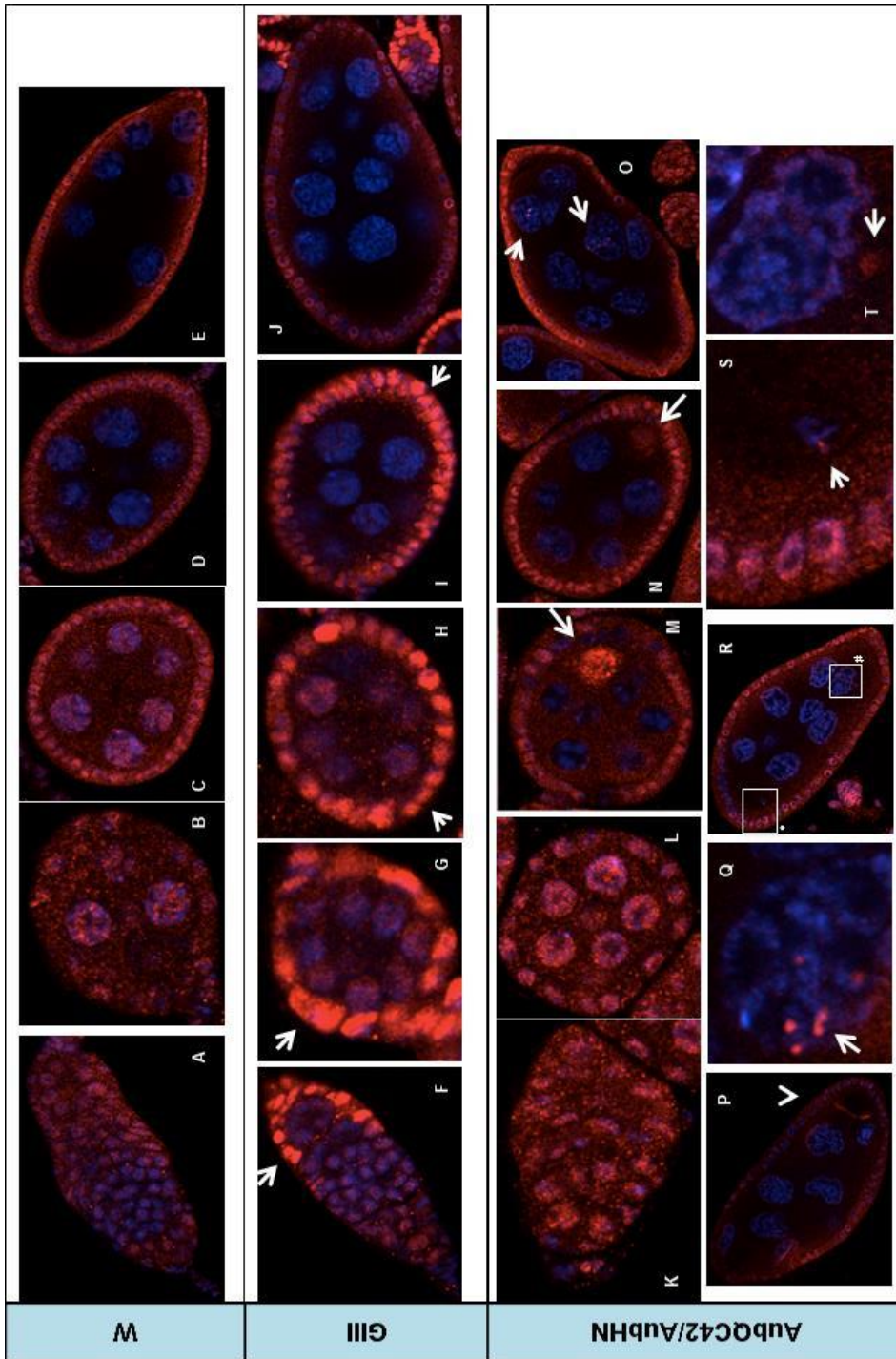


Figura 34. Localització de la proteïna *HeT-A* Gag (en vermell) a ovaris salvatges i mutants de *Drosophila melanogaster*. El DNA està marcat en blau. S'ha usat la línia white (w) w^{1118} com a control. **A:** germari i estadi 1 de w; **B:** estadi 2-3 de w; **C:** estadi 3-4 de w; **D:** estadi 5-6 de w; **E:** estadi 7-8 de w. **F:** germari i estadi 1 de GIII; **G:** estadi 2-3 de GIII; **H:** estadi 4-5 de GIII; **I:** estadi 5-6 de GIII; **J:** estadi 7-8 de GIII. **K:** germari del mutant d'*aubergine*; **L:** estadi 2-3 del mutant d'*aub*; **M:** estadi 4-5 del mutant d'*aub*; **N:** estadi 5-6 del mutant d'*aub*; **O:** estadi 8 del mutant d'*aub*; **P:** estadi 8 del mutant d'*aub*. **Q:** nucli d'una *nurse cell* d'estadi 8 del mutant d'*aub*; **R:** estadi 8 del mutant d'*aub*; **S:** ampliació del nucli de l'oòcit de la imatge R; **T:** ampliació del nucli d'una *nurse cell* de la imatge R.

Per estudiar la presència de la proteïna *HeT-A* Gag als telòmers s'ha dut a terme una immunolocalització de *HeT-A* Gag a ovaris Hoap^{GFP}. La línia transgènica Hoap^{GFP} expressa endògenament la proteïna Hoap fusionada a la proteïna verda fluorescent GFP. Hoap (codificada pel gen *caravaggio*) forma part del *capping* telomèric (veure l'apartat 1.6.1. *El complex de capping telomèric*). A mosques salvatges aquesta proteïna localitza als telòmers. La visualització alhora de les proteïnes HOAP i *HeT-A* Gag permet analitzar la possible localització telomèrica d'aquesta última. La co-localització d'ambdues proteïnes es dona, com es pot observar a la Figura 35, en forma de petits punts intranuclears vora la membrana nuclear tant a les *nurse cells* com a les cèl·lules fol·liculars dels estadis 1-3 de desenvolupament (Fig. 35C i 35F). Aquesta localització intranuclear és similar a la trobada per a la proteïna *HeT-A* Gag a cèl·lules S2 i neuroblasts de larves d'estadi 3 (Figura 10 i Figura 38).

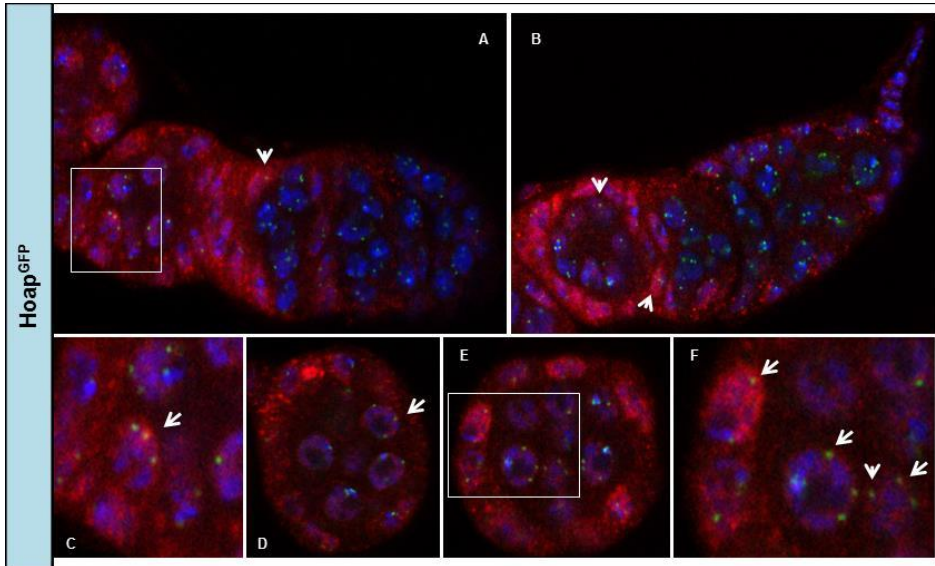


Figura 35. Immunolocalització de la proteïna *HeT-A* Gag (en vermell) a ovaris Hoap-GFP (en verd). El DNA es troba marcat en blau. Les fletxes blanques indiquen la co-localització d'ambdues proteïnes (visualitzada en groc). **A:** germari i estadi 1-2 de Hoap^{GFP}; **B:** germari i estadi 1-2 de Hoap^{GFP}; **C:** ampliació de la imatge A; **D:** estadi 3-4 de Hoap^{GFP}; **E:** estadi 3-4 de Hoap^{GFP}; **F:** ampliació de la imatge E.

En conclusió doncs, les proteïnes *HeT-A* Gag i Hoap co-localitzen parcialment (vora la membrana nuclear), per tant, no tota la localització de *HeT-A* Gag detectada a les Figures 34 i 35 es dona als telòmers.

4.1.1.C. Localització de la proteïna *TART* Pol a ovaris

La Figura 36 mostra la localització endògena de la proteïna *TART* Pol a ovaris de *Drosophila melanogaster* mitjançant immunodeteccions amb l'anticòs anti-*TART* Pol.

- A ovaris **salvatges** la proteïna *TART* Pol es detecta (Figura 36; A-F) únicament a estadis primerencs de desenvolupament. Es troba al germari i dins del nucli de les *nurse cells* formant-hi un únic punt als estadis 1-3 (Fig. 36; A-C). També està present formant diversos punts als estadis 4 i 5 (Fig. 36D). A més, localitza perinuclearment a les *nurse cells* als estadis 2-3 de desenvolupament (Fig. 36C). A les cèl·lules fol·liculars localitza també al voltant del nucli i forma una única acumulació intranuclear fins l'estadi 5. Hem pogut detectar *TART* Pol a les *border cells* als estadis 9 i 10 (Fig. 36F), fet que considerem interessant. La localització de *TART* Pol en aquestes cèl·lules s'ha observat tant a ovaris salvatges com a mutants **GIII** i d'*aubergine*. A estadis tardans, *TART* Pol no localitza ni a les *nurse cells* ni a l'oòcit (Fig. 36E).

- A ovaris mutants **GIII**, *TART* Pol (Figura 36; G-K) mostra una localització com a ovaris *wt*, amb l'excepció de la formació de petits punts al nucli de les *nurse cells* a estadis més tardans que a ovaris salvatges (als estadis 6-8) com s'observa a les Figures 36J i 36K.

- Als mutants transheterozigots d'*aubergine* (Figura 36; L-P) *TART* Pol localitza com a **GIII** però les acumulacions dins el nucli de les *nurse cells* als estadis 2-3 tenen menor intensitat (veure l'apartat 4.2.B.1. *Caracterització de les proteïnes Lost i Trailer Hitch*) (Fig. 36; L-N).

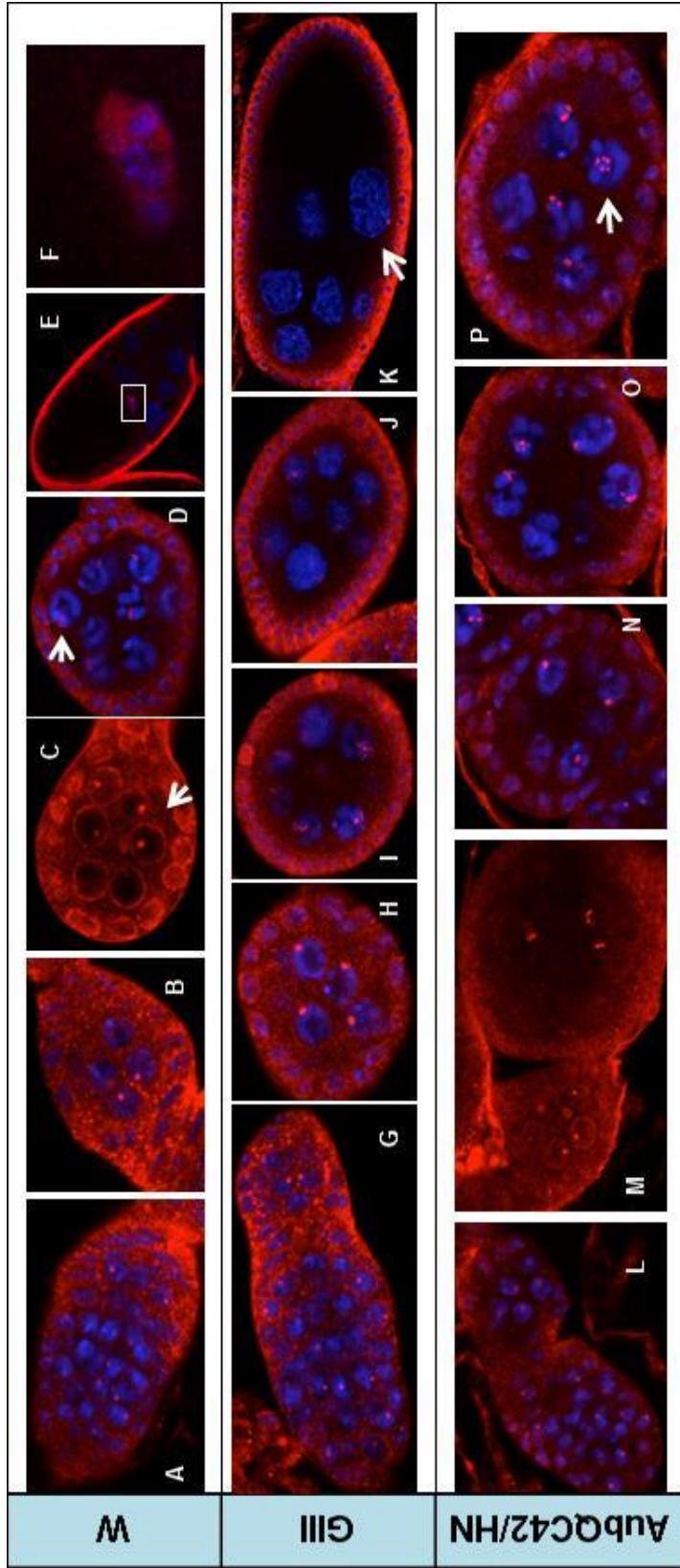


Figura 36. Localització de la proteïna *TART* Pol (en vermell) a ovaris salvatges i mutants de *Drosophila melanogaster*. El DNA es troba marcat en blau (*Topro-3*). **A:** germari de w; **B:** estadi 2 de w; **C:** estadi 3 de w (sense el marcatge del DNA s'observa la localització perinuclear que recorda el *nuage*); **D:** estadi 4 de w; **E:** estadi 10 de w; **F:** ampliació de les *border cells* de la imatge E (posterior amunt). **G:** germari i estadi 1 de GIII; **H:** estadi 2-3 de GIII; **I:** estadi 4-5 de GIII; **J:** estadi 5-6 de GIII; **K:** estadi 7-8 de GIII. **L:** germari i estadi 1-2 del mutant d'*aub*; **M:** estadis 2 i 4 del mutant d'*aub*; **N:** estadi 2-3 del mutant d'*aub*; **O:** estadi 3-4 del mutant d'*aub*; **P:** estadi 5-6 del mutant d'*aub*.

Per esbrinar si la localització perinuclear de *TART* Pol a les *nurse cells* està indicant la seva presència a l'estructura *nuage* (característica de proteïnes implicades en la via dels *piRNAs* a la línia germinal, com per exemple Aubergine i Vasa), s'han realitzat immunolocalitzacions de la proteïna *TART* Pol amb proteïnes que formen part del *nuage*. Per realitzar aquests experiments s'han emprat ovaris de mosques que expressen endògenament les proteïnes d'interès Aubergine o Vasa fusionades a la proteïna verda fluorescent GFP. Així, s'ha trobat co-localització de *TART* Pol amb Aubergine en alguns punts de la regió perinuclear a estadis primerencs (Figura 37; A-D). D'igual manera, s'ha vist co-localització de *TART* Pol amb Vasa en punts de la regió perinuclear de les *nurse cells* a estadis temprans de desenvolupament (Figura 37; E-H). No obstant, en tots dos casos la co-localització no es dona en tot el *nuage*, fent pensar que només part de *TART* Pol es troba dins d'aquesta estructura.

Paral·lelament, s'ha estudiat la localització de *TART* Pol a ovaris Hoap^{GFP} per estudiar la possible localització als telòmers de la proteïna *TART* Pol. Els experiments de co-localització mostren que cap dels punts on es troba la proteïna *TART* Pol dins del nucli de les *nurse cells* ni de les cèl·lules fol·liculars no co-localitza amb la proteïna Hoap (Figura 37; I-N). Per aquesta raó es pot concloure que la proteïna *TART* Pol no localitza als

telòmers durant els primers estadis de desenvolupament a ovaris de *Drosophila melanogaster*. Aquest fet apunta cap a una possible funció alternativa a la de manteniment telomèric descrita fins ara o a un comportament del retrotransposó independent del seu *targeting* a telòmers (veure l'apartat 5. *Discussió*).

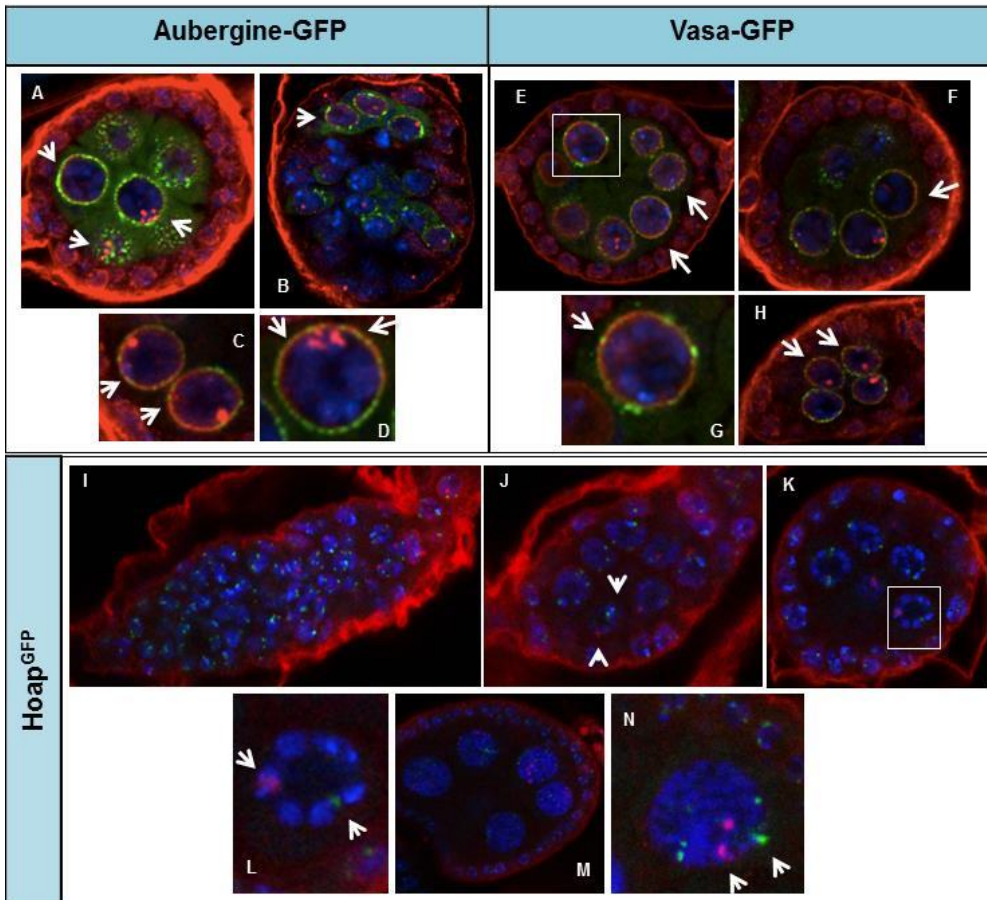


Figura 37. Immunolocalització de la proteïna TART Pol (en vermell) a ovaris Aubergine-GFP, Vasa-GFP i Hoap-GFP (en verd). El DNA està marcat en blau. Les fletxes blanques mostren la clara co-localització (en groc; als dos panells superiors) o no co-localització (al panell inferior) de les

dues proteïnes. **A:** estadi 3-4 d'Aub-GFP; **B:** germari i estadi 1 d'Aub-GFP; **C i D:** ampliació de nuclis de *nurse cells* d'estadi 3-4 d'Aub-GFP. **E i F:** estadis 3-4 de Vasa-GFP; **G:** ampliació del nucli d'una *nurse cell* de la imatge E; **H:** estadi 2 de Vasa-GFP. **I:** germari i estadi 1 de Hoap^{GFP}; **J:** estadi 2 de Hoap^{GFP}; **K:** estadi 3-4 de Hoap^{GFP}; **L:** ampliació d'una *nurse cell* de la imatge K; **M:** estadi 4-5 de Hoap^{GFP}; **N:** ampliació d'una *nurse cell* d'estadi 4-5 de Hoap^{GFP}.

4.1.1.D. Co-localització de les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol a neuroblasts

Els neuroblasts són els precursors del que esdevindran les neurones a la mosca adulta, es troben al cervell de les larves i es divideixen centenars de vegades fins l'estadi de pupa. El fet de dur a terme tantes mitosis fa que els calgui replicar els seus telòmers, per tant, és un teixit on pot observar-se la localització de les proteïnes telomèriques de *Drosophila*.

Els neuroblasts són un tipus cel·lular força diferent al d'ovaris, ja que no duen a terme cap endoreplicació sinó que realitzen mitosis, i es troben a larves d'estadi 3 enlloc de mosques adultes. Per tot això, resulta de gran interès poder estudiar els retrotransposons telomèrics de *Drosophila* en un tipus cel·lular tan diferent al vist anteriorment. A neuroblasts, com succeeix a ovaris, se sintetitzen RNAs i proteïnes de *HeT-A* i *TART* a uns nivells suficientment elevats com per poder ser detectats i analitzats (vist en experiments realitzats anteriorment al nostre laboratori, així com en l'estudi d'expressió de *HeT-A* amb cervells de larves de l'article Zhang L et al 2014 publicat recentment). A més, l'estudi d'aquestes cèl·lules permet analitzar possibles diferències de localització entre ambdós teixits cel·lulars (neuroblasts i ovaris).

S'han realitzat co-immunolocalitzacions de les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol a neuroblasts de mosques salvatges i GIII (Figura 38). Als neuroblasts

salvatges, *HeT-A* Gag localitza formant molts punts d'intensitat suau dins el nucli principalment vora la membrana nuclear (Figura 38; les 3 files superiors de la segona columna), mentre que a GIII presenta un nombre menor de punts però de molta major intensitat que a neuroblasts salvatges (Figura 38; les 3 files inferiors de la segona columna). *TART* Pol també forma punts o acumulacions dins el nucli a *wild-type* (Figura 38; les 3 files superiors de la tercera columna), mentre que a GIII els punts són més intensos tot i presentar-ne un número similar (Figura 38; les 3 files inferiors de la tercera columna). Tant a neuroblasts salvatges com GIII les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol co-localitzen (Figura 38; en groc, indicat amb fletxes blanques). La co-localització d'ambdues proteïnes és parcial a neuroblasts salvatges. Aquests resultats confirmen que la RNP telomèrica conté, com a mínim de manera transitòria o durant un cert període de temps, les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol. A més, tenint en compte els resultats publicats anteriorment de co-localització intranuclear de *HeT-A* Gag amb Hoap (Rashkova S et al 2002b), podem afirmar que els punts on *HeT-A* Gag i *TART* Pol co-localitzen corresponen als telòmers.

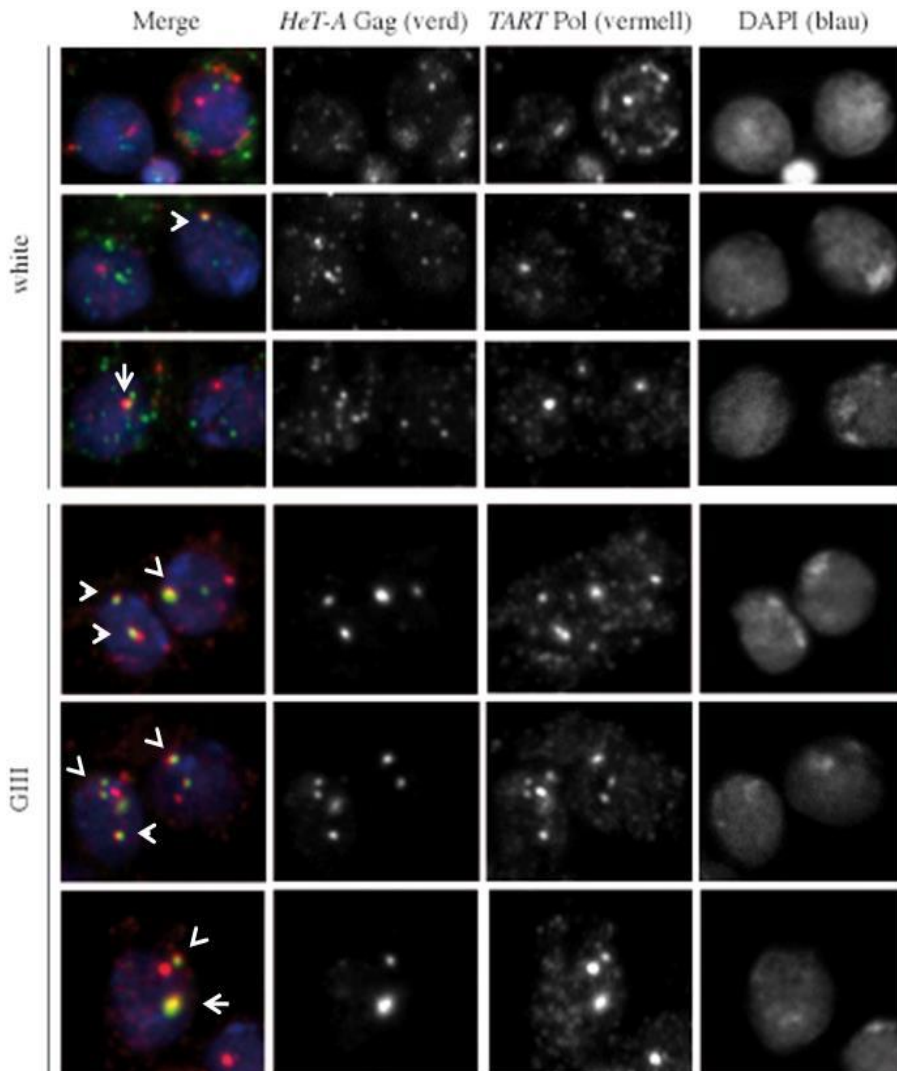


Figura 38. Immunolocalització de les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol a neuroblasts de larves salvatges *white* (w^{1118}) i GIII d'estadi 3. La primera columna (*merge*) combina els tres marcatges alhora. El DNA s'hi troba marcat en blau, *HeT-A* Gag en verd i *TART* Pol en vermell. La segona columna mostra la localització de *HeT-A* Gag, i *TART* Pol s'observa a la tercera columna. A la quarta columna es mostra el DNA tenyit amb DAPI. Les tres files superiors d'imatges corresponen a neuroblasts de *white*, i les

tres inferiors són neuroblasts GIII. Les fletxes blanques indiquen la co-localització (en groc) de les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol.

4.1.1.E. Localització de les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol a embrions

Mai en estudis anteriors s'havia analitzat la localització de les proteïnes dels retrotransposons telomèrics de *Drosophila* a embrió. És per aquesta raó, i perquè durant les primeres hores de desenvolupament de l'embrió és quan tenen lloc divisions mitòtiques sincronitzades, que hem estudiat la localització de *HeT-A* Gag i *TART* Pol a embrió fent ús dels anticossos generats al nostre laboratori.

A continuació es presenten imatges de localització de les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol a embrions salvatges, així com a mutants d'*aubergine*. Pot observar-se en ambdós casos que els mutants analitzats no presenten diferències substancials de localització respecte a embrions salvatges.

***HeT-A* Gag** a embrions salvatges (Figura 39) i mutants d'*aubergine* (Figura 40) localitza formant punts o petites acumulacions tant al nucli com al citoplasma de les cèl·lules perifèriques de l'embrió, així com també en nombroses cèl·lules centrals. És rellevant la seva localització en forma de punts a les *pole cells*.

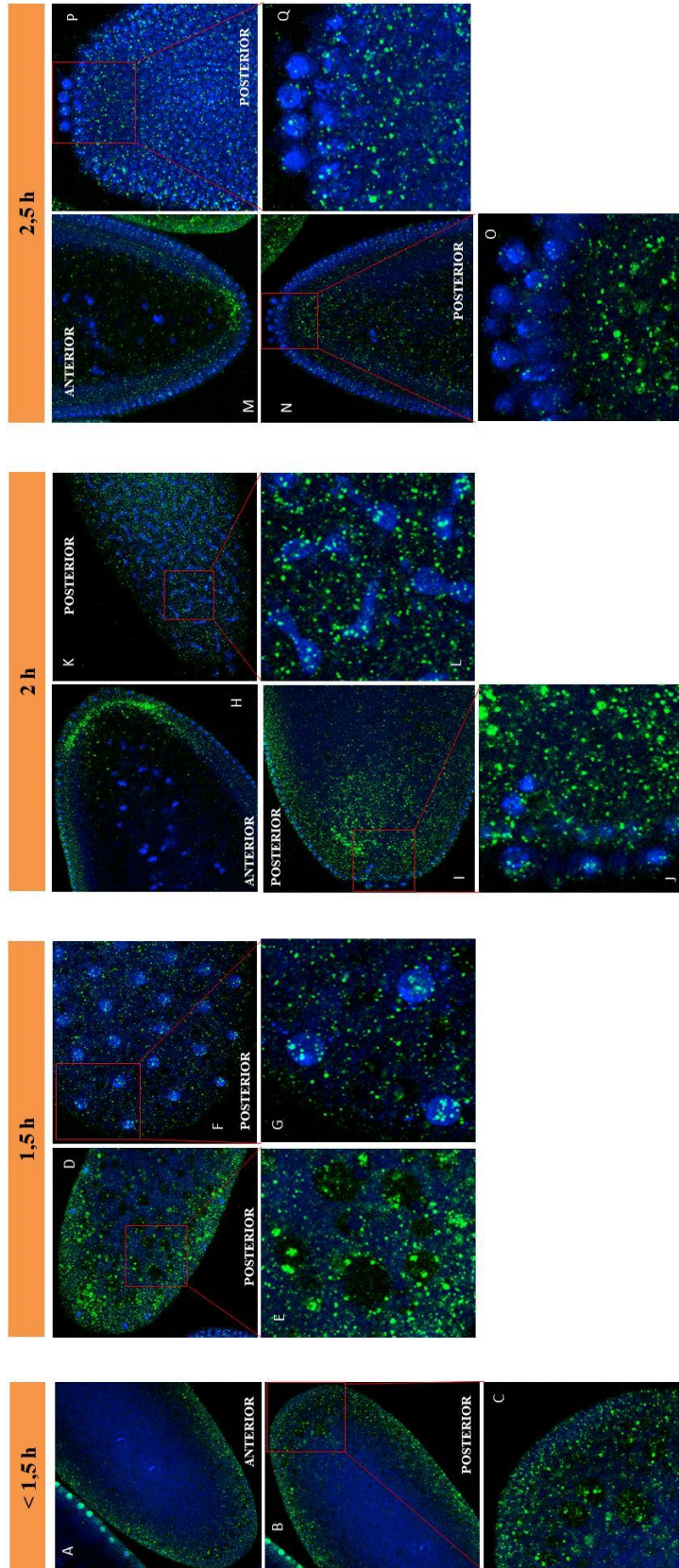


Figura 39. Localització de la proteïna *HeT-A* Gag (en verd) a embrions salvatges *white* (w; *wild-type*) de *Drosophila melanogaster*. El DNA està tenyit en blau. **A i B:** parts anterior (A) i posterior (B) d'un embrió w en *early cleavage* (<1.5h); **C:** ampliació de la part posterior de la Figura B; **D:** pol posterior d'un embrió w en fase de migració dels *cleavage nuclei* (1.5h); **E:** ampliació de la Figura D; **F:** *stack* o visió externa del pol posterior d'un embrió w en migració dels *cleavage nuclei* (1.5h); **G:** ampliació de la Figura F; **H i I:** pols anterior (O) i posterior (P) d'un embrió w durant la formació de la blastoderma sincicial (2h) – les *pole cells* es formen posteriorment (P); **J:** ampliació de les *pole cells* de la Figura I; **K:** pol posterior d'un embrió w formant la blastoderma sincicial (2h) durant la divisió cel·lular; **L:** ampliació de cèl·lules en divisió de la Figura K; **M i N:** pols anterior (T) i posterior (U) d'un embrió w en estadi de blastoderma cel·lular (2.5h) – les membranes cel·lulars es formen entre els nuclis; **O:** ampliació de les *pole cells* de la Figura N; **P:** pol posterior d'un embrió w en fase de blastoderma cel·lular (*stack* extern; 2.5h); **Q:** ampliació de les *pole cells* de la Figura P.

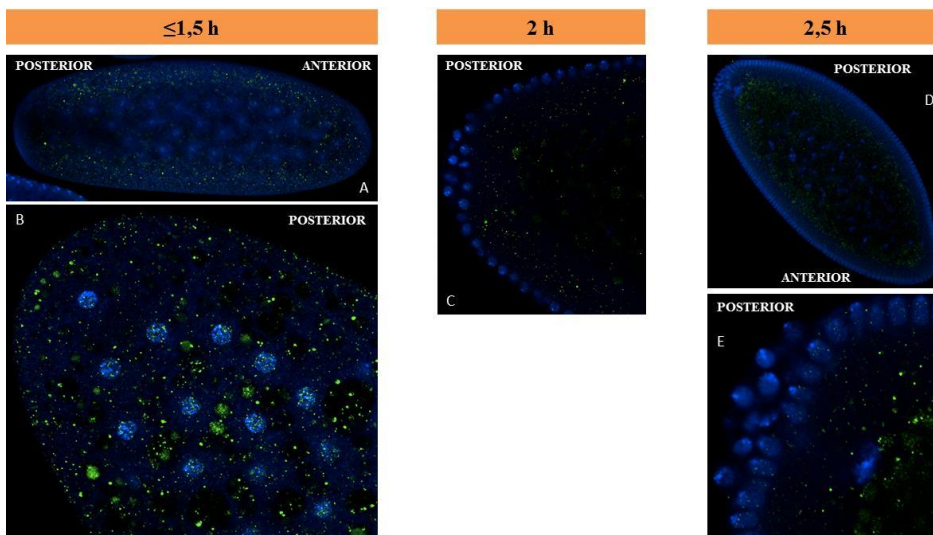


Figura 40. Localització de la proteïna *HeT-A* Gag (en verd) a embrions mutants heterozigots d'Aubergine^{QC42} de *Drosophila melanogaster*. El DNA està tenyit en blau. **A:** embrió mutant d'*aub* en estadi d'*early cleavage* (<1.5h; pol posterior a l'esquerra); **B:** pol posterior d'un embrió mutant d'*aub* en estadi de migració dels *cleavage nuclei* (1.5h; *stack* o visió externa); **C:** pol posterior d'un embrió mutant d'*aub* durant la formació de la blastoderma sincitial (2h); **D:** embrió mutant d'*aub* en estadi de blastoderma cel·lular (2.5h; posterior cap a l'esquerra i cap amunt); **E:** ampliació de les *pole cells* d'un embrió mutant d'*aub* en estadi de blastoderma cel·lular (2.5h).

La proteïna **TART Pol** també es detecta a les *pole cells* en forma de punts. Forma acumulacions de dimensió major a les de *HeT-A* Gag però només a la perifèria de l'embrió, deixant espais lliures on la proteïna no localitza. *TART* Pol forma estructures no definides: s'acumula a tota la zona del voltant d'estructures rodones d'aparença buida, les quals recorden la forma d'una bombolla (veure l'apartat 5. *Discussió*). Se'n pot observar la localització a embrions salvatges i mutants d'*aubergine* a les Figures 41 i 42, respectivament. De nou, no s'observen diferències significatives entre ambdues línies de *Drosophila melanogaster*.

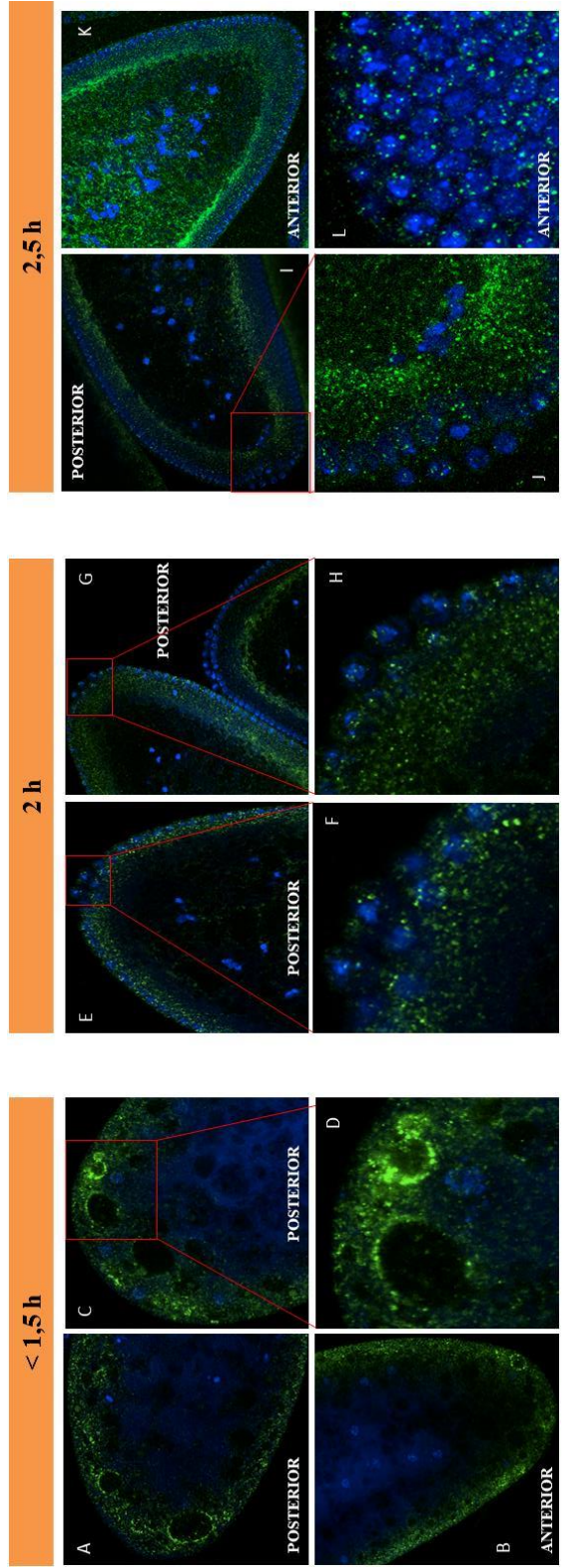


Figura 41. Localització de la proteïna *TART* Pol (en verd) a embrions salvatges *white* (w; *wild-type*) de *Drosophila melanogaster*. El DNA està tenyit en blau. **A:** pol posterior d'un embrió w en estadi *d'early cleavage* (<1.5h); **B:** pol anterior (B) d'un embrió w en estadi *d'early cleavage* (<1.5h); **C:** pol posterior d'un embrió w en estadi *d'early cleavage* (<1.5h); **D:** ampliació de la figura C; **E:** pol posterior d'un embrió w en estadi de blastoderma sincitial durant la formació de les *pole cells* (2h); **F:** ampliació de les *pole cells* de la figura E; **G:** pol posterior d'un embrió w en estadi de blastoderma sincitial durant la formació de les *pole cells* (2h); **H:** ampliació de les *pole cells* de la figura G; **I:** pol posterior d'un embrió w en estadi de blastoderma cel·lular (2.5h); **J:** ampliació de les *pole cells* de la figura I; **K:** pol anterior (P) d'un embrió w en estadi de blastoderma cel·lular (2.5h); **L:** ampliació de la regió anterior d'un embrió w en estadi de blastoderma cel·lular (*stack* o visió externa).

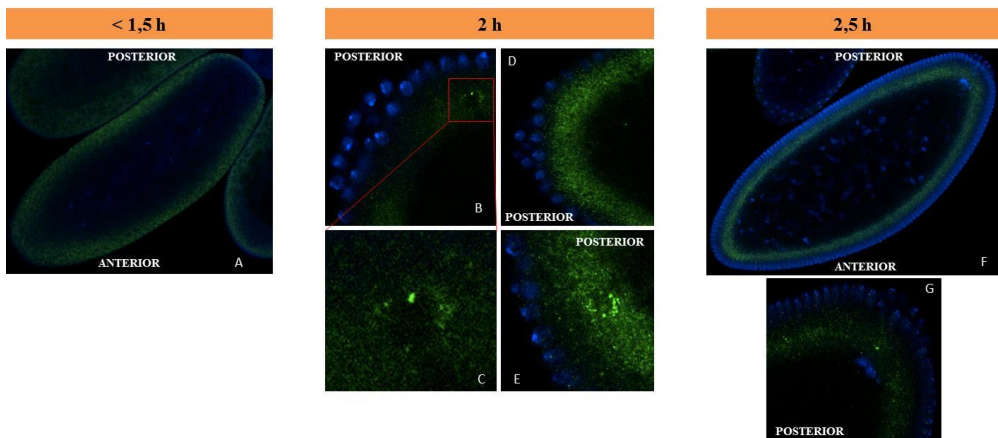


Figura 42. Localització de la proteïna *TART* Pol (en verd) a embrions mutants heterozigots d'Aubergine^{QC42} de *Drosophila melanogaster*. El DNA està tenyit en blau. **A:** embrió mutant d'*aub* en estadi *early cleavage* (<1.5h); **B:** ampliació del pol posterior d'un embrió mutant d'*aub* durant la formació de la blastoderma sincitial (2h); **C:** ampliació de la Figura B; **D:**

ampliació del pol posterior d'un embrió mutant d'*aub* durant la formació de la blastoderma sincitial (2h); **E**: ampliació de les *pole cells* d'un embrió mutant d'*aub* en estadi de blastoderma sincitial (2h); **F**: embrió mutant d'*aub* en estadi de blastoderma cel·lular (2.5h); **G**: pol posterior (H) d'un embrió mutant d'*aub* en estadi de blastoderma cel·lular (2.5h).

De nou, en aquestes immunodeteccions de *TART* Pol no s'han observat diferències de localització clares respecte a les de la línia salvatge. A més, les diferències d'intensitat en el marcatge tampoc són comparables de forma relativa.

En conjunt, de totes les immunolocalitzacions realitzades a embrió pot concloure's que no s'observen diferències significatives de localització de les proteïnes *HeT-A* Gag ni *TART* Pol a embrions mutants d'*aubergine* respecte embrions salvatges. Tot i que tant *HeT-A* Gag com *TART* Pol presenten una localització en forma de punts, *HeT-A* Gag forma punts o acumulacions de mida major als de *TART* Pol, així com la seva localització varia lleugerament dins l'embrió. En ambdós casos però és possible detectar-les a les *pole cells* (veure l'apartat 5. *Discussió*).

4.1.1.F. Interacció de la proteïna *HeT-A* Gag amb *TART-RT* i *TART*Gag

HeT-A* Gag interacciona amb *TART-RT

Les proteïnes endògenes *HeT-A* Gag i *TART* Pol s'expressen tant a cèl·lules S2 com a larves i mosques adultes salvatges a uns nivells no suficientment elevats com per ser detectades per la tècnica de *western blot*, i encara menys en una immunoprecipitació. És per això que hem emprat estratègies diferents. Per una banda, hem utilitzat cèl·lules S2 transfectades amb proteïnes recombinants per dur a terme aquestes immunoprecipitacions

mitjançant els anticossos que reconeixen les seves *tags*. I per una altra, hem emprat cervells de larves GIII per detectar-hi les proteïnes telomèriques endògenes, ja que s'hi troben sobreexpressades.

Per estudiar la possible interacció entre les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol s'han dut a terme immunoprecipitacions en ambdós sentits. Per una banda, s'ha emprat l'extracte proteic de cèl·lules S2 transfectades establement amb la transcriptasa reversa de *TART* fusionada al *tag* TAP i transfectades posteriorment de forma transitòria amb *HeT-A* Gag-GFP. Emprant l'anticòs anti-GFP s'ha immunoprecipitat *HeT-A* Gag. Aquesta interacció es pot observar al revelat amb anti-TAP que marca la proteïna *TART*-RT (Figura 43A). Per altra banda, s'ha dut a terme la immunoprecipitació a partir de cervells de larves GIII en el sentit contrari. En aquest cas s'ha immunoprecipitat amb anti-*TART* Pol i s'ha revelat el *western blot* amb l'anticòs que reconeix *HeT-A* Gag (Figura 43B). S'observa doncs que ambdues proteïnes immunoprecipiten en el dos sentits. Per tant, aquest resultat suggereix que la proteïna Gag de *HeT-A* estaria interaccionant amb la Transcriptasa Reversa de *TART*.

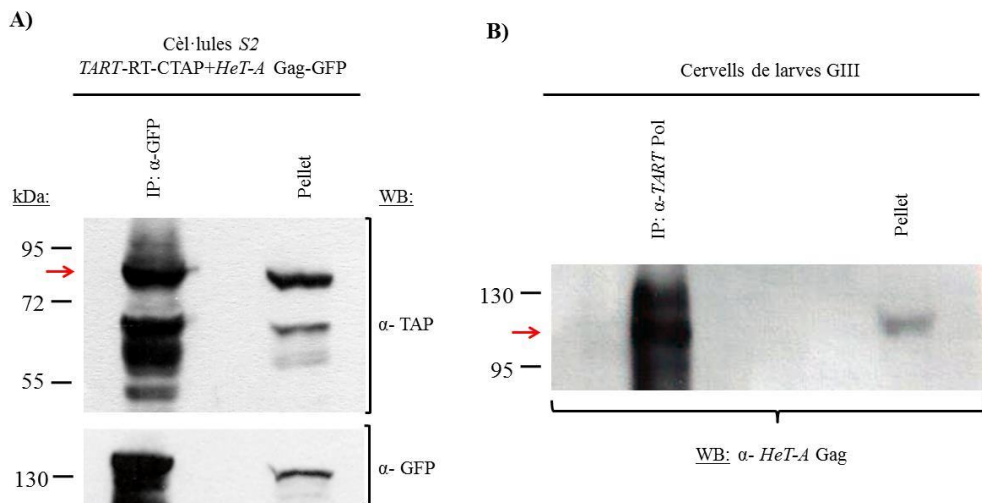


Figura 43. Immunoprecipitacions de les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART*-

RT. A) Extracte proteic de cèl·lules S2 transfectades. La primera columna correspon a la IP de *HeT-A* Gag emprant l'anticòs anti-GFP. El *pellet* de les cèl·lules s'observa a la segona columna. La fila superior correspon al *western blot* revelat amb l'anticòs anti-TAP que indica la presència de la proteïna *TART-RT*. La fila inferior, revelada amb l'anticòs anti-GFP, mostra la detecció de la proteïna *HeT-A* Gag. La fletxa vermella senyala la banda corresponent a la proteïna *TART-RT-CTAP*. **B)** Extracte proteic de 120 cervells de larves GIII d'estadi 3. La primera columna mostra la IP amb l'anticòs anti-*TART* Pol. La segona columna correspon al *pellet* resultant de centrifugar el lisat proteic de cervells GIII. El *western blot* està revelat amb l'anticòs anti-*HeT-A* Gag. La fletxa vermella senyala la banda corresponent a la proteïna *HeT-A* Gag endògena.

***HeT-A* Gag interacciona amb *TART* Gag**

D'altra banda, mitjançant la immunoprecipitació de cèl·lules S2 establiment transfectades amb *HeT-A* Gag fusionada al *tag* TAP i transfectades posteriorment de forma transitòria amb *TART* Gag-GFP (Figura 44), pot suggerir-se també que les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Gag estarien estar interaccionant entre elles.

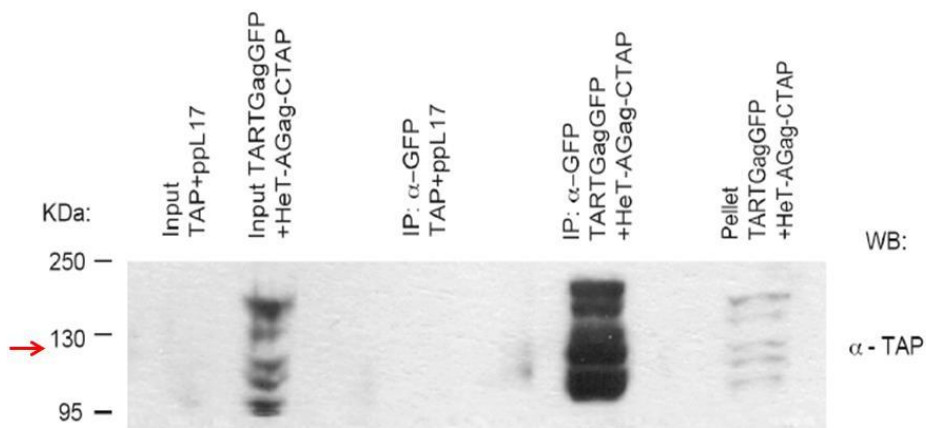


Figura 44. Immunoprecipitació de les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Gag a partir de cèl·lules S2 transfectades establement. Les dues primeres columnes corresponen a dos extractes proteics inicials diferents. A la primera columna s'ha carregat l'extracte inicial de cèl·lules control transfectades. La segona columna correspon a l'extracte inicial de cèl·lules S2 estables *HeT-A* Gag-CTAP re-transfectades amb *TART* Gag-GFP. La tercera columna mostra la IP control, la quarta columna conté la IP d'interès: de *TART* Gag i *HeT-A* Gag (mateix extracte proteic que a la segona columna). El *pellet* es pot observar a l'última columna. El *western blot* està revelat amb l'anticòs α -TAP que detecta la presència de la proteïna *HeT-A* Gag (la fletxa vermella n'indica la mida, la qual és d'uns 100 kDa + la mida del TAP).

El fet d'haver observat mitjançant co-immunoprecipitacions que *HeT-A* Gag, *TART* Gag i *TART*-RT poden estar interaccionant entre elles suggereix que totes tres proteïnes estarien formant part d'una mateixa RNP telomèrica.

4.1.2. Caracterització dels RNAs de *HeT-A* i *TART* a ovaris

Els mRNAs de *HeT-A* i *TART* són els intermediaris de transposició dels retrotransposons telomèrics, i segons la literatura publicada només poden detectar-se per hibridació *in situ* d'RNA a ovaris mutants de la via dels PIWI/piRNAs (Shpiz S et al 2007; Shpiz S et al 2009) (veure l'apartat *I. Introducció*).

Com s'ha explicat anteriorment, *HeT-A* i *TART* disposen de promotors per ser transcrits tant en sentit *sense* com *antisense* (Danilevskaya ON et al 1999; Pardue ML i Debaryshe PG 2008; Shpiz S et al 2009). De fet els resultats que hem obtingut al nostre laboratori indiquen una expressió molt lleu de l'RNA *antisense* de *HeT-A* respecte al seu *sense* (Piñeyro D et al 2011), en canvi per a *TART* s'ha descrit que els nivells d'RNA *antisense* són força més elevats als del *sense* (Danilevskaya ON et al 1999).

A continuació es presenten els resultats dels experiments duts a terme durant la realització d'aquesta tesi d'hibridacions *in situ* fluorescents d'RNA mitjançant el mètode d'amplificació per tiramida. Hem escollit aquesta metodologia per detectar els RNAs de *HeT-A* i *TART* perquè és la que major sensibilitat de detecció proporciona. Amb aquesta tècnica hem pogut obtenir imatges d'alta resolució on s'observa amb gran definició la localització precisa dels RNAs tant *sense* com *antisense* de *HeT-A* i *TART* a ovaris salvatges i mutants.

*** mRNA sense de *HeT-A*:**

- A ovaris **salvatges** localitza a partir de l'estadi 6 al citoplasma de les cèl·lules fol·liculars i *nurse cells*. A més forma punts al nucli de les *nurse cells* i les *border cells* (Figura 45; A-F).

- A ovaris **GIII** presenta una localització similar a la salvatge, tot i detectar-se ja als primers estadis de desenvolupament i presentar nivells superiors d'expressió especialment a les *border cells* (a la regió posterior) i a les *nurse cells* (sobretot als primers estadis i l'estadi 10 tardà) (Figura 45; G-K). Concretament, l'mRNA de *HeT-A* presenta la mateixa localització que la proteïna *TART Pol* a les *border cells*.

- A ovaris mutants transheterozigots d'**aubergine** (Figura 45; M-U) l'RNA sense de *HeT-A* localitza igual que a ovaris salvatges. No obstant, també es troba present a l'oòcit a la regió anterior o posterior en funció de l'estadi de desenvolupament. Dels estadis 4 a 6 localitza al pol posterior de l'oòcit. En canvi, a partir de l'estadi 6-7 localitza a la regió anterior de l'oòcit així com al citoplasma de les *nurse cells* formant-hi grans acumulacions. En general es troba expressat a nivells molt elevats a tot el citoplasma de les *nurse cells* als estadis posteriors al 9, independentment de les acumulacions esmentades al citoplasma de les *nurse cells* que presenten nivells encara més elevats d'expressió. Aquest resultat era esperable ja que a mutants d'*aubergine* la via dels piRNAs deixa de desreprimir els retrotransposons telomèrics i per tant aquests mutants presenten nivells d'mRNA i proteïna de *HeT-A* i *TART* majors. Aquesta "deslocalització" és similar a l'observada per a la proteïna *HeT-A Gag* a mutants d'*aubergine*.

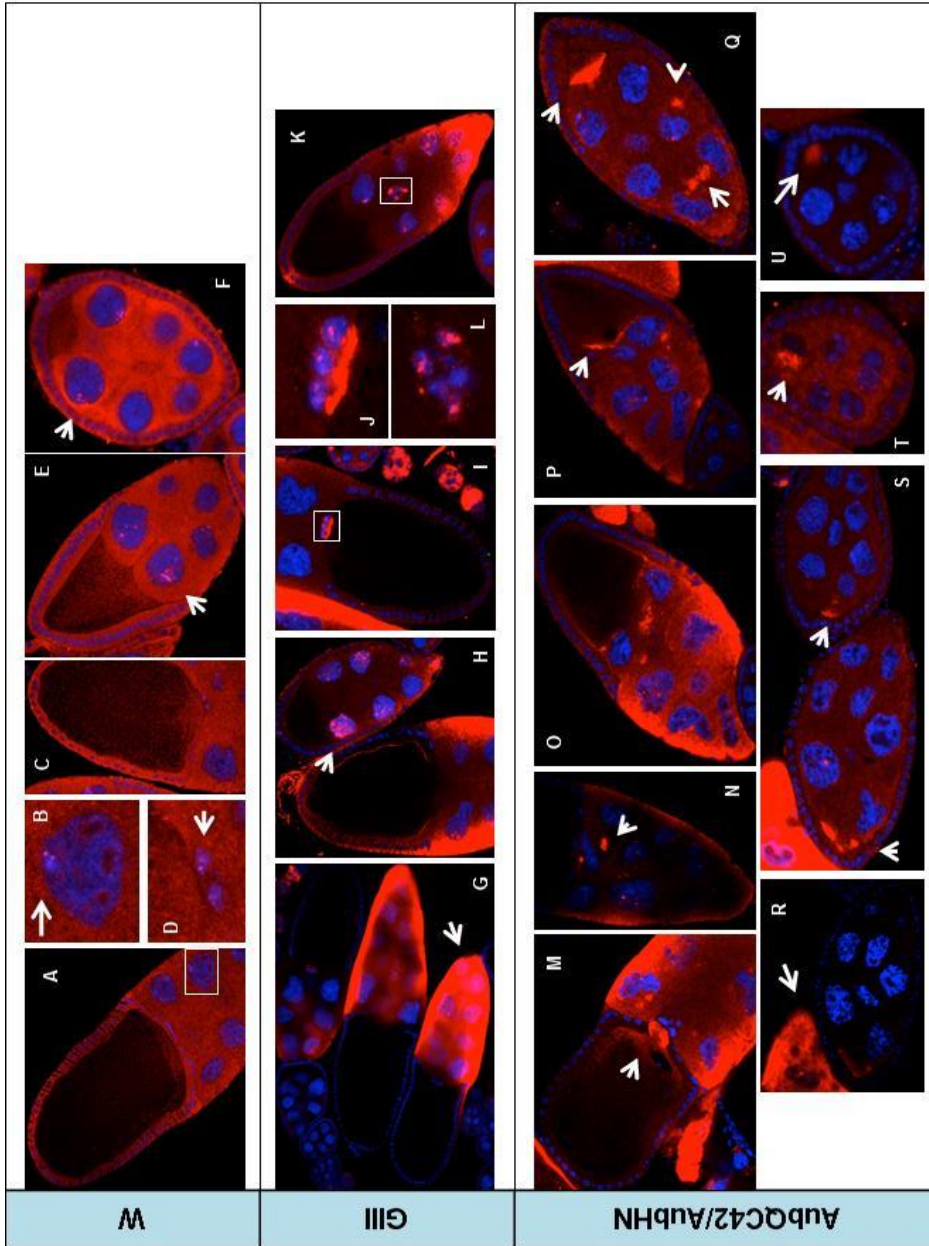


Figura 45. Hibridació *in situ* fluorescent de l'RNA sense (mRNA) de *HeT-A* (en vermell) d'ovaris salvatges i mutants de *Drosophila melanogaster*. S'ha emprat el mètode d'amplificació amb Tiramida (tinció fluorescent amb *Tyramide-568*). El DNA es troba marcat en blau. S'ha usat la línia white (w) *w¹¹¹⁸* com a control. **A:** estadi 10 de w; **B:** ampliació d'una *nurse cell* de la imatge A; **C:** estadi 10 de w; **D:** ampliació de les *border cells* de la imatge C; **E:** estadi 9 de w; **F:** estadis 5-6 de w. **G:** estadis temprans (dalt a l'esquerra) i estadis 10a i 10b de GIII (aquesta imatge s'ha realitzat disminuint molt la intensitat del làser del microscopi per tal d'evitar-ne la saturació a conseqüència de l'alta intensitat de fluorescència d'aquest marcatge; la intensitat del làser és doncs menor a la de la resta d'imatges); **H:** estadis 10 (a l'esquerra) i 8 (a la dreta) de GIII; **I:** estadi 10 de GIII; **J:** ampliació de les *border cells* de la imatge I (posterior cap avall); **K:** estadi 9 de GIII; **L:** ampliació de les *border cells* en migració de la imatge K (posterior cap a la dreta). **M:** estadi 10 del mutant d'*aub*; **N:** *nurse cells* de l'estadi 10 del mutant d'*aub* (posterior cap amunt); **O:** estadi 9 del mutant d'*aub*; **P:** estadis 6-7 (a l'esquerra a sota) i 9 (a la dreta a dalt) del mutant d'*aub*; **Q:** estadi 8 del mutant d'*aub*; **R:** estadi 6-7 del mutant d'*aub*; **S:** estadis 6-7 (a la dreta) i 8 (a l'esquerra) del mutant d'*aub*; **T:** estadi 5 del mutant d'*aub*; **U:** estadi 4 del mutant d'*aub*.

*** mRNA sense de *TART*:**

- A ovaris **salvatges** forma punts al nucli de les *nurse cells* únicament a l'estadi 10 (Figura 46; A-D).
- A ovaris **GIII** (Figura 46; E-J) localitza a les cèl·lules fol·liculars formant-hi un únic punt de gran intensitat al nucli a partir de l'estadi 5-6, així com presenta diversos punts al nucli de les *nurse cells* també des del mateix estadi. A més, pot observar-se'n certa expressió a les *border cells*.
- A ovaris mutants transheterozigots d'***aubergine*** localitza al nucli de les *nurse cells* formant-hi un gran punt tant a estadis temprans com tardans de desenvolupament (Figura 46; K-N). La seva localització al nucli de les *nurse cells* és similar a la de la proteïna *TART* Pol únicament durant els primers estadis de desenvolupament (des del germari fins els estadis 3-4).

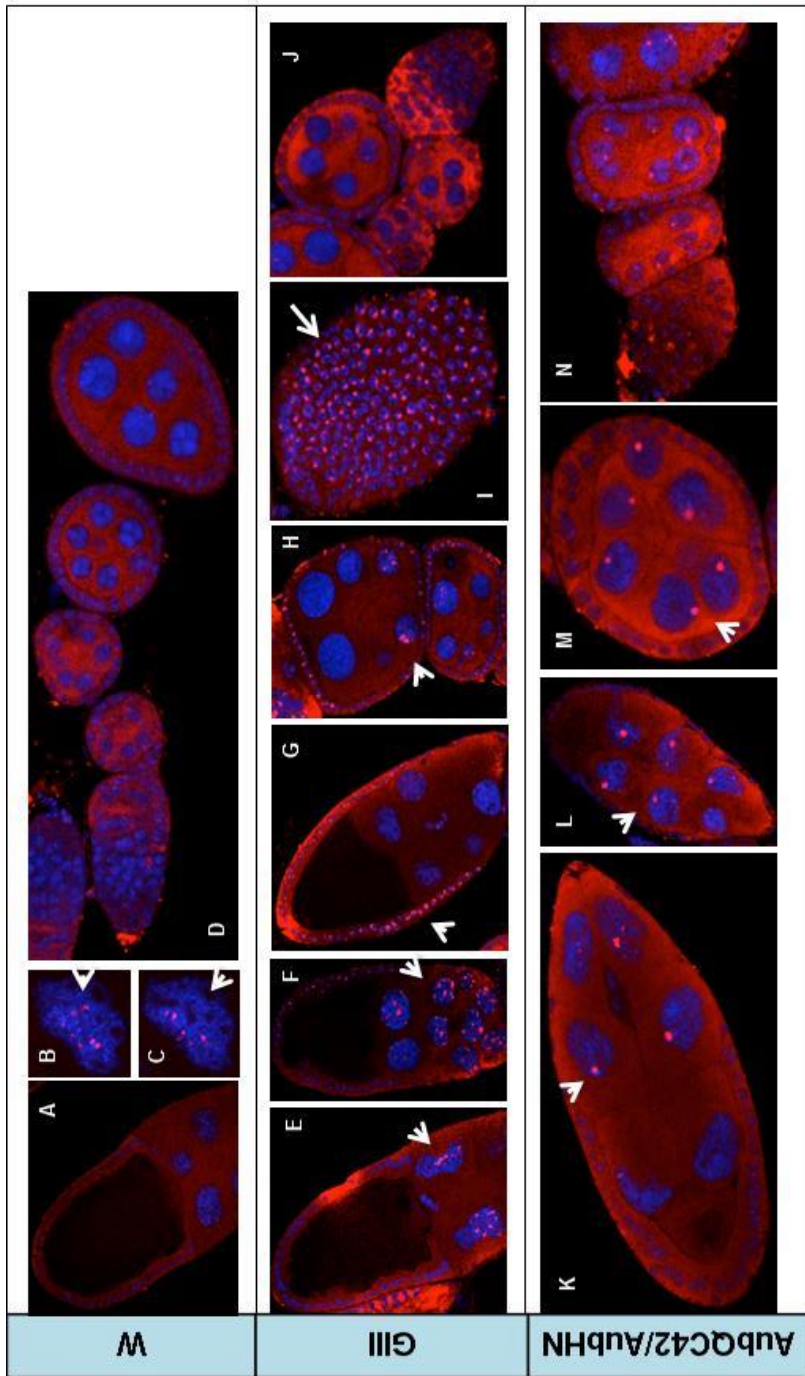


Figura 46. Hibridació *in situ* fluorescent de l'RNA sense (mRNA) de *TART* (en vermell) d'ovaris salvatges i mutants de *Drosophila melanogaster*. S'ha emprat el mètode d'amplificació amb Tiramida (tinció fluorescent amb *Tyramide-568*). El DNA es troba marcat en blau. S'ha usat la línia *white* (w) *w¹¹¹⁸* com a control. **A:** estadi 10 de w; **B i C:** ampliació del nucli d'una *nurse cell* d'un estadi 10 de w proper a l'oòcit; **D:** estadis temprans de w (germari i estadis 1, 3, 4, 5 i 6-7, d'esquerra a dreta). **E:** estadi 10 de GIII; **F:** estadi 9 de GIII; **G:** estadi 9 de GIII; **H:** estadis 5-6 (a baix) i 7 (a dalt) de GIII; **I:** cèl·lules fol·liculars de l'estadi 5-6 de GIII (*stack* o tall extern); **J:** estadis primerencs de GIII (germari i primers estadis fins al 4-5, de dreta a baix a esquerra a dalt). **K:** estadi 9 del mutant d'*aub*; **L:** estadi 8 del mutant d'*aub*; **M:** estadi 5-6 del mutant d'*aub*; **N:** estadis primerencs del mutant d'*aub* (germari i estadis 3-4 i 5, d'esquerra a dreta).

* **RNA antisense de *HeT-A*:**

- **Totes les línies** analitzades presenten un senyal d'expressió molt lleu al citoplasma de les cèl·lules fol·liculars i *nurse cells* i a les àrees del nucli on no hi ha cromatina condensada. Aquests nivells tan baixos d'expressió els considerem soroll de fons (*background*) de les mostres. Així doncs, a ovaris salvatges no podem detectar l'RNA *antisense* de *HeT-A* amb la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent que hem emprat. D'altra banda, a GIII se'n pot detectar algun punt ocasional dins el nucli d'algunes *nurse cells* als estadis 8-9 de desenvolupament.

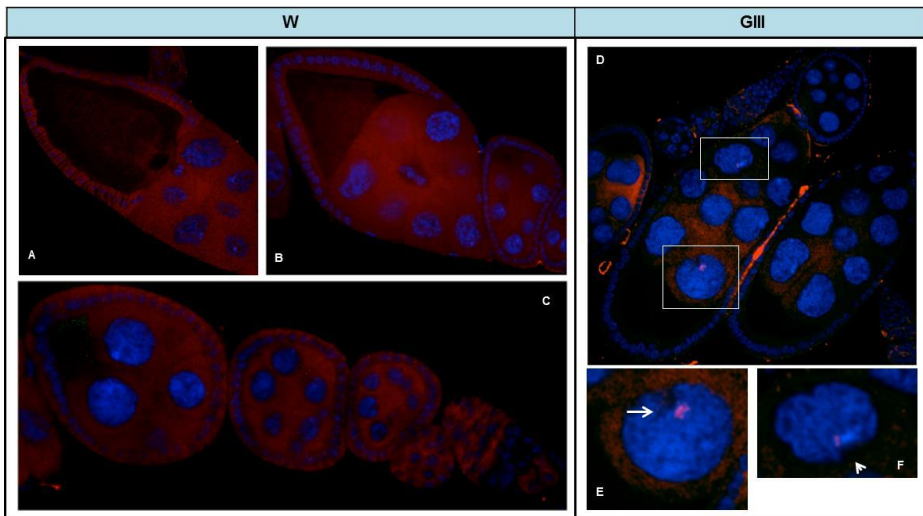


Figura 47. Hibridació *in situ* fluorescent de l'RNA *antisense* de *HeT-A* (en vermell) d'ovaris salvatges i mutants GIII de *Drosophila melanogaster*. S'ha emprat el mètode d'amplificació amb Tiramida (tinció fluorescent amb *Tyramide-568*). El DNA es troba marcat en blau. S'ha usat la línia white (*w*) *w*¹¹¹⁸ com a control. **A:** estadi 10 de *w*; **B:** estadis 9 i 7 de *w*; **C:** estadis primerencs de *w* (germari i estadis 2, 4, 5 i 6). **D:** diferents estadis de desenvolupament d'un ovari GIII; **E i F:** ampliació de les *nurse cells* de la imatge D.

*** RNA antisense de *TART*:**

- A ovaris **salvatges** l'RNA *antisense* de *TART* presenta petits punts al nucli de les *nurse cells* als estadis 9 i 10, així com localitza al citoplasma de les *nurse cells* i cèl·lules fol·liculars des de l'estadi 5-6 (Figura 48; A-E). Aquesta localització és similar a la de l'mRNA *sense* de *HeT-A* d'ovaris salvatges.

- A ovaris **GIII** localitza com a ovaris salvatges excepte pel fet que els punts al nucli de les *nurse cells* són més abundants i d'intensitat major (sobretot a l'estadi 10), i que s'observen en un estadi anterior (estadi 6) (Figura 48; F-I). Aquesta localització al nucli de les *nurse cells* és similar a la de l'RNA *sense* de *TART* a ovaris GIII (tot i ser lleugerament menys intensa).

- A ovaris mutants transheterozigots d'***aubergine*** (Figura 48; J-O) localitza de manera similar que l'RNA *sense* de *HeT-A* en aquests mateixos mutants. Es troba doncs als estadis 5-6 de desenvolupament a la regió posterior de l'oòcit. A partir de l'estadi 7 localitza al pol anterior de l'oòcit i al citoplasma de les *nurse cells* formant-hi acumulacions de gran intensitat. Aquesta distribució a l'oòcit recorda també a la de la proteïna *HeT-A* Gag en aquests mateixos mutants.

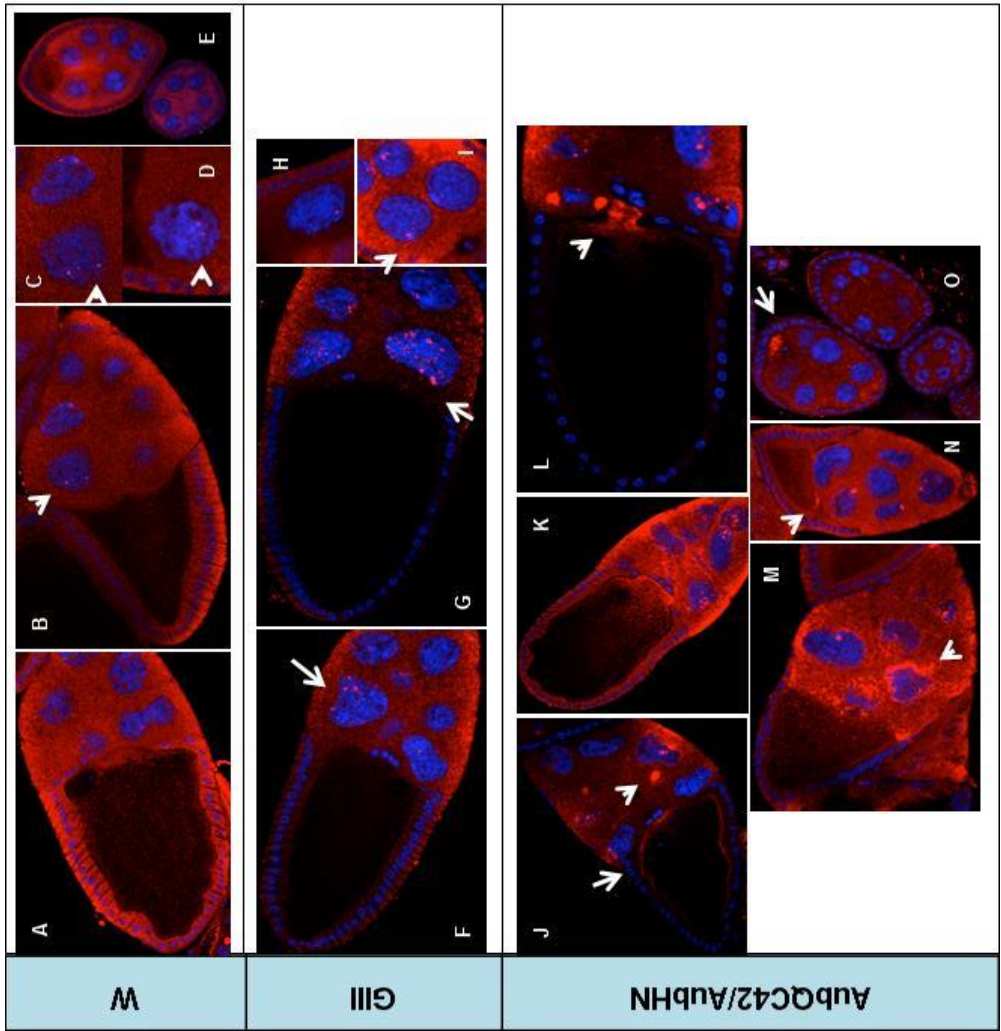


Figura 48. Hibridació *in situ* fluorescent de l'RNA antisense de *TART* (en vermell) d'ovaris salvatges i mutants de *Drosophila melanogaster*. S'ha emprat el mètode d'amplificació amb Tiramida (tinció fluorescent amb *Tyramide-568*). El DNA es troba marcat en blau. S'ha usat la línia white (w) w^{1118} com a control. **A:** estadi 10 de w; **B:** estadi 9 de w; **C:** ampliació de dues *nurse cells* de la imatge B (posterior cap a l'esquerra); **D:** ampliació d'una *nurse cell* d'estadi 8 (posterior cap amunt); **E:** estadis 5 i 7 de w. **F i G:** estadi 10 de GIII; **H:** ampliació d'una *nurse cell* d'estadi 9 de GIII (posterior cap amunt); **I:** ampliació de les *nurse cells* d'un estadi 6-7 de GIII (posterior cap avall a l'esquerra). **J, K i L:** estadi 10 del mutant d'*aub*; **M i N:** estadi 9 del mutant d'*aub*; **O:** estadis 4, 6 i 6 (de baix a dalt i de dreta a esquerra) del mutant d'*aub*.

S'ha analitzat també l'expressió de *HeT-A* i *TART* a embrions però no ha estat possible obtenir-ne cap senyal clar. Els nostres resultats mostren que, amb la metodologia que hem emprat d'hibridació *in situ* fluorescent d'RNA, els retrotransposons telomèrics no són detectables a embrió.

4.1.3. Resum de les localitzacions de les proteïnes i els RNAs de *HeT-A* i *TART* a ovaris salvatges i mutants GIII i d'*aubergine*

A continuació es troben representades en taules les diferents localitzacions de les proteïnes i RNAs (tant *sense* com *antisense*) dels retrotransposons telomèrics. Cada element està marcat amb un color concret que el distingeix. Les localitzacions es troben descrites en cadascun dels diversos estadis de desenvolupament per separat. Les correspondències de colors utilitzades són les següents: **HeT-A Gag** (proteïna), **TART Pol** (proteïna), **RNA sense de HeT-A** (mRNA), **RNA sense de TART** (mRNA), **RNA antisense de HeT-A**, i **RNA antisense de TART**. La no presència d'un color en una casella indica l'absència de localització d'aquell element en aquell estadi i aquella ubicació concreta. Cada taula indica la localització dels elements de la RNP telomèrica en una línia de *Drosophila melanogaster* determinada: salvatge (wt), mutant GIII, i mutant per a *aubergine*.

La primera taula (Taula 1) resumeix les localitzacions dels diferents components de *HeT-A* i *TART* a mosques salvatges (wt).

Després es presenten les taules referents a les línies mutants analitzades. En els casos en què la localització d'un element difereix de la seva localització a la línia salvatge (wt), la descripció d'aquell element concret es troba escrit en lletres majúscules.

A la Taula 2 poden observar-se les localitzacions dels diversos components de la RNP telomèrica a la línia mutant GIII. I a la Taula 3 s'hi troba el resum per als ovaris mutants transheterozigots d'*aubergine* (Aub^{QC42}/Aub^{HN}).

WT	Cèl·lules folliculars	Nurse cells	oòcit	Border cells
Germari + estadi 1	Citoplasma + Nucli (difós) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt)	Citoplasma + Nucli (difós) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt)		
Estadis 2-3	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt)	Citoplasma + Nucli (difós) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt)		
Estadi 4	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt)	Citoplasma + Nucli (difós) Citoplasma + Nucli (diversos punts)		
Estadis 5-6	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt) Citoplasma Citoplasma	Nucli (diversos punts) Citoplasma + Nucli (perifèria + diversos punts) Citoplasma		
Estadis 7-8	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria) Citoplasma Citoplasma	Citoplasma + Nucli (diversos punts) Citoplasma + Nucli (algun punt, pocs)		
Estadi 9	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria) Citoplasma Citoplasma	Citoplasma + Nucli (diversos punts) Citoplasma + Nucli (algun punt, pocs)		Citoplasma + perifèria nuclis Nucli (algun punt, pocs)
Estadi 10	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria) Citoplasma Citoplasma	Citoplasma + Nucli (algun punt, pocs) Citoplasma Nucli (diversos punts)		Citoplasma + perifèria nuclis Nucli (algun punt, pocs)

Taula 1. Resum de les localitzacions de les proteïnes i els transcrits de *HeT-A* i *TART* a ovaris salvatges (wt).

GIII	Cèl·lules fol·liculars	Nurse cells	oòcit	Border cells
Germari + estadi 1	<p>Citoplasma + Nucli (MOLTA QUANTITAT)</p> <p>Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt)</p> <p>Citoplasma</p>	<p>Citoplasma + Nucli (difós)</p> <p>Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt)</p> <p>CITOPLASMA (ESTADI 1)</p> <p>Citoplasma</p>		
Estadis 2-3	<p>Citoplasma + Nucli (MOLTA QUANTITAT)</p> <p>Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt)</p> <p>Citoplasma</p>	<p>Citoplasma + Nucli (difós)</p> <p>Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt)</p> <p>CITOPLASMA (FORÇA QUANTITAT)</p> <p>Citoplasma</p>		
Estadi 4	<p>Citoplasma + Nucli (MOLTA QUANTITAT)</p> <p>Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt)</p> <p>Citoplasma</p>	<p>Citoplasma + Nucli (difós)</p> <p>Citoplasma + Nucli (diversos punts)</p> <p>CITOPLASMA (FORÇA QUANTITAT)</p> <p>Citoplasma</p>		
Estadis 5-6	<p>Citoplasma + Nucli (MOLTA QUANTITAT)</p> <p>Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt)</p> <p>Citoplasma</p> <p>NUCLI (1 PUNT MOLT INTENS)</p> <p>Citoplasma</p>	<p>Nucli (diversos punts)</p> <p>Citoplasma + Nucli (perifèria + diversos punts)</p> <p>NUCLI (DIVERSOS PUNTS I MOLT INTENSOS)</p> <p>Citoplasma + Nucli (ALGUN PUNT I)</p>		
Estadis 7-8	<p>Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria)</p> <p>CITOPLASMA + NUCLI (PERIFÈRIA + 1 PUNT)</p> <p>Citoplasma</p> <p>NUCLI (1 PUNT MOLT INTENS)</p> <p>Citoplasma</p>	<p>NUCLI (ALGUN PUNT ESCÀS)</p> <p>Citoplasma + Nucli</p> <p>(MOLTS PUNTS I DE GRAN INTENSITAT)</p> <p>NUCLI (DIVERSOS PUNTS I MOLT INTENSOS)</p> <p>Citoplasma + Nucli (DIVERSOS PUNTS)</p>		
Estadi 9	<p>Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria)</p> <p>CITOPLASMA + NUCLI (PERIFÈRIA + 1 PUNT)</p> <p>Citoplasma</p> <p>NUCLI (1 PUNT MOLT INTENS)</p> <p>Citoplasma</p>	<p>Nucli (MOLTS PUNTS I DE GRAN INTENSITAT) +</p> <p>Citoplasma (FORÇA INTENSITAT)</p> <p>NUCLI (DIVERSOS PUNTS I MOLT INTENSOS)</p> <p>Citoplasma + Nucli (DIVERSOS PUNTS)</p>	<p>Citoplasma + perifèria nuclis</p> <p>Nucli (PUNTS MOLT INTENSOS)</p> <p>NUCLI (DIVERSOS PUNTS)</p>	
Estadi 10	<p>Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria)</p> <p>CITOPLASMA + NUCLI (PERIFÈRIA + 1 PUNT)</p> <p>Citoplasma</p> <p>Citoplasma</p>	<p>Nucli (MOLTS PUNTS I DE GRAN INTENSITAT) +</p> <p>Citoplasma (MOLTÍSSIMA QUANTITAT AL'ESTADI 10b)</p> <p>Nucli (DIVERSOS PUNTS I MOLT INTENSOS)</p> <p>NUCLI (PUNTS MOLT ESCASSOS)</p> <p>Citoplasma + NUCLI</p> <p>(MOLTS PUNTS I DE FORÇA INTENSITAT)</p>	<p>Citoplasma + perifèria nuclis</p> <p>Nucli (PUNTS MOLT INTENSOS + GRAN ACUMULACIÓ AL CITOPLASMA AL POL POSTERIOR, EN CONTACTE AMB L'OOCIT)</p> <p>NUCLI (DIVERSOS PUNTS)</p>	

Taula 2. Resum de les localitzacions de les proteïnes i els transcrits de *Het-A* i *TART* a ovaris mutants GIII.

Taula 3. Resum de les localitzacions de les proteïnes i els transcrits de *HeT-A* i *TART* a ovaris mutants transheterozigots d'*aubergine*

Aub	Cèl·lules fol·liculars	Nurse cells	oòcit	Border cells
Germari + estadi 1	Citoplasma + Nucli (difós, FORÇA INTENSITAT) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt) Citoplasma	Citoplasma + Nucli (difós, FORÇA INTENSITAT) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt) Citoplasma + NUCLI (1 PUNT MOLT INTENS)		
Estadis 2-3	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria, FORÇA INTENSITAT) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt) Citoplasma	Citoplasma + Nucli (difós, FORÇA INTENSITAT) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt) Citoplasma + NUCLI (1 PUNT MOLT INTENS)		
Estadi 4	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria, FORÇA INTENSITAT) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt) Citoplasma	Citoplasma + Nucli (QUASI SENSE PUNTS) Citoplasma + Nucli (diversos punts, FORÇA INTENSITAT) Citoplasma + NUCLI (1 PUNT MOLT INTENS) NUCLI (ALGUN PUNT)	TOT PART POSTERIOR	
Estadis 5-6	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria, FORÇA INTENSITAT) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt) Citoplasma Citoplasma	NUCLI (QUASI SENSE PUNTS) Nucli (diversos punts, FORÇA INTENSITAT) NUCLI (1 PUNT MOLT INTENS) Citoplasma + NUCLI (ALGUN PUNT) Citoplasma	TOT PART POSTERIOR PART POSTERIOR	
Estadis 7-8	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria, FORÇA INTENSITAT) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt) Citoplasma Citoplasma	NUCLI (FORÇA PUNTS) + CITOPLASMA (ALGUNS PUNTS) NUCLI (ALGUN PUNT ESCÀS) Nucli (ALGUN PUNT) + CITOPLASMA (GRANS ACUMULACIONS) NUCLI (1 PUNT MOLT INTENS, 2-3 PETITS) Citoplasma + Nucli (algun punt)	NUCLI (1 PUNT) + PART ANTERIOR PART ANTERIOR PART ANTERIOR	Citoplasma + perifèria nuclis CITOPLASMA (POC) NUCLI (ALGUN PUNT ESCÀS)
Estadi 9	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt) Citoplasma Citoplasma	Nucli (ALGUN PUNT) + CITOPLASMA (GRANS ACUMULACIONS) NUCLI (1 PUNT MOLT INTENS, 2-3 PETITS) Citoplasma + Nucli (algun punt, FORÇA INTENSITAT) + CITOPLASMA (VORALA PERIFÈRIA DEL NUCLI)	PART ANTERIOR PART ANTERIOR	Citoplasma + perifèria nuclis CITOPLASMA (POC) NUCLI (ALGUN PUNT ESCÀS)
Estadi 10	Citoplasma + Nucli (difós, sobretot perifèria) Citoplasma + Nucli (perifèria + 1 punt) Citoplasma Citoplasma	Nucli (ALGUN PUNT) + CITOPLASMA (GRANS ACUMULACIONS) Nucli (1 PUNT MOLT INTENS, 2-3 PETITS) Citoplasma + NUCLI (DIVERSOS PUNTS, FORÇA INTENSITAT) + CITOPLASMA (ACUMULACIONS DE GRAN INTENSITAT)	PART ANTERIOR PART ANTERIOR	Citoplasma + perifèria nuclis CITOPLASMA (POC) NUCLI (ALGUN PUNT ESCÀS)

Com s'ha esmentat anteriorment, les *border cells* són unes cèl·lules molt especials i força desconegudes que provenen en un origen de cèl·lules fol·liculars. Aquestes últimes adopten capacitat migratòria i es desplacen durant l'estadi 9 de la part anterior a la posterior del conjunt de *nurse cells*, fins arribar a l'estadi 10 a la zona de les *nurse cells* més propera al nucli de l'oòcit.

El fet que haguem trobat en aquestes cèl·lules tan particulars diversos components de la RNP telomèrica és quelcom sorprenent i interessant.

S'ha pogut trobar que localitzen a les *border cells* (tant a l'estadi 9 com al 10):

- A ovaris **salvatges**: la proteïna **TART Pol** i l'**RNA sense de HeT-A** (l'mRNA, l'intermediari de transposició).
- A mutants **GIII**: igual que a ovaris salvatges, però l'mRNA de *HeT-A* s'hi troba a nivells més elevats (sobretot a l'estadi 10 vora el nucli de l'oòcit), i a més també s'hi detecta l'**RNA sense de TART** (mRNA).
- A mutants d'*aubergine*: similar a ovaris salvatges, i a més s'hi detecta l'**RNA antisense de TART** (però **no** l'mRNA de *TART*, com sí que passa a GIII).

El fet de trobar *TART Pol* a les *border cells*, així com la seva localització en forma d'un sol punt al nucli de les *nurse cells* durant els primers estadis de desenvolupament ovàric fan pensar en la possibilitat que aquesta proteïna estigui duent a terme una altra funció a més a més de la telomèrica.

4.2. ALTRES PROTEÏNES QUE FORMEN LA RNP TELOMÈRICA: Proteïnes cel·lulars que interaccionen amb *HeT-A* Gag i *TART*Pol

Per tal d'identificar les proteïnes cel·lulars que formen part del complex o ribonucleoproteïna telomèrica, juntament amb les proteïnes i els RNAs dels propis retrotransposons telomèrics *HeT-A* i *TART*, s'han dut a terme dues estratègies independents.

Una d'elles és una primera aproximació per cercar interaccions bioquímiques de la proteïna *HeT-A* Gag amb proteïnes que segons la literatura serien bones candidates a interaccionar-hi.

La segona és l'aïllament de complexos proteics que interaccionen amb *HeT-A* Gag i *TART-RT* mitjançant la tècnica del TAP *tag* seguida d'una anàlisi per espectrometria de masses.

Aquestes dues estratègies han permès identificar diverses interaccions bioquímiques de proteïnes cel·lulars mai abans relacionades amb els telòmers de *Drosophila*, així com la posterior caracterització i anàlisi de fenotips dels seus mutants. En conjunt, aquests resultats permeten realitzar un petit esbós sobre com pot estar-se duent a terme el manteniment telomèric a *Drosophila melanogaster*, incrementant els coneixements que prèviament se'n tenia.

4.2.A. Primera aproximació amb proteïnes candidates a formar part de la RNP telomèrica

S'han realitzat co-immunoprecipitacions amb proteïnes candidates a interaccionar amb les proteïnes dels retrotransposons telomèrics. Com s'ha explicat abans, les proteïnes endògenes *HeT-A* Gag i *TART* Pol es troben a tots els tipus cel·lulars de mosques salvatges a uns nivells no suficientment abundants com per ser detectades en un *western blot* o una immunoprecipitació. Per aquesta raó, s'han dut a terme estudis amb les proteïnes recombinants (fusionades a diferents *tags*) o amb les proteïnes endògenes a partir d'extractes proteics de la línia mutant GIII que sobreexpressa els retrotransposons telomèrics.

En el cas de les proteïnes recombinants s'han transfectat transitòriament cèl·lules S2 amb la proteïna Gag de *HeT-A* juntament amb la proteïna candidata, fusionades cadascuna d'elles a *tags* diferents (veure l'apartat 3. *Materials i Mètodes*). No obstant, sempre que ha estat possible s'han emprat extractes proteics que han permès detectar-ne les proteïnes endògenes.

Les proteïnes candidates a participar en el cicle de vida telomèric de *Drosophila* són aquelles que els seus homòlegs a altres espècies localitzen als telòmers, o que participen en el *capping* o l'estabilitat dels telòmers (veure l'apartat 1. *Introducció*). Per tant, les proteïnes candidates escollides han estat aquelles que els seus mutants presenten fenotips de disfunció telomèrica, com HP-1 i Woc. (Fanti L et al 1998; Raffa GD et al 2005).

També hem cregut interessant estudiar la possible interacció de la proteïna *HeT-A* Gag amb la Lamina, ja que s'ha vist que aquesta proteïna juga un paper important en l'ancoratge dels telòmers a la membrana nuclear en altres organismes (Gruenbaum Y et al 2005). A ratolí, HP1 interacciona amb la Lamina, així com amb el receptor de la Lamina i l'embolcall nuclear

(Lomberk G et al 2006). Tenint en compte que HP1 fa possible el *capping* dels telòmers, i la proximitat (quasi solapament en alguns casos) a la membrana nuclear de la proteïna *HeT-A* Gag (veure l'apartat 1. *Introducció*), pot hipotetitzar-se que la Lamina (directament o a través d'HP1) podria estar participant en l'ancoratge de *HeT-A* Gag a la membrana nuclear i que, per tant, podria estar implicada en el seu *targeting* telomèric.

D'altra banda, com s'ha explicat a l'apartat 1. *Introducció*, s'ha pogut observar que les proteïnes Jil-1 i Z4 s'associen a la seqüència de retrotransposons telomèrics (HTT) però que no es troben al *cap* telomèric (Andreyeva EN et al 2005). De fet va suggerir-se a Gan M et al 2011 la possibilitat que ambdues proteïnes estiguessin interaccionant entre elles.

En resum doncs, les proteïnes candidates a interaccionar amb *HeT-A* Gag i amb les quals s'han dut a terme les immunoprecipitacions d'aquesta primera aproximació per trobar proteïnes cel·lulars que interaccionen amb la RNP telomèrica són: HP1, Lamina, Z4 i Jil-1.

***HeT-A* Gag no interacciona amb les proteïnes Lamina ni HP1**

Com es pot observar a la Figura 49, les immunoprecipitacions realitzades a cèl·lules S2 entre les proteïnes *HeT-A* Gag (transfectada, fusionada a la GFP) i Lamina (endògena) indiquen que no interaccionen entre elles.

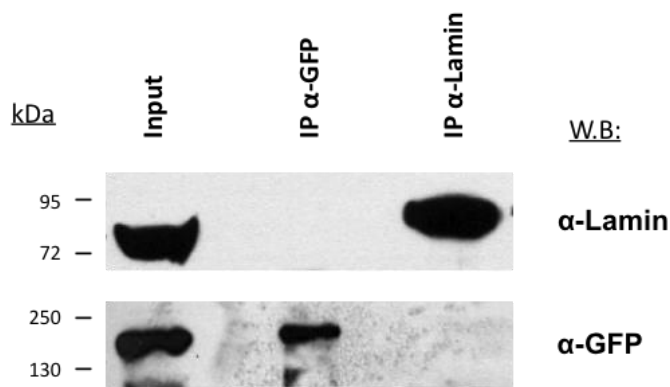


Figura 49. Immunoprecipitació de la Lamina i *HeT-A* Gag emprant cèl·lules S2 transfectades amb *HeT-A* Gag-GFP. A la primera columna s'observa l'extracte inicial de proteïnes (*Input*), i a les columnes segona i tercera hi ha les immunoprecipitacions realitzades amb els anticossos anti-GFP i anti-Lamina respectivament. La primera fila mostra el *western blot* revelat amb l'anticòs que reconeix la Lamina. La segona fila correspon a la mateixa membrana revelada amb anti-GFP, el qual indica la presència de *HeT-A* Gag-GFP.

A continuació es pot observar la Figura 50 que correspon a l'anàlisi de la interacció bioquímica entre HP1 i *HeT-A* Gag-GFP a cèl·lules S2 transfectades. El resultat indica que les proteïnes *HeT-A* Gag i HP1 tampoc no interaccionen entre elles.

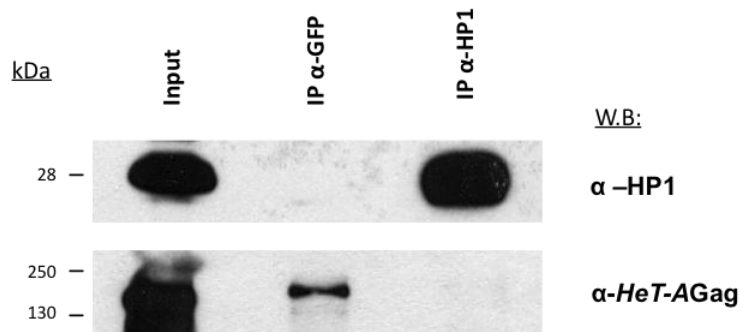


Figura 50. Immunoprecipitació d'HP1 amb *HeT-A* Gag emprant cèl·lules S2 transfectades *HeT-A* Gag-GFP. A la primera columna s'observa l'extracte inicial de proteïnes (*Input*), i a les columnes segona i tercera les s'hi troben les immunoprecipitacions realitzades amb els anticossos anti-GFP i anti-HP1 respectivament. La primera fila mostra el *western blot* revelat amb l'anticòs que reconeix la proteïna HP1 endògena. La segona fila correspon a la mateixa membrana revelada amb anti-GFP, és a dir, que marca *HeT-A* Gag-GFP.

Quant a Woc, tot i ser una bona candidata a participar en la RNP telomèrica, finalment no s'hi han pogut dur a terme els estudis d'interacció amb *HeT-A* Gag per manca de temps.

La proteïna Z4 interacciona amb *HeT-A* Gag i Jil-1

Seguidament, s'ha estudiat la possible interacció entre *HeT-A* Gag i Z4 a cèl·lules S2 transfectades amb ambdues proteïnes fusionades a les *tags* GFP i Flag respectivament. L'experiment pot observar-se a la Figura 51, d'on es pot concloure que les proteïnes Z4 i *HeT-A* Gag sí que interaccionen entre elles.

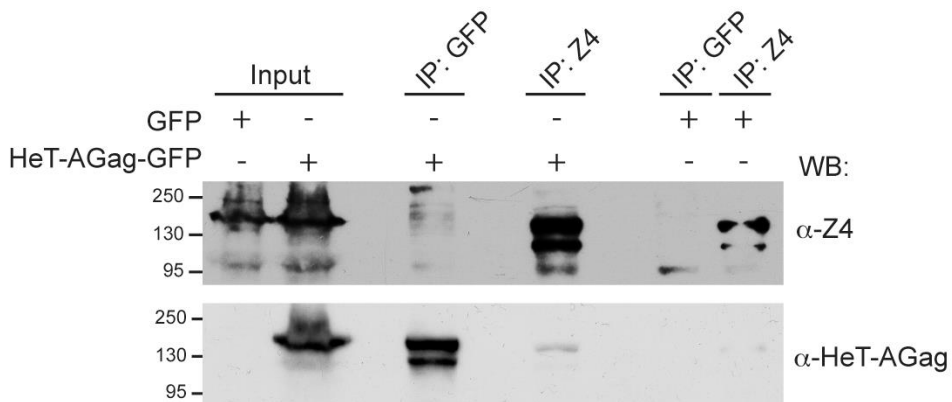


Figura 51. Immunoprecipitació de les proteïnes *HeT-A* Gag i Z4 emprant cèl·lules S2 transfectades amb *HeT-A* Gag-GFP. A les dues primeres columnes s'observen els extractes inicials de proteïnes (*Input*). La primera columna correspon a l'extracte proteic de cèl·lules transfectades amb un vector que conté únicament la GFP, i la segona és l'extracte proteic de la transfecció d'S2 amb *HeT-A* Gag-GFP. Les columnes tercera i quarta corresponen a immunoprecipitacions realitzades amb els anticossos anti-GFP i anti-Z4, respectivament, amb l'extracte proteic de cèl·lules transfectades amb *HeT-A* Gag-GFP. En canvi, les columnes cinquena i sisena, tot i ser les

mateixes immunoprecipitacions (mateixos anticossos) que a les dues columnes anteriors, els seus extractes proteics corresponen a cèl·lules transfectades únicament amb GFP (controls). La primera fila mostra el *western blot* revelat amb l'anticòs que reconeix la proteïna Z4 endògena. La segona fila correspon a la mateixa membrana revelada amb anti-*HeT-A* Gag, és a dir, que reconeix *HeT-A* Gag-GFP. (Figura publicada a l'article Silva-Sousa R et al 2012).

A continuació, s'ha analitzat la interacció de *HeT-A* Gag amb Jil-1 (Figura 52), i tal com indica el resultat obtingut de les immunoprecipitacions realitzades, aquestes dues proteïnes no interaccionen bioquímicament entre elles.

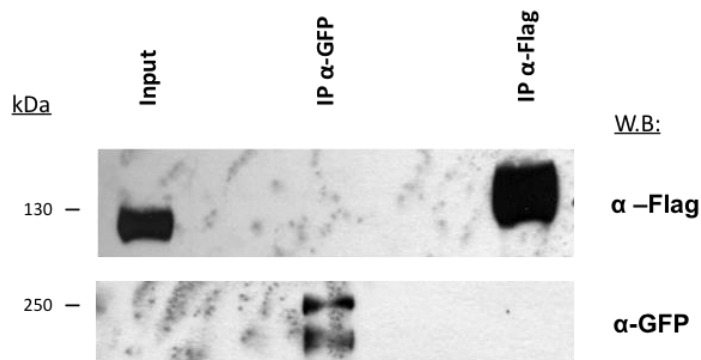


Figura 52. Immunoprecipitació de les proteïnes *HeT-A* Gag i Jil-1 emprant cèl·lules S2 transfectades amb *HeT-A* Gag-Flag i Jil-1-GFP. A la primera columna s'observa l'extracte inicial de proteïnes (*Input*), i a les columnes segona i tercera les immunoprecipitacions realitzades amb els anticossos anti-GFP i anti-Flag respectivament. La primera fila mostra el *western blot* revelat amb l'anticòs anti-Flag que reconeix la proteïna recombinant *HeT-A* Gag-Flag. La segona fila correspon a la mateixa membrana revelada amb anti-GFP, és a dir, que marca Jil-1-GFP.

No obstant, per tal de comprovar si, tot i no interaccionar Jil-1 amb *HeT-A* Gag, Jil-1 està interaccionant amb Z4, ja que ambdues proteïnes localitzen als telòmers de *Drosophila* a la seqüència HTT on es troben els retrotransposons telomèrics (Andreyeva EN et al 2005), s'ha dut a terme la immunoprecipitació presentada a la Figura 53, de la qual es pot concloure que Z4 i Jil-1 sí que interaccionen entre elles.

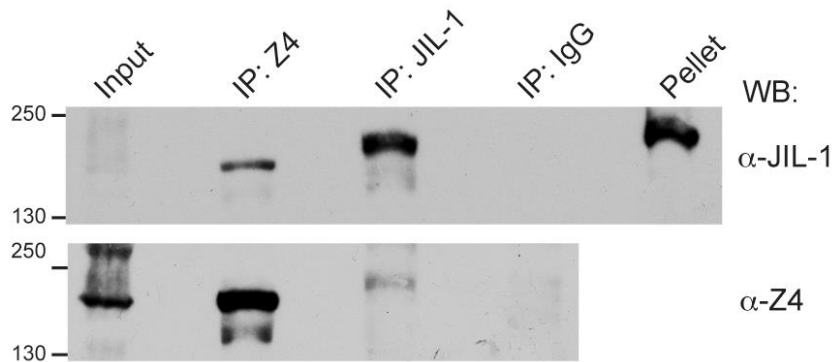


Figura 53. Immunoprecipitació de les proteïnes Jil-1 i Z4 emprant cèl·lules S2. A la primera columna s'observa l'extracte inicial de proteïnes (*Input*), i a les columnes segona, tercera i quarta les immunoprecipitacions realitzades amb els anticossos anti-Z4, anti-Jil-1 i anti-IgG (control negatiu), respectivament. L'última columna és el *pellet* cel·lular resultant de la centrifugació realitzada inicialment per obtenir l'extracte proteic d'S2. La primera fila mostra el *western blot* revelat amb l'anticòs que reconeix la proteïna Jil-1 endògena. La segona fila correspon a la mateixa membrana revelada amb anti-Z4 que en reconeix la proteïna endògena (el *pellet* d'aquesta fila no es mostra ja que no presentava cap marcatge). (Figura publicada a l'article Silva-Sousa R et al 2012).

En resum, després de realitzar immunoprecipitacions amb les proteïnes candidates esmentades, hem trobat que *HeT-A* Gag no interacciona amb les

proteïnes Lamina, HP-1 ni Jil-1. Sí que són remarcables en canvi les interaccions bioquímiques de les proteïnes *Z4* i *HeT-A* Gag, així com de *Z4* amb Jil-1.

Les dues interaccions trobades són de gran rellevància ja que indiquen que *HeT-A* Gag, *Z4* i Jil-1 podrien estar formant part d'un mateix complex proteic o RNP, i presenten un possible mecanisme de *targeting* de la proteïna Gag de *HeT-A* als telòmers (hem trobat també altres indicis que reforcen encara més aquesta hipòtesi: Figura 54). Aquests resultats formen part de l'article publicat recentment pel nostre laboratori a *PLoS Genetics* (Silva-Sousa R et al 2012).

La interferència de *z4* i *HeT-A* gag provoca fusions telomèriques a cèl·lules S2

Per estudiar els efectes de la pèrdua de la proteïna *Z4* així com de *HeT-A* Gag, s'han interferit els seus gens per separat per veure si provoquen el mateix fenotip. Per saber quin efecte té l'absència de *Z4* sobre l'estabilitat telomèrica, s'han dut a terme experiments de silenciament de *z4*, així com de *HeT-A* gag i gens control de fusions telomèriques a cèl·lules S2.

El *knock-down* dels gens *z4* i *HeT-A* gag per difusió dels seus dsRNAs a cèl·lules S2 genera fenotips de fusions telomèriques, tal i com es pot observar a les preparacions de cromosomes metafàsics de la Figura 54A, inclosa també a l'article que hem publicat a *PLoS Genetics*: Silva-Sousa R et al 2012. Pot concloure's doncs que *Z4*, igual que *HeT-A* Gag, té un efecte directe en l'estabilitat telomèrica de *Drosophila*.

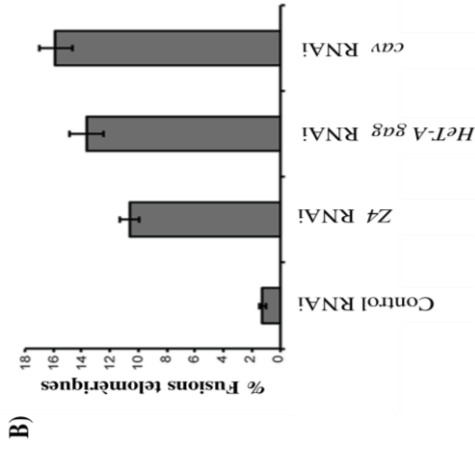
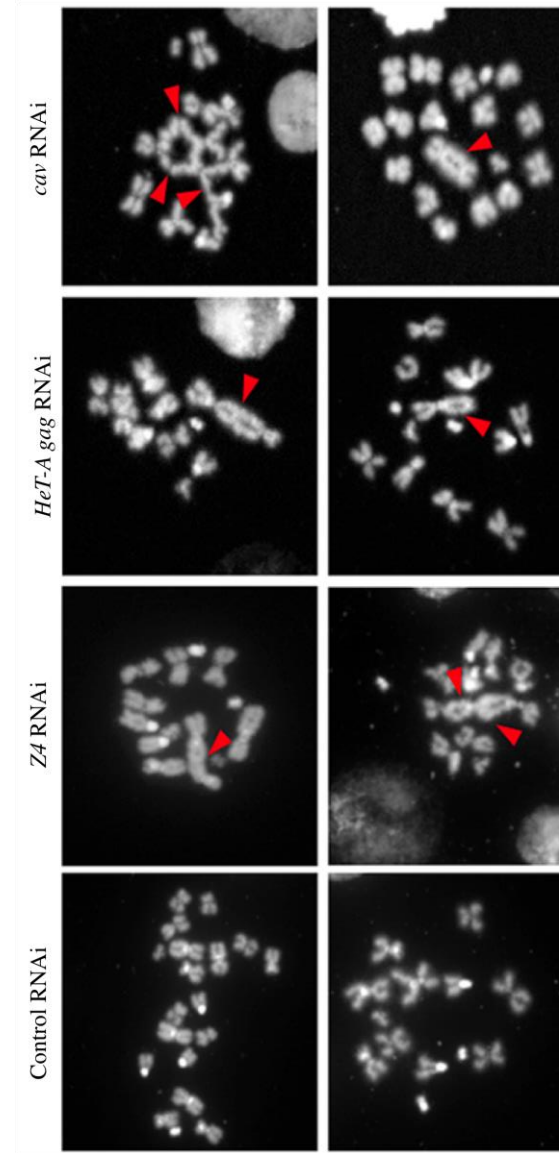


Figura 54. Efecte de la interferència de Z4 i *HeT-A gag* a cèl·lules S2. **A)** Cromosomes metafàsics de cèl·lules S2 tractades durant 48 h amb diferents dsRNAs per difusió. El DNA està tenyit amb DAPI. Es presenten dues fotografies per a cada interferència (en dues files). La primera columna correspon a cèl·lules tractades amb el dsRNA de *SART1* (un retrotransposó no-LTR dels telòmers de *Bombyx mori*) que són el control negatiu de fusions telomèriques. Les columnes segona i tercera corresponen a la interferència amb el dsRNAs de Z4 i *HeT-A gag*, respectivament. L'última columna mostra el control positiu de fusions telomèriques: cèl·lules interferides per *caravaggio* (gen que codifica la proteïna Hoop implicada en el *capping telomèric*). Les flexes vermelles indiquen la presència de fusions telomèriques. **B)** Percentatge de fusions telomèriques que presenten els cromosomes metafàsics de cèl·lules S2 tractades amb diferents dsRNAs per difusió: *SART1* (control negatiu), Z4, *HeT-A gag*, i *caravaggio* (quantificació dels resultats observats a **A**). (Publicat a Silva-Sousa R et al 2012).

4.2.B. Purificació de complexos proteics mitjançant el mètode del TAP tag

Mètode de purificació de complexos proteics TAP tag

El mecanisme de purificació *Tandem Affinity Purification*, anomenat també TAP, consta de dues purificacions seqüencials seguides d'una anàlisi final de les proteïnes aïllades mitjançant espectrometria de masses (Rigaut G et al 1999). Aquest tipus de purificació seqüencial permet eliminar les interaccions inespecífiques, tot i que també aquelles més dèbils i transitòries, donant com a resultat final l'obtenció dels pèptids que interaccionen de forma estable i amb una alta especificitat amb la proteïna diana.

Aquesta purificació es duu a terme emprant tampons de composició similar a la cel·lular, intentant així reproduir al màxim les condicions fisiològiques perquè segueixin tenint lloc les interaccions proteiques que es donen *in vivo* (veure l'apartat 3. *Materials i Mètodes*). Tal com s'observa a la Figura 55, el tag TAP conté la proteïna A, la qual s'uneix a les IgGs de les boles magnètiques en un primer pas de purificació (part superior de la Figura 56). Després de diversos rentats, s'allibera el complex de proteïnes de les boles magnètiques d'IgGs fent-hi una digestió amb la proteasa TEV, i s'uneix a les boles de Calmodulina a través del domini CBP (Proteïna d'unió a la Calmodulina). A continuació es realitzen rentats i s'allibera el complex de proteïnes amb una elució final amb EGTA o bullint directament les boles. Les proteïnes alliberades al final de tot el procés de purificació del TAP són posteriorment digerides i els seus pèptids són analitzats per Espectrometria de masses (part inferior de la Figura 56).

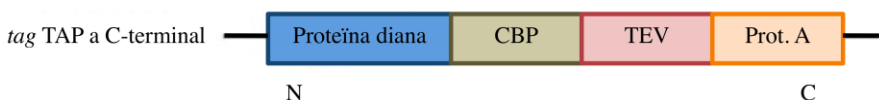


Figura 55. Representació del tag TAP del vector pMK33-CTAP (Adaptat de Veraksa A et al 2005).

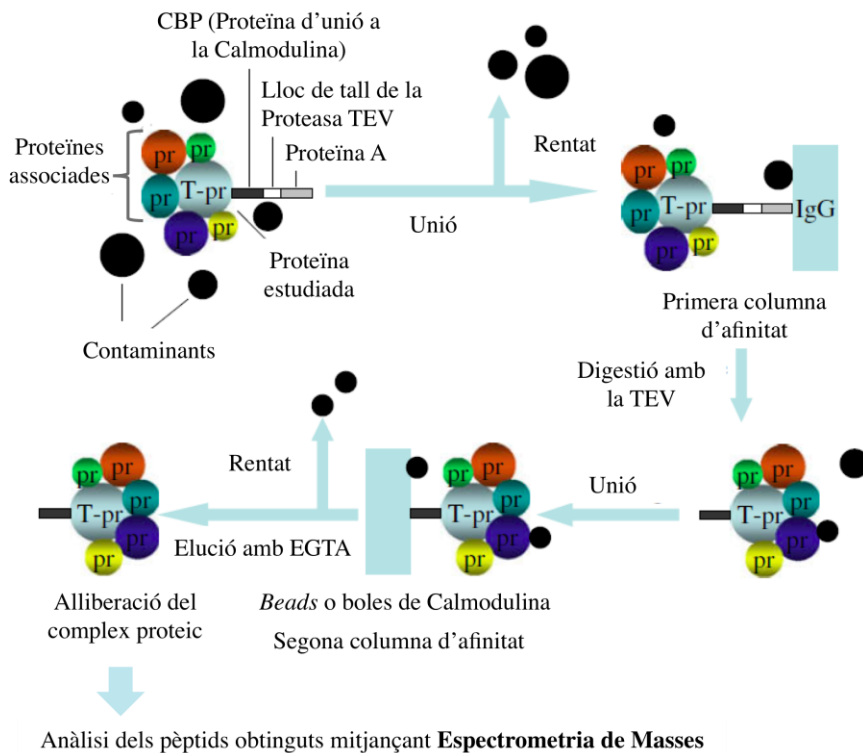


Figura 56. Esquema del procés de Purificació per Afinitat en Tàndem (TAP) de complexos proteics, seguit de l'anàlisi per Espectrometria de masses. La proteïna diana es troba representada com a "T-pr", i les proteïnes amb què interacciona com a "pr". (Adaptat de Xu X et al 2010).

Generació de línies cel·lulars estables *HeT-A* Gag-CTAP i *TART-RT*-CTAP

Per poder realitzar aquestes purificacions de complexos proteics es van generar línies cel·lulars estables Schneider S2 de *HeT-A* Gag i *TART-RT*

fusionades al *tag* TAP. Va emprar-se a més el TAP sol com a línia control (vector buit). Per generar aquestes línies cel·lulars, primer es van transfectar transitòriament cèl·lules S2 amb el vector d'interès (CTAP, *HeT-A* Gag-CTAP o *TART-RT-CTAP*). El TAP conté una resistència a Higromicina que permet seleccionar les cèl·lules transfectades i establir-ne així les línies estables. Abans de la purificació va induir-se l'expressió de les proteïnes d'interès mitjançant una concentració adient de sulfat de coure (CuSO_4), ja que el TAP conté un promotor de metal·lotioneïna induïble per sulfat de coure (veure l'apartat 3. *Materials i Mètodes*). La generació d'aquestes línies cel·lulars estables va ser duta a terme per la Dra. Rute Silva-Sousa.

Per trobar la concentració més idònia de sulfat de coure i optimitzar així els nivells d'expressió proteica, van realitzar-se *western blot* per a cada línia cel·lular emprant diferents concentracions d'inducció (Figura 57). Amb aquests resultats va establir-se que les concentracions més adients per induir les línies cel·lulars estables era de 200 μM de CuSO_4 per a *TART-RT-CTAP* i CTAP, i de 100 μM per a *HeT-A* Gag-CTAP.

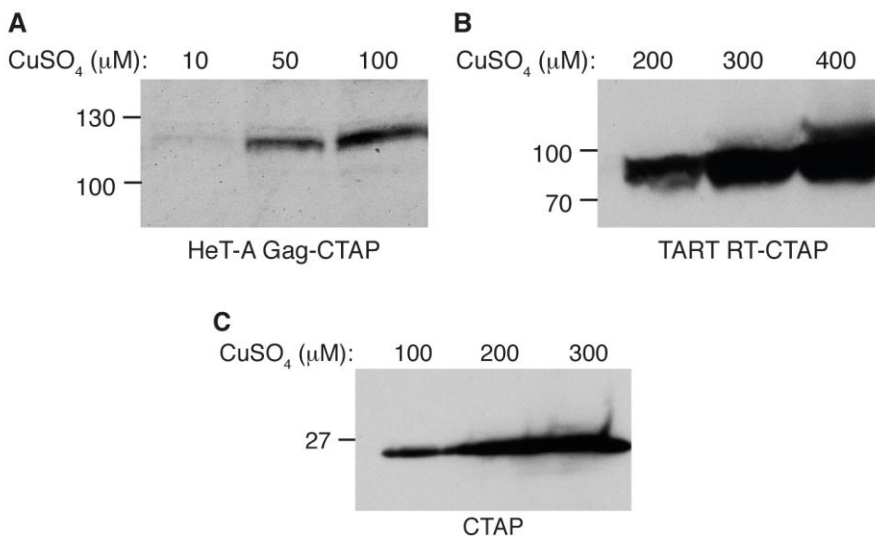


Figura 57. *Western blot* de les proteïnes recombinants sintetitzades per les diferents línies cel·lulars estables S2 induïdes a concentracions

creixents de sulfat de coure. Les concentracions de sulfat de coure testades es troben indicades a sobre de cada columna i el pes molecular de les proteïnes s'observa a l'esquerra de cada imatge. La Figura A correspon a la línia cel·lular estable *HeT-A* Gag-CTAP, la B a *TART-RT-CTAP*, i la C a la línia control CTAP. Totes les imatges són *western blot* revelats amb l'anticòs anti-TAP.

Per comprovar que el constructe transfectat a les línies cel·lulars era funcional es van dur a terme immunolocalitzacions de les cèl·lules induïdes a diferents concentracions de sulfat de coure. A la Figura 58 es pot apreciar la quantitat creixent de proteïna recombinant *HeT-A* Gag-CTAP generada en incrementar la concentració de sulfat de coure.

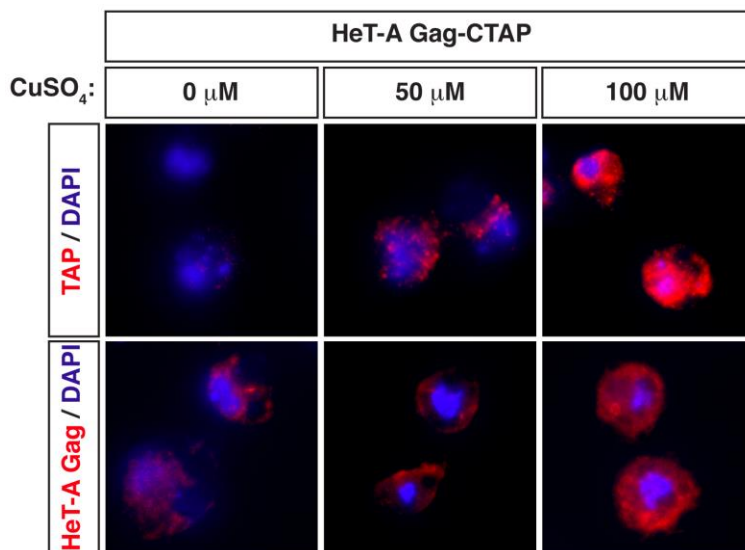


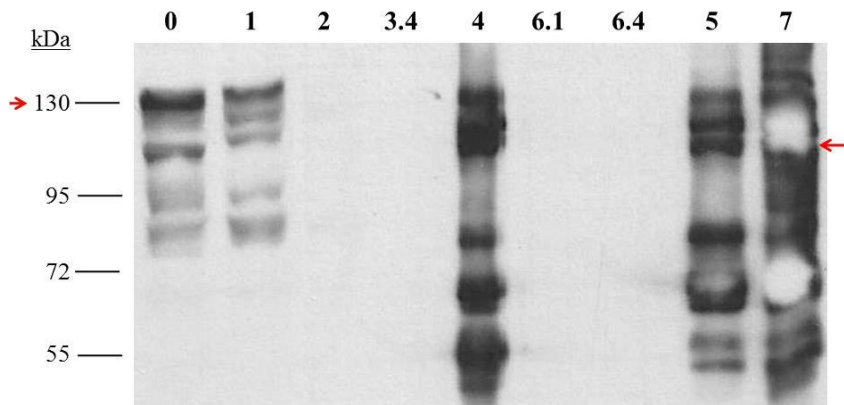
Figura 58. Immunolocalització de la línia cel·lular estable *HeT-A* Gag-CTAP. El DNA està marcat en blau. A la fila superior s'observa en vermell la *tag* TAP amb l'anticòs anti-TAP, mentre que a la fila inferior es detecta la proteïna *HeT-A* Gag amb el seu anticòs específic. A les tres columnes s'hi observa la quantitat creixent de proteïna sintetitzada (d'esquerra a dreta) a mesura que s'incrementa la concentració de sulfat de coure amb què se

n'indueix la síntesi (la columna de l'esquerra mostra les cèl·lules sense induir).

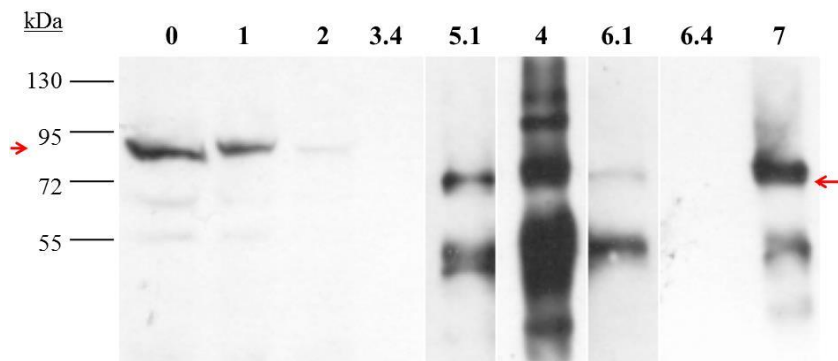
Purificació de complexos proteics de les línies cel·lulars estables *HeT-A* Gag-CTAP, *TART-RT*-CTAP i CTAP

A la Figura 59 es poden observar els diferents passos de les purificacions de complexos proteics del mètode TAP.

A) *HeT-A* Gag-CTAP



B) *TART-RT*-CTAP



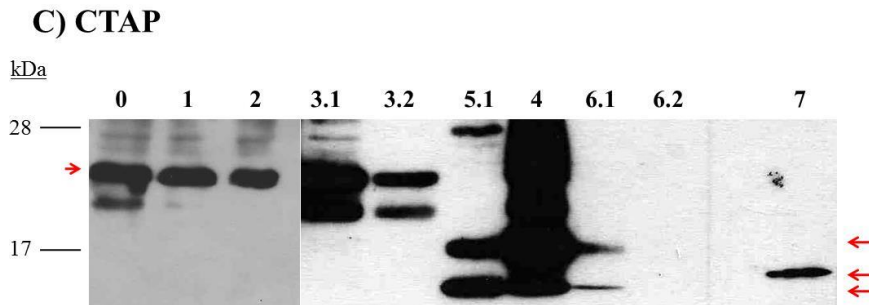


Figura 59. Western blot dels diferents passos de purificació del mètode del TAP tag revelats amb l'anticòs anti-TAP. A) Purificació de la línia cel·lular *HeT-A* Gag-CTAP induïda amb 100 μm de CuSO_4 . B) Purificació de la línia cel·lular *TART-RT-CTAP* induïda amb 200 μm de CuSO_4 . El pes molecular es troba indicat a l'esquerra de cada panell en kDa. Les fletxes vermelles indiquen la presència de la proteïna d'interès. Els passos de purificació observats als *films* es descriuen a continuació. 0: Lisat cel·lular inicial; 1: Lisat cel·lular després de la seva centrifugació (sobrenedant); 2: Líquid eluït després d'unir l'extracte proteic a les boles magnètiques d'IgGs; 3.1: Primer rentat després de la unió a les boles d'IgGs; 3.2: Segon rentat després de la unió a les IgGs; 3.4: Últim pas de rentat després de la unió a les IgGs; 5.1: Líquid eluït en la digestió amb la proteasa TEV; 4: Boles d'IgGs després de la digestió amb la proteasa TEV; 6.1: Primer rentat després de la unió a les boles de Calmodulina; 6.2: Segon rentat després de la unió a les boles de Calmodulina; 6.4: Últim rentat després de la unió a les boles de Calmodulina; 7: Boles de Calmodulina Finals. (Per a més informació veure l'apartat 3. *Materials i Mètodes*). El TAP sencer té una mida aproximada d'uns 22 kDa. (La banda de 28 kDa observada al carril 5.1 de la purificació de CTAP (C) correspon a la cadena lleugera de les IgGs que està sent reconeguda per l'anticòs secundari per amb què s'ha revelat el *western blot*). (A la columna "7" de la Figura A, la quantitat de proteïna *HeT-A* Gag purificada és tan elevada que el film fotogràfic es troba saturat, raó per la

qual presenta una aparent manca de senyal quan és en realitat on major senyal hi ha de tot el *film*).

A la Figura 60 es poden observar les bandes que corresponen a les proteïnes obtingudes en la purificació en tàndem dels complexos proteics. Aquesta figura mostra el gel d'acrilamida tenyit amb nitrat de plata on s'han corregut les boles de Calmodulina finals de les purificacions de CTAP, *TART-RT-CTAP*, i *HeT-A Gag-CTAP*, respectivament.

S'han tallat els trossos d'interès del gel, s'han tenyit, i s'han enviat al servei d'anàlisi per espectrometria de masses on n'han obtingut l'empremta peptídica. Posteriorment, s'han identificat les proteïnes purificades mitjançant el *software Mascot* que cerca a diverses bases de dades específiques d'espectrometria de masses. Els resultats obtinguts detallen, a més de les diverses proteïnes identificades, el número de pèptids trobats, el percentatge que cobreixen els pèptids que se n'ha trobat respecte la seqüència total de la proteïna, i el *Mascot Score*. Aquest *score* està relacionat amb la probabilitat de què les dades experimentals coincideixin per atzar amb les seqüències de bases de dades de proteïnes. Per tant, com més elevat és el valor de l'*score*, més seguretat es té que la proteïna identificada és un veritable positiu, és a dir, que el resultat obtingut és més significatiu i és menys probable que s'hagi identificat per atzar.

Les proteïnes identificades a la purificació control (CTAP) han estat les que es presenten a la Taula 4. Les proteïnes obtingudes tant a la purificació del CTAP com a les de *HeT-A Gag-CTAP* o *TART-RT-CTAP* s'han considerat com a *background*, és a dir, com a proteïnes amb una alta afinitat d'adherència al *tag TAP* i que per aquesta raó no poden considerar-se específiques de les purificacions de *HeT-A Gag* o *TART-RT* fusionades al TAP.

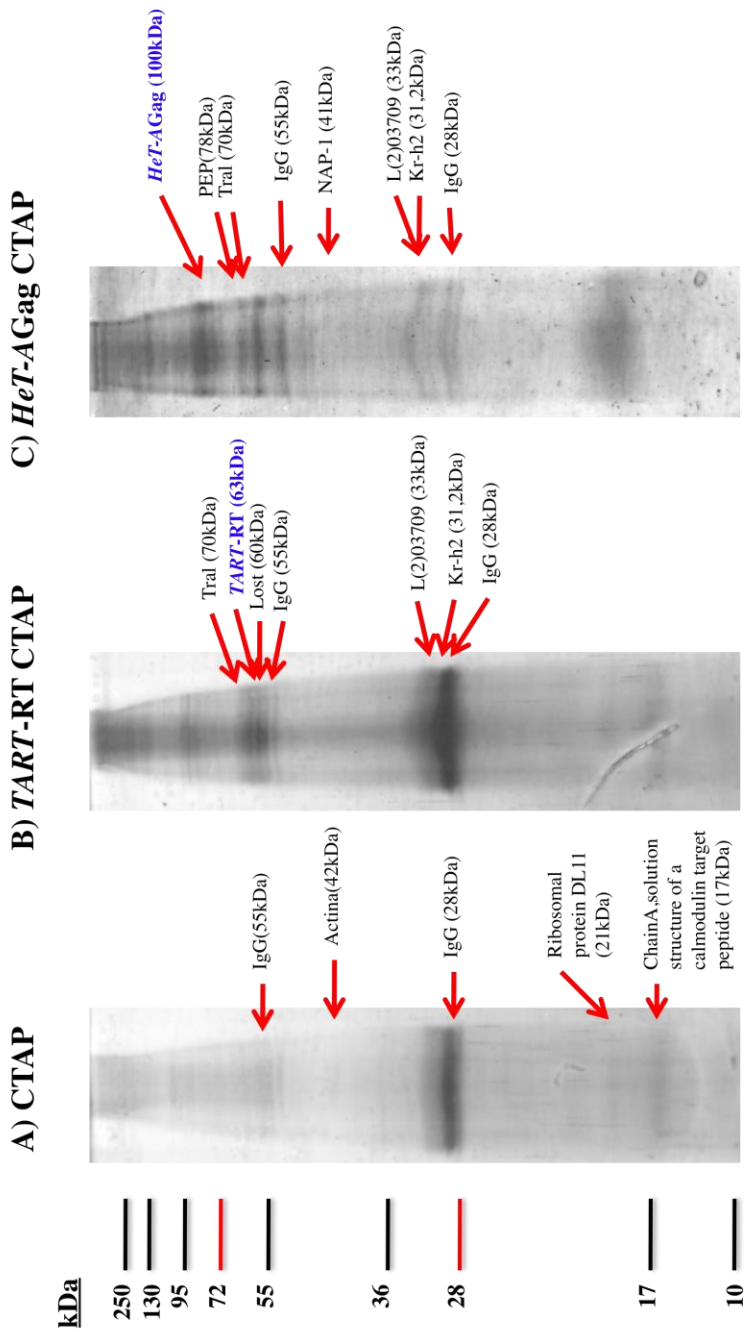


Figura 60. Gels d'acrilamida tenyits amb nitrats de plata on s'han carregat les boles de Calmodulina del pas final del mètode de purificació TAP. La primera columna mostra la purificació del CTAP, la segona la de TART-RT-CTAP, i l'última la de HeT-A Gag-CTAP. Els pesos moleculars de les proteïnes es troben indicats en kDa a l'esquerra. Les fletxes vermelles senyalen

PROTEÏNES PURIFICADES	CTAP		
	Pèptids	% Coverage	Mascot Score
Chain A, Solution Structure Of A Calmodulin-Target Peptide Complex By Multidimensional Nmr	6	48.6	330.6
Actin	9	31.9	542
ribosomal protein DL11 [Drosophila melanogaster]	1	7.6	77.8
CG12836 [Drosophila melanogaster]	1	4.5	38.4

Taula 4. Llistat de proteïnes obtingudes en l'espectrometria de masses de la purificació de la línia cel·lular control CTAP. Es troben especificats els valors del número de pèptids detectats, el percentatge de seqüència coberta (% Coverage) i els Mascot Scores. La proteïna diana es troba marcada amb fons blau (ja que el *Calmodulin-target peptide complex* detectat forma part del TAP tag). L'score més elevat està senyalat en vermell.

Identificades noves proteïnes que podrien participar en la RNP telomèrica mitjançant la purificació de complexos proteics

Després de diverses purificacions de *HeT-A* Gag-CTAP (2 purificacions independents) i *TART-RT*-CTAP (3 purificacions independents), i de comparar-ne els resultats amb els de la línia control CTAP (Taula 4), s'han identificat diferents proteïnes que han sortit en diverses purificacions i amb scores elevats. Les més rellevants d'aquestes proteïnes poden observar-se a la Taula 5. Es troben agrupades (de dalt a baix) segons les seves funcions o tipus proteic en els següents grups: proteïnes diana, proteïnes d'interès amb diverses funcions cel·lulars, histones, porines, tubulines, i factors d'inici de l'elongació/traducció o sintases/translocases d'ATP.

	HeT-A Gag C-TAP						TART-RT C-TAP					
	Purificació 1			Purificació 2			Purificació 1			Purificació 2		
	Peptids	% Coverage	Mascot Score	Peptids	% Coverage	Mascot Score	Peptids	% Coverage	Mascot Score	Peptids	% Coverage	Mascot Score
PROTEINES PURIFICADES												
probable gag protein [Drosophila melanogaster]	30	31.6	171.5	31	37.2	2131.4	-	-	-	-	-	-
ORF2 of TART-A transposon [Drosophila melanogaster]	-	-	-	-	-	-	2	1.7	111.1	9	9.8	399.1
Nucleosome Assembly Protein-1 (NAP-1)												
trailer hitch	2	7.8	146.4	1	4.9	79.5	-	-	-	-	-	-
Protein on ecdysone puffs (PEP)	1	2.9	52.2	2	6.2	91.7	-	-	-	2	5.7	119.6
lethal (2)03709, isoform C (gll16107234) [Drosophila melanogaster]	-	-	-	1	4	62.4	-	-	-	1	4	38.4
Kruppel homolog 2	1	1.8	84.7	2	5.3	130.6	-	-	-	-	-	-
Scully	2	7.4	139.2	2	7.4	133.5	1	4	86.5	-	-	-
Mec2	-	-	-	1	6.9	39.8	-	-	-	2	11.2	73.6
string of pearls	1	5.5	71.8	1	5.9	82	-	-	-	-	-	-
bellwether [Drosophila melanogaster]	1	4.6	56.9	1	4.6	40.7	-	-	-	-	-	-
glycoprotein 93 [Drosophila melanogaster]	1	12.4	60.9	2	8.2	88.6	2	8.2	71.7	-	-	-
polyadenylate-binding protein - fruit fly (Drosophila melanogaster)	-	-	-	6	12.9	276.7	-	-	-	-	-	-
ubiquitin-specific protease 7 [Drosophila melanogaster]	2	2.8	104.5	3	4.7	168.7	-	-	-	1	2.4	43.7
H2A histone	1	2.2	48.5	1	2.2	43.7	-	-	-	-	-	-
histone H4 replacement, isoform C [Drosophila melanogaster]	-	-	-	3	4.7	206	-	-	-	1	28.9	60
mitochondrial porin [Drosophila melanogaster]	-	-	-	1	14.3	46.7	1	14.3	63	-	-	-
porin, isoform A [Drosophila melanogaster]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	18.1	235.7
alpha-Tubulin at 84B CG1913-PA [Drosophila melanogaster]	5	28.7	310.5	5	21.6	267.8	-	-	-	-	-	-
beta-tubulin [Drosophila melanogaster]	8	28.2	512.1	-	-	-	1	2.2	57.8	5	17.6	367.4
elongation factor 1alpha48D CG8280-PA, isoform A [Drosophila melanogaster]	10	27.1	521.1	3	12.1	149.1	-	-	-	4	15.9	298.2
ATP synthase [Drosophila melanogaster]	7	24.6	425.3	5	15.8	276.4	-	-	-	4	9.7	175.3
ADP/ATP translocase [Drosophila melanogaster]	4	12.8	213.2	2	7.6	121.2	1	6.5	82.1	-	-	-
eukaryotic translational initiation factor 4A (eIF-4A) [Drosophila melanogaster]	1	10.8	119.1	2	6.7	71.3	-	-	-	-	-	-
eIF-2alpha [Drosophila melanogaster]	1	11.9	161.6	1	3.5	112.9	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	2	7	143.2	-	-	-	-	-	-

Taula 5. Llistat de proteïnes obtingudes en l'espectrometria de masses de 2 purificacions de proteïnes de HeT-A Gag-CTAP i 3 de TART-RT-CTAP. Cada purificació conté els valors de nombre de pèptids detectats, percentatge de seqüència coberta (% Coverage), i Mascot Scores. Les proteïnes diana es troben en el requadre blau, i les proteïnes seleccionades per seguir investigant estan remarcades en negreta. Els scores més elevats s'han senyalat en vermell.

A la Taula 6 es poden observar les proteïnes de la Taula 5 agrupades per funció proteica.

<u>Agrupació per funció proteica</u>	<u>Proteïnes purificades</u>
Citoesquelet/Mitosi/cicle cel·lular	alpha-Tubulin, beta-Tubulin, Actin, Trailer hitch, Mec2, Lethal(2)03709
Porines	porin, mitochondrial porin
Unió a RNA - Ribonucleoproteïnes (RNPs)	String of pearls, Lost, PEP, NAP-1, Cloned by ability to arrest the cell cycle (...)
Metabolisme de lípids (Ecdisona)	Lethal(2)03709, PEP, Scully
Plegament proteic	Glycoprotein 93
Cromatina	H2A histone, histone H4, NAP-1
Proteïnes ribosomals	String of pearls, Ribosomal proteins (moltes de diferents)
ATPases/GTPases	ATP synthase gamma, ATP synthase beta, ADP/ATP translocase, vacuolar ATPase, Elongation Factor 1-alpha
Proteïnes de <i>Heat-shock</i>	Heat shock protein cognate 4, heat shock protein 83
Transport/Degradació	Lethal(2)03709, Trailer hitch, Mec2
Transcripció/Traducció	Polyadenilate Binding Protein, Elongation Factor 1alpha, Cloned by ability to arrest the cell cycle (...)
<i>Splicing</i> d'mRNA	Lost, Polyadenilate Binding Protein
Especificació-Localització a l'oòcit, Desenvolupament	Lost, Trailer Hitch, Polyadenilate Binding Protein
Funció desconeguda	Krüppel homolog 2, Lethal(2)03709

Taula 6. Classificació per funció proteica de les diferents proteïnes identificades en l'espectrometria de masses de les purificacions de *HeT-A* Gag-CTAP i *TART-RT-CTAP*.

A la Taula 7 es presenten les proteïnes que s'han obtingut a més d'una purificació de *HeT-A* Gag-CTAP o *TART-RT-CTAP* o que són comunes a tots dos tipus de purificacions i que per les seves funcions proteiques són d'especial interès.

PROTEÏNES IDENTIFICADES	<i>HeT-A</i> Gag	<i>TART-RT</i>
Protein on Ecdysone puffs (PEP)	2	
Nucleosome Assembly Protein-1 (NAP-1)	2	
Lethal (2) 03709	2	1
Lost	2	2
Krüppel homolog 2	1	1
Trailer hitch	1	1

Taula 7. Proteïnes identificades en les purificacions de *HeT-A* Gag-CTAP i *TART-RT-CTAP* i número de vegades que s'han trobat en aquell tipus de purificació. Les proteïnes en vermell són les que s'han seleccionat per seguir-hi fent experiments.

A conseqüència de les seves funcions proteiques i del número de vegades que s'han identificat en les purificacions realitzades, hem decidit centrar la nostra investigació posterior en tres d'aquestes proteïnes: **Lost** (també anomenada Growl), **Trailer Hitch** (Tral), i **Nucleosome Assembly Protein – 1** (Nap-1).

Les proteïnes Lost i Tral estan implicades en interacció a mRNAs i tenen un paper important en l'*splicing*, regulació, protecció i estabilització de diferents mRNAs cel·lulars. Podrien jugar un paper important doncs en la formació de la ribonucleoproteïna telomèrica (RNP). En canvi, NAP-1 es troba relacionada principalment amb transport i remodelament de l'heterocromatina.

4.2.B.1. CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES LOST I TRAILER HITCH

Antecedents de Lost i Trailer Hitch

Trailer Hitch (Tral) va ser descrita a Wilhelm JE et al 2005 com una proteïna necessària per a l'especificació de l'eix dorsoventral a l'oòcit, associada al reticle endoplasmàtic (RE) i necessària per al transport de proteïnes secretades. També s'ha relacionat amb la regulació post-transcripcional d'mRNAs a cervell de *Drosophila* on estaria formant part d'una RNP neuronal (Barbee SA et al 2006). Al treball presentat per Eulalio A et al 2007 s'observa que Tral co-localitza a cèl·lules S2 amb proteïnes dels *P-bodies* (dominis citoplasmàtics on localitzen proteïnes i mRNAs sotmesos a modificacions post-transcripcionals, degradació, repressió de la traducció o protecció/emmagatzemament). La proteïna Tral interacciona a *Drosophila* amb les proteïnes dels *P-bodies* Me31B i DCP1, així com amb la proteïna repressora de la traducció CUP (Tritschler F et al 2008). A l'estudi publicat a Snee MJ i Macdonald PM 2009a s'observa als mutants de *tral* els següents defectes: localització aberrant de diversos mRNAs del pol anterior de l'oòcit com per exemple *gurken* (*grk*), organització incorrecta dels microtúbuls a l'oòcit, i diverses alteracions dels microfilaments que en els casos més severos donen lloc a fenotips d'aparició de gàbies d'actina ectòpiques que segresten proteïnes al seu interior i no permeten que localitzin correctament. A Liu L et al 2011 es descriu la interacció al *nuage* de Tral amb les proteïnes AGO3 i PAPI, implicades en el silenciament de transposons (veure l'apartat 1.8. *Regulació de la transposició d'elements mòbils*), i s'observa que els ovaris mutants per a *tral* presenten un increment de més del doble de l'expressió de *HeT-A* respecte a ovaris salvatges (entre d'altres transposons). Per últim, a l'article més recent de Tral s'identifica aquesta proteïna com un

Decapping Factor, és a dir, un enzim de regulació post-transcripcional que exposa els mRNAs que han de ser degradats per nucleases citoplasmàtiques (Jonas S i Izaurralde E 2013).

La proteïna Lost va anomenar-se originalment Growl. Per aquesta raó pot trobar-se amb ambdós noms en funció del treball publicat. Aquesta proteïna ha estat escassament estudiada, havent-se associat principalment a Tral i al desenvolupament de *Drosophila*.

A Snee MJ i Macdonald PM 2009b es confirma que Lost i Tral localitzen als *Sponge bodies*, així com també es mostra que Lost i Tral interaccionen entre elles a través d'mRNAs amb els quals interaccionen. Els *Sponge bodies* són unes estructures citoplasmàtiques o perinuclears relacionades amb la formació d'mRNPs i regulació post-transcripcional on s'emmagatzemen o reprimeixen mRNAs temporalment.

S'ha comprovat que Lost interacciona amb la proteïna Rumpelstiltskin (Rump), així com amb l'RNA de *nanos* (*nos*) al qual ajuda a localitzar correctament a ovaris de *Drosophila* (Sinsimer KS et al 2011). De fet, ja anteriorment s'havia identificat la proteïna Rump com una ribonucleoproteïna M heterogènia (hnRNPM) que participa en la localització de l'RNA de *nos* (Jain RA i Gavis ER 2008). Precisament, a Sinsimer KS et al 2011 es descriu que la col·laboració entre Lost i Rump és necessària perquè l'RNA d'*oskar* (*osk*) localitzi posteriorment als últims estadis de l'oogènesi, i se suggereix que ambdues proteïnes podrien estar formant part d'un complex que facilités la correcta localització de nombrosos mRNAs als estadis tardans de l'oogènesi de *Drosophila*.

A Weil TT et al 2012 s'afirma que Lost, Tral i altres factors relacionats també amb localització d'mRNAs i regulació de la traducció no co-localitzen amb l'mRNA de *grk* situat a la perifèria dels *P-bodies*, i es descriu que la proteïna Tral es dispersa a l'embrió després que aquest sigui activat, quan es desassemblen els *P-bodies*, donant lloc a l'activació de la traducció

de l'mRNA de *bcd*.

TART Pol interacciona amb Lost

Primerament s'ha confirmat la interacció bioquímica de les proteïnes Lost i TART Pol tant a cèl·lules S2 transfectades com a ovaris GIII mitjançant immunoprecipitació (Figura 61).

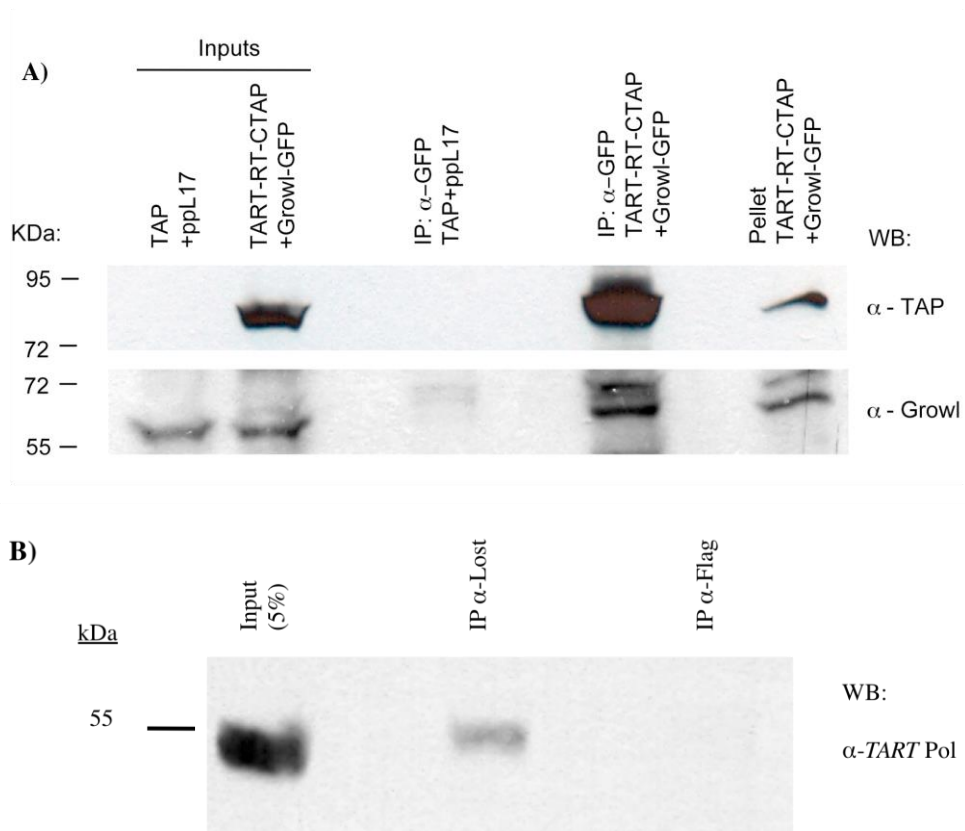


Figura 61. Immunoprecipitacions de Lost (o Growl) amb TART Pol. Els pesos moleculars es troben indicats en kDa a l'esquerra de cada imatge. **A)** Experiment realitzat emprant extractes proteics de cèl·lules S2 transfectades. Les dues primeres columnes mostren els extractes inicials (*Inputs*). La

primera columna correspon a cèl·lules S2 estables CTAP re-transfectades amb el vector ppL17 que conté només la GFP (aquest extracte inicial correspon a cèl·lules que tenen transfectats els dos *tags* buits: TAP i GFP). La segona columna correspon a l'extracte inicial de cèl·lules estables *TART-RT-CTAP* re-transfectades amb *Growl-GFP* (és a dir, la seqüència de *Lost* fusionada a la GFP). Les columnes tercera i quarta són les immunoprecipitacions (IP) amb l'anticòs anti-GFP, emprant el mateix extracte proteic que a la primera columna (IP control), o el mateix que a la segona (IP d'interès, on s'observa la interacció en qüestió), respectivament. L'última columna correspon al *pellet* cel·lular obtingut després de centrifugar les cèl·lules per obtenir-ne l'extracte proteic emprat en les columnes segona i quarta. Els *western blot* presentats corresponen a la mateixa membrana revelada amb dos anticossos diferents. El *film* de la fila superior correspon al revelat amb anti-TAP (el qual està marcant *TART-RT-CTAP*), i el de la fila inferior s'ha realitzat amb anti-*Growl* (el qual detecta *Growl-GFP*). **B)** Experiment dut a terme amb l'extracte proteic d'ovaris GIII. S'hi detecten les proteïnes endògenes. La primera columna és l'extracte inicial (*Input*) resultat de lisar ovaris de femelles GIII. La segona columna és la IP amb l'anticòs anti-*Lost* del mateix extracte proteic que a la primera columna (mostra la interacció d'interès). La tercera columna és la IP control, la qual s'ha dut a terme amb un anticòs que no reconeix cap proteïna de l'extracte (en aquest cas: anti-Flag). El *western blot* es troba revelat amb anti-*TART* Pol i en reconeix la proteïna endògena.

Les proteïnes *Lost* i *Tral* interaccionen entre elles

Hem confirmat la interacció de les proteïnes *Lost* i *Tral* (Figura 62), publicada ja anteriorment (Snee MJ i Macdonald PM 2009b).

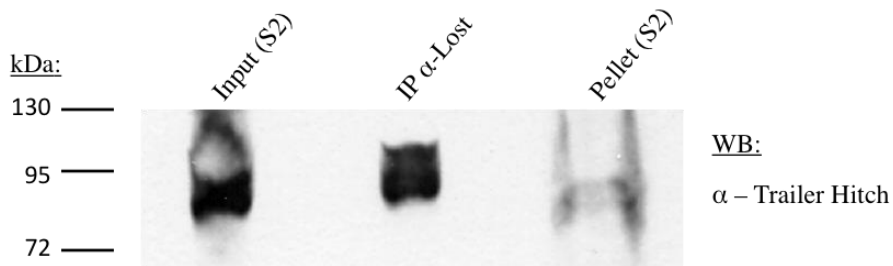


Figura 62. Immunoprecipitació de Lost i Trailer Hitch a cèl·lules S2. S'hi detecten les proteïnes endògenes. La primera columna correspon a l'extracte proteic inicial (*Input*), la segona columna és la IP amb l'anticòs anti-Lost, i la tercera és el *pellet* cel·lular. El *western blot* es troba revelat amb l'anticòs anti-Tral.

Les proteïnes Lost i Tral co-localitzen a l'oòcit d'ovaris de *Drosophila melanogaster*

A conseqüència de la interacció bioquímica entre les proteïnes Lost i Tral, hem decidit cercar la seva co-localització a ovaris de *Drosophila*. Per fer-ho hem realitzat una immunolocalització de Tral a ovaris d'una línia que expressa endògenament la proteïna Lost fusionada a la GFP. Com s'observa a la Figura 63, Lost i Tral co-localitzen als ovaris al pol posterior de l'oòcit als estadis 4 i 5 de desenvolupament (Figura 63A i 63C) i fins l'estadi 6 (Figura 63B). En canvi, als estadis 7 i 8 la seva co-localització apareix també al pol anterior de l'oòcit (Figura 63D i 63E). Aquesta és la primera vegada que s'observa la co-localització de les proteïnes Lost i Tral a ovaris de *Drosophila*.

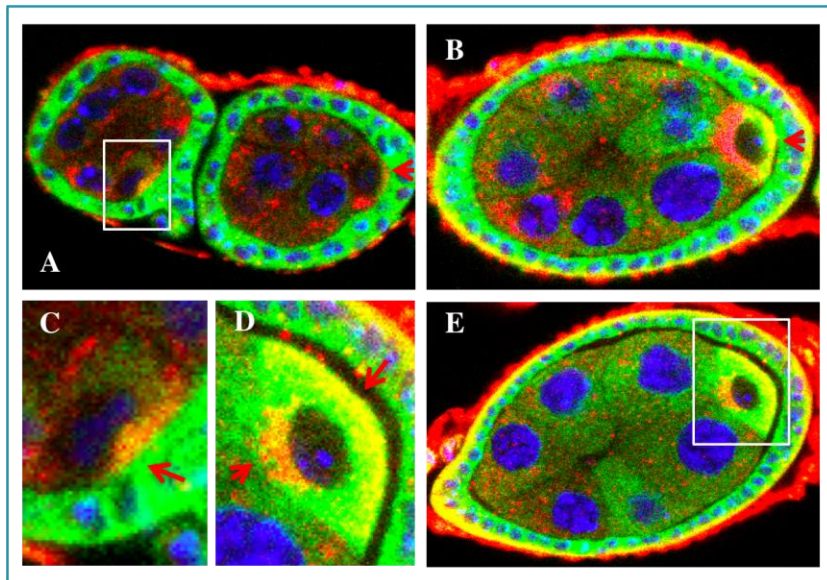


Figura 63. Immunolocalització de les proteïnes Tral (en vermell) i Lost (en verd) a ovaris Lost-GFP (salvatges). El DNA es troba marcat en blau. Les fletxes vermelles indiquen la co-localització d'ambdues proteïnes (visualitzada en groc). Els requadres blancs mostren la regió ampliada de la imatge. **A:** estadis 4 i 5 (d'esquerra a dreta); **B:** estadi 6; **C:** ampliació de l'oòcit de la imatge A; **D:** ampliació de l'oòcit de la imatge E; **E:** estadi 7-8.

A cèl·lules S2 les proteïnes Lost i Tral localitzen al citoplasma de manera difosa i hi formen petites inclusions

S'ha estudiat la localització de Lost i Tral a cèl·lules S2, tant de les seves proteïnes endògenes com de la proteïna recombinant transfectada Lost-GFP. Com es pot observar a la Figura 64, ambdues proteïnes presenten una distribució semblant: localitzen de manera uniforme per tot el citoplasma i formen algunes inclusions citoplasmàtiques. Aquesta localització a cèl·lules S2 s'havia observat ja per a la proteïna Tral a treballs anteriors (Eulalio A et al 2007; Tritschler F et al 2008) però no s'havia descrit encara per a Lost.

Els resultats presentats a la Figura 64 permeten observar que a cèl·lules S2 la proteïna Lost endògena presenta un patró de localització (no analitzat mai anteriorment) similar al de Tral. La immunolocalització de Tral que hem realitzat permet a més confirmar la immunolocalització ja publicada d'aquesta proteïna. Per últim, a la Figura 64 també s'hi observa que la proteïna recombinant Lost-GFP transfectada a cèl·lules S2 és funcional i localitza d'igual manera que la proteïna Lost endògena (i de forma similar també a Tral).

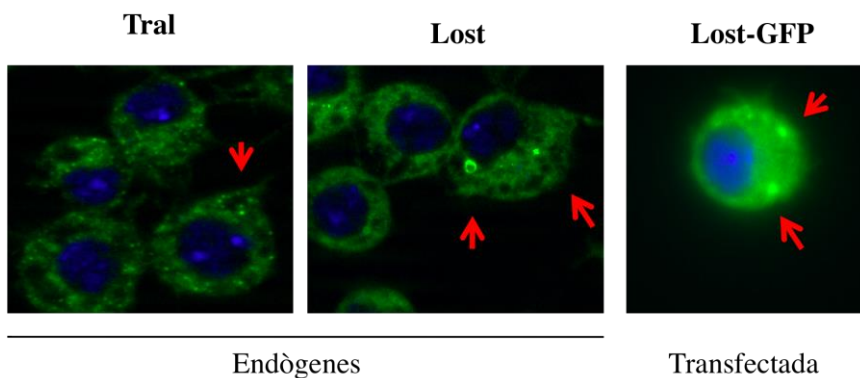


Figura 64. Localització de les proteïnes endògenes i recombinants de Tral i Lost a cèl·lules S2. El DNA es troba marcat en blau. A les dues primeres columnes d'immunodeteccions s'observa en verd la localització de les proteïnes endògenes Tral i Lost, respectivament. A la tercera columna s'observa *in vivo* una cèl·lula S2 estable *TART-RT-CTAP* transfectada amb la proteïna recombinant Lost-GFP i induïda 24 h amb 200 μ M de CuSO_4 . Les fletxes vermelles indiquen inclusions o punts intensos que formen les proteïnes al citoplasma.

De fet, la localització de la proteïna recombinant *TART Pol-GFP* transfectada a cèl·lules S2 és també citoplasmàtica, com pot observar-se a la Figura 65.

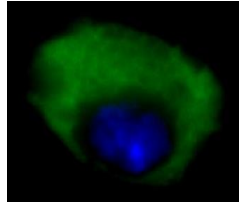


Figura 65. Cèl·lula S2 transfectada transitòriament amb el constructe *TART Pol-GFP* (en verd) i fixada. El DNA es troba tenyit amb DAPI (en blau).

Les proteïnes *TART Pol* i *Lost* co-localitzen a ovaris de *Drosophila melanogaster*

Per tal de cercar la possible co-localització de les proteïnes *TART Pol* i *Lost*, s'ha realitzat la immunodetecció de *TART Pol* a ovaris de la línia que expressa endògenament la proteïna *Lost* fusionada a la GFP (Figura 66). Ambdues proteïnes co-localitzen només en determinats punts dels primers estadis de desenvolupament: des del germari (Figura 66A) fins l'estadi 4 (Figura 66E). Concretament, la co-localització de *TART Pol* i *Lost* es dona a la regió perinuclear de les *nurse cells* i les cèl·lules fol·liculars (Figures 66D i 66E) i també en forma de petites inclusions o punts vora el nucli de les cèl·lules fol·liculars (Figures 66B i 66C).

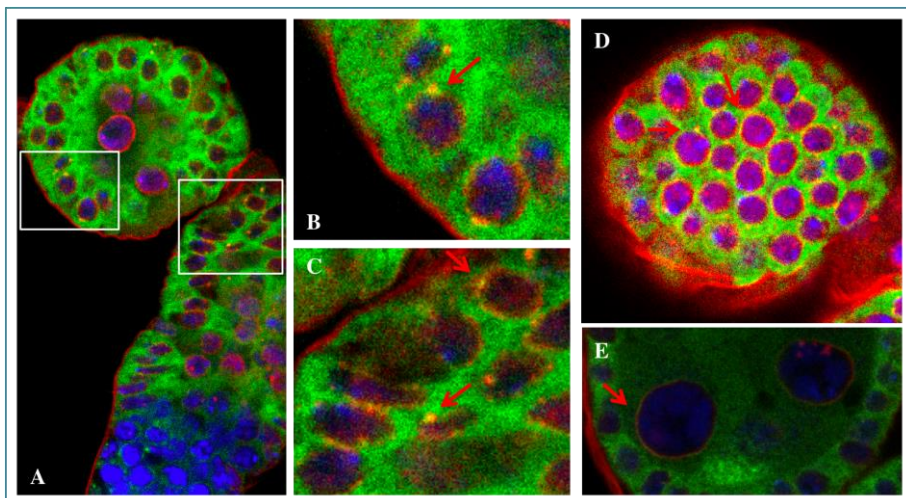


Figura 66. Immunolocalització de les proteïnes *TART Pol* (en vermell) i *Lost* (en verd) a ovaris *Lost-GFP* (salvatges). El DNA està marcat en blau. Les fletxes vermelles indiquen la co-localització (visualitzada en groc) d'ambdues proteïnes. Els requadres blancs delimiten les zones ampliades de la imatge. **A:** germari i estadis 1 i 2 (de dreta a esquerra, i de baix a dalt); **B:** ampliació de cèl·lules fol·liculars d'estadi 2 de la imatge A; **C:** ampliació de les cèl·lules fol·liculars i *nurse cells* d'estadi 1 de la imatge A; **D:** cèl·lules fol·liculars (*stack* o tall extern) d'estadi 2; **E:** *nurse cells* d'estadi 4.

La quantitat de proteïna *TART Pol* dins el nucli de *nurse cells* d'estadi 2-3 disminueix a ovaris mutants per a *Tral* i *Aubergine*

A continuació, s'ha analitzat la localització de la proteïna *TART Pol* a ovaris de diferents línies mutants: per a *lost* (*Lost*¹), *tral* (*Tral Hypomorphic*), i *aubergine* (*Aub*^{QC42}). Aquest últim gen està relacionat amb la via dels *piRNAs*, com s'ha explicat abans. S'ha estudiat també un mutant doble dels gens *lost* i *rumpelstiltskin* (*Lost*¹*Rump*¹), ja que s'ha demostrat que ambdues proteïnes col·laboren en un mateix complex i que els efectes fenotípics trobats en aquest mutant doble són en alguns casos més dramàtics que al mutant només de *lost* (Sinsimer KS et al 2011).

Tots els ovaris mutants analitzats tenen una localització de la proteïna *TART Pol* similar a la d'ovarís salvatges, no obstant, alguns dels punts que *TART Pol* forma dins el nucli de les *nurse cells* als primers estadis de desenvolupament presenten una intensitat de fluorescència menor a la salvatge. Per aquesta raó, s'han analitzat en detall els nivells de fluorescència dels punts intranuclears de *TART Pol* a les *nurse cells* d'estadi 2-3 mitjançant el software *ImageJ* (per a més informació sobre la metodologia emprada, veure l'apartat 3. *Materials i mètodes*). A la Figura 67 es pot observar una imatge que correspon a la intensitat màxima de fluorescència de *TART Pol* generada a partir de tots els *stacks* que conformen les *nurse cells* d'un ovari

salvatge obtinguts amb un microscopi confocal de fluorescència. Imatges com aquesta són les que s'han analitzat amb el *software ImageJ* per quantificar els valors d'intensitat de fluorescència dels punts intranuclears de *TART Pol* a les *nurse cells* d'estadi 2-3. Els resultats d'aquests experiments poden observar-se a la Figura 68.

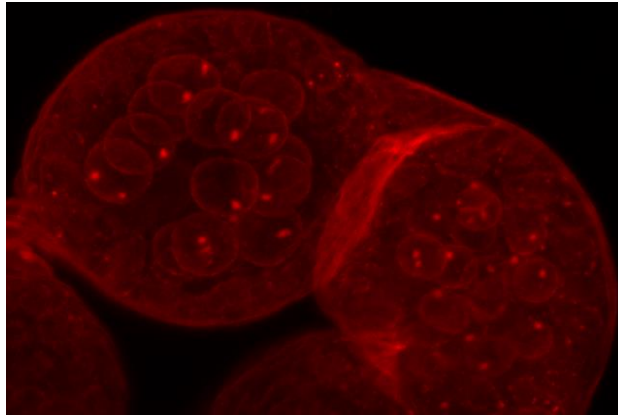


Figura 67. Immunolocalització de la proteïna *TART Pol* (en vermell) a ovaris *Lost-GFP* (salvatges). Imatge obtinguda després de projectar les intensitats màximes de fluorescència de tots els *stacks* o talls obtinguts amb un microscopi confocal de fluorescència de les *nurse cells* de cambres ovàriques d'estadi 2 (dreta) i 3-4 (esquerra).

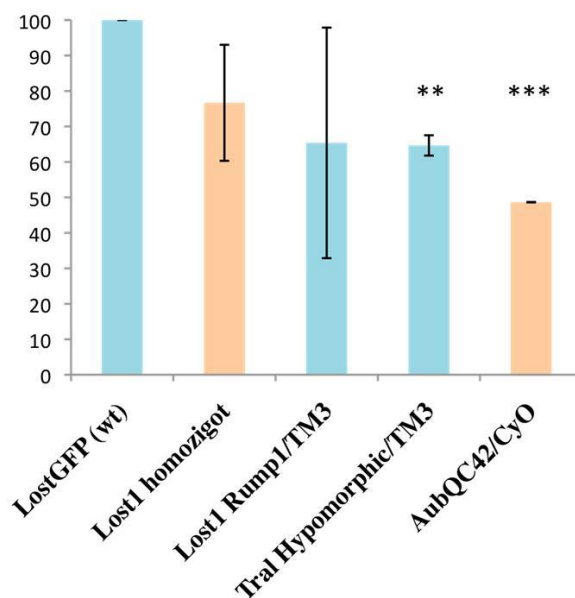


Figura 68. Percentatges dels valors de les mitjanes d'intensitat màxima de fluorescència (eix Y) dels punts formats per la proteïna *TART* Pol al nucli de *nurse cells* d'estadi 2-3 a ovaris mutants i salvatges (LostGFP).

Els valors d'intensitat màxima de fluorescència de la projecció de diversos talls obtinguts amb microscòpia confocal s'han analitzat mitjançant el software *ImageJ*. S'han analitzat un mínim de 140 punts de *TART* Pol de cada línia per a cada experiment. La mitjana s'ha obtingut a partir dels valors de dos experiments independents en els mutants amb barres de color taronja i de tres experiments independents en els de color blau. Els asteriscs indiquen diferències estadístiques significatives emprant el *t-test* (un asterisc, $P < 0.05$ a 0.01 ; dos asteriscs, $P < 0.01$ a 0.001 ; tres asteriscs, $P < 0.001$) de la intensitat màxima de senyal fluorescent de *TART* Pol per a cadascun dels mutants comparats amb la de línia salvatge (LostGFP).

Els resultats del mutant Lost¹Rump¹ presenten una desviació massa elevada com per poder extreure'n conclusions. No obstant, els resultats significatius de la Figura 68 indiquen una possible col·laboració entre la proteïna *TART* Pol i Tral, així com amb la via dels *piRNAs* (Aub). Aquests resultats suggereixen que Tral (i potser també indirectament Lost) podria estar implicada en el transport o localització de la proteïna *TART* Pol als ovaris durant els primers estadis de desenvolupament de *Drosophila melanogaster*, formant-hi possiblement un mateix complex proteic o RNP.

D'altra banda, les hibridacions *in situ* que hem realitzat als mutants de *lost* i *tral* ens indiquen que els RNAs de *HeT-A* i *TART*, tant *sense* com *antisense*, localitzen com a ovaris salvatges.

La proteïna *TART* Pol localitza anormalment als estadis 9 i 10 d'ovaris mutants per a *Tral* i *Lost-Rump*

A més a més del fenotip trobat a mutants de *tral* i d'*aubergine* (via dels piRNAs) a estadis primerencs de desenvolupament (estadis 2-3), s'ha estudiat també la localització de la proteïna *TART* Pol a estadis més avançats de desenvolupament d'ovaris mutants per a *lost* i *tral*. Per tal d'observar els efectes més extrems possibles de la mutació de *Lost* s'han emprat els ovaris mutants dobles de *lost* i *rump*: *Lost*¹*Rump*¹ (Sinsimer KS et al 2011).

Així, s'ha trobat una localització anormal de *TART* Pol a ovaris mutants *Lost*¹*Rump*¹ i *Tral* Hypomorphic, tal com es pot observar a la Figura 69.

A ovaris salvatges no pot detectar-se la proteïna *TART* Pol als estadis 9 i 10 de desenvolupament, amb l'excepció de les *border cells* (Figura 69; A-C).

En canvi, als mutants de *Tral* (Figura 69; D-G) i *Lost*¹*Rump*¹ (Figura 69; H-N) *TART* Pol pot detectar-se als estadis 9 i 10 en forma d'acumulacions al citoplasma de les *nurse cells* (Figures 69; E, G, I, K i M), o formant diversos punts dins el nucli de les *nurse cells* (Figura 69N). Aquestes deteccions recorden a les deslocalitzacions observades a les *nurse cells* d'ovaris mutants d'*aubergine* per a l'RNA *sense* de *HeT-A* i l'*antisense* de *TART* (Figures 45M-U; i 48J-O; respectivament) i per a la proteïna *HeT-A* Gag (Figura 34; K-T). Val a dir que aquest fenotip de localització anormal de *TART* Pol es troba més accentuat als mutants de *Lost*¹*Rump*¹ que als de *Tral* Hypomorphic.

Els resultats de la Figura 68 i la Figura 69 evidencien la relació de les proteïnes *Lost* i *Tral* en la RNP telomèrica, ja que la localització de *TART* Pol es veu afectada tant a ovaris mutants de *Lost* com de *Tral* (veure l'apartat 5. *Discussió*).

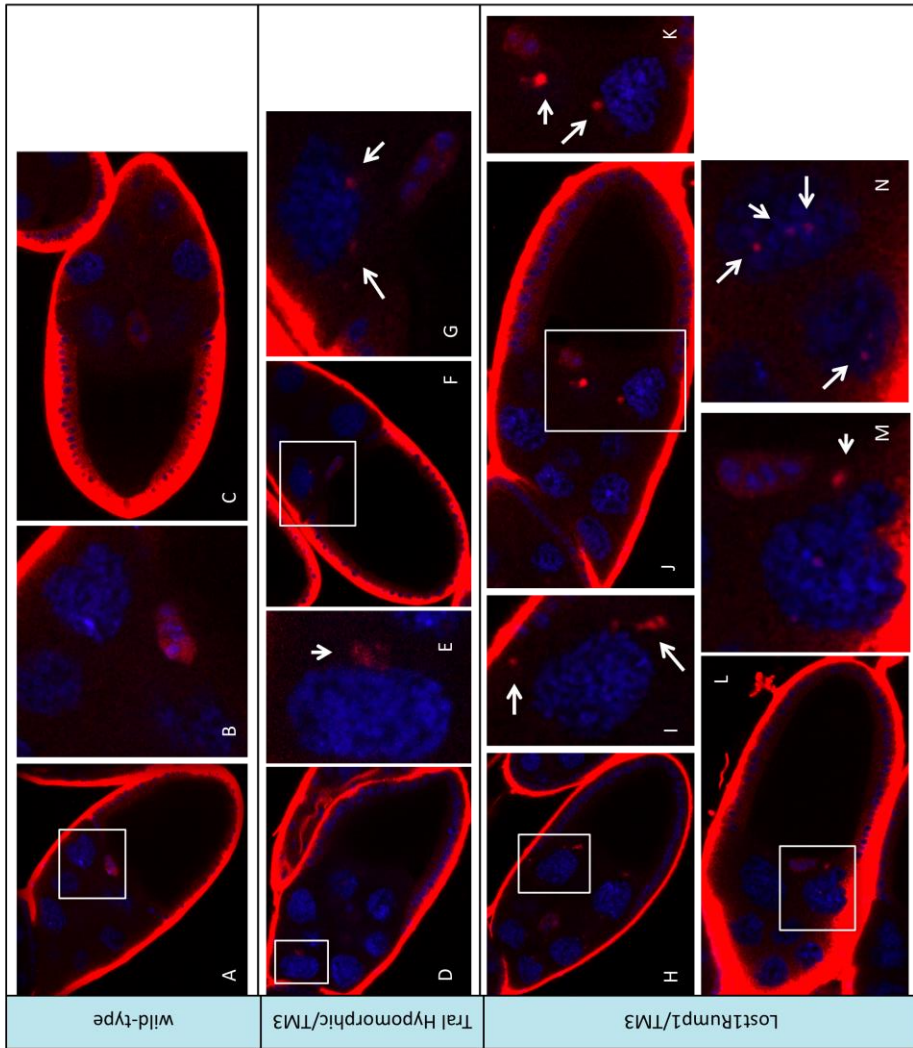


Figura 69. Localització de la proteïna *TART* Pol (en vermell) als estadis 9 i 10 d'ovaris salvatges i mutants per a *Trailer Hitch* i *Lost-Rump*. El DNA està marcat en blau. Els requadres blancs mostren les àrees ampliades de la imatge. Les fletxes blanques indiquen la deslocalització o localització “anormal” de *TART* Pol. **A:** Estadi 10 salvatge (*wild-type*); **B:** ampliació de les *border cells* de la imatge A; **C:** Estadi 9 salvatge (*wild-type*). **D:** Estadi 9 del mutant *Tral Hypomorphic*; **E:** ampliació d'una *nurse cell* de la imatge D; **F:** Estadi 10 del mutant *Tral Hypomorphic*; **G:** ampliació d'una *nurse cell* i les *border cells* de la imatge F. **H:** Estadi 9 temprà del mutant *Lost¹Rump¹*; **I:** ampliació d'una *nurse cell* de la imatge H. **J:** Estadi 9 tardà del mutant *Lost¹Rump¹*; **K:** ampliació d'una *nurse cell* (part inferior) i les *border cells* (part superior dreta) de la imatge J. **L:** Estadi 10 del mutant *Lost¹Rump¹*; **M:** ampliació d'una *nurse cell* i les *border cells* de la imatge L. **N:** ampliació de dues *nurse cells* d'estadi 10 del mutant *Lost¹Rump¹* (posterior cap a la dreta).

4.2.B.2. CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEÏNA NAP-1

Antecedents de la *Nucleosome Assembly Protein-1* (NAP-1)

A *Drosophila*, NAP-1 és una xaperona de nucleosomes capaç de fer de *shuttle* o transport de les histones H2A i H2B duent-les des del citoplasma (fase G₂ del cicle cel·lular) fins la maquinària d'assemblament de cromatina del nucli (fase S) (Ito T et al 1996). La quinasa CK2 (Casein Kinase 2) s'uneix a NAP-1 i la fosforila, essent aquest un possible mecanisme de translocació d'aquesta proteïna entre el citoplasma i el nucli (Li M et al 1999; Park YJ i Luger K 2006a).

NAP-1 presenta nombrosos homòlegs a eucariotes, alguns dels quals s'han relacionat amb diverses funcions cel·lulars com són el desplaçament de nucleosomes, la regulació de la transcripció o del cicle cel·lular, i la incorporació o intercanvi de variants d'histones (Park YJ i Luger K 2006b). L'estudi publicat per Rong YS 2008 mostra la interacció de la variant d'histona H2A.z amb NAP-1 a *Drosophila* i relaciona específicament aquesta variant d'histona amb el *capping* telomèric.

El treball presentat per Stephens GE et al 2006 demostra la interacció de Nap-1 amb HP2 (Su(var)2) i amb el complex remodelador de nucleosomes NURF, i relaciona la proteïna Nap-1 amb la formació de l'heterocromatina i el silenciament de gens (de manera similar a com ho fan HP1 i HP2). NURF (*Nucleosome Remodeling Factor*) és un complex format per quatre subunitats, entre elles l'ATPasa ISWI que desplaça els nucleosomes mitjançant la hidròlisi d'ATP per permetre la transcripció de la cromatina i que interacciona a més amb diversos factors de transcripció (Badenhorst P et al 2002).

A Del Rosario BC i Pemberton LF 2008, es vincula a llevat la reorganització de nucleosomes que duu a terme Nap-1 amb l'elongació de la transcripció; i

es mostra que Nap-1 interacciona amb Yra1 (una proteïna que forma part del complex de transcripció i exportació d'mRNAs anomenat TREX), essent aquest un possible mecanisme de reclutament de la histona de xaperones a gens transcripcionalment actius. D'altra banda, el treball presentat a Moshkin YM et al 2009 indica el paper de les xaperones d'histones NAP-1 i ASF1 en el silenciament dels gens regulats per NOTCH a *Drosophila*.

Per últim, un article recent mostra que Nap-1 té una funció important durant la mitosi, essent la responsable de la dissociació de la Cohesina i la resolució de les cromàtides germanes (Moshkin YM et al 2013). La Cohesina és un complex proteic que cohesiona les cromàtides germanes després de la replicació (quelcom vital perquè segreguin correctament els cromosomes durant la mitosi i la meiosi) fins l'inici de la mitosi, moment en què és fosforilada per quinases mitòtiques provocant així la seva dissociació dels cromosomes (primer dels braços i després del centròmer) i la resolució de les cromàtides germanes. Nap-1 s'uneix a la Cohesina a l'inici de la mitosi evitant que ho faci la fosfatasa PP2A (la unió de PP2A evitaria la fosforilació de la Cohesina i no permetria el seu alliberament dels cromosomes), mostrant doncs un paper antagonístic d'aquestes dues proteïnes (Moshkin YM et al 2013).

***HeT-A* Gag interacciona amb la proteïna Nap-1**

Primerament, hem confirmat la interacció bioquímica de les proteïnes Nap-1 i *HeT-A* Gag mitjançant una immunoprecipitació de les proteïnes endògenes a ovaris GIII de *Drosophila melanogaster* (Figura 70).

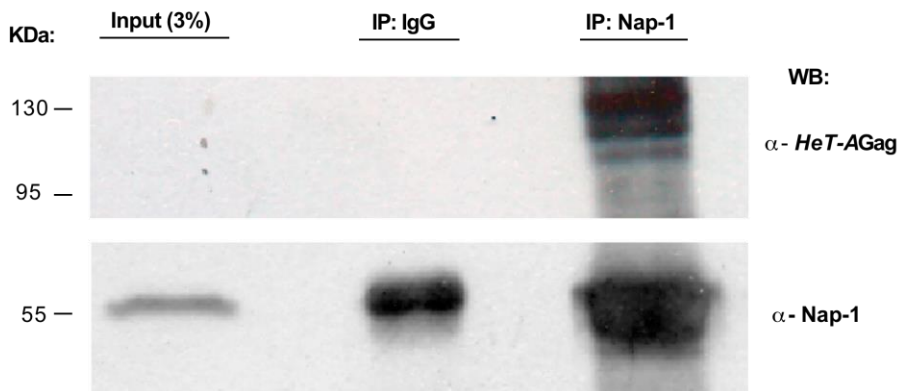


Figura 70. Immunoprecipitació de Nap-1 amb *HeT-A* Gag emprant ovaris GIII. Els pesos moleculars es troben indicats en kDa a l'esquerra dels panells. La primera columna correspon a l'extracte proteic inicial d'ovarís GIII (*Input*; representa el 3% del volum total d'extracte proteic). La segona columna és la IP control, realitzada amb un anticòs inespecífic (en aquest cas: anti-IgGs). La tercera columna és la IP amb l'anticòs anti-Nap-1 (la IP que mostra la interacció d'interès). La fila superior correspon al *western blot* revelat amb l'anticòs que reconeix la proteïna endògena *HeT-A* Gag, mentre que la inferior és la mateixa membrana revelada amb anti-Nap-1. La banda detectada a la segona columna del *western blot* inferior correspon a la cadena pesada de les IgGs, de 55 kDa (mida molt similar a la de Nap-1), que està sent reconeguda per l'anticòs secundari d'aquest *western blot*.

Anàlisi de les línies mutants per a *nap-1*

Per a l'estudi de Nap-1 n'hem emprat dues línies mutants diferents.

La primera línia mutant és un *knock-out* del gen *nap-1* anomenat Nap-1 K.O., de la qual n'hem analitzat femelles mutants homozigotes (veure l'apartat 3. *Materials i Mètodes*).

La segona línia és un mutant RNAi de *nap-1* que conté la seqüència UAS

(*Upstream Activation Sequence*), la qual activa l'expressió del transgen (en aquest cas: l'RNAi de *nap-1*) quan s'hi uneix la proteïna Gal4 (veure l'apartat 3. *Materials i Mètodes*). Aquesta línia s'ha creuat amb la línia *driver* Nanos-Gal4 que dirigeix l'expressió a ovaris. Creuant la línia mutant Nap-1 RNAi amb la línia *driver* Nanos se silencia l'expressió de *nap-1* (mitjançant el seu RNAi) únicament a ovaris. En aquest cas, hem analitzat els ovaris de femelles mutants dobles homozigotes de la segona generació de descendents d'aquest primer creuament.

Per comprovar la quantitat de proteïna Nap-1 endògena sintetitzada als ovaris mutants de *nap-1* hem dut a terme la tècnica de *western blot* a partir dels seus extractes proteics, com s'observa a la Figura 71.

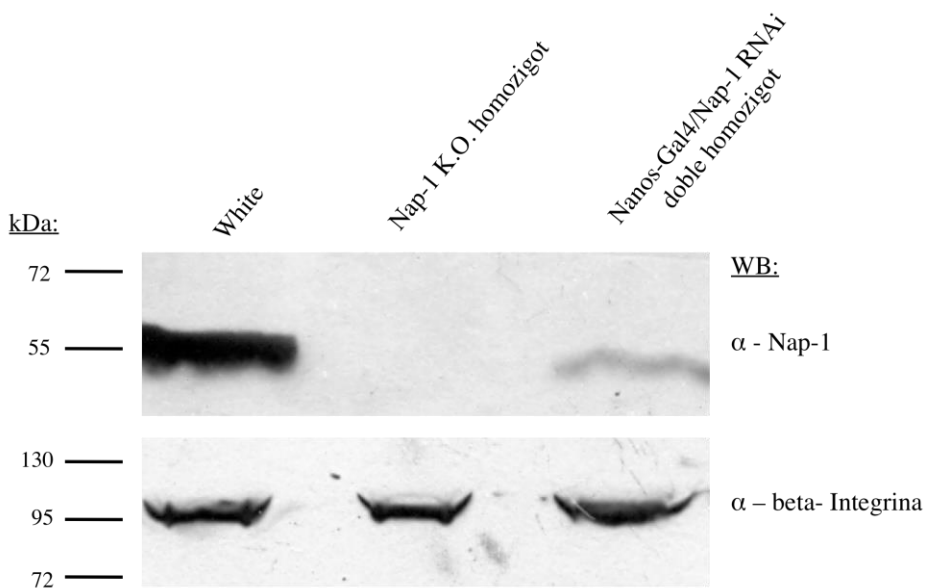


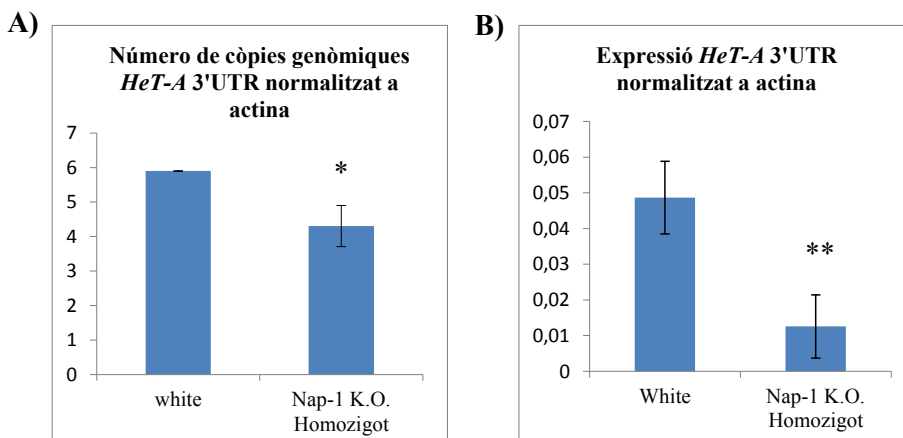
Figura 71. *Western blot* d'ovaris salvatges *white* (primera columna), d'ovaris mutants *Nap-1 K.O. homozygots* (segona columna), i de mutants *NanosGal4/Nap-1 RNAi* dobles homozigots (tercera columna). La imatge superior correspon al revelat amb l'anticòs anti-Nap-1. La imatge inferior és el mateix film revelat amb l'anticòs que reconeix la β -Integrina,

una proteïna constitutiva que ens permet comprovar que tots els carrils han estat carregats amb la mateixa quantitat d'extracte proteic. Els pesos moleculars es troben indicats en kDa a l'esquerra de cada panell.

Tal com s'observa a la Figura 71, el mutant Nap-1 K.O. homozigot no sintetitza la proteïna Nap-1, o si ho fa és a uns nivells tan baixos que no són detectables amb la tècnica de *western blot* (veure Lankenau S et al 2003 on s'observen resultats similars de "no-detecció" de Nap-1 en aquests mutants). En canvi, el mutant doble homozigot Nanos-Gal4/Nap-1 RNAi sí que en sintetitza una petita quantitat. Per aquesta raó, hem decidit emprar per als experiments posteriors d'anàlisi de l'expressió de *HeT-A* el mutant homozigot Nap-1 K.O.

La proteïna Nap-1 regula l'expressió de *HeT-A*

Per estudiar l'efecte de la mutació de la proteïna Nap-1, implicada en cromatina, en l'expressió del retrotransposó *HeT-A*, s'ha emprat la tècnica de la *Real-time PCR*. S'han analitzat possibles canvis d'expressió de *HeT-A* a ovaris mutants Nap-1 K.O homozigots (amb encebadors per al 3'UTR de *HeT-A*) respecte a ovaris salvatges (*white*) normalitzant-los a l'*actina* (gen constitutiu). Els resultats d'aquests experiments s'observen a la Figura 72.



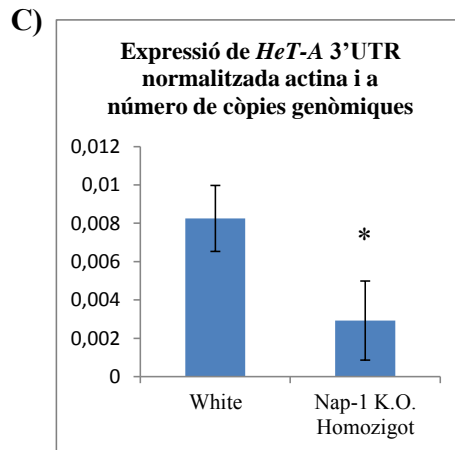


Figura 72. Anàlisi dels canvis d'expressió del 3'UTR de *HeT-A* a ovaris salvatges (*white*) i mutants homozigots Nap-1 K.O. A) Número de còpies genòmiques del 3'UTR de *HeT-A* normalitzat a número de còpies d'*actina*. Mitjana obtinguda a partir dels resultats de dos experiments independents de *Real-time PCR*. B) Expressió del 3'UTR de *HeT-A* normalitzada a *actina*. Mitjana de tres experiments independents de *Real-time PCR* amb extraccions d'RNA també independents. C) Expressió del 3'UTR de *HeT-A* normalitzada a *actina* i a número de còpies genòmiques. Mitjana de tres experiments independents de *Real-time PCR* amb extraccions d'RNA independents. Els asteriscs indiquen diferències estadístiques significatives emprant el *t-test* (un asterisc, $P < 0.05$ to 0.01 ; dos asteriscs, $P < 0.01$ a 0.001 ; tres asteriscs, $P < 0.001$) de *HeT-A* 3'UTR normalitzat a l'*actina* d'ovaris mutants Nap-1 K.O. homozigots respecte a ovaris salvatges (*white*).

A l'hora d'estudiar la regulació de l'expressió de *HeT-A* cal tenir en compte el número de còpies genòmiques inicials de cada línia (Figura 72A) per poder comparar els resultats dels mutants de *nap-1* amb els de *white* (salvatges). A més, és possible que el fet que l'expressió de *HeT-A* sigui menor als mutants de *nap-1* sigui responsable indirectament de que el seu número de còpies genòmiques sigui també inferior al salvatge, ja que els

trànscrits de *HeT-A* són els seus intermediaris de transposició.

En conjunt, aquests resultats indiquen que l'expressió del 3'UTR de *HeT-A* es veu disminuïda a la meitat a ovaris mutants per a *nap-1* respecte ovaris salvatges, demostrant que Nap-1 regula l'expressió del retrotransposó *HeT-A*. Per tant, Nap-1 és un regulador positiu de l'expressió de *HeT-A*.

Malformació del tòrax i l'ala esquerra a mutants RNAi de *nap-1*

A mosques adultes mutants RNAi de *nap-1* hem observat un fenotip aberrant similar al que presenten els mutants RNAi de *HeT-A*. Aquest fet indica la possible implicació d'ambdues proteïnes en una mateixa via (Figura 73). El fenotip aberrant, observat en ambdós casos a femelles de generació F2, suggereix una possible alteració del disc imaginal d'ala (veure l'*Annex 1*).

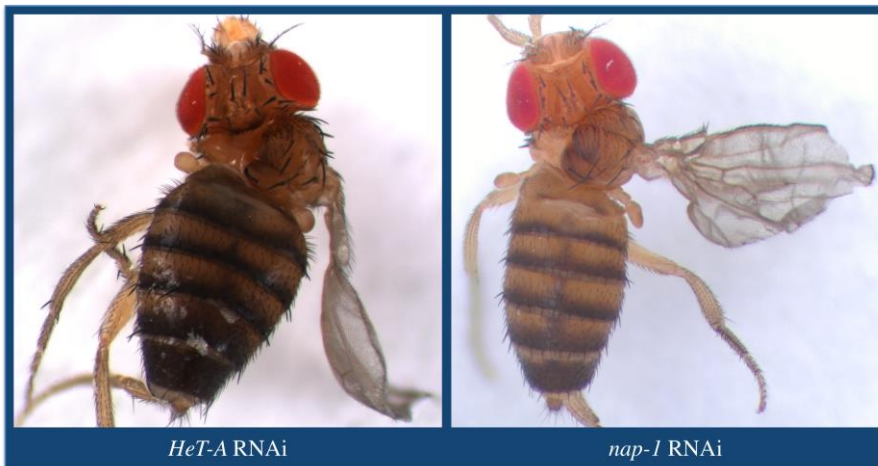


Figura 73. Mosques femella de generació F2 amb malformacions toràciques i absència de l'ala esquerra. La imatge de l'esquerra correspon al mutant 4-1 pWiz *HeT-A gag* RNAi/CyO; Maternal alpha-Tubulin Gal4/TM3 [l'1,32% de les mosques totals (mascles i femelles) d'aquesta generació presenten aquest fenotip; veure l'*Annex 1*]. A la imatge de la dreta

s'observa el mutant Nanos Gal4/CyO; Nap-1 RNAi/TM3 (el 0,7% de les mosques totals d'aquesta generació presenten aquest fenotip). S'han estudiat un mínim de 140 mosques totals d'aquesta generació per a cada línia mutant. Imatges obtingudes de projectar mitjançant el *software Combine Z4* diferents talls (*stacks*) realitzats amb una lupa de camp clar.

D'altra banda, les immunolocalitzacions de neuroblasts mutants Nap-1 K.O. homozigots així com dels mutants ScaGal4; Nap-1 RNAi no presenten cap clara diferència de localització de la proteïna *HeT-A* Gag respecte a neuroblasts salvatges.

La interferència de *nap-1* provoca fusions telomèriques a cèl·lules S2

S'ha estudiat l'efecte d'interferir a cèl·lules S2 l'mRNA de la proteïna Nap-1, així com el de *HeT-A* Gag, comparant-los amb els controls positiu i negatiu d'interferència. El control positiu de fusions telomèriques és Hoap (proteïna del *capping* telomèric de *Drosophila* codificada pel gen *caravaggio*), i el negatiu és *SART1* (retrotransposó telomèric no-LTR de *Bombyx mori*). Després d'afegir per difusió els dsRNAs de *HeT-A* gag i *nap-1* a cèl·lules S2, s'ha pogut observar la presència de fusions telomèriques a cromosomes metafàsics (Figura 74A).

S'han calculat també els valors dels percentatges de fusions per metafase de cadascuna de les interferències realitzades (Figura 74B). La presència de fusions telomèriques interferint a cèl·lules S2 tant el gen *nap-1* com *HeT-A* gag, i que tinguin lloc amb uns percentatges tan similars de fusions per metafase, suggereixen de nou la possibilitat que les proteïnes *HeT-A* Gag i Nap-1 estiguin formant part d'un mateix complex.

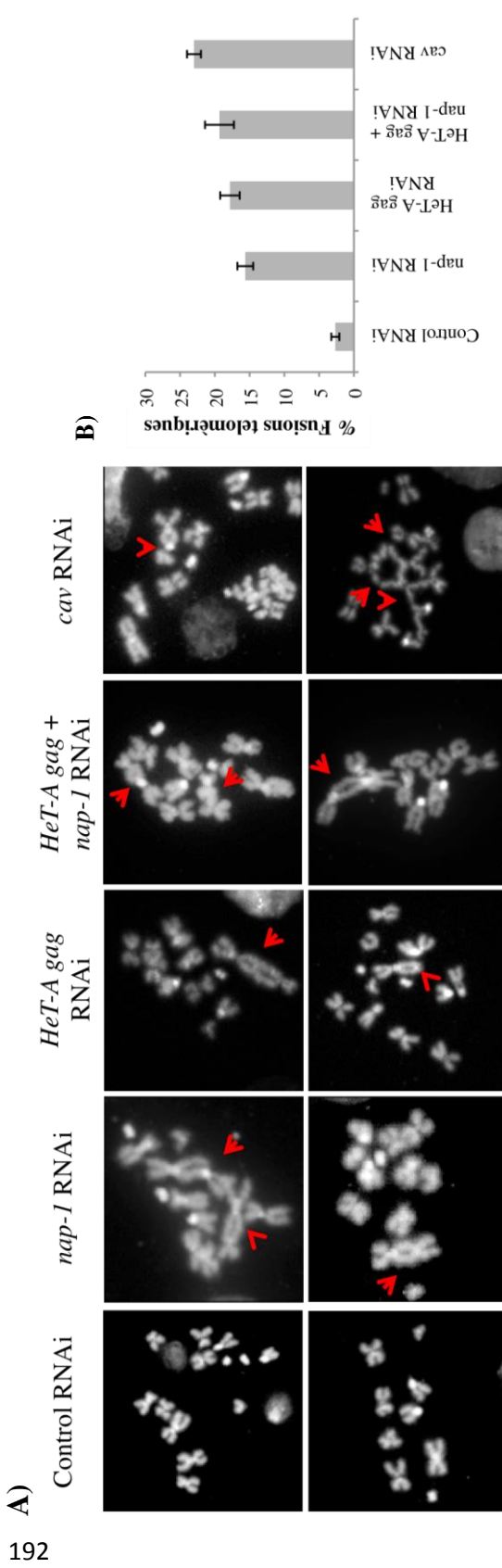


Figura 74. Efecte de la interferència de *nap-1* i *HeT-A gag* a cèl·lules S2. **A)** Cromosomes metafàsics de cèl·lules S2 tractades durant 48 h amb diferents dsRNAs per difusió. El DNA està teñit amb DAPI. Es presenten dues imatges de cada tipus d'interferència (en dues files). La primera columna correspon a cèl·lules S2 tractades amb el dsRNA de *SART1* (retrotransposó telomèric no-LTR de *Bombyx mori*), les quals són el control negatiu de fusions telomèriques ("Control RNAi"). Les columnes segona i tercera corresponen a la interferència amb el dsRNA, de *nap-1* i *HeT-A gag* per separat. La quarta columna presenta la interferència combinada dels dsRNAs de *nap-1* i *HeT-A gag* alhora. L'última columna mostra el control positiu de fusions telomèriques, obtingut d'interferir el gen *caravaggio* (*cav* codifica per a la proteïna de *capping telomèric* Hoap). **B)** Percentatge de fusions telomèriques que presenten els cromosomes metafàsics de les cèl·lules S2 tractades amb diferents dsRNAs per difusió: *SART1* (control negatiu), *nap-1*, *HeT-A gag*, *nap-1*+*HeT-A gag*, i *caravaggio* (quantificació dels resultats observats a l'A). S'han analitzat un mínim de 100 metafases de tres preparacions diferents per a cada interferència.

Cal destacar que el fet d'obtenir el mateix fenotip de fusions telomèriques en interferir l'mRNA del retrotransposó *HeT-A* i el de *nap-1* (Figura 74) i *Z4* (Figura 54), i que *HeT-A* Gag interaccioni amb les proteïnes Nap-1 (Figura 70) i *Z4* (Figura 51); i que *Z4* ho faci amb Jil-1 (Figura 53), recolza sòlidament la nostra hipòtesi de què *HeT-A* Gag podria estar realitzant el *targeting* telomèric gràcies a la RNP formada, entre d'altres, per les proteïnes *Z4*, Jil-1 i Nap-1.

En resum, després dels resultats obtinguts en l'estudi de la proteïna Nap-1, pot afirmar-se que aquesta proteïna està duent a terme dues funcions diferents. Per una banda, Nap-1 actuaria a nivell de la proteïna *HeT-A* Gag, interaccionant-hi directament, i possiblement ajudaria a la formació o al transport de la RNP del citoplasma fins al nucli i/o en el seu *targeting* als telòmers. I per una altra banda, Nap-1 actuaria també a nivell d'RNA fent de remodelador de la cromatina i regulant positivament l'expressió de *HeT-A* (de forma similar a *Z4* i Jil-1).

5. DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

A continuació es discuteixen els diferents resultats obtinguts durant la realització d'aquesta tesi (descrits a l'apartat anterior: 4. *Resultats*).

5.1. CARACTERITZACIÓ DE LES PROTEÏNES I ELS RNAS TELOMÈRICS DE *DROSOPHILA* A DIFERENTS TEIXITS CEL·LULARS

5.1.1. Caracterització de les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol

Els anticossos que hem generat al nostre laboratori reconeixen específicament les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol

Ja que no es disposava anteriorment d'anticossos que reconeguessin *HeT-A* Gag ni *TART-RT*, vam generar-ne anticossos específics a partir de pèptids d'aquestes proteïnes (veure l'apartat 3. *Materials i mètodes*) i vam comprovar la seva especificitat, detectant-ne les proteïnes endògenes i recombinants a diferents teixits de *Drosophila melanogaster* per *Western Blot* (Figura 32), i per immunolocalitzacions a diferents línies de *Drosophila* (Figures 33, 34 i 36). Aquesta especificitat en immunolocalitzacions s'evidencia comparant els resultats que s'observen a la línia salvatge, amb els de GIII (que sobreexpressa els retrotransposons telomèrics), i els de la línia mutant d'*aubergine* (que té desreprimida l'expressió de *HeT-A* i *TART*) (Figures 34 i 36). Mai abans s'havien pogut detectar amb anticossos específics les proteïnes endògenes dels telòmers de *Drosophila*. Val a dir però que recentment s'ha publicat un article en el qual s'empra un anticòs generat a *guinea pig* que reconeix específicament *HeT-A* Gag, i que ha estat obtingut pel propi laboratori que ha realitzat l'estudi (Zhang L et al 2014).

Hem dut a terme immunolocalitzacions de les proteïnes telomèriques endògenes a teixits de *Drosophila* que repliquen els telòmers. Concretament, hem observat la localització diferencial d'aquestes proteïnes a neuroblasts de cervells de larva, i a ovaris i embrions de la línia germinal adulta per intentar entendre millor com es dona el cicle de vida telomèric de *Drosophila melanogaster*. Als apartats següents es descriu i discuteix cadascuna de les localitzacions observades en aquests teixits.

Durant el cicle de vida telomèric de *Drosophila* podria formar-se una RNP esfèrica composta per diferents proteïnes i RNAs telomèrics

Hem realitzat immunoprecipitacions entre les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART*-RT, així com entre les Gags de *HeT-A* i *TART*, les quals podrien estar formant part de la hipotètica RNP telomèrica (Figures 43 i 44). Les interaccions observades suggereixen la formació d'un complex proteic compost com a mínim per les tres proteïnes telomèriques principals de *Drosophila*, tal i com s'havia hipotetitzat ja anteriorment (Rashkova S et al 2002b; Pardue ML et al 2005). De fet s'ha descrit recentment a neuroblasts la formació d'esferes compostes per *HeT-A* Gag, les quals contenen al seu interior l'mRNA de *HeT-A* i localitzen als telòmers (Zhang L et al 2014). A més, en aquest article no descarten la possibilitat que aquestes esferes continguin al seu interior altres trànscrips dels retrotransposons telomèrics. Probablement, l'esfera protegiria i ajudaria a transportar els trànscrips telomèrics dins la cèl·lula. Per tant, s'estaria formant una RNP de forma esfèrica composta per la Gag de *HeT-A* (Zhang L et al 2014), juntament amb la Gag de *TART* i la Transcriptasa Reversa de *TART* (Figures 43 i 44), així com l'mRNA de *HeT-A* al seu interior (Zhang L et al 2014). A més, és molt possible que els trànscrips de *TART* localitzin també dins d'aquesta esfera i

emprin el mateix mecanisme per assolir amb èxit el *targeting* telomèric i ser retrotranscrits.

***HeT-A* Gag i *TART* Pol co-localitzen a cèl·lules mitòtiques que repliquen els telòmers**

A ovaris salvatges, les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol comparteixen localització dins el nucli de les *nurse cells* des dels primers estadis de l'oogènesi fins l'estadi 4, i al citoplasma de les cèl·lules fol·liculars vora la membrana nuclear fins l'estadi 5 (Figures 34A-34E; i 36A-36E).

Les *nurse cells* duen a terme endoreplicacions al llarg de tota l'oogènesi; i és precisament a partir de l'estadi 6 de desenvolupament quan les cèl·lules fol·liculars passen de realitzar mitosis a fer endoreplicacions (Lee HO et al 2009). A més, en les immunolocalitzacions que hem realitzat a glàndules salivals (un altre teixit endoreplicatiu) no hem pogut detectar-hi les proteïnes *HeT-A* Gag ni *TART* Pol (imatges no mostrades), però en canvi sí que hem pogut detectar-les a neuroblasts (cèl·lules mitòtiques) (Figura 38).

Les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol co-localitzen al nucli de neuroblasts salvatges i GIII en forma de punts (Figura 38), no obstant el marcatge és molt més intens a GIII ja que aquesta línia presenta uns nivells de proteïna *HeT-A* Gag majors als salvatges. De fet, aquesta mateixa localització ha estat publicada recentment (només per a *HeT-A* Gag) a Zhang L et al 2014.

Tots aquests resultats indiquen doncs una possible relació entre la mitosi cel·lular i la co-localització de les proteïnes telomèriques (absent en endoreplicacions). Precisament, durant les endoreplicacions no s'escurcen els telòmers, i pot pensar-se que probablement per aquesta raó no sigui necessària la replicació telomèrica a cèl·lules endoreplicatives. Així, la presència de *HeT-A* Gag i *TART* Pol a les *nurse cells* (als primers estadis de desenvolupament) suggereix que aquestes proteïnes podrien estar realitzant

una funció diferent a la d'elongar els telòmers. En aquest context, s'han descrit ja anteriorment funcions no-telomèriques que realitzen els components telomèrics d'altres organismes, com per exemple actuar com a factors de transcripció de gens no telomèrics (Li Y i Tergaonkar V 2014; Ye J et al 2014).

Al nucli de les *nurse cells* TART Pol no localitza als telòmers

La co-immunolocalització de les proteïnes dels retrotransposons *HeT-A* i *TART* amb la proteïna endògena de *capping* telomèric Hoap fusionada a la GFP permet observar si aquestes localitzen als telòmers. Per tant, per saber si les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol que detectem als primers estadis de desenvolupament dins el nucli de les *nurse cells* estan localitzant als telòmers, hem realitzat aquestes co-immunolocalitzacions a ovaris. Els resultats que observem indiquen que *TART* Pol no localitza als telòmers (Figures 37I-37N). Així doncs, es pot suggerir que la proteïna *TART* Pol que forma un únic punt intranuclear a les *nurse cells* als estadis 2-3 i diversos punts a l'estadi 4 (visualitzat a vegades com una línia per la proximitat que presenten els punts) està realitzant una funció diferent de la telomèrica, com s'ha suggerit ja abans.

En canvi, sí que s'observa co-localització de *HeT-A* Gag amb Hoap en forma de petits punts vora la membrana nuclear tant de les *nurse cells* com de les cèl·lules fol·liculars (Figura 35). Això indica, tal com hem observat ja anteriorment al nostre laboratori a cèl·lules S2 i com s'ha publicat també a Rashkova S et al 2002b i a Zhang L et al 2014, que la proteïna Gag de *HeT-A* es situa vora la membrana nuclear quan localitza als telòmers. Aquesta localització concorda de fet amb l'observada en altres espècies. S'ha demostrat a altres organismes que la Lamina juga un paper important en l'ancoratge dels telòmers a la membrana nuclear (Gruenbaum Y et al 2005). A més, a ratolí s'ha vist que la proteïna HP1 (implicada en el *capping*

telomèric) interacciona amb la Lamina, així com amb el seu receptor i l'embolcall nuclear (Lomberk G et al 2006). No obstant, la major part de la proteïna *HeT-A* Gag que s'observa dins el nucli de les *nurse cells* localitza fora els telòmers (Figura 35). Això, juntament amb el fet que *TART* Pol no comparteixi amb *HeT-A* Gag la mateixa localització dins les *nurse cells*, suggereix de nou la possibilitat que la funció d'ambdues proteïnes al nucli d'aquestes cèl·lules endoreplicatives no sigui telomèrica. Una altra opció seria també que aquestes proteïnes no estiguin duent a terme cap funció concreta en aquestes cèl·lules germinals sinó que, simplement, hi localitzin pel fet de no trobar-s'hi regulades.

***TART* Pol localitza parcialment a l'estructura perinuclear *nuage* i s'acumula dins el nucli de les *nurse cells* formant-hi un únic punt a l'estadi 2-3**

Els experiments d'immunolocalització de *TART* Pol a ovaris salvatges que expressen les proteïnes endògenes de la via dels piRNAs que localitzen al *nuage* (Vasa i Aubergine) fusionades a la GFP, han permès observar que *TART* Pol co-localitza amb elles de forma parcial (Figura 37A-37H). És a dir, a l'estadi 2-3 d'ovarí salvatge una part de les proteïnes *TART* Pol que envolten el nucli de les *nurse cells* es troben a l'estructura *nuage*. Aquest resultat presenta l'opció que una part de la Transcriptasa Reversa de *TART* (la qual és imprescindible per a la transposició i elongació telomèrica de *Drosophila*) estigui sent retinguda dins del *nuage* per, possiblement, evitar la transposició de *HeT-A* i *TART* als telòmers. És probable que el silenciament dels retrotransposons telomèrics no es doni únicament a nivell post-transcripcional sinó que sigui també a nivell post-traduccional. La proteïna *TART* Pol quedaria retinguda dins del *nuage* per ser posteriorment degradada o per "emmagatzemar-la" i poder-la emprar més endavant en el desenvolupament quan fos necessària. És possible que *TART* Pol localitzi perinuclearment no només al *nuage*, sinó també en altres estructures que

localitzin a la perifèria del nucli i que estiguin participant també en processos de silenciament, emmagatzemament i/o protecció de proteïnes. De fet, la localització en forma d'anella contínua i ben definida envoltant el nucli de les *nurse cells* durant els primers estadis de desenvolupament que presenta *TART* Pol és similar a la que presenta la nucleoporina (*nup154*), un dels principals components del porus nuclear (Grimaldi MR et al 2007). Si s'observen en detall les imatges obtingudes, pot contemplar-se fins i tot la possibilitat que la localització de *TART* Pol sigui en alguns casos dins el nucli, paral·lela i molt propera a la membrana nuclear, indicant de nou que part d'aquesta proteïna estaria localitzant fora del *nuage*. Precisament, a l'estadi 2-3 és també quan la Transcriptasa reversa de *TART* s'acumula dins el nucli de les *nurse cells* com un únic punt que no correspon als telòmers (com s'ha comentat abans). Ja que aquests punts intranuclears de *TART* Pol coincideixen en el temps (estadis de desenvolupament comuns) amb la presència parcial d'aquesta mateixa proteïna a l'estructura perinuclear *nuage*, pot hipotetitzar-se que la retenció de la RT de *TART* dins el nucli té també l'objectiu de "silenciar-la" o "bloquejar-la". En aquest cas, es trobaria retinguda en un únic punt o compartiment diferent al del *nuage*, però possiblement relacionat també amb silenciament d'elements mòbils. De fet, els resultats de quantificació de fluorescència d'aquests punts intranuclears a mutants d'*aubergine*, mostren que aquests mutants presenten una menor intensitat de proteïna *TART* Pol que a ovaris salvatges (Figura 68), relacionant així aquesta acumulació intranuclear amb la via dels piRNAs i la repressió dels transposons telomèrics. En aquesta mateixa línia, a l'article de Chambeyron S et al 2008 van detectar trànscrips de transposons silenciats concentrats en punts concrets dins el nucli de *nurse cells*, i van suggerir la possibilitat que es tractés d'una estructura intranuclear de silenciament de transposons. Tot i tractar-se de trànscrips en el cas publicat, i d'una proteïna en el nostre cas, podríem hipotetitzar que l'estructura intranuclear de silenciament descrita per Chambeyron S et al 2008 fos una estructura

intranuclear especialitzada en repressió d'elements mòbils, on hi localitzessin tant trànscrips com proteïnes o RNPs senceres que han de ser silenciades. De ser així, *TART* Pol hi podria ser protegida o retinguda perquè no poguessin realitzar-se noves transposicions telomèriques, essent aquest un altre possible mecanisme de silenciament de *HeT-A* i *TART*. De fet, un altre article recent descriu també la presència d'un centre de processament primari de trànscrips llargs provinents de múltiples clústers de piRNAs dins el nucli de cèl·lules fol·liculars (Dennis C et al 2013). Aquesta estructura intranuclear única s'ha anomenat *Dot COM* i es troba sovint juxtaposada amb els *Yb-bodies* citoplasmàtics. Tot i tractar-se d'una estructura exclusiva de les cèl·lules fol·liculars i haver-s'hi detectat trànscrips precursors de la via dels piRNAs enlloc de proteïnes (com és *TART* Pol), presenta una similitud força interessant amb els resultats que hem obtingut.

***HeT-A* Gag es sintetitza en grans quantitats a les cèl·lules fol·liculars mitòtiques d'ovaris GIII, i *TART* Pol es detecta a mutants GIII i d'*aubergine* a estadis posteriors als salvatges**

Les principals diferències de localització a ovaris GIII respecte salvatges són: que *HeT-A* Gag presenta un marcatge molt més intens a les cèl·lules fol·liculars durant els primers estadis de desenvolupament i fins l'estadi 6 (Figura 34; F-J), i que es pot detectar la proteïna *TART* Pol dins el nucli de les *nurse cells* a estadis posteriors als quals es detecta a ovaris salvatges (després de l'estadi 5, Figura 36; G-K). La línia GIII disposa de telòmers més llargs, amb major número de còpies genòmiques i nivells d'expressió i quantitat de proteïna dels retrotransposons telomèrics més elevats que la línia salvatge (Siriaco GM et al 2002; Piñeyro D et al 2011). Així doncs, aquesta pot ser la raó per la qual observem un increment del marcatge de *HeT-A* Gag en aquests mutants.

D'altra banda, a mutants transheterozigots d'*aubergine* la diferència de localització de *HeT-A* Gag respecte a ovaris salvatges és que es troba present a partir de l'estadi 4-5 dins l'oòcit i a les *nurse cells* en forma de punts dins el nucli o d'acumulacions aberrants al citoplasma (Figura 34; K-T). No obstant, el marcatge de *TART* Pol als mutants d'*aubergine* (Figura 36; L-P), és semblant al de GIII.

El mutant d'*aubergine* permet observar on localitzarien aquestes proteïnes en el cas de no donar-se el silenciament dels transposons telomèrics per part de la via dels piRNAs. De fet, treballs anteriors van detectar ja la presència dels trànscrips de *HeT-A* a l'oòcit de mutants de *piwi* (Shpiz S et al 2007). És més, l'article recent Zhang L et al 2014 mostra la localització de la proteïna *HeT-A* Gag a ovaris mutants de la via dels piRNAs *SpE*: localitza a l'oòcit i la zona perinuclear de les *nurse cells* a estadis intermitjos, i al germari forma punts als cistoblasts en desenvolupament. Als nostres resultats amb mutants transheterozigots d'*aubergine* observem igualment aquesta clara localització de *HeT-A* Gag a l'oòcit (Figura 34; M, N, P i S). N'hem trobat localització també als cistoblasts del germari, tot i que no hi observem cap intensitat notablement més elevada que a la resta del germari. A més, tot i que no apreciem que *HeT-A* Gag localitzi de forma especialment marcada ni definida al voltant del nucli de les *nurse cells*, sí que en alguns casos en trobem incursions al citoplasma, vora el nucli, però en estadis una mica més tardans als publicats per Zhang L et al 2014. Una possible explicació per les lleugeres diferències de localització de la proteïna *HeT-A* Gag dels nostres resultats respecte als publicats és que els experiments que hem realitzat nosaltres els hem dut a terme amb ovaris mutants transheterozigots d'*aubergine*, mentre que a Zhang L et al 2014 han emprat mutants homozigots d'*Spn-E*. Podria ser doncs que la causa d'aquestes diferències de localització fos el fons genètic de les línies analitzades. D'altra banda, els anticossos emprats no són tampoc els mateixos, cadascun d'ells ha estat generat a laboratoris diferents i amb animals immunitzats diferents i, tot i

que ambdós reconeixen la Gag de *HeT-A*, és possible que no ho facin amb la mateixa eficàcia.

En conjunt, observant els resultats de localització de *TART* Pol discutits abans, podem deduir que quan *HeT-A* i *TART* incrementen la seva expressió (com passa a GIII i al mutant d'*aubergine*) la Pol de *TART* es troba present després de l'estadi 4 dins el nucli de les *nurse cells*. Aquesta localització diferent respecte a ovaris salvatges no és específica del silenciament per piRNAs ja que l'observem als dos mutants analitzats. Així doncs, els punts que forma la proteïna *TART* Pol després de l'estadi 4 dins el nucli de les *nurse cells* als mutants que hem estudiat podrien estar implicats en elongació-transposició telomèrica. No obstant, també podrien estar duent a terme alguna funció alternativa a la telomèrica tot i estar-hi indirectament lligada, ja que només podria realitzar-se quan els retrotransposons telomèrics es trobessin sobreexpressats.

Les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol podrien heretar-se per via materna

Des dels primers estadis de desenvolupament som capaços de detectar les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol a ovaris salvatges (Figures 34A i 36A), però en canvi no hi observem els trànscrips de *HeT-A* i *TART* (Figures 45, 46, 47 i 48). Aquest fet suggereix que les proteïnes telomèriques no es tradueixen *de novo* a l'ovari sinó que probablement s'hereten de la mare. Aquesta hipòtesi es veu reforçada pels resultats que hem obtingut a les immunodeteccions d'embrions on s'observa que *HeT-A* Gag i *TART* Pol localitzen a les *pole cells* (Figures 39J, 39O i 39Q; i Figures 41F, 41H i 41J). Les *pole cells* són les cèl·lules progenitores de la línia germinal de l'adult (Dansereau DA i Lasko P 2008), per tant, el fet de detectar-hi les proteïnes telomèriques és de vital importància perquè mostra el seu pas a la següent generació i corrobora la possible herència materna de *HeT-A* Gag i *TART*

Pol. Aquesta herència és quelcom imprescindible per a la supervivència de la mosca que s'està formant ja que perpetua el sistema de manteniment telomèric de *Drosophila* a les futures generacions. Aquesta és la primera vegada que s'observa la transmissió per via materna de les proteïnes telomèriques a la següent generació. A més, el fet que s'hagi trobat que la proteïna Lost, la qual hem identificat a les purificacions de complexos proteics de *HeT-A* Gag i *TART-RT* (Taula 5), localitza a les *pole cells* i que s'hagi suggerit que la proteïna Rump podria reclutar Lost als RNPs que contenen trànscrips que han de localitzar posteriorment als estadis tardans de l'oogènesi (com *nanos*) (Sinsimer KS et al 2011), presenta la possibilitat que la RNP telomèrica passi a les *pole cells* (Figures 39 i 41) associant-se a la proteïna Lost. Tot i que no ha estat possible detectar cap localització clara dels trànscrips telomèrics a embrió a conseqüència de l'alt soroll de fons d'aquest teixit i probablement també de les limitacions de la pròpia metodologia emprada (imatges no mostrades), desconeixem si a les *pole cells* hi localitzen també els trànscrips de *HeT-A* i *TART* (els quals podrien servir-se de la interacció de Lost amb *HeT-A* Gag i *TART* Pol per entrar a les *pole cells* dins de la RNP telomèrica). Alguns retrotransposons entren estratègies diverses per localitzar correctament durant el desenvolupament de *Drosophila*, com per exemple el retroelement *I factor*. Els trànscrips d'aquest retrotransposó competeixen amb l'mRNA de *gurken* per la maquinària encarregada del seu transport i localització a l'embrió temprà (Van de Bor V et al 2005).

En conjunt, els resultats de les immunolocalitzacions realitzades a diferents estadis embrionaris mostren la presència d'ambdues proteïnes telomèriques formant nombrosos punts tant als nuclis de les cèl·lules en divisió (perifèriques i centrals) com en determinades regions citoplasmàtiques i espais/estructures internes. A més, la distribució de *HeT-A* Gag i *TART* Pol a embrions salvatges (Figures 39 i 41) és força similar a la dels mutants d'*aubergine* (Figures 40 i 42).

El tipus de localització en forma de punts o petites acumulacions que presenta *HeT-A* Gag (més difosa i sense acumulacions clares en el cas de *TART* Pol) és sorprenentment semblant a la que s'observa per als agregats d'actina dels microfilaments subcorticals a embrions temprans (previs a la blastoderma) mitjançant tincions amb fal·loïdina (Riparbelli MG et al 2007). El fet que *HeT-A* Gag localitzi amb un patró similar al que presenta l'actina a l'embrió, i que a més haguem obtingut l'actina com una de les proteïnes identificades en la purificació de complexes proteics (tot i haver-la descartat per trobar-se present també en el control negatiu), és quelcom interessant. En aquest cas podríem fer la hipòtesi que *HeT-A* Gag interaccionés amb els microfilaments per poder entrar dins els nuclis que comencen a dividir-se a l'embrió temprà i dur a terme l'elongació telomèrica. La distribució dels microfilaments depèn de la fase mitòtica en què es troben els nuclis, estant estretament associats al fus mitòtic dels microtúbuls (Riparbelli MG et al 2007). En aquest sentit és interessant també que haguem identificat les alfa- i beta-tubulines a les purificacions de complexes proteics realitzades per a *HeT-A* Gag i *TART-RT* (Taula 5). No obstant, la proteïna *HeT-A* Gag només localitza dins el nucli a cèl·lules en interfase, per tant durant la mitosi no entraria al nucli, sinó que ho faria a la fase S del cicle cel·lular (com es discutirà més endavant).

Concretament, la localització més diferencial a embrió de la proteïna *TART* Pol respecte *HeT-A* Gag és la seva distribució a la fase de blastoderma cel·lular (2,5h): concentrada a la perifèria de l'embrió, a la regió compresa entre els nuclis perifèrics en divisió i l'embrió pròpiament dit. Aquesta distribució tan característica de *TART* Pol recorda a la trobada en immunolocalitzacions de la Miosina II no muscular durant la cel·lularització de la blastoderma sincicial o cel·lular, quan s'han format ja les *pole cells*, a embrions de *Drosophila* (Royou A et al 2004). La Miosina II és reclutada al còrtex a l'inici de la mitosi, fet que sembla ser decisiu perquè la cèl·lula passi de tenir forma columnar a esfèrica per poder realitzar la mitosi i

citocinesi, i és la responsable, juntament amb l'actina, de formar l'anell contràctil que permet el tancament-estretament basal de la membrana cel·lular durant la citocinesi (Royou A et al 2004). Precisament, aquesta acumulació de la Miosina II al solc que s'invagina durant la primera cel·lularització embrionària és molt similar a la trobada per a *TART* Pol, suggerint una possible relació entre aquestes dues proteïnes i connectant-les també amb l'actina i *HeT-A* Gag. Es pot conjecturar doncs que la Transcriptasa Reversa de *TART* entrés dins les cèl·lules de l'embrió gràcies a la cel·lularització, el primer moment en què cada cèl·lula té el seu propi citoplasma separat del de les altres. De fet, al transfectar *TART* Pol-GFP a cèl·lules S2 (línia cel·lular de *Drosophila* d'origen embrionari) observem que localitza exclusivament al citoplasma (Figura 65). És potser per aquesta raó, per la seva funció a nivell citoplasmàtic, que pugui trobar-se vinculada a la cel·lularització de l'embrió.

En resum doncs, a embrió la proteïna *HeT-A* Gag sembla associar-se als microfilaments i/o microtúbuls, i *TART* Pol a la Miosina II (tot i relacionar-se també de forma indirecta a l'actina). Ambdós casos mostren una relació directa a embrió entre les proteïnes telomèriques de *Drosophila* i la mitosi/citocinesi, quelcom raonable tenint en compte la seva implicació en l'elongació telomèrica, tan important durant les divisions cel·lulars actives d'aquest teixit.

Per últim, la localització tan peculiar que presenta *TART* Pol a l'embrió temprà en forma seccionada, és a dir, envoltant estructures circulars no definides a l'interior de les quals no localitza (Figura 41D), recorda a la trobada a les "vacuoles aparents" descrites en tincions d'actina d'embrions abans de completar la migració nuclear (Karr TL i Alberts BM 1986). De nou trobem en aquests primers estadis embrionaris la relació entre les proteïnes telomèriques i l'actina. *HeT-A* Gag sembla localitzar en algun cas dins d'aquestes mateixes vacuoles formant-hi acumulacions (Figura 39E),

mentre que *TART* Pol s'acumula sempre a la seva perifèria (Figura 41D). No obstant, la funció d'aquestes estructures sembla ser encara del tot desconeguda.

5.1.2. Caracterització dels trànscrips de *HeT-A* i *TART*

Anteriorment es creia que no podien detectar-se els trànscrips telomèrics de *Drosophila* en un fons salvatge perquè el silenciament dels retrotransposons *HeT-A* i *TART* era total (o pràcticament), i els experiments previs d'hibridacions *in situ* convencionals que se n'havia realitzat no eren capaços de detectar-ne cap senyal (Shpiz S et al 2007). No obstant, sí que havia estat possible detectar l'mRNA de *HeT-A* mitjançant *Northern blot* d'RNA d'ovaris salvatges (George JA i Pardue M-L 2003). A més, també havíem pogut detectar recentment al nostre laboratori mitjançant RT-PCR els trànscrips de *HeT-A* a ovaris salvatges (Petit N et al 2012), confirmant doncs que el silenciament d'aquest retrotransposó no és complet. Per aquesta raó, vam pensar que havien de poder-se visualitzar els trànscrips telomèrics a ovaris salvatges. Emprant la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent amb amplificació per tiramida, de major sensibilitat que la convencional, hem estat capaços de detectar els trànscrips de *HeT-A* i *TART* (intermediaris de transposició telomèrica) a ovaris salvatges, quelcom que no s'havia pogut veure mai fins ara. Així, hem estudiat en detall la localització dels trànscrips telomèrics a ovaris salvatges i mutants. Els resultats obtinguts als mutants GIII i d'*aubergine* en què s'observa una major intensitat de senyal (Figures 45, 46, 47 i 48), juntament amb els resultats publicats a treballs anteriors (Shpiz S et al 2007; Shpiz S et al 2009; Zhang L et al 2014), confirmen que les sondes de *HeT-A* i *TART* utilitzades en els nostres experiments són específiques i que la tècnica emprada detecta correctament i amb suficient sensibilitat els trànscrips telomèrics.

A ovaris salvatges es poden detectar els mRNAs de *HeT-A* i *TART*, i l'RNA antisense de *TART*

L'mRNA de *HeT-A* es detecta a ovaris salvatges a partir de l'estadi 6 de desenvolupament: al citoplasma de les *nurse cells* i cèl·lules fol·liculars, i al nucli d'algunes *nurse cells* en forma de punts, especialment vora la membrana nuclear (Figura 45; A-F). Aquesta localització a les cèl·lules fol·liculars a partir de l'estadi 6 suggereix la vinculació de la transcripció de *HeT-A* amb les endoreplicacions cel·lulars (Lee HO et al 2009). La localització a les *nurse cells* (també endoreplicatives) es dona després de l'estadi 6, que és justament quan els nuclis de les *nurse cells* passen a adquirir una aparença de cromatina descondensada (Dej KJ i Spradling AC 1999) i per tant se'n facilita la transcripció. Com s'ha explicat abans, durant el cicle endoreplicatiu no es dona l'escurçament telomèric, així doncs no sembla que les cèl·lules que realitzen aquest tipus de cicle cel·lular requereixin elongar els seus telòmers (a més, a partir de l'estadi 6 no hi detectem les proteïnes telomèriques, per tant no s'estan elongant els telòmers). És possible que aquest trànscrip dugui a terme una funció diferent de la telomèrica que sigui important per al correcte desenvolupament de *Drosophila*, tot i que desconeixem totalment quina podria ser. D'altra banda, el fet que a partir d'aquest estadi ovàric comencin a transcriure's gran quantitat de trànscrips i sintetitzar-se nombroses proteïnes com a preparació per al *dumping* que tindrà lloc posteriorment, fa pensar també en la possibilitat que l'expressió de *HeT-A* no sigui específica, sinó un romanent de trànscrips que encara no han pogut ser silenciats pels mecanismes de regulació pertinents a conseqüència de l'elevat nombre de còpies genòmiques replicades que estan sent transcrites de forma massiva.

L'mRNA de *TART* localitza a ovaris salvatges formant alguns punts dins el nucli de les *nurse cells* a l'estadi 10 (Figura 46; A-D). De nou, l'expressió intranuclear del trànscrip *sense* de *TART* en aquest estadi probablement no

estigui relacionada amb l'elongació telomèrica ja que no hi detectem cap de les proteïnes telomèriques.

Com que els retrotransposons telomèrics de *Drosophila* es transcriuen en ambdós sentits (Danilevskaya ON et al 1999; Shpiz S et al 2009), hem estudiat també la localització dels seus trànscrips *antisense*. L'RNA *antisense* de *TART* localitza a ovaris salvatges al nucli de les *nurse cells* formant-hi alguns punts als estadis 7-9, i presenten una intensitat lleugerament menor que la del seu trànscrip *sense*. En canvi, no podem detectar el trànscrip *antisense* de *HeT-A* a ovaris salvatges perquè no s'hi expressa o com a mínim ho fa a uns nivells d'intensitat massa baixos perquè puguin ser-hi detectats (i diferenciats del soroll de fons de les mostres) amb la tècnica que hem emprat.

Aquests resultats coincideixen amb els publicats anteriorment a George JA i Pardue M-L 2003, on són capaços de detectar l'mRNA de *HeT-A* a ovaris salvatges mitjançant *Northern blot* d'RNA total. La parella de trànscrips *HeT-A sense* i *TART antisense* és de fet la que s'ha descrit que s'expressa en majors nivells a ovaris de *Drosophila* comparant-la amb l'*antisense* de *HeT-A* i el *sense* de *TART*. Al treball presentat per Danilevskaya ON et al 1999 es detecta mitjançant *Northern Blot* el trànscrip *sense* de *HeT-A* a femelles adultes salvatges però no el seu *antisense*. A més hi detecten tant l'RNA *sense* com *antisense* de *TART*, però expliquen que l'*antisense* és molt més abundant (Danilevskaya ON et al 1999; George JA i Pardue ML 2003). Al nostre laboratori hem pogut observar també mitjançant RT-PCR que la seqüència que comprèn la *gag* del trànscrip *antisense* de *HeT-A* no s'expressa a larva salvatge (Piñeyro D et al 2011).

En conjunt, la detecció dels trànscrips de *HeT-A* i *TART* que observem a ovaris salvatges formant punts dins el nucli podrien correspondre als telòmers, ja que els trànscrips podrien estar duent a terme l'elongació telomèrica com a intermediaris de transposició que són. D'altra banda però,

com s'ha comentat abans, el fet que els diferents components de la RNP telomèrica no comparteixin la mateixa localització suggereix que probablement localitzin fora del telòmer, especialment en el cas de l'RNA *sense* de *TART* que presenta un únic punt intranuclear als mutants analitzats (a les *nurse cells* del mutant d'*aubergine* i les fol·liculars de GIII). En aquesta línia, l'article de Chambeyron S et al 2008 suggereix, com s'ha esmentat anteriorment, que podria donar-se l'acumulació de trànscrips de retrotransposons dins el nucli de les *nurse cells* en unes estructures intranuclears especials destinades específicament a l'acumulació d'RNAs de transposons reprimits. Aquest podria ser doncs el cas dels RNAs telomèrics que observem dins els nuclis. D'altra banda, sí que hem pogut detectar per RT-PCR trànscrips *antisense* del 3'UTR de *HeT-A* de mides molt diverses a larva i hem identificat seqüències conservades d'*splicing* úniques d'aquests trànscrips (Piñeyro D et al 2011). Aquest fet, juntament amb la falta de detecció (o escassa) dels trànscrips *antisense* de *HeT-A* en les hibridacions *in situ* d'RNA realitzades (Figura 47), fan pensar de nou en un paper diferent al d'intermediari de transposició o elongació telomèrica per a aquest RNA. És possible que el trànscrip *antisense* del 3'UTR de *HeT-A* estigui participant en la regulació de la transposició telomèrica. Podria estar implicat en l'inici de la via dels piRNAs o a determinar d'alguna manera quines seqüències genòmiques de *HeT-A* han de ser transcrites o retrotranscrites, és a dir, quines estaran actives. De fet, una de les principals diferències observades entre les mosques GIII (de telòmers deu vegades més llargs) i les salvatges és l'abundància dels diferents tipus d'*splicing* dels trànscrips *antisense* del 3'UTR de *HeT-A* (Piñeyro D et al 2011). Per tant, aquest resultat sembla reflectir una possible implicació dels trànscrips *antisense* del 3'UTR de *HeT-A* en la regulació de l'elongació telomèrica.

Els trànscrips telomèrics localitzen diferencialment a ovaris mutants GIII i d'*aubergine*

Les principals diferències observades als ovaris mutants analitzats respecte als salvatges són que l'mRNA de *HeT-A* es troba expressat a nivells extremadament elevats a l'inici de l'oogènesi i als estadis 9 i 10 al citoplasma de les *nurse cells* de GIII (Figura 45; G-L); i que localitza a l'oòcit i forma grans acumulacions en punts concrets del citoplasma a les *nurse cells* de mutants d'*aubergine* (Figura 45; M-U). Ambdues línies mutants tenen incrementada l'expressió d'aquest trànscrip *sense* respecte a ovaris salvatges, no obstant, l'increment és extremadament elevat en el cas de GIII. Aquest resultat concorda amb el fet que els telòmers de GIII siguin més llargs i que els nivells d'expressió que presenta dels retrotransposons telomèrics siguin majors als salvatges (Piñeyro D et al 2011). La detecció de l'mRNA de *HeT-A* únicament a l'oòcit de la línia mutant per a la via dels piRNAs confirma que a GIII segueix tenint lloc la repressió dels trànscrips telomèrics.

L'mRNA de *TART* a GIII forma més punts, de major intensitat i detectables a estadis més temprans (a partir de l'estadi 6) al nucli de les *nurse cells* que a ovaris salvatges. El més destacable és que a partir d'aquest mateix estadi aquest trànscrip forma un únic punt molt intens al nucli de les cèl·lules fol·liculars de GIII (Figura 46; E-J). En el primer cas, la detecció de més punts i més intensos torna a estar relacionada amb què GIII presenta telòmers més llargs i una major expressió dels trànscrips telomèrics. El fet que s'observi a partir de l'estadi 6 podria estar relacionat amb què a partir d'aquest estadi és quan els nuclis de les *nurse cells* presenten una cromatina d'aspecte descondensat (Dej KJ i Spradling AC 1999) i per tant ja poden realitzar-se transcripcions cel·lulars. De nou, l'acumulació en un únic punt intranuclear de l'mRNA de *TART* a les cèl·lules fol·liculars de GIII suggereix la seva repressió en una estructura nuclear concreta com la

descrita per Chambeyron S et al 2008. No obstant, el fet que n'observem un únic punt intranuclear i que sigui justament només a les cèl·lules fol·liculars apunta més a l'estructura intranuclear *Dot COM* descrita per Dennis C et al 2013, de la qual s'ha parlat abans. En aquest article s'especifica concretament que l'mRNA de *HeT-A* no localitza al *Dot COM* a ovaris salvatges ni mutants d'*Spn-E* (Dennis C et al 2013), no obstant, no van estudiar-hi la localització dels transcrits de *TART*. Els nostres resultats suggereixen que molt probablement l'mRNA de *TART* estigui localitzant a GIII al *Dot COM* de les cèl·lules fol·liculars. És precisament també a partir de l'estadi 6 quan les cèl·lules fol·liculars comencen a realitzar endoreplicacions (Deng WM et al 2001). El fet que detectem a GIII l'mRNA de *TART* al nucli de cèl·lules que duen a terme endoreplicacions (cèl·lules fol·liculars a partir de l'estadi 6, i *nurse cells*) i que tenen la cromatina descondensada (*nurse cells* d'estadi 6) fa pensar en una possible relació entre l'expressió de l'mRNA de *TART* i l'endoreplicació, igual que succeeix amb l'mRNA de *HeT-A*. D'altra banda, al mutant d'*aubergine* l'mRNA de *TART* també forma un únic punt molt intens dins el nucli de cada *nurse cell* i en tots els estadis de desenvolupament (Figura 46; K-N), el qual probablement correspon també a aquesta estructura intranuclear de transcrits d'elements mòbils reprimits o silenciats descrita a Chambeyron S et al 2008. Tractant-se en aquest cas d'un mutant de la via dels piRNAs podria esperar-se que els transcrits telomèrics no s'hi trobessin silenciats, no obstant podria ser que *Aubergine* no fos indispensable per al tipus de repressió que té lloc en aquestes estructures concretes de silenciament intranuclear.

L'RNA *antisense* de *TART* localitza a GIII de forma similar que a ovaris salvatges, tot i presentar alguns punts més (Figura 48; F-I). Per tant, sembla ser que l'increment d'expressió telomèrica de GIII no provoca un increment significatiu d'expressió d'aquest transcrit a ovaris. En canvi, la localització de l'*antisense* de *TART* a mutants d'*aubergine* (Figura 48; J-O) és força semblant a la de l'mRNA de *HeT-A* en aquesta mateixa línia (Figura 45; M-

U): localitza aberrantment a l'oòcit i s'acumula al citoplasma de les *nurse cells*.

En resum, les dues principals diferències dels mutants d'*aubergine* comparats amb els de GIII són a les *nurse cells*: la detecció de l'mRNA de *TART* (a mutants d'*aubergine* localitza dins el nucli des de l'estadi 1, mentre que a GIII no hi apareix fins l'estadi 5-6), i de l'mRNA de *HeT-A* (present des de l'estadi 1 al citoplasma de mutants GIII, i només des de l'estadi 6-7 a mutants d'*aubergine*). Sembla doncs com si ambdues línies tinguessin programat el moment d'inici d'expressió de l'mRNA d'un dels dos retrotransposons telomèrics a l'estadi 1 i el de l'altre element mòbil vora l'estadi 6 a les *nurse cells*, però que es trobés intercanviat l'ordre d'expressió de *HeT-A* i *TART* a GIII respecte *aubergine*. A més, l'RNA *antisense* de *TART* es detecta a les *nurse cells* de mutants d'*aubergine* molt abans (estadi 4) que a ovaris GIII o salvatges (a l'estadi 6-7). És interessant comparar les línies mutants GIII i *aubergine* ja que ambdues tenen incrementada l'expressió telomèrica, no obstant GIII manté encara l'estabilitat genòmica mentre que això no passa als mutants d'*aubergine* que deixen d'estar regulats per la via dels piRNAs. En global, els mutants d'*aubergine* presenten una expressió avançada en el temps (a estadis anteriors) dels trànscrips *sense* i *antisense* de *TART* respecte GIII, probablement pel fet d'haver-se suprimit la repressió de transposicions per part dels piRNAs. Les cèl·lules fol·liculars de GIII (igual que les salvatges) es troben regulades per la via somàtica dels piRNAs, en la qual no es dona el cicle de *ping-pong* i on participa només la proteïna Piwi (Li C et al 2009). Aquesta pot ser doncs la responsable de les diferències presents entre els mutants GIII i d'*aubergine* a les cèl·lules fol·liculars. A GIII l'mRNA de *TART* es detecta a les fol·liculars dels estadis 5-6 al 9 com un únic punt al nucli, el qual és inexistent als mutants d'*aubergine*. És molt possible doncs que aquest punt intranuclear de GIII correspongui a una acumulació d'aquest trànscrip per tal de reprimir-ne l'expressió/transposició, o per protegir-lo fins quan sigui

necessari el seu ús. Aquesta localització recorda altra vegada la de l'estructura *Dot COM* de processament primari de piRNAs esmentada abans (Dennis C et al 2013).

No obstant, la diferència que sorprèn més entre ambdues línies mutants és que l'mRNA de *HeT-A* s'expressi a estadis anteriors a GIII que a mutants d'*aubergine*, i no a l'inrevés. Una hipòtesi per a això podria ser que la mutació de GIII que provoca l'increment de longitud telomèrica en sigui la responsable, tot i que se'n desconeix encara el mecanisme concret. A l'article de Walter MF et al 2007 descriuen un fenotip de defectes dels ovaris mutants GIII similar al que presenten els mutants de *prod*. Prod és una proteïna que s'uneix als telòmers al 3'UTR de *HeT-A* (Török T et al 2007). A més, s'ha vist que als mutants de *prod* que tenen afectada la localització de la proteïna Prod a l'heterocromatina centromèrica s'hi observen alteracions en la proliferació dels discos imaginals i letalitat de larves en estadis tardans (Török T et al 1997). De fet els mutants GIII, de telòmers més llargs, tenen reduïda la fecunditat i fertilitat (Walter MF et al 2007). En aquest mateix treball se suggereix la possibilitat que l'increment de còpies de *HeT-A* als telòmers de GIII causi una redistribució de la localització de Prod del centròmer als telòmers que sigui la causant dels fenotips de disminució de fecunditat i fertilitat d'aquesta línia. És possible doncs que aquesta hipotètica redistribució de Prod a GIII no tingui lloc a mutants d'*aubergine* (o com a mínim no de la mateixa forma), i que estigui contribuint d'alguna manera a que l'expressió de *HeT-A* a GIII es doni a estadis previs als d'*aubergine*.

Com s'ha explicat abans, la detecció dels trànscrips i/o proteïnes telomèriques a l'oòcit succeeix únicament als mutants d'*aubergine* (mai a GIII). Dels estadis 4 a 6 es detecta *HeT-A* Gag a tot l'oòcit així com l'mRNA de *HeT-A* a la seva regió posterior. A l'estadi 6 s'observa l'RNA *antisense* de *TART* al pol posterior de l'oòcit. Als estadis 7-8, en canvi, amdós

trànscrits canvien de localització dins l'oòcit i passen ara a detectar-se únicament al seu pol anterior. *HeT-A* Gag es concentra també en aquest estadi a la regió anterior de l'oòcit així com al seu nucli. Per últim, als estadis 9 i 10 es detecten només els trànscrits *sense* de *HeT-A* i *antisense* de *TART* al seu pol anterior. El fet d'observar localització a l'oòcit només als mutants d'*aubergine* és d'esperar ja que les transposicions a l'oòcit fan perillar la integritat genòmica de la descendència, i a GIII aquesta no es veu afectada. El més interessant però d'observar els resultats dels mutants de la via dels piRNAs on hi ha la desrepressió de *HeT-A* i *TART*, és veure que l'expressió dels seus trànscrits (i també de *HeT-A* Gag) passa de ser posterior a anterior a mesura que avança el desenvolupament de *Drosophila* (en funció de l'estadi de l'oogènesi). No obstant, el significat i la causa d'aquest canvi de localització dins l'oòcit a mesura que la cambra ovàrica madura són quelcom incert.

És interessant a més que justament observem la co-localització de les proteïnes Lost i Tral (Figura 63) en els mateixos estadis i regions de l'oòcit on localitzen la proteïna *HeT-A* Gag i els RNAs *sense* de *HeT-A* i *antisense* de *TART*, és a dir, abans de l'estadi 6 al pol posterior de l'oòcit i a l'estadi 7-8 a la seva regió anterior. Aquesta localització compartida de les proteïnes Lost, Tral i *HeT-A* Gag i de l'mRNA de *HeT-A* i l'*antisense* de *TART* dins l'oòcit suggereix la possible participació de Lost i Tral en el cicle de vida telomèric de *Drosophila*. En aquest cas podria ser que Lost i Tral participessin en el transport de la RNP telomèrica, o d'una part d'ella, dins l'oòcit fins la regió adient on hi és requerida. D'altra banda també és possible que Lost i Tral estiguin implicades en la regulació de la traducció de l'mRNA de *HeT-A*, com es discutirà més endavant, permetent la síntesi de la proteïna *HeT-A* Gag únicament a la regió concreta de l'oòcit on és necessària. De fet, treballs anteriors han relacionat ja la proteïna Tral amb la regulació de la traducció d'mRNAs (Barbee SA et al 2006; Weil TT et al 2012). A més, el fenotip d'acumulacions aberrants al citoplasma de les *nurse*

cells mutants per a *aubergine* dels trànscrips *sense* de *HeT-A* i *antisense* de *TART* (Figures 45N-45Q; i 48J, 48L i 48M) és similar al que observem per a la proteïna *TART* Pol als mutants de *tral* i *lost-rump* (Figura 69; D-M). Aquestes similituds indiquen que *Tral* i *Lost* podrien estar implicades en la repressió de la RNP telomèrica, participant probablement d'alguna manera en la via dels piRNAs com es discutirà de nou més endavant. De fet, un treball anterior va relacionar ja la proteïna *Tral* amb el *nuage* i la via de silenciament dels piRNAs, així com mostrava que els mutants de *tral* tenen incrementada l'expressió de *HeT-A* (Liu L et al 2011).

A Shpiz S et al 2009 s'ha descrit que els trànscrips *sense* i *antisense* de *HeT-A* i *TART* localitzen a ovaris mutants homozigots per a *Spn-E* principalment en forma de punts dins el nucli de les *nurse cells*, i en menor quantitat al seu citoplasma; i que el trànscrip *sense* de *HeT-A* també s'observa a l'oòcit. Aquests resultats són força similars als que hem obtingut en els nostres experiments amb ovaris mutants d'*aubergine*. La localització del trànscrip *antisense* de *HeT-A* no l'hem analitzada al mutant de la via dels piRNAs, no obstant, la seva distribució a ovaris GIII és com la descrita a Shpiz S et al 2009. Quelcom interessant és que precisament als mutants d'*aubergine* detectem uns nivells d'RNA *sense* de *HeT-A* i *antisense* de *TART* baixos dins el nucli de les *nurse cells* però enriquits al seu citoplasma, indicant que aquesta línia exporta amb major eficiència els trànscrips telomèrics del nucli al citoplasma (o el seu transport presenta una menor repressió). Aquest fet concordaria amb els resultats d'ovariss salvatges i GIII, controlats per la via dels piRNAs, que presenten acumulacions de trànscrips en forma de punts dins el nucli (igual que el suggerit a Chambeyron S et al 2008). No obstant, el fet que observem un fenotip similar d'acumulació de l'mRNA de *TART* en un únic punt dins el nucli de les *nurse cells* als mutants de la via dels piRNAs (*aubergine*) apunta a què potser hi hagi una altra possible explicació per a la formació d'aquestes inclusions intranuclears que la suggerida en aquest article, com s'ha comentat ja abans, i que no tingui res a veure amb el

silenciament de transposons.

Una diferència clara entre els resultats que hem obtingut al mutant de la via dels piRNAs que hem emprat i els publicats anteriorment amb mutants d'aquesta via de silenciament es troba en la localització del transcrit *antisense* de *TART*. Nosaltres hem detectat aquest transcrit amb un patró semblant al de l'mRNA de *HeT-A* (a l'oòcit, al citoplasma i nucli de les *nurse cells*, i al citoplasma de les cèl·lules fol·liculars), mentre que segons Shpiz S et al 2009 localitza únicament en forma de punts dins el nucli de les *nurse cells*. Aquesta localització tan desigual del transcrit *antisense* de *TART* podria ser conseqüència d'estar analitzant línies mutants diferents de la via dels piRNAs en ambdós casos (d'*aubergine* versus d'*Spn-E*), o bé d'emprar sondes diferents. En el nostre cas hem utilitzat per a la sonda una seqüència de major extensió a l'emprada a l'article d'Shpiz S et al 2009, la qual posteriorment vam digerir per obtenir-ne diferents seqüències de mida petita que abasten gran part del retrotransposó i poden penetrar dins els teixits eficientment. A més, les seqüències emprades per a les sondes de *HeT-A* i *TART* en els nostres experiments i els publicats anteriorment no són exactament les mateixes, així com tampoc ho són les tècniques d'hibridació *in situ* d'RNA emprades. Per tant, aquests factors podrien ser els responsables de les diferències observades dels nostres resultats amb els publicats. Val a dir que les sondes que hem emprat als nostres experiments són específiques (veure l'inici de l'apartat 5.1.2.) i que la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent pel mètode de la Tiramida presenta una major sensibilitat de detecció que les tècniques emprades en publicacions anteriors, reforçant els nostres resultats. Això s'evidencia en la capacitat de detectar en els nostres experiments els transcrits de *HeT-A* i *TART* a línies salvatges, cosa que mai havia estat possible fer fins ara.

Com a resum global, a ovaris salvatges els transcrits que formen punts dins el nucli de les *nurse cells* varien en funció de l'estadi de desenvolupament. A partir de l'estadi 6, quan els nuclis de les *nurse cells* passen a tenir la

cromatina descondensada (Dej KJ i Spradling AC 1999), detectem l'expressió de l'mRNA de *HeT-A*, i a partir del 7-8 la de l'*antisense* de *TART*. És només a l'estadi 10 quan hi localitzen també els trànscrips *sense* de *TART*. Per tant, l'expressió de l'mRNA de *TART* es dona més tard que la de l'mRNA de *HeT-A*, tot i co-existir ambdós a l'estadi 10. En canvi, a GIII la diferència més rellevant és que l'mRNA de *TART* i el seu trànscrip *antisense* es detecten també a l'estadi 6 al nucli de les *nurse cells* (abans que a *wild-type*; juntament amb l'mRNA de *HeT-A*), coincidint amb la descondensació de la cromatina d'aquests nuclis, de nou avançats en el temps respecte a ovaris salvatges. Aquests resultats indiquen doncs que els trànscrips (tant *sense* com *antisense*) de *TART* es detecten abans en el temps al nucli de *nurse cells* GIII que salvatges. Això podria ser conseqüència, igual que l'increment sobtat de l'mRNA de *HeT-A* als estadis 9 i 10, de què la línia GIII té una mutació que fa que tingui els telòmers més llargs i una major expressió dels retrotransposons telomèrics. Per tant, és possible que aquesta mutació provoqui que es doni la transcripció dels mRNAs de *HeT-A* i *TART* a estadis previs tant a les cèl·lules fol·liculars com les *nurse cells*. Aquests trànscrips són precisament els intermediaris de transposició telomèrica, per tant, té certa lògica que siguin els components "alterats" a GIII; no obstant, els mRNAs per sí sols no són capaços d'elongar els telòmers sinó que s'hi requeriria també la presència de les proteïnes telomèriques (cosa que no succeeix a les *nurse cells* després de l'estadi 5). Així doncs, molt probablement aquests trànscrips realment no estiguin duent a terme cap funció telomèrica, sinó una d'alternativa, o bé simplement hi localitzin perquè poden expressar-s'hi (perquè siguin capaços d'"escapar" parcialment de la repressió de la via dels piRNAs d'alguna manera que desconeixem) sense tenir-hi cap finalitat concreta.

Diferents components de la RNP telomèrica localitzen a les *border cells*

Les *border cells* són unes cèl·lules que provenen en un origen de cèl·lules fol·liculars que adopten capacitat migratòria i que principalment participen en la producció de la closca de l'embrió (*eggshell*) (Montell DJ 2003) i en la formació del pil·li que farà possible l'entrada de l'espermatozou dins l'oòcit per fecundar-lo. No obstant, són unes cèl·lules de les quals es coneix poc. El fet que haguem trobat en aquestes cèl·lules tan particulars diversos components de la RNP telomèrica és quelcom sorprenent i interessant.

Detectem la proteïna *TART* Pol i l'mRNA de *HeT-A* a les *border cells* d'ovaris salvatges (Figures 36F i 45D), així com a les línies mutants estudiades. La principal diferència a GIII és que els nivells de l'mRNA de *HeT-A* incrementen a nivells elevadíssims tant al citoplasma com al nucli de les *border cells* (Figures 45J i 45L), i que també hi detectem l'mRNA de *TART*. En canvi, a mutants d'*aubergine* l'mRNA de *HeT-A* presenta nivells com els salvatges i s'hi detecta l'*antisense* de *TART* (però no l'mRNA de *TART* com a GIII). La sobreexpressió telomèrica de GIII i *aubergine* sembla afectar a nivell de les *border cells* en què hi localitzin els transcrits de *TART*. Com s'ha explicat abans, la diferència més característica que hem observat a ovaris GIII respecte als salvatges és l'expressió de l'mRNA de *TART* dins el nucli de les cèl·lules fol·liculars en forma d'un únic punt molt intens; i les *border cells* provenen precisament de les cèl·lules fol·liculars. Així doncs, sembla ser que el retrotransposó *TART* pot expressar-se a nivells més elevats a les *border cells* d'ovaris amb sobreexpressió telomèrica, ja que hi observem la proteïna *TART* Pol i els seus transcrits (*sense* i *antisense* de *TART*). De fet, com s'ha comentat anteriorment, *TART* Pol localitza també en forma d'un sol punt al nucli de les *nurse cells* als primers estadis de desenvolupament, fent pensar de nou en la possibilitat que *TART* Pol estigui duent a terme una altra funció a més del seu paper telomèric ja descrit. En

aquesta línia, s'han revelat recentment diverses funcions de l'enzim Telomerasa que s'aparten de la seva habitual funció d'elongació telomèrica, com ara actuar com un regulador transcripcional de diversos gens implicats en proliferació cel·lular, tumorigènesi o inflamació (Li Y i Tergaonkar V 2014). Per tant, és molt possible que *TART* Pol també dugui a terme alguna altra funció a més de retrotranscriure els trànscrips telomèrics, i que aquesta tingui a veure amb el seu paper a les *border cells*. De fet, la localització que presenta *TART* Pol en aquestes cèl·lules és molt semblant a la del regulador de microtúbuls *Stathmin*, el qual es troba altament sobreexpressat a les *border cells* i és necessari per a la seva migració cel·lular (Borghese L et al 2006). També es troben sobreexpressats a les *border cells* diversos reguladors del citoesquelet d'actina, entre els quals es troben molts gens específics de múscul (Borghese L et al 2006). Per tant pot suggerir-se que *TART* Pol podria estar participant d'alguna manera en la migració cel·lular o en l'organització del citoesquelet.

No obstant, com s'ha comentat, l'expressió més intensa i remarcable detectada a les *border cells* és la de l'mRNA de *HeT-A* a GIII. A més, sembla rellevant que aquest marcatge tan intens localitzi principalment a la regió de les *border cells* més propera a l'oòcit, ja que permet hipotetitzar que aquest sigui un mecanisme per fer arribar a l'oòcit la RNP telomèrica, o com a mínim alguns dels seus components, i permetre'n així la transmissió a la següent generació. D'altra banda, una altra possibilitat és que les *border cells* no es trobin regulades per la via dels piRNAs; tot i que això és quelcom encara desconegut. De ser així, podríem especular que aquesta és la raó per la qual hi detectem diversos components dels retrotransposons telomèrics, sense que hi duguin a terme cap finalitat concreta; i com que l'mRNA de *HeT-A* és el que s'expressa a nivells més elevats, per això l'hi detectem amb tanta intensitat.

Un treball publicat indica que es troben sobreexpressats a *border cells* salvatges respecte a cèl·lules fol·liculars salvatges gens com: actina, miosina, tropomiosina, diverses proteïnes de *heat-shock*, i la variant d'histones H2AvD, així com la Lamina i la histona H4, entre d'altres (Borghese L et al 2006). Precisament, la miosina i l'actina són dues de les proteïnes amb uns patrons de localització a embrió que, com s'ha discutit anteriorment, recorden als de *TART* Pol i *HeT-A* Gag. A més, en la purificació de complexos proteics de *TART-RT* hem identificat justament la histona H4, així com nombroses proteïnes de *heat-shock*. El fet que a les *border cells* s'hi trobi sobreexpressada la variant d'histones H2AvD respecte a cèl·lules fol·liculars (Borghese L et al 2006) té especial interès ja que, com es discutirà més endavant, l'H2AvD és una proteïna que interacciona amb Nap-1 i localitza als telòmers de *Drosophila* (Rong YS 2008), i hem observat que Nap-1 interacciona amb *HeT-A* Gag (Figura 70). A més, com es raonarà després, Nap-1 està implicada en la regulació de l'expressió de *HeT-A*, lligant així amb el fet que detectem el transcrit *sense* de *HeT-A* a les *border cells*.

Entre els estadis 9 i 10 és quan es dona la migració de les *border cells* del pol anterior al posterior de les *nurse cells* mitjançant diverses vies de senyalització, entre les quals es troben la via de Jak-Stat i la senyalització de l'hormona ecdisona (Montell DJ 2003). És possible que l'ecdisona afecti d'alguna manera l'expressió dels transcrits telomèrics de *Drosophila*, ja que una de les proteïnes que hem identificat en les purificacions de complexos proteics és PEP (*Protein on Ecdysone Puffs*) (Taula 5), i podria ser aquesta la raó per la qual detectem components de la RNP telomèrica a les *border cells*. D'altra banda, la via de Jak-Stat, que regula la proliferació cel·lular, es presenta com una molt bona candidata a relacionar també les *border cells* amb la detecció dels transcrits telomèrics en aquestes cèl·lules. En la via de senyalització Jak-Stat, s'activa la quinasa JAK (*Janus Kinase*) que fosforila STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), el qual activa

altres components de diverses vies, entre ells Ken. Ken és una proteïna que s'uneix al DNA, que interacciona amb Z4 en determinades situacions i que, com hem pogut demostrar recentment al nostre laboratori, regula la transcripció de *TART* (Silva-Sousa R et al 2013a). Per tant, el fet que Ken es trobi actiu a les *border cells* als estadis 9-10 podria explicar la detecció de *TART* Pol i de l'mRNA de *HeT-A* en aquestes cèl·lules. No obstant, Ken regula negativament l'expressió de *TART*, per tant al activar-se Ken s'esperaria que aquesta reprimís la transcripció de *TART* i no que s'incrementés la detecció de *TART* Pol i l'mRNA de *HeT-A* (i dels trànscrips de *TART* als mutants que sobreexpressen els retrotransposons telomèrics) com succeeix als resultats que hem obtingut.

En conjunt, el fet de detectar a les *border cells* diversos components de la RNP telomèrica presenta la possibilitat que s'estiguin elongant els telòmers en aquestes cèl·lules concretes de l'ovari. D'altra banda una altra opció possible, com hem suggerit anteriorment, és que determinats components de la RNP telomèrica duguin a terme una funció diferent de la telomèrica a les *border cells*, tot i que l'escàs coneixement actual d'aquestes cèl·lules en dificulti la seva interpretació.

5.2. IDENTIFICACIÓ D'ALTRES PROTEÏNES CEL·LULARS IMPLICADES EN EL CICLE DE VIDA TELOMÈRIC DE *DROSOPHILA*

Per tal d'entendre millor el cicle de vida telomèric de *Drosophila* vam decidir cercar quines proteïnes cel·lulars podrien estar-hi col·laborant. Per fer-ho, primer vam buscar interaccions bioquímiques entre les proteïnes telomèriques i altres proteïnes cel·lulars. Aquestes proteïnes van ser, per una banda, proteïnes implicades en estabilitat telomèrica i, per una altra, proteïnes identificades en les purificacions de complexos proteics de *HeT-A* Gag i *TART-RT*. La posterior caracterització de les proteïnes trobades ha permès definir possibles funcions que aquestes durien a terme durant el cicle de vida telomèric de *Drosophila melanogaster*.

Z4 interacciona amb *HeT-A* Gag i Jil-1, tres proteïnes implicades en estabilitat telomèrica

Després d'una primera aproximació de proteïnes candidates a interaccionar amb *HeT-A* Gag, hem trobat que les proteïnes Lamina i HP1 no hi interaccionen (Figures 49 i 50), en canvi sí que hem pogut observar un vincle entre el retrotransposó *HeT-A* i les proteïnes Z4 i Jil-1. La proteïna Z4 interacciona amb *HeT-A* Gag (Figura 51) i amb Jil-1 (Figura 53), però aquestes dues últimes no ho fan entre elles (Figura 52). A més, el fenotip comú de fusions telomèriques a cromosomes metafàsics de cèl·lules S2 interferides per als gens *z4* i *HeT-A gag* (Figura 54) (publicat a Silva-Sousa R et al 2012) evidencia la importància de Z4 en l'estabilitat telomèrica de *Drosophila*, i suggereix la possibilitat que *HeT-A* Gag sigui la responsable de dirigir la proteïna Z4 (i indirectament també Jil-1, a través de la seva interacció amb Z4) a la seqüència HTT telomèrica, ja que com s'ha comentat anteriorment *HeT-A* Gag està relacionada amb el seu *targeting* (Rashkova S

et al 2002b). Ja als telòmers, Z4 i Jil-1 s'encarregarien de regular la transcripció dels retrotransposons telomèrics, ja que els mutants de *z4* tenen incrementada l'expressió de *HeT-A*, mentre que els mutants de *jil-1* la tenen disminuïda i presenten un increment de marques de silenciament de la cromatina al promotor de *HeT-A* (Silva-Sousa R et al 2012). Per tant, podem afirmar que Jil-1 és un regulador positiu de *HeT-A* i Z4 n'és un regulador negatiu. D'altra banda, un treball anterior havia descrit ja la proteïna Prod com un regulador negatiu de *HeT-A* (Török T et al 2007). A més, els nostres resultats indiquen, com es discutirà en detall més endavant, que la proteïna Nap-1, la qual interacciona amb *HeT-A* Gag (Figura 70) i forma part del mateix complex proteic que Prod (Moshkin YM et al 2009), és un altre regulador de la transcripció de *HeT-A*, i que està implicada també en l'estabilitat telomèrica de *Drosophila*.

S'ha descrit anteriorment que Z4 s'uneix al receptor de l'ecdisona (EcR) i que, juntament amb el complex remodelador de nucleosomes NURF, regula la transcripció dels gens diana de l'EcR (Kugler SJ et al 2011). És interessant doncs que en les purificacions de complexos proteics de *HeT-A* Gag haguem identificat la proteïna PEP (*Protein on Ecdysone Puffs*) (Taula 5), relacionada també amb l'ecdisona, pròpia d'heterocromatina, i que interacciona amb HP1a (implicada en *capping* telomèric) (Piacentini L et al 2009). Durant la metamorfosi es donen pics d'ecdisona, i el fet d'haver de generar els nous teixits de la mosca adulta implica la necessitat de realitzar nombroses divisions cel·lulars. És possible doncs que el metabolisme de l'ecdisona participi en la regulació de l'elongació telomèrica de *Drosophila*, i per tant en la transcripció de *HeT-A*. De fet, *jil-1* és un gen activat per l'ecdisona, i la proteïna Jil-1 és activadora de l'expressió de *HeT-A* (Silva-Sousa R et al 2012). Per tant, es pot especular la formació d'un complex compost per les proteïnes: *HeT-A* Gag, Z4, Jil-1, NURF, HP1 i PEP, que podria localitzar als telòmers i regular l'expressió del retrotransposó *HeT-A*. La manca d'un anticòs que reconegués específicament la proteïna PEP,

juntament amb la identificació d'altres proteïnes bones candidates a participar en el cicle de vida telomèric i la falta de temps, han estat els responsables de no continuar estudiant més profundament aquesta proteïna. No obstant, aquesta seria una línia d'investigació interessant a seguir en un futur.

La interacció de Nap-1 amb *HeT-A* Gag podria facilitar l'entrada de la RNP telomèrica al nucli durant la fase S del cicle cel·lular

Nap-1 es troba altament conservada a eucariotes i, tot i ser una xaperona d'histones i remodelar la cromatina, s'han descrit funcions molt diverses de les diferents proteïnes de la família NAP. Algunes d'aquestes funcions són: participar en la transcripció, en la proliferació específica de teixits, en la replicació, l'apoptosi, la inhibició enzimàtica, el transport d'histones fins al nucli, i la regulació del cicle cel·lular (Park YJ i Luger K 2006b). De fet, la proteïna Nap-1 s'ha relacionat a llevat amb la mitosi, els microtúbuls i la reorganització del citoesquelet (Li M et al 1999). Per tant, no pot descartar-se la possibilitat que Nap-1 estigui participant o intervenint d'alguna manera en el cicle de vida dels retrotransposons telomèrics de *Drosophila*.

Dues de les proteïnes que hem identificat en la purificació de complexos proteics de *HeT-A* Gag-CTAP són Nap-1 i la histona H2A (Taula 5). Nap-1 presenta dominis d'importació nuclear i està implicada en el transport de les histones H2A i H2B del citoplasma al nucli (Ito T et al 1996; Li M et al 1999; Rodriguez P et al 2000; Park YJ i Luger K 2006a). Per això, Nap-1 es presenta com una bona candidata a transportar de manera similar la RNP telomèrica a través de la seva interacció amb *HeT-A* Gag (Figura 70). Aquesta interacció podria estar tenint lloc de dues maneres diferents. Per una banda, Nap-1 podria estar formant part de la RNP telomèrica. I per una altra, podria interaccionar temporalment amb *HeT-A* Gag, en el moment oportú del cicle de vida telomèric. Ja que no hem identificat Nap-1 en les purificacions

de *TART-RT-CTAP* (Taules 5 i 7), sembla més probable que es tracti del segon cas: que la interacció de *HeT-A* Gag amb Nap-1 sigui temporal. D'altra banda, s'ha descrit que Nap-1 localitza al citoplasma a la fase G₂ del cicle cel·lular i que entra al nucli a l'inici de la fase S (Ito T et al 1996), la mateixa en què es detecten els majors nivells de proteïna *HeT-A* Gag al nucli de neuroblasts salvatges (Zhang L et al 2014). Per tant, pot suggerir-se que Nap-1 s'associa al citoplasma amb *HeT-A* Gag i que, a l'inici de la fase S, Nap-1 transporta *HeT-A* Gag (i amb ella tota la RNP telomèrica) fins l'interior del nucli.

Per altra banda, la quinasa CK2 que fosforila Nap-1 (provocant-ne la mobilització del citoplasma al nucli) localitza als *ecdysone-induced puffs* de glàndules salivals de *Drosophila* juntament amb l'EcR (Sawatsubashi S et al 2010), on també s'uneix la proteïna PEP (Piacentini L et al 2009); per tant ambdues proteïnes podrien estar interaccionant en aquestes regions del DNA (regulades per l'ecdisona). A més, hem pogut identificar les proteïnes Nap-1 i PEP exclusivament a les purificacions de complexos proteics de *HeT-A* Gag-CTAP i no a les de *TART-RT-CTAP* (Taula 5), indicant una possible connexió entre PEP, la via de l'ecdisona, i el trànsit del citoplasma al nucli de Nap-1 (i probablement també de *HeT-A* Gag). Com s'ha comentat abans, existeix també un vincle entre la via de l'ecdisona i les proteïnes Z4 i NURF (veure l'apartat anterior).

Nap-1 podria col·laborar en el *targeting* de la RNP telomèrica als telòmers

S'ha descrit que Nap-1 interacciona amb HP2, la qual a la vegada interacciona amb la proteïna de *capping* telomèric HP1 (Stephens GE et al 2006); i que Nap-1 s'uneix a la variant d'histones H2A.Z (H2AvD) que també s'ha relacionat específicament amb el *capping* de telòmers (Rong YS 2008). Per tant, Nap-1 podria estar duent a terme no només el transport del

citoplasma al nucli de la RNP telomèrica, sinó també facilitant-ne el *targeting* als telòmers, un procés en el qual només s'hi havia implicat fins ara la proteïna *HeT-A* Gag (Rashkova S et al 2002b). Val a dir a més, que la immunodetecció de la histona H2AvD a ovaris salvatges de *Drosophila* (Joyce EF et al 2011) presenta nombroses similituds de localització amb la de la proteïna *HeT-A* Gag (Figures 34A-34E). Tot això, juntament amb el fet d'haver obtingut el mateix fenotip de fusions telomèriques interferint *HeT-A* *gag*, *nap-1* (Figura 74) i *z4* (Figura 54); i que *HeT-A* Gag interaccioni amb Nap-1 (Figura 70) i Z4 (Figura 51), i Z4 amb Jil-1 (Figura 53); evidencia la importància de les proteïnes Nap-1, Z4 i Jil-1 en l'estabilitat telomèrica de *Drosophila* i reforça la hipòtesi de què aquestes tres proteïnes participen en el *targeting* telomèric de *HeT-A* Gag (i per tant de tota la RNP telomèrica). Cal afegir que el fet d'haver obtingut també el mateix fenotip de malformació del tòrax i manca de l'ala esquerra a mosques adultes interferides per a *HeT-A* *gag* i per a *nap-1* (Figura 73) suggereix de nou que ambdues proteïnes podrien estar participant en una mateixa via, així com la seva possible implicació en el desenvolupament de l'ala de *Drosophila* (veure l'*Annex 1*).

Nap-1 regula l'expressió de *HeT-A*

La disminució de l'expressió de *HeT-A* a ovaris mutants per a *nap-1* respecte als salvatges (Figura 72) suggereix que Nap-1 activa l'expressió de *HeT-A* modificant-ne la cromatina, actuant-hi com un regulador positiu de transcripció. De fet, Nap-1 interacciona amb Nurf (Stephens GE et al 2006), una proteïna que juntament amb Ken participa en la via de senyalització Jak-Stat (de la qual s'ha parlat abans). Com s'ha explicat, la proteïna Z4 funciona com un co-factor remodelador de la cromatina: quan s'associa als complexos NURF o DREF/TRF2 activa la transcripció, mentre que quan s'uneix a Ken (a la via de Jak-Stat) reprimeix la transcripció (Kugler SJ et al 2011). A més, hem trobat al nostre laboratori que les proteïnes DREF, TRF2

i Ken presenten afinitat d'unió per a *HeT-A* i *TART*, i que totes tres en són reguladores negatives d'expressió (Silva-Sousa R et al 2013a); igual que *Z4* és un regulador negatiu de l'expressió de *HeT-A* (Silva-Sousa R et al 2012). Per tant, és possible que *Nap-1* funcioni de forma similar a com ho fa *Z4* al interaccionar amb *NURF*, com un co-factor, per remodelar la cromatina i activar la transcripció de *HeT-A*. Una altra dada rellevant és la identificació de les proteïnes *Nap-1* i *Prod* en un mateix complex proteic (Moshkin YM et al 2009), ja que *Prod* s'uneix als telòmers al 3'UTR de *HeT-A* (Török T et al 2007) i s'ha descrit que els mutants de *prod* tenen incrementada l'expressió de *HeT-A* tot i no presentar cap afectació a nivell de longitud telomèrica (Török T et al 2007). En global doncs, *Nap-1* participa en la regulació de l'expressió del retrotransposó *HeT-A*, juntament amb *Prod*, *Z4*, *NURF*, *DREF* i *TRF2* (així com *Jil-1*).

Una pregunta interessant és per quin mecanisme afecta *Nap-1* la transcripció de *HeT-A*. Apareixen dues possibles respostes que permeten explicar els resultats que hem obtingut de disminució de l'expressió de *HeT-A* a mutants de *nap-1* (Figura 72).

Per una banda, s'ha descrit a *S. cerevisiae* que *Nap-1* interacciona i colocalitza al DNA amb *Yra1*, una proteïna exportadora d'mRNAs que forma part del complex de transcripció *TREX* (Del Rosario BC i Pemberton LF 2008). Aquest complex és una mRNP que s'associa amb la RNA Polimerasa II a l'ORF i al 3'UTR del gen a transcriure. Tal com suggereixen en aquest article, *Nap-1* podria ser la responsable del desassemblament dels nucleosomes que remodelen la cromatina dels promotors actius durant l'elongació de la transcripció, així com del seu posterior reassemblament després del pas de la Polimerasa (Del Rosario BC i Pemberton LF 2008). De fet, s'ha descrit a *Drosophila* que *Nap-1* interacciona amb diferents proteïnes modificadores d'histones com *LID*, *SIN3A* i *Rpd3* (Moshkin YM et al 2009). A més, s'ha vist que *Rpd3* modifica la cromatina del promotor de

HeT-A (Burgio G et al 2011). Per tant, Nap-1 podria localitzar als telòmers de *Drosophila* juntament amb proteïnes amb les quals interacciona, com són: *HeT-A* Gag (Figura 70); diferents proteïnes modificadores d'histones, entre elles Rpd3 (Moshkin YM et al 2009); diverses histones (especialment H2A i H2B) (Ito T et al 1996) i la variant d'histona H2AvD (Rong YS 2008); el complex remodelador de nucleosomes NURF; i les proteïnes heterocromatíniques HP1 i HP2 (Stephens GE et al 2006). Nap-1 podria ser doncs la responsable de remodelar la cromatina de *HeT-A* (i probablement també la de *TART*) quan es requereix la seva transcripció activa, de manera similar a com ho fan les proteïnes Z4 i Jil-1. Per tant, podríem proposar un model en el qual quan *HeT-A* es trobés transcripcionalment actiu, Nap-1 dirigís el remodelament de la cromatina del seu promotor (situat al 3'UTR de *HeT-A*) fent-ne possible la transcripció. Aquest model permetria explicar perquè els mutants de *nap-1* tenen disminuïda l'expressió de *HeT-A*, ja que si Nap-1 està mutada no pot remodelar la cromatina del promotor de *HeT-A* i el pas de la RNA Polimerasa es veu impedit.

Per altra banda, la segona opció possible és la proposada al treball de Rong YS 2008, on se suggereix que la variant d'histones H2AvD, que localitza als telòmers i interacciona amb Nap-1, podria estar funcionant a *Drosophila* com un límit o “frontera” entre l'eucromatina i l'heterocromatina. És a dir, que l'H2AvD podria estar evitant que l'heterocromatina del TAS (domini subtelomèric) s'estengués fins als *arrays* eucromatínics dels retrotransposons telomèrics (HTT); actuant d'igual manera que les proteïnes Jil-1 i Z4 (Silva-Sousa R et al 2012; Silva-Sousa R i Casacuberta E 2013). De ser així, al mutar *nap-1* podria ser que la histona H2AvD perdés la capacitat d'unió als telòmers (si la localització d'H2AvD depengués del *targeting* telomèric per part de Nap-1), deixant de fer de “frontera” heterocromatínica, i produint el conseqüent silenciament dels retrotransposons telomèrics al escampar-se l'heterocromatina del TAS; donant com a resultat final una disminució de

l'expressió de *HeT-A*, que és de fet el que observem als mutants de *nap-1* (Figura 72).

Un altre resultat interessant que hem obtingut és que les mosques mutants per a *nap-1* presenten un número de còpies genòmiques de *HeT-A* menor al salvatge (Figura 72A). Aquesta reducció de còpies genòmiques podria tenir dues possibles causes. Per una banda, pot ser que els telòmers dels mutants de *nap-1* siguin més curts que els salvatges com a conseqüència de tenir disminuïda l'expressió de *HeT-A*, i dur a terme per tant menys transposicions telomèriques. Per altra banda en canvi, és possible que al estar mutat *nap-1* la RNP telomèrica entri al nucli amb més dificultats o amb una eficiència més baixa de la normal, provocant que pugui arribar al final del telòmer una quantitat menor d'RNPs telomèriques i que, en conseqüència, es realitzin menys elongacions dels telòmers (veient-se així disminuït el número de còpies genòmiques dels retrotransposons telomèrics).

TART Pol interacciona i co-localitza a ovaris amb Lost

Hem identificat les proteïnes Lost i Trailer Hitch (Tral) en les purificacions de complexos proteics de *HeT-A* Gag i *TART*-RT (Taula 5), i hem confirmat per immunoprecipitació la interacció entre Lost i *TART* Pol (Figura 61). S'havia descrit ja anteriorment que Lost i Tral interaccionen entre elles a través d'RNA (Snee MJ i Macdonald PM 2009b), i ho hem confirmat al nostre laboratori (Figura 62); així com n'hem visualitzat per primera vegada la co-localització a l'òcit: al pol posterior als estadis 4-6, i als pols posterior i anterior als estadis 7-8 (Figura 63). En canvi, la co-localització a ovaris de Lost amb *TART* Pol té lloc durant els primers estadis de desenvolupament, des del germari fins l'estadi 4: a les cèl·lules fol·liculars formant-hi escassos punts propers a la membrana nuclear, i a la regió perinuclear de les *nurse cells* i cèl·lules fol·liculars (Figura 66).

Lost i Tral podrien participar en la correcta localització de la RNP telomèrica a ovaris

La co-localització perinuclear de *TART* Pol i Lost recorda de nou l'estructura *nuage* (Figura 66), per tant, ja que hem pogut observar que *TART* Pol co-localitza parcialment amb el *nuage* (Figures 37A-37H) i que s'ha descrit que Tral co-localitza amb proteïnes d'aquesta mateixa estructura (Liu L et al 2011), seria possible que les proteïnes Lost, Tral i *TART* Pol estiguessin compartint localització al *nuage*. A més a més, la co-localització de Lost i *TART* Pol en inclusions o punts citoplasmàtics propers al nucli de les cèl·lules fol·liculars recorda a la de la proteïna Armitage en les estructures *Yb-bodies*, implicades en la síntesi o biogènesi primària de piRNAs (Olivieri D et al 2010). En conjunt doncs, aquests resultats semblen indicar que les proteïnes Lost, Tral, i *TART* Pol comparteixen localització en estructures implicades en la via dels piRNAs. En aquest sentit, els resultats que hem obtingut de disminució de quantitat de proteïna *TART* Pol acumulada dins el nucli de les *nurse cells* d'estadi 2-3 a mutants de *tral* i *aubergine* respecte ovaris salvatges (Figura 68) semblen guardar-hi certa relació. El resultat de la Figura 68 suggereix una relació entre *TART* Pol, la proteïna Tral i el silenciament dels retrotransposons telomèrics, on no només estaria tenint lloc el silenciament de *HeT-A* i *TART* a nivell transcripcional sinó també post-traducciona, ja que Tral i Aubergine podrien participar a “retenir” o “silenciar” la proteïna *TART* Pol dins el nucli (o en determinades regions del citoplasma, com es discutirà més endavant). Aquest “segrest” de *TART* Pol provocaria que no es poguessin retrotranscriure ni *HeT-A* ni *TART*, i que per tant no transposessin als telòmers. Però a més, la “retenció” de *TART* Pol per part de Tral i/o d'Aubergine en una estructura que la manté aïllada de la resta de la cèl·lula podria estar evitant que aquesta fos degradada, emmagatzemant-la perquè es trobés disponible més endavant quan fos necessària. Així doncs, podem hipotetitzar que Tral podria ser la proteïna encarregada de dur *TART* Pol fins aquesta zona específica de la cèl·lula (dins

el nucli de les *nurse cells*), on podrien tenir lloc processos de silenciament com la via dels piRNAs.

Paral·lelament, a ovaris mutants per a *lost* i *rump*, així com per a *tral*, observem també una localització anormal de la proteïna *TART* Pol als estadis 9 i 10 de desenvolupament (Figura 69). Aquesta localització anòmala de *TART* Pol podria explicar-se de dues maneres. Per una banda, si el complex Lost-Rump-Tral participa a ovaris salvatges a mantenir els RNAs dels retrotransposons telomèrics emmagatzemats o protegits reprimint-ne la traducció (com es discutirà més endavant), això explicaria que als mutants de *lost-rump* i *tral* pogués detectar-se la proteïna *TART* Pol a localitzacions no habituals, ja que s'estarien traduint els seus trànscrips (tot i no justificar perquè això succeeix només als estadis 9 i 10). Per altra banda, podria ser que la localització aberrant de *TART* Pol fos conseqüència de què els llocs de sortida del reticle endoplasmàtic localitzin anormalment. S'ha trobat que a mutants de *tral* els llocs de sortida del reticle endoplasmàtic presenten una localització aberrant, caracteritzada per molts més punts i de major mida al citoplasma de les *nurse cells* i l'òcit respecte a ovaris salvatges, i que això succeeix precisament a l'estadi 9 (Wilhelm JE et al 2005). Si fos aquest el cas, el fenotip de localització anormal de la proteïna *TART* Pol als estadis 9 i 10 no seria específica, sinó que en realitat seria conseqüència de l'afectació global dels llocs de sortida del reticle endoplasmàtic, alterant probablement la localització de la majoria de proteïnes secretades. Precisament, al final de l'estadi 10 de desenvolupament és quan es formen cabdells de filaments d'actina al citoplasma de les *nurse cells* que irradien des de la membrana cel·lular fins al nucli per mantenir-ne els nuclis a lloc quan es dona el *dumping* en estadis posteriors (Matova N et al 1999). A més, com s'ha descrit, els mutants de *tral* presenten retenció de proteïnes en gàbies d'actina (Snee MJ i Macdonald PM 2009a). Per tant, al mutar-se *Tral* i *Lost-Rump*, la proteïna *TART* Pol podria quedar retinguda en aquestes gàbies d'actina que es formen entre el citoplasma i el nucli de les *nurse cells* a l'estadi 10,

causant fenotips com els que observem a la Figura 69.

Per últim, és interessant remarcar que a Liu L et al 2011 se suggereix un mecanisme pel qual el *nuage* localitza a la perifèria del nucli: Tral (amb localització al *nuage*) interacciona amb CUP, una proteïna que a la vegada interacciona amb la Nucleoporina NUP154 que forma part del complex del porus nuclear. Per tant, el fet que Tral es relacioni amb una proteïna del porus nuclear, i que haguem identificat Tral en la purificació de complexos proteics de *HeT-A* Gag-CTAP (Taula 5), planteja la possibilitat que la localització de *HeT-A* Gag vora la membrana nuclear es doni gràcies a la seva interacció amb Tral. De fet, mitjançant el *software* de predicció d'interaccions *Biogrid* es prediu la possible interacció de Lost amb SIN3A, una proteïna que s'ha publicat anteriorment que interacciona amb Nap-1 (Moshkin YM et al 2009). Per tant, ja que hem comprovat que Nap-1 interacciona amb *HeT-A* Gag (Figura 70), tot plegat indica que les proteïnes Lost, Tral i Nap-1 podrien estar participant en la correcta localització de *HeT-A* Gag dins el nucli (concretament, vora la membrana nuclear).

En conjunt doncs, els diferents resultats descrits anteriorment suggereixen que les proteïnes Lost i Tral podrien estar participant en la correcta localització de les proteïnes telomèriques *TART* Pol i *HeT-A* Gag (i probablement també de tota la RNP telomèrica) a ovaris salvatges de *Drosophila melanogaster* (dins d'estructures o regions concretes de la cèl·lula).

Lost i Tral podrien participar en el silenciament, protecció, i regulació de la traducció dels trànscrips telomèrics

A cèl·lules S2, Lost i Tral localitzen formant inclusions citoplasmàtiques (Figura 64) que corresponen als *P-bodies*, unes estructures implicades en el silenciament, protecció, emmagatzemament, i degradació de trànscrips (Eulalio A et al 2007; Tritschler F et al 2008). Per tant, és possible que Lost i

Tral estiguin reprimint, protegint o regulant la traducció dels RNAs de *HeT-A* o *TART* (o inclús de la RNP telomèrica sencera) dins dels *P-bodies*, o dels *Sponge Bodies*. S'ha descrit que Tral localitza als *Sponge Bodies*, unes altres estructures amb funcions similars a les dels *P-bodies*, al citoplasma de les *nurse cells* i l'òocit dels estadis 6 a 10b (Snee MJ i Macdonald PM 2009b). Aquests són precisament els estadis (6-10b) en què detectem els trànscrips dels retrotransposons telomèrics a ovaris salvatges (Figures 45, 46 i 48), per tant, la interacció entre Tral i els trànscrips telomèrics seria quelcom factible (quant a co-presència en el temps). És possible que la compartimentació d'mRNAs al citoplasma en forma de *P-bodies* o *Sponge bodies* permeti separar els mRNAs o les RNPs en funció del tipus de regulació que requereixen. Un estudi anterior va relacionar diversos components dels *P-bodies* amb la repressió de l'expressió de *HeT-A* (Lim AK et al 2009), i s'ha descrit que els ovaris mutants de *tral* tenen incrementada l'expressió de *HeT-A* (Liu L et al 2011), indicant que la proteïna Tral podria jugar un paper important en el silenciament del retrotransposó *HeT-A*. De fet, mitjançant el *software* de predicció d'interaccions *Biogrid* es prediu la interacció de Tral amb DREF, la qual se sap que interacciona amb Z4 (Kugler SJ et al 2011) i que regula negativament l'expressió de *HeT-A* i *TART* (Silva-Sousa R et al 2013a). Per tant, tots aquests resultats suggereixen que els trànscrips telomèrics podrien ser reprimits o silenciats gràcies a Lost i Tral en aquests compartiments citoplasmàtics (*P-bodies* o *Sponge bodies*) o en la pròpia estructura perinuclear *nuage*.

D'altra banda, Lost i Tral podrien dur a terme una funció alternativa o addicional regulant la traducció dels trànscrips telomèrics, com s'ha esmentat abans. S'ha descrit que Tral participa en la regulació de la traducció neuronal i que interacciona amb CUP, una proteïna que reprimeix la traducció (Barbee SA et al 2006; Tritschler F et al 2008). De fet, s'ha proposat que durant el desenvolupament de *Drosophila* la traducció dels mRNAs podria estar regulada en funció de la localització específica dels trànscrips (definida

per la RNP on es troben), ja que la traducció és activa a la perifèria dels *P-bodies* però es troba reprimida al seu interior (Weil TT et al 2012). Aquest podria ser doncs el mecanisme emprat pels trànscripats telomèrics: que al associar-se amb Tral a l'interior dels *P-bodies* se'n reprimís la traducció i que, quan es desassemblassin els *P-bodies* o els trànscripats telomèrics interaccionessin amb altres proteïnes o bé s'allunyessin del centre dels *P-bodies* fins localitzar a la seva perifèria (on es troben els factors d'activació de la traducció), s'activés la traducció de *HeT-A* (i *TART*).

Els mutants de *tral* presenten una localització incorrecta de diversos mRNAs, sobretot dels que localitzen anteriorment a l'oòcit, com el de *gurken* (*grk*) que localitza a la unió entre el pol anterior de l'oòcit i el còrtex lateral adjacent al seu nucli (Snee MJ i Macdonald PM 2009a). Aquest fenotip possiblement sigui conseqüència de l'alteració dels microtúbuls que presenten aquests mutants a l'oòcit, ja que és un mecanisme de transport i localització emprat per diversos mRNAs. En aquest article, proposen que Tral podria fer de nucli d'assemblament de complexos de tipus RNP regulant-ne la traducció, ja que evitaria que els mRNAs fossin traduïts abans que localitzessin on els pertoca. Donada la identificació de tubulines a totes les purificacions dutes a terme amb *HeT-A* Gag i *TART-RT* (Taula 5), observant que als mutants d'*aubergine* (on estan desreprimits els trànscripats telomèrics) els RNAs *sense* de *HeT-A* i *antisense* de *TART* localitzen anteriorment a l'oòcit als estadis 8, 9 i 10 (Figures 45 i 48), i veient que als mutants de *tral* diversos mRNAs localitzen incorrectament i tenen els microtúbuls alterats (Snee MJ i Macdonald PM 2009a), pot hipotetitzar-se que els trànscripats de *HeT-A* i *TART* (o fins i tot la RNP telomèrica sencera) estiguin emprant la mateixa via de localització que l'mRNA de *grk*: que utilitzin els microtúbuls per desplaçar-se i localitzar adientment a l'oòcit. En aquest cas, Tral podria estar ajudant a la correcta localització dels RNAs de *HeT-A* i *TART* als ovaris de *Drosophila*, reprimint-ne la traducció fins trobar-s'hi ben localitzats i/o ser necessaris. De ser així, seria possible que

Tral facilités l'entrada dels mRNAs telomèrics a l'oòcit ja que, com s'ha comentat, Tral localitza també a l'oòcit. Si aquest fos el cas, la raó per la qual no detectem els trànscrips telomèrics a l'oòcit d'ovaris salvatges podria ser que n'hi hagués molt poques molècules i/o que les tècniques que hem emprat per detectar-los no fossin prou sensibles.

5.3. MODEL PROPOSAT DEL CICLE DE VIDA DELS RETROTRANSPOSONS TELOMÈRICS *HeT-A* I *TART*

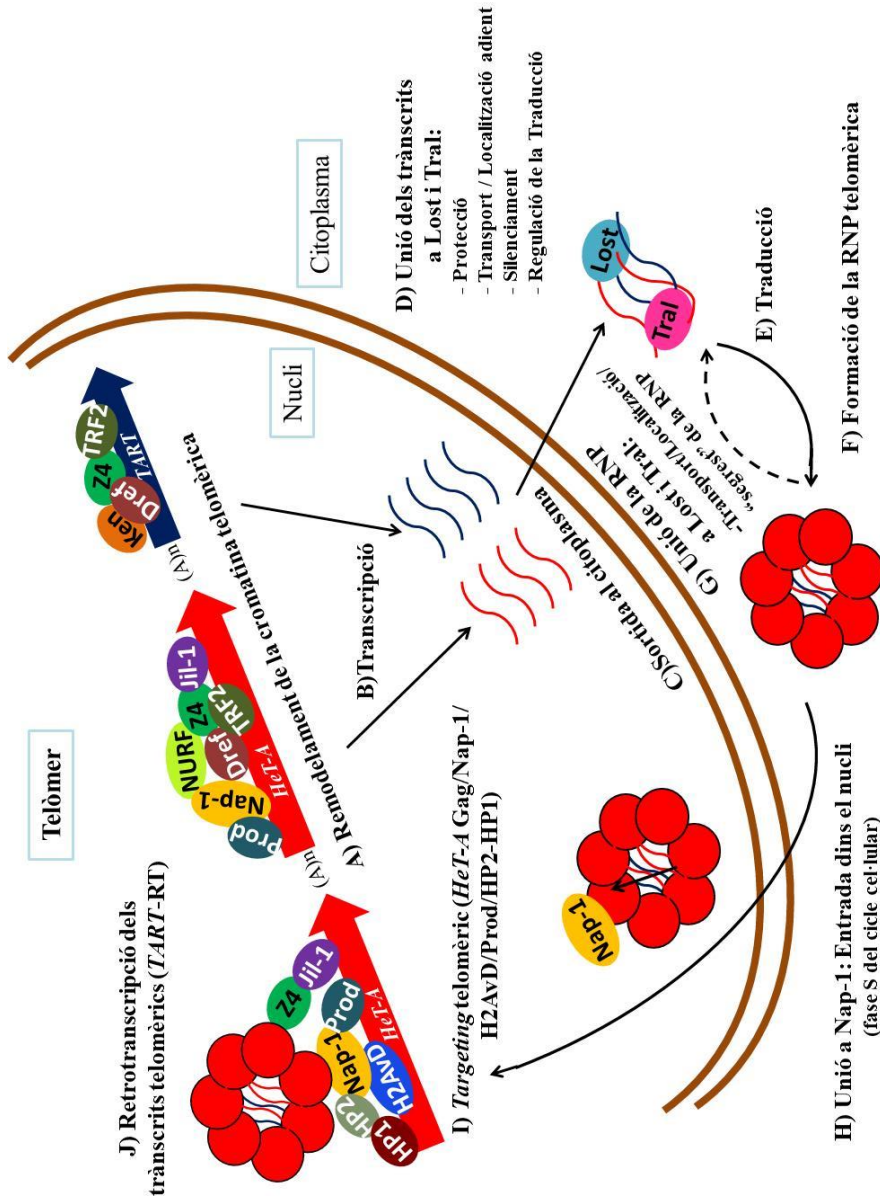
A continuació es presenta una representació gràfica de les diferents hipòtesis suggerides en la discussió dels resultats obtinguts durant la realització d'aquesta tesi per explicar com poden estar tenint lloc els diferents passos del cycle de vida telomèric de *Drosophila melanogaster*.

El model que proposem per al cycle de vida telomèric de *Drosophila* és el següent:

- La transcripció dels retrotransposons telomèrics *HeT-A* i *TART* es troba regulada per diverses proteïnes que interaccionen amb el seu DNA, com són: Jil-1 i Nap-1 (reguladors positius d'expressió de *HeT-A*), Prod (regulador negatiu de *HeT-A*), Ken (regulador negatiu de *TART*), i ZA, DREF i TRF2 (reguladors negatius de *HeT-A* i *TART*). L'expressió dels trànscrips *HeT-A* i *TART* es regula mitjançant el remodelament de la cromatina telomèrica (Figura 75A).
- Quan s'activa l'expressió dels retrotransposons *HeT-A* i *TART* al nucli (Figura 75B), aquests són transcrits a RNA. A continuació, aquests trànscrips telomèrics surten al citoplasma cel·lular (Figura 75C).
- Al citosol, els RNAs de *HeT-A* i *TART* podrien associar-se amb les proteïnes Lost i Tral (Figura 75D), les quals els protegrien de ser degradats i els durien fins a estructures de silenciament i processament de trànscrips com el *nuage*, els *P-bodies* o *Sponge bodies*, els *Yb-bodies*, el *Dot COM*, o similar. Allà, podrien ser degradats directament o ser processats per obtenir-ne piRNAs que regularien post-transcripcionalment l'expressió de *HeT-A* i *TART*. A més, Lost i Tral

- podrien transportar els trànscripats telomèrics i localitzar-los al lloc adient dins la cèl·lula, així com podrien regular-ne la traducció (la seva interacció probablement en reprimiria la traducció).
- Seguidament, quan els trànscripats telomèrics poguessin ser traduïts (Figura 75E), es sintetitzarien les proteïnes *HeT-A* Gag, *TART* Gag i *TART* Pol; les quals s'associarien formant una RNP que contindria els seus propis trànscripats a l'interior (Figura 75F).
 - És possible que Lost i Tral interaccionessin llavors amb les proteïnes de la RNP telomèrica (Figura 75G), transportant-la fins la localització adient i/o protegint-la/"segrestant-la" en compartiments cel·lulars concrets fins ser requerida.
 - A continuació, la proteïna Nap-1 interaccionaria amb *HeT-A* Gag al citoplasma, ajudant a què la RNP telomèrica entrés dins del nucli a la fase S del cicle cel·lular (Figura 75 H).
 - Dins el nucli, Nap-1 facilitaria el *targeting* als telòmers de la RNP telomèrica (Figura 75I), gràcies a la seva interacció amb H2AvD, HP2 (que interacciona amb HP1), (i Prod, que localitza a *HeT-A*). A més, la interacció de *HeT-A* Gag amb Z4 contribuiria a la localització de les proteïnes Z4 i Jil-1 a l'*array* telomèric HTT.
 - Un cop la RNP assolís l'extrem telomèric, la proteïna *TART*-RT retrotranscriuria els RNAs de *HeT-A* i *TART*, afegint noves còpies genòmiques d'aquests retrotransposons al final del cromosoma (Figura 75J), elongant així el telòmer.

Figura 75. Model proposat del cicle de vida telomèric de *Drosophila*. Les fletxes vermella i blau marí representen una còpia genòmica dels retrotransposons telomèrics *HeT-A* i *TART*, respectivament. Els transcrits telomèrics estan dibuixats com a línies ondulades de color vermell i blau. Les proteïnes telomèriques s'han representat en forma de boles vermelles. Les diferents proteïnes cel·lulars que participen en el cicle de vida de *HeT-A* i *TART* s'observen com a cercles de colors diversos. La membrana nuclear es troba dibuixada com dues línies paral·leles corbes de color marró. Veure la descripció al text de cadascun dels passos del cicle de vida telomèric de *Drosophila*.



5.4. RELACIONS AMB ALTRES PROTEÏNES IDENTIFICADES A LES PURIFICACIONS DE COMPLEXES PROTEÏCS

A continuació es presenta un dibuix esquemàtic de resum de totes les interaccions trobades. La finalitat d'aquest dibuix és visualitzar les interrelacions de totes les proteïnes de les quals s'ha parlat anteriorment, així com d'altres que no s'han discutit en detall però de les quals se'n coneix informació, i que possiblement es trobin implicades de forma directa o indirecta en el cicle de vida telomèric de *Drosophila*.

Les interaccions trobades en els experiments duts a terme durant la realització d'aquesta tesi mitjançant la purificació de complexos proteïcs estan marcades amb una línia negra, i les confirmades per immunoprecipitació amb una línia vermella. Les interaccions publicades en treballs anteriors es veuen marcades amb línia verda, i les predites amb els *softwares* de predicció d'interaccions *Biogrid* o *String* s'identifiquen amb línia blava. També s'han dibuixat amb línies discontinües (seguint el mateix codi cromàtic) les interaccions que realitzen diverses proteïnes amb el DNA de *HeT-A* (HTT) i que regulen l'expressió d'aquest retrotransposó (de forma directa o indirecta).

LLEGENDA

- Interaccions trobades en aquest estudi (purificació de complexos proteïcs)
- Interaccions confirmades en aquest estudi (IPs)
- Interaccions publicades (experiments d'articles)
- Interaccions predites (*String* o *Biogrid*)
- - - Regulació de l'expressió de *HeT-A* trobada al nostre lab
- - - Regulació de l'expressió de *HeT-A* publicada (experiments articles)

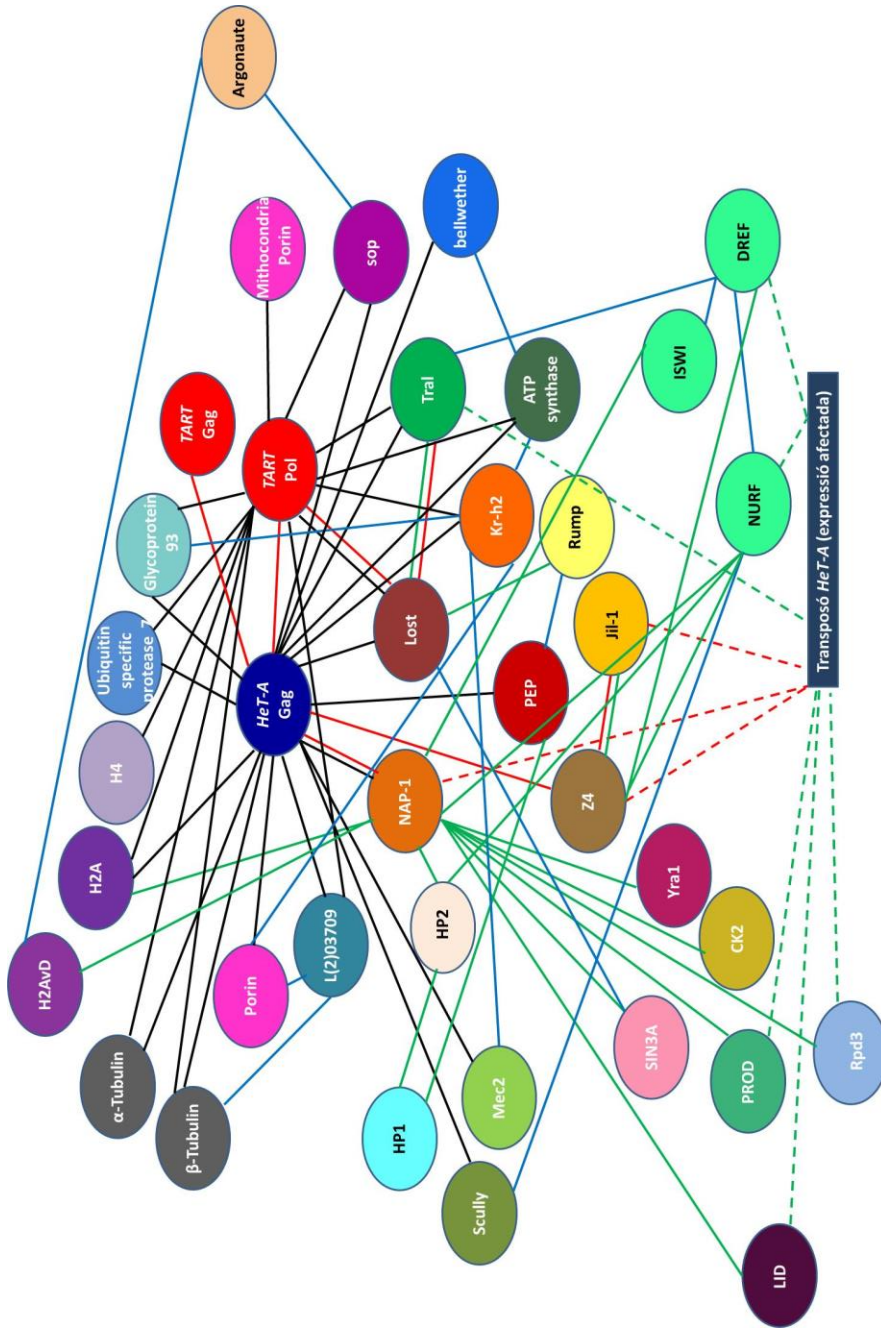


Figura 76. Representació de les diferents interaccions trobades o predites de proteïnes relacionades d'alguna manera amb el cicle de vida telomèric de *Drosophila*.

6. CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1. Les proteïnes *HeT-A* Gag, *TART* Gag i *TART*-RT podrien estar formant part d'un mateix complex o RNP telomèrica.
2. *HeT-A* Gag i *TART* Pol co-localitzen a cèl·lules mitòtiques que repliquen els telòmers, com els neuroblasts i les cèl·lules fol·liculars d'ovaris fins l'estadi 6.
3. A ovaris salvatges detectem les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol a les cèl·lules fol·liculars i les *nurse cells* durant els primers estadis de desenvolupament. Ambdues proteïnes comparteixen localització en tota la regió perinuclear de les cèl·lules fol·liculars.
4. *TART* Pol localitza parcialment al *nuage* i s'acumula en un únic punt que no correspon a cap telòmer dins el nucli de les *nurse cells* d'estadi 2-3.
5. *HeT-A* Gag es sintetitza en grans quantitats a les cèl·lules fol·liculars mitòtiques d'ovaris GIII i *TART* Pol es detecta a ovaris mutants GIII i d'*aubergine* a estadis posteriors als salvatges.
6. A ovaris mutants d'*aubergine* *HeT-A* Gag presenta una localització marcadament diferent respecte a la d'ovaris salvatges a l'òocit, i al nucli i citoplasma de les *nurse cells*.
7. Les proteïnes *HeT-A* Gag i *TART* Pol localitzen a les *pole cells* d'embrió i es detecten als primers estadis de l'oogènesi quan encara no s'hi observen els seus trànscrips, suggerint una possible herència materna de les proteïnes telomèriques de *Drosophila*.
8. A ovaris salvatges es poden detectar els mRNAs de *HeT-A* i *TART*, i l'RNA *antisense* de *TART* mitjançant hibridació *in situ* d'RNA,

indicant la possible existència d'algun mecanisme que permeti que una petita part dels trànscripats telomèrics eludeixin el mecanisme de regulació de la via dels piRNAs.

9. Diferents components de la RNP telomèrica localitzen a les *border cells*. A ovaris salvatges hi detectem la proteïna *TART Pol* i l'mRNA de *HeT-A*; i a ovaris mutants *GIII* i d'*aubergine* s'hi troben aquests mateixos components juntament amb els trànscripats de *TART*.
10. *Z4* interacciona amb *HeT-A Gag* i *Jil-1*.
11. Les proteïnes *Z4*, *Nap-1* i *HeT-A Gag* estan implicades en estabilitat telomèrica.
12. La interacció de *Nap-1* amb *HeT-A Gag* podria facilitar l'entrada de la RNP telomèrica al nucli durant la fase S del cicle cel·lular. Posteriorment, *Nap-1* podria col·laborar també en el *targeting* de la RNP telomèrica als telòmers.
13. *Nap-1* és un regulador positiu de l'expressió de *HeT-A*.
14. *TART Pol* interacciona i co-localitza a ovaris amb *Lost*.
15. *Lost* i *Tral* podrien participar en la correcta localització de la RNP telomèrica a ovaris; així com podrien estar implicades en el silenciament, protecció, i regulació de la traducció dels trànscripats telomèrics.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

Abad, J. P., De Pablos, B., Osoegawa, K., De Jong, P. J., Martín-Gallardo, A., & Villasante, A. (2004a). Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: full-length copies of HeT-A and TART elements at telomeres. *Molecular Biology and Evolution*, 21(9), 1613–9. doi:10.1093/molbev/msh174

Abad, J. P., De Pablos, B., Osoegawa, K., De Jong, P. J., Martín-Gallardo, A., & Villasante, A. (2004b). TAHRE, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. *Molecular Biology and Evolution*, 21(9), 1620–4. doi:10.1093/molbev/msh180

Amero, S. A., Elgin, S. C., & Beyer, A. L. (1991). A unique zinc finger protein is associated preferentially with active ecdysone-responsive loci in *Drosophila*. *Genes & Development*, 5(2), 188–200. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1899840>

Amero, S. A., Matunis, M. J., Matunis, E. L., Hockensmith, J. W., Raychaudhuri, G., & Beyer, A. L. (1993). A unique ribonucleoprotein complex assembles preferentially on ecdysone-responsive sites in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 13(9), 5323–30. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=360230&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Andreyeva, E. N., Belyaeva, E. S., Semeshin, V. F., Pokholkova, G. V., & Zhimulev, I. F. (2005). Three distinct chromatin domains in telomere ends of polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* Tel mutants. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 23), 5465–77. doi:10.1242/jcs.02654

Aravin, A. A., Naumova, N. M., Tulin, A. V., Vagin, V. V., Rozovsky, Y. M., & Gvozdev, V. A. (2001). Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Current Biology*: CB, 11(13), 1017–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470406>

Assa-Kunik, E., Torres, I. L., Schejter, E. D., Johnston, D. S., & Shilo, B.-Z. (2007). *Drosophila* follicle cells are patterned by multiple levels of Notch signaling and antagonism between the Notch and JAK/STAT pathways. *Development (Cambridge, England)*, 134(6), 1161–9. doi:10.1242/dev.02800

Bachmann, A. S., Corpuz, G., Hareld, W. P., Wang, G., & Coller, B. A. (2004). A simple method for the rapid purification of copia virus-like particles from *Drosophila* Schneider 2 cells. *Journal of Virological Methods*, 115(2), 159–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14667531>

Badenhorst, P., Voas, M., Rebay, I., & Wu, C. (2002). Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes & Development*, 16(24), 3186–98. doi:10.1101/gad.1032202

Bao, X., Cai, W., Deng, H., Zhang, W., Krencik, R., Girton, J., ... Johansen, K. M. (2008). The COOH-terminal domain of the JIL-1 histone H3S10 kinase interacts with histone H3 and is required for correct targeting to chromatin. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32741–50. doi:10.1074/jbc.M806227200

Bao, X., Zhang, W., Krencik, R., Deng, H., Wang, Y., Girton, J., ... Johansen, K. M. (2005). The JIL-1 kinase interacts with lamin Dm0 and regulates nuclear lamina morphology of *Drosophila* nurse cells. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 21), 5079–87. doi:10.1242/jcs.02611

Barbee, S. A., Estes, P. S., Cziko, A.-M., Hillebrand, J., Luedeman, R. A., Coller, J. M., ... Ramaswami, M. (2006). Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron*, 52(6), 997–1009. doi:10.1016/j.neuron.2006.10.028

Bilder, D., & Haigo, S. L. (2012). Expanding the morphogenetic repertoire: perspectives from the *Drosophila* egg. *Developmental Cell*, 22(1), 12–23. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.003

Blackburn, E. H. (1984). Telomeres: do the ends justify the means?. *Cell*, 37(1):7-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6722877>

Blackburn, E. H., Greider, C.W., Henderson, E., Lee, M.S., Shampay, J., Shippen-Lentz, D. (1989). Recognition and elongation of telomeres by telomerase. *Genome*;31(2):553-60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2698831>

Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 350(6319):569-73. PMID:1708110

Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106(6), 661–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572773>

Boivin, A., Gally, C., Netter, S., Anxolabéhère, D., & Ronsseray, S. (2003). Telomeric associated sequences of *Drosophila* recruit polycomb-group proteins in vivo and can induce pairing-sensitive repression. *Genetics*, 164(1), 195–208. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1462534&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Bojovic, B., Booth, R. E., Jin, Y., Zhou, X., & Crowe, D. L. (2014). Alternative lengthening of telomeres in cancer stem cells in vivo. *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2013.603

Borghese, L., Fletcher, G., Mathieu, J., Atzberger, A., Eades, W. C., Cagan, R. L., & Rørth, P. (2006). Systematic analysis of the transcriptional switch inducing

migration of border cells. *Developmental Cell*, 10(4), 497–508. doi:10.1016/j.devcel.2006.02.004

Brasset, E., Taddei, A. R., Arnaud, F., Faye, B., Fausto, A. M., Mazzini, M., ... Vaury, C. (2006). Viral particles of the endogenous retrovirus ZAM from *Drosophila melanogaster* use a pre-existing endosome/exosome pathway for transfer to the oocyte. *Retrovirology*, 3, 25. doi:10.1186/1742-4690-3-25

Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 128(6), 1089–103. doi:10.1016/j.cell.2007.01.043

Brennecke, J., Malone, C. D., Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Stark, A., & Hannon, G. J. (2008). An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5906), 1387–92. doi:10.1126/science.1165171

Brown, K. E., Baxter, J., Graf, D., Merckenschlager, M., & Fisher, A. G. (1999). Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Molecular Cell*, 3(2), 207–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10078203>

Burgio, G., Cipressa, F., Ingrassia, A. M. R., Cenci, G., & Corona, D. F. V. (2011). The histone deacetylase Rpd3 regulates the heterochromatin structure of *Drosophila* telomeres. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 12), 2041–8. doi:10.1242/jcs.078261

Capkova Frydrychova, R., Biessmann, H., & Mason, J. M. (2008). Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(3-4), 356–64. doi:10.1159/000167823

Casacuberta, E., Marín, F. A., & Pardue, M.-L. (2007). Intracellular targeting of telomeric retrotransposon Gag proteins of distantly related *Drosophila* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), 8391–6. doi:10.1073/pnas.0702566104

Casacuberta, E., & Pardue, M.-L. (2002). Coevolution of the telomeric retrotransposons across *Drosophila* species. *Genetics*, 161(3), 1113–24. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1462189&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Casacuberta, E., & Pardue, M.-L. (2005). HeT-A and TART, two *Drosophila* retrotransposons with a bona fide role in chromosome structure for more than 60 million years. *Cytogenetic and Genome Research*, 110(1-4), 152–9. doi:10.1159/000084947

Cenci, G., Ciapponi, L., & Gatti, M. (2005). The mechanism of telomere protection: a comparison between *Drosophila* and humans. *Chromosoma*, 114(3), 135–45. doi:10.1007/s00412-005-0005-9

Cenci, G., Siriaco, G., & Gatti, M. (2003). The role of HeT-A and TART retrotransposons in *Drosophila* telomere capping. *Genetica*, 117(2-3), 311–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12723710>

Cenci, G., Siriaco, G., Raffa, G. D., Kellum, R., & Gatti, M. (2003). The *Drosophila* HOAP protein is required for telomere capping. *Nature Cell Biology*, 5(1), 82–4. doi:10.1038/ncb902

Chambeyron, S., Popkova, A., Payen-Groschêne, G., Brun, C., Laouini, D., Pelisson, A., & Bucheton, A. (2008). piRNA-mediated nuclear accumulation of retrotransposon transcripts in the *Drosophila* female germline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 14964–9. doi:10.1073/pnas.0805943105

Cohen, S. B., Graham, M. E., Lovrecz, G. O., Bache, N., Robinson, P. J., & Reddel, R. R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5820), 1850–3. doi:10.1126/science.1138596

Craig, N. L. (2002). *Mobile DNA II* 2nd ed. N. N. Craig, ed. (AMS).

Danilevskaya, O. N., Traverse, K. L., Hogan, N. C., DeBaryshe, P. G., & Pardue, M. L. (1999). The two *Drosophila* telomeric transposable elements have very different patterns of transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 19(1), 873–81. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=83944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Dansereau, D. A., & Lasko, P. (2008). The development of germline stem cells in *Drosophila*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 450, 3–26. doi:10.1007/978-1-60327-214-8_1

De Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development*, 19(18), 2100–10. doi:10.1101/gad.1346005

De Lange, T., Blackburn, E. H., & Lundblad, V. (2006). *Telomeres*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press.

De Lorenzo, C., Strand, D., & Mechler, B. M. (1999). Requirement of *Drosophila* I(2)gl function for survival of the germline cells and organization of the follicle cells in a columnar epithelium during oogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 43(3), 207–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10410900>

- Dej, K. J., & Spradling, A. C. (1999). The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during *Drosophila* oogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 126(2), 293–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9847243>
- Del Rosario, B. C., & Pemberton, L. F. (2008). Nap1 links transcription elongation, chromatin assembly, and messenger RNP complex biogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 28(7), 2113–24. doi:10.1128/MCB.02136-07
- Dernburg, A. F., Broman, K. W., Fung, J. C., Marshall, W. F., Philips, J., Agard, D. A., & Sedat, J. W. (1996). Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell*, 85(5), 745–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8646782>
- Deng, H., Bao, X., Cai, W., Blacketer, M. J., Belmont, A. S., Girton, J., ... Johansen, K. M. (2008). Ectopic histone H3S10 phosphorylation causes chromatin structure remodeling in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 135(4), 699–705. doi:10.1242/dev.015362
- Deng, H., Zhang, W., Bao, X., Martin, J. N., Girton, J., Johansen, J., & Johansen, K. M. (2005). The JIL-1 kinase regulates the structure of *Drosophila* polytene chromosomes. *Chromosoma*, 114(3), 173–82. doi:10.1007/s00412-005-0006-8
- Deng, W. M., Althausen, C., & Ruohola-Baker, H. (2001). Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in *Drosophila* follicle cells. *Development (Cambridge, England)*, 128(23), 4737–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731454>
- Dennis, C., Zanni, V., Brasslet, E., Eymery, A., Zhang, L., Mteirek, R., Jensen, S., Rong, Y. S., & Vaury, C. (2013). ‘Dot COM’, a Nuclear Transit Center for the Primary piRNA Pathway in *Drosophila*. *PLoS ONE* 8(9): e72752. doi:10.1371/journal.pone.0072752
- Desset, S., Buchon, N., Meignin, C., Coiffet, M., & Vaury, C. (2008). In *Drosophila melanogaster* the COM locus directs the somatic silencing of two retrotransposons through both Piwi-dependent and -independent pathways. *PloS One*, 3(2), e1526. doi:10.1371/journal.pone.0001526
- Doheny, J. G., Mottus, R., & Grigliatti, T. A. (2008). Telomeric position effect--a third silencing mechanism in eukaryotes. *PloS One*, 3(12), e3864. doi:10.1371/journal.pone.0003864
- Duband-Goulet, I., & Courvalin, J. C. (2000). Inner nuclear membrane protein LBR preferentially interacts with DNA secondary structures and nucleosomal linker. *Biochemistry*, 39(21), 6483–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828963>
- Dufourt, J., Dennis, C., Boivin, A., Gueguen, N., Théron, E., Goriaux, C., ... Vaury, C. (2014). Spatio-temporal requirements for transposable element piRNA-mediated

silencing during *Drosophila* oogenesis. *Nucleic Acids Research*, 42(4), 2512–24. doi:10.1093/nar/gkt1184

Edgar, B. A., & Orr-Weaver, T. L. (2001). Endoreplication Cell Cycles. *Cell*, 105(3), 297–306. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867401003348>

Edgar, B. A., & Orr-Weaver, T. L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell*, 105(3), 297–306. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348589>

Eggert, H., Gortchakov, A., & Saumweber, H. (2004). Identification of the *Drosophila* interband-specific protein Z4 as a DNA-binding zinc-finger protein determining chromosomal structure. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 18), 4253–64. doi:10.1242/jcs.01292

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., & Izaurralde, E. (2007). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Molecular and Cellular Biology*, 27(11), 3970–81. doi:10.1128/MCB.00128-07

Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M., & Pimpinelli, S. (1998). The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 2(5), 527–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9844626>

Feschotte, C., & Pritham, E. J. (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review of Genetics*, 41, 331–68. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090448

Foe, V. E., & Alberts, B. M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Cell Science*, 61, 31–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6411748>

Font-Burgada, J., Rossell, D., Auer, H., & Azorin, F. (2008). *Drosophila* HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression. *Genes & Development*, 22(21), 3007–23. doi:10.1101/gad.481408

Frydman, H. M., & Spradling, A. C. (2001). The receptor-like tyrosine phosphatase lar is required for epithelial planar polarity and for axis determination within *drosophila* ovarian follicles. *Development (Cambridge, England)*, 128(16), 3209–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11688569>

Frydrychova, R. C., Mason, J. M., & Archer, T. K. (2008). HP1 is distributed within distinct chromatin domains at *Drosophila* telomeres. *Genetics*, 180(1), 121–31. doi:10.1534/genetics.108.090647

- Frydrychová, R., Grossmann, P., Trubac, P., Vítková, M., & Marec, F. (2004). Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects. *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil National de Recherches Canada*, 47(1), 163–78. doi:10.1139/g03-100
- Fujiwara, H., Osanai, M., Matsumoto, T., & Kojima, K. K. (2005). Telomere-specific non-LTR retrotransposons and telomere maintenance in the silkworm, *Bombyx mori*. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 13(5), 455–67. doi:10.1007/s10577-005-0990-9
- Fuller, A. M., Cook, E. G., Kelley, K. J., & Pardue, M.-L. (2010). Gag proteins of *Drosophila* telomeric retrotransposons: collaborative targeting to chromosome ends. *Genetics*, 184(3), 629–36. doi:10.1534/genetics.109.109744
- Gajewski, A., & Krohne, G. (1999). Subcellular distribution of the *Xenopus* p58/lamin B receptor in oocytes and eggs. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 1), 2583–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10393814>
- Gan, M., Moebus, S., Eggert, H., & Saumweber, H. (2011). The Chriz-Z4 complex recruits JIL-1 to polytene chromosomes, a requirement for interband-specific phosphorylation of H3S10. *Journal of Biosciences*, 36(3), 425–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21799255>
- Gao, G., Walser, J.-C., Beaucher, M. L., Morciano, P., Wesolowska, N., Chen, J., & Rong, Y. S. (2010). HipHop interacts with HOAP and HP1 to protect *Drosophila* telomeres in a sequence-independent manner. *The EMBO Journal*, 29(4), 819–29. doi:10.1038/emboj.2009.394
- George, J. A., DeBaryshe, P. G., Traverse, K. L., Celniker, S. E., & Pardue, M.-L. (2006). Genomic organization of the *Drosophila* telomere retrotransposable elements. *Genome Research*, 16(10), 1231–40. doi:10.1101/gr.5348806
- George, J. A., & Pardue, M.-L. (2003). The promoter of the heterochromatic *Drosophila* telomeric retrotransposon, HeT-A, is active when moved into euchromatic locations. *Genetics*, 163(2), 625–35. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1462444&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gou, D., Rubalcava, M., Sauer, S., Mora-Bermúdez, F., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., ... Sauer, F. (2010). SETDB1 is involved in postembryonic DNA methylation and gene silencing in *Drosophila*. *PloS One*, 5(5), e10581. doi:10.1371/journal.pone.0010581
- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, 43(2 Pt 1), 405–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3907856>

Greider, C.W. (1996). Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem*, 65:337-65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8811183/>

Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., & de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97(4), 503–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338214>

Grimaldi, M. R., Cozzolino, L., Malva, C., Graziani, F., & Gigliotti, S. (2007). nup154 genetically interacts with cup and plays a cell-type-specific function during *Drosophila melanogaster* egg-chamber development. *Genetics*, 175(4), 1751–9. doi:10.1534/genetics.106.062844

Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R. D., Shumaker, D. K., & Wilson, K. L. (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(1), 21–31. doi:10.1038/nrm1550

Guarda, A., Bolognese, F., Bonapace, I. M., & Badaracco, G. (2009). Interaction between the inner nuclear membrane lamin B receptor and the heterochromatic methyl binding protein, MeCP2. *Experimental Cell Research*, 315(11), 1895–903. doi:10.1016/j.yexcr.2009.01.019

Hamann, S., & Strätling, W. H. (1998). Specific binding of *Drosophila* nuclear protein PEP (protein on ecdysone puffs) to hsp70 DNA and RNA. *Nucleic Acids Research*, 26(18), 4108–15. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=147826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Handler, D., Meixner, K., Pizka, M., Lauss, K., Schmied, C., Gruber, F. S., & Brennecke, J. (2013). The genetic makeup of the *Drosophila* piRNA pathway. *Molecular Cell*, 50(5), 762–77. doi:10.1016/j.molcel.2013.04.031

Holmer, L., & Worman, H. J. (2001). Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 58(12-13), 1741–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11766875>

Homem, C. C., & Knoblich, J. A. (2012). *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development*, 139(23):4297-310. doi: 10.1242/dev.080515.

Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R., & Kadonaga, J. T. (1996). *Drosophila* NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 3112–24. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=231306&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Jain, R. A., & Gavis, E. R. (2008). The *Drosophila* hnRNP M homolog Rumpelstiltskin regulates nanos mRNA localization. *Development (Cambridge, England)*, 135(5), 973–82. doi:10.1242/dev.015438

Jin, Y., Wang, Y., Johansen, J., & Johansen, K. M. (2000). JIL-1, a chromosomal kinase implicated in regulation of chromatin structure, associates with the male specific lethal (MSL) dosage compensation complex. *The Journal of Cell Biology*, 149(5), 1005–10. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174831&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Johnstone, O., & Lasko, P. (2004). Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development. *Development (Cambridge, England)*, 131(17), 4167–78. doi:10.1242/dev.01286

Jonas, S., & Izaurralde, E. (2013). The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes & Development*, 27(24), 2628–41. doi:10.1101/gad.227843.113

Joppich, C., Scholz, S., Korge, G., & Schwendemann, A. (2009). Umbrea, a chromo shadow domain protein in *Drosophila melanogaster* heterochromatin, interacts with Hip, HP1 and HOAP. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 17(1), 19–36. doi:10.1007/s10577-008-9002-1

Joyce, E. F., Pedersen, M., Tiong, S., White-Brown, S. K., Paul, A., Campbell, S. D., & McKim, K. S. (2011). *Drosophila* ATM and ATR have distinct activities in the regulation of meiotic DNA damage and repair. *The Journal of Cell Biology*, 195(3), 359–67. doi:10.1083/jcb.201104121

Karr, T. L., & Alberts, B. M. (1986). Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila* embryos. *The Journal of Cell Biology*, 102(4), 1494–509. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2114179&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Khurana, J. S., Xu, J., Weng, Z., & Theurkauf, W. E. (2010). Distinct functions for the *Drosophila* piRNA pathway in genome maintenance and telomere protection. *PLoS Genetics*, 6(12), e1001246. doi:10.1371/journal.pgen.1001246

Kidwell, M. G., Kidwell, J. F., & Sved, J. A. (1977). Hybrid Dysgenesis in *DROSOPHILA MELANOGASTER*: A Syndrome of Aberrant Traits Including Mutation, Sterility and Male Recombination. *Genetics*, 86(4), 813–33. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1213713&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Kierszenbaum, A. L. (2000). Telomeres: more than chromosomal non-sticking ends. *Molecular Reproduction and Development*, 57(1), 2–3. doi:10.1002/1098-2795(200009)57:1<2::AID-MRD2>3.0.CO;2-R

Komonyi, O., Schauer, T., Papai, G., Deak, P., & Boros, I. M. (2009). A product of the bicistronic *Drosophila melanogaster* gene CG31241, which also encodes a

trimethylguanosine synthase, plays a role in telomere protection. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 6), 769–74. doi:10.1242/jcs.035097

Kugler, S. J., Gehring, E.-M., Wallkamm, V., Krüger, V., & Nagel, A. C. (2011). The Putzig-NURF nucleosome remodeling complex is required for ecdysone receptor signaling and innate immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 188(1), 127–39. doi:10.1534/genetics.111.127795

Kugler, S. J., & Nagel, A. C. (2007). putzig is required for cell proliferation and regulates notch activity in *Drosophila*. *Molecular Biology of the Cell*, 18(10), 3733–40. doi:10.1091/mbc.E07-03-0263

Kugler, S. J., & Nagel, A. C. (2010). A novel Pzg-NURF complex regulates Notch target gene activity. *Molecular Biology of the Cell*, 21(19), 3443–8. doi:10.1091/mbc.E10-03-0212

Lankenau, S., Barnickel, T., Marhold, J., Lyko, F., Mechler, B. M., & Lankenau, D.-H. (2003). Knockout targeting of the *Drosophila* nap1 gene and examination of DNA repair tracts in the recombination products. *Genetics*, 163(2), 611–23. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1462439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Lee, H. O., Davidson, J. M., & Duronio, R. J. (2009a). Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes & Development*, 23(21), 2461–77. doi:10.1101/gad.1829209

Lee, H. O., Davidson, J. M., & Duronio, R. J. (2009b). Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes & Development*, 23(21), 2461–77. doi:10.1101/gad.1829209

Lee, Y. S., & Carthew, R. W. (2003). Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods (San Diego, Calif.)*, 30(4), 322–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12828946>

Li, C., Vagin, V. V., Lee, S., Xu, J., Ma, S., Xi, H., ... Zamore, P. D. (2009). Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell*, 137(3), 509–21. doi:10.1016/j.cell.2009.04.027

Li, M., Strand, D., Krehan, A., Pyerin, W., Heid, H., Neumann, B., & Mechler, B. M. (1999). Casein kinase 2 binds and phosphorylates the nucleosome assembly protein-1 (NAP1) in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Biology*, 293(5), 1067–84. doi:10.1006/jmbi.1999.3207

Li, Y., & Tergaonkar, V. (2014). Noncanonical functions of telomerase: implications in telomerase-targeted cancer therapies. *Cancer Research*, 74(6), 1639–44. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3568

Lim, A. K., & Kai, T. (2007). Unique germ-line organelle, nuage, functions to repress selfish genetic elements in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 104(16), 6714–9. doi:10.1073/pnas.0701920104
- Lim, A. K., Tao, L., & Kai, T. (2009). piRNAs mediate posttranscriptional retroelement silencing and localization to pi-bodies in the *Drosophila* germline. *The Journal of Cell Biology*, 186(3), 333–42. doi:10.1083/jcb.200904063
- Liu, D., O'Connor, M. S., Qin, J., & Songyang, Z. (2004). Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51338–42. doi:10.1074/jbc.M409293200
- Liu, L., Qi, H., Wang, J., & Lin, H. (2011). PAPI, a novel TUDOR-domain protein, complexes with AGO3, ME31B and TRAL in the nuage to silence transposition. *Development (Cambridge, England)*, 138(9), 1863–73. doi:10.1242/dev.059287
- Lomberk, G., Wallrath, L., & Urrutia, R. (2006). The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biology*, 7(7), 228. doi:10.1186/gb-2006-7-7-228
- Lu, J., & Clark, A. G. (2010). Population dynamics of PIWI-interacting RNAs (piRNAs) and their targets in *Drosophila*. *Genome Research*, 20(2), 212–27. doi:10.1101/gr.095406.109
- Mahajan-Miklos, S., & Cooley, L. (1994). Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Developmental Biology*, 165(2), 336–51. doi:10.1006/dbio.1994.1257
- Maillet, L., Boscheron, C., Gotta, M., Marcand, S., Gilson, E., & Gasser, S. M. (1996). Evidence for silencing compartments within the yeast nucleus: a role for telomere proximity and Sir protein concentration in silencer-mediated repression. *Genes & Development*, 10(14), 1796–811. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8698239>
- Mani, S. R., & Juliano, C. E. (2013). Untangling the web: the diverse functions of the PIWI/piRNA pathway. *Molecular Reproduction and Development*, 80(8), 632–64. doi:10.1002/mrd.22195
- Mani, S. R., Megosh, H., & Lin, H. (2014). PIWI proteins are essential for early *Drosophila* embryogenesis. *Developmental Biology*, 385(2), 340–9. doi:10.1016/j.ydbio.2013.10.017
- Martínez, P., & Blasco, M. A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature Reviews. Cancer*, 11(3), 161–76. doi:10.1038/nrc3025
- Mason, J. M., Frydrychova, R. C., & Biessmann, H. (2008). *Drosophila* telomeres: an exception providing new insights. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 30(1), 25–37. doi:10.1002/bies.20688

Matova, N., Mahajan-Miklos, S., Mooseker, M. S., & Cooley, L. (1999). *Drosophila* quail, a villin-related protein, bundles actin filaments in apoptotic nurse cells. *Development* (Cambridge, England), 126(24), 5645–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572041>

Matsumoto, T., Hamada, M., Osanai, M., & Fujiwara, H. (2006). Essential domains for ribonucleoprotein complex formation required for retrotransposition of telomere-specific non-long terminal repeat retrotransposon SART1. *Molecular and Cellular Biology*, 26(13), 5168–79. doi:10.1128/MCB.00096-06

Matsumoto, T., Takahashi, H., & Fujiwara, H. (2004). Targeted nuclear import of open reading frame 1 protein is required for in vivo retrotransposition of a telomere-specific non-long terminal repeat retrotransposon, SART1. *Molecular and Cellular Biology*, 24(1), 105–22. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=303349&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Maxwell, P. H., Belote, J. M., & Levis, R. W. (2006). Identification of multiple transcription initiation, polyadenylation, and splice sites in the *Drosophila melanogaster* TART family of telomeric retrotransposons. *Nucleic Acids Research*, 34(19), 5498–507. doi:10.1093/nar/gkl709

Mesnard, J.M., & Lebeurier, G. (1991). How do viral reverse transcriptases recognize their RNA genome?. *FEBS Letters*, 287(1-2):1-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1715279>

McClintock, B. (1931). Cytological observations of deficiencies involving known genes, translocations and an inversion in *Zea mays*. *Mo. Agric. Exp. Res. Stn. Res. Bull.* 138, 4–30.

Meignin, C., Dastugue, B., & Vaury, C. (2004). Intercellular communication between germ line and somatic line is utilized to control the transcription of ZAM, an endogenous retrovirus from *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, 32(13), 3799–806. doi:10.1093/nar/gkh708

Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews. Genetics*, 14(7), 447–59. doi:10.1038/nrg3462

Melnikova, L., Biessmann, H., & Georgiev, P. (2005). The Ku protein complex is involved in length regulation of *Drosophila* telomeres. *Genetics*, 170(1), 221–35. doi:10.1534/genetics.104.034538

Melnikova, L., & Georgiev, P. (2002). Enhancer of terminal gene conversion, a new mutation in *Drosophila melanogaster* that induces telomere elongation by gene conversion. *Genetics*, 162(3), 1301–12. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1462325&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Melnikova, L., & Georgiev, P. (2005). *Drosophila* telomeres: the non-telomerase alternative. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 13(5), 431–41. doi:10.1007/s10577-005-0992-7
- Mikhailovsky, S., Belenkaya, T., & Georgiev, P. (1999). Broken chromosomal ends can be elongated by conversion in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 108(2), 114–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10382073>
- Montell, D. J. (2003). Border-cell migration: the race is on. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(1), 13–24. doi:10.1038/nrm1006
- Moshkin, Y. M., Doyen, C. M., Kan, T.-W., Chalkley, G. E., Sap, K., Bezstarosti, K., ... Verrijzer, C. P. (2013). Histone chaperone NAP1 mediates sister chromatid resolution by counteracting protein phosphatase 2A. *PLoS Genetics*, 9(9), e1003719. doi:10.1371/journal.pgen.1003719
- Moshkin, Y. M., Kan, T. W., Goodfellow, H., Bezstarosti, K., Maeda, R. K., Pilyugin, M., ... Verrijzer, C. P. (2009). Histone chaperones ASF1 and NAP1 differentially modulate removal of active histone marks by LID-RPD3 complexes during NOTCH silencing. *Molecular Cell*, 35(6), 782–93. doi:10.1016/j.molcel.2009.07.020
- Nguyen-Chi, M., & Morello, D. (2011). RNA-binding proteins, RNA granules, and gametes: is unity strength? *Reproduction (Cambridge, England)*, 142(6), 803–17. doi:10.1530/REP-11-0257
- Oikemus, S. R., McGinnis, N., Queiroz-Machado, J., Tukachinsky, H., Takada, S., Sunkel, C. E., & Brodsky, M. H. (2004). *Drosophila atm*/telomere fusion is required for telomeric localization of HP1 and telomere position effect. *Genes & Development*, 18(15), 1850–61. doi:10.1101/gad.1202504
- Oikemus, S. R., Queiroz-Machado, J., Lai, K., McGinnis, N., Sunkel, C., & Brodsky, M. H. (2006). Epigenetic telomere protection by *Drosophila* DNA damage response pathways. *PLoS Genetics*, 2(5), e71. doi:10.1371/journal.pgen.0020071
- Olivieri, D., Sykora, M. M., Sachidanandam, R., Mechtler, K., & Brennecke, J. (2010). An in vivo RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 29(19), 3301–17. doi:10.1038/emboj.2010.212
- Olovnikov, A. M. (1971). Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 201(6), 1496–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5158754>
- Osanai, M., Kojima, K. K., Futahashi, R., Yaguchi, S., & Fujiwara, H. (2006). Identification and characterization of the telomerase reverse transcriptase of

Bombyx mori (silkworm) and *Tribolium castaneum* (flour beetle). *Gene*, 376(2), 281–9. doi:10.1016/j.gene.2006.04.022

Pardue, M.-L., & DeBaryshe, P. G. (2002). Telomeres and transposable elements. *Mobile DNA II*. N. Craig, R. Craigie, M. Gellert, and A. Lambowitz, editors. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 870–887.

Pardue, M.-L., & DeBaryshe, P. G. (2008). *Drosophila* telomeres: A variation on the telomerase theme. *Fly* (Austin), 2(3), 101–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18820466>

Pardue, M.-L., Rashkova, S., Casacuberta, E., DeBaryshe, P. G., George, J. A., & Traverse, K. L. (2005). Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila*. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 13(5), 443–53. doi:10.1007/s10577-005-0993-6

Park, Y.-J., & Luger, K. (2006a). Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 84(4), 549–58. doi:10.1139/o06-088

Park, Y.-J., & Luger, K. (2006b). The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1248–53. doi:10.1073/pnas.0508002103

Perrat, P. N., DasGupta, S., Wang, J., Theurkauf, W., Weng, Z., Rosbash, M., & Waddell, S. (2013). Transposition-driven genomic heterogeneity in the *Drosophila* brain. *Science* (New York, N.Y.), 340(6128), 91–5. doi:10.1126/science.1231965

Perrini, B., Piacentini, L., Fanti, L., Altieri, F., Chichiarelli, S., Berloco, M., ... Pimpinelli, S. (2004). HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 15(3), 467–76. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.036

Petit, N., Piñeyro, D., López-Panadès, E., Casacuberta, E., & Navarro, A. (2012). HeT-A_pi1, a piRNA Target Sequence in the *Drosophila* Telomeric Retrotransposon HeT-A, Is Extremely Conserved across Copies and Species. *PloS One*, 7(5), e37405. doi:10.1371/journal.pone.0037405

Phalke, S., Nickel, O., Walluscheck, D., Hortig, F., Onorati, M. C., & Reuter, G. (2009). Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nature Genetics*, 41(6), 696–702. doi:10.1038/ng.360

Piacentini, L., Fanti, L., Negri, R., Del Vescovo, V., Fatica, A., Altieri, F., & Pimpinelli, S. (2009). Heterochromatin protein 1 (HP1a) positively regulates euchromatic gene expression through RNA transcript association and interaction

with hnRNPs in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 5(10), e1000670. doi:10.1371/journal.pgen.1000670

Piñeyro, D., López-Panadès, E., Lucena-Pérez, M., & Casacuberta, E. (2011). Transcriptional analysis of the HeT-A retrotransposon in mutant and wild type stocks reveals high sequence variability at *Drosophila* telomeres and other unusual features. *BMC Genomics*, 12(1), 573. doi:10.1186/1471-2164-12-573

Raffa, G. D., Cenci, G., Siriaco, G., Goldberg, M. L., & Gatti, M. (2005). The putative *Drosophila* transcription factor woc is required to prevent telomeric fusions. *Molecular Cell*, 20(6), 821–31. doi:10.1016/j.molcel.2005.12.003

Raffa, G. D., Siriaco, G., Cugusi, S., Ciapponi, L., Cenci, G., Wojcik, E., & Gatti, M. (2009). The *Drosophila* modigliani (moi) gene encodes a HOAP-interacting protein required for telomere protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2271–6. doi:10.1073/pnas.0812702106

Rashkova, S., Athanasiadis, A., & Pardue, M.-L. (2003). Intracellular targeting of Gag proteins of the *Drosophila* telomeric retrotransposons. *Journal of Virology*, 77(11), 6376–84. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=155015&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Rashkova, S., Karam, S. E., Kellum, R., & Pardue, M.-L. (2002b). Gag proteins of the two *Drosophila* telomeric retrotransposons are targeted to chromosome ends. *The Journal of Cell Biology*, 159(3), 397–402. doi:10.1083/jcb.200205039

Rashkova, S., Karam, S. E., & Pardue, M.-L. (2002a). Element-specific localization of *Drosophila* retrotransposon Gag proteins occurs in both nucleus and cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3621–6. doi:10.1073/pnas.032071999

Rath, U., Ding, Y., Deng, H., Qi, H., Bao, X., Zhang, W., ... Johansen, K. M. (2006). The chromodomain protein, Chromator, interacts with JIL-1 kinase and regulates the structure of *Drosophila* polytene chromosomes. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 11), 2332–41. doi:10.1242/jcs.02960

Rath, U., Wang, D., Ding, Y., Xu, Y.-Z., Qi, H., Blacketer, M. J., ... Johansen, K. M. (2004). Chromator, a novel and essential chromodomain protein interacts directly with the putative spindle matrix protein skeleton. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(5), 1033–47. doi:10.1002/jcb.20243

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., & Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*, 17(10), 1030–2. doi:10.1038/13732

- Riparbelli, M. G., Callaini, G., & Schejter, E. D. (2007). Microtubule-dependent organization of subcortical microfilaments in the early *Drosophila* embryo. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 236(3), 662–70. doi:10.1002/dvdy.21062
- Rodriguez, P., Pelletier, J., Price, G. B., & Zannis-Hadjopoulos, M. (2000). NAP-2: histone chaperone function and phosphorylation state through the cell cycle. *Journal of Molecular Biology*, 298(2), 225–38. doi:10.1006/jmbi.2000.3674
- Rong, Y. S. (2008). Loss of the histone variant H2A.Z restores capping to checkpoint-defective telomeres in *Drosophila*. *Genetics*, 180(4), 1869–75. doi:10.1534/genetics.108.095547
- Rørth, P. (2009). Collective cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 407–29. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113231
- Royou, A., Field, C., Sisson, J. C., Sullivan, W., & Karess, R. (2004). Reassessing the role and dynamics of nonmuscle myosin II during furrow formation in early *Drosophila* embryos. *Molecular Biology of the Cell*, 15(2), 838–50. doi:10.1091/mbc.E03-06-0440
- Saito, K. (2013). The epigenetic regulation of transposable elements by PIWI-interacting RNAs in *Drosophila*. *Genes & Genetic Systems*, 88(1), 9–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23676706>
- Sasaki, T., & Fujiwara, H. (2000). Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267(10), 3025–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806402>
- Sawatsubashi, S., Murata, T., Lim, J., Fujiki, R., Ito, S., Suzuki, E., ... Kato, S. (2010). A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes & Development*, 24(2), 159–70. doi:10.1101/gad.1857410
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., ... Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & Development*, 18(11), 1251–62. doi:10.1101/gad.300704
- Seum, C., Bontron, S., Reo, E., Delattre, M., & Spierer, P. (2007). *Drosophila* G9a is a nonessential gene. *Genetics*, 177(3), 1955–7. doi:10.1534/genetics.107.078220
- Seum, C., Reo, E., Peng, H., Rauscher, F. J., Spierer, P., & Bontron, S. (2007). *Drosophila* SETDB1 is required for chromosome 4 silencing. *PLoS Genetics*, 3(5), e76. doi:10.1371/journal.pgen.0030076

- Sheen, F.M., & Levis, R.W. (1994). Transposition of the LINE-like retrotransposon TART to *Drosophila* chromosome termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26):12510-4.
- Shpiz, S., Kwon, D., Rozovsky, Y., & Kalmykova, A. (2009). rasiRNA pathway controls antisense expression of *Drosophila* telomeric retrotransposons in the nucleus. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 268–78. doi:10.1093/nar/gkn960
- Shpiz, S., Kwon, D., Uneva, A., Kim, M., Klenov, M., Rozovsky, Y., ... Kalmykova, A. (2007). Characterization of *Drosophila* telomeric retroelement TAHRE: transcription, transpositions, and RNAi-based regulation of expression. *Molecular Biology and Evolution*, 24(11), 2535–45. doi:10.1093/molbev/msm205
- Silva-Sousa, R., & Casacuberta, E. (2013). The JIL-1 kinase affects telomere expression in the different telomere domains of *Drosophila*. *PloS One*, 8(11), e81543. doi:10.1371/journal.pone.0081543
- Silva-Sousa, R., López-Panadès, E., & Casacuberta E. (2012). An example of co-evolution with transposable elements. . In M. A. Garrido-Ramos (Ed.), *Genome Dynamics*. 2012, Vol. 7. Repetitive DNA. Retrieved from <http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=showproducts&searchWhat=books&ProduktNr=256867>
- Silva-Sousa, R., López-Panadès, E., Piñeyro, D., & Casacuberta, E. (2012). The chromosomal proteins JIL-1 and Z4/Putzig regulate the telomeric chromatin in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 8(12), e1003153. doi:10.1371/journal.pgen.1003153
- Silva-Sousa, R., Varela, M. D., & Casacuberta, E. (2013). The Putzig partners DREF, TRF2 and KEN are involved in the regulation of the *Drosophila* telomere retrotransposons, HeT-A and TART. *Mobile DNA*, 4(1), 18. doi:10.1186/1759-8753-4-18
- Simmons, M. J., Ryzek, D.-F., Lamour, C., Goodman, J. W., Kummer, N. E., & Merriman, P. J. (2007). Cytotype regulation by telomeric P elements in *Drosophila melanogaster*: evidence for involvement of an RNA interference gene. *Genetics*, 176(4), 1945–55. doi:10.1534/genetics.106.066746
- Sinsimer, K. S., Jain, R. A., Chatterjee, S., & Gavis, E. R. (2011). A late phase of germ plasm accumulation during *Drosophila* oogenesis requires lost and rumpelstiltskin. *Development (Cambridge, England)*, 138(16), 3431–40. doi:10.1242/dev.065029
- Siriaco, G. M., Cenci, G., Haoudi, A., Champion, L. E., Zhou, C., Gatti, M., & Mason, J. M. (2002). Telomere elongation (Tel), a new mutation in *Drosophila melanogaster* that produces long telomeres. *Genetics*, 160(1), 235–45. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1461955&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., & de Lange, T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Molecular and Cellular Biology*, 20(5), 1659–68. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=85349&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Snee, M. J., & Macdonald, P. M. (2004). Live imaging of nuage and polar granules: evidence against a precursor-product relationship and a novel role for Oskar in stabilization of polar granule components. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 10), 2109–20. doi:10.1242/jcs.01059

Snee, M. J., & Macdonald, P. M. (2009a). Bicaudal C and trailer hitch have similar roles in gurken mRNA localization and cytoskeletal organization. *Developmental Biology*, 328(2), 434–44. doi:10.1016/j.ydbio.2009.02.003

Snee, M. J., & Macdonald, P. M. (2009b). Dynamic organization and plasticity of sponge bodies. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 238(4), 918–30. doi:10.1002/dvdy.21914

Spradling, A. (1993). Germline cysts: Communes that work. *Cell*, 72(5), 649–651. doi:10.1016/0092-8674(93)90393-5

Spradling, A. C. (1993). Germline cysts: communes that work. *Cell*, 72(5), 649–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8453660>

Stephens, G. E., Xiao, H., Lankenau, D.-H., Wu, C., & Elgin, S. C. R. (2006). Heterochromatin protein 2 interacts with Nap-1 and NURF: a link between heterochromatin-induced gene silencing and the chromatin remodeling machinery in *Drosophila*. *Biochemistry*, 45(50), 14990–9. doi:10.1021/bi060983y

Takács, S., Biessmann, H., Reddy, H. M., Mason, J. M., & Török, T. (2012). Protein interactions on telomeric retrotransposons in *Drosophila*. *International Journal of Biological Sciences*, 8(7), 1055–61. doi:10.7150/ijbs.4460

Takahashi, H., Okazaki, S., & Fujiwara, H. (1997). A new family of site-specific retrotransposons, SART1, is inserted into telomeric repeats of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Research*, 25(8), 1578–84. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Török, T., Benitez, C., Takács, S., & Biessmann, H. (2007). The protein encoded by the gene proliferation disrupter (*prod*) is associated with the telomeric retrotransposon array in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 116(2), 185–95. doi:10.1007/s00412-006-0090-4

- Török, T., Harvie, P. D., Buratovich, M., & Bryant, P. J. (1997). The product of proliferation disrupter is concentrated at centromeres and required for mitotic chromosome condensation and cell proliferation in *Drosophila*. *Genes & Development*, 11(2), 213–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9009204>
- Tritschler, F., Eulalio, A., Helms, S., Schmidt, S., Coles, M., Weichenrieder, O., ... Truffault, V. (2008). Similar modes of interaction enable Trailer Hitch and EDC3 to associate with DCP1 and Me31B in distinct protein complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 28(21), 6695–708. doi:10.1128/MCB.00759-08
- Van De Bor, V., Hartswood, E., Jones, C., Finnegan, D., & Davis, I. (2005). *gurken* and the I factor retrotransposon RNAs share common localization signals and machinery. *Developmental Cell*, 9(1), 51–62. doi:10.1016/j.devcel.2005.04.012
- Van Driel, R., Fransz, P. F., & Verschure, P. J. (2003). The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 20), 4067–75. doi:10.1242/jcs.00779
- Veraksa, A., Bauer, A., & Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Analyzing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 232(3), 827–34. doi:10.1002/dvdy.20272
- Wagner, N., Weber, D., Seitz, S., & Krohne, G. (2004). The lamin B receptor of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 10), 2015–28. doi:10.1242/jcs.01052
- Walter, M. F., Biessmann, M. R., Benitez, C., Török, T., Mason, J. M., & Biessmann, H. (2007). Effects of telomere length in *Drosophila melanogaster* on life span, fecundity, and fertility. *Chromosoma*, 116(1), 41–51. doi:10.1007/s00412-006-0081-5
- Wang, Y., Zhang, W., Jin, Y., Johansen, J., & Johansen, K. M. (2001). The JIL-1 tandem kinase mediates histone H3 phosphorylation and is required for maintenance of chromatin structure in *Drosophila*. *Cell*, 105(4), 433–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11371341>
- Waterham, H. R., Koster, J., Mooyer, P., Noort Gv, G. van, Kelley, R. I., Wilcox, W. R., ... Oosterwijk, J. C. (2003). Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *American Journal of Human Genetics*, 72(4), 1013–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1180330&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New Biology*, 239(94), 197–201. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4507727>

Wei, C., & Price, M. (2003). Protecting the terminus: t-loops and telomere end-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*: CMLS, 60(11), 2283–94. doi:10.1007/s00018-003-3244-z

Weil, T. T., Parton, R. M., Herpers, B., Soetaert, J., Veenendaal, T., Xanthakis, D., ... Davis, I. (2012). *Drosophila* patterning is established by differential association of mRNAs with P bodies. *Nature Cell Biology*, 14(12), 1305–13. doi:10.1038/ncb2627

Wilhelm, J. E., Buszczak, M., & Sayles, S. (2005). Efficient protein trafficking requires trailer hitch, a component of a ribonucleoprotein complex localized to the ER in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 9(5), 675–85. doi:10.1016/j.devcel.2005.09.015

Wismar, J., Habtemichael, N., Warren, J. T., Dai, J. D., Gilbert, L. I., & Gateff, E. (2000). The mutation without children(*rgl*) causes ecdysteroid deficiency in third-instar larvae of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 226(1), 1–17. doi:10.1006/dbio.2000.9811

Wolpert, L., Jessell T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., & Smith, J. (2007, Third Edition) (1998, First Edition). *Principles of Development*. Oxford University Press.

Wu, T.-J., Chiang, Y.-H., Lin, Y.-C., Tsai, C.-R., Yu, T.-Y., Sung, M.-T., ... Lin, J.-J. (2009). Sequential loading of *Saccharomyces cerevisiae* Ku and Cdc13p to telomeres. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 12801–8. doi:10.1074/jbc.M809131200

Xu, X., Song, Y., Li, Y., Chang, J., Zhang, H., & An, L. (2010). The tandem affinity purification method: an efficient system for protein complex purification and protein interaction identification. *Protein Expression and Purification*, 72(2), 149–56. doi:10.1016/j.pep.2010.04.009

Ye, J., Renault, V. M., Jamet, K., & Gilson, E. (2014). Transcriptional outcome of telomere signalling. *Nature Reviews. Genetics*, 15(7), 491–503. doi:10.1038/nrg3743

Zhang, L., Beaucher, M., Cheng, Y., & Rong, Y. S. (2014). Coordination of transposon expression with DNA replication in the targeting of telomeric retrotransposons in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 33(10), 1148–58. doi:10.1002/emboj.201386940

Zhu, H., Belcher, M., & van der Harst, P. (2011). Healthy aging and disease: role for telomere biology? *Clinical Science (London, England)*: 120(10), 427–40. doi:10.1042/CS20100385

<http://www.developmentalbiology.net/>

ANNEXOS

ANNEX 1

Estudi fenotípic de línies mutants RNAi de *HeT-A* i *Jockey*

8. ANNEXOS

8.1. Annex 1. Estudi fenotípic de línies mutants RNAi de *HeT-A* i *Jockey*

Amb l'objectiu d'analitzar l'efecte fenotípic de la disminució d'expressió dels retrotransposons telomèrics a *Drosophila melanogaster*, van generar-se mosques mutants RNAi de *HeT-A* i *TART*. Van analitzar-se a més els mutants RNAi de *Jockey* per emprar-los com a control. *Jockey* és també un retrotransposó de tipus no-LTR de *Drosophila*, i és el més proper filogenèticament a *HeT-A* i *TART* (Casacuberta E i Pardue ML 2005). L'anàlisi d'aquest mutant control permet discernir els fenotips generals de silenciament d'un retrotransposó no-LTR amb la tècnica d'RNAi dels fenotips específics de silenciar els retrotransposons telomèrics de *Drosophila*.

Els mutants RNAi van generar-se mitjançant un constructe RNAi clonat en un vector pWiz, el qual conté una seqüència UAS (*Upstream Activating Sequence*). La seqüència RNAi comprèn un fragment de DNA d'entre 500 i 700 bp del transcrit a silenciar (en aquest cas, està compost per un fragment dels gens *HeT-A gag*, *TART Pol* o *Jockey gag*). La seqüència gènica d'interès va insertar-se dues vegades i amb una orientació oposada l'una de l'altra a amdós costats d'un intró de *white* (i a continuació de la seqüència activadora de transcripció UAS) (Lee YS i Carthew RW 2003). Després d'injectar aquest constructe RNAi-pWiz a ous de *Drosophila*, van obtenir-se les mosques transgèniques estables. El posterior creuament d'aquestes mosques RNAi amb mosques *driver*, les quals sintetitzen la proteïna Gal4 en teixits específics, fan possible la transcripció del constructe RNAi a la descendència d'aquest creuament (F0) únicament al teixit on dirigeix l'expressió el *driver*. En expressar-se el constructe RNAi (quan la proteïna Gal4 s'uneix a la seqüència UAS) es transcriu un RNA que per complementarietat de seqüència forma un *hairpin*. Aquest és reconegut dins

l'organisme com un RNA de doble cadena i és processat com a tal, donant com a resultat final el silenciament parcial o disminució de l'expressió del transcrit d'interès per la via de l'RNAi, que en el nostre cas serien els mRNAs *full-length* de *HeT-A*, *TART* o *Jockey* (veure l'apartat 1. *Introducció*, Figura 26).

L'estudi que es mostra a continuació presenta els fenotips obtinguts de creuar el mutants RNAi de *HeT-A* i *Jockey* amb mosques *driver* de línia germinal (*daughterless-Gal4* i *maternal-alpha-Gal4*). En aquest cas, els efectes fenotípics poden apreciar-se a partir de la segona generació (F1), ja que quan la F0 madura la seva línia germinal és quan pot apreciar-se l'efecte del silenciament en qüestió a la seva descendència.

Les mosques emprades per a l'estudi són les següents (per a més detalls veure l'apartat 3. *Materials i Mètodes*):

- Línies mutants RNAi (pWiz-UAS):
 - o RNAi de *HeT-A*
 - Cromosoma II: 4-1
 - Cromosoma III: 69-1
 - o RNAi de *Jockey*
 - Cromosoma II: 57-3

- Línies *driver* de línia germinal (Gal4):
 - o Da-Gal4 (*Daughterless-Gal4*) (Cromosoma III)
 - o MataTub-Gal4 (*Maternal α -Tubulin-Gal4*)(Cromosoma II/III)

Tot seguit es presenten algunes imatges dels diferents fenotips obtinguts a la descendència d'aquests creuaments:

- Malformació de segments (cutícula)

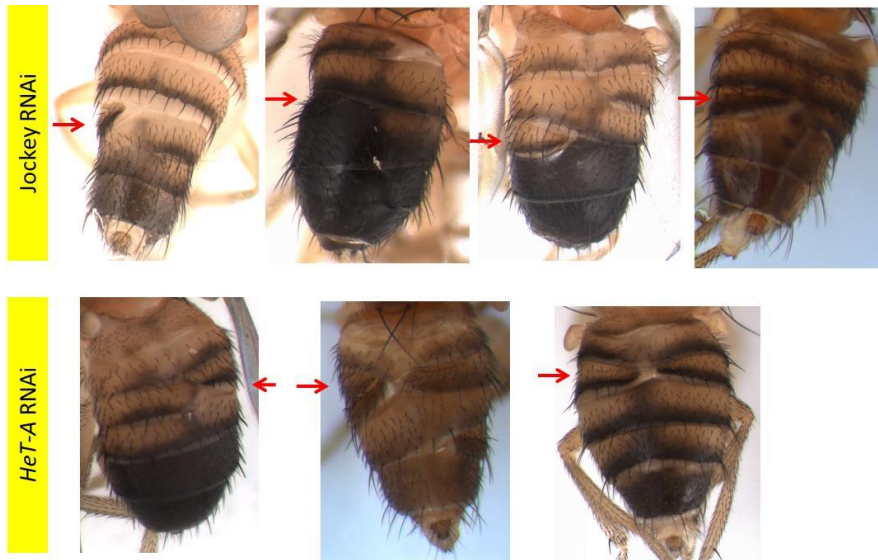


Figura 77. Fenotips de malformació de segments abdominals de mutants RNAi de *Jockey* i *HeT-A* amb *drivers* de línia germinal.

- Despimentació de la cutícula



Figura 78. Fenotips de despimentació de la cutícula de mutants RNAi de *Jockey* amb *drivers* de línia germinal.

- Taques fosques a la cutícula



Figura 79. Fenotip d'aparició de taques fosques a la cutícula de mutants RNAi de *HeT-A* amb *drivers* de línia germinal.

- Malformació d'un dels dos halteris o aparició d'un tercer halteri necròtic



Figura 80. Fenotips de malformació d'un dels dos halteris o d'un tercer halteri necròtic de mutants RNAi de *HeT-A* amb *drivers* de línia germinal.

- Ales sense desplegar



Figura 81. Fenotip d'ala sense desplegar d'un mutant RNAi de *Jockey* amb un *driver* de línia germinal.

- Ales adherides al cos
- Taques negres a les ales
- Forma de l'ala anormal, amb manca de trossos o segments anòmals
- Tòrax malformat amb manca de l'ala esquerra



Figura 82. Fenotips de malformació del tòrax amb manca de l'ala esquerra de mutants RNAi de *HeT-A* amb *drivers* de línia germinal.

A continuació, es presenten taules amb els percentatges en què s'ha trobat cada fenotip en els diferents creuaments estudiats a diverses generacions (de la F1 a la F5). Els valors numèrics comprenen la suma de fenotips dels mutants heterozigots i homozigots de cada genotip mutant. Els percentatges indicats fan referència al total de mascles o femelles per separat que presenten aquell fenotip. Els resultats més rellevants es troben remarcats en vermell.

F1 (suma d'heterozigots i homozigots junts)	4-1 pWiz HeT-A Daughterless				4-1 pWiz HeT-A Maternal				69-1 pWiz HeT-A Maternal				57-3 pWiz Jockey Maternal	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
Femelles/Mascles:														
Normals	32 (66,67%)	28 (66,67%)	35 (50,72%)	28 (50,91%)	17 (47,22%)	24 (42,11%)	7 (25,93%)	16 (47,06%)	0	0	0	0	0	0
Taques negres o ratlles	0	5 (11,9%)	19 (27,54%)	13 (23,64%)	11 (30,56%)	25 (43,86%)	13 (48,15%)	5 (14,71%)	0	0	0	0	0	0
Ales arrugades-mal desplegadas/acherides al cos	13 (27,1%)	9 (21,43%)	7 (10,14%)	6 (10,91%)	5 (13,89%)	5 (8,77%)	4 (14,82%)	2 (5,88%)	0	0	0	0	0	0
Segments malformats	0	0	8 (11,59%)	8 (14,55%)	3 (8,33%)	3 (5,26%)	3 (11,11%)	11 (32,35%)	0	0	0	0	0	0
Bulto-taca petita marronós-negra a l'abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tórax malformat + NO ala esquerra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Despigmentació cutícula (dreta últim segment)	2 (4,17%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ales malformades	1 (2,08%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Número total (100% de cada columna)	48	42	69	55	36	57	27	34						

Resum mosques RNAi (F1)

Taula 8. Número i percentatge de mosques mutants RNAi amb els fenotips descrits obtingudes a la F1 (2a generació; descendència de creuar les mosques heterozigotes de la 1a generació F0 entre elles).

F2 (suma d'heterozigots i homozigots junts)	HeT-A RNAi						Jockey RNAi	
	4-1 pWiz HeT-A Daughtertless		4-1 pWiz HeT-A Maternal		69-1 pWiz HeT-A Maternal		57-3 pWiz Jockey Maternal	
	F	M	F	M	F	M	F	M
Femelles/Masclles:								
Normals	59 (54,1%)	44 (55%)	38 (52,1%)	52 (65,8%)	19 (55,88%)	40 (66,67%)	44 (72,13%)	51 (83,61%)
Taques negres o ratlles a les ales	14 (12,8%)	8 (10%)	21 (28,77%)	13 (16,46%)	6 (17,65%)	8 (13,33%)	8 (13,11%)	5 (8,2%)
Ales arrugades-mal desplegadas/adherides al cos	36 (33%)	27 (33,8%)	9 (12,3%)	11 (13,92%)	9 (26,47%)	7 (11,67%)	5 (8,2%)	2 (3,28%)
Segments malformats	0	1 (1,25%)	1 (1,37%)	2 (2,53%)	0	5 (8,33%)	4 (6,56%)	2 (3,28%)
Bulto-taca petita marronosa-negra a l'abdomen	0	0	1 (1,37%)	0	0	0	0	0
Tórax malformat + NO ala esquerra	0	0	2 (2,74%)	0	0	0	0	0
Despigmentació cutícula (dreta últim segment)	0	0	0	1 (1,27%)	0	0	0	1 (1,64%)
Halterí malformat	0	0	1 (1,37%)	0	0	0	0	0
Número total (100% de cada columna)	109	80	73	79	34	60	61	61

Resum mosques RNAi (F2)

Taula 9. Número i percentatge de mosques mutants RNAi obtingudes a la F2 amb els fenotips descrits.

F3 (suma d'heterozigots i homozigots Junts)	HeT-A RNAi						Jockey RNAi	
	4-1 pWiz HeT-A Daughterless		4-1 pWiz HeT-A Maternal		Maternal 69-1 pWiz HeT-A		57-3 pWiz Jockey Maternal	
	F	M	F	M	F	M	F	M
Femelles/Masclles:								
Normals	34 (70,83%)	38 (67,86%)	76 (79,17%)	113 (88,28%)	40 (62,5%)	56 (72,73%)	84 (66,67%)	114 (83,21%)
Taques negres o ratlles ales	4 (8,33%)	5 (8,93%)	7 (7,29%)	4 (3,13%)	14 (21,88%)	7 (9,09%)	23 (18,25%)	6 (4,38%)
Ales arrugades-mal desplegades/adherides al cos	10 (20,83%)	13 (23,21%)	6 (6,25%)	9 (7,03%)	6 (9,38%)	7 (9,09%)	10 (7,94%)	8 (5,84%)
Segments malformats	0	0	5 (5,21%)	2 (1,56%)	4 (6,25%)	6 (7,79%)	9 (7,14%)	6 (4,38%)
Bulto-taca petita marronós-negra a l'abdomen	0	0	1 (1,04%)	0	0	0	0	0
Tòrax malformat + NO ala esquerra	0	0	1 (1,04%)	0	0	0	0	0
Despigmentació cutícula (dreta últim segment)	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,73%)
Ales malformades	0	0	0	0	0	0	0	2 (1,46%)
Halterí malformat	0	0	0	0	0	1 (1,3%)	0	0
Número total	48	56	96	128	64	77	126	137

Taula 10. Número i percentatge de mosques mutants RNAi obtingudes a la F3 amb els fenotips descrits.

Resum mosques RNAi (F4)

F4 (suma d'heterozigots i homozigots junts)	HeT-A RNAi				Jockey RNAi					
	4-1 pWiz HeT-A Daughterless		4-1 pWiz HeT-A Maternal		69-1 pWiz HeT-A Maternal		57-3 pWiz Jockey Maternal		57-3 pWiz Jockey Daughterless	
Femelles/Masclés:	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
Normals	21 (55,26%)	14 (58,33%)	85 (77,98%)	107 (92,24%)	37 (61,67%)	72 (79,12%)	84 (80,77%)	111 (86,72%)	13 (56,52%)	8 (44,44%)
Taques negres o ratlles ales	1 (2,63%)	1 (4,17%)	16 (14,68%)	4 (3,45%)	14 (23,33%)	5 (5,49%)	9 (8,65%)	2 (1,56%)	1 (4,35%)	1 (5,56%)
Ales arrugades-mal desplegades/adherides al cos	14 (36,84%)	9 (37,5%)	5 (4,59%)	3 (2,59%)	1 (1,67%)	1 (1,1%)	4 (3,85%)	9 (7,03%)	8 (34,78%)	8 (44,44%)
Segments malformats	0	0	3 (2,75%)	1 (0,86%)	8 (13,33%)	9 (9,89%)	7 (6,73%)	6 (4,69%)	0	1 (5,56%)
Bulto-taca petita marronós-negra a l'abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tórax malformat + NO ala esquerra	1 (2,63%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Despigmentació cutícula (dreta últim segment)	0	0	0	0	0	3 (3,3%)	0	0	0	0
Halteri malformat	0	0	0	0	0	1 (1,1%)	0	0	0	0
Ala malformada	0	0	0	1 (0,86%)	0	0	0	0	1 (4,35%)	0
Número total	38	24	109	116	60	91	104	128	23	18

Taula 11. Número i percentatge de mosques mutants RNAi obtingudes a la F4 amb els fenotips descrits.

F5 (suma d'heterozigots i homozigots junts)	HeT-A RNAi				Jockey RNAi					
	4-1 pWiz HeT-A Daughterless		4-1 pWiz HeT-A Maternal		69-1 pWiz HeT-A Maternal		57-3 pWiz Jockey Maternal		57-3 pWiz Jockey Daughterless	
Femelles/Masclles:	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
Normals	57 (76%)	62 (78,48%)	69 (76,67%)	103 (83,74%)	50 (69,44%)	70 (78,65%)	69 (75%)	77 (85,56%)	12 (37,5%)	23 (62,16%)
Taques negres o ratlles ales (2,67%)	2	0	13 (14,44%)	4 (3,25%)	14 (19,44%)	4 (4,49%)	7 (7,61%)	1 (1,11%)	13 (40,63%)	3 (8,11%)
Ales arrugades-mal desplegades/adherides al cos (20%)	15 (20%)	14 (17,72%)	4 (4,44%)	11 (8,94%)	4 (5,56%)	6 (6,74%)	12 (13,04%)	8 (8,89%)	7 (21,88%)	6 (16,22%)
Segments malformats	0	0	3 (3,33%)	2 (1,63%)	1 (1,39%)	8 (8,99%)	2 (2,17%)	4 (4,44%)	0	0
Bulto-taca petita marronós- negra a l'abdomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tórax malformat + NO ala esquerra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alteració pigmentació cutícula (1,33%)	1 (1,33%)	3 (3,8%)	0	3 (2,44%)	0	0	1 (1,09%)	0	0	2 (5,41%)
Halterí malformat	0	0	1 (1,11%)	0	1 (1,39%)	0	0	0	0	0
Ales malformades	0	0	0	0	1 (1,39%)	1 (1,12%)	1 (1,09%)	0	0	3 (8,11%)
Pota més curta del normal (l'esquerra i més posterior)	0	0	0	0	1 (1,39%)	0	0	0	0	0
Número total	75	79	90	123	72	89	92	90	32	37

Resum mosques RNAi (F5)

Taula 12. Número i percentatge de mosques mutants RNAi obtingudes a la F5 amb els fenotips descrits.

El retrotransposó *Jockey* es troba insertat a regions eucromatíniques, al costat d'altres gens. Els fenotips que observem en aquests mutants control poden ser conseqüència probablement de què el silenciament d'aquest retrotransposó estigui afectant els gens eucromatínics propers a ell, i que sigui doncs un efecte indirecte del seu silenciament.

En conjunt, el més remarcable de tots aquests resultats és l'obtenció de dos fenotips únics als mutants RNAi de *HeT-A* absents al control (RNAi de *Jockey*), que són: la malformació del tòrax amb manca de l'ala esquerra; i la malformació (mida engrandida i coloració negrosa, de tipus necròtic) d'un dels dos halteris o d'un tercer halteri aberrant. A més, hem pogut obtenir aquests fenotips a diferents generacions dels mutants de *HeT-A* creuats amb diferents *drivers*. Un fet interessant també és que el fenotip de malformació de l'halteri l'hem observat tant a mascles com a femelles, però en canvi, la malformació del tòrax amb manca de l'ala esquerra només és present a femelles. Tot i que els percentatges amb què s'observen aquests fenotips aberrants són molt baixos, el fet d'observar-los únicament als mutants de *HeT-A* RNAi, i tant als mutants 4-1 com als 69-1 creuats amb diferents *drivers*, així com no trobar-se al control (mutant RNAi de *Jockey*), fan que es presentin com un fenotip interessant a tenir en compte de la mutació d'aquest retrotransposó telomèric.

En resum doncs, la disminució d'expressió per RNAi de *HeT-A* sembla afectar al desenvolupament del tòrax, l'ala esquerra i els halteris de *Drosophila melanogaster*.

Els halteris són unes estructures en forma de baqueta que es formen a *Drosophila melanogaster* quan les ales posteriors (presentes als insectes ancestrals de 4 ales) no es desenvolupen. Les ales, així com altres òrgans adults, es formen a partir dels discos imaginals de la larva durant l'estadi de pupa quan les hormones hi indueixen la metamorfosi. Els discos imaginals són petites làmines d'unes 40 cèl·lules que provenen de la blastoderma

cel·lular i que donen lloc a cèl·lules epidèrmiques. Hi ha diversos discos imaginals, un per a cada ala, per a cada halteri, i per a cadascuna de les altres estructures adultes (Wolpert L et al 2007).

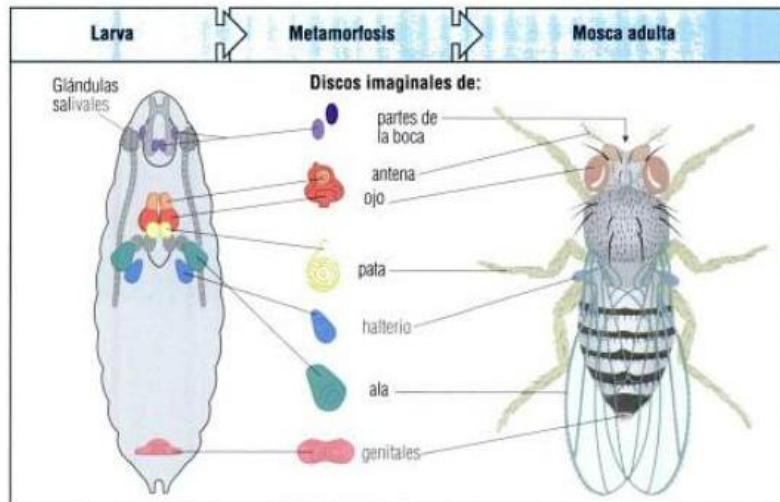


Figura 83. Discos imaginals que donen lloc a les estructures adultes durant la metamorfosi de *Drosophila* (Wolpert L et al 2007).

Els fenotips de manca de l'ala esquerra i malformació de l'halteri als mutants RNAi de *HeT-A* suggereixen la implicació d'aquest retrotransposó telomèric en el desenvolupament o proliferació dels discos imaginals d'ala i d'halteri. Pot hipotetitzar-se doncs que aquests discos imaginals requereixin una major replicació telomèrica durant la metamorfosi que d'altres, i que siguin per tant els més afectats pel silenciament de *HeT-A*.

La malformació de part del tòrax que observem en alguns d'aquests mutants suggereix també la possible afectació ja a l'embrió tardà a nivell dels 3 segments toràcics (T1, T2 i T3). De fet, les ales corresponen a T2 i l'halteri a T3, així com el tòrax a T1 i T2 (Wolpert L et al 2007). El tipus de malformació que hem observat al tòrax suggereix la possible afectació del segment T2 més que no de T1 (veure el dibuix de la Figura 84).

Així, podem plantejar dues possibles explicacions dels resultats obtinguts. Per una banda, podria ser que el silenciament de *HeT-A* afectés, d'alguna manera que encara desconexim, al correcte desenvolupament dels segments T2 i T3 de l'embrió tardà. I per altra banda, també hi ha l'opció que estigui actuant en un estadi posterior: a nivell dels discos imaginals d'ala i halteri a la larva; o bé fins i tot durant el desenvolupament o proliferació d'aquests discos imaginals a l'estadi de pupa, quan s'han de formar l'ala i l'halteri adults.

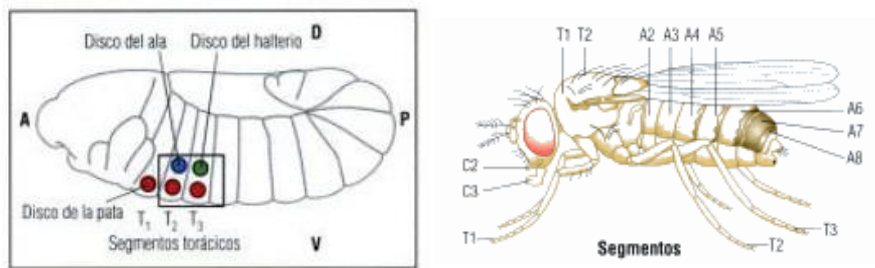


Figura 84. Posició dels discos imaginals a l'embrió tardà de *Drosophila* i relació entre els segments de l'embrió tardà i els apèndixs als quals dona lloc en la mosca adulta (Wolpert L et al 2007).

A més, com s'observa a continuació, el silenciament per RNAi de *HeT-A* del creuament del mutant 4-1 amb el *driver* Da-Gal4 incubat a 29°C és letal a pupa (i en alguns casos ho és ja a larva). Les imatges següents corresponen a larves i pupes F5 d'aquest creuament.



Figura 85. Fenotip de letalitat de larves i pupes F5 mutants RNAi 4-1 *HeT-A*; Da-Gal4 incubades a 29°C.

Val a dir que tots aquests resultats són encara preliminars i cal acabar de confirmar-los, així com manca també comprovar per *Real-time PCR* la disminució dels nivells d'expressió de *HeT-A* i *Jockey* en aquests mutants. No obstant, aquestes primeres dades obtingudes dels efectes fenotípics a mutants RNAi de *HeT-A* es presenten com el primer pas d'una línia d'investigació interessant a seguir estudiant en un futur proper.

La mutació total de *HeT-A* (K.O.) no és possible tècnicament a conseqüència de l'elevat número de còpies genòmiques que presenta aquest element mòbil. A més, aquest mutant seria, molt probablement, inviable. Així doncs, la continuació d'aquest estudi amb mutants RNAi dels retrotransposons telomèrics de *Drosophila* permetrà discernir la implicació de *HeT-A* i *TART* en el desenvolupament d'aquest organisme i comprovar l'efecte fenotípic de la disminució de la seva expressió per la via d'RNAi.

