



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio funcional de la variante embrionaria de la histona H1 de *Drosophila*

Paula Climent Cantó

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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 Doctorado de Genética

Departamento de Genética

Facultad de Biología

Universidad de Barcelona

## **Estudio funcional de la variante embrionaria de la histona H1 de *Drosophila***

Memoria presentada por Paula Climent Cantó para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona. Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Ferran Azorín Marín en el Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona) y el Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC).

El director de la tesis,

La tutora,

Dr. Ferran Azorín Marín

Dra. Susana Balcells Comas

La autora,

Paula Climent Cantó

Barcelona, marzo de 2019



*A mon père.*



## AGRADECIMIENTOS

Ara que mire enrere i veig tot el que he viscut durant aquests anys puc dir que ha sigut un camí llarg i amb moments difícils, però també ple de molts bons records. Voldria tancar aquesta etapa agraint a les persones que m'han acompanyat al llarg d'aquest procés.

En primer lloc, vull agrair-li al Ferran el haver-me donat l'oportunitat de poder desenvolupar aquest projecte. També vull fer una especial menció a l'Albert, per tota l'ajuda i el suport durant aquests darrers anys; i, per descomptat, a l'Òscar per tots els anàlisis bioinformàtics i la seua ajuda en aquest projecte. També vull agrair a la llarga llista de gent que ha passat pel PBA3 durant la meua estada. Al Salva per la seua amistat i per tots els moments de bogeria als que ens arrossegaves; a la Maria, l'Anna i el Gianmarco per haver compartit tants bons moments durant aquests anys, no podria haver tingut millors companys de viatge. També vull donar les gràcies a l'Alicia, per haver-me ajudat a passar stocks, a recollir embrions, fer minipreps i en definitiva amb tot allò que li demanara quan necessitava ajuda, però sobretot, per la seua amistat i per totes aquelles converses matinals i intercanvi de cotilleos. També vull donar-li les gràcies a la Paula Escudero, per tants bons moments aquests últims mesos; a l'Olga i la Mònica per la seua disponibilitat i respondre sempre a les meues preguntes. I per descomptat també vull agrair a la Lluïsa, el Jordi, l'Eva, la Carolina, el Milos, la Paula Bujosa, l'Aleix i la Marta. Allà on vaja estic segura que us trobaré a faltar.

Aquests darrers anys he conegut molta gent, però cap amb la rellevància que va tindre l'Ada per a mi. Per això li vull donar les gràcies, no només per ser una gran mentora, sinó també per la seua amistat, pel seu suport i pels seus valuosos consells durant tots aquests anys.

També vull agrair a la resta de gent que he conegut al Parc, però en especial a Daniela, Juanjo, Celia, Lada i Elena per tots els bons moments que hem passat, no només a la sala de mosques sinó fora del Parc. Encara em ric quan recorde aquelles voltes en què algú ens va vindre a renyar perquè rèiem "massa"... A Daniela en particular li vull també donar les gràcies per tots els seus ànims a casa durant el període escriptura.

No em puc oblidar de Saray, Maribel, Olga, Andrea i Marc ni de tots aquests anys junts a Barcelona, moltes gràcies pel vostre suport constant. Tampoc em puc deixar a Estela,

amb qui he compartit tantes frustracions i alegries; ni a Pablo i Eric, gràcies pel vostre interès malgrat la distància.

Per acabar, vull agrair a la meua família, especialment a mon, per animar-me sempre amb tot el que feia i pel seu suport al llarg d'aquests anys.





---

**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Estructura de la cromatina</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. La histona H1</b> .....	<b>5</b>
1.2.1. Estructura de la histona H1 .....	5
1.2.2. Función de la histona H1 .....	7
1.2.3. Variantes de histona H1 .....	8
1.2.4. La variante germinal y embrionaria de <i>Drosophila melanogaster</i> : dBigH1 .....	12
<b>1.3. La línea germinal de <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>16</b>
1.3.1. La línea germinal femenina .....	16
1.3.1.1. La oogénesis .....	18
1.3.1.2. Mecanismos de regulación en la línea germinal femenina .....	20
1.3.2. La línea germinal masculina .....	21
1.3.2.1. Mecanismos de regulación en la línea germinal masculina .....	23
<b>1.4. La transcripción y la RNA polimerasa II</b> .....	<b>24</b>
1.4.1. Papel de las modificaciones de las histonas en la transcripción .....	26
1.4.2. Complejos remodeladores de la cromatina .....	28
<b>1.5. La regulación de la traducción en organismos eucariotas</b> .....	<b>29</b>
1.5.1. Regulación de la longitud de la cola de poli(A) .....	29
1.5.3. Poliadenilación alternativa .....	30
1.5.4. Regulación mediante proteínas de unión a RNA .....	30
1.5.5. Regulación mediante microRNAs .....	31
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1. Materiales</b> .....	<b>39</b>
3.1.1. Cepas bacterianas .....	39
3.1.2. Plásmidos .....	39
3.1.2.1. Plásmidos de clonaje .....	39
3.1.2.2. Plásmidos para la expresión de proteínas en células S2 de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	39
3.1.2.3. Plásmidos para la generación de líneas transgénicas de moscas .....	40
3.1.3. Líneas celulares .....	40

3.1.4. Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	41
3.1.5. Oligonucleótidos .....	42
3.1.6. Anticuerpos.....	45
<b>3. 2. Métodos.....</b>	<b>46</b>
3.2.1. Técnicas de manipulación del DNA .....	46
3.2.1.1. PCR.....	46
3.2.1.2. Transformación de células competentes .....	46
3.2.1.3. Minipreparación de DNA plasmídico.....	46
3.2.1.4. Maxipreparación de DNA plasmídico.....	47
3.2.1.5. Transfección de células S2 .....	47
3.2.2. Técnicas de análisis del DNA.....	48
3.2.2.1. Electroforesis de DNA en gel de agarosa .....	48
3.2.2.2. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	48
3.2.2.3. PCR cuantitativa.....	50
3.2.2.4. Secuenciación i análisis .....	51
3.2.3. Técnicas de análisis del RNA.....	51
3.2.3.1. Extracción de RNA.....	51
3.2.3.2. RT-qPCR.....	52
3.2.1.3. Amplificación rápida de extremos de cDNA (3'RACE) .....	52
3.2.3.2. Arrays de expresión .....	53
3.2.4. Técnicas de análisis de proteínas.....	53
3.2.4.1. Extracción proteica.....	53
3.2.4.2. Extracción ácida de histonas con ácido clorhídrico 0,2N.....	53
3.2.4.3. Electroforesis en gel de acrilamida .....	54
3.2.4.4. Tinción con Coomassie blue .....	55
3.2.4.5. Western blot (WB).....	55
3.2.4.6. Inmunofluorescencia .....	56
3.2.4.6.1. Inmunofluorescencia en células S2 .....	56
3.2.4.6.2. Inmunofluorescencia en cromosomas politénicos .....	56
3.2.4.6.3. Inmunofluorescencia en ovarios .....	57
3.2.5. Expresión en las líneas celulares estables .....	58
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1. Análisis de la función de dBigH1 en transcripción .....</b>	<b>63</b>
4.1.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de dBigH1 .....	63
4.1.1.1. La proteína dBigH1 se incorpora a lo largo de la cromatina y afecta a la unión de dH1 .....	63
4.1.1.2 dBigH1 afecta negativamente la expresión génica.....	67
4.1.1.3. dBigH1 reprime la expresión de <i>bam</i> .....	73

4.1.2. Análisis funcional de los dominios de dBigH1.....	74
4.1.2.1. El CTD es necesario para la unión a la cromatina.....	74
4.1.2.2. El NTD es necesario para el reemplazo de dH1.....	77
4.1.2.3. El NTD es necesario para la represión de la transcripción.....	81
4.1.3. dBigH1 interfiere en la unión de la RNA polimerasa II y la acetilación de las histonas	83
<b>4.2. Análisis de la expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina.....</b>	<b>90</b>
4.2.1. Patrón de expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina.....	90
4.2.2. Regulación de la expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina .....	96
4.2.2.2. Estudio del papel de diferentes RBP en la regulación de dBigH1 .....	98
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>5.1. Análisis de la función de dBigH1 .....</b>	<b>107</b>
5.1.1. dBigH1 se incorpora a la cromatina de manera uniforme y afecta a la unión de dH1 y la transcripción .....	107
5.1.2. Función de los dominios de dBigH1.....	109
5.1.2.1. El CTD es necesario para la unión a la cromatina.....	109
5.1.2.2. El dominio ED es el responsable del reemplazo de dH1 y de la represión de la transcripción .....	110
5.1.3 dBigH1 modifica el estado epigenético de la cromatina activa.....	112
<b>5.2. Análisis del patrón de expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina y de su regulación .....</b>	<b>114</b>
5.2.1. dBigH1 coexiste con la variante somática dH1 en diversos estadios del desarrollo de las células germinales femeninas .....	114
5.2.2. La expresión de dBigH1 se regula postranscripcionalmente en los cistos a través de señales contenidas en el 3'UTR.....	116
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>119</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>123</b>
<b>8. ANNEXO .....</b>	<b>149</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Grados de compactación de la cromatina .....	4
<b>Figura 2.</b> Estructura de la histona H1 y modos de interacción con el nucleosoma .....	6
<b>Figura 3.</b> Variantes de histona H1 en varias especies.....	8
<b>Figura 4.</b> Las variantes de H1 presentes en el oocito se mantienen en la embriogénesis hasta la activación del genoma zigótico.....	10
<b>Figura 5.</b> Comparación de la estructura de las variantes específicas de la línea germinal.....	11
<b>Figura 6.</b> Comparación de las secuencias de dBigH1 con las histonas somáticas dH1 y la H1.2 de humanos.....	13
<b>Figura 7.</b> dBigH1 se expresa en embriones y en la línea germinal .....	13
<b>Figura 8.</b> Recambio de dBigH1 durante la celularización .....	14
<b>Figura 9.</b> Los mutantes <i>dbigH1<sup>100</sup></i> activan el genoma zigótico prematuramente .....	15
<b>Figura 10.</b> Expresión de dBigH1 en el testículo.....	16
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de los ovarios de <i>Drosophila</i> .....	18
<b>Figura 12.</b> Formación del fusoma y reorganización de los cistos .....	19
<b>Figura 13.</b> Regulación en la línea germinal femenina.....	21
<b>Figura 14.</b> Representación de los testículos de <i>Drosophila</i> .....	22
<b>Figura 15.</b> Vías de regulación en las células madre y los GB .....	23
<b>Figura 16.</b> Fases iniciales de la transcripción.....	25
<b>Figura 17.</b> Patrón de distribución de diferentes modificaciones de histonas relacionadas con la transcripción.....	27
<b>Figura 18.</b> Regulación de la traducción .....	31
<b>Figura 19.</b> Expresión de dBigH1 tras la inducción con CuSO <sub>4</sub> .....	58
<b>Figura 20.</b> Expresión de las construcciones dBigH1, dBigH1 <sup>ΔED</sup> y dBigH1 <sup>ΔNTD</sup> .....	59
<b>Figura 21.</b> Análisis de la cantidad expresada de dBigH1, dBigH1 <sup>ΔED</sup> y dBigH1 <sup>ΔNTD</sup> tras la inducción con CuSO <sub>4</sub> .....	60
<b>Figura 22.</b> dBigH1 se incorpora en todo el genoma y su deposición correlaciona con la presencia de dH1. ....	64
<b>Figura 23.</b> Distribución de dBigH1 y dH1 a lo largo de la región génica.....	65
<b>Figura 24.</b> Tras la incorporación de dBigH1, disminuye la ocupación de dH1. ....	66
<b>Figura 25.</b> La relación entre el TSS y el CDS varía en las células inducidas .....	67
<b>Figura 26.</b> Efecto de dBigH1 en la expresión génica.....	68
<b>Figura 27.</b> Cambio en la expresión génica de genes down- y up-regulados .....	69
<b>Figura 28.</b> Relación entre los niveles de expresión, dBigH1 y dH1 .....	70

<b>Figura 29.</b> Mapa de las vías KEGG enriquecidas en los genes expresados diferencialment .....	72
<b>Figura 30.</b> Mapas epigenéticos de los genes de células S2.....	73
<b>Figura 31.</b> dBigH1 inhibe la expresión de <i>bam</i> .....	74
<b>Figura 32.</b> Localización de dBigH1 en cromosomas politénicos.....	76
<b>Figura 33.</b> Unión de dBigH1, dBigH1 <sup>ΔED</sup> y dBigH1 <sup>ΔNTD</sup> a la cromatina.....	77
<b>Figura 34.</b> La delección del dominio ED no afecta a la distribución de dBigH1 .....	78
<b>Figura 35.</b> Distribución de dBigH1, dH1 y dBigH1 <sup>ΔED</sup> a lo largo de la región génica. ..	79
<b>Figura 36.</b> dBigH1 <sup>ΔED</sup> no reemplaza dH1.....	80
<b>Figura 37.</b> dBigH1 <sup>ΔNTD</sup> se incorpora a la cromatina sin afectar a la ocupación de dH1.....	81
<b>Figura 38.</b> Cambio en la expresión génica de los genes down- y up-regulados cuando se expresa dBigH1 <sup>ΔED</sup> . .....	82
<b>Figura 39.</b> Cambio en la expresión génica de los genes down- y up-regulados cuando se expresa dBigH1 <sup>ΔNTD</sup> .....	83
<b>Figura 40.</b> Perfiles de distribución y contenido de Rpb3 en células control y células que expresan dBigH1 y dBigH1 <sup>ΔED</sup> .....	84
<b>Figura 41.</b> Contenido de RNA polimerasa II en los genes down-regulados, up-regulados y no-DE.....	85
<b>Figura 42.</b> Efecto sobre la RNA polimerasa pausada.....	87
<b>Figura 43.</b> Efecto sobre la activación de la transcripción.....	89
<b>Figura 44.</b> Expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina.....	90
<b>Figura 45.</b> En el germario, dBigH1 se expresa solamente en células germinales.....	91
<b>Figura 46.</b> dBigH1 se expresa en GSC y CB.....	92
<b>Figura 47.</b> Comparación de los patrones de expresión de dBigH1 y dH1 en ovarios .	93
<b>Figura 48.</b> Patrón de expresión de la forma elongante de la RNAPolimerasa II, Ilo <sup>ser2</sup> , en ovarios .....	95
<b>Figura 49.</b> Alineación de las secuencias obtenidas por 3'RACE. ....	97
<b>Figura 50.</b> La expresión de dBigH1 en los cistos está regulada a través del 3'UTR ...	98
<b>Figura 51.</b> Dianas de miRNA en el 3'UTR de dBigH1. ....	98
<b>Figura 52.</b> La depleción de Bam produce ovarios tumorales.....	100
<b>Figura 53.</b> Patrón de expresión de Brat en ovarios. ....	101
<b>Figura 54.</b> La reducción de Brat produce un aumento en el número de GSC y la expresión de dBigH1 en los cistos .....	102
<b>Figura 55.</b> Construcciones mutantes para los dominios de unión de Brat.....	103
<b>Figura 56.</b> Cambio en la expresión del gen reportero GFP en presencia de dBigH1 o dH1 .....	109

<b>Figura 57.</b> Cambio en la expresión del gen reportero GFP en presencia de dBigH1 o dBigH1 <sup>ΔED</sup> .....	111
<b>Figura 58.</b> Posible modelo de acción de dBigH1 .....	113
<b>Figura 59.</b> Esquematización del patrón de expresión de dBigH1 y dH1 durante la oogénesis y de la transcripción .....	116

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Plásmidos de clonaje. ....	39
<b>Tabla 2.</b> Plásmidos de expresión en células S2.....	39
<b>Tabla 3.</b> Plásmidos para la generación de moscas transgénicas. ....	40
<b>Tabla 4.</b> Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i> usadas.....	42
<b>Tabla 5.</b> Lista de oligonucleótidos usados .....	45
<b>Tabla 6.</b> Lista de anticuerpos.....	45

## ABREVIACIONES

<b>add</b>	aducina
<b>APA</b>	<i>Alternative polyadenylation</i>
<b>ARE</b>	<i>A/U rich element</i>
<b>Bam</b>	<i>Bag-of-marbles</i>
<b>Bgcn</b>	<i>Benign gonial cell neoplasm</i>
<b>BMP</b>	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
<b>Brat</b>	<i>Brain tumor</i>
<b>BSA</b>	albúmina sérica bovina
<b>CB</b>	cistoblasto
<b>CDS</b>	secuencia codificante
<b>ChIP</b>	Inmunoprecipitación de cromatina
<b>CPE</b>	<i>Cytoplasmic Polyadenylation Element</i>
<b>CPEB</b>	<i>CPE Binding protein</i> (proteínas de unión al CPE)
<b>CTD</b>	dominio C-terminal
<b>D</b>	ácido aspártico
<b>da</b>	<i>daughterless</i>
<b>DE</b>	diferencialmente expresado
<b>dH1</b>	Histona H1 de <i>Drosophila</i>
<b>DNA</b>	ácido desoxiribonucleico
<b>Dpp</b>	<i>Decapentaplegic</i>
<b>DSIF</b>	<i>DRB Sensitivity-Inducing Factor</i>
<b>E</b>	Ácido glutámico
<b>FC</b>	<i>Fold Change</i>
<b>FSC</b>	<i>Follicle Stem Cell</i> (célula madre folicular)
<b>GB</b>	Gonioblasto
<b>Gbb</b>	<i>Glas bottom boat</i>
<b>GD</b>	dominio globular
<b>GSC</b>	<i>Germ Stem Cells</i> (células madre germinales)
<b>Ilo<sup>ser2</sup></b>	RNA Polimerasa II S2 fosforilada
<b>Ilo<sup>ser5</sup></b>	RNA Polimerasa II S5 fosforilada
<b>IP</b>	Inmunoprecipitación
<b>JAK-STAT</b>	<i>Janus Kinase-Signal Transducer and Activation of Transcription</i>
<b>K</b>	Lisina
<b>Kb</b>	Kilobase

---

<b>Mad</b>	<i>Mothers against dpp</i>
<b>Med</b>	<i>Medea</i>
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>modENCODE</b>	<i>MODEl organisms Encyclopedia of DNA Elements</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>NC</b>	<i>Nurse Cells</i> (células nodrizas)
<b>NELF</b>	<i>Negative Elongation Factor</i>
<b>Nos</b>	Nanos
<b>NTD</b>	dominio N-terminal
<b>P</b>	Prolina
<b>PABP</b>	<i>Poly(A)-binding protein</i> (proteína de unión a poli(A))
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PGC</b>	<i>Primordial Germ Cells</i> (células primordiales germinales)
<b>P-TEFb</b>	<i>Positive-Transcription Elongation Factor b</i>
<b>Pum</b>	<i>Pumilio</i>
<b>R</b>	Arginina
<b>RBP</b>	<i>RNA Binding Protein</i> (proteína de unión al RNA)
<b>RISC</b>	<i>RNA-induced silencing complex</i>
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>S</b>	Serina
<b>Shn</b>	<i>Schnurri</i>
<b>SSC</b>	<i>Somatic Stem Cells</i> (células madre somáticas)
<b>Sxl</b>	<i>Sex lethal</i>
<b>T</b>	Treonina
<b>TA</b>	<i>Transit Amplifying region</i> (zona de amplificación mitótica)
<b>TFII</b>	<i>Transcription factor for RNA polymerase II</i>
<b>TSS</b>	<i>Transcription Start Site</i> (lugar de inicio de la transcripción)
<b>TXE</b>	lugar de finalización de la transcripción
<b>UAS</b>	<i>Upstream Activating Sequence</i>
<b>Upd</b>	<i>Unpaired</i>
<b>UTR</b>	<i>Untranslated Region</i> (región no traducida)
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>WHD</b>	<i>Winged Helix Domain</i>
<b>Y</b>	Tirosina
<b>ZGA</b>	<i>Zigotic Genome Activation</i> (activación del genoma zigótico)







# **1.INTRODUCCIÓN**

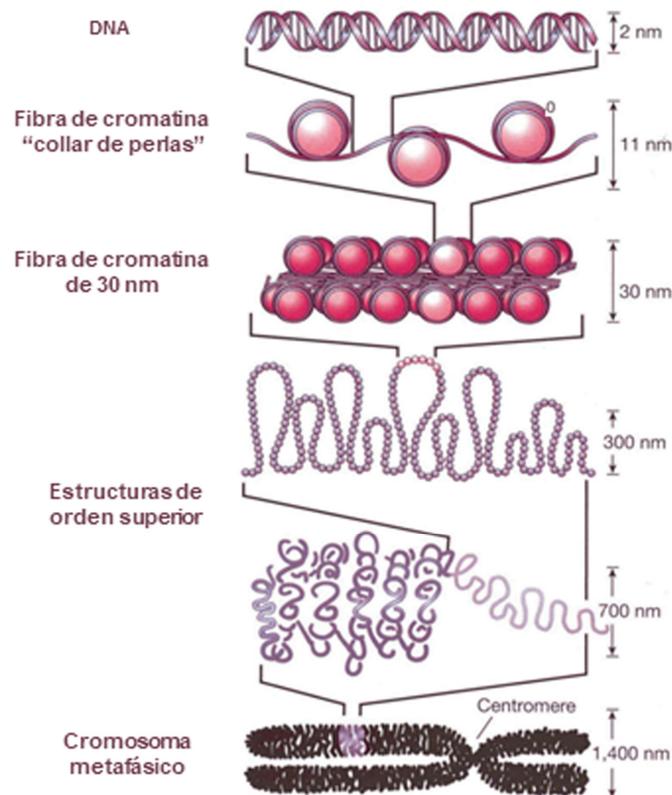


## 1.1. Estructura de la cromatina

Las células eucariotas codifican la información necesaria para la formación y funcionamiento de un ser vivo en el DNA. En la célula eucariota el DNA se encuentra en el interior del núcleo y puede llegar a medir hasta dos metros en el caso de las células humanas (Alberts et al., 2002). La asociación del DNA con diferentes proteínas hace posible que se pueda empaquetar en el interior del núcleo eucariota y que a su vez pueda llevar a cabo los procesos en los que está implicado, tales como la replicación, reparación, recombinación o transcripción. Esta asociación de proteínas al DNA recibe el nombre de cromatina.

El empaquetamiento del DNA se produce gracias al enrollamiento de 145-147 pares de bases (pb) alrededor de un octámero de histonas, formado por dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 Y H4 (revisado en Cutter and Hayes, 2015). Esta estructura se denomina nucleosoma. Los nucleosomas están conectados por DNA de longitud variable que recibe el nombre de DNA internucleosomal o espaciador. Esta estructura se repite a lo largo del genoma y da lugar a una fibra de 10 nm de diámetro conocida como “collar de perlas” (**Figura 1**).

Además, la histona H1 se une al DNA en los sitios de entrada y salida del nucleosoma, proporcionando sellado a la estructura y protección de unos 20 pb adicionales. Esta estructura resultante se denomina cromatosoma (Simpson, 1978). En estudios *in vitro* se ha demostrado que la histona H1 promueve y estabiliza la compactación de la cromatina en una fibra de 30 nm de diámetro (revisado en Hansen, 2002; Robinson and Rhodes, 2006). La cromatina puede además adquirir otras estructuras mediante el establecimiento de contactos entre secuencias distantes entre ellas a través de diferentes proteínas (**Figura 1**) (revisado en Van Steensel, 2011).



**Figura 1. Grados de compactación de la cromatina.** La doble cadena de DNA se enrolla alrededor del octámero de histonas y da lugar al nucleosoma. El conjunto de nucleosomas separados por DNA espaciador forma una fibra de 10 nm. La unión de la histona H1 al DNA que entra y sale del nucleosoma estabiliza la formación de la fibra de 30 nm. Estas fibras pueden plegarse en estructuras de órdenes superiores (adaptado de Felsenfeld and Groudine, 2003).

Tradicionalmente la cromatina en el núcleo interfásico se ha clasificado en dos tipos según su aspecto en el microscopio de campo claro: heterocromatina, con un aspecto altamente condensado, y eucromatina, con un aspecto más difuso. En general, la heterocromatina es una región pobre en genes y transcripcionalmente inactiva. Por el contrario, la eucromatina es rica en genes y estos son transcripcionalmente activos (Alberts et al., 2002).

## 1.2. La histona H1

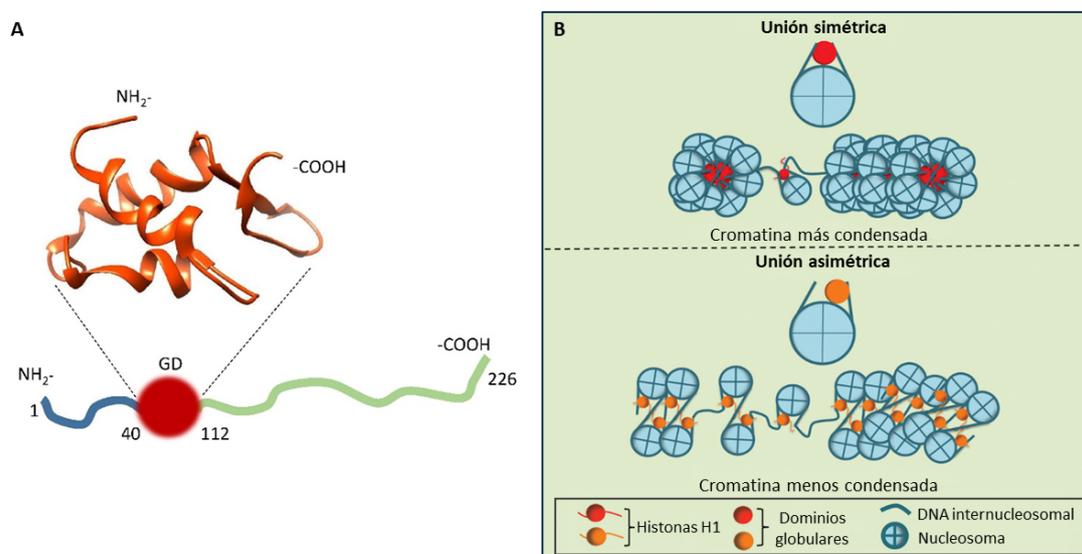
### 1.2.1. Estructura de la histona H1

La histona H1 tiene una estructura tripartida compuesta por un dominio globular altamente conservado y dos dominios terminales, el N- y C-terminal, más variables (**Figura 2A**) (Wolffe, 1998). Estos últimos se consideran dominios desestructurados, ya que no parecen tener una estructura en solución, pero adquieren una estructura secundaria cuando interactúan con el DNA. Normalmente estos dominios suelen contener un gran porcentaje de residuos básicos (Hansen et al., 2006; Roque et al., 2005).

El dominio globular consta de 70-80 aminoácidos y es necesario para la formación del cromatosoma gracias a dos sitios de unión que permiten el reconocimiento de los dúplex de DNA (Brown et al., 2006; Goytisolo et al., 1996). Este dominio contiene un motivo llamado *winged helix domain* (WHD) formado por 3 hélices  $\alpha$  y 3 hojas  $\beta$  en orden  $\alpha \beta \alpha \alpha \beta \beta$  (Ramakrishnan et al., 1993).

Se han propuesto diferentes modelos para la interacción de la histona H1 con el nucleosoma. Por ejemplo, la histona H1.5 humana interactúa con el surco menor del DNA del nucleosoma, se sitúa simétricamente respecto al eje del nucleosoma y contacta con 10 pb de cada una de las cadenas de DNA espaciador, la entrante y la saliente (Goytisolo et al., 1996). Por otro lado, la histona H1 de *Drosophila* se sitúa de una forma ligeramente asimétrica. Esta histona contacta principalmente con los 10 pb de una de las cadenas de DNA, aunque puede interactuar con la otra de forma más débil (Zhou et al., 2013). Por último, un tercer modo de unión sería el de la H5 de pollo que también se une de forma asimétrica, pero en este caso interactúa con las dos cadenas de DNA (Zhou et al., 2015). Las diferentes formas de unión de la histona H1 al nucleosoma pueden dar lugar a la formación de estructuras superiores diferentes (**Figura 2**).

El dominio C-terminal (CTD) es necesario para la unión de gran afinidad y ayuda a la estabilización de las estructuras secundarias de la cromatina (Allan et al., 1986; Caterino et al., 2011; Hendzel et al., 2004; Lu and Hansen, 2004). Aunque su secuencia primaria no está del todo conservada, sí lo está su composición aminoacídica, la cual está enriquecida en residuos de lisina (K) (revisado en Hansen et al., 2006). La interacción del CTD con el DNA es principalmente electrostática en la que las cargas positivas de este dominio ayudan a neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA (revisado en Harshman et al., 2013; Lu et al., 2009b).



**Figura 2. Estructura de la histona H1 y modos de interacción con el nucleosoma.** A) Estructura tripartida típica de las histonas H1. El dominio globular (GD) se encuentra flanqueado por un dominio N-terminal (azul) corto y C-terminal (verde) más largo. La estructura se corresponde a la histona H1.5 y los números indican la posición de los residuos (imagen adaptada de Bednar et al., 2016). B) Unión de la histona H1 al nucleosoma. La unión se puede dar de forma simétrica o asimétrica, de modo que el dominio globular puede establecer dos o tres contactos con el DNA. Las diferencias en el modo de unión de las diferentes histonas H1 dan lugar a diferentes grados de compactación de la cromatina (imagen adaptada de Zhou et al., 2015).

El CTD puede variar en su longitud, carga y en las modificaciones postraduccionales. Estas variables se traducen en diferentes modos de regulación de la formación de estructuras superiores (Harshman et al., 2013). El CTD puede contener secuencias S/TPKK (Bharath et al., 2002; Churchill and Suzuki, 1989; Suzuki, 1989) que dan lugar a giros  $\beta$  que se unen al DNA en el surco menor y median la condensación del DNA (Churchill and Suzuki, 1989). La fosforilación de este dominio en la serina (S) o treonina (T) afecta a la unión al DNA y a la compactación. Mientras que una fosforilación parcial provoca relajación de la cromatina, la hiperfosforilación durante la metafase provoca la condensación.

El dominio N-terminal (NTD) es el más corto, contiene normalmente entre 20 y 35 residuos y es la región menos conservada entre las diferentes isoformas de H1 (Ponte et al., 1998). Consta de dos subregiones, la más distal está compuesta por residuos hidrofóbicos mientras que la región más cercana al dominio globular es de carácter básico (revisado en Roque et al., 2015). Este dominio no parece afectar a la formación

de estructuras superiores de la cromatina (Allan et al., 1986), sin embargo la afinidad de la unión a la cromatina puede depender de este dominio (Harshman et al., 2013; Öberg and Belikov, 2012).

### **1.2.2. Función de la histona H1**

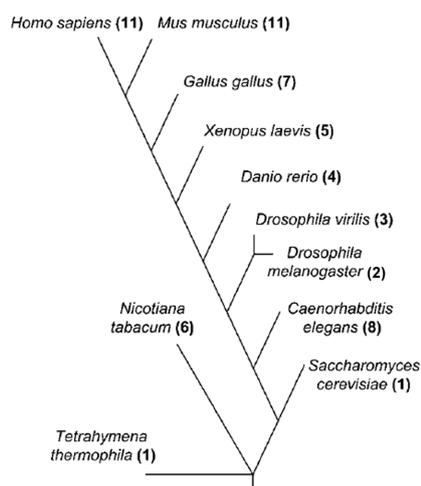
Como ya se ha mencionado, la histona H1 se une al DNA en los sitios de entrada y salida del nucleosoma y ayuda a la formación y estabilización de estructuras superiores de la cromatina (Ricci et al., 2015; Thoma et al., 1979; Woodcock et al., 2006). Inicialmente se consideró a la histona H1 como un represor general de la transcripción debido a su papel en la compactación de la cromatina (Schlissel and Brown, 1984; Shimamura et al., 1989; Ura et al., 1996). No obstante, en los mutantes de H1 de *Saccharomyces cerevisiae*, se observa una reducción de la expresión de algunos genes en contra de lo esperado (Hellauer et al., 2001). Por otro lado, la reducción de los niveles de la histona somática H1 en *Drosophila melanogaster*, solo produce cambios en un número reducido de genes (Vujatovic et al., 2012). De forma similar, en células embrionarias de ratón, la reducción del contenido de H1 al 50% solo afecta a un pequeño porcentaje de genes, la mayoría de los cuales se encuentran más expresados, aunque algunos también ven su expresión disminuida (Fan et al., 2005). En el caso de las variantes humanas, la depleción de distintas variantes en células únicamente altera la expresión de un 2% de los genes e incluye tanto el aumento como la reducción de la expresión (Sancho et al., 2008).

Asimismo, la histona H1 también participa en la formación de la heterocromatina. En *Drosophila*, la depleción de la histona H1 provoca una alteración en la morfología de los cromosomas politénicos y en la localización de los marcadores de heterocromatina HP1a y H3K9me2 (Lu et al., 2009a). De hecho la histona H1 interacciona con HP1a y Su(var)3-9, responsable de la metilación de la H3K9 (Xingwu et al., 2013). También en mamíferos se ha propuesto una interacción entre H1 y HP1a (Daujat et al., 2005). Además, la histona H1 también interacciona con STAT92E y regula su localización en el proceso de formación de la heterocromatina de un modo independiente de la metilación de la H3K9 (Xu et al., 2014). Recientemente, también se ha visto que la histona H1 de *Drosophila* previene la inestabilidad genómica en regiones heterocromáticas gracias a la prevención de la acumulación de híbridos DNA:RNA (Bayona-Feliu et al., 2017).

Finalmente, la histona H1 se ha relacionado también con la reparación del DNA (Downs et al., 2003; Hashimoto et al., 2007). En el caso de células humanas, la ubiquitinación de la H1 es necesaria para la reparación de las roturas de doble cadena, ya que facilita la remodelación de la cromatina necesaria para su reparación (Thorslund et al., 2015).

### 1.2.3. Variantes de histona H1

La familia de histonas H1 conforma un grupo muy heterogéneo ya que en la mayoría de metazoos se han descrito diferentes variantes de histona H1 (**Figura 3**). En el caso de humanos y ratón se han identificado hasta 11 variantes que se pueden clasificar según su patrón de expresión temporal y espacial. Así pues, siete de ellas se encuentran en células somáticas (H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1.0 y H1.X) y cuatro en la línea germinal (H1t, H1T2, H1LS1 y H1oo). Su expresión, además, puede estar asociada a la replicación del DNA durante la fase S del ciclo celular o ser independiente de la replicación y expresarse a lo largo de todo el ciclo (Izzo et al., 2008).



**Figura 3. Variantes de histona H1 en varias especies.** Árbol evolutivo de diversas especies eucariotas. Entre paréntesis se indica el número de variantes identificadas en cada una de las especies (imagen modificada de Izzo et al., 2008).

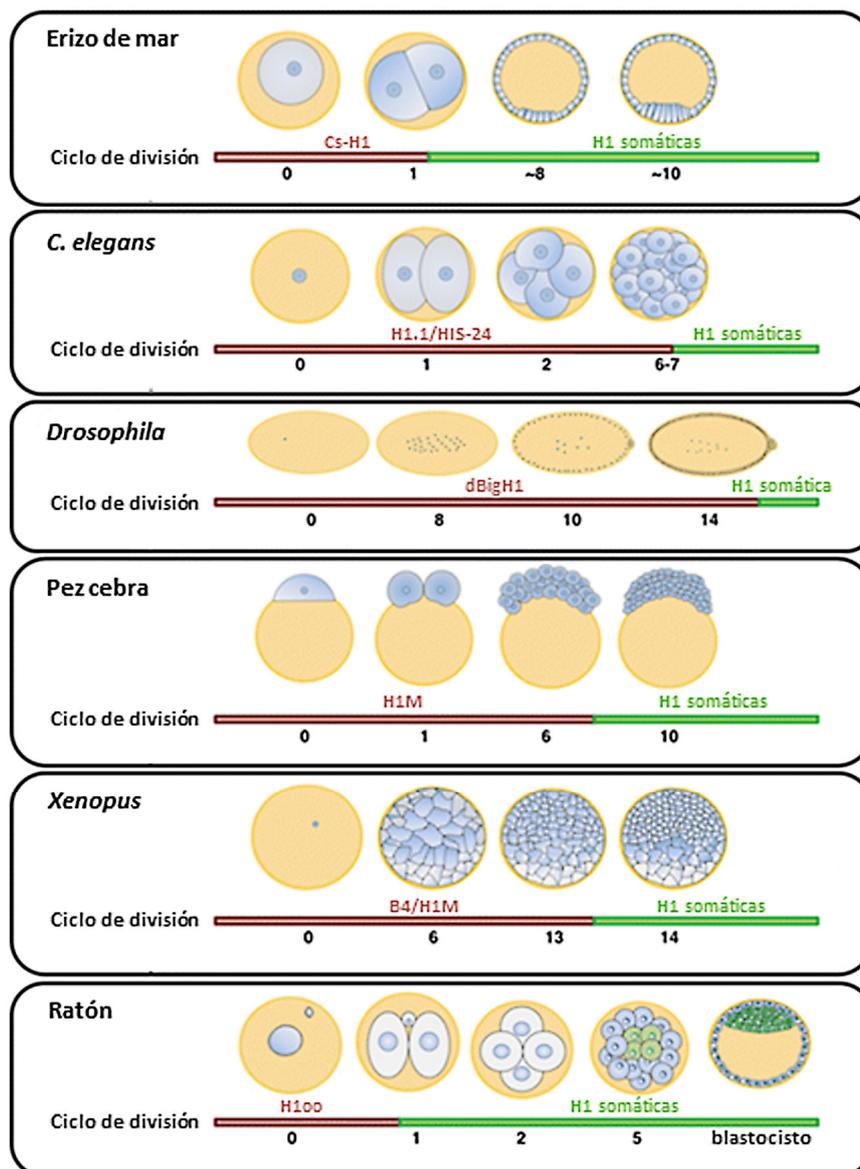
En *Mus musculus*, la delección de algunas de ellas (H1.0, H1.c, H1.d, H1.e) no afecta al desarrollo de los animales mutantes. En estos animales se mantiene la proporción entre histona H1 y nucleosomas, lo que indica un mecanismo de compensación por parte del resto de variantes (Fan et al., 2001; Sirotkin et al., 1995). No obstante, también se ha propuesto que las diferentes variantes puedan tener funciones concretas. Por ejemplo, en *Gallus gallus*, las diferentes isoformas parecen regular la expresión de genes concretos (Takami et al., 2000) y la H1.X de *Mus musculus* se localiza en el nucléolo y juega un papel en la segregación cromosómica (Takata et al., 2007). En el caso de

células humanas, las diferentes variantes parecen regular de forma específica la expresión génica, puesto que la depleción individual de cada una de las variantes afecta a la expresión de genes diferentes (Sancho et al., 2008).

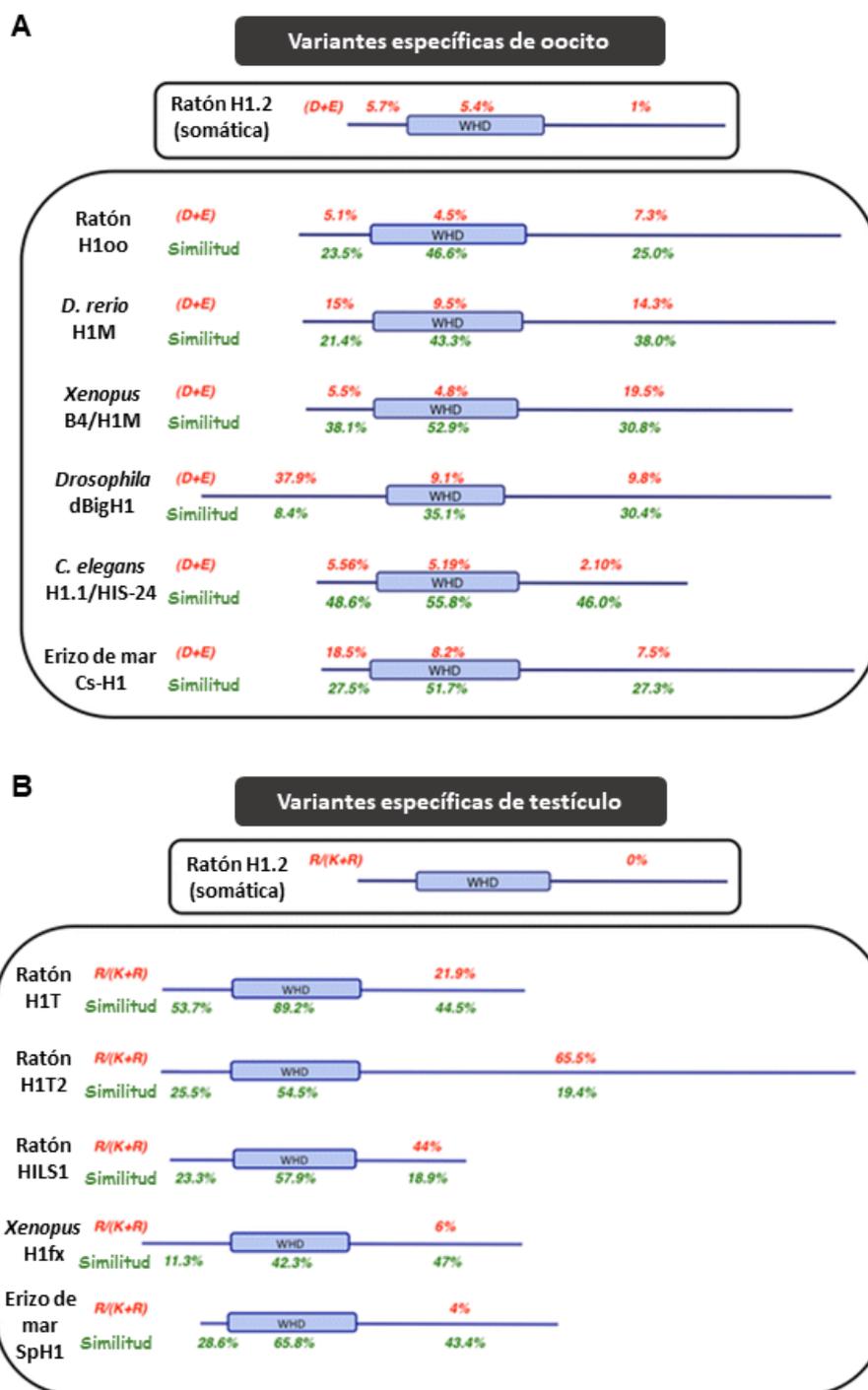
Un elemento característico de los metazoos es la existencia de variantes específicas de la línea germinal (revisado en Pérez-Montero et al., 2015). Las variantes específicas de testículo se han identificado desde equinodermos (Strickland et al., 1980) hasta mamíferos, donde existen tres variantes (H1T, H1S1 y H1T2) que se expresan a lo largo de la espermatogénesis antes de ser reemplazadas por las protaminas (Drabent et al., 1991; Drabent et al., 1993; Martianov et al., 2005; Tanaka et al., 2005; Yan et al., 2003).

Respecto a las histonas de la línea germinal femenina, se expresan durante la ovogénesis y en muchos casos persisten en los primeros estadios de desarrollo embrionario. Normalmente son reemplazadas por las variantes somáticas cuando se activa la expresión del genoma cigótico (ZGA, de sus siglas en inglés) (**Figura 4**) (revisado en Pérez-Montero et al., 2015). En *Drosophila* y pez cebra, el reemplazo de la histona germinal y embrionaria por la histona somática se produce en todas las células excepto en las células germinales primordiales (Müller et al., 2002; Pérez-Montero et al., 2013; Wibbrand and Olsen, 2002). En cambio, en ratón y humanos la variante H1oo desaparece después de la fertilización en el estadio de 2 células y vuelve a aparecer en los folículos primordiales (Mizusawa et al., 2010; Tanaka et al., 2001).

En cuanto a la estructura de las variantes germinales de H1 conservan la estructura tripartida, con el WHD conservado. Por el contrario, los dominios N- y C-terminal difieren más entre las distintas variantes. Por lo general, las variantes de oocitos presentan un CTD más largo y enriquecido en residuos ácidos de aspártico (D) y glutámico (E) mientras que las variantes masculinas están enriquecidas en residuos de arginina (R) y lisina (K) y se asemejan más a las variantes somáticas (**Figura 5**) (revisado en Pérez-Montero et al., 2015).



**Figura 4. Las variantes de H1 presentes en el oocito se mantienen en la embriogénesis hasta la activación del genoma zigótico.** En las primeras divisiones del embrión se detecta la variante de H1 de la línea germinal femenina. En general, la variante se mantiene hasta la ZGA. En este momento es reemplazada por las histonas H1 somáticas. El recambio por la variante somática y la ZGA se produce en diferentes momentos del desarrollo embrionario temprano dependiendo de la especie (imagen adaptada de Pérez-Montero et al., 2015).



**Figura 5. Comparación de la estructura de las variantes específicas de la línea germinal.**

A) Características estructurales de las variantes específicas de oocitos y de la línea germinal en comparación con la variante somática H1.2 de ratón. En color rojo se indica el porcentaje de residuos ácidos (D+E). B) Características estructurales de las variantes presentes en los testículos. En rojo se indica el porcentaje de residuos R respecto al total de residuos básicos (K+R) del CTD. En color verde se indica el grado de similitud entre los diferentes dominios respecto a la histona somática H1.2 de ratón (Pérez-Montero et al., 2015).

Las características estructurales propias de cada variante repercuten en la afinidad con la que se unen al DNA y al nucleosoma y también en el grado de condensación de la cromatina. En el caso de la variante B4/H1M de *Xenopus*, tiene una afinidad menor por el DNA que las variantes somáticas (Ura et al., 1996). Además, el CTD está compuesto por una menor cantidad de aminoácidos cargados positivamente, lo que implica una menor condensación del DNA (Nightingale et al., 1996). En el caso de la H1<sub>oo</sub> de mamíferos, se caracteriza por una mayor movilidad respecto a la histona somática H1c (Meshorer et al., 2006; Teranishi et al., 2004).

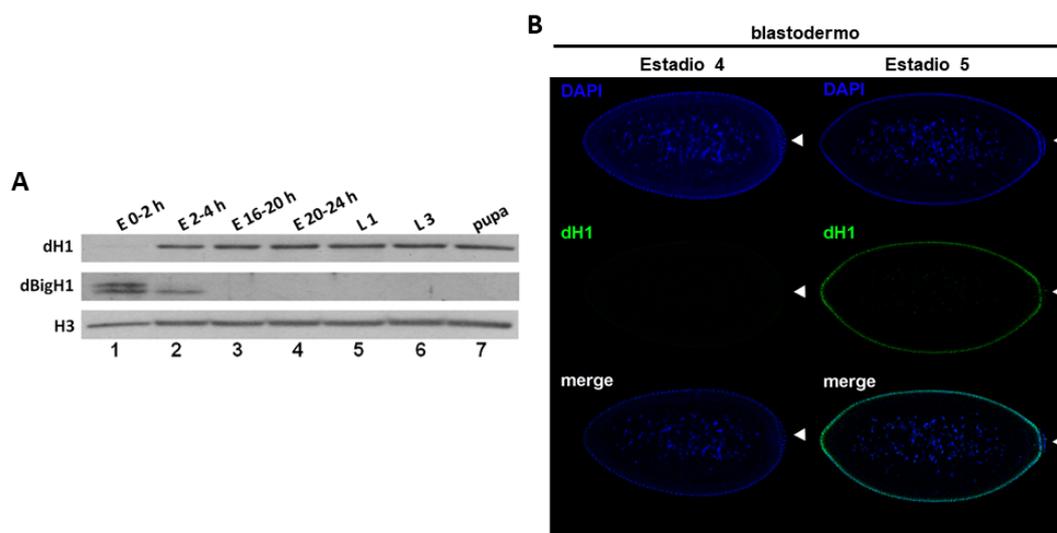
En el caso de la espermatogénesis, las diferentes variantes muestran también diferentes propiedades y afinidades por el DNA. En concreto, la variante H1T se une con una afinidad menor que las variantes somáticas, posiblemente debido a una sustitución en el dominio globular (Ramesh et al., 2006) y a la ausencia de motivos S/TPKK en el CTD (Khadake and Rao, 1995; Khadake and Rao, 1997). Estas características permiten un grado de compactación menor que podría facilitar la recombinación meiótica en los espermatocitos. La variante H1T2, en cambio, contiene más residuos R que la H1T por lo que permite un mayor grado de condensación de la cromatina (Tanaka et al., 2005).

### **1.2.4. La variante germinal y embrionaria de *Drosophila melanogaster*: dBigH1**

La familia de histonas H1 de *Drosophila* es menos compleja que en el resto de metazoos puesto que solo se han descrito una variante somática, dH1 (Nagel and Grossbach, 2000), y una variante específica de la línea germinal y del embrión, dBigH1 (Pérez-Montero et al., 2013).

dBigH1 presenta la estructura tripartida típica de las histonas H1. En cuanto al dominio globular, muestra un 57% de homología con el de dH1. Asimismo, el CTD también está parcialmente conservado, con un 35% de homología respecto a la dH1. Por el contrario, el NTD presenta un menor grado de homología debido a una mayor longitud. Además, la cola N-terminal contiene una gran cantidad de residuos D y E concentrados principalmente en la región más terminal del dominio (**Figura 6**).

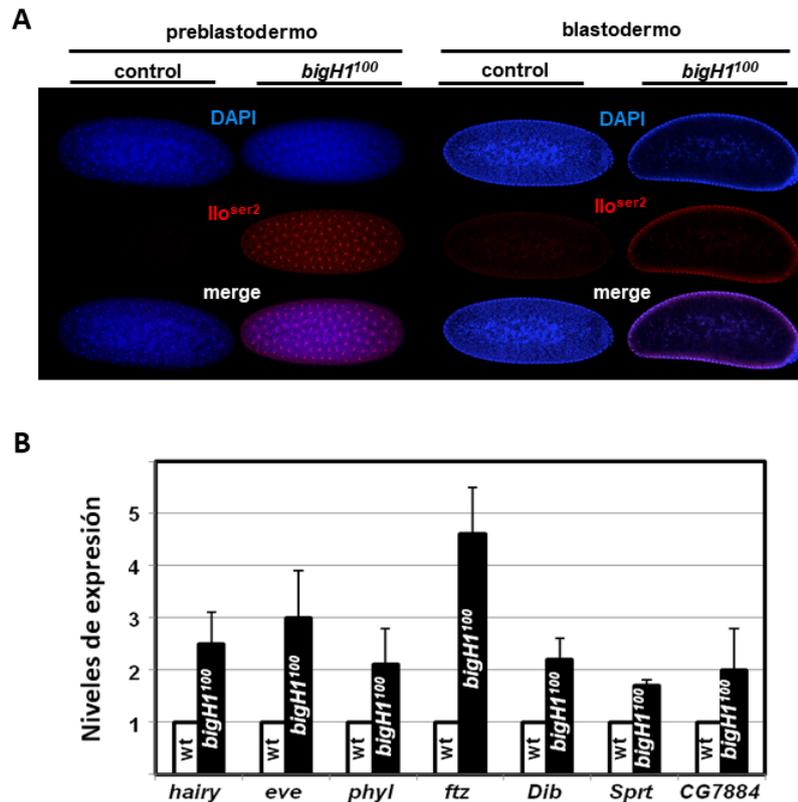




**Figura 8. Recambio de dBigH1 durante la celularización.** A) Análisis de la presencia de dBigH1 y dH1 en la cromatina en diferentes estadios mediante *western blot*. dBigH1 se encuentra unida a la cromatina durante los primeros estadios embrionarios (E 0-2h). Durante la celularización (E 2-4h) empieza a producirse el recambio. En estadios larvarios (L1 y L3) y en la pupa solo se encuentra la variante somática, dH1. B) El recambio de dBigH1 se produce en las células somáticas, pero no en las PGCs, donde no se detecta dH1 (punta de flecha) (Pérez-Montero et al., 2013).

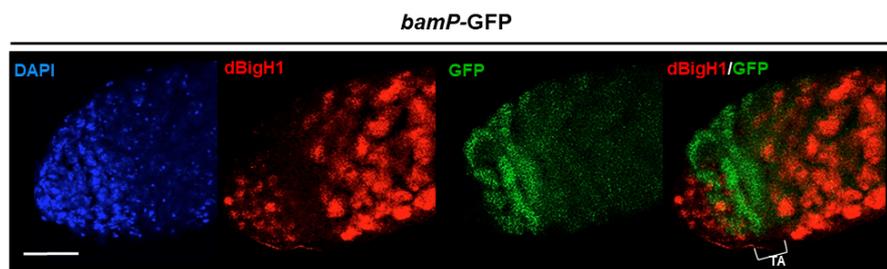
La histona dBigH1 es esencial para el correcto desarrollo embrionario, puesto que embriones deficientes para la proteína (*dbigH1<sup>100</sup>*) presentan múltiples defectos y una elevada letalidad. Entre los defectos observados, se encuentra una activación prematura del genoma zigótico, puesto que en los embriones mutantes se aprecia un incremento de la forma elongante de la RNA Polimerasa II, fosforilada en la S2 del CTD (Pol II <sup>o<sup>ser2</sup></sup>) y un aumento en la expresión de genes zigóticos (**Figura 9**).

**Figura 7. (Continuación)** Estadios de la gastrulación. dBigH1 se pierde en las células somáticas, pero se mantiene en las PGC (flecha blanca) (Pérez-Montero et al., 2013).



**Figura 9. Los mutantes *dbigH1<sup>100</sup>* activan el genoma zigótico prematuramente.** A) Los embriones *dbigH1<sup>100</sup>* muestran un incremento de los niveles de la Pol II  $\alpha^{ser2}$ , comparado con los embriones control. B) Análisis de diferentes genes zigóticos mediante RT-qPCR. Los niveles de expresión son superiores en los embriones mutantes (Pérez-Montero et al., 2013).

Por otro lado, dBigH1 también se expresa en la línea germinal (**Figura 7A**). Mientras que en otros organismos se han identificado diferentes variantes para la línea germinal femenina y masculina, dBigH1 se expresa en ambas gónadas. En la línea germinal masculina, dBigH1 presenta un patrón peculiar: se expresa en las células madre germinales (GSC) y sus hijas los gonioblastos (GB), durante las divisiones de las espermatogonias desaparece su expresión y reaparece en los espermatocitos (**Figura 10**) (Carbonell et al., 2017; Pérez-Montero et al., 2013). La bajada de expresión en la zona de divisiones de las espermatogonias se debe a la presencia del regulador translacional Bam (Carbonell et al., 2017), que participa en la regulación de la traducción de diferentes factores asociados a la pluripotencia (Song et al., 2004).



**Figura 10. Expresión de dBigH1 en el testículo.** dBigH1 se expresa en las GSC y en los espermatocitos, pero no en la región de amplificación mitótica (TA) correspondiente a las espermatogonias. El patrón de dBigH1 es complementario al del regulador Bam (en verde) (Carbonell et al., 2017).

En este contexto, dBigH1 es necesaria para el mantenimiento de las GSC puesto que la depleción de la histona provoca una diferenciación prematura de las células madre (Carbonell et al., 2017). Asimismo, dBigH1 también es necesaria para la diferenciación de los espermatocitos ya que la falta de dBigH1 produce una acumulación de espermatogonias que no se diferencian (Carbonell et al., 2017). En embriogénesis se ha propuesto que dBigH1 actúa como un represor general de la transcripción, no obstante, las células germinales de la línea masculina son transcripcionalmente activas. En los espermatocitos, la distribución de dBigH1 no es homogénea como en embriones y existe una correlación negativa entre el contenido de dBigH1 y el nivel de expresión de los genes (Carbonell et al., 2017).

### 1.3. La línea germinal de *Drosophila melanogaster*

Durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*, las células que se forman en la parte posterior del embrión reciben el nombre de células polares y son las que dan lugar a las PGC. La especificación de estas células se debe a la localización y acumulación de productos maternos en la parte posterior del embrión durante la formación del huevo (Dansereau and Lasko, 2008).

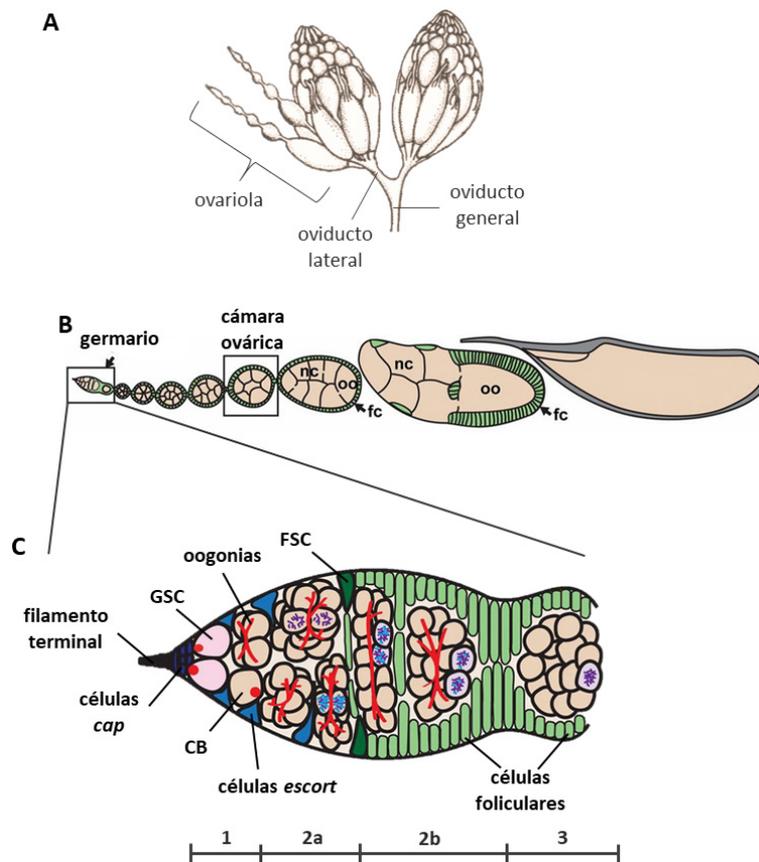
#### 1.3.1. La línea germinal femenina

Una mosca adulta contiene dos ovarios formados por 15-20 ovariolas (**Figura 11A**). Cada ovariola consiste en una cadena de cámaras ováricas que se encuentran en diferentes estadios de desarrollo (**Figura 11B**). La estructura situada en el extremo anterior de la ovariola recibe el nombre de germario, contiene células somáticas y germinales y es responsable de generar nuevas cámaras ováricas que se desarrollan en su paso por la ovariola hasta formar un huevo maduro. Este proceso se divide en 14

estadios en base a las diferencias morfológicas de las cámaras ováricas. Cuando ya se ha formado el huevo maduro, éste llega al oviducto lateral que desemboca en el general para, finalmente, llegar al útero donde podrá ser fecundado.

En la parte anterior del germario se encuentran entre 2 y 3 células madre germinales (GSC) que están en contacto con un nicho formado por las células del filamento terminal y las células *cap* (Xie and Spradling, 2000). Las GSC se dividen asimétricamente para generar una nueva célula madre, que mantiene el contacto con el nicho, y una célula hija llamada cistoblasto (CB) que empieza a diferenciarse. El CB experimenta cuatro divisiones mitóticas sincrónicas, pero sin llegar a completar la citoquinesis. El resultado es un grupo o cisto de 16 células conectadas entre ellas a través de puentes citoplasmáticos que reciben el nombre de oogonias (revisado en Huynh and St Johnston, 2004). Durante la diferenciación de los CB y sus divisiones, están acompañados por células *escort* hasta que son encapsulados por las células foliculares para formar una cámara ovárica (Decotto and Spradling, 2005). Las diferentes cámaras están conectadas por células *stalk*. Tanto las células *stalk* como las células foliculares proceden de las células madre foliculares (FSC) (**Figura 11C**) (Margolis and Spradling, 1995).

El germario se divide en tres regiones. La primera de ellas es la que contiene las GSC, los CB y las oogonias que se están dividiendo. Las células entran en la región 2a cuando aparece el grupo de 16 células y éstas son rodeadas por las células foliculares en la región 2b y 3 (**Figura 11C**) (King, 1970).

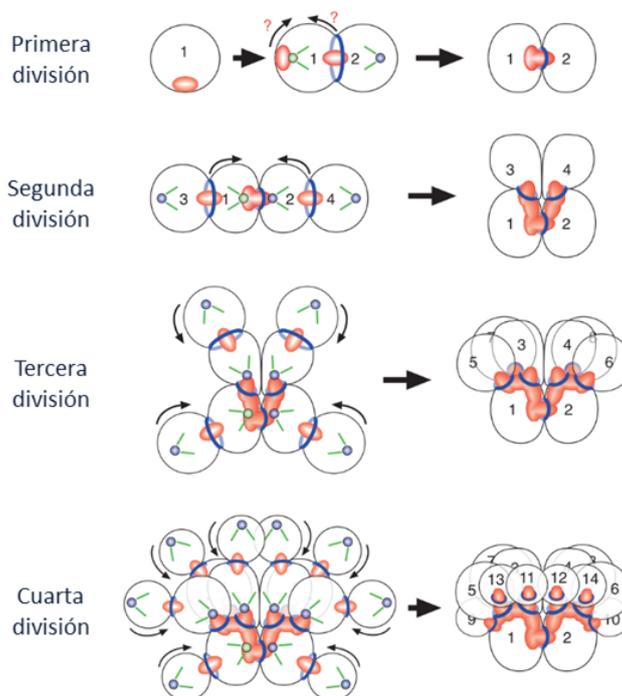


**Figura 11. Representación esquemática de los ovarios de *Drosophila*.** A) Cada hembra contiene dos ovarios con 15-20 ovariolas (imagen adaptada de Koch et al., 1967). B) Dentro de cada ovariola hay un germario en la parte anterior y diferentes cámaras ováricas que avanzan hacia la parte posterior. nc: nurse cell; fc: célula folicular; oo: oocito. C) Detalle del germario. En la parte anterior se encuentran las células del filamento terminal y las células cap, que interactúan con 2 GSCs. Las GSC se dividen asimétricamente y producen un CB que se divide para dar lugar a las oogonias que se mantienen conectadas por puentes citoplasmáticos (en rojo). Las células escort acompañan a las oogonias hasta que las células foliculares (en verde) rodean las 16 células. En la parte inferior se indica las regiones del germario (imagen modificada de Ables, 2015).

### 1.3.1.1. La oogénesis

La oogénesis comienza cuando una GSC se divide de forma asimétrica para dar lugar a otra GSC y a un CB, el cual inicia el proceso de diferenciación. Las GSC se caracterizan por presentar una estructura llamada espectrosoma que consiste en vesículas membranosas con componentes del citoesqueleto situada en la parte anterior, orientada hacia el nicho (Lin and Spradling, 1995). El CB se divide cuatro veces y da lugar a un grupo de 16 células conectadas entre ellas por puentes citoplasmáticos o *ring canals*. La orientación de las divisiones de los CB está determinada por el fusoma, una estructura derivada del espectrosoma, ya que a él se ancla el huso mitótico (Deng and

Lin, 1997). El modo en que se dividen garantiza que al final haya dos células con cuatro *ring canals*, dos células con tres, cuatro con dos y ocho con un único *ring canal* (**Figura 12**) (Lin et al., 1994).



**Figura 12. Formación del fusoma y reorganización de los cistos.** Durante la primera división mitótica, el espectrosoma (en rosa) interactúa con uno de los centrosomas (esfera azul) y ancla uno de los polos del huso mitótico (en verde). Después de la división, la célula hija hereda parte del fusoma que migra y se fusiona con el fusoma nuevo (rosa) formado en el *ring canal* (azul oscuro). Este proceso se repite con cada división mitótica. También se produce una reorientación de las células para que los fusomas se puedan unir (imagen adaptada de Huynh and St Johnston, 2004).

De las 16 células, las únicas que entran en profase meiótica son las dos que tienen cuatro canales, los pro-oocitos (Koch et al., 1967). En esta región, las células foliculares empiezan a migrar y rodear los cistos de 16 células (King, 1970) y uno de los pro-oocitos, el que queda en una posición más posterior, es el que se diferencia finalmente como oocito. El resto de células entran en ciclos de endoreplicación para dar lugar a células poliploides llamadas células nodrizas o *nurse cells* (NC) (Dej and Spradling, 1999; Hong et al., 2003). El oocito permanece arrestado en profase I y entre el estadio 3 y 4 los cromosomas se condensan y agrupan en una estructura llamada cariosoma. Hasta el estadio 13 no se produce la maduración del oocito que retoma la meiosis. En el estadio 14 vuelve a quedar arrestado en metafase I. Durante los últimos estadios el oocito recibe

productos sintetizados por las NC que serán necesarios para las primeras horas del desarrollo (King, 1970).

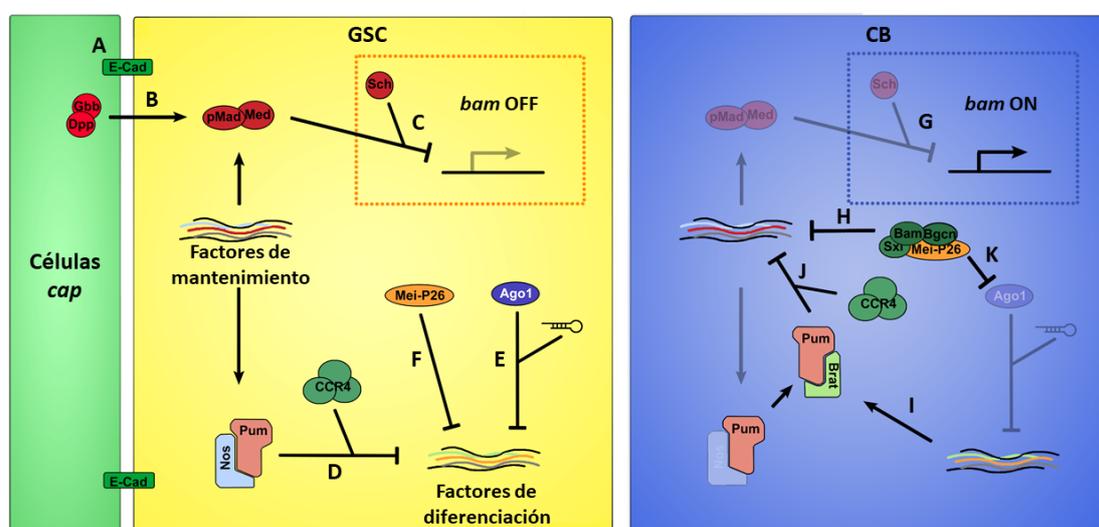
### 1.3.1.2. Mecanismos de regulación en la línea germinal femenina

Cada germario contiene entre 2 y 3 GSC en la parte más anterior que contactan con células *cap*. El anclaje de las GSC al nicho se produce a través de E-cadherina y Armadillo (**Figura 13A**) (Song et al., 2002). Esta unión permite que las GSC reciban señales de la vía de señalización *Bone Morphogenetic Protein* (BMP). Las células *cap* secretan Decapentaplegic (Dpp) y Glass bottom boat (Gbb), dos ligandos de la familia BMP, que cuando se unen a sus receptores provocan la fosforilación de Mothers against dpp (Mad). La forma fosforilada (pMad) forma un complejo con Medea (Med) y se transloca al núcleo (**Figura 13B**). Estos factores se unen a regiones reguladoras de la región 5' del gen *bag-of-marbles* (*bam*), un regulador traduccional que promueve la diferenciación, e inhiben su transcripción en las GSC gracias al reclutamiento adicional del factor de transcripción Schnurri (Shn) (**Figura 13C**) (Hamaratoglu et al., 2014; Song et al., 2004; Xie and Spradling, 1998).

En las GSC, además, el complejo represor formado por Nanos (Nos) y Pumilio (Pum) reclutan el complejo CCR4-NOT, responsable de la deadenilación de los mRNAs (**Figura 13D**). El acortamiento de la cola de poli(A) disminuye la eficiencia de la traducción (Joly et al., 2013). Por otro lado, Mei-P26 y la maquinaria de microRNA (miRNA) (**Figura 13F, E**) colaboran para mantener las GSC. Los miRNAs son RNAs pequeños que reprimen la traducción o facilitan la degradación de los mRNAs diana. Una vez procesados se unen a proteínas de la familia Argonaute y sirven de guía para el reconocimiento de secuencias en la región 3'UTR de los mRNA (revisado en Bushati and Cohen, 2007). La eliminación de algunos de los elementos de esta vía afectan al número y la diferenciación de las GSC (Jin and Xie, 2007; Li et al., 2012a; Park et al., 2007; Yang et al., 2007).

Cuando una GSC se divide asimétricamente, la célula hija que queda alejada del nicho deja de recibir las señales Dpp/Gbb y puede expresar *bam* (**Figura 13G**). La expresión de este regulador se mantiene en las oogonias (Ohlstein and McKearin, 1997) y forma un complejo junto con las proteínas Benign gonial cell neoplasm (Bgcn), Sex lethal (Sxl) y Mei-P26 e inhibe la traducción de Nos (**Figura 13H**) (Lavoie et al., 1999; Li et al., 2013).

Una de las proteínas cuya traducción regula el complejo Nos/Pum es Brain tumor (Brat) que se expresa en las ogonias (Harris et al., 2011). Cuando Bam inhibe la traducción de Nos, permite la expresión de Brat que forma un complejo con Pum (**Figura 13I**). Este complejo regulador evita la traducción de proteínas necesarias para el mantenimiento de las GSC también mediante el reclutamiento del complejo CCR4-NOT y el acortamiento de las colas de poli(A) (**Figura 13J**). Algunos de los mRNAs que se ven afectados por este complejo son miembros de la vía de señalización BMP (Mad, Med y Shn) (Harris et al., 2011; Newton et al., 2015). Además, el complejo Bam/Bgcn/Sxl/Mei-P26 afecta a la vía de miRNAs de modo que favorecen también la expresión de factores de diferenciación (**Figura 13K**) (Neumüller et al., 2008).



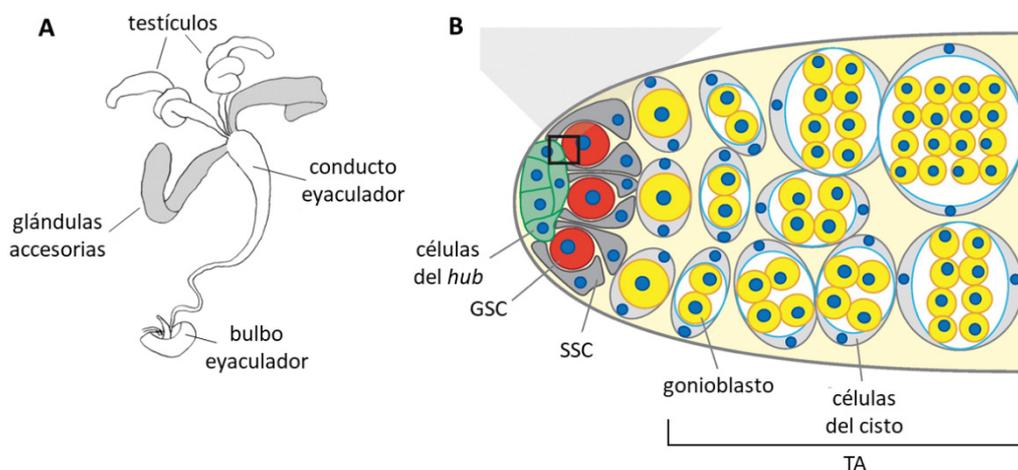
**Figura 13. Regulación en la línea germinal femenina.** A) Las células madre se mantienen unidas a las células *cap* (verde) mediante la E-cadherina. B) Las células *cap* secretan los ligandos Dpp y Gbb, que activan la vía de señalización BMP. C) Los factores de transcripción pMad y Med junto con Sch reprimen la expresión de Bam. D-F) En el citoplasma, diversos factores colaboran en la represión de la traducción de factores necesarios para la diferenciación. G) Cuando la GSC se divide, la célula que queda más alejada del nicho deja de activar la vía de BMP y puede expresar *bam*. H-K) Bam forma un complejo con otros factores y permite la expresión de diferentes factores de diferenciación.

### 1.3.2. La línea germinal masculina

Los testículos de *Drosophila* son dos estructuras tubulares enroscadas en las que se lleva a cabo la espermatogénesis (**Figura 14A**). En la parte más anterior del testículo, existen dos tipos de célula madre que mantienen la espermatogénesis: las células madre de la línea germinal (GSC) y las células madre somáticas (SSC). Al igual que en la línea germinal femenina, las células madre se encuentran en un nicho, formado por unas 12

células somáticas situadas en la punta del testículo, llamadas células del *hub*. Cada una de las GSC está rodeada por dos SSC que también están en contacto con el *hub* (**Figura 14B**). Las GSC se dividen de forma asimétrica para dar lugar a una nueva GSC y a una célula hija, el gonioblasto (GB), que deja de estar en contacto con el *hub* (Inaba et al., 2010; Yamashita et al., 2003).

Los GB sufren cuatro rondas de divisiones mitóticas, pero sin completar la citocinesis, lo que da lugar a la formación de 16 espermatogonias conectadas por puentes citoplasmáticos o *ring canals*. Esta región de divisiones mitóticas recibe el nombre de región de amplificación (TA del inglés *transit amplifying*) (**Figura 14B**). Tras las divisiones, estas células se diferencian a espermatoцитos primarios y entran en una fase de crecimiento en la que se transcriben los productos necesarios para el resto de la espermatogénesis. Tras la primera división meiótica, se forman grupos de 32 espermatoцитos secundarios que después de la segunda división meiótica dan lugar a 64 espermátidas, que darán lugar al espermato maduro (revisado en Maines and Wasserman, 1998).

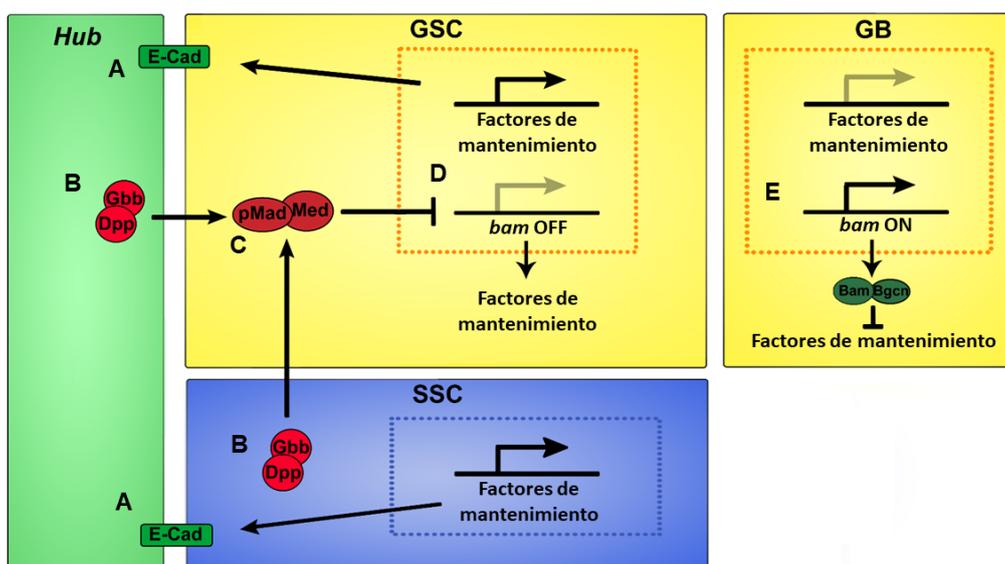


**Figura 14. Representación de los testículos de *Drosophila*.** A) Los machos adultos contienen dos testículos y dos glándulas accesorias que desembocan en el conducto eyaculador (imagen adaptada de Ravi Ram and Wolfner, 2007). B) Sección de la zona anterior del testículo. Las GSC (rojo) y las SSC (gris oscuro) están en contacto con las células del *hub* (verde). La división asimétrica de las GSC y las SSC produce un GB (amarillo) y células del cisto (gris claro) respectivamente. Los GB se dividen 4 veces para dar un grupo de 16 células, las espermatogonias, que se mantienen unidas por puentes citoplasmáticos (imagen adaptada de Li and Xie, 2005).

### 1.3.2.1. Mecanismos de regulación en la línea germinal masculina

Las células madre, tanto GSC como SSC, se mantienen unidas al *hub* a través de uniones adherentes (Voog et al., 2008). La E-cadherina, igual que en ovarios, tiene un papel importante en estas uniones y garantizan que las GSC reciban las señales procedentes del nicho necesarias para su mantenimiento (**Figura 15A**).

Una de las vías de señalización importante para el mantenimiento de las GSC es la vía de BMP, que actúa de un modo similar a ovarios. Los ligandos Dpp y Gbb producidos por las células del *hub* y las SSC son los responsables de la activación de la vía (**Figura 15B**) que tiene como resultado la represión de la expresión de *bam*, esto evita la diferenciación de las GSC (**Figura 15D**) (Kawase et al., 2004; Shivdasani and Ingham, 2003). Tras la división asimétrica de las GSC, los GB pierden la activación de la vía BMP y *bam* deja de estar reprimido (**Figura 15E**). Bam se empieza a detectar en los grupos de 4 células, alcanza su máxima expresión en el grupo de 8 células y decrece hasta desaparecer en el de 16 células. La correcta acumulación de Bam es necesaria para que las células dejen de dividirse y se diferencien a espermatoцитos (Insko et al., 2009; Insko et al., 2012).



**Figura 15. Vías de regulación en las células madre y los GB.** A) Las células madre se mantienen adheridas al *hub* (verde) gracias a la presencia de E-cadherina. B) Las células del *Hub* y las SSC secretan los ligandos Dpp y Gbb, que activan la vía de señalización BMP. C) Los factores de transcripción pMad y Med reprimen la expresión de Bam. D) Con la división de la GSC, la célula hija pierde el contacto con el *hub* y expresa *bam*.

### 1.4. La transcripción y la RNA polimerasa II

La transcripción es el proceso mediante el cual la RNA polimerasa sintetiza una molécula de RNA a partir de una cadena molde de DNA. Los organismos eucariotas contienen tres tipos distintos de RNA polimerasas encargadas de transcribir diferentes tipos de genes. Por lo general, las RNA polimerasas I y II transcriben los RNA ribosómicos (rRNA) y los de transferencia (tRNA). Mientras que los genes que codifican para proteínas se transcriben a RNA mensajeros (mRNA) por la RNA polimerasa II (Cooper, 2000).

La RNA polimerasa II está formada por 12 subunidades (Rpb1 a Rpb12). La Rpb1 es la subunidad más grande y su CTD contiene un heptapéptido (YSPYSPS) que se repite en número variable según la especie (26 veces en levadura, 44 en *Drosophila* y 52 en humanos) y puede estar fosforilado en diferentes posiciones. Los distintos estados de fosforilación están relacionados con los diferentes pasos del proceso de transcripción (revisado en Buratowski, 2009; Chiba et al., 2010).

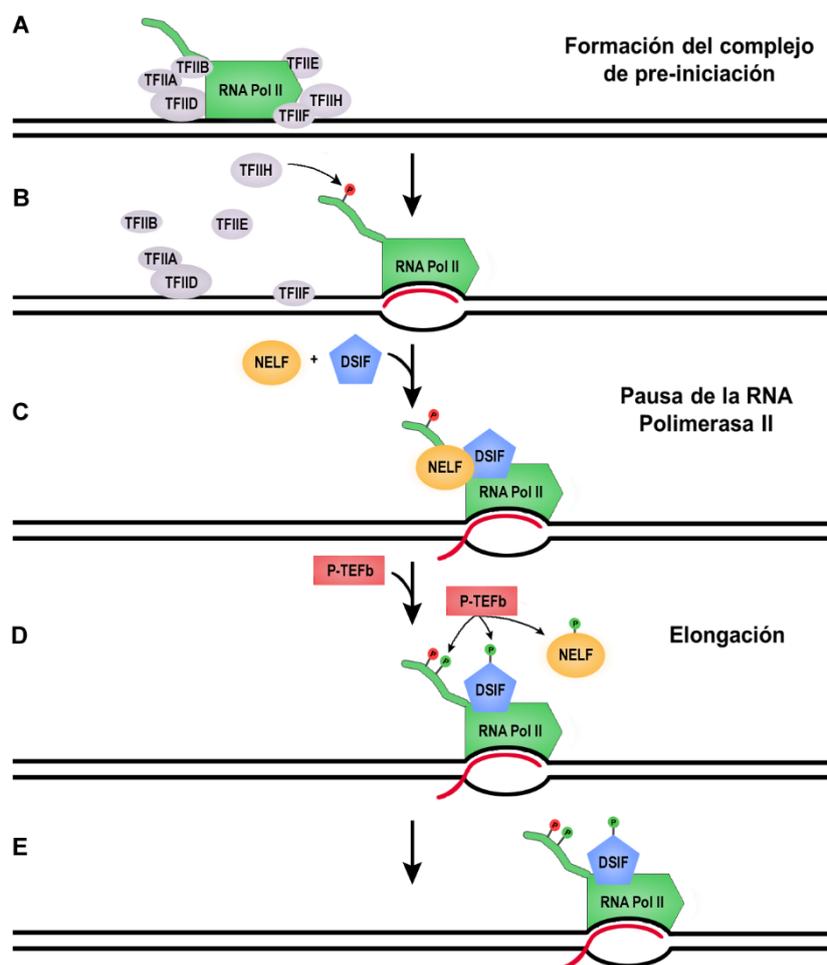
En primer lugar, se da la formación del complejo de pre-iniciación en el promotor (**Figura 16A**). Este complejo está formado por la RNA polimerasa II y por diferentes factores generales de la transcripción (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH – *Transcription Factor for RNA polymerase II A-H*), que aumentan la afinidad de la RNA polimerasa por la región promotora. El posicionamiento de la RNA polimerasa depende de los diferentes factores generales, los cuales reconocen diferentes secuencias presentes en las regiones promotoras (revisado en Juven-Gershon and Kadonaga, 2010).

Una vez formado este complejo, la subunidad cdk7 del TFIIH fosforila la S5 del CTD que provoca una desestabilización de la unión de la RNA polimerasa a los diferentes factores del complejo. De este modo la RNA polimerasa II queda liberada y puede avanzar (**Figura 16B**). Normalmente, el complejo tiende a detenerse cerca de la región promotora debido a la presencia de factores de elongación negativos, estos son el complejo NELF (*Negative Elongation Factor*) y DSIF (*DRB Sensitivity-Inducing Factor*). Cuando esto ocurre se dice que la polimerasa está pausada (**Figura 16C**).

La fase de elongación continúa cuando el factor P-TEFb (*Positive-Transcription Elongation Factor b*) fosforila los complejos NELF y DSIF. Esto conlleva la disociación de NELF del complejo de elongación, mientras que DSIF permanece asociado. Además, P-TEFb fosforila la S2 del CTD, que junto con la fosforilación de DSIF, reclutan factores

necesarios para el avance de la RNA polimerasa (**Figura 16D, E**). A medida que el complejo de elongación avanza, los niveles de S5 fosforilada disminuyen, mientras que los de la S2 fosforilada aumentan (revisado en Buratowski, 2009; Nechaev and Adelman, 2011).

La terminación de la transcripción se puede dar por diferentes mecanismos, aunque en la mayoría de mRNAs se produce por la presencia de una secuencia de poliadenilación seguida de una secuencia rica en G/U. Tras esta secuencia se produce el corte del mRNA seguido de su poliadenilación (revisado en Chiba et al., 2010).



**Figura 16. Fases iniciales de la transcripción.** A) Formación del complejo de pre-iniciación. La interacción con diferentes factores estabiliza la unión de la RNA Pol II al promotor. B) La fosforilación del CTD en la S5 desestabiliza la unión con los factores generales y permite el avance de la polimerasa. C) Reclutamiento de factores negativos que impiden el avance de la RNA Polimerasa. D-E) La elongación continúa cuando P-TEFb fosforila los factores negativos de la elongación y la RNA Pol II.

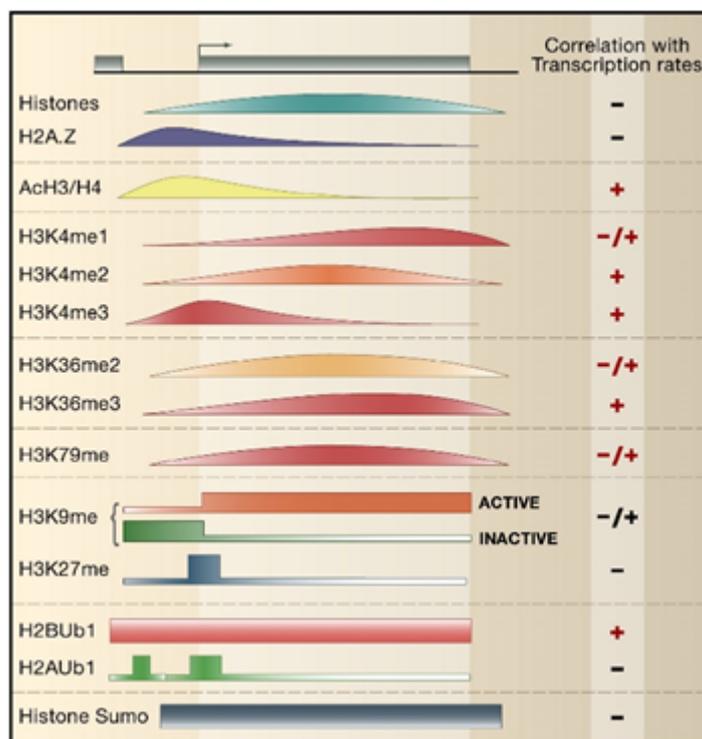
La estructura de la cromatina debe ser modificada para que el proceso de transcripción se lleve a cabo. Existen diversos mecanismos implicados en la regulación como las modificaciones postraduccionales de las histonas, el intercambio de variantes o la remodelación de la cromatina.

### **1.4.1. Papel de las modificaciones de las histonas en la transcripción**

Existen un gran número de PTM que pueden localizarse tanto en las colas N-terminales de las histonas, que protruyen hacia el exterior del nucleosoma, como en los dominios globulares o C-terminales. La metilación de las lisinas (K) y argininas (R) se han relacionado con diferentes aspectos de la transcripción. En particular, la trimetilación de las K4 (H3K4me3) y K36 (H3K36me3) de la histona H3 se asocia a la activación transcripcional. La H3K4me3 es catalizada por la metiltransferasa Set1, que se une a la S5 fosforilada del CTD de la forma activa de la RNA polimerasa II (Ng et al., 2003), por lo que esta marca se encuentra en los promotores de genes activos (Barski et al., 2007; Pokholok et al., 2005). Por el contrario, H3K36me3 es catalizada por Set2 (Kizer et al., 2005) y ocurre a lo largo de la unidad de transcripción (Bannister et al., 2005; Barski et al., 2007; Bell et al., 2007) gracias a la unión de Set2 a la forma elongante de la RNA polimerasa II (Li et al., 2003b; Xiao et al., 2003). Además de estas modificaciones, existen otras que también están relacionadas con la transcripción, ya sea de un modo positivo o negativo (**Figura 17**) (revisado en Li et al., 2007; Zhang et al., 2015). En concreto la acetilación de K en las histonas H3 y H4 se da en los promotores de genes activos y correlaciona con la actividad transcripcional (revisado en Millar and Grunstein, y 2006; Zhang et al., 2015).

La acetilación de K puede afectar de un modo directo la estructura de la cromatina. La adición de esta modificación neutraliza las cargas positivas de las histonas, por lo que se ha propuesto que puede debilitar la unión entre las histonas y el DNA o las interacciones entre diferentes nucleosomas. Por ejemplo, la acetilación de la H3K64 o la H3K122 se encuentran frecuentemente en regiones activas transcripcionalmente y los nucleosomas que presentan estas modificaciones tienen una menor afinidad por el DNA. Estas modificaciones también facilitan la evicción de las histonas (Di Cerbo et al., 2014; Tropberger et al., 2013). Además, la acetilación de las lisinas se puede producir en un gran número de residuos de la cola N-terminal (revisado en Kouzarides, 2007). Los niveles de acetilación de las histonas dependen de la acción de acetiltransferasas (HAT) y deacetilasas (HDAC) (revisado en Bannister and Kouzarides, 2011; Sterner and Berger, 2000). Un ejemplo de HAT directamente relacionado con la activación de la

transcripción es el caso de TAF<sub>II</sub> (*TATA-binding protein-associated factor*), una subunidad del factor general de la transcripción TFIID, que se une a los promotores de forma específica a través de la subunidad TBP (*TATA-binding protein*) (Mizzen et al., 1996).



**Figura 17. Patrón de distribución de diferentes modificaciones de histonas relacionadas con la transcripción.** Imagen de Li et al., 2007.

El efecto de las modificaciones sobre la estructura de la cromatina es en su mayoría debido a la interacción con diferentes factores. El reconocimiento se produce a través de dominios específicos para las diferentes modificaciones. En el caso de las lisinas acetiladas, son reconocidas por los llamados bromodominios (revisado en Swygert and Peterson, 2014). Estos dominios se encuentran, por ejemplo, en los complejos remodeladores y modificadores de las histonas o proteínas que sirven de anclaje para componentes de la maquinaria de transcripción (revisado en Fujisawa and Filippakopoulos, 2017). Las lisinas metiladas pueden ser reconocidas por diferentes dominios (PHD, Tudor, PWWP, MBT y cromodominio) presentes también en complejos remodeladores y modificadores de las histonas (revisado en Bannister and Kouzarides, 2011; Swygert and Peterson, 2014; Yap and Zhou, 2010). Además, las modificaciones también pueden impedir el reconocimiento de las histonas por diferentes factores.

### 1.4.2. Complejos remodeladores de la cromatina

Los complejos remodeladores pueden afectar la estructura de la cromatina mediante diferentes mecanismos como el deslizamiento y retirada de nucleosomas o el recambio de las histonas canónicas por otras variantes. Esta actividad requiere de la hidrólisis de ATP, mediante la cual los remodeladores son capaces de alterar los contactos entre el DNA y las histonas. Además de la actividad ATPasa, estos complejos incluyen dominios que regulan esta actividad, dominios que reconocen las modificaciones de las histonas y dominios o proteínas a través de los cuales interactúan con otros factores. Los remodeladores se clasifican en cuatro familias conservadas desde levaduras hasta mamíferos: SWI/SNF, ISWI, CHD e INO80. Todas las familias contienen la subunidad ATPasa SWI/SNF2. Además, dentro de cada familia existen diferentes complejos que varían en la composición de las subunidades (revisado en Clapier and Cairns, 2009; Petty and Pillus, 2013).

Los complejos de la familia SWI/SNF contienen bromodominios mediante los cuales reconocen la acetilación de las histonas. Además, la presencia de estas modificaciones se ha visto que incrementa la remodelación por parte de los complejos SWI/SNF y RSC en levadura (Ferreira et al., 2007). Diferentes estudios muestran que esta familia está implicada en el inicio de la transcripción (revisado en Lorch and Kornberg, 2015). Por otro lado, la familia CHD se caracteriza por contener cromodominios. Los miembros de esta familia pueden deslizar o retirar los nucleosomas para promover la transcripción, aunque también pueden inhibirla mediante la colaboración con subunidades HDAC (revisado en Clapier and Cairns, 2009; Petty and Pillus, 2013).

Los complejos ISWI, a diferencia de SWI/SNF y CHD, se unen a colas de histonas que no contienen modificaciones. En el caso concreto de los complejos ACF y CHRAC de *Drosophila* y mamífero se encargan de optimizar el espaciado de los nucleosomas con el fin de que se produzca el ensamblaje de la cromatina y de este modo reprimen la transcripción. En levaduras y en *Drosophila* se ha visto además que la subunidad ATPasa de ISWI puede interactuar y cooperar con HDACs lo que favorece la represión (Burgio et al., 2008). Por el contrario, el complejo NURF puede colocar los nucleosomas de una forma aleatoria y facilitar la transcripción (revisado en Clapier and Cairns, 2009). Finalmente, el complejo INO80 también se ha relacionado tanto con la activación como la represión de la transcripción. Este remodelador puede desplazar los nucleosomas y recolocarlos tras el paso de la maquinaria de la transcripción. Además, retira los dímeros de H2A-H2B y los reemplaza por H2A.Z-H2B, lo que promueve la

activación de la transcripción, además de la reparación del DNA (revisado en Poli et al., 2017).

## **1.5. La regulación de la traducción en organismos eucariotas**

En eucariotas, el proceso de traducción requiere de una regulación muy compleja. Por un lado, existen mecanismos generales de la traducción que regulan de una forma global la traducción de los mRNA. Esta regulación se da mediante la activación o inhibición de uno o más componentes de la maquinaria de la traducción. Por otro lado, también se puede producir una regulación específica de los distintos mRNA. Este tipo de regulación se produce gracias a secuencias presentes en la región 5' y 3' no traducidas (UTR) e incluso en la secuencia codificante del mRNA, las cuales son reconocidas por diferentes complejos.

### **1.5.1. Regulación de la longitud de la cola de poli(A)**

La cola de poli(A) está relacionada con la estabilidad y la traducción de los mRNA. Numerosos estudios muestran que durante el proceso de maduración del oocito y el desarrollo de muchos organismos, la traducción de los mRNA maternos está relacionada con cambios en la longitud de la cola poli(A). Así pues, los mRNA con colas cortas se mantienen silenciados durante su desarrollo y se traducen cuando se da un alargamiento de la cola de poli(A). Por el contrario, cuando se produce un acortamiento, dejan de traducirse e incluso precede a su degradación (McGrew et al., 1989; Sallés et al., 1996).

La poliadenilación de los mRNA se produce gracias a la presencia del hexanucleótido señal de poliadenilación, también necesario para la poliadenilación en el núcleo, y el elemento de poliadenilación citoplasmática (CPE) (Fox et al., 1989; McGrew et al., 1989), que es reconocido por proteínas de unión al CPE (CPEB) (Hake and Richter, 1994). La estimulación de la traducción mediante la cola de poli(A) se da por el reconocimiento y unión de la proteína de unión a poli(A) (PABP), que interacciona con el factor eIF4G y mejora la afinidad del factor eIF4E a la estructura del cap en el extremo 5', de modo que se produce el reclutamiento del complejo 43S (revisado en Richter, 1999; Villalba et al., 2011), formado por la subunidad pequeña del ribosoma o 40S, el tRNA y factores necesarios para la iniciación de la traducción. Además, también se pueden encontrar otras señales, como por ejemplo los elementos ricos en AU (ARE), que favorecen el acortamiento de las colas de poli(A) (**Figura 18B-C**) (Chen et al., 1994; Shyu et al., 1991).

### 1.5.3. Poliadenilación alternativa

Existen estudios que muestran que una gran proporción de genes contienen en su secuencia más de un lugar de poliadenilación. Esto implica que se puedan dar eventos de poliadenilación alternativa (APA) y que se generen extremos 3' alternativos con el fin de regular la estabilidad, localización y traducción de los mRNA (**Figura 18A**). En diferentes organismos, se ha observado la existencia de poliadenilación alternativa en los diferentes tejidos donde se expresa una proteína (revisado en Elkon et al., 2013). En el caso de humanos, diferentes tejidos analizados como pulmones, ovarios y placenta usan sitios de poli(A) más cercanos, mientras que el sistema nervioso usa preferentemente sitios más alejados (Zhang et al., 2005). De forma similar, en *Drosophila melanogaster*, los genes asociados a neuronas también presentan 3'UTRs más largos, mientras que los genes expresados en testículos contienen los 3'UTR más cortos (Smibert et al., 2012). El uso de 3'UTR alternativos también se ha podido observar durante el desarrollo embrionario, a medida que avanza el desarrollo la longitud de los 3'UTR aumenta (Ji et al., 2009). La formación de 3'UTRs más largos puede favorecer la aparición de mecanismos adicionales de regulación, ya que estos 3'UTRs pueden contener nuevos sitios de unión para diferentes proteínas o sitios de reconocimiento de miRNAs (Ji and Tian, 2009).

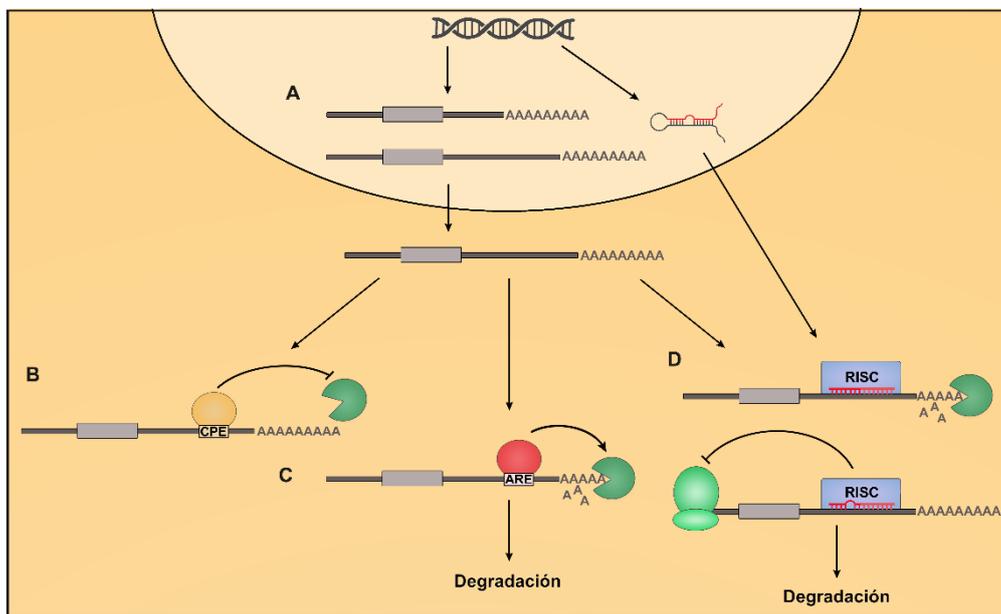
### 1.5.4. Regulación mediante proteínas de unión a RNA

A lo largo de la vida del mRNA, éste se asocia a diferentes proteínas conocidas como RBP (del inglés *RNA binding protein*). Esta unión puede tener tanto efectos positivos como negativos en la traducción (**Figura 18B, C**). La unión de la RBP al mRNA se produce a través de dominios de unión a RNA, que les permite reconocer de forma específica secuencias de pocos nucleótidos o estructuras presentes en el mRNA. Además, las RBP pueden formar diferentes complejos con otras RBP y afectar a la especificidad del reconocimiento (revisado en Lunde et al., 2007).

Se conocen diferentes RBP, un ejemplo son las proteínas que reconocen los elementos CPE o los ARE que favorecen la deadenilación de las colas de poli(A). También lo son las proteínas Nos y Pum, mencionadas en el apartado 1.3.1.2 y conservadas desde *C. elegans* hasta humanos (Miller and Olivas, 2011; Tsuda et al., 2003).

### 1.5.5. Regulación mediante microRNAs

Los miRNA son pequeñas moléculas de unos 22 nucleótidos que actúan como represores de la traducción. Después de diferentes pasos de procesado, los miRNAs se unen en el citoplasma a proteínas de la familia Argonaute, que junto con Dicer, un enzima con actividad RNasa, forman el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*). El miRNA guía el complejo hacia sus mRNA diana gracias a su complementariedad con la secuencia. Cuando el apareamiento es perfecto, se produce el corte y degradación del mRNA, mientras que cuando es imperfecto se produce un silenciamiento del mRNA (**Figura 18D**) (Bushati and Cohen, 2007).



**Figura 18. Regulación de la traducción.** A) En el momento de finalizar la transcripción, el mRNA puede ser cortado y poliadenilado en diferentes secuencias y generar varias isoformas. B) La unión de algunas RBP previene el acortamiento de la cola de poli(A) y su posterior degradación. C) La unión de la RBP al elemento ARE recluta a nucleasas que degradan la cola de poli(A). D) Reconocimiento de mRNA por parte del complejo RISC que acabarán siendo degradados.



## **2.OBJETIVOS**



Estudios previos han demostrado que dBigH1 es esencial para la correcta activación del genoma zigótico. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual dBigH1 reprime la transcripción zigótica no ha sido determinado. Por otro lado, dBigH1 se expresa en la línea germinal femenina, pero se desconoce su función y regulación. Por estos motivos se propusieron los siguientes objetivos:

1. Estudio del mecanismo molecular por el cual dBigH1 regula la transcripción.
2. Análisis de la regulación de la expresión de dBigH1 durante la oogénesis.



## **3.MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Cepas bacterianas

Para la manipulación de DNA plasmídico se usaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : *deoR endA1 gyrA96 hsdR17 (r<sub>k</sub>m<sub>k</sub>) recA1 relA1 supE44 thi-1 F'[traD36 proAB+ lac1<sup>q</sup> lacZ  $\Delta$ M15]*.

#### 3.1.2. Plásmidos

##### 3.1.2.1. Plásmidos de clonaje

En la **Tabla 1** se indican los plásmidos usados en los clonajes realizados en este trabajo.

Nombre	Características
<b>pCR2.1-TOPO (Invitrogen)</b>	Usado para el clonaje de productos de PCR mediante el sistema TOPO-TA (Invitrogen).
<b>pattB</b>	Usado para la generación de líneas transgénicas de mosca mediante inserción dirigida.
<b>pMK33-FLAG</b>	Vector pMK33-C-TAP modificado que contiene la secuencia de FLAG. Usado en la generación de líneas de células S2 estables. Contiene el promotor de la metalotioneína, el cual responde a la presencia de metales en el medio (Carbonell et al., 2017; Veraksa et al., 2005).

**Tabla 1. Plásmidos de clonaje.** Se especifica el uso de los plásmidos.

##### 3.1.2.2. Plásmidos para la expresión de proteínas en células S2 de *Drosophila melanogaster*

Se han generado diferentes líneas estables de S2 que expresan diferentes formas truncadas de dBigH1. En la **Tabla 2** se enumeran los plásmidos usados para la generación de las diferentes líneas.

Nombre	Características
<b>pMK33-dBigH1::FLAG</b>	Generado en el laboratorio por el Dr. Alejandro Vaquero. Contiene el CDS de dBigH1.
<b>pMK33-dBigH1<sup>AED</sup>::FLAG</b>	Contiene las bases 174 a 1059 del CDS de dBigH1.
<b>pMK33-dBigH1<sup>ANTD</sup>::FLAG</b>	Contiene las bases 306 a 1059 del CDS de dBigH1.

**Tabla 2. Plásmidos de expresión en células S2.** Se indica la secuencia de cada construcción.

### 3.1.2.3. Plásmidos para la generación de líneas transgénicas de moscas

En este trabajo se han usado diferentes líneas transgénicas de mosca generadas en el laboratorio. En la **Tabla 3. Plásmidos para la generación de moscas transgénicas.** Se indica el contenido de los plásmidos. se especifican los plásmidos usados en este trabajo.

Nombre	Características
<b>pattB-vasaP-EGFP-3'UTR vasa</b>	Contiene la secuencia codificante para el EGFP, el promotor y secuencias UTR del gen <i>vasa</i> . Cedido por el Dr. Nakamura (Sano et al., 2002).
<b>pattB-vasaP-EGFP-3'UTR bh1</b>	Contiene la secuencia codificante para el EGFP, el promotor y secuencia 5'UTR del gen <i>vasa</i> y la secuencia 3'UTR de <i>dBigH1</i> .
<b>pattB-dBigH1P-dBigH1::HA</b>	Contiene el promotor de <i>dBigH1</i> , su CDS y las secuencias 5' y 3'UTR.
<b>pattB-dBigH1P-dBigH1<sup>m1</sup>::HA</b>	Contiene el promotor de <i>dBigH1</i> , su CDS y las secuencias 5' y 3'UTR. La secuencia 3'UTR contiene dos mutaciones puntuales en las posiciones 14 y 15 del 3'UTR (GT>CC).
<b>pattB-dBigH1P-dBigH1<sup>m2</sup>::HA</b>	Contiene el promotor de <i>dBigH1</i> , su CDS y las secuencias 5' y 3'UTR. La secuencia 3'UTR contiene dos mutaciones puntuales en las posiciones 42 y 43 del 3'UTR (GT>CC).
<b>pattB-dBigH1P-dBigH1<sup>m1+m2</sup>::HA</b>	Contiene el promotor de <i>dBigH1</i> , su CDS y las secuencias 5' y 3'UTR. La secuencia 3'UTR contiene cambios puntuales en las posiciones 14 y 15 (GT>CC) y 42 y 43 del 3'UTR (GT>CC).

**Tabla 3. Plásmidos para la generación de moscas transgénicas.** Se indica el contenido de los plásmidos.

### 3.1.3. Líneas celulares

En este estudio se han usado células S2 de *Drosophila melanogaster* y líneas estables derivadas de células S2. Estas células proceden de embriones de 20 a 24h (Schneider, 1972). Las células S2 crecen a 25°C semiadheridas a la superficie en medio Schneider (Biowest), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de Penicilina/Estreptomocina. Las líneas estables derivadas se mantuvieron en medio Schneider suplementado con 10% de FBS y 0,3 mg/mL de Higromicina B (Sigma).

### 3.1.4. Líneas de *Drosophila melanogaster*

En la **Tabla 4** se indican las diferentes líneas de *Drosophila melanogaster* usadas en este trabajo.

Genotipo	Procedencia	Características
<i>white<sup>-</sup></i> ( <i>w<sup>1118</sup></i> )	BDSC	Mutación del gen <i>white</i> que elimina la proteína. Usadas como moscas control.
<i>da-gal4</i>	BDSC	Expresa la proteína Gal4 bajo el control del promotor del gen <i>daughterless</i> .
<i>w<sup>1118</sup>, nos-Gal4::VP16</i>	Cedida por la Dra. Llimargas	Expresa la proteína Gal4 bajo el control del promotor <i>nanos</i> (Van Doren et al., 1998).
<i>w; [bamP-bam::GFP-bam3'UTR]wt/CyO</i>	Cedida por el Dr. Buszczak	Expresa la proteína Bam fusionada con GFP (Chen and McKearin, 2003a).
<i>w; UAS-dBigH1</i>	Generada en el laboratorio	Expresa dBigH1 bajo el control de la secuencia UAS.
<i>w; UAS-dBigH1<sup>ΔED</sup></i>	Generada en el laboratorio	Expresa dBigH1 <sup>ΔED</sup> bajo el control de la secuencia UAS.
<i>w; UAS-dBigH1<sup>ΔNTD</sup></i>	Generada en el laboratorio	Expresa dBigH1 <sup>ΔNTD</sup> bajo el control de la secuencia UAS.
<i>w; UAS-dBigH1<sup>ΔCTD</sup></i>	Generada en el laboratorio	Expresa dBigH1 <sup>ΔCTD</sup> bajo el control de la secuencia UAS.
<i>dBigH1P-dBigH1::HA</i>	Generada en el laboratorio	Expresa dBigH1 bajo las secuencias reguladoras de dBigH1.
<i>dBigH1P-dBigH1<sup>m1</sup>::HA</i>	Generada en el laboratorio	Expresa dBigH1 <sup>m1</sup> bajo las secuencias reguladoras de dBigH1.
<i>dBigH1P-dBigH1<sup>m2</sup>::HA</i>	Generada en el laboratorio	Expresa dBigH1 <sup>m2</sup> bajo las secuencias reguladoras de dBigH1.
<i>dBigH1P-dBigH1<sup>m1+m2</sup>::HA</i>	Generada en el laboratorio	Expresa dBigH1 <sup>m1+m2</sup> bajo las secuencias reguladoras de dBigH1.
<i>vasaP-EGFP-vasa3'UTR</i>	Generada en el laboratorio	Expresa la proteína EGFP bajo el promotor del gen <i>vasa</i> . Además contiene las secuencias UTR.
<i>vasaP-EGFP-BigH13'UTR</i>	Generada en el laboratorio	Expresa la proteína EGFP bajo el promotor del gen <i>vasa</i> . Contiene el 3'UTR del gen <i>dBigH1</i> .
<i>y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS00029}attP2</i>	BDSC	Expresa un RNAi contra <i>bam</i> bajo el control de la secuencia UAS.

$y[1] v[1]; P\{y[+t7.7]$ $v[+t1.8]=TRiP.HM05078\}attP2$	BDSC	Expresa un RNAi contra <i>brat</i> bajo el control de la secuencia UAS.
--	------	---

**Tabla 4. Líneas de *Drosophila melanogaster* usadas.** Se indica la procedencia de las diferentes líneas y sus características.

### 3.1.5. Oligonucleótidos

En la **Tabla 5** se indican los oligonucleótidos usados, los cuales fueron sintetizados por Sigma.

Nombre	Secuencia	Experimento
S2 1) F	GCTCGAGATGGAGGTCGAGACAGATAATC	Clonaje
S2 2) R	GATATCGACTTTGCGCTTGC	Clonaje
S2 3) F	GCTCGAGATGATATCCCTAGCTCTTATGG	Clonaje
S2 9) R	GCCCTCGAGGACTTTGCGCTTGC	Clonaje
F_Brat_m1	TATCCTTTTTTTTCAGTACATGTGAAAC	Clonaje
R_Brat_m1	TAAATCATAACTAAGCGTAATCTGG	Clonaje
F_Brat_m2	ATGTGAAACTTTTCCTTAAATAAAATTGATAC	Clonaje
R_Brat_m2	GTAAGTAAAAAATCATATAAATCATAACTAAG	Clonaje
R_Brat_m1B	GTAAGTAAAAAATGATATAAATCATAAC	Clonaje
eve_FW	AACTCCTTGAACGGCAGCC	ChIP-qPCR
eve_RV	CAGCTGGTCACGGGTGAAG	ChIP-qPCR
hairy_FW	CGCCGATCCCAAGATTGTG	ChIP-qPCR
hairy_RV	AGCGGCTAACCTCGTTTAC	ChIP-qPCR
ftz_FW	GTCAGACGTACACCCGCTA	ChIP-qPCR
ftz_RV	CGGGTGATGTATCTATTGA	ChIP-qPCR
tum_FW	GGAACACCGACGACGAAG	ChIP-qPCR
tum_RV	TACGCAGTGCACAATCAGT	ChIP-qPCR
actin_FW	GCGCGGTTACTCTTTCACCA	ChIP-qPCR, RT-qPCR
actin_RV	ATGTCACGGACGATTTACAG	ChIP-qPCR, RT-qPCR
RT96500_FW	GAATCGAAAACCTCACGTAGCA	ChIP-qPCR
RT96500_RV	TGGTTGCTACTTTACTTGCGC	ChIP-qPCR
TR2_F	AAACACGTCTCCACCCGAAG	ChIP-qPCR
TR2_R	CTATTCTAACATTCGGCATTCCAC	ChIP-qPCR
Het-AORF_F	AAACGACGATCTGGACTGCT	ChIP-qPCR
Het-AORF_R	CGGAAAATGCTGGGAGTTA	ChIP-qPCR
bam_TSS_FW	TTGAAACTTATTTGTGCGACGGC	ChIP-qPCR

bam_TSS_RV	TTTACCGTTTGAATGCCTGACG	ChIP-qPCR
cg14946_TSS_F	AGCTTCCAATATTCCCGACT	ChIP-qPCR
cg14946_TSS_R	TGCAACGACCGATAAGTCTG	ChIP-qPCR
cg14946_CDS_F	TCAAGTCGGATGTTGGATGC	ChIP-qPCR
cg14946_CDS_R	CCAGAACTGCGAGAACACG	ChIP-qPCR
cg9733_TSS_F	CGGTACTGTAGGATTCCGA	ChIP-qPCR
cg9733_TSS_R	CTGACCCGATAACCCTTAC	ChIP-qPCR
cg9733_CDS_F	GGAACAGGATTTACGATGGC	ChIP-qPCR
cg9733_CDS_R	GAGGACATATCGCCGATTGA	ChIP-qPCR
cg10232_TSS_F	GGATAGATAACCGACGGATTTG	ChIP-qPCR
cg10232_TSS_R	GCTGTCTGCTTACGAACC	ChIP-qPCR
cg10232_CDS_F	TGCCCCCTTTGTAGAGATC	ChIP-qPCR
cg10232_CDS_R	CGTTTGAAGACGCACCAAGG	ChIP-qPCR
cg13386_TSS	GATGATGAACGCAGCGAAGC	ChIP-qPCR
cg13386_TSS_R	CGGGCGAACATGATGACTAAG	ChIP-qPCR
cg13386_CDS_F	AATCCTCTGCTCCTCCAG	ChIP-qPCR
cg13386_CDS_R	CTGCTGCTCGTCGTTTACG	ChIP-qPCR
Upd2_TSS_F	AGCAGCAAGCGATTGTGATA	ChIP-qPCR
Upd2_TSS_R	TTAAGGTAAAGGCTGGCATTG	ChIP-qPCR
Upd2_CDS_F	CGCAGTACAAGTTCCGCAA	ChIP-qPCR
Upd2_CDS_R	ATAGGAGGCGTTTATGGTCA	ChIP-qPCR
cg10550_TSS_F	CGGACGGAGAGTTCAGTATTT	ChIP-qPCR
cg10550_TSS_R	GTTCCGAGAAAACGCTGCTTT	ChIP-qPCR
cg10550_CDS_F	GCTAAAAGGGTTCGATCTGC	ChIP-qPCR
cg10550_CDS_R	CTCTGCTCGTTGTAGATGGA	ChIP-qPCR
cg9338-RB_TSS_F	TGAACGCTTTCGCTTTGGAC	ChIP-qPCR
cg9338-RB_TSS_R	CGGTGAGAGCCAAGATCATT	ChIP-qPCR
cg9338-RB_CDS_F	GGTAACCCGCAAATCGTGA	ChIP-qPCR
cg9338-RB_CDS_R	CGCAGCTCAGCAACTTGTT	ChIP-qPCR
cg11550_TSS_F	CAACCAGTTTCACTTGCGAA	ChIP-qPCR
cg11550_TSS_R	CGCCGAGGATTTACTTCTGA	ChIP-qPCR
cg11550_CDS_F	AAGGAACTGACCACTGTGC	ChIP-qPCR
cg11550_CDS_R	CCTCCAGTTGACCACCATA	ChIP-qPCR
cg3376_TSS_F	GCGGTTGGATTTCGATTCT	ChIP-qPCR
cg3376_TSS_R	ACTCCACACTTGTCGCTTTG	ChIP-qPCR
cg3376_CDS_F	GACGTGTGGAACCAAACCA	ChIP-qPCR
cg3376_CDS_R	TTTCGTGGTTGCCAGAG	ChIP-qPCR
osi3_TSS_F	ATCACTGGCGGGAAATTCG	ChIP-qPCR
osi3_TSS_R	AATCACACTCTCACAGTCGC	ChIP-qPCR

MATERIALES Y MÉTODOS

osi3_CDS_F	CTCTATGGGGTCCGATGA	ChIP-qPCR
osi3_CDS_R	GAGAACTTGTATCGCAGGGA	ChIP-qPCR
cg13157_TSS_F	TTGCCGTTTACAAGCCGTC	ChIP-qPCR
cg13157_TSS_R	CCAGTTTTTCGGTGTAACGCT	ChIP-qPCR
cg13157_CDS_F	TAGCACATCCCTTACGGTG	ChIP-qPCR
cg13157_CDS_R	TGGGCGGAGTTTAGAGAATC	ChIP-qPCR
tj_TSS_F	CAGAGCATCCAGAGCAGA	ChIP-qPCR
tj_TSS_R	GCTTTTCGCGTCCAATGTGA	ChIP-qPCR
tj_CDS_F	GACATGCTGACCACGTTGAC	ChIP-qPCR
tj_CDS_R	CTGATGGAGTCGCTTGGAC	ChIP-qPCR
RpL32	GCTAAGCTGTCCGACAAATG	RT-qPCR
RpL32	ACCAGGAACTTCTTGAATC	RT-qPCR
bam_FW	GCACGGCGATTGCTTAGAG	RT-qPCR
bam_RV	CGGTCAGGTGATCATGCAG	RT-qPCR
cg14946_cDNA_FW	CAGCGGGGAGATAGTTTTGA	RT-qPCR
cg14946_cDNA_RV	AAACCACTGTGCTACCCAAT	RT-qPCR
cg5144_cDNA_FW	AAAACCTAGATCCCGATGGC	RT-qPCR
cg5144_cDNA_RV	CTAGTCACTGCCCAACAAT	RT-qPCR
cg10232_cDNA_FW	GTAGAGATCGGCATCGAGTA	RT-qPCR
cg10232_cDNA_RV	TCGTGGGTATATCGAACTGG	RT-qPCR
cg13386_cDNA_FW	AAATCTCCAGGATCGCATCAG	RT-qPCR
cg13386_cDNA_RV	ATACGGGTGGGAATTGCTTT	RT-qPCR
upd2_cDNA_FW	GGAACATCACGATGAGCGAA	RT-qPCR
upd2_cDNA_RV	TCTTTAGCTTCACCGCACTT	RT-qPCR
cg10550_cDNA_FW	TCCCTACGATGCCATGTAC	RT-qPCR
cg10550_cDNA_RV	CTGCTTACCCAGAGACTCAA	RT-qPCR
cg9338_cDNA_FW	GTAGCCTCGTTTTGGATTGC	RT-qPCR
cg9338_cDNA_RV	TTACCGGGAATGTCGATGG	RT-qPCR
cg11550_cDNA_FW	CACCTGGAGGAGTTCTTCG	RT-qPCR
cg11550_cDNA_RV	GCAGGGGAACAATAGAGACT	RT-qPCR
inx2_cDNA_FW	GTGTGCTTCGTCTCTTCTT	RT-qPCR
inx2_cDNA_RV	TCCATGACCAGCATCTTGAG	RT-qPCR
cg3376_cDNA_FW	CCACGAGTCCTGGATAATGA	RT-qPCR
cg3376_cDNA_RV	ACGCAGGGCTTTCATGTTAT	RT-qPCR
3-RACE AS	TAATACGACTCACTATAGGGCGGATCCTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN	3'RACE
T7AS	GTAATACGACTCACTATAGGGC	3'RACE
b1utr1FW	GGTCAAGAACTGGTGGCT	3'RACE
b1utr4FW	GTCAAGGCGGTCAAGAAAC	3'RACE

b1utr3FW	CTAAAAAGTCGCGAAAGTCC	secuenciación
b1utr8FW	AAAGGGAGCCTCCACACC	secuenciación

**Tabla 5. Lista de oligonucleótidos usados.** Se indica la secuencia de 5' a 3' y el experimento en el que se usó.

### 3.1.6. Anticuerpos

La **Tabla 6** contiene una lista de los anticuerpos usados en los distintos experimentos.

Primarios	Características	Procedencia
anti-dBigH1	Conejo; IF 1:800; WB 1:10.000; ChIP 1µL	Generado en el laboratorio
anti-dBigH1	Rata; IF 1:600	Generado en el laboratorio
anti-dH1	Conejo; IF 1:400; ChIP 1µL	Cedido por el Dr. J. Kadonaga
anti-H4	Conejo; WB 1:5000	Abcam
anti-H3Kac	Conejo; ChIP 2 µg	Millipore
anti-Rpb3	Conejo; ChIP 3,5µg	Cedido por la Dr. J. Zeitlinger.
anti-Pol II Ser2P	Conejo; IF 1:400	Abcam
anti-Pol II Ser5P	Conejo; ChIP: 2 µg	Abcam
anti-brat	Conejo; IF 1:250	Cedido por el Dr. J. Knoblich
anti-aducina	Ratón; IF 1:30	DSHB
anti-vasa	Rata; IF 1:300	DSHB
anti-tj	Cobaya; IF 1:500	Cedido por la Dr. Godt
anti-FLAG	Ratón; WB 1:2500	Sigma
anti-HA	Rata; IF 1:200	Roche
Secundarios	Características	Procedencia
anti-conejo Cy3	IF 1:400	Jackson
anti-conejo Cy5	IF 1:400	Jackson
anti-ratón Cy2	IF 1:400	Jackson
anti-ratón Cy3	IF 1:400	Jackson
anti-rata Cy2	IF 1:400	Jackson
anti-rata Cy5	IF 1:400	Jackson
anti-cobaya Cy5	IF 1:400	Cedido por el Dr. Casanova
anti-conejo HRP	WB 1:10.000	Jackson
anti-ratón HRP	WB 1:10.000	Jackson

**Tabla 6. Lista de anticuerpos.** Se indica las diluciones usadas en los diferentes ensayos (IF: inmunofluorescencia, WB: Western Blot; ChIP: inmunoprecipitación de cromatina).

## 3. 2. Métodos

### 3.2.1. Técnicas de manipulación del DNA

#### 3.2.1.1. PCR

Para las PCR se usaron condiciones estándar con algunas variaciones en la temperatura de hibridación o en el tiempo de elongación, dependiendo de los oligonucleótidos usados y el tamaño del producto de la amplificación.

Para los clonajes se usó la polimerasa *Phusion Hot Start*, puesto que su tasa de error es muy baja. Para una reacción estándar se usó entre 1 pg y 10 ng de DNA y se preparó la reacción de acuerdo al manual del fabricante. Abajo se indica el programa utilizado para las PCR.

```
          2 min a 98°C
-----
        30 seg a 98°C
        30 seg a 54°C      x25
        15-30seg/Kb a 72°C
-----
          10 min a 72°C
```

#### 3.2.1.2. Transformación de células competentes

Las células competentes se incubaron con 10 µL del producto de ligación durante 30 min en hielo. Posteriormente se realizó un choque térmico en un baño a 42°C durante 2 min. Seguidamente se añadió 400 µL de medio LB y se dejaron recuperar las células durante 30 min a 37°C y en agitación constante. Finalmente se sembraron las células en placas de LB con antibiótico y se dejaron crecer durante la noche a 37°C.

#### Medio LB

Triptona 10 g/L

Extracto de levadura 5 g/L

NaCl 10 g/L

NaOH 1mM

#### 3.2.1.3. Minipreparación de DNA plasmídico

Para el aislamiento del DNA plasmídico se usó el método de “minipreparación alcalina” que consiste en una lisis alcalina de las bacterias. Para la extracción del DNA bacteriano se inocularon 4 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a partir de una colonia aislada de bacterias previamente transformadas con el plásmido de

interés. Se incubó el cultivo durante la noche a 37°C en agitación constante. El día siguiente se pasó 1,5 mL del cultivo a un *ependorf* y se centrifugó a 9000 revoluciones por minuto (rpm) durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 µL de solución GTE con el vórtex. Posteriormente se añadió 200 µL de la solución de lisis, se mezcló por inversión y se incubó la mezcla en hielo durante 5 min. Pasado este tiempo, se añadió 150 µL de acetato sódico 3M, se invirtió el tubo y se dejó en hielo 5 min más. Tras este tiempo, se centrifugó 5 min a 14.000 rpm y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió un volumen de fenol/cloroformo, se mezcló con el vórtex y se centrifugó 2 min a 14.000 rpm. En este punto se recuperó la fase acuosa (fase superior) donde se encuentra el DNA del plásmido y se añadió dos volúmenes de etanol 100% frío. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min. El pellet obtenido se lavó con 300 µL de etanol 70% frío y se volvió a centrifugar a 14.000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a 37°C. Finalmente, se resuspendió el pellet con 40 µL de TE 1X suplementado con 1 µg de RNasaA y se dejó digerir durante al menos 20 min a 37°C.

<b>GTE</b>	<b>Solución de lisis</b>	<b>TE 1X</b>
Glucosa 50 mM	NaOH 0,2 N	Tris-HCl pH 8.0 10 mM
Tris-HCl pH 8.0 25 mM	SDS 1%	EDTA 1 mM
EDTA 10 mM		

#### **3.2.1.4. Maxipreparación de DNA plasmídico**

Para la maxipreparación se inocularon 500 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a partir de un minicultivo. El cultivo se incubó toda la noche en agitación a 37°C. Al día siguiente se recogió el cultivo y se centrifugó a 4500 rpm, se descartó el medio y se procedió a la extracción del DNA plasmídico con el kit *DNA, RNA and protein purification* de Macherey-Nagel según las instrucciones del fabricante. Finalmente, el pellet se dejó secar y se resuspendió en 500 µL de TE 1X.

#### **3.2.1.5. Transfección de células S2**

Para la obtención de células estables se transfectaron células S2 mediante el método de fosfato cálcico (Di Nocera and Dawid, 1983), que facilita la entrada de DNA a las células mediante la formación de precipitados de DNA-Ca<sup>2+</sup>.

Inicialmente se plaquearon 3x10<sup>6</sup> células en placas de 5 mL y pasadas 24h se procedió a la transfección. Cada transfección se realizó por duplicado y las cantidades se escalaron para 2,5 reacciones. En primer lugar, se preparó la mezcla de DNA (10 o 20

$\mu\text{g}$ ) en un volumen final de 125  $\mu\text{L}$ , 1 mL de 0,25 M de  $\text{ClCa}_2$  en un tubo de 1,5 mL y 1 mL de medio 2xHeBS en un *falcon* de 15 mL. Luego se añadió el  $\text{CaCl}_2$  a la mezcla de DNA y posteriormente se añadió la mezcla anterior al tubo con el medio 2xHeBS gota a gota y con agitación ligera y constante para que se formaran los precipitados. Se dejó flocular los precipitados a 25°C durante 35 min. Pasado este tiempo se resuspendió los precipitados y se echó 850  $\mu\text{L}$  en cada placa. Transcurridas 24 horas, el medio se sustituyó por el medio de selección, que contiene 10% FBS y 0,3 mg/mL de Higromicina B (Sigma).

### **2xHeBS**

NaCl 16 g/L

KCl 0,7 g/L

$\text{Na}_2\text{PO}_4$  (sin hidratar) 0,4 g/L

Glucosa 2 g/L

Hepes pH 7.1 10 g/L

## **3.2.2. Técnicas de análisis del DNA**

### **3.2.2.1. Electroforesis de DNA en gel de agarosa**

Para el análisis de los fragmentos obtenidos mediante PCR se migró el resultado de la reacción en un gel de agarosa al 1%. Para la preparación del gel se disolvió la agarosa en TBE 1X. Una vez la agarosa solidificó se corrió el gel en una cubeta con TBE 1X. Antes de cargar la muestra en el gel, se le añadió Orange G para su visualización. Cuando el gel hubo corrido suficiente se procedió a la tinción del gel con bromuro de etidio 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disuelto en TBE 1X durante 15 min en agitación. Posteriormente se lavó el gel con agua destilada y se acudió al transiluminador para la visualización del DNA.

#### **TBE 1X**

Tris base 9 mM

EDTA 2,4 mM

Ácido bórico 0,08 M

#### **Orange G**

Glicerol 50%

EDTA 20 mM

Orange G (Sigma) 0,02%

### **3.2.2.2. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

Para realizar un ChIP en células S2 se partió de  $10^8$  células. Las células se incubaron con formaldehído a una concentración final de 1,8% en agitación durante 10 min para entrecruzar la cromatina. Pasado este tiempo se añadió glicina a una concentración final de 0,125 M (a partir de una solución stock a 1M en PBS 1X) y se dejó en agitación durante 5 min para parar la reacción. Posteriormente, las células se centrifugaron en frío

2 min a 1500 g y se lavó el pellet en 5 mL de PBS 1X. Tras la centrifugación, el pellet se resuspendió en 10 mL de solución A y se incubó durante 10 min a 4°C en la rueda. Posteriormente se centrifugaron las células en frío 2 min a 1500 g. El pellet se resuspendió en 10 mL de solución B y se incubó durante 10 min en una rueda a 4°C. Transcurrido este tiempo se volvió a centrifugar las células y se resuspendieron en 4,5 mL de TE 1X con la pipeta. Para la lisis, se añadió SDS al 1%, se invirtió el tubo 5 veces y se volvieron a centrifugar. La cromatina se lavó dos veces con 5 mL de TE 1X y se resuspendió en 4 mL TE 1X con PMSF 1mM y SDS 0,1%. Las muestras se sonicaron en ciclos de 30 segundos ON y 30 segundos OFF y un total de 25 ciclos para obtener fragmentos de DNA de 200-500 pb. Tras la sonicación se volvieron a juntar las muestras y se centrifugaron en frío durante 5 min a la velocidad máxima y se recuperó los sobrenadantes.

Para cada inmunoprecipitación (IP) se usó una alícuota de 400 µL y 40 µL de la muestra (10% de la muestra usada en la IP) se guardaron para el input. A la muestra de la IP se le añadió Tritón X-100 a una concentración final de 1%, Deoxicolato (DOC) al 0,1% y NaCl a 140 mM, se incubó en la rueda a 4°C durante 10 min y se volvió a centrifugar en frío durante 5 min a la velocidad máxima. Tras recuperar el sobrenadante se hizo un prelavado con 30 µL de bolas de proteína A sefarosa (GE-Healthcare) previamente bloqueadas con RIPA-BSA al 1%. Las muestras se incubaron durante 1h a 4°C en la rueda. Posteriormente se centrifugan durante 2 min a 3000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se añadió PMSF a 1 mM y el anticuerpo correspondiente o suero preinmune (mock). Las muestras se incubaron en la rueda durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se añadieron 40 µL de proteína A sefarosa previamente bloqueada y se incubó en la rueda a 4°C. Tras 3h de incubación se centrifugaron las muestras durante 2 min a 3000 rpm y se lavó el pellet 5 veces durante 5 min en la rueda con la solución RIPA, una vez con tampón LiCl y dos con TE 1X. Tras los lavados se resuspendió las bolas con 40 µL de TE 1X. A los inputs y las muestras de las IP se les añadió RNasaA a 125 µg/mL y se incubó durante 30 min a 37°C. Para la elución del material inmunoprecipitado, las muestras se ajustaron a SDS al 1%, NaHCO<sub>3</sub> al 0,1 M y Proteinasa K al 0,2 µg/µL y se incubaron toda la noche a 65°C para revertir el entrecruzamiento.

Al día siguiente se centrifugaron las muestras durante 30 seg a máxima velocidad y se recuperó el sobrenadante. Se añadió un volumen de fenol/cloroformo, se vorteoó 30 seg y se centrifugó en frío durante 10 min a máxima velocidad. Posteriormente se recuperó

la fase acuosa y se lavó con un volumen de cloroformo. Tras la centrifugación, se recuperaron 270  $\mu$ L del sobrenadante y se añadieron 2  $\mu$ L de acrilamida 0,25%, 30  $\mu$ L de acetato sódico 3M y 700  $\mu$ L de etanol absoluto frío. Se dejó precipitar las muestras a 4°C durante al menos 30 min y después se centrifugaron en frío durante 15 min a máxima velocidad. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500  $\mu$ L de etanol 70% frío. Finalmente se dejó secar el pellet y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua milliQ. El DNA precipitado se puede analizar mediante PCR cuantitativa (qPCR) o mediante secuenciación.

### **Solución A**

Hepes pH 7.9 10mM  
EDTA 10mM  
EGTA 0,5mM  
Tritón X-100 0,25%

### **Solución B**

Hepes pH 7.9 10mM  
NaCl 100mM  
EDTA 1mM  
EGTA 0,5mM  
Tritón X-100 0,01%

### **TE 1X**

Tris-HCl pH 8.0 10 mM  
EDTA 1 mM

### **RIPA**

NaCl 140mM  
Tris-HCl pH 8 10mM  
EDTA 1mM  
Tritón X-100 1%  
SDS 0,01%  
DOC 0,1%

### **Tampón LiCl**

LiCl 250 mM  
Tris-HCl pH8 10 mM  
EDTA 1mM  
NP-40 0,5%  
DOC 0,5%

### **3.2.2.3. PCR cuantitativa**

Las PCR cuantitativas o qPCR se realizaron mediante el termociclador *Light Cycler* de Roche utilizando el kit *NZY qPCR Green Master Mix (nzytech)*. Las reacciones se realizaron por triplicado y se usó 2  $\mu$ L del material inmunoprecipitado para cada reacción. El programa estándar de la qPCR usado es el siguiente:

5 min a 95°C

-----  
10 seg a 95°C

10 seg a 60°C    x45

10 seg a 72°C

Los datos se analizaron mediante el método de cálculo estándar de la  $\Delta\Delta C_t$ . El resultado se expresa en forma de eficiencia o % input, que representa el material inmunoprecipitado en relación al input.

#### **3.2.2.4. Secuenciación i análisis**

Para los ChIP-seq se partió de 3-10 ng de DNA, dependiendo de la muestra. La generación de la librería se realizó utilizando el kit *NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina* de NEB (Ref.: E7645S) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las librerías generadas se amplificaron por PCR durante 10 ciclos. Se generó un pool equimolar con las librerías generadas y se realizó la secuenciación *single-end* de 50 nucleótidos obteniendo más de 30 millones de lecturas en todas las muestras.

Los controles de calidad, anotación y análisis de los datos resultantes de la secuenciación fueron realizados por Óscar Reina de la unidad de Bioestadística y Bioinformática del IRB Barcelona.

#### **3.2.3. Técnicas de análisis del RNA**

##### **3.2.3.1. Extracción de RNA**

Para la extracción de RNA de células se usaron  $10^7$  células. Tras recoger las células se centrifugaron 5 min a 1200 rpm. El pellet de células se lavó dos veces con PBS 1X. Tras los lavados se resuspendió el pellet en 1 mL de Trizol (Invitrogen) y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. Después se añadió 0,2 mL de cloroformo y se mezcló por inversión. Las muestras se dejaron 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 15 min a la máxima velocidad y en frío. La fase acuosa se recuperó y se purificó mediante el kit *RNeasy Mini* de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El pellet se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua.

Para la extracción de RNA de embriones se partió de 100-150  $\mu$ L de embriones decorionados. Para la extracción de RNA de las gónadas se partió de 40 ovarios y de 500 testículos diseccionados en PBS 1X. Tras retirar el PBS, se añadió 400  $\mu$ L de Trizol y se homogeneizó el tejido con la ayuda de un émbolo. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 5 min. Después se añadió 80  $\mu$ L de cloroformo, se mezcló por inversión y se dejaron 3 min a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugaron las muestras durante 15 min en frío a la máxima velocidad. La fase acuosa se recuperó y se añadió 2  $\mu$ L de pellet Paint y un volumen de isopropanol. Las muestras se dejaron toda la noche a 4°C para precipitar el RNA. Al día siguiente se centrifugaron durante 1h a 13.000 rpm y a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se limpió el pellet con etanol al 75%, se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm en frío. El pellet se dejó secar y se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua.

### 3.2.3.2. RT-qPCR

Mediante esta técnica se puede cuantificar la expresión de un gen en relación a otro de expresión ubicua o que no cambia entre las diferentes condiciones analizadas. Consta de una reacción de transcripción reversa (RT) y una qPCR. Para la retrotranscripción se usó el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* de Roche. Para la RT se usó 1 µg de RNA y se usó un primer oligo-dT para amplificar todos los RNA poliadenilados. El volumen se ajustó a 13 µL y se realizó un paso previo de desnaturalización de 10 min a 65°C. Inmediatamente se introdujeron las muestras en hielo y se añadió el resto de componentes de la RT siguiendo las indicaciones del fabricante. Las RT se incubaron durante 30 min a 55°C y se inactivó la transcriptasa mediante la incubación de las muestras durante 5 min a 85°C.

La reacción de qPCR se realizó en un volumen final de 10 µL y se usó ~10 ng de cDNA. Las reacciones se realizaron por triplicado. Como control de contaminación genómica se prepararon reacciones en las que se usó RNA (~10 ng) en lugar de cDNA. El kit y programas usados son los mismos que en el apartado 3.2.2.3. Los datos se analizaron mediante el método de cálculo estándar de la  $\Delta\Delta C_t$ . Los datos de expresión se muestran en relación a la expresión del gen *RpL32*, excepto en el análisis de la expresión de *bam*, en el que se usó *Act5C* para la normalización.

### 3.2.1.3. Amplificación rápida de extremos de cDNA (3'RACE)

Esta técnica permite obtener cDNA a partir de los mRNAs poliadenilados presentes en la célula a partir de la transcripción reversa combinada con la amplificación del cDNA mediante PCR. Para la RT-PCR se usó el primer 3-RACE AS (**Tabla 5**) para amplificar los mRNA poliadenilados y se usó el mismo protocolo que en el apartado anterior. Para la amplificación del cDNA se usó el siguiente programa:

```
5 min a 95°C
-----
30 seg a 95°C
30 seg a 58°C   x35
5 min a 72°C
-----
15 min a 72°C
```

El producto se analizó mediante gel de agarosa. Las bandas obtenidas se purificaron y se secuenciaron.

### 3.2.3.2. Arrays de expresión

El cDNA se preparó a partir de 35 ng de RNA y se amplificó por PCR durante 17 ciclos utilizando el kit *TransPlex® Complete Whole Transcriptome Amplification* de Sigma (Ref.: WTA2) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, 8 µg del cDNA amplificado fueron fragmentados y marcados mediante el kit *GeneChip Human Mapping 250K Nsp Assay* de Affymetrix (Ref.: 900766) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA fragmentado y marcado se hibridó sobre los arrays *GeneChip Drosophila Genome 2.0* de Affymetrix (Ref.: 900531) durante 16 horas a 45°C. Tras la incubación, los arrays se procesaron en la estación de lavado *GeneChip Fluidics Station 450* de Affymetrix. Finalmente, se escanearon mediante el escáner *GSC3000 System* de Affymetrix.

### 3.2.4. Técnicas de análisis de proteínas

#### 3.2.4.1. Extracción proteica

Para la extracción proteica total de células se recogieron las células y se centrifugan 5 min a 1200 rpm. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1X. El pellet se resuspendió en PLB 5X y se sonicaron a 40% de amplitud durante unos 10 segundos en un sonicador Branson.

Para el extracto proteico de cromatina se procedió como en el apartado 3.2.2.2, pero tras la sonicación y centrifugación se añadió PLB 5X a las muestras.

#### **PLB 5X**

Tris pH 6.8 0,125 M

Glicerol 22%

SDS 5%

Azul de bromofenol

#### 3.2.4.2. Extracción ácida de histonas con ácido clorhídrico 0,2N

Para la extracción de histonas con ácido clorhídrico (HCl) se recogieron las células, se centrifugan 5 min a 1200 rpm y se lavaron dos veces con PBS 1X. Una vez lavadas, se resuspendió el pellet en 500 µL de la solución A y se pasó por el Dounce usando el émbolo A. Tras incubar las muestras 10 min en hielo se centrifugaron a 3000 rpm en frío durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se volvió a repetir los pasos anteriores. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los núcleos en HCl 0,2N a una densidad de  $4 \times 10^7$  células/mL y se dejaron toda la noche en rotación a 4°C.

Al día siguiente se centrifugaron las muestras durante 10 min a 13.000 rpm en frío para eliminar los restos de núcleos. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se añadió 6 volúmenes de acetona fría. Las muestras se mezclaron por inversión y se dejaron en hielo seco. Pasados 30 min, las muestras se centrifugaron 10 min a 13.000 rpm a 4°C.

Se descartó el sobrenadante, se añadió 1 mL de acetona- HCl 0,1N, se mezcló por inversión y se incubaron durante 10 min en hielo seco. Se volvió a centrifugar 10 min a 13.000 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó y se añadió 1 mL de acetona para eliminar los restos de ácido. Se invirtió 5-6 veces y se volvió a centrifugar 10 min a 13.000 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el pellet con agua añadiéndola gota a gota y con ayuda del vórtex.

### **Solución A**

Hepes pH7,9 10 mM

MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM

KCl 10 mM

PMSF 1,5 mM

DTT 0,5 mM

NP40 0,05%

### **3.2.4.3. Electroforesis en gel de acrilamida**

Mediante la electroforesis en gel de acrilamida se puede separar las proteínas según su peso molecular. Esta separación ocurre en condiciones desnaturizantes y con SDS a través de una matriz de poliacrilamida. Los geles están compuestos por una matriz apiladora, al 4% de acrilamida, y una matriz separadora, al 8-15% de acrilamida según el tamaño de las proteínas que se quieran separar. Antes de correr las muestras, se les añadió PLB y β-mercaptoetanol. Las muestras se hirvieron 5 min, 10 en el caso de muestras de cromatina, a 95°C. Para correr las electroforesis se usó tampón LAEMMLI 1X. Como marcador de peso molecular se usó el marcador *PageRuler Prestained* o *PageRuler Plus Prestained* (Thermo Fisher Scientific).

### **LAEMMLI 1X**

SDS 1%

Glicina 2 M

Tris Base 250 mM

#### 3.2.4.4. Tinción con Coomassie blue

Para la tinción de geles de acrilamida con Coomassie, el gel se equilibró previamente con ácido acético al 10% durante 5 min. Posteriormente se incubó el gel durante 20 min a temperatura ambiente con la solución de Coomassie y se eliminó el exceso de tinción mediante la incubación con ácido acético al 10%.

##### **Coomassie**

Coomassie Brilliant Blue 0,5 mg/mL

Etanol 40%

ácido acético 10%

#### 3.2.4.5. Western blot (WB)

Las proteínas migradas en el gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 3 horas a 4°C aplicando un voltaje de 50V en tampón de transferencia. Una vez transferida la membrana se incubó en solución de bloqueo durante una hora. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario diluido en PBST durante 1,5h. Una vez finalizada la incubación se lavó la membrana tres veces durante 5 min con PBST y se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa. Tras la incubación se lavó la membrana tres veces durante 10 min con PBST y se procedió a la detección de la señal mediante quimioluminiscencia.

Para el revelado se usó el kit *ECL Western Blotting System* de GE Healthcare. La solución de revelado se incubó durante un minuto sobre la membrana. Finalmente, la membrana se secó y se expuso a una película fotográfica CL-XPosure (Thermo Scientific) el tiempo necesario para obtener la señal. Las películas fotográficas se digitalizaron usando el densitómetro calibrado GS-800 (Bio-Rad) y se cuantificaron con el programa de análisis de imagen Fiji (Schindelin et al., 2012).

##### **Tampón de transferencia**

Tris-base 25 mM

Glicina 40 mM

SDS 0,05%

Metanol 20%

##### **PBST**

PBS 1X

Tween 20 0,05%

##### **Solución de bloqueo**

PBST

leche en polvo 5%

### 3.2.4.6. Inmunofluorescencia

#### 3.2.4.6.1. Inmunofluorescencia en células S2

La inmunodetección en células S2 se realizó mediante la impactación de células gracias al uso de una citocentrífuga y unos embudos especiales que concentran la muestra en una región concreta del portaobjetos. Para obtener las preparaciones, se recogieron 300  $\mu\text{L}$  de células S2 y se les añadió 1 mL de medio hipotónico MAC. Se incubó durante 5 min para que las células incorporasen el agua y se hincharan. Después se cogieron 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla para cada preparación y se colocó en cada uno de los embudos. Las células se centrifugaron a 500 rpm durante 10 min. Posteriormente, se dejó secar los portaobjetos durante 30 min. Una vez secos, se añadió 50  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído al 4% en PBS 1X sobre el área donde se encuentran las células y se fijaron durante 10 min. Seguidamente se lavaron los portaobjetos con PBS 1X durante 5 min y después dos veces con PBS-T durante 10 min. El anticuerpo primario se diluyó en 10  $\mu\text{L}$  de PBT y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las preparaciones se lavaron dos veces durante 10 min con PBS-T-BSA 0,1% y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se lavaron dos veces durante 10 min con PBS-T, seguidos de dos lavados con PBS 1X. Finalmente se montaron los cubreobjetos con 10  $\mu\text{L}$  de una solución Mowiol con DAPI al 0,2 ng/ $\mu\text{L}$ .

#### **MAC**

Glicerol 50 mM

KCl 5 mM

NaCl 10 mM

CaCl<sub>2</sub> 0,8 mM

Sacarosa 10 mM

#### **PBS-T**

PBS 1X

Tween 20 0,2%

#### 3.2.4.6.2. Inmunofluorescencia en cromosomas politénicos

Para la preparación de cromosomas politénicos, se diseccionaron glándulas salivales de larvas de estadio L3 en solución Cohen. Posteriormente se incubaron durante 2 min en la solución fijadora. Las glándulas se pasaron después a una gota de solución 3 colocada en un cubreobjetos siliconizado para hacer el *squash* de las preparaciones y así romper las membranas celulares y extender los cromosomas en el portaobjetos. Seguidamente se bañaron las preparaciones en nitrógeno líquido y se retiró el cubreobjetos. Las preparaciones se lavaron durante 5 min en PBS-T a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en PBS-T-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las preparaciones tres veces durante 5

min en PBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en PBS-T durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente las preparaciones se lavaron tres veces durante 5 min y finalmente se montaron en Mowiol con DAPI al 0,2 ng/ $\mu$ L.

<b>Solución Gohen</b>	<b>Solución fijadora</b>	<b>Solución 3</b>
MgCl <sub>2</sub> 10mM	0.74% FA	Ácido acético 45%
Glicerol-3P 25 mM	PBS 1X	0.62% FA
CaCl <sub>2</sub> 3mM		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM		
NP-40 0,5%		
KCl 30 mM		
Sacarosa 160 mM		

#### **PBS-T**

PBS 1X

Tween 20 0,05%

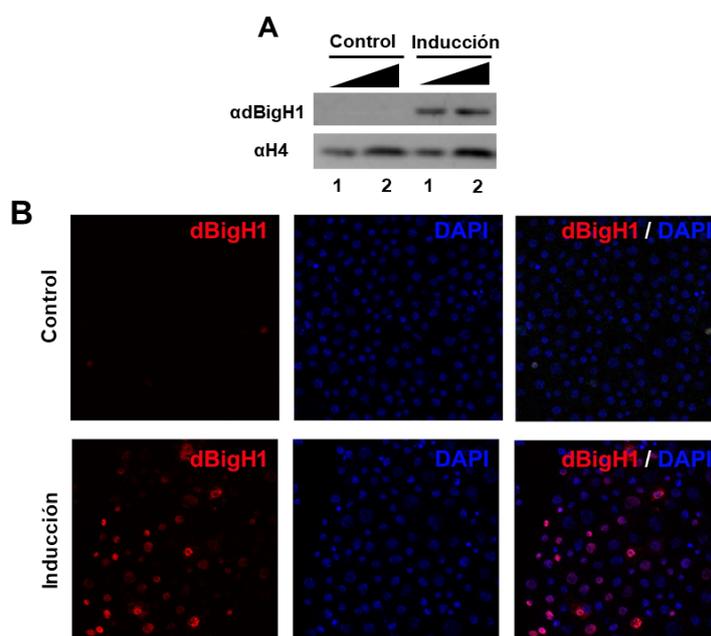
#### 3.2.4.6.3. Inmunofluorescencia en ovarios

Los ovarios se diseccionaron en PBS 1X y se separaron las ovariolas. Posteriormente se fijaron durante 20 min en una solución heptano-fijativo en proporción 3:1. Tras este tiempo se lavaron tres veces durante 20 min en PBS-T. Los ovarios se bloquearon durante una hora en PBS-T-BSA 2%. El anticuerpo primario se incubó con la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los ovarios se lavaron 3 veces durante 20 min en PBS-T-BSA 2% y se incubó el anticuerpo secundario en la misma solución durante 2h a temperatura ambiente. Tras este periodo se hicieron tres lavados con PBS-T de 20 min y en el primer lavado se añadió DAPI para el marcaje del DNA. Finalmente se montaron los ovarios en medio Mowiol.

<b>Solución de fijación</b>	<b>PBS-T</b>
PBS 1X	PBS 1X
Formaldehido 4%	Tween 20 0,2%
NP-40 0,5%	Tritón X-100 0,1%

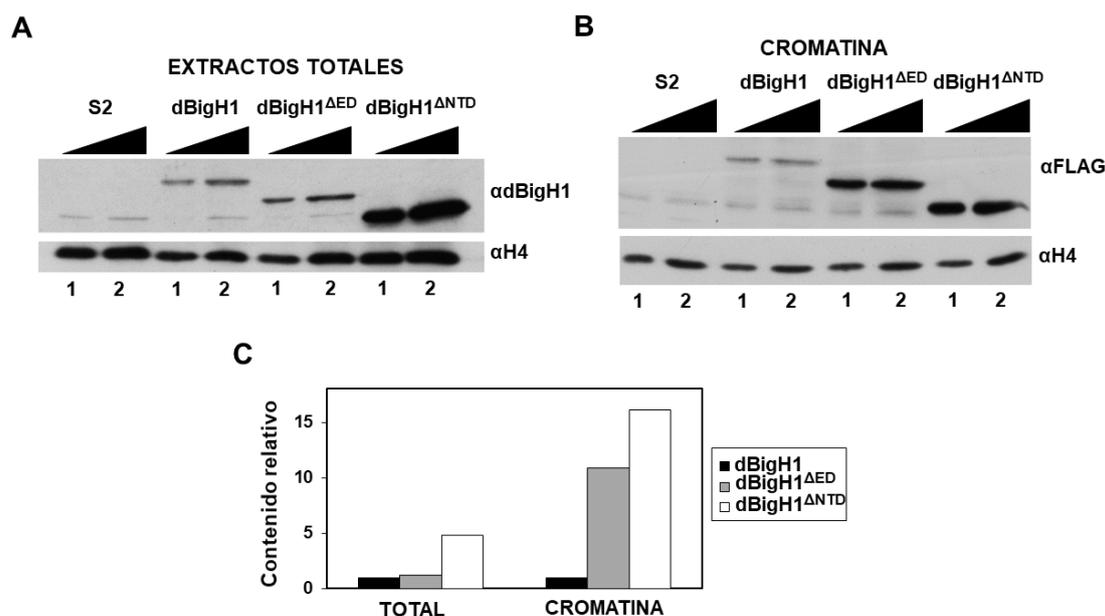
### 3.2.5. Expresión en las líneas celulares estables

Tras la selección y obtención de la línea que contiene la construcción dBigH1::FLAG (de aquí en adelante dBigH1) se analizó la expresión de dBigH1 mediante inmunodetección y western blot (WB). La mayor expresión de dBigH1 se obtuvo con CuSO<sub>4</sub> 1 mM durante 24h. En la **Figura 19** se puede ver como dBigH1 se detecta solo tras la inducción y se localiza en el núcleo.



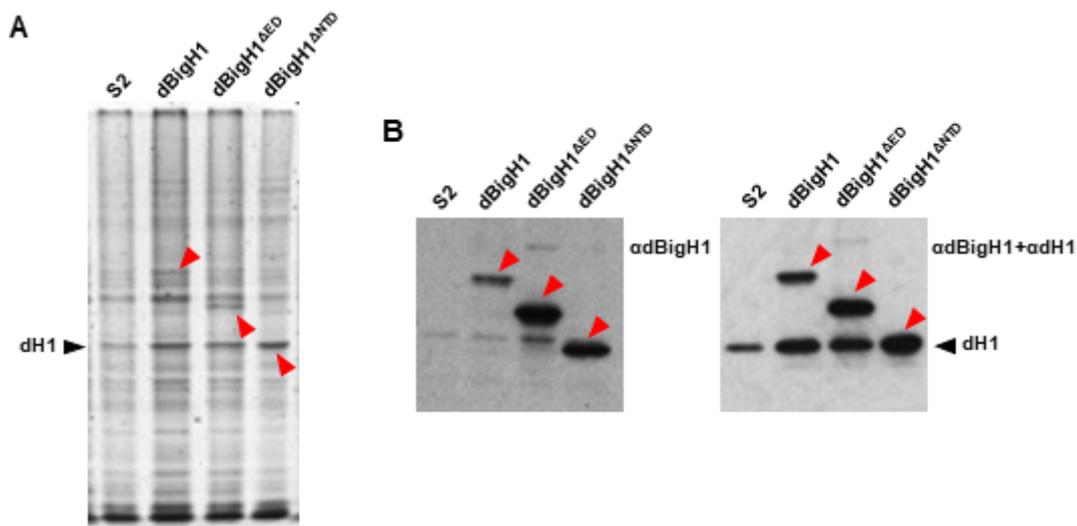
**Figura 19. Expresión de dBigH1 tras la inducción con CuSO<sub>4</sub>.** A) WB de células control (no inducidas) y células inducidas con CuSO<sub>4</sub> 1 mM. En el gel se cargaron cantidades crecientes de las muestras (carriles 1 y 2). La H4 se usó como control de carga. B) Inmunodetección de dBigH1 (rojo). El DNA se marcó con DAPI (azul). Tras la inducción, dBigH1 se detecta en los núcleos.

Tras la obtención de las líneas que expresan las formas truncadas dBigH1<sup>ΔED</sup>::FLAG (dBigH1<sup>ΔED</sup>) y dBigH1<sup>ΔNTD</sup>::FLAG (dBigH1<sup>ΔNTD</sup>) se comprobó su expresión mediante WB. Todas las líneas expresan las construcciones cuando se induce la expresión con CuSO<sub>4</sub> 1 mM durante 24h (**Figura 20A**). Para analizar el grado de unión a la cromatina de cada construcción, se preparó cromatina entrecruzada (apartado 3.2.2.2) y se analizó mediante WB (**Figura 20B**). Con estos análisis se estimó que las construcciones dBigH1<sup>ΔED</sup> y dBigH1<sup>ΔNTD</sup> son más abundantes en la cromatina que dBigH1 (**Figura 20C**).



**Figura 20. Expresión de las construcciones dBigH1, dBigH1<sup>ΔED</sup> y dBigH1<sup>ΔNTD</sup>.** A) WB de extractos totales, se cargaron cantidades crecientes (carriles 1 y 2). La H4 se usó para la normalización. Todas las líneas expresan la construcción cuando se inducen con CuSO<sub>4</sub> 1 mM. Como control se usaron células S2 a las que se les añadió también CuSO<sub>4</sub> y que no expresan dBigH1. B) WB de muestras de cromatina entrecruzada, se cargaron cantidades crecientes (carriles 1 y 2). La H4 se usó para la normalización. Todas las construcciones se incorporan a la cromatina. C) Cuantificación de la expresión (TOTAL) y de la abundancia en la cromatina (CROMATINA) de las diferentes construcciones respecto a la construcción dBigH1. La construcción dBigH1<sup>ΔNTD</sup> se expresa más que el resto de construcciones. dBigH1<sup>ΔED</sup> y dBigH1<sup>ΔNTD</sup> son más de 10 veces más abundantes en la cromatina que dBigH1.

Para establecer la cantidad real de dBigH1, dBigH1<sup>ΔED</sup> y dBigH1<sup>ΔNTD</sup>, se prepararon extractos de histonas mediante extracción con HCl 0,2N (apartado 3.2.4.2). Los extractos fueron analizados mediante tinción con Coomassie y WB (**Figura 21**). Las cantidades de dBigH1 y dBigH1<sup>ΔNTD</sup> no se pudieron determinar directamente, puesto que la banda de dBigH1 solapa con una banda también presente en las células S2 control y la banda de dBigH1<sup>ΔNTD</sup> solapa con la banda de dH1. En el caso de dBigH1<sup>ΔED</sup>, corresponde al 23% del total de histonas H1 y, por lo tanto, teniendo en cuenta que el grado de unión a cromatina de dBigH1<sup>ΔED</sup> es unas 10 veces superior al de dBigH1, estimamos que, en el caso de la expresión de dBigH1, esta representa alrededor de un 2% del total de histonas H1.



**Figura 21. Análisis de la cantidad expresada de dBigH1, dBigH1<sup>ΔED</sup> y dBigH1<sup>ΔNTD</sup> tras la inducción con CuSO<sub>4</sub>.** A) Tinción del gel con Coomassie. Las flechas rojas indican las bandas correspondientes a cada construcción. La flecha negra indica la banda correspondiente a dH1. B) Análisis mediante WB. La membrana se incubó con anticuerpos αdBigH1 (izquierda) y αH1 (derecha). Las flechas rojas indican las bandas correspondientes a cada construcción y la negra la correspondiente a dH1. La banda de dBigH1 solapa con una banda también presente en las células S2 control y la construcción dBigH1<sup>ΔNTD</sup> con la de dH1.

## **4.RESULTADOS**



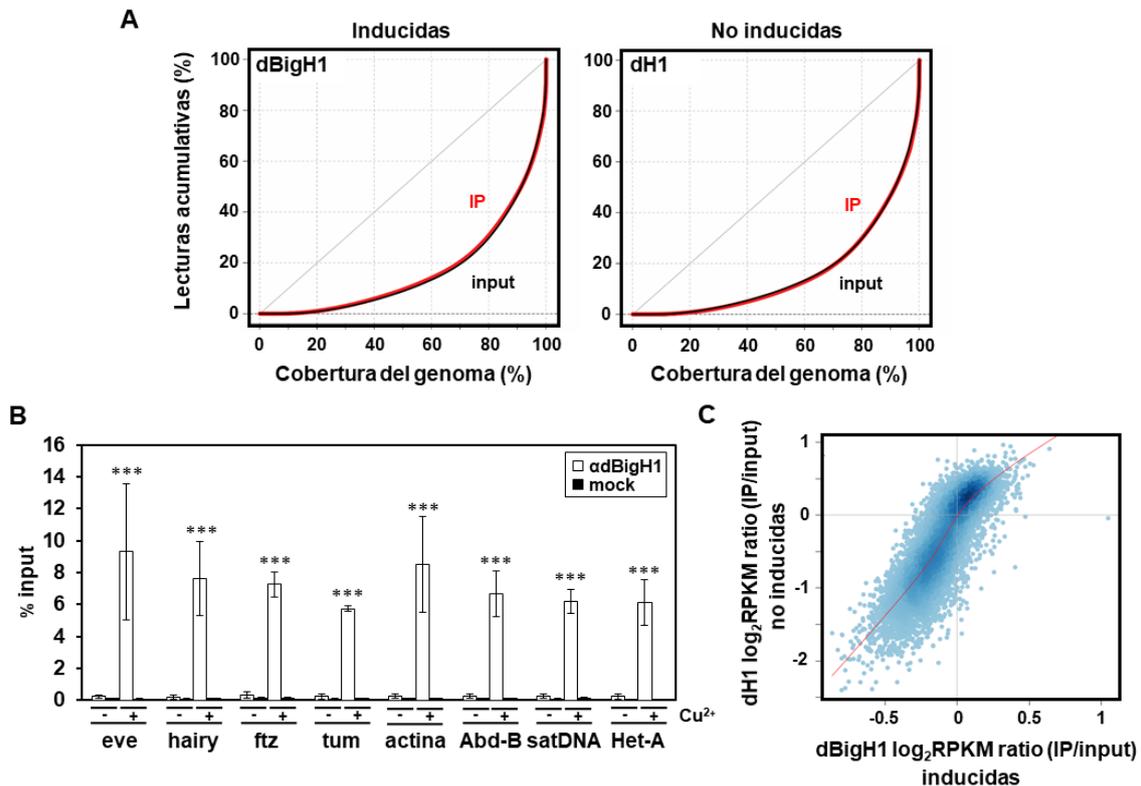
## 4.1. Análisis de la función de dBigH1 en transcripción

### 4.1.1. Análisis del efecto de la sobreexpresión de dBigH1

#### 4.1.1.1. La proteína dBigH1 se incorpora a lo largo de la cromatina y afecta a la unión de dH1

dBigH1 se localiza de forma uniforme en la cromatina en estadios previos a la celularización. Tras este proceso, coincidiendo con la activación del genoma zigótico, dBigH1 es reemplazada por la variante somática, dH1. Con el fin de estudiar el comportamiento de dBigH1 y su relación con dH1, se expresó dBigH1 en células S2, que carecen de dBigH1, usando una línea celular que expresa dBigH1 bajo el control de un promotor inducible con  $\text{Cu}^{2+}$  (ver apartado 3.2.5). Con el fin de poder analizar la distribución de dBigH1 y dH1 se realizaron experimentos de ChIP-seq. Los resultados del ChIP-seq muestran que dBigH1 se localiza a lo largo de todo el genoma, puesto que la cobertura genómica de las muestras inmunoprecipitadas (IP) es muy similar a la cobertura del input (**Figura 22A**, izquierda). Esta distribución es similar a la de dH1 en células control en las que no se ha inducido la expresión de dBigH1 (**Figura 22A**, derecha).

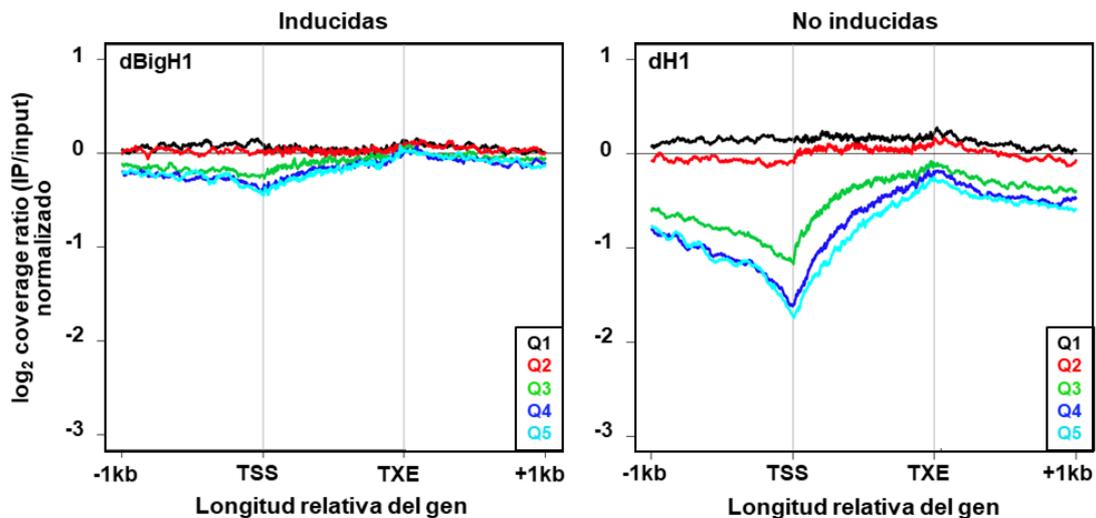
Los resultados obtenidos mediante ChIP-seq fueron comprobados mediante ChIP-qPCR. Para ello se seleccionaron al azar diferentes genes y secuencias repetitivas en las que se analizó la presencia de dBigH1. Tal y como se muestra en la **Figura 22B**, dBigH1 se encuentra en todas las regiones analizadas en las muestras inducidas con  $\text{CuSO}_4$ . La inmunoprecipitación con  $\alpha$ dBigH1 es específica puesto que en muestras en las que se usó suero preinmune (mock), no se inmunoprecipitaron estas secuencias. Por otro lado, los análisis de ChIP-seq muestran además que existe una correlación entre la deposición de dBigH1 y el contenido de dH1 en las células control, puesto que los genes ricos en dBigH1 se corresponden con los genes ricos en dH1 en las células no-inducidas (**Figura 22C**).



**Figura 22. dBigH1 se incorpora en todo el genoma y su deposición correlaciona con la presencia de dH1.** A) Curvas de Lorenz en las que se muestra el porcentaje del genoma cubierto en los inputs (negro) y en las IPs (rojo). El porcentaje de cobertura entre la IP de dBigH1 es similar al del input en células inducidas (izquierda). Lo mismo ocurre para la IP de dH1 en células no inducidas (derecha). B) ChIP-qPCR en células sin inducir y tras la inducción. Se representa la cantidad de material inmunoprecipitado respecto al total (% input). Como control de la especificidad de la inmunoprecipitación se usó suero preimmune (mock). Tras la inducción, dBigH1 se detecta en las diferentes secuencias analizadas. Las barras de error representan el error estándar (n=2). Se indica el nivel de significancia estadística para las diferencias de inmunoprecipitación entre las células no inducidas e inducidas (\*\*\*) <math><0,005</math>; test t-Student de dos colas). C) Representación de la ocupación de dBigH1 en función de la ocupación de dH1 en las células control. Existe una correlación entre el contenido de dBigH1 y el de dH1 ( $r=0,846$ ).

Además, se comparó los perfiles de distribución de ambas histonas a lo largo de las regiones génicas. Para ello, se dividieron los genes en cinco categorías de acuerdo a sus niveles de expresión en células S2 control, que no expresan dBigH1. Normalmente, los genes activos transcripcionalmente, además de contener una menor cantidad de H1, están deplecionados para H1 en la región cercana al sitio de inicio de la transcripción (TSS) (Braunschweig et al., 2009; Cao et al., 2013; Izzo et al., 2013; Li et al., 2012b; Mayor et al., 2015; Millán-Ariño et al., 2014; Nalabothula et al., 2014). Por otro lado, el contenido de H1 aumenta progresivamente a lo largo de la secuencia codificante (CDS). Sin embargo, los genes cuya expresión es reducida no presentan esta depleción

característica (Braunschweig et al., 2009; Cao et al., 2013; Izzo et al., 2013; Mayor et al., 2015; Millán-Ariño et al., 2014; Nalabothula et al., 2014). En la **Figura 23** se muestran los perfiles de distribución para dBigH1 y dH1. En los gráficos se representa la longitud relativa del gen y 1 kb aguas arriba y abajo del gen. En el caso de dBigH1, existen diferencias en el contenido de dBigH1 según la expresión génica, aunque esta diferencia es mayor para el contenido de dH1. Por otro lado, ambas variantes presentan una depleción alrededor del TSS en los genes activos, aunque esta depleción es mucho más pronunciada en el caso de la dH1.

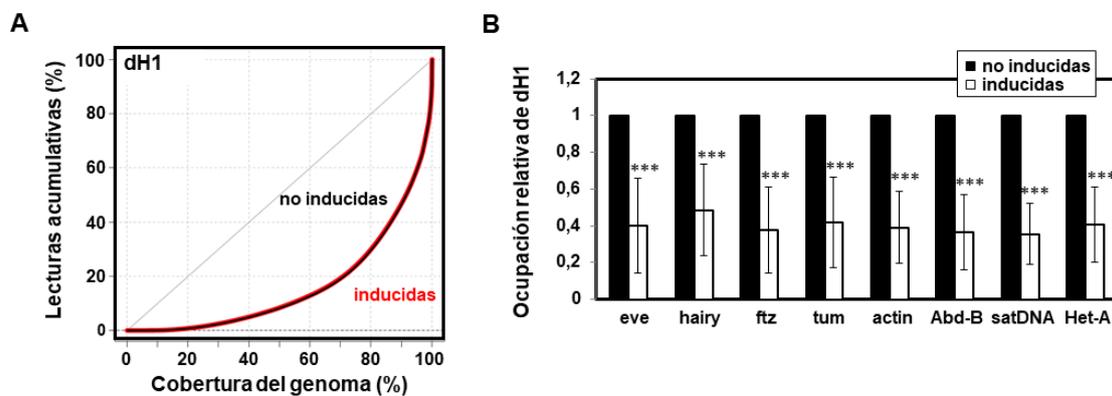


**Figura 23. Distribución de dBigH1 y dH1 a lo largo de la región génica.** En negro, los genes menos expresados (Q1) y en azul claro los más expresados (Q5). Los genes más activos contienen menos dBigH1 y dH1. Las diferencias en el contenido son mayores para dH1. El contenido disminuye alrededor del TSS, especialmente para la histona dH1 y aumenta a lo largo del CDS.

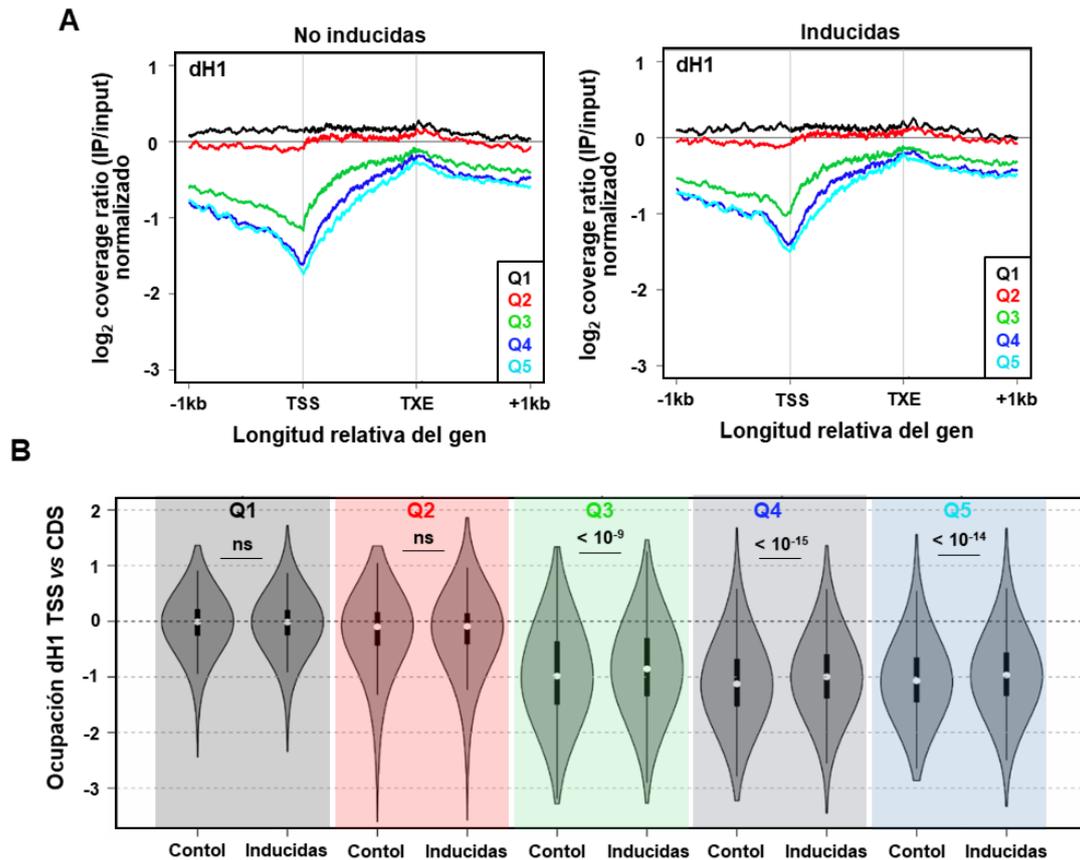
Con el fin de analizar el efecto de la expresión de dBigH1 sobre la distribución genómica de dH1, se realizaron también ensayos de ChIP-seq en las células que expresaban dBigH1 (células inducidas). Los resultados obtenidos muestran que la expresión e incorporación de dBigH1 en la cromatina no tiene un gran efecto en la proporción del genoma cubierto por dH1, puesto que las curvas de Lorenz son similares entre las IP en células no inducidas y células inducidas (**Figura 24A**). A pesar de que dBigH1 no parece alterar el grado de cobertura de dH1, mediante ChIP-qPCR se puede observar una disminución del contenido de dH1 en las regiones analizadas (**Figura 24B**). De hecho, cuando se compara la distribución de dH1 a lo largo de las regiones génicas en las células no inducidas e inducidas, parece que la depleción alrededor del TSS en los genes expresados es menos profunda en las células inducidas (**Figura 25A**). Con el fin

## RESULTADOS

de comprobar esta observación, se midió la diferencia existente en la señal de dH1 entre la región TSS, considerada como el TSS $\pm$ 100 pb, y el CDS, considerado como la región que va desde las 100 pb aguas abajo del TSS hasta el lugar de finalización de la transcripción (TXE). La relación TSS/CDS aumenta en las células inducidas (**Figura 25B**), esto indica que existe una disminución en el grado de depleción de dH1 alrededor del TSS en los genes expresados. Los resultados obtenidos mediante ChIP-qPCR (**Figura 24B**) sugieren que este aumento en la relación TSS/CDS se debería a una disminución del contenido de dH1. En conjunto, estos resultados sugieren que dBigH1 estaría reemplazando a dH1 cuando se incorpora a la cromatina.



**Figura 24. Tras la incorporación de dBigH1, disminuye la ocupación de dH1.** A) Curvas de Lorenz. El genoma cubierto por las IP en células no inducidas (negro) e inducidas (rojo) son similares. B) ChIP-qPCR en células inducidas y no inducidas. El gráfico muestra el cambio en la ocupación relativa de dH1 respecto a las células control. Tras la inducción, la ocupación de dH1 disminuye en las regiones analizadas. Las barras de error representan el error estándar (n=2). Las diferencias de ocupación son estadísticamente significativas en todas las regiones (\*\*\*) p-valor<0,005; test t-Student de dos colas).



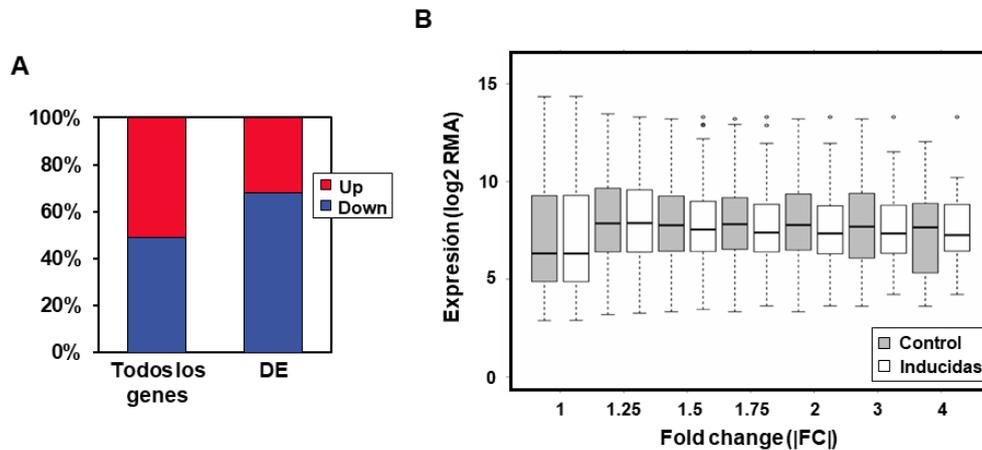
**Figura 25. La relación entre el TSS y el CDS varía en las células inducidas.** A) Distribución de dH1 en la región génica en células no inducidas (izquierda) y tras la inducción de dBigH1 (derecha) en los diferentes grupos de expresión (de menor a mayor expresión: Q1-Q5). La distribución de dH1 en células inducidas se asemeja a la de células no inducidas. B) Relación entre la ocupación del TSS y el CDS según los cinco grupos de expresión en células S2 (parte superior, de menor a mayor expresión) en células no inducidas y células inducidas. La ratio TSS/CDS en las células inducidas aumenta en comparación con las no inducidas para los genes activos transcripcionalmente. Se indica el p-valor para estas diferencias (ns, no significativo; prueba de Wilcoxon).

#### 4.1.1.2 dBigH1 afecta negativamente la expresión génica

Durante la embriogénesis, dBigH1 está presente cuando el genoma zigótico no se expresa, lo cual ha llevado a sugerir que dBigH1 actúa como un represor transcripcional. Con el fin de analizar el posible efecto represor de dBigH1 se analizaron los perfiles de expresión mediante arrays en células inducidas y células S2 (control), que no contienen la construcción para la expresión de dBigH1. A las células S2 se les añadió la misma cantidad de  $\text{CuSO}_4$  para eliminar el posible efecto debido al tratamiento para la inducción. Comparado con las células control, un 4,7% de los genes se expresan diferencialmente (DE) con un cambio en la expresión o *fold-change* ( $|FC|$ ) igual o superior a 1,5. De todos los genes DE, aproximadamente un 68% corresponde a genes

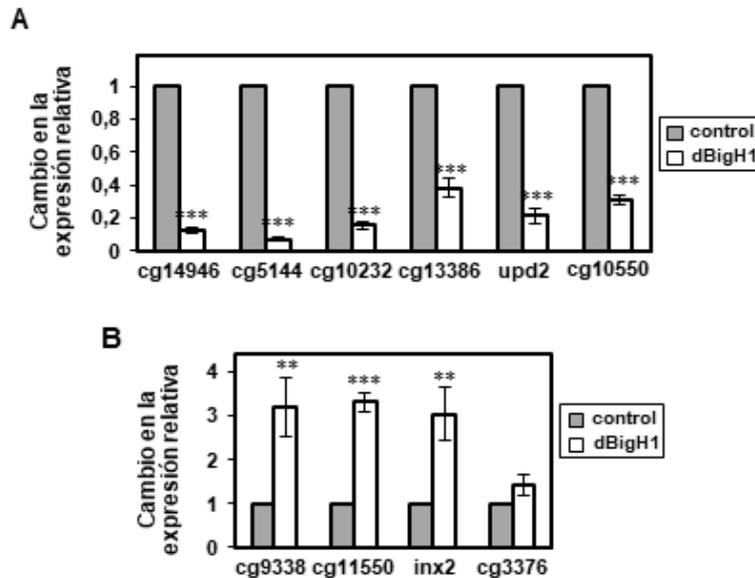
## RESULTADOS

down-regulados y un 32% a genes up-regulados. (**Figura 26A**). Cuando se compara los niveles de expresión entre condiciones y según el valor absoluto del FC ( $|FC|$ ), el efecto general que se observa es de down-regulación (**Figura 26B**).



**Figura 26. Efecto de dBigH1 en la expresión génica.** A) Proporción de genes up- y down-regulados en células inducidas en comparación con las células control. Cuando se consideran todos los genes (izquierda), aproximadamente la mitad están down-regulados y la otra mitad up-regulados. De los genes DE, la mayoría se encuentran down-regulados (68%). B) Representación de los niveles de expresión según los valores de  $|FC|$ , indicados en la parte inferior. En gris se representan los valores para las células S2 control tratadas con CuSO<sub>4</sub> y en blanco para las células en las que se ha inducido la expresión de dBigH1. La tendencia es un efecto de down-regulación de la expresión.

Los resultados obtenidos se comprobaron mediante RT-qPCR. Para ello, se seleccionaron 6 genes down-regulados con un  $|FC| > 1,5$ . Todos los genes analizados muestran una fuerte disminución de la expresión. Respecto a los genes up-regulados, se seleccionaron 4 genes, también con un  $|FC| > 1,5$ . En este caso, solo 3 de los 4 genes analizados estaban up-regulados (**Figura 27**).

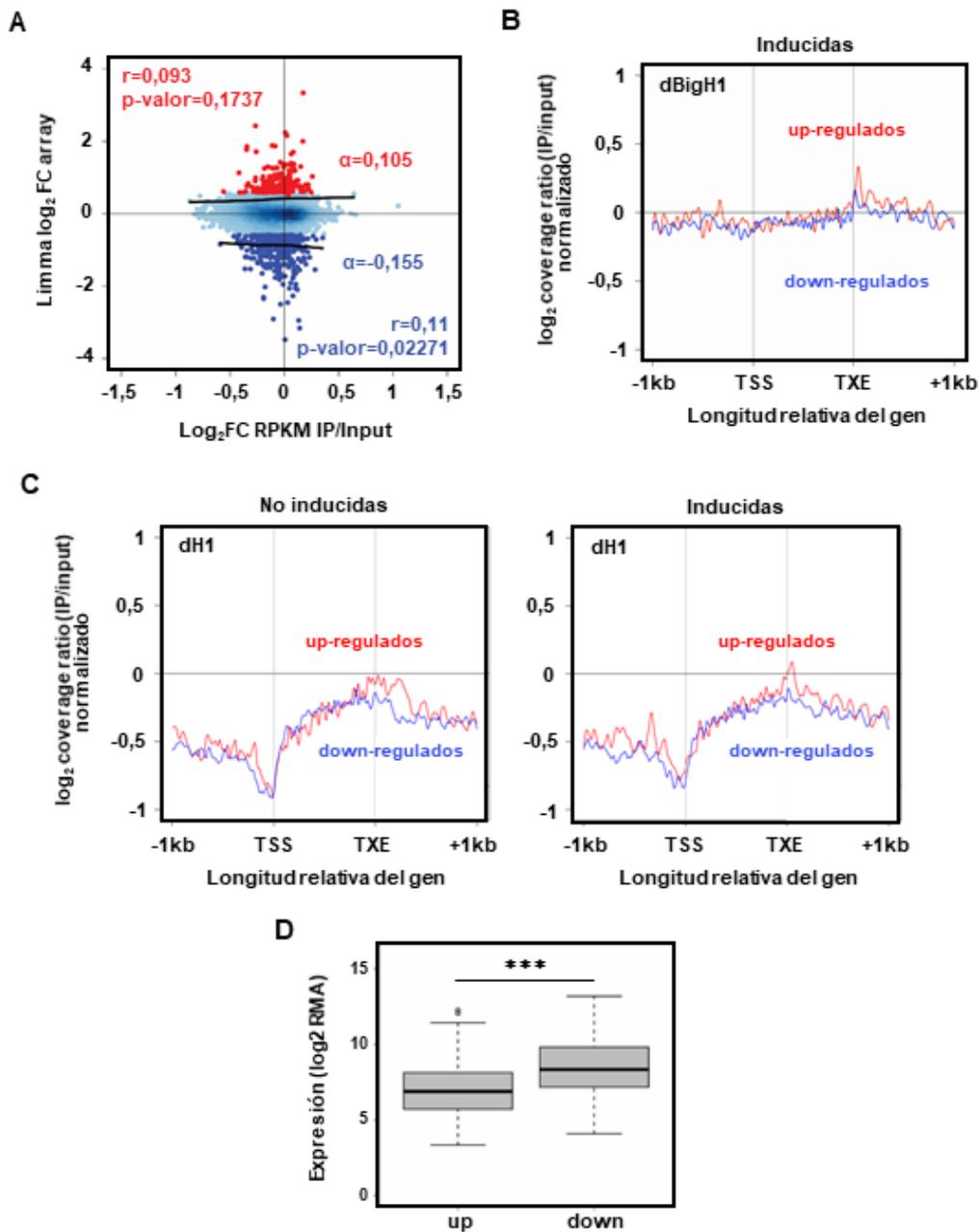


**Figura 27. Cambio en la expresión génica de genes down- y up-regulados.** Los gráficos muestran el cambio de expresión respecto a las células control tratadas con CuSO<sub>4</sub>. A) Los genes down-regulados muestran una fuerte disminución de la expresión en las células inducidas. B) En tres de los cuatro genes up-regulados se puede observar un aumento en la expresión. Las barras de error representan el error estándar (n=7). Se indica el p-valor para las diferencias en la expresión (\*\*<0,01; \*\*\*<0,005, test t-Student de dos colas).

Posteriormente se analizó si existía una relación entre el contenido de dBigH1 y el cambio de expresión de los genes en las células inducidas. Tanto en los genes down-regulados como en los up-regulados se puede observar una correlación moderada entre el cambio en la expresión y el contenido de dBigH1 (**Figura 28A**). En el caso de los genes down-regulados, la pendiente de la recta ( $\alpha=-0,155$ ) es mayor que en los genes up-regulados ( $\alpha=0,105$ ), lo que indica que el cambio en la expresión según el contenido de dBigH1 es más débil en los genes up-regulados. Además, el grado de correlación es mayor en los genes down-regulados (Pearson  $r=0,11$ ; p-valor=0,02271) que en los up-regulados (Pearson  $r=0,093$ ), no siendo estadísticamente significativa para estos últimos (p-valor=0,1737).

Por otro lado, si se mira la distribución de dBigH1 en estos genes, su distribución es uniforme a lo largo del gen y es muy similar para genes up- y down-regulados (**Figura 28B**). En el caso de dH1, los perfiles para los genes up-regulados y down-regulados muestran una distribución similar tanto en células no inducidas como en las inducidas (**Figura 28C**). Sin embargo, cuando se mira la expresión de estos genes en células S2 control que no han sido tratadas con CuSO<sub>4</sub>, los genes que se encuentran down-

regulados muestran niveles de expresión mayores a los genes que se encuentran up-regulados cuando se expresa dBigH1 (**Figura 28D**).



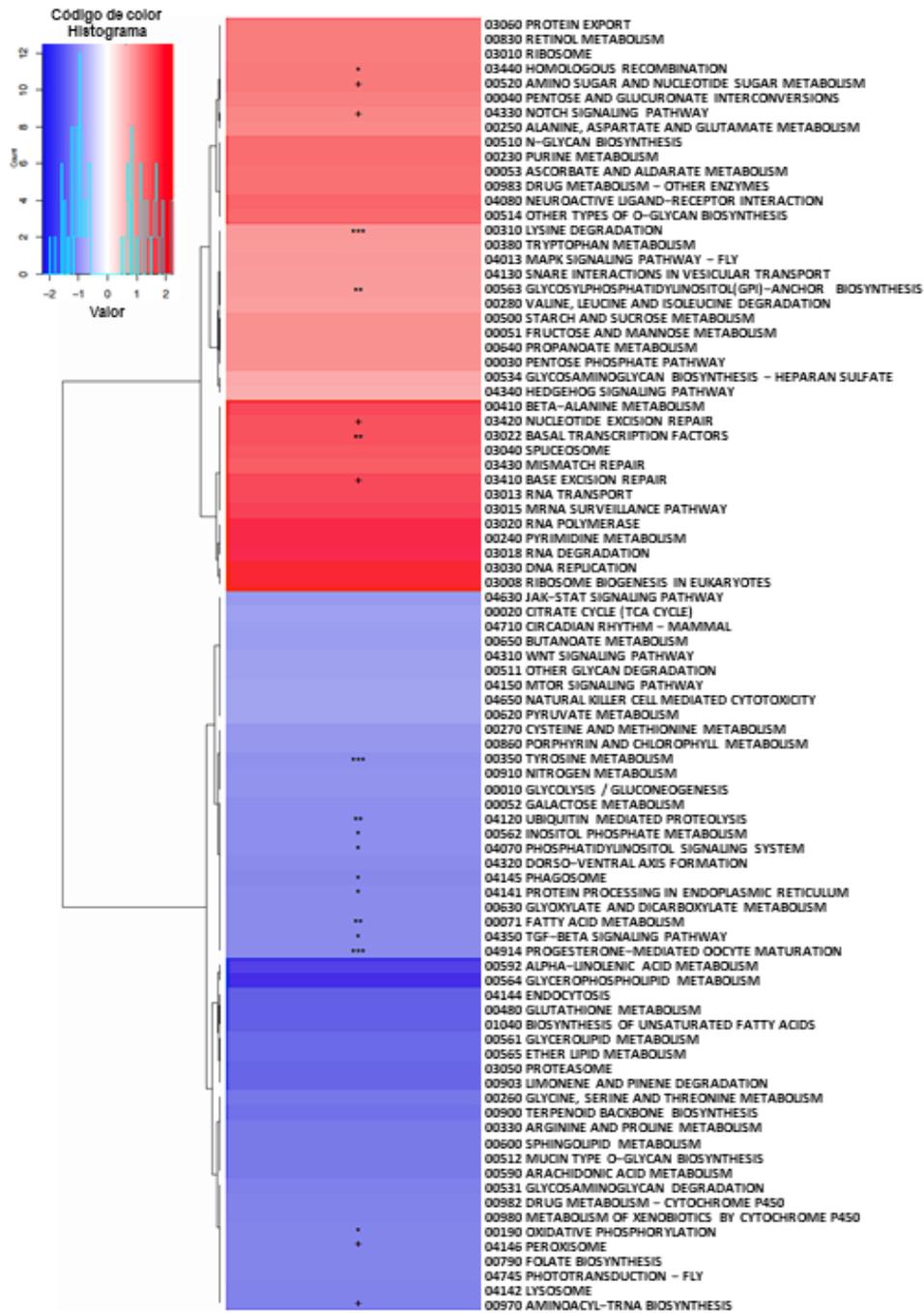
**Figura 28. Relación entre los niveles de expresión, dBigH1 y dH1.** A) Correlación de los niveles de dBigH1 con el grado de cambio en la expresión. En rojo se muestran los genes up-regulados, en azul oscuro los down-regulados y en azul claro los genes no expresados diferencialmente. Existe una correlación entre el contenido de dBigH1 y el nivel de down-regulación (Pearson  $r=0,11$ ;  $p\text{-valor}=0,02271$ ). Los genes up-regulados no muestran una correlación estadísticamente significativa (Pearson  $r=0,093$ ;  $p\text{-valor}=0,1737$ ). Se indica el valor de la pendiente ( $\alpha$ ). B) Distribución de dBigH1 en la región génica. En rojo se muestra los genes up-regulados y en azul los genes down-regulados. Respecto a la función de los genes down-regulados, se asocian a vías de procesos metabólicos y con funciones *housekeeping* según la clasificación KEGG (Kyoto

*Encyclopedia of Genes and Genomes*). Por otro lado, los up-regulados están relacionados con procesos diversos, aunque una de las categorías más up-reguladas está relacionada con procesos que tienen que ver con el DNA/RNA (**Figura 29**). Además, se realizaron mapas epigenéticos utilizando la herramienta ChroGPS con el fin de caracterizar el estado epigenético de los genes diferencialmente expresados. Esta herramienta integra los datos disponibles en modENCODE para generar mapas en los que los genes se pueden agrupar según la presencia de diferentes marcas epigenéticas o factores asociados a la activación transcripcional o el silenciamiento (Font-Burgada et al., 2014). De este modo, los genes se pueden agrupar en tres grandes dominios: cromatina activa, cromatina polycomb (PC) y cromatina silenciada mediante HP1a. En la **Figura 30** se pueden ver en qué regiones se localizan los genes que se encuentran up-regulados y down-regulados en las células que expresan dBigH1. En el caso de los genes down-regulados, se encuentran distribuidos por los tres dominios. Respecto a los genes up-regulados, también se encuentran distribuidos por los tres dominios, aunque se encuentran en menor proporción en el dominio PC en comparación con los genes down-regulados.

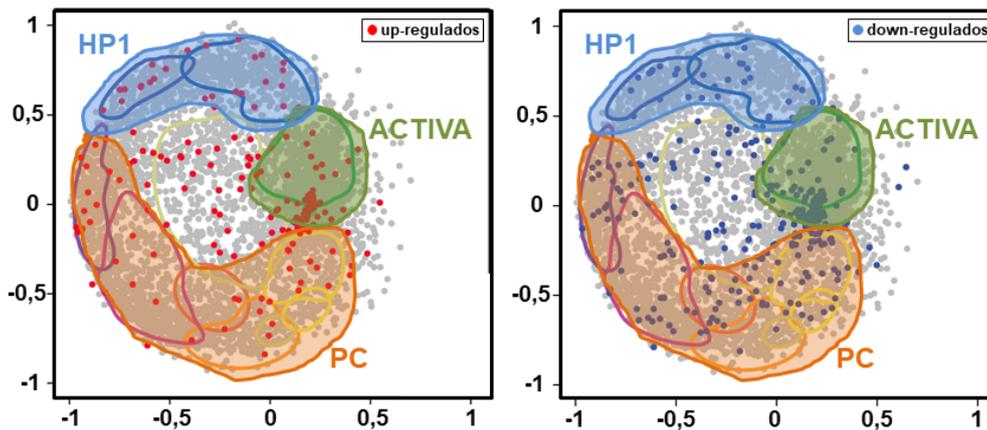
---

**Figura 28. (Continuación)** up-regulados y en azul los down-regulados, los perfiles de ambos son similares. C) Distribución de dH1 en la región génica de los genes down-regulados (azul) y up-regulados (rojo) en células no inducidas (izquierda) e inducidas (derecha). Los perfiles de los genes up-regulados y down-regulados son similares entre ellos en las células no inducidas y no varían cuando se induce la expresión de dBigH1. D) Niveles de expresión de los genes up-regulados y down-regulados en células S2 que no han sido tratadas con CuSO<sub>4</sub>. Los genes down-regulados se expresan más que los up-regulados (p-valor<0,0001, test de Wilcoxon).

# RESULTADOS



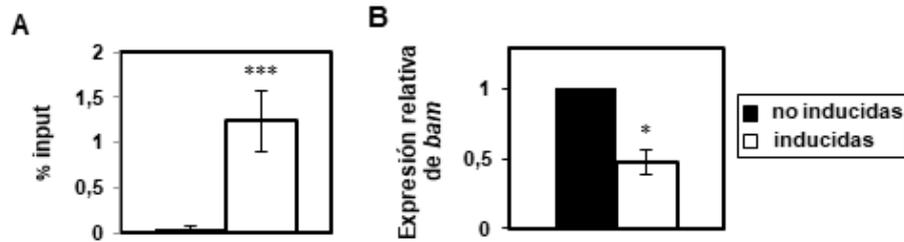
**Figura 29. Mapa de las vías KEGG enriquecidas en los genes expresados diferencialmente.** En rojo, las categorías pertenecientes a los genes up-regulados y en azul a los down-regulados (+, \*, \*\*, \*\*\* GSEA FDR <0,25; 0,05; 0,01 y 0,001 respectivamente).



**Figura 30. Mapas epigenéticos de los genes de células S2.** Se muestra la localización de los genes up-regulados (izquierda) y down-regulados (derecha) en los tres principales dominios (cromatina activa, cromatina silenciada mediante proteínas del grupo policomb y cromatina silenciada mediante HP1a). Los genes up-regulados y down-regulados se distribuyen por los diferentes dominios, aunque los genes up-regulados se encuentran en menor proporción en el dominio PC comparado con los genes down-regulados.

#### 4.1.1.3. dBigH1 reprime la expresión de *bam*

Uno de los genes estudiados en este trabajo fue *bam*. En testículos, la disminución de los niveles de dBigH1 tiene como resultado el alargamiento de la región TA debido a la acumulación de espermatogonias, lo que sugiere un defecto en la diferenciación a espermatocitos. Mediante ChIP-seq se vio que dBigH1 se localiza en el gen *bam*. Con el fin de estudiar el posible papel de dBigH1 en la diferenciación de los espermatocitos, se usó la línea celular estable para expresar dBigH1 y estudiar su efecto sobre el gen *bam*. En la **Figura 31A** se puede ver que, tras su inducción, dBigH1 se localiza en el promotor del gen *bam*, tal y como ocurre en los espermatocitos. Además, la incorporación de dBigH1 tiene como resultado una disminución de la expresión de *bam* (**Figura 31B**). Este resultado sugiere que dBigH1 es necesaria para la diferenciación a espermatocitos mediante el silenciamiento de *bam*. Los experimentos realizados en testículos de *Drosophila* apoyan estos resultados puesto que dBigH1 está presente sobre el promotor del gen *bam* y la depleción de dBigH1 resulta en un aumento en sus niveles de expresión. Así mismo, la sobreexpresión de dBigH1 en testículos tiene como resultado la represión de construcciones reporteras que se expresan bajo el control del promotor de *bam*. En conjunto, estos resultados confirman la necesidad de dBigH1 para la diferenciación a espermatocitos mediante el silenciamiento de *bam* (Carbonell et al., 2017).



**Figura 31. dBigH1 inhibe la expresión de *bam*.** A) ChIP-qPCR de la región promotora de *bam*. El gráfico muestra la cantidad de material inmunoprecipitado en relación a la cromatina total (% input). dBigH1 se encuentra en la región promotora tras la inducción de su expresión. Las barras de error representan el error estándar (n=2). El p-valor para la diferencia es <0,0001 (test t-Student de dos colas). B) Análisis de la expresión relativa de *bam* mediante RT-qPCR. El gráfico muestra el cambio de expresión respecto a las células no inducidas. La ocupación del promotor de *bam* por dBigH1 resulta en una disminución de la expresión. Las barras de error representan el error estándar (n=2; p-valor<0,05; test t-Student de dos colas).

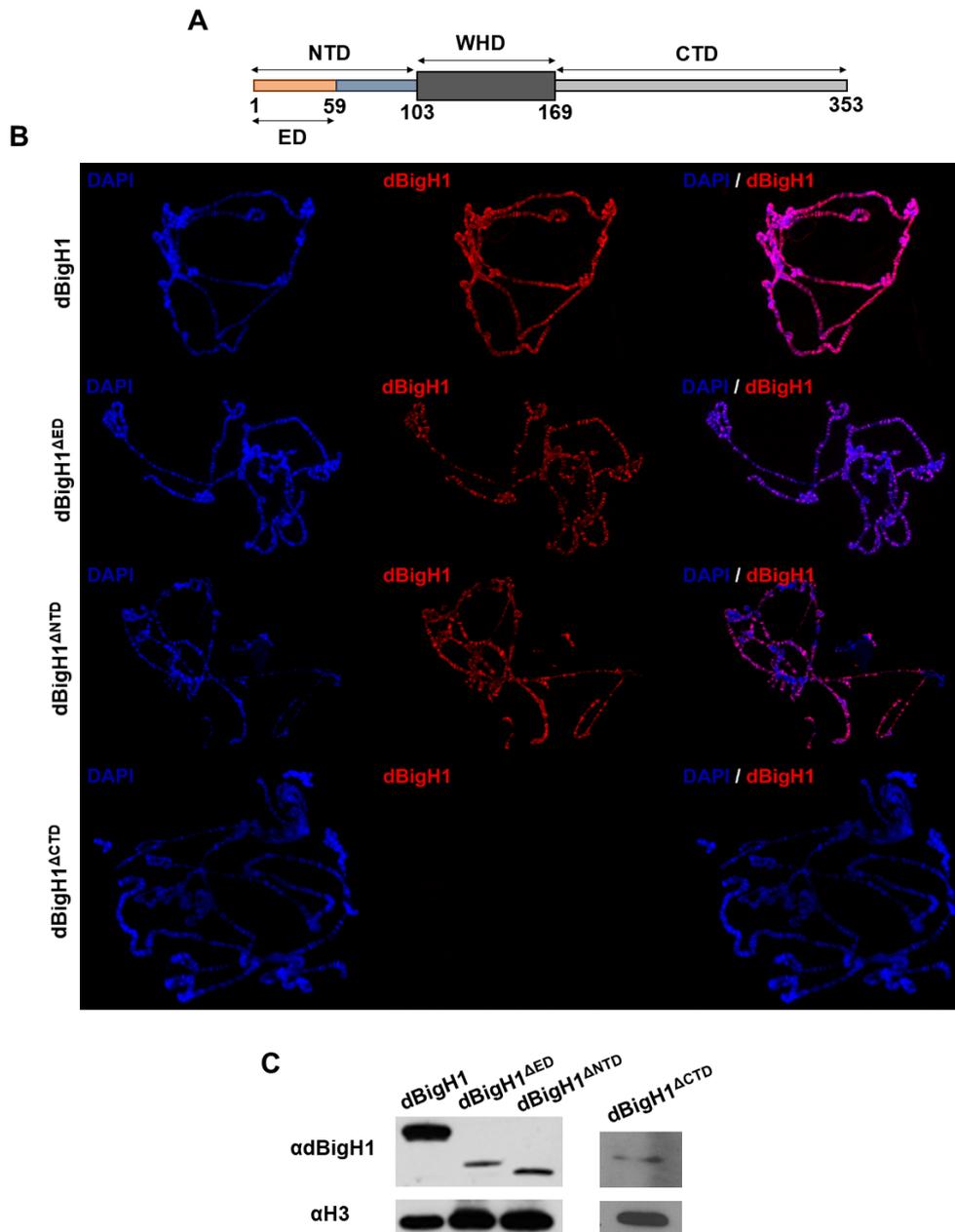
#### 4.1.2. Análisis funcional de los dominios de dBigH1

##### 4.1.2.1. El CTD es necesario para la unión a la cromatina

dBigH1 muestra la estructura típica de las histonas H1, compuesta por tres dominios. El dominio central y el CTD están conservados respecto a la variante somática. Sin embargo, el NTD contiene un pequeño dominio enriquecido en residuos D y E (**Figura 32A**).

Con el fin de analizar la contribución de cada dominio a la función de dBigH1, se usó el sistema Gal4/UAS para la sobreexpresión en la mosca de diferentes formas truncadas de la proteína dBigH1. En concreto se estudiaron cuatro construcciones: 1) UAS-dBigH1, que contiene la secuencia completa de la proteína dBigH1; 2) UAS-dBigH1<sup>ΔED</sup>; que expresa una proteína que carece del dominio ácido N-terminal enriquecido en residuos E y D; 3) UAS-dBigH1<sup>ΔNTD</sup>, cuya proteína no contiene el NTD; y 4) UAS-dBigH1<sup>ΔCTD</sup>, a la que se le ha eliminado el dominio CTD. El sistema Gal4/UAS consta de un driver que dirige la expresión de la proteína Gal4 y un elemento UAS que se activa cuando Gal4 se une (Duffy, 2002). Para este experimento se usó el *driver daughterless (da)-gal4*, que se expresa en glándulas salivales. Estas glándulas contienen un tipo de cromosomas especializados que reciben el nombre de cromosomas politénicos. Estos cromosomas se forman gracias a rondas sucesivas de replicación del DNA sin que la célula se divida, de modo que las cromátidas hermanas permanecen unidas. El gran tamaño de estos cromosomas permite el estudio de la unión de proteínas a la cromatina.

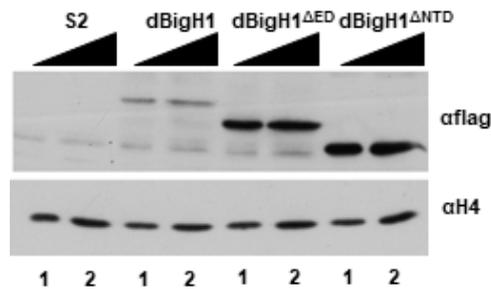
La sobreexpresión de las diferentes construcciones muestra que el CTD es fundamental para la unión de dBigH1 a la cromatina, puesto que la construcción en la que se ha delecionado este dominio no se detecta en los cromosomas politénicos (**Figura 32B**), a pesar de expresarse en las glándulas salivales (**Figura 32C**). Este resultado concuerda con otros estudios realizados con la histona H1.1 de mamíferos en que el CTD es necesario para la unión de gran afinidad a la cromatina (Hendzel et al., 2004). Por el contrario, las deleciones del dominio ED o del NTD completo no afectan a la capacidad de unión de dBigH1 puesto que ambas formas se detectan en los cromosomas politénicos (**Figura 32B**).



**Figura 32. Localización de dBigH1 en cromosomas politénicos.** A) Esquema de la estructura de dBigH1. Esta variante contiene un dominio rico en residuos E y D en el NTD. Los números indican la posición del aminoácido donde empieza y acaba cada dominio. B) Inmunodetección en cromosomas politénicos de dBigH1 (rojo). El DNA se marcó con DAPI (azul). El dominio CTD es necesario para la unión de dBigH1 a la cromatina. La delección del dominio ED o del NTD al completo no afectan a la capacidad de unión al DNA puesto que ambas formas se detectan en los cromosomas. C) Western blot de glándulas salivales en las que se han sobreexpresado las distintas construcciones. Todas las construcciones se expresan en las glándulas.

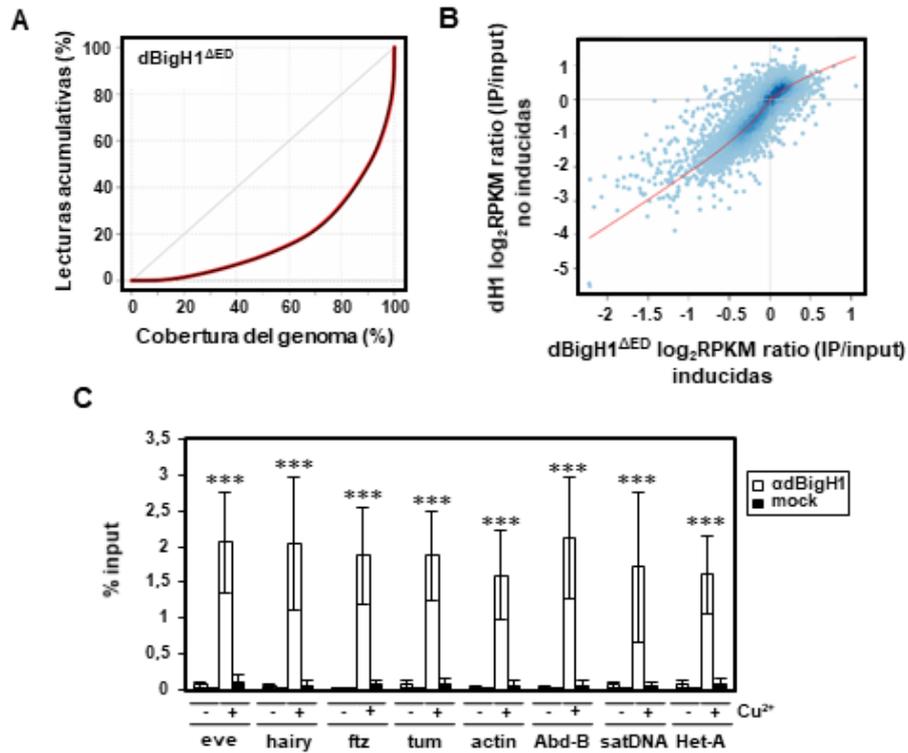
#### 4.1.2.2. El NTD es necesario para el reemplazo de dH1

Puesto que el NTD no está implicado en la unión a la cromatina, se analizó su posible contribución en el reemplazo de dH1. Con el fin de poder realizar estos análisis, se usó una línea celular que expresa la forma truncada dBigH1<sup>ΔED</sup>. Esta construcción, igual que la sobreexpresada en moscas, se une a la cromatina puesto que se detecta mediante *western blot* en muestras de cromatina entrecruzada (**Figura 33**).



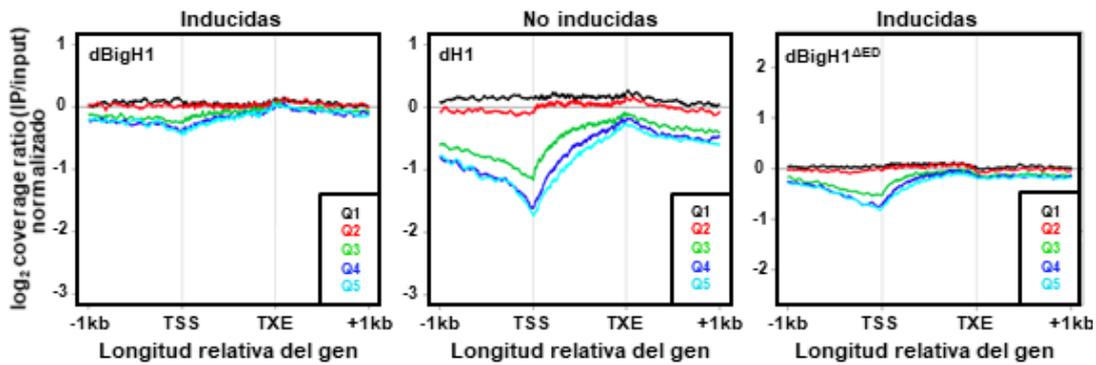
**Figura 33. Unión de dBigH1, dBigH1<sup>ΔED</sup> y dBigH1<sup>ΔNTD</sup> a la cromatina.** Western blot de cromatina entrecruzada procedente de las diferentes líneas celulares. Todas las construcciones de dBigH1 se detectan en la cromatina. En los geles se cargaron cantidades crecientes de las distintas muestras (carriles 1 y 2). La H4 se usó como control de carga.

Con el objetivo de analizar la distribución de dBigH1<sup>ΔED</sup> se realizaron experimentos de ChIP-seq. Los análisis muestran que esta forma truncada se distribuye a lo largo de la cromatina igual que la proteína dBigH1 (**Figura 34A**). Además, igual que la forma completa de dBigH1, su deposición correlaciona con el contenido de dH1 en células no inducidas (**Figura 34B**). Los resultados del ChIP-seq fueron comprobados mediante ChIP-qPCR. En todas las regiones analizadas se pudo detectar dBigH1 tras la inducción, pero no en las células control (**Figura 34C**).



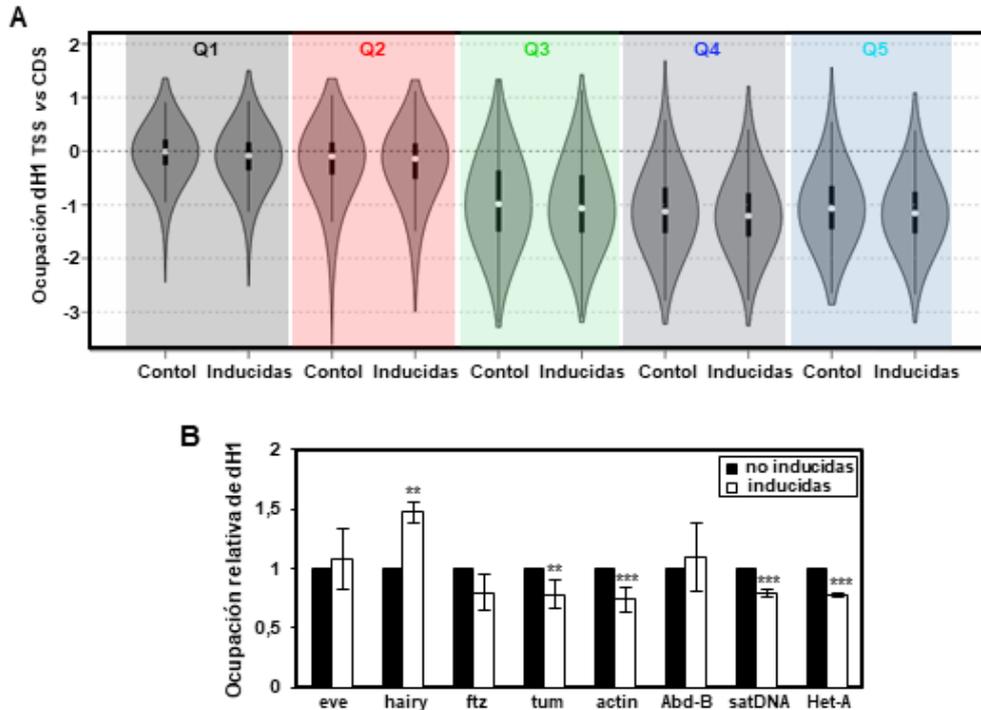
**Figura 34. La delección del dominio ED no afecta a la distribución de dBigH1.** A) Curvas de Lorenz en las que se muestra el porcentaje del genoma cubierto en los inputs (negro) y en las IPs (rojo). El porcentaje de cobertura es similar entre las IPs y los inputs. B) Representación de la ocupación de dBigH1 en función de la ocupación de dH1 en las células control no inducidas. Existe una correlación entre el contenido de dBigH1<sup>ΔED</sup> y el de dH1 ( $r=0,863$ ). C) ChIP-qPCR en células sin inducir y en células inducidas. Se representa la eficiencia de la inmunoprecipitación en relación al material total sin inmunoprecipitar (% input). Como control para la especificidad de la inmunoprecipitación se usó suero preinmune (mock). dBigH1<sup>ΔED</sup> se detecta en todas las secuencias analizadas en las células inducidas. Las barras de error representan el error estándar ( $n=2$ ). Se indica el nivel de significancia estadística para las diferencias de inmunoprecipitación con  $\alpha$ dBigH1 entre las células no inducidas e inducidas ( $***<0,005$ ; test t-Student de dos colas).

Posteriormente se analizó la distribución de dBigH1<sup>ΔED</sup> a lo largo de las regiones génicas. Esta construcción se localiza a lo largo del gen y existen diferencias en la ocupación según el nivel de expresión de los genes, igual que para dBigH1 o dH1, siendo los genes menos expresados los que tienen un mayor contenido de dBigH1<sup>ΔED</sup>. Además, con esta construcción se observa una depleción alrededor del TSS mayor que para la construcción dBigH1, pero menor que para dH1 (**Figura 35**).



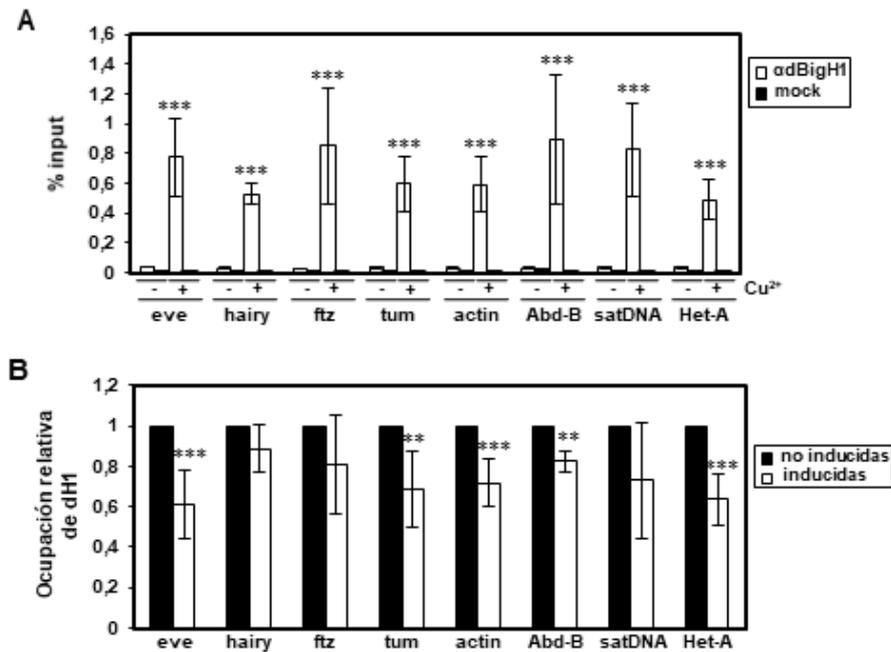
**Figura 35. Distribución de dBigH1, dH1 y dBigH1<sup>ΔED</sup> a lo largo de la región génica.** Representación de los perfiles de dBigH1 (izquierda), dH1 (centro) y dBigH1<sup>ΔED</sup> (derecha) según los grupos de expresión (de menor a mayor expresión: Q1-Q5). El contenido de dBigH1<sup>ΔED</sup>, al igual que de dBigH1 y dH1, es mayor cuanto menos se expresa el gen. En los genes activos transcripcionalmente (Q3-Q5), el contenido de dBigH1<sup>ΔED</sup>, disminuye alrededor del TSS y aumenta a lo largo del CDS de un modo más similar a dH1.

Por otro lado, la ratio TSS/CDS no aumenta cuando se expresa la forma dBigH1<sup>ΔED</sup> (**Figura 36A**). Mediante ChIP-qPCR se puede observar que, a diferencia de lo que ocurre con la proteína completa, la unión de dBigH1<sup>ΔED</sup> no afecta a la ocupación de dH1 (**Figura 36B**). En conjunto, estos resultados sugieren que dBigH1<sup>ΔED</sup> no es capaz de reemplazar dH1 en la misma medida que lo hace dBigH1 y que por lo tanto el dominio ED es necesario para el reemplazo.



**Figura 36. dBigH1<sup>AED</sup> no reemplaza dH1.** A) Relación entre la ocupación del TSS y el CDS según los grupos de expresión en células no inducidas y células inducidas. B) ChIP-qPCR en células inducidas y no inducidas. El gráfico muestra el cambio en la ocupación de dH1 respecto a las células no inducidas. Tras la inducción la ocupación de dH1 disminuye solo en algunas de las regiones analizadas. Las barras representan el error estándar (n=2). Se indica el p-valor para las diferencias de expresión respecto a las células no inducidas (\*\*<0,01; \*\*\*<0,005; test t-Student de dos colas).

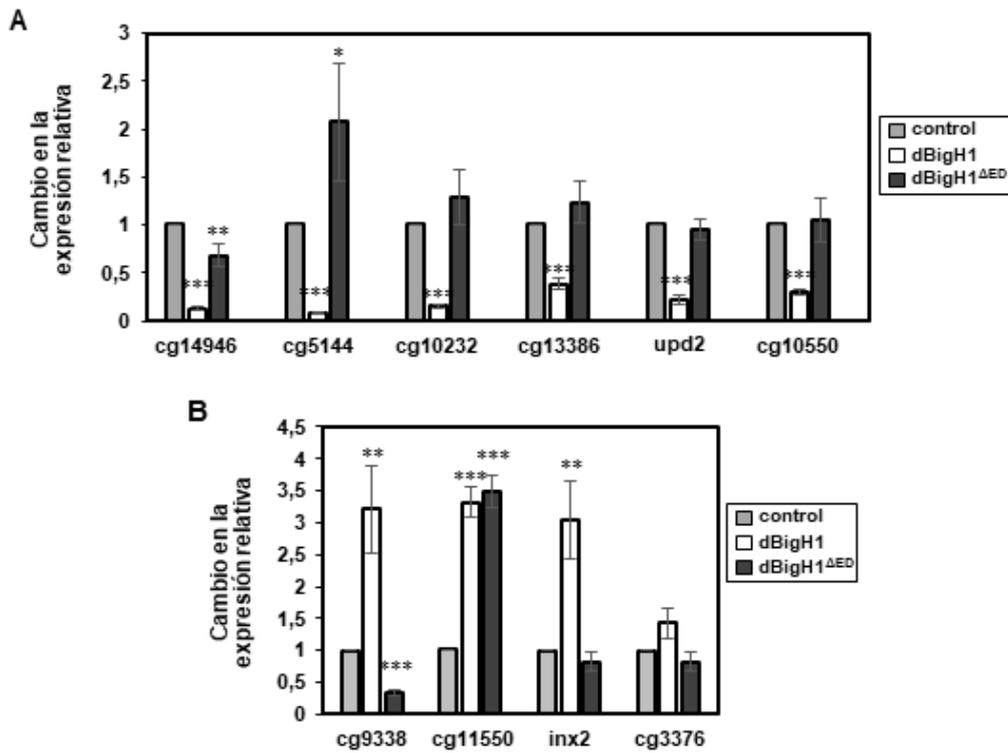
Del mismo modo, la expresión de la forma truncada dBigH1<sup>ΔNTD</sup>, que carece del NTD completo, es capaz de unirse a la cromatina, igual que cuando se sobreexpresa en glándulas salivales (**Figura 33**). Además, en todas las regiones analizadas mediante ChIP-qPCR se pudo detectar la presencia de dBigH1<sup>ΔNTD</sup> en las células en las que se indujo la expresión, pero no en las células no inducidas o cuando se usó suero preinmune para la inmunoprecipitación (**Figura 37A**). Respecto al reemplazo de dH1, mediante ChIP-qPCR se puede observar que, igual que para la forma dBigH1<sup>AED</sup>, el grado de ocupación de dH1 en las regiones analizadas no se ve afectada con la misma magnitud que cuando se expresa dBigH1 (**Figura 37B**).



**Figura 37. dBigH1<sup>ANTD</sup> se incorpora a la cromatina sin afectar a la ocupación de dH1.** A) ChIP-qPCR en células sin inducir y en células inducidas con anticuerpos contra dBigH1. Se representa la cantidad de material inmunoprecipitado en relación a la cromatina total (% input). Como control para la especificidad de la inmunoprecipitación se usó suero preinmune (mock). dBigH1<sup>ANTD</sup> se incorpora a la cromatina. Las barras de error representan el error estándar (n=2). Se indica el nivel de significancia estadística para las diferencias de inmunoprecipitación con αdBigH1 entre las células no inducidas e inducidas (\*\*\*<0,005; test t-Student de dos colas). B) ChIP-qPCR en células inducidas y no inducidas con anticuerpos contra dH1. El gráfico muestra el cambio en la ocupación de dH1 respecto a las células control. Las barras de error representan el error estándar (n=2). Se indica el p-valor para las diferencias de expresión respecto a las células no inducidas (\*\*<0,01; \*\*\*<0,005; test t-Student de dos colas).

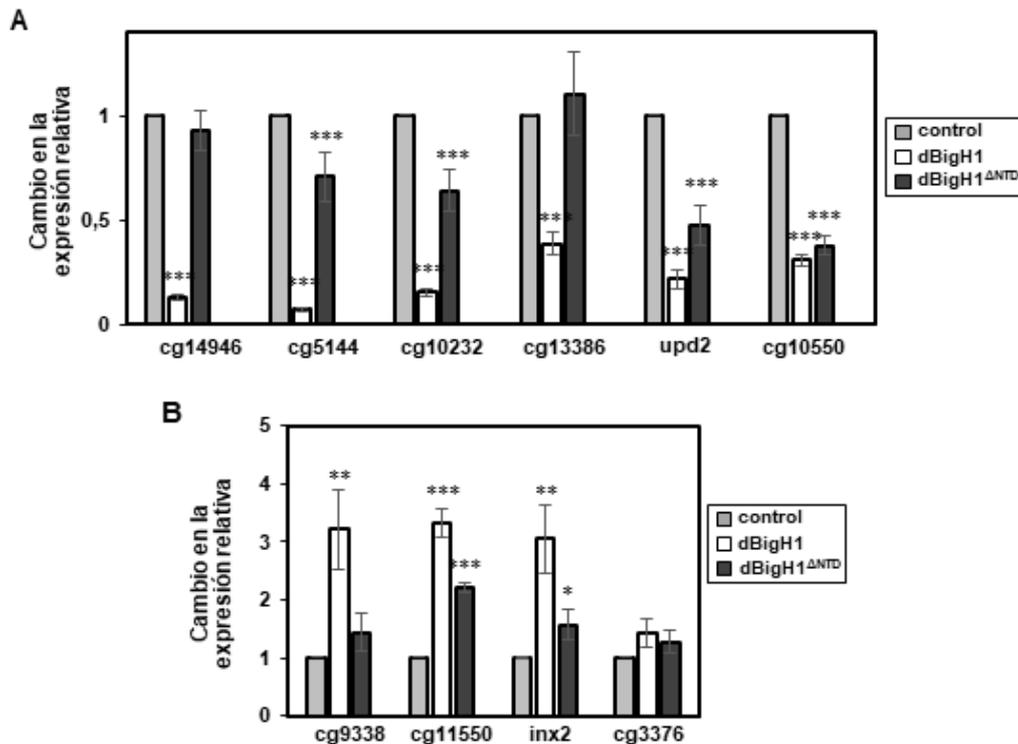
#### 4.1.2.3. El NTD es necesario para la represión de la transcripción

Para analizar la posible contribución del dominio NTD a la regulación de la transcripción se sobreexpresaron las diferentes formas truncadas y se analizó el efecto sobre la expresión génica de los genes diferencialmente expresados por dBigH1 mediante RT-qPCR. De los seis genes que se encontraban fuertemente down-regulados tras la expresión de dBigH1, únicamente uno se encontró down-regulado con la expresión de dBigH1<sup>ΔED</sup> aunque en menor medida (**Figura 38A**). En el caso de los genes que estaban up-regulados, el resultado es variable, puesto que uno de ellos estaba up-regulado también cuando se sobreexpresa la construcción dBigH1<sup>ΔED</sup>, mientras que los otros están down-regulados o no se ven afectados (**Figura 38B**). Estos resultados sugieren que el dominio ED es necesario para que dBigH1 pueda reprimir la expresión génica.



**Figura 38. Cambio en la expresión génica de los genes down- y up-regulados cuando se expresa dBigH1<sup>ΔED</sup>.** Los gráficos muestran el cambio en la expresión relativa respecto a las células control tratadas con CuSO<sub>4</sub>. A) Genes down-regulados por la expresión de dBigH1. Solo un gen de los seis analizados muestra una disminución de la expresión cuando se expresa la forma dBigH1<sup>ΔED</sup>. B) Genes up-regulados por la expresión de dBigH1. Solo uno de los genes aumenta su expresión cuando se expresa dBigH1<sup>ΔED</sup>. Las barras de error representan el error estándar (control y dBigH1: n=7; dBigH1<sup>ΔED</sup>: n=4). Se indica el p-valor para las diferencias en la expresión relativa comparadas con el control (\*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,005, test t-Student de dos colas).

La expresión de dBigH1<sup>ΔNTD</sup> da resultados similares. Respecto a los genes down-regulados, 4 de los 6 genes analizados muestran una disminución en la expresión, aunque marcadamente menor que con dBigH1 y de los genes up-regulados, solo dos de ellos están up-regulados, aunque menos que con dBigH1 (**Figura 39**).



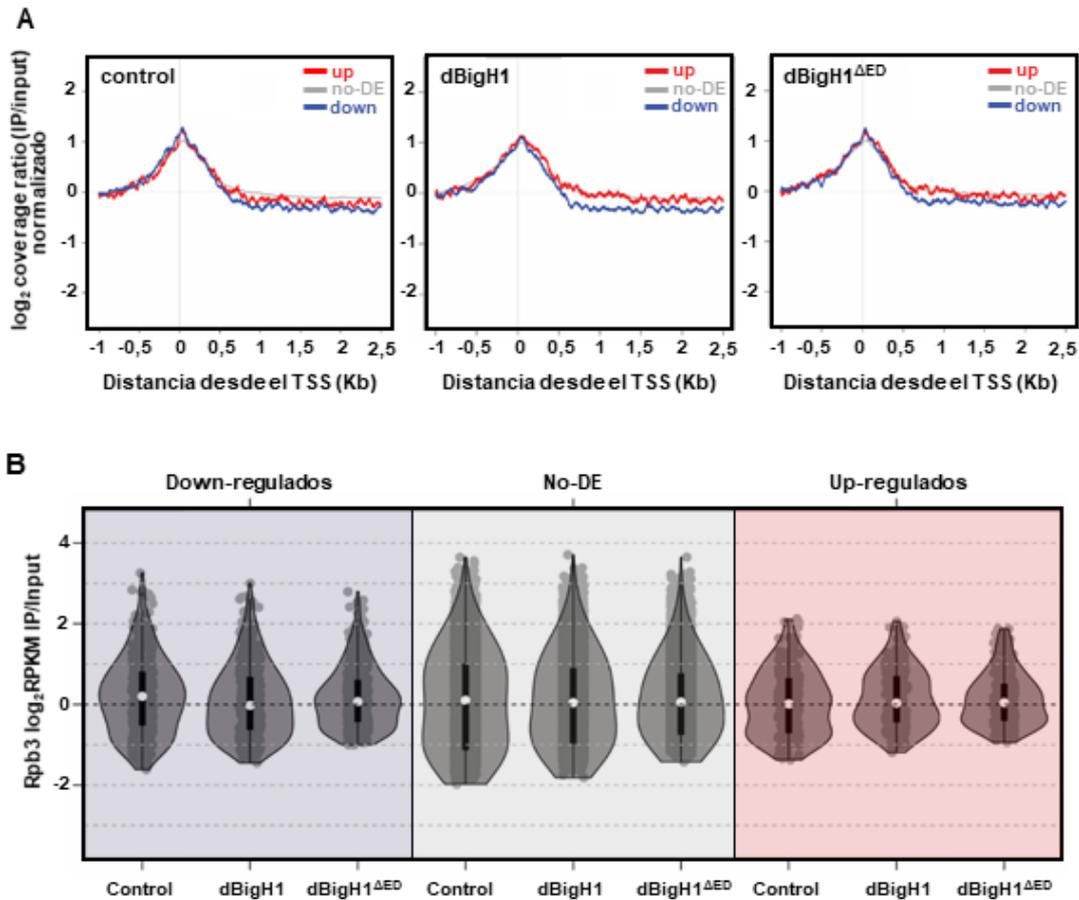
**Figura 39. Cambio en la expresión génica de los genes down- y up-regulados cuando se expresa dBigH1<sup>ΔNTD</sup>.** Los gráficos muestran el cambio en la expresión relativa respecto a las células control tratadas con CuSO<sub>4</sub>. A) Genes down-regulados por la expresión de dBigH1. La forma dBigH1<sup>ΔNTD</sup> down-regula algunos de los genes, aunque en menor medida que dBigH1. B) Genes up-regulados con la expresión de dBigH1. Solo dos de los genes se encuentran up-regulados cuando se expresa dBigH1<sup>ΔNTD</sup>. Las barras de error representan el error estándar (control y dBigH1: n=7; dBigH1<sup>ΔNTD</sup>: n=4). Se indica el p-valor para las diferencias en la expresión relativa comparadas con las células control (\*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,005; test t-Student de dos colas).

#### 4.1.3. dBigH1 interfiere en la unión de la RNA polimerasa II y la acetilación de las histonas

A continuación, analizamos mediante CHIP-seq la distribución genómica de la RNA polimerasa II en células control (S2 tratadas con CuSO<sub>4</sub>) y células donde se indujo la expresión de dBigH1 o dBigH1<sup>ΔED</sup>. Para la inmunoprecipitación usamos anticuerpos contra la subunidad Rpb3 (Shao and Zeitlinger, 2017) de la RNA polimerasa II. En la **Figura 40A** se muestran los perfiles de distribución de Rpb3 para cada grupo de genes (up-regulados, down-regulados y no expresados diferencialmente). En las células control, la distribución de la RNA polimerasa II es similar para los distintos tipos de genes, con un pico centrado en la región del TSS. Cuando se expresa dBigH1, los genes que están down-regulados muestran un menor contenido de Rpb3 a lo largo del gen en

## RESULTADOS

comparación con el resto de genes. Cuando es la forma dBigH1<sup>ΔED</sup> la que se incorpora, esta diferencia entre los genes down-regulados y el resto ya no se observa.

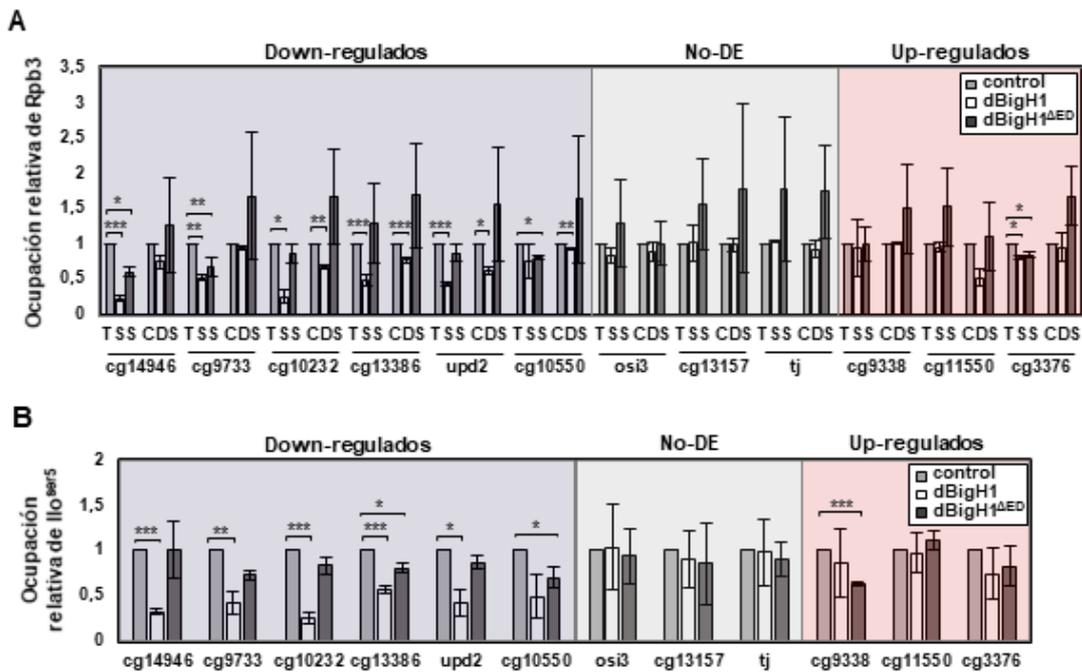


**Figura 40. Perfiles de distribución y contenido de Rpb3 en células control y células que expresan dBigH1 y dBigH1<sup>ΔED</sup>.** A) Representación de los perfiles de distribución de Rpb3 a lo largo de los genes up-regulados (rojo), los down-regulados (azul) y los que no se expresan diferencialmente (gris). El contenido de Rpb3 en los genes down-regulados es menor cuando se expresa dBigH1. B) Análisis del contenido de Rpb3 mediante ChIP-seq. El contenido de Rpb3 disminuye en los genes down-regulados de las células que expresan dBigH1.

Por otra parte, aunque no de manera estadísticamente significativa, el contenido total de Rpb3 disminuye levemente en los genes down-regulados cuando se expresa dBigH1 (**Figura 40B**), mientras que en los genes no-DE o los up-regulados estas diferencias no son tan evidentes. Con el fin de comprobar estos resultados se realizaron experimentos de ChIP-qPCR y se analizaron 6 genes down-regulados, 3 genes up-regulados y 3 no-DE. En la **Figura 41A**, se puede observar como el contenido de Rpb3 disminuye en los genes down-regulados analizados, tanto en la región TSS como en la CDS. Asimismo, el efecto sobre la ocupación en la región TSS también se puede observar mediante el

análisis de la forma fosforilada en la S5 de la subunidad Rpb1 (Ilo<sup>ser5</sup>) de la RNA polimerasa II, la cual se localiza en la región promotora (**Figura 41B**).

Por el contrario, cuando se expresa dBigH1<sup>ΔED</sup>, en la mayoría de las regiones TSS y CDS ya no se observa una disminución del contenido de Rpb3 en los genes down-regulados (**Figura 41A**). Lo mismo ocurre cuando se analiza la ocupación relativa de Ilo<sup>ser5</sup> en las regiones TSS (**Figura 41B**). Aunque parece haber una pequeña disminución, únicamente es estadísticamente significativa en dos de los 6 genes analizados y, en cualquier caso, la disminución es menor que cuando se expresa dBigH1. Estos resultados indican que el dominio ED es el responsable de la disminución del contenido de la RNA polimerasa II en los genes down-regulados.



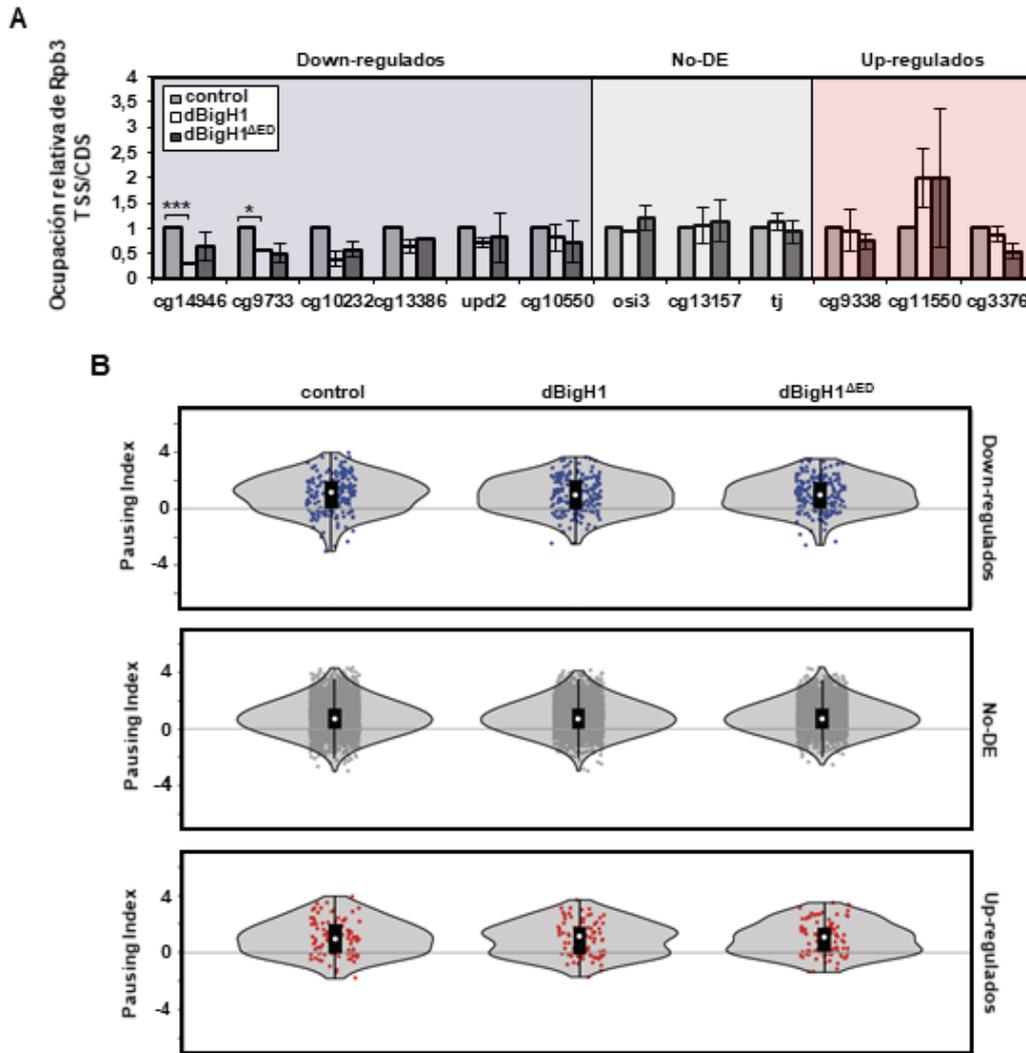
**Figura 41. Contenido de RNA polimerasa II en los genes down-regulados, up-regulados y no-DE.** A) ChIP-qPCR con anticuerpos contra la subunidad Rpb3 de la RNA polimerasa II en células S2 inducidas (control) y células que expresan dBigH1 y dBigH1<sup>ΔED</sup>. El gráfico muestra la ocupación de Rpb3 respecto a las células control. El contenido de Rpb3 disminuye en los genes down-regulados cuando se expresa dBigH1, especialmente en las regiones de los TSS. Las barras de error representan el error estándar (n=2). Se indica el p-valor para las diferencias de ocupación entre las células control y las células que expresan dBigH1 o dBigH1<sup>ΔED</sup> (\*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,005; test t-Student de dos colas). B) Contenido de la forma activa de la RNA polimerasa próxima al promotor (Ilo<sup>ser5</sup>) en las regiones TSS determinado por ChIP-qPCR. El contenido de esta forma disminuye en los genes down-regulados cuando se sobreexpresa dBigH1, pero no se ve afectado de igual manera con la expresión de dBigH1<sup>ΔED</sup>. Las barras de

Cabe destacar que los efectos de la expresión de dBigH1 en la ocupación de la Rpb3 son mayores en las regiones TSS que en las CDS en la mayoría de los genes down-regulados analizados (**Figura 41B**). Estos resultados sugieren que existe un efecto sobre la cantidad de polimerasa que se encuentra pausada. Con los resultados del análisis de la ocupación de Rpb3 en las regiones TSS y CDS (**Figura 41B**) se calculó la relación TSS/CDS. Los resultados muestran que existe una leve disminución en la relación TSS/CDS en los genes down-regulados cuando se expresa dBigH1, aunque únicamente en dos de los genes es estadísticamente significativa. Por el contrario, en el caso de los genes up-regulados y no-DE, esta disminución no se aprecia (**Figura 42A**). Cuando se expresa la forma dBigH1<sup>ΔED</sup>, aunque existe también una pequeña disminución en algunos de los genes down-regulados, en ningún caso es significativa.

Con el fin de analizar en mayor profundidad esta posibilidad, se calculó el índice de polimerasa pausada o *pausing index* en las distintas condiciones (control, expresión de dBigH1 y expresión de dBigH1<sup>ΔED</sup>) a partir de los datos de ChIP-seq. Este índice se calculó como la relación entre la ocupación de Rpb3 en el TSS±250 pb y el resto del CDS. Estos análisis muestran que en las células control, los genes down-regulados tienen un *pausing index* más alto en comparación con el resto de genes (**Figura 42B**). Además, este índice tiende a disminuir cuando se expresa dBigH1, aunque la disminución no es estadísticamente significativa. Respecto a los genes no-DE y up-regulados, no se observa ningún cambio respecto a las células control (**Figura 42B**). Cuando se expresa dBigH1<sup>ΔED</sup> también se puede apreciar una pequeña disminución en el *pausing index*, que tampoco es estadísticamente significativa.

---

**Figura 41. (Continuación)** error representan el error estándar (n=3 para control y dBigH1; n=2 para dBigH1<sup>ΔED</sup>). Se indica el p-valor para las diferencias de ocupación respecto a las células control (\*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,005; test t-Student de dos colas).

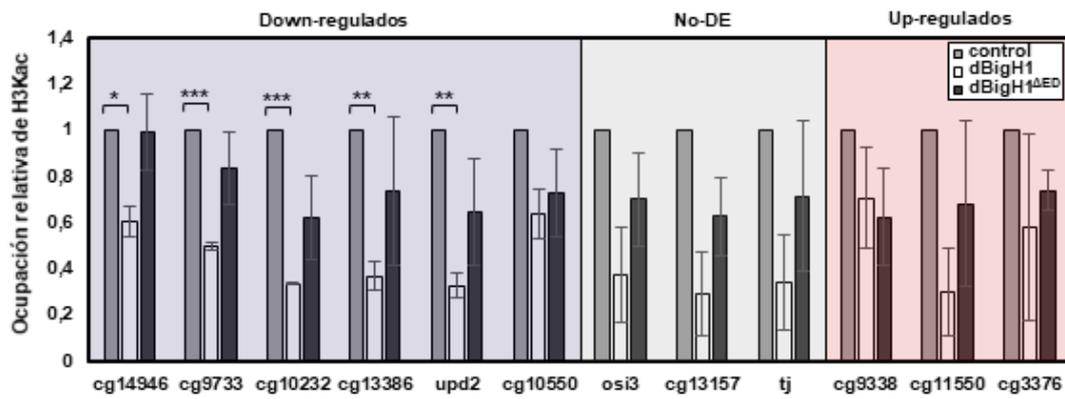


**Figura 42. Efecto sobre la RNA polimerasa pausada.** A) Relación entre la ocupación del TSS y el CDS. La relación tiende a disminuir cuando se expresa dBigH1 o dBigH1<sup>ΔED</sup> en algunos genes down-regulados. Las barras de error representan el error estándar (n=2). Se indica el p-valor para las diferencias de ocupación respecto a las células control (\*<0,05; \*\*\*<0,005; test t-Student de dos colas). B) Representación del *pausing index* de los genes down-regulados, no-DE y up-regulados en células control (izquierda), células que expresan dBigH1 (centro) y células que expresan dBigH1<sup>ΔED</sup> (derecha). En las células control, los genes down-regulados presentan un *pausing index* mayor que el resto de genes. La expresión de dBigH1 y dBigH1<sup>ΔED</sup> reduce el *pausing index* en los genes down-regulados, aunque no de manera estadísticamente significativa.

Los genes activos transcripcionalmente están enriquecidos en ciertas marcas epigenéticas, entre las que se encuentran la acetilación de las histonas H3 y H4 (Schones and Zhao, 2008). Se ha propuesto que las histonas interactúan con el DNA y con otros nucleosomas gracias a interacciones electrostáticas de modo que la acetilación de los residuos K neutraliza las cargas positivas y debilita estas uniones

(Bannister and Kouzarides, 2011; Di Cerbo et al., 2014; Tropberger et al., 2013), lo que permite la entrada de los factores necesarios para que se produzca la transcripción. Además, los residuos K9 y K14 de la H3 se encuentran acetilados en las regiones promotoras y 5' de los genes (Bernstein et al., 2005; Kim et al., 2005; Liang et al., 2004; Pokholok et al., 2005; Roh et al., 2004; Schübeler et al., 2004; Yin et al., 2011) y promueven la transcripción a través de diferentes mecanismos como la atracción de factores remodeladores o la interacción con los factores del PIC (Agalioti et al., 2002; Kuo et al., 2000; Reinke and Hörz, 2003; Zhao et al., 2005). Con el objetivo de determinar si la interferencia en la transcripción se produce durante los primeros pasos del proceso, se analizaron los niveles de acetilación de la K9 y K14 de la histona H3 (H3Kac) mediante ChIP-qPCR en las regiones promotoras de los genes en los que se estudió el contenido de RNA polimerasa II. De los 6 genes que se encuentran down-regulados con la expresión de dBigH1, en 5 se observa una disminución en los niveles de H3Kac (**Figura 43**). Aunque en los genes no-DE y los up-regulados también se puede observar una disminución de H3Kac, existe una mayor variabilidad y la diferencia respecto a las células control no es estadísticamente significativa (**Figura 43**). Con la expresión de la forma dBigH1<sup>ΔED</sup> también existe una tendencia de disminución de H3Kac, aunque en menor grado y con una mayor variabilidad que cuando se expresa dBigH1. Además, esta tendencia se observa también en los genes no-DE y up-regulados y en ningún caso las diferencias observadas son estadísticamente significativas comparadas con las células control (**Figura 43**).

Los resultados obtenidos sugieren que dBigH1 interfiere en la unión de la RNA polimerasa II y la acetilación de las histonas. Este efecto parece estar mediado por el dominio ED, puesto que la forma dBigH1<sup>ΔED</sup> no parece tener estos efectos.

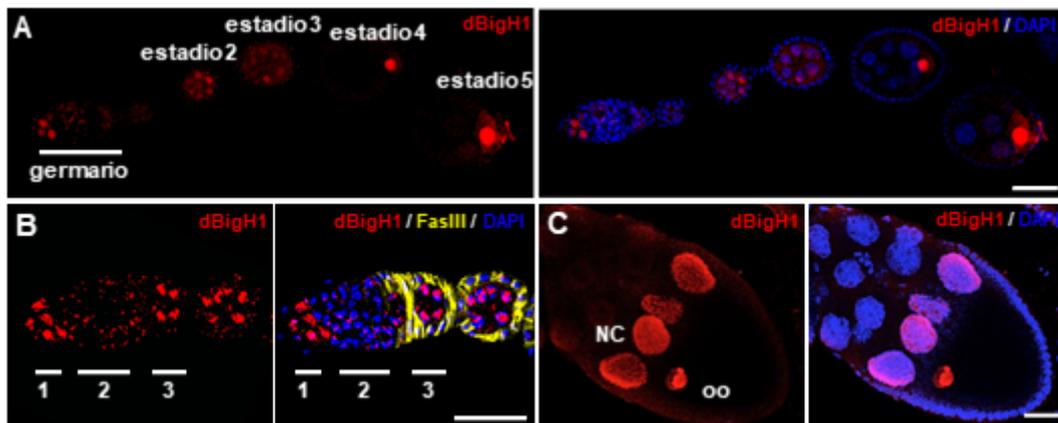


**Figura 43. Efecto sobre la activación de la transcripción.** Análisis mediante ChIP-qPCR del contenido de H3Kac en las regiones promotoras. En los genes down-regulados se produce una disminución del contenido de H3Kac cuando se expresa dBigH1. La expresión de dBigH1<sup>ΔED</sup> no afecta al contenido de H3Kac. Las barras de error representan el error estándar (n=2). Se indica el p-valor para las diferencias de ocupación respecto a las células control (\*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,005; test t-Student de dos colas).

## 4.2. Análisis de la expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina

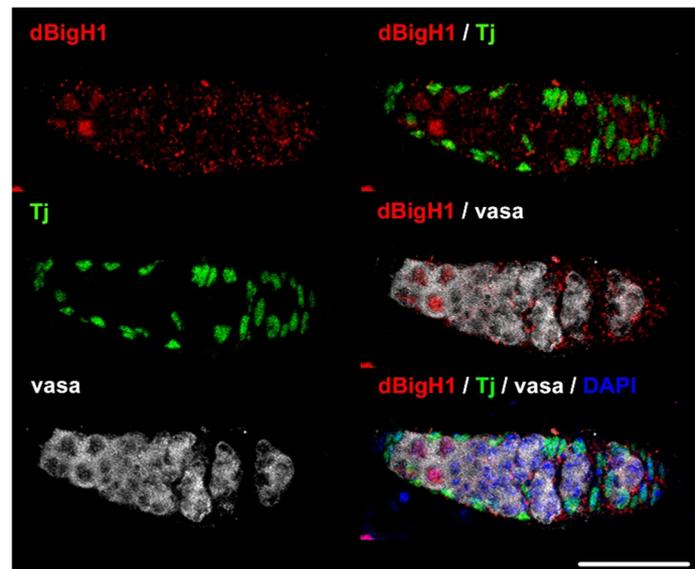
### 4.2.1. Patrón de expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina

Estudios anteriores de nuestro grupo habían determinado el patrón de expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina (**Figura 44A**). Dichos estudios mostraron que dBigH1 se detecta en las células de la parte más anterior del germario, correspondiente a la región 1. Posteriormente, en la región 2, donde los CB empiezan a dividirse para formar los cistos de 16 células, dBigH1 ya no se detecta y reaparece en la región 3, cuando las células germinales son rodeadas por las células foliculares, que son positivas para Fasciclina III (**Figura 44B**), para formar una nueva cámara ovárica. En las cámaras ováricas menos desarrolladas (estadios 1 a 3) se detecta expresión de dBigH1 en todas las células, mientras que en estadios más avanzados (a partir del estadio 4), la expresión de dBigH1 se restringe fundamentalmente al oocito, donde se mantiene a lo largo de toda la oogénesis (**Figura 44A,C**). Más adelante (a partir del estadio 9) se puede detectar dBigH1 en algunas NC, especialmente en las más cercanas al oocito (**Figura 44C**).



**Figura 44. Expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina.** A) Inmunodetección de dBigH1 (rojo) en una ovариola con diferentes estadios. El DNA se marcó con DAPI. La parte anterior se corresponde con el germario. Se indican los estadios de las diferentes cámaras ováricas. La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m. B) Inmunodetección de dBigH1 (rojo) y Fasciclina III (FasIII, amarillo) en el germario. El DNA se marcó con DAPI. Se indican las diferentes regiones del germario. La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m. C) Inmunodetección de dBigH1 (rojo) de una cámara ovárica de estadio 9. El DNA se marcó con DAPI. dBigH1 se detecta en el oocito (oo) y en las *nurse cells* (NC) más cercanas al oocito. La barra de escala corresponde a 30  $\mu$ m. Resultados obtenidos por S. Pérez-Montero y A. Carbonell.

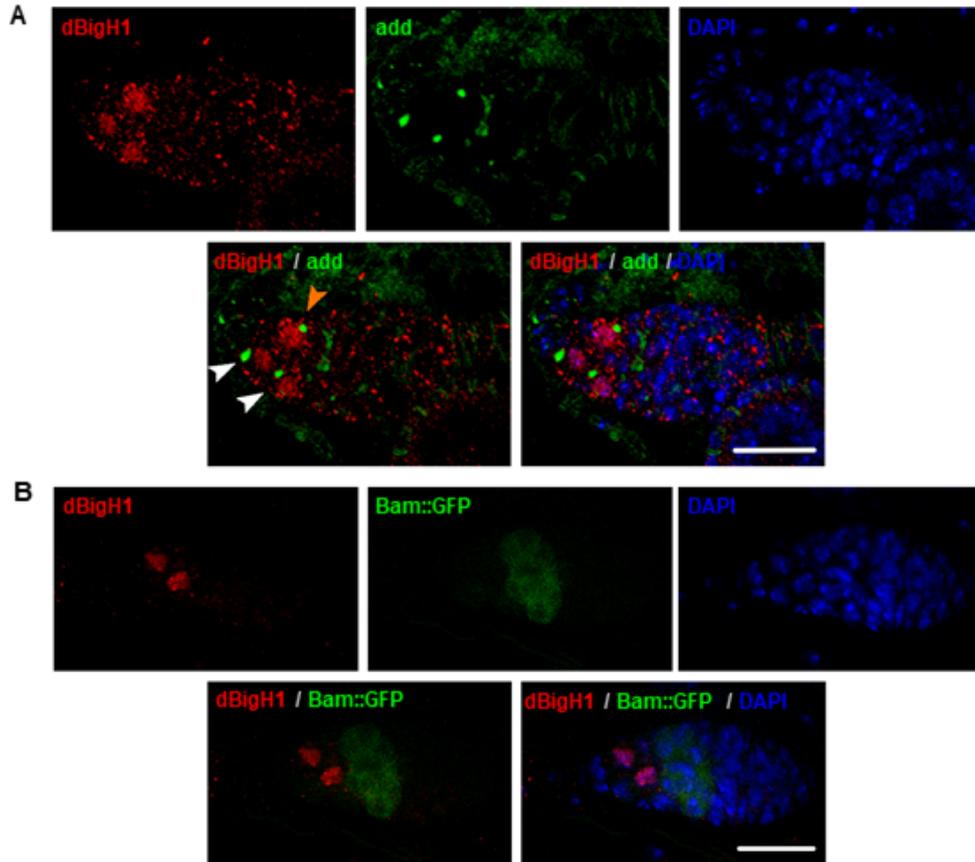
En el germario, las células anteriores que expresan dBigH1 son germinales, puesto que expresan el marcador específico de la línea germinal vasa (Lasko and Ashburner, 1988; Lasko and Ashburner, 1990), pero no expresan Traffic jam (Tj), un marcador de células somáticas (Li et al., 2003a) (**Figura 45**).



**Figura 45.** En el germario, dBigH1 se expresa solamente en células germinales. Inmunodetección de dBigH1 (rojo), vasa (gris) y Tj (verde) en el germario. El DNA se marcó con DAPI (azul). dBigH1 no se expresa en las células que expresan Tj, pero sí en las que expresan el marcador vasa. La barra de escala equivale a 25  $\mu$ m.

En la parte anterior del germario se encuentran entre 2 y 3 GSC que se dividen asimétricamente para renovar la población de GSC y para dar lugar a CB que empiezan a diferenciarse. Estas células contienen una estructura formada por diferentes componentes del citoesqueleto llamada espectrosoma. En el caso de las GSC, esta estructura se sitúa en la parte anterior, mientras que esto no pasa en los CB. Cuando las células se dividen y dan lugar a los cistos quedan conectadas entre ellas y presentan una estructura derivada del espectrosoma, llamada fusoma, de aspecto ramificado. Para determinar la naturaleza de las células que expresan dBigH1 en la región anterior del germario se usó un anticuerpo contra la aducina (add), un componente del fusoma y el espectrosoma (de Cuevas et al., 1996; Zaccai and Lipshitz, 1996). La **Figura 46A** muestra que las células que expresan dBigH1 son GSC y CB, ya que presentan espectrosomas que están orientados tanto hacia la parte anterior como en otras direcciones. Asimismo, se realizaron experimentos de inmunodetección en moscas portadoras de una construcción *bamP-bam::GFP* que, en ovarios, expresa específicamente en las células de los cistos Bam::GFP (Chen and McKearin, 2003). La

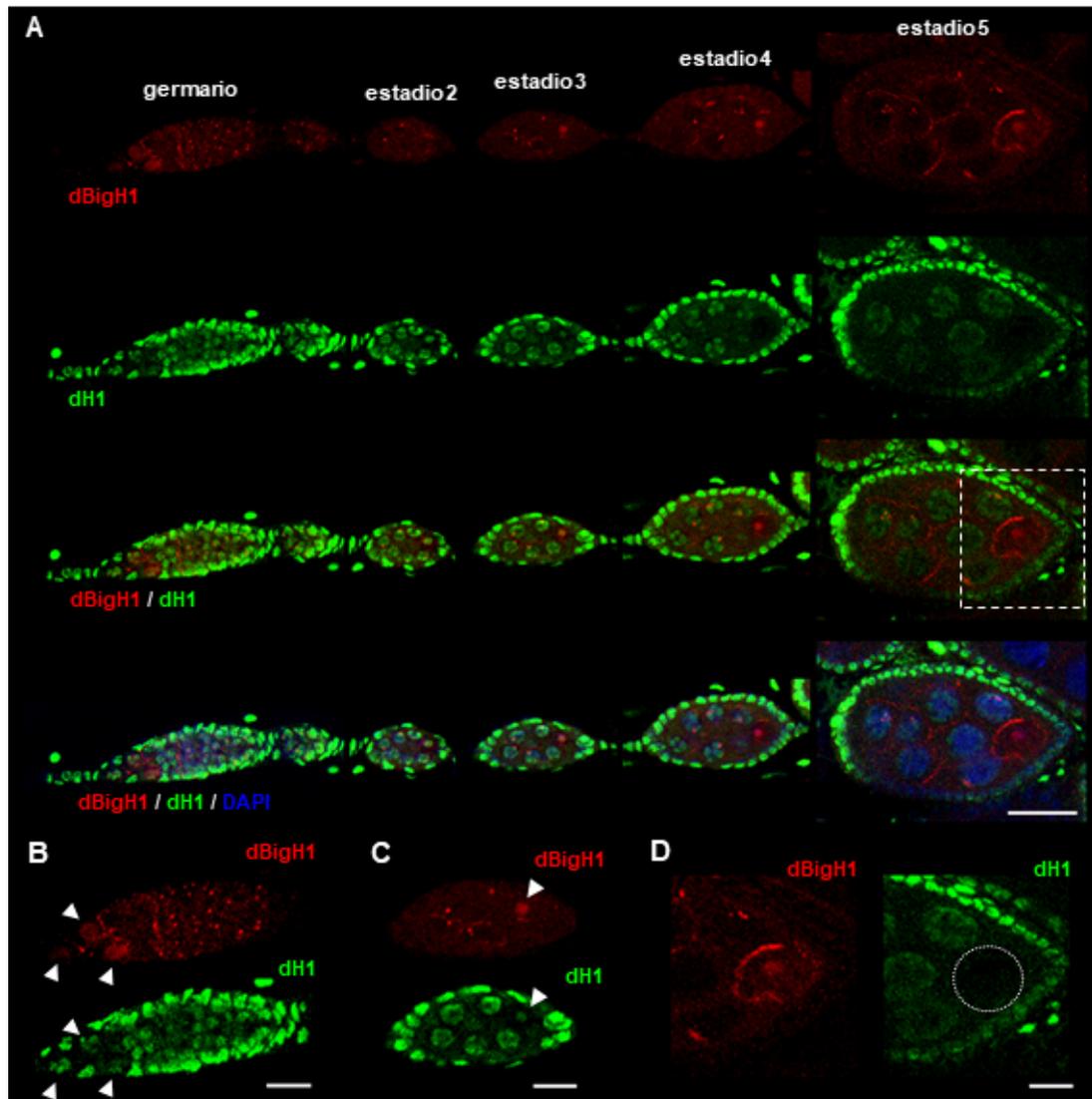
**Figura 46B** muestra que la expresión de dBigH1 no coincide con la expresión de Bam lo que confirma que, en el germario, la expresión de dBigH1 esta confinada a las GSC y CB.



**Figura 46. dBigH1 se expresa en GSC y CB.** A) Inmunodetección de dBigH1 (rojo) y aducina (verde). El DNA se marcó con DAPI (azul). Las flechas blancas indican las GSC, posición anterior del espectrosoma, y la naranja un CB, posición posterior del espectrosoma. B) Inmunodetección de dBigH1 (rojo) en ovarios de moscas *bamP-bam::GFP*. El DNA se marcó con DAPI (azul). dBigH1 no se detecta en las células que expresan Bam::GFP. Las barras de escala corresponden a 15  $\mu$ m.

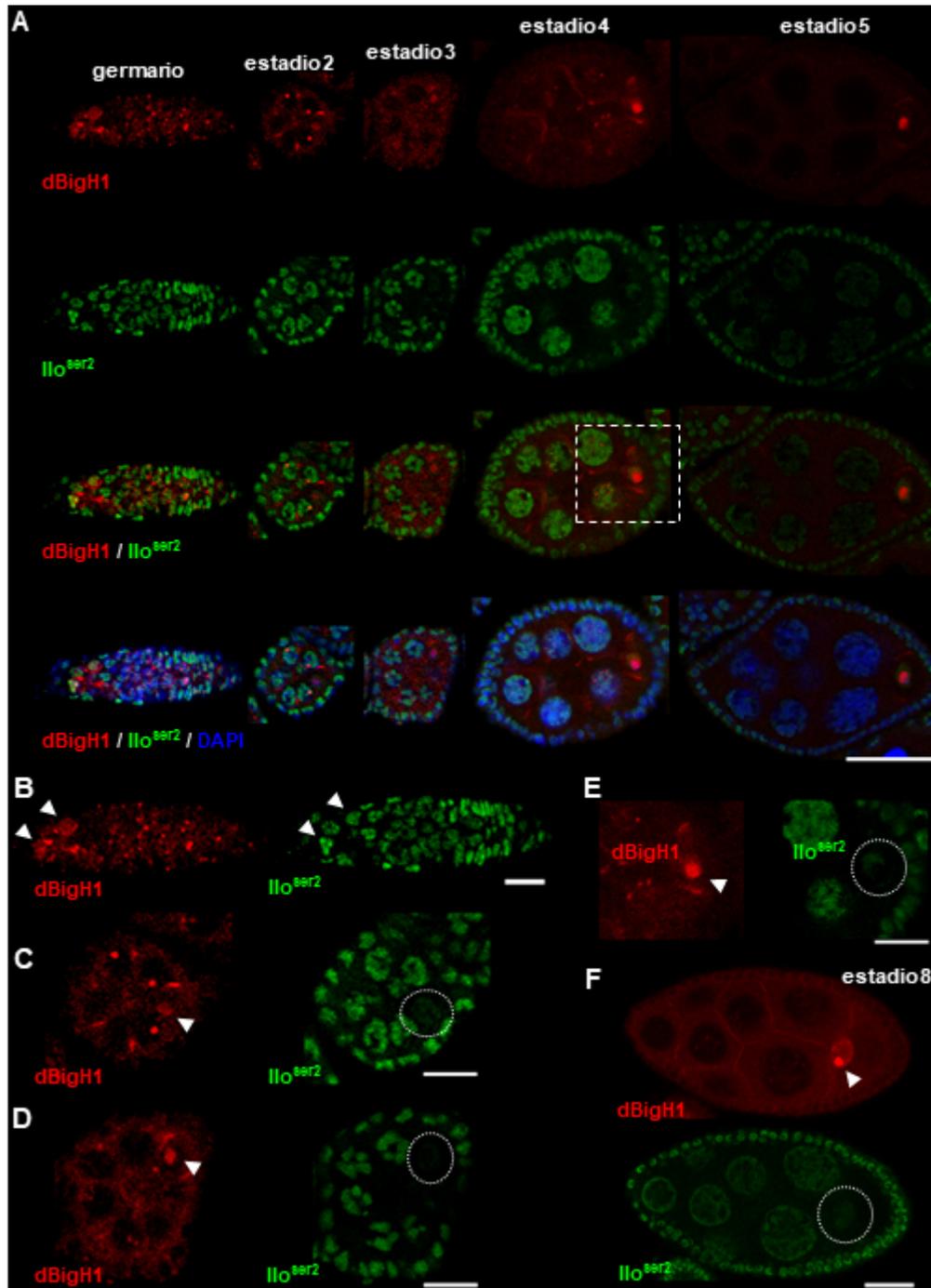
Durante el desarrollo embrionario temprano, la expresión de dBigH1 y de la variante somática dH1 son excluyentes, ya que dH1 se detecta a partir de la celularización cuando dBigH1 ya no se detecta (Pérez-Montero et al., 2013). En este sentido, se analizó también el patrón de expresión de dH1 en la línea germinal femenina y su relación con el patrón de expresión de dBigH1. Para ello, se realizaron experimentos de inmunodetección de dBigH1 y dH1 en ovarios. dH1 se expresa tanto en las células de la línea germinal como en las células foliculares que son somáticas (**Figura 47**). En la región del germario, dH1 se detecta en las GSC, donde coexiste con dBigH1, pero

también en el resto de células (**Figura 47B**). En las cámaras ováricas, dH1 se detecta tanto en las NC como en el oocito hasta el estadio 3 (**Figura 47C**). A partir de este estadio, los niveles de dH1 en el oocito empiezan a decrecer y a partir del estadio 5 ya no se detecta (**Figura 47D**). En el caso de dBigH1, se encuentra presente en el oocito en todos los estadios (**Figura 47**). Estos resultados muestran que ambas variantes pueden coexistir en las células germinales durante la gametogénesis femenina.



**Figura 47. Comparación de los patrones de expresión de dBigH1 y dH1 en ovarios.** A) Inmunodetección de dBigH1 (rojo) y dH1 (verde) en diferentes estadios de la ovogénesis. El DNA se marcó con DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 25  $\mu\text{m}$ . B) Ampliación del germario en A. Las flechas señalan GSC. C) Ampliación de la cámara ovárica del estadio 3. La flecha señala el oocito. En este estadio todavía se detecta dH1 en el oocito. También se detecta y dBigH1 en el oocito. D) Ampliación del oocito y las NC adyacentes de la cámara del estadio 5 (recuadro blanco de A). El círculo blanco indica la región ocupada por el oocito. Las barras de escala corresponden a 10  $\mu\text{m}$  (B-D).

A continuación, se realizaron experimentos de inmunodetección de la forma elongante de la RNA polimerasa II, que se encuentra fosforilada en la S2 del CTD (Ilo<sup>ser2</sup>), para estudiar si la acumulación de dBigH1 en el oocito va acompañada de su silenciamiento transcripcional. La forma Ilo<sup>ser2</sup> se detecta a lo largo de toda la gametogénesis tanto en células somáticas como en germinales (**Figura 48A**). En concreto, en el germario, Ilo<sup>ser2</sup> se detecta en todas las células, incluidas las GSC donde también se expresa dBigH1 (**Figura 48B**). En cuanto a las cámaras ováricas, en las NC se detecta Ilo<sup>ser2</sup> en los diferentes estadios (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). En cambio, en el oocito, que contiene dBigH1 a lo largo de todos los estadios, se detecta Ilo<sup>ser2</sup> únicamente en el estadio 2, aunque el marcaje es menos intenso que en las NC (**Figura 48C**). Posteriormente, en el estadio 3 apenas se detecta Ilo<sup>ser2</sup> (**Figura 48D**) y, aunque en los estadios posteriores la señal de Ilo<sup>ser2</sup> aumenta, no se localiza con el cariosoma (**Figura 48E**). No es hasta el estadio 8 cuando se vuelve a detectar Ilo<sup>ser2</sup> en el cariosoma (**Figura 48F**).



**Figura 48. Patrón de expresión de la forma elongante de la RNAPolimerasa II,  $Ilo^{ser2}$ , en ovarios.** A) Inmunodetección de dBigH1 (rojo) y  $Ilo^{ser2}$  (verde). El DNA se marcó con DAPI (azul). B) Ampliación de la región del germario. Las flechas indican las GSC que contienen dBigH1 y  $Ilo^{ser2}$ . C) Ampliación de la cámara de estadio 2. En este estadio se detecta  $Ilo^{ser2}$  en el cariosoma (indicado por la flecha y el círculo). D) Ampliación del estadio 3. Apenas se detecta  $Ilo^{ser2}$  en el oocito (círculo). La flecha señala el cariosoma, rico en dBigH1. E) Ampliación del estadio 4 (recuadro blanco en A). La forma  $Ilo^{ser2}$  se detecta en el oocito (círculo), pero no en el cariosoma (flecha). F) Cámara ovárica de estadio 8. En el oocito de este estadio se recupera la transcripción. Las barras de escala corresponden a 25  $\mu\text{m}$  (A, F) y 10  $\mu\text{m}$  (B-E).

### 4.2.2. Regulación de la expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina

Como ya se ha comentado, dBigH1 se expresa en las GSC y CB, pero su expresión se pierde en la región en la que las células de los cistos empiezan a diferenciarse y se dividen, para finalmente recuperar su expresión en las cámaras ováricas emergentes del germario y, posteriormente, quedar restringida al oocito (**Figura 44**). En el germario existen diversos mecanismos de regulación que aseguran el correcto desarrollo y diferenciación de las células germinales. En concreto, la regulación postranscripcional juega un papel muy importante. Prueba de ello es la presencia de diferentes complejos que regulan la traducción de los componentes necesarios para la diferenciación de los CB (Harris et al., 2011; Newton et al., 2015; Shen et al., 2009a) o para el mantenimiento de las GSC (Li et al., 2012a) y de la acción de la maquinaria de miRNA (Jin and Xie, 2007; Park et al., 2007; Yang et al., 2007). Este tipo de regulación depende en gran parte de las regiones 3'UTR, puesto que albergan elementos que pueden ser reconocidos por los diferentes elementos. En testículos, la expresión de dBigH1 está sujeta a regulación postraduccional, siendo Bam el responsable del silenciamiento de dBigH1 en la región de las divisiones mitóticas correspondiente a las espermatogonias (Carbonell et al., 2017). Por todo ello, se decidió analizar la posibilidad de una regulación postraduccional de dBigH1 en el germario.

En primer lugar, se analizó si el 3'UTR del mRNA de BigH1 en la línea germinal femenina era diferente al anotado ya que en *Drosophila*, igual que en otros organismos, se ha descrito eventos de poliadenilación alternativa (APA) en una gran cantidad de genes. Además, mediante los análisis realizados se identificaron 3'UTR diferentes a los anotados en un gran número de los genes analizados (Smibert et al., 2012). En el caso de la secuencia de dBigH1, existen numerosas secuencias de poliadenilación aguas abajo del 3'UTR anotado. Con el fin de determinar si dBigH1 presenta diferentes 3'UTR en los diferentes tejidos y momentos del desarrollo, se extrajo RNA de diferentes tejidos de moscas control y se analizó mediante la técnica 3'RACE. El producto de la PCR se analizó en un gel de agarosa al 1%. En el caso de embriones y ovarios, se obtuvo una única banda que por tamaño podía coincidir con el 3'UTR anotado. En el caso de testículos, se obtuvieron dos bandas. Una de ellas podía corresponder al 3'UTR anotado, pero la otra podía deberse al uso de un hexanucleótido señal de poliadenilación diferente. Las diferentes bandas se purificaron y secuenciaron usando un cebador complementario a la secuencia codificante. En el caso de testículos, solo una de las bandas se amplificó con el cebador usado. En los tres casos se obtuvo la misma secuencia 3'UTR que corresponde al anotado (**Figura 49**). Este resultado

permite concluir que para *dBigH1* no existen eventos de APA que puedan generar mRNAs con distintos 3'UTR en los tejidos analizados.

```

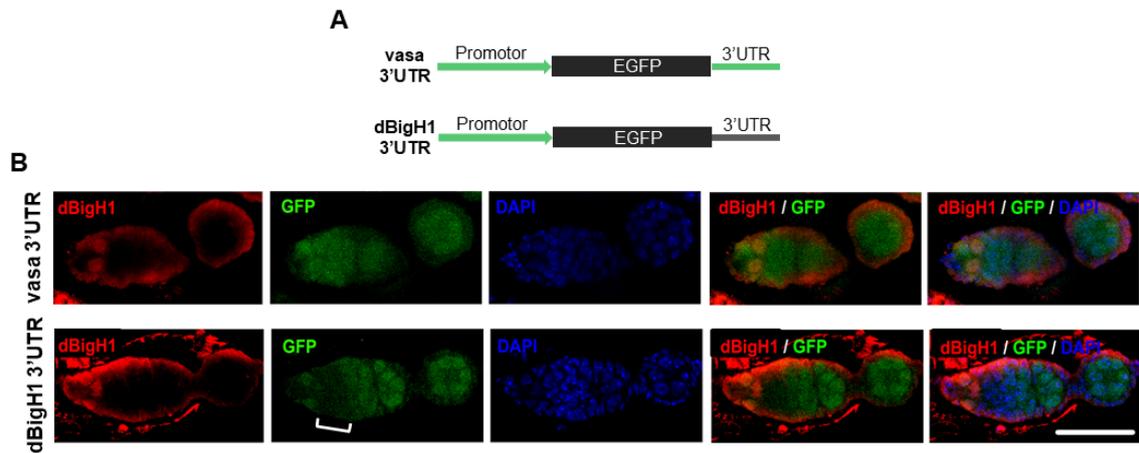
E  TTATGATTTATATGTTTTTTTTTCAGTACATGTGAAACTTTGTTTAAATAAAATTG
O  TTATGATTTATATGTTTTTTTTTCAGTACATGTGAAACTTTGTTTAAATAAAATTG
T  TTATGATTTATATGTTTTTTTTTCAGTACATGTGAAACTTTGTTTAAATAAAATTG
3'UTR TTATGATTTATATGTTTTTTTTTCAGTACATGTGAAACTTTGTTTAAATAAAATTG

E  ATACTTTTTTAGTTCCTAGCAAAA--AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
O  ATACTTTTTTAGTTCCTACCAAAA--AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA--
T  ATACTTTTTTAGTTCCTAGCAAAA--AAAAAANAAAAAAAAAAAAAAAA--
3'UTR ATACTTTTTTAGTTCCTAGCAATAATTAAATGACTTTTCTTTTAAAGT
      *▲

```

**Figura 49. Alineación de las secuencias obtenidas por 3'RACE.** Alineamiento de las secuencias 3'UTR obtenidas de cada tejido (E, embriones; O, ovarios; T, testículos) y el 3'UTR anotado (3'UTR). La flecha roja indica el final del 3'UTR. El asterisco indica diferencias en la secuencia. En las secuencias obtenidas de embriones, ovarios y testículos se puede observar parte de la cola de poli(A) al final de la secuencia.

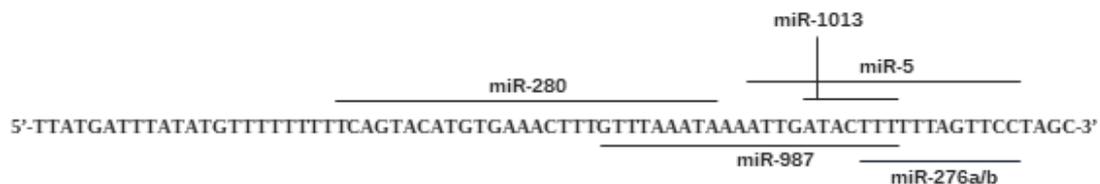
A continuación, se analizó la contribución del 3'UTR a la regulación de la expresión de *dBigH1*. Para ello se generaron dos líneas transgénicas que expresan el gen reportador EGFP bajo el control de diferentes secuencias reguladoras. En el primer caso, EGFP contiene las secuencias promotora y 3'UTR del gen *vasa*, que se expresa a lo largo de la línea germinal; mientras que la otra construcción contiene el promotor de *vasa* y el 3'UTR de *dBigH1* (**Figura 50A**). En las líneas transgénicas que contienen estas construcciones se estudió el patrón de expresión de EGFP. Las tinciones muestran que la construcción portadora del 3'UTR de *vasa* se expresa a lo largo de la línea germinal, mientras que en la construcción portadora del 3'UTR de *dBigH1*, la expresión de EGFP en los cistos se ve marcadamente reducida (**Figura 50B**). Esto indica que el 3'UTR juega un papel en la regulación de la expresión de *dBigH1* en el germario.



**Figura 50. La expresión de dBigH1 en los cistos está regulada a través del 3'UTR.** A) Esquema de las diferentes construcciones empleadas. B) Inmunodetección de dBigH1 (rojo) en las líneas transgénicas EGFP vasa3'UTR y dBigH13'UTR. La sustitución del 3'UTR de vasa por el de dBigH1 produce una disminución de la expresión del EGFP en la región de amplificación mitótica de los cistos. La barra de escala corresponde a 25 μm.

#### 4.2.2.2. Estudio del papel de diferentes RBP en la regulación de dBigH1

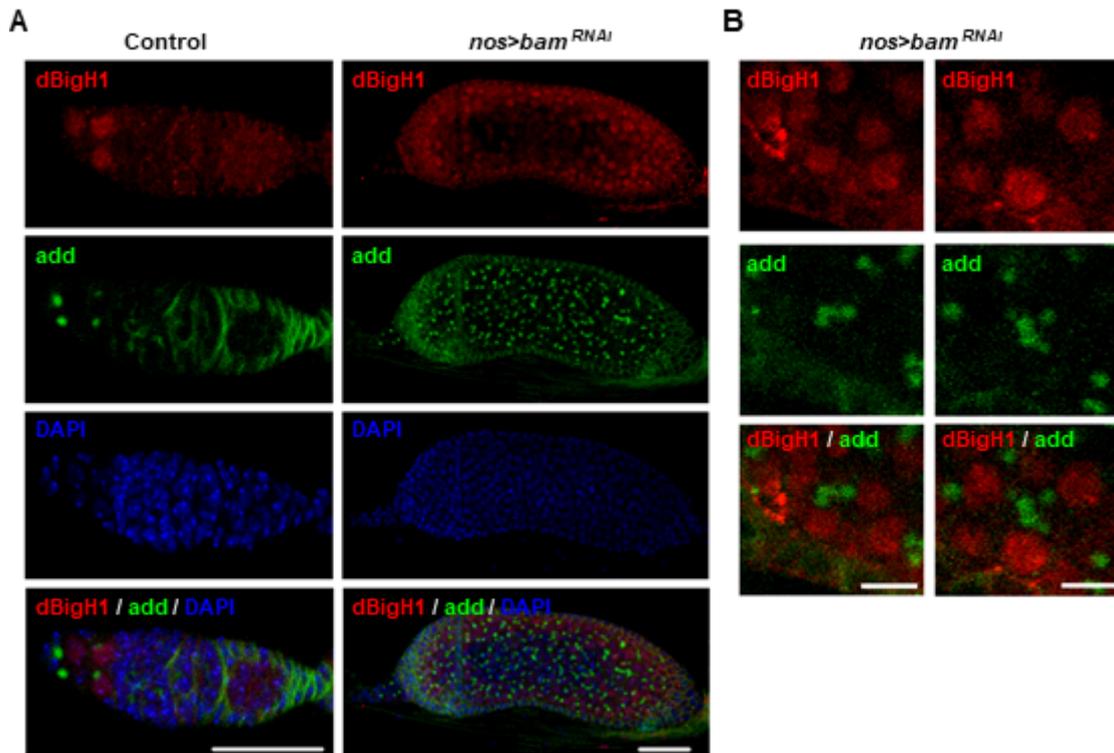
A continuación, nos planteamos la identificación de los factores que pueden regular la expresión de dBigH1 a través del 3'UTR. En primer lugar, y dado que la vía de los miRNAs también se encuentra activa en el germario (Jin and Xie, 2007; Park et al., 2007; Yang et al., 2007), analizamos la posibilidad de que la expresión de dBigH1 estuviera regulada por miRNAs. De hecho, análisis bioinformáticos mediante la herramienta miRanda (Betel et al., 2007; Enright et al., 2003) permitió identificar la presencia en el 3'UTR de secuencias diana putativas para varios miRNAs (**Figura 51**). Sin embargo, de acuerdo con la información disponible en la base de datos Flybase (Thurmond et al., 2019), ninguno de estos miRNAs se expresa en la línea germinal femenina.



**Figura 51. Dianas de miRNA en el 3'UTR de dBigH1.** Se indican las dianas para los diferentes miRNA encontradas mediante la herramienta miRanda.

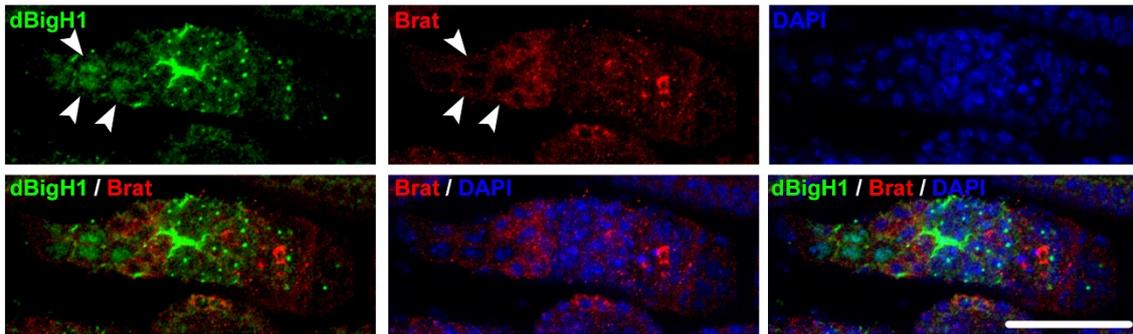
Por otra parte, en ovarios se conocen diferentes RBP implicadas en la regulación de la expresión de factores necesarios para el mantenimiento de las GSC y su diferenciación. Uno de estos factores es Bam, una proteína que regula negativamente la expresión de los mRNAs de factores de mantenimiento de las GSC. Puesto que la expresión de

dBigH1 decae en la región de expresión de Bam (**Figura 46B**) y en testículos regula negativamente la expresión de dBigH1 en espermatogonias (Carbonell et al., 2017), se analizó la posibilidad de que Bam también regulase la expresión de dBigH1 en ovarios. Para comprobarlo se realizaron experimentos de depleción de Bam. Para ello, se indujo la expresión de un RNA de interferencia (RNAi) contra Bam con el *driver nos-Gal4*, que se expresa específicamente en las células germinales (Van Doren et al., 1998). La depleción de Bam da lugar a ovarios tumorales debido a la acumulación de GSC y CB ya que la mayoría contienen espectrosoma (**Figura 52A**). Esto es similar a lo que ocurre con los mutantes genéticos (McKearin and Ohlstein, 1995). Estas células contienen dBigH1 (**Figura 52**). No obstante, la presencia de dBigH1 en estas células puede deberse a que son GSC y CB y no a una regulación postraduccional por parte de Bam puesto que la acumulación de GSC y CB es debida a que Bam se encarga de reprimir factores necesarios para el mantenimiento de las GSC (Li et al., 2013; Shen et al., 2009a), de modo que en ausencia de Bam las GSC y CB se acumulan y no se diferencian a cistos. Sin embargo, en los casos en los que se pueden observar células unidas mediante fusomas, estas células también contienen dBigH1 (**Figura 52B**). Esto también se observa en testículos, donde la depleción de Bam induce la expresión de dBigH1 en las espermatogonias, que normalmente no contienen dBigH1 (Carbonell et al., 2017). Así pues, Bam parece regular la expresión de dBigH1 en ovarios como en los testículos.



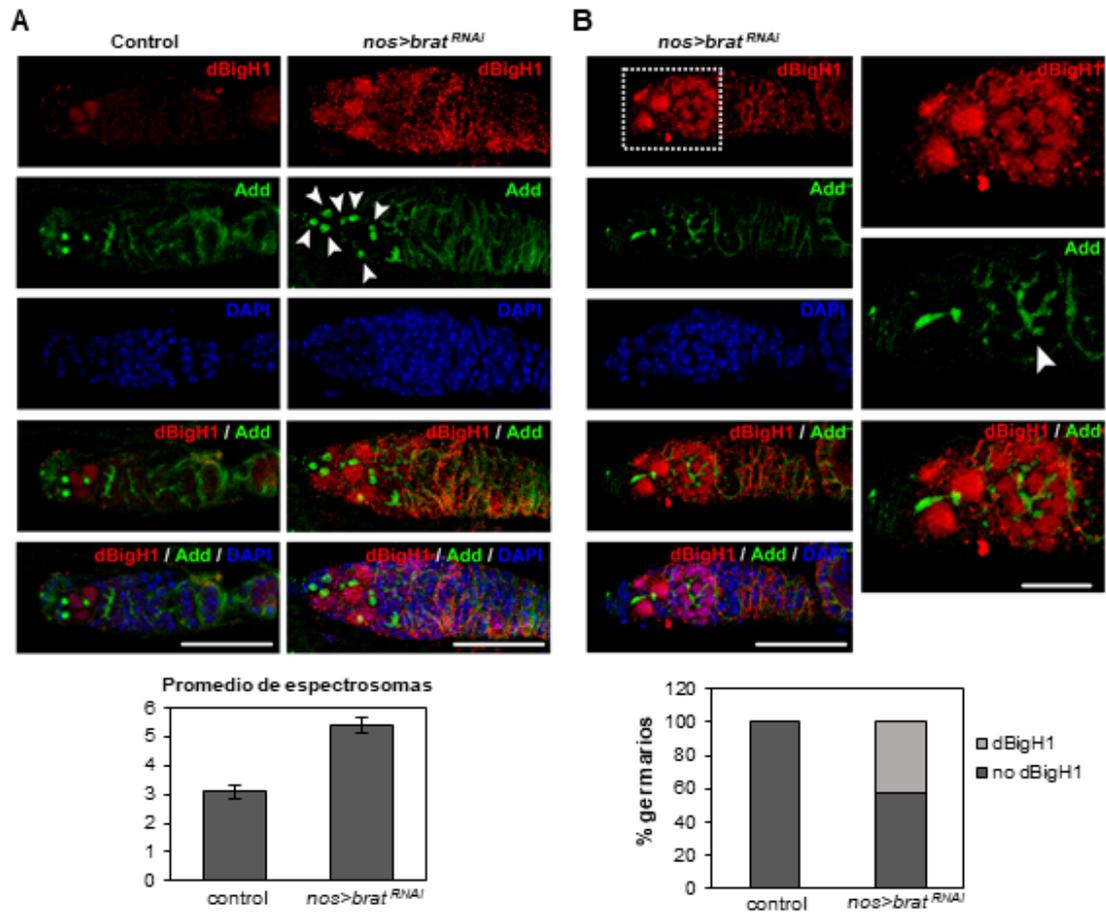
**Figura 52. La depleción de Bam produce ovarios tumorales.** Inmunohistoquímica de ovarios control *nos-gal4/+* y *knockdown nos>bam<sup>RNAi</sup>* de dBigH1 (rojo) y aducina (verde). El DNA se marcó con DAPI (azul). A) La reducción de los niveles de *bam* produce ovarios con hiperproliferación celular. La mayoría de las células parecen ser GSC ya que presentan un patrón punteado de aducina, solo se distinguen algunos casos de fusomas. La barra de escala equivale a 25  $\mu\text{m}$ . B) Células unidas por fusomas en las que se detecta dBigH1 en ovarios *nos>bam<sup>RNAi</sup>*. La barra de escala equivale a 5  $\mu\text{m}$ .

El segundo candidato que se estudió fue Brain tumor (Brat). El mRNA de Brat se expresa a lo largo de la línea germinal. Sin embargo, la expresión de la proteína se limita a las células de los cistos (**Figura 53**) (Harris et al., 2011), donde la expresión de BigH1 disminuye. Se ha visto que en estas células Brat forma un complejo con Pum y afecta a la traducción de diferentes componentes de la vía de señalización BMP (Harris et al., 2011; Newton et al., 2015). Además, durante la embriogénesis, Brat se une a una gran cantidad de mRNAs para regular su traducción durante la transición materno-zigótica, entre los cuales se encuentra el de dBigH1 (Laver et al., 2015). Por estos motivos, se consideró Brat como un posible candidato.

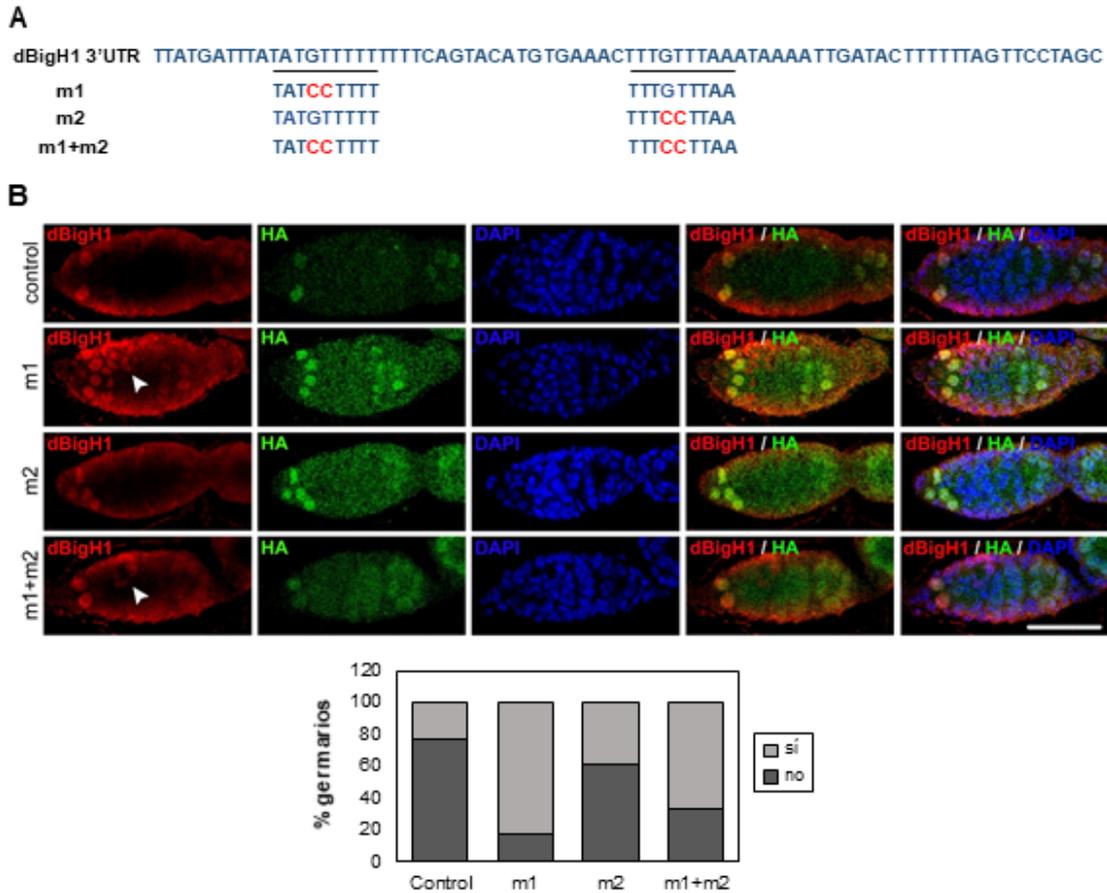


**Figura 53. Patrón de expresión de Brat en ovarios.** Inmunodetección en ovarios control para dBigH1 (verde) y Brat (rojo). El DNA se marcó con DAPI (azul). Las puntas de flecha indican las células que expresan dBigH1. La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m.

Para estudiar la posible contribución de Brat a la regulación de dBigH1, se analizó el efecto de la sobreexpresión de un RNAi contra *brat* con el *driver nos-Gal4*. La depleción de Brat, provoca un aumento en el número de espectrosomas (**Figura 54A**) que sugiere un incremento en el número de GSC/CB. Este resultado concuerda con el obtenido en mutantes genéticos de *brat* (Harris et al., 2011). Además de este fenotipo, también se observó que en aproximadamente un 42% de los germarios dBigH1 está presente en las células de los cistos, marcadas por el fusoma (**Figura 54B**), que normalmente no expresan dBigH1. Estos resultados sugieren que Brat está regulando negativamente la expresión de dBigH1 en los cistos. A este respecto, Laver et al. (2015) identificaron el motivo de unión de Brat a partir del análisis de los mRNAs embrionarios inmunoprecipitados con Brat. Con el fin de estudiar si el efecto observado es debido a una acción directa de Brat sobre el mRNA de *dBigH1* se analizó la secuencia 3'UTR del mensajero en busca de posibles motivos de unión de Brat. El 3'UTR de dBigH1 contiene dos posibles dianas de Brat (**Figura 55A**). Para poder estudiar el efecto de Brat se usó una construcción control en la que se introdujo mutaciones puntuales en las dos posiciones centrales de los motivos (GT>CC). Las construcciones incluyen el promotor, las secuencias 5'UTR y 3'UTR y la secuencia codificante fusionada con HA con el fin de poder distinguir las construcciones de la proteína endógena. Así pues, se generaron tres construcciones diferentes, además de la construcción control. En primer lugar, una construcción que contiene la primera diana mutada (m1), otra con la mutación de la segunda diana (m2) y, por último, una tercera que contiene las mutaciones de ambas (m1+m2) (**Figura 55A**). A partir de estas construcciones se generaron diferentes líneas transgénicas en las que se analizó el patrón de expresión de la proteína de fusión.



**Figura 54. La reducción de Brat produce un aumento en el número de GSC y la expresión de dBigH1 en los cistos.** Inmunohistoquímica en ovarios control (*nos-gal4/+*) y *knockdown* (KD) *nos>brat<sup>RNAi</sup>* para dBigH1 (rojo) y aducina (verde). El DNA se marcó con DAPI (azul). A) La depleción de *brat* produce un incremento en el número de espectrosomas (GSC y CB), indicados mediante las flechas. La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m. En la parte inferior se incluye la cuantificación del número promedio de espectrosomas por germario control (n=35) y KD (n=38). La diferencia es estadísticamente significativa (p-valor<0,0001; test t-Student de dos colas). B) En el KD, dBigH1 se expresa en las células diferenciadas, unidas mediante el fusoma (verde). A la derecha se muestra una ampliación del recuadro. La flecha señala la estructura del fusoma. La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m (izquierda) y a 10  $\mu$ m (derecha). En la parte inferior se muestra la cuantificación del porcentaje de germarios que contienen dBigH1 en células diferenciadas (gris claro) (n=38; p-valor<0,0001, test de Fisher).



**Figura 55. Construcciones mutantes para los dominios de unión de Brat.** A) Secuencia 3'UTR de *dBigH1*. Subrallados se encuentran los dos motivos de Brat identificados. Debajo, se indica las secuencias de los motivos de cada mutante, en rojo se indican los cambios introducidos. B) Inmunodetección de dBigH1 (rojo) y HA (verde) en ovarios de las diferentes líneas transgénicas. El DNA se marcó con DAPI (azul). Patrón de expresión de las diferentes construcciones (control, m1, m2 y m1+m2). Las puntas de flecha señalan células diferenciadas que expresan dBigH1. La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m. En la parte inferior se muestra la cuantificación del porcentaje de germarios en los que se detecta marcaje para dBigH1 (gris claro) frente a los que no (gris oscuro) en las diferentes líneas. Las diferencias solo son estadísticamente significativas entre la línea control y la línea m1 (p-valor<0,0001, test de Fisher; control, n=22; m1, n= 24; m2, n=18; m1+m2, n=21).

La construcción control, igual que la proteína endógena, se expresa en las GSC y CB, desaparece posteriormente y se recupera su expresión al final del germario, cuando se está formando la cámara ovárica (**Figura 55B**). En el caso de las construcciones mutantes también se observa este patrón y en ningún caso se detecta marcaje con  $\alpha$ HA en células que no son GSC o CB. No obstante, con el anticuerpo contra dBigH1 sí se observan casos en los que dBigH1 se expresa en células que, por su tamaño y posición, no son GSC o CB. Esto se observa con mayor frecuencia en el caso de las líneas m1 y m1+m2, aunque solo es estadísticamente significativo en el caso de la línea m1 (**Figura**

**55B).** En general, la inmunodetección con anticuerpos  $\alpha$ HA es más difícil que con anticuerpos  $\alpha$ dBigH1. Por lo tanto, podría ser que las construcciones con el motivo 1 mutado se expresasen en algunos de los cistos pero que no pudiesen detectarse de manera eficiente con los anticuerpos  $\alpha$ HA.

## **5.DISCUSIÓN**



## 5.1. Análisis de la función de dBigH1

### 5.1.1. dBigH1 se incorpora a la cromatina de manera uniforme y afecta a la unión de dH1 y la transcripción

Las células S2 de *Drosophila* no expresan dBigH1 por lo que constituyen un buen modelo para estudiar los efectos diferenciales que dBigH1 pueda tener sobre la transcripción con respecto a la variante somática dH1. En este trabajo se generó una línea estable que contiene una construcción para la expresión de dBigH1 bajo el control del promotor de la metalotioneína que es inducible mediante la adición de cobre en el medio de cultivo. Utilizando este sistema experimental se ha podido determinar que, igual a lo observado en embriones tempranos (Pérez-Montero et al., 2013), dBigH1 se incorpora a la cromatina de forma uniforme en las células S2 después de inducir su expresión.

La deposición de dBigH1 correlaciona con el contenido de dH1 antes de la inducción, indicando que dBigH1 tiende a incorporarse mejor en aquellos lugares donde había más dH1, lo cual sugiere que la deposición de dBigH1 se rige por los mismos mecanismos que la deposición de la variante somática dH1. Además, los experimentos de ChIP-qPCR indican que dBigH1 reemplaza dH1. El reemplazo de variantes somáticas por variantes embrionarias también se ha observado en experimentos de transferencia nuclear en ratones y vaca (Gao et al., 2004; Jullien et al., 2010; Jullien et al., 2014; Teranishi et al., 2004; Yun et al., 2012). En estos experimentos, la transferencia de núcleos procedente de células somáticas a oocitos va seguida del remplazamiento de las H1 por la variante embrionaria H1oo. El remplazamiento de dH1 por dBigH1 no parece estequiométrico ya que la disminución de dH1 (~50%) parece mayor que la cantidad de dBigH1 incorporada, la cual representa solo aproximadamente un 2% del total de histonas H1. Aunque no se ha podido calcular directamente la cantidad real de dBigH1 expresada, se puede inferir este resultado teniendo en cuenta que dBigH1 es unas 10 veces menos abundante en la cromatina que dBigH1<sup>ΔED</sup> y que esta forma representa el 23% de histona H1 total (ver apartado 3.2.5 de materiales y métodos). Es posible que dBigH1, debido a su dominio ED, altere la estructura de la cromatina y dificulte la deposición de dH1.

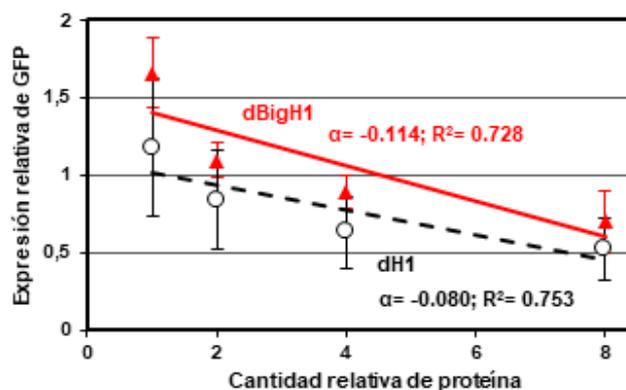
Los análisis realizados muestran que, a nivel de gen, la distribución de dBigH1 y dH1 son similares, aunque presentan algunas diferencias. En primer lugar, su contenido varía según el grado de expresión de los genes, siendo los menos expresados los que

tienen un mayor contenido. Además, los genes activos muestran una depleción alrededor del TSS. Esta disminución es especialmente acusada en el caso de la variante somática dH1, como ya se había descrito previamente para otras H1 somáticas (Braunschweig et al., 2009; Cao et al., 2013; Izzo et al., 2013; Li et al., 2012b; Mayor et al., 2015; Millán-Ariño et al., 2014; Nalabothula et al., 2014). La presencia de esta depleción probablemente refleja la existencia de una región libre de nucleosomas (NFR, del inglés *nucleosome-free region*), característica de los promotores de los genes activos y que facilita el acceso de los factores necesarios para la transcripción (revisado en Jiang and Pugh, 2009). En el caso de dBigH1, la depleción en el TSS es menos patente, por lo que su distribución a lo largo del gen es más homogénea. La presencia de dBigH1 en la región TSS puede ser un indicativo de que, cuando dBigH1 se une, la ocupación nucleosomal de la NFR es mayor, lo que estaría de acuerdo con la reducción de la expresión génica observada cuando se expresa dBigH1. Por otro lado, la expresión de dBigH1 afecta a la depleción de dH1 en el TSS, siendo ésta menos profunda que en las células no inducidas, lo cual también apuntaría hacia una mayor ocupación nucleosomal de la NFR.

El efecto principal de la expresión de dBigH1 sobre la expresión génica es de reducción, ya que aproximadamente un 68% de los genes diferencialmente expresados disminuyen su expresión. Esta disminución es a nivel transcripcional, ya que la unión de la RNA polimerasa II se ve afectada. Esto quiere decir que la sustitución de dH1 por dBigH1 dificulta la transcripción. De hecho, inicialmente se atribuyó a las histonas H1 una función de represión general de la transcripción (Schlissel and Brown, 1984; Shimamura et al., 1989; Ura et al., 1996). No obstante, diversos estudios han mostrado que, tanto en mamíferos como en *Drosophila*, las variantes somáticas se encuentran presentes en genes activos (Braunschweig et al., 2009; Cao et al., 2013; Izzo et al., 2013; Li et al., 2012b; Mayor et al., 2015; Millán-Ariño et al., 2014; Nalabothula et al., 2014) y, además, se ha demostrado que la histona H1 puede regular también positivamente la transcripción (Fan et al., 2005; Hellauer et al., 2001; Mayor et al., 2015; Sancho et al., 2008; Vujatovic et al., 2012).

Experimentos *in vitro* confirmaron que dBigH1 tiene un mayor efecto de represión de la transcripción que dH1. En estos experimentos se usó un plásmido con un gen reportero GFP. Este plásmido se incubó con un extracto embrionario de *Drosophila* que contiene todos los elementos necesarios para la reconstitución *in vitro* de la cromatina (Becker and Wu, 1992). Además, durante la reconstitución se añadió cantidades crecientes de dBigH1 o dH1 y posteriormente se analizó la expresión del gen GFP. Los resultados

muestran que ambas histonas reprimen la transcripción, pero la represión es mayor cuando se incorpora dBigH1 (**Figura 56**). Por otro lado, el incremento de la expresión observado en aproximadamente un 32% de los genes diferencialmente expresados no parece ocurrir a nivel transcripcional, ya que el contenido en RNA polimerasa II de los mismos no se ve afectado por la expresión de dBigH1.



**Figura 56.** Cambio en la expresión del gen reportero GFP en presencia de dBigH1 o dH1.

El gráfico muestra el cambio en la expresión relativa de GFP cuando se añade dH1 (negro) o dBigH1 (rojo) durante la reconstitución *in vitro* de la cromatina. Se indica el valor de la pendiente de la recta de regresión ( $\alpha$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Ambas histonas reprimen la transcripción, aunque los efectos de dBigH1 son mayores que los de dH1. Resultados obtenidos por M.Tatarski.

Hay que resaltar que, aunque la mayoría de los genes diferencialmente expresados disminuyen su expresión, la proporción total de genes que cambian significativamente su expresión al expresar dBigH1 es baja, de alrededor de un 5%. Esto puede ser debido a la baja expresión de dBigH1 respecto al total de histona H1 (~2%). A este respecto, observamos que los genes que disminuyen su expresión tienen un *pausing index* mayor que el resto de genes en las células control y que, además, tiende a disminuir con la expresión de dBigH1. Esto podría indicar que estos genes son más sensibles a la incorporación de dBigH1 que el resto por el tipo de regulación transcripcional a la que están sujetos.

## 5.1.2. Función de los dominios de dBigH1

### 5.1.2.1. El CTD es necesario para la unión a la cromatina

Diversos estudios han mostrado que el CTD de las histonas H1 está implicado en la unión de gran afinidad a cromatina y en la estabilización de estructuras secundarias de la cromatina (Allan et al., 1986; Caterino et al., 2011; Hendzel et al., 2004; Lu and Hansen, 2004). En dBigH1, el CTD parece estar también implicado en la unión a la

cromatina, puesto que cuando se elimina este dominio, la proteína no se puede detectar unida a cromosomas politénicos, a pesar de expresarse en las glándulas salivales. Estudios realizados en diferentes organismos muestran que las variantes embrionarias tienen una menor afinidad de unión al DNA. Concretamente, en mamíferos se ha descrito una mayor movilidad para la H1 $\alpha$  respecto a la histona somática H1c (Meshorer et al., 2006; Teranishi et al., 2004). En el caso de *Xenopus*, B4/H1M también es más móvil (Jullien et al., 2010). La menor afinidad de las variantes embrionarias es probablemente debida a una menor proporción de residuos cargados positivamente en el CTD (Nightingale et al., 1996; Ura et al., 1996). El CTD de dBigH1 tiene también una menor proporción de residuos cargados positivamente que la variante somática dH1, por lo que es posible que dBigH1 se una al DNA con una afinidad menor. Además, el dominio ácido ED situado en el extremo N-terminal de dBigH1 puede también afectar a la afinidad de su interacción con la cromatina.

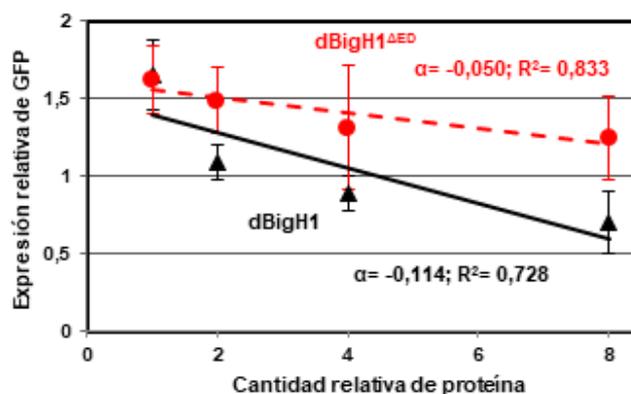
### **5.1.2.2. El dominio ED es el responsable del reemplazo de dH1 y de la represión de la transcripción**

En cuanto a la función del dominio NTD, diversos estudios parecen indicar que está implicado en el grado de afinidad con la que se une a la cromatina (Harshman et al., 2013; Öberg and Belikov, 2012). Los estudios realizados en este trabajo demuestran que el NTD, concretamente el dominio ED, es el responsable de los efectos de dBigH1 sobre el reemplazo de dH1, puesto que el grado de ocupación de dH1 disminuye mucho más con la expresión de dBigH1 que con las formas dBigH1 $\Delta$ ED o dBigH1 $\Delta$ NTD. El hecho de que no existan grandes diferencias entre los efectos de las dos formas truncadas indica que el efecto es principalmente debido a los residuos ácidos del dominio ED. Además, la mayor similitud de la construcción dBigH1 $\Delta$ ED con la histona dH1 hace que se comporte de un modo más parecido a dH1. De este modo, la característica depleción alrededor del TSS en los genes activos es más evidente cuando se elimina el dominio ED, lo cual sugiere que afecta menos la expresión génica que dBigH1 (ver más adelante).

Por otro lado, el contenido total de H1s en la cromatina aumenta con la incorporación de dBigH1 $\Delta$ ED puesto que la ocupación de dH1 no disminuye y, además, dBigH1 $\Delta$ ED se incorpora a la cromatina en mayor cantidad que dBigH1. De nuestros estudios se estima que el aumento es de alrededor de un 23%. No obstante, este aumento no parece traducirse en una menor tasa de transcripción, puesto que en diversos genes analizados no se observa una disminución de la expresión ni del contenido de RNA polimerasa II.

De hecho, el contenido de histona H1 puede variar entre distintos tipos celulares aumentando con la diferenciación (Fan et al., 2003; Fan et al., 2005; Woodcock et al., 2006; Zhang et al., 2012) y, aunque estos cambios van asociados a cambios en los programas concretos de expresión génica, la competencia transcripcional global no se ve significativamente afectada. Por otra parte, tanto en mamíferos como en *Drosophila*, la reducción del contenido de H1 solamente afecta de manera significativa la expresión de un número reducido de genes (Fan et al., 2005; Mayor et al., 2015; Sancho et al., 2008; Vujatovic et al., 2012).

El dominio ED es también necesario para la represión por parte de dBigH1, puesto que la represión observada tras la expresión de dBigH1 no se observa cuando se expresa la forma dBigH1<sup>ΔED</sup>. De hecho, el grado de ocupación de la RNA polimerasa II no se ve afectado en los genes cuya expresión disminuye cuando se expresa la forma dBigH1<sup>ΔED</sup>, a diferencia de lo que ocurre cuando se expresa dBigH1. En experimentos *in vitro* también se ha observado esta pérdida de la capacidad de represión de dBigH1 cuando se reconstituye cromatina en presencia de dBigH1<sup>ΔED</sup> (Figura 57). En conjunto, estos resultados sugieren que el dominio ED es el responsable de la represión transcripcional producida por dBigH1.



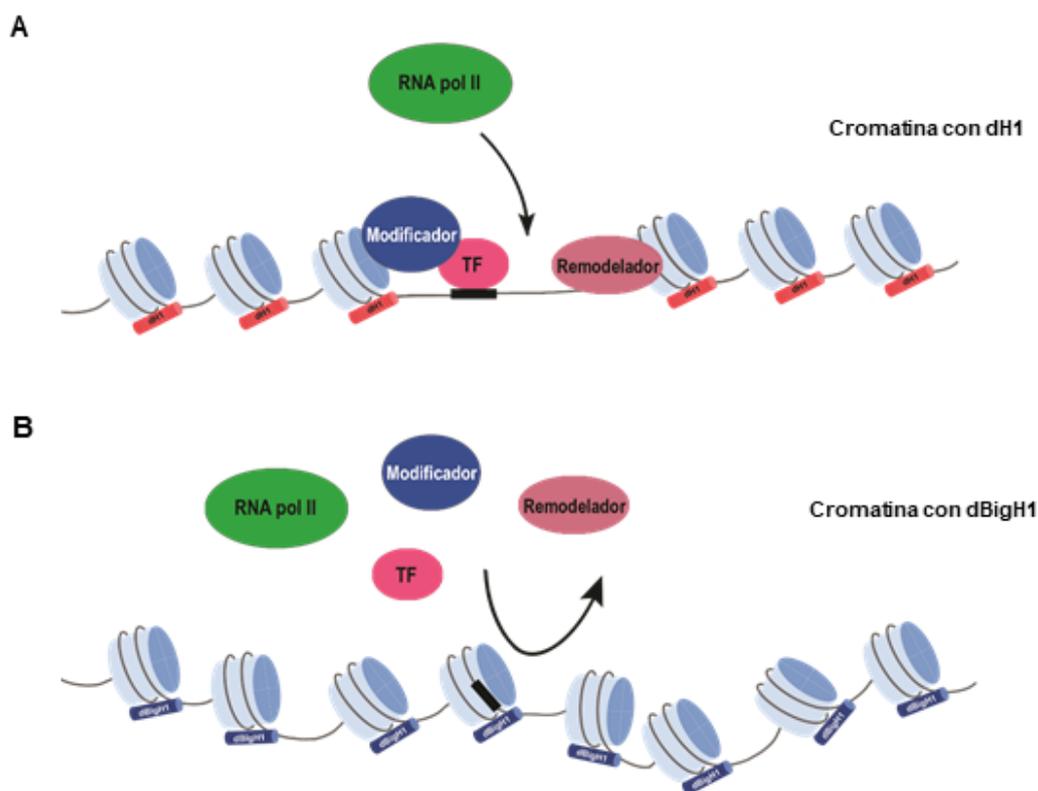
**Figura 57. Cambio en la expresión del gen reportero GFP en presencia de dBigH1 o dBigH1<sup>ΔED</sup>.** El gráfico muestra el cambio en la expresión relativa de GFP cuando se añade dBigH1 (negro) o dBigH1<sup>ΔED</sup> (rojo) durante la reconstitución *in vitro* de la cromatina. Se indica el valor de la pendiente de la recta de regresión ( $\alpha$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Los efectos de represión de dBigH1 son mayores que los de dBigH1<sup>ΔED</sup>. Resultados obtenidos por M.Tatarski.

### 5.1.3 dBigH1 modifica el estado epigenético de la cromatina activa

Las histonas pueden sufrir un gran número de modificaciones, entre ellas la acetilación de K. Se han descrito diferentes K que pueden estar acetiladas, algunas de ellas se encuentran en el dominio globular y su acetilación favorece la transcripción debido a la debilitación de las interacciones entre las histonas y el DNA, lo cual facilita a su vez la remodelación de la cromatina (Di Cerbo et al., 2014; Shogren-Knaak et al., 2006; Tropberger et al., 2013). Además, se han descrito diferentes K en las colas N-terminales de las histonas H3 (K9, K14, K18, K23, K27), H4 (K5, K8, K12, K16), H2A (K5) y H2B (K12, K15) que también pueden ser acetiladas (revisado en Kouzarides, 2007; Millar and Grunstein, 2006). Diversos estudios han mostrado que existe una correlación entre el grado de acetilación de K y la expresión génica. En concreto, los residuos K9 y K14 de la H3 se encuentran acetilados en las regiones promotoras (Bernstein et al., 2005; Kim et al., 2005; Liang et al., 2004; Pokholok et al., 2005; Roh et al., 2004; Schübeler et al., 2004; Yin et al., 2011). La acetilación de estos residuos está implicada en diferentes funciones como la remodelación de la cromatina (Kuo et al., 2000; Reinke and Hörz, 2003; Zhao et al., 2005) y formación del complejo de pre-iniciación mediante el reclutamiento del TFIID (Agalioti et al., 2002) o la transición a la elongación (Gates et al., 2017; Karam et al., 2010).

En este trabajo se ha analizado el efecto de la expresión de dBigH1 en la acetilación de la K9 y K14 de la H3 (H3Kac). Cuando se expresa dBigH1, los niveles de acetilación de estos residuos disminuyen significativamente en los promotores de genes que disminuyen su expresión, lo cual está en acuerdo con la disminución de la expresión observada en los mismos. Los niveles de H3Kac también tienen tendencia a disminuir en los promotores de los genes no diferencialmente expresados y los que aumentan la expresión, aunque, en estos casos, la disminución no es estadísticamente significativa. Esto sugiere que la disminución de H3Kac no implica necesariamente un cambio en la expresión génica. De hecho, la pérdida de H3K9ac no afecta por igual a la expresión de todos los genes (Gates et al., 2017), lo que podría explicar que la expresión solo disminuya en un grupo de genes. De un modo similar, la inactivación del complejo CBP/p300 tampoco afecta por igual a la expresión génica, siendo los genes con un mayor índice de polimerasa pausada cuya expresión disminuye más (Boija et al., 2017). Por el contrario, la forma dBigH1<sup>ΔED</sup> no afecta de manera significativa los niveles de H3Kac, lo que indica que el dominio ED está implicado en la disminución de los niveles de acetilación.

En general, las histonas son proteínas básicas ricas en residuos K, por lo que la presencia de este dominio ED resulta llamativo. De hecho, como ya se ha comentado, las variantes embrionarias de otras especies presentan una mayor proporción de residuos ácidos comparado con las variantes somáticas (revisado en Pérez-Montero et al., 2015) y se unen con menor afinidad al DNA (Jullien et al., 2010; Meshorer et al., 2006; Teranishi et al., 2004; Ura et al., 1996). En concreto, en presencia de la variante B4/H1M de *Xenopus*, la cromatina es más dinámica facilitando la remodelación (Saeki et al., 2005). En el caso de dBigH1, la presencia del dominio ED podría también alterar la estructura de la cromatina, dificultando el acceso a la cromatina y/o la actividad de factores de transcripción, remodeladores o modificadores de histonas. Como consecuencia, la unión de la RNA polimerasa II se vería afectada y, por tanto, la expresión génica se vería reducida (**Figura 58**).



**Figura 58. Posible modelo de acción de dBigH1.** A) La cromatina con la variante dH1 (en rojo) es más permisiva a la transcripción. Diferentes activadores, tales como factores de transcripción (TF), modificadores de histonas (Modificador) o remodeladores pueden unirse al DNA y facilitar el ensamblaje y avance de la maquinaria de transcripción. B) La cromatina que contiene dBigH1 (en azul) presenta una organización diferente debido al dominio ED. La presencia de dBigH1 evita la unión de los diferentes activadores y de la RNA polimerasa II.

## 5.2. Análisis del patrón de expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina y de su regulación

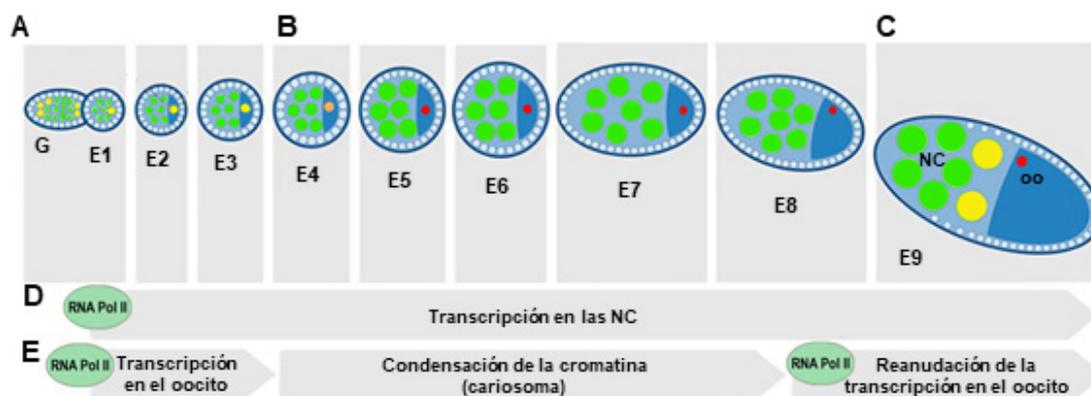
### 5.2.1. dBigH1 coexiste con la variante somática dH1 en diversos estadios del desarrollo de las células germinales femeninas

En general, las histonas H1 embrionarias se expresan también en el oocito (Hyeseong and Wolffe, 1994; Pérez-Montero et al., 2015; Smith et al., 1988; Tanaka et al., 2001). Como ya se ha comentado en la Introducción, en *Drosophila*, dBigH1 se expresa durante los estadios tempranos de la embriogénesis y también a lo largo del desarrollo de la línea germinal tanto masculina como femenina (Carbonell et al., 2017; Pérez-Montero et al., 2013). En la línea germinal masculina, dBigH1 se expresa en las GSC y los GB, no se detecta durante las divisiones mitóticas de las espermatogonias, se vuelve a detectar en los espermatoцитos y finalmente desaparece durante la diferenciación de las espermátidas (Carbonell et al., 2017). En este trabajo, se ha analizado el patrón de expresión de dBigH1 en la línea germinal femenina a lo largo de la oogénesis. Dicho patrón guarda similitudes con el previamente descrito a lo largo de la espermatogénesis. En concreto, dBigH1 se expresa en las GSC y los CB, desaparece en la región 2, correspondiente a las divisiones mitóticas de los cistos, y se recupera la expresión en la región 3, cuando los cistos comienzan a diferenciarse y dan lugar a las cámaras ováricas (**Figura 59A**). En las cámaras ováricas, dBigH1 se detecta especialmente en el oocito a lo largo de todos los estadios de desarrollo de las mismas (**Figura 59**). Así mismo, en estadios avanzados de desarrollo, se puede detectar dBigH1 también en las NC, especialmente en aquellas más cercanas al oocito (**Figura 59C**).

Al igual que sucede durante la espermatogénesis, la variante somática dH1 se detecta en las GSC femeninas, los CB y durante las divisiones mitóticas de los cistos (**Figura 59A**). En este sentido, se ha propuesto que dH1 es necesaria para el mantenimiento de las GSC, reprimiendo factores de diferenciación a través de la regulación de la acetilación de la H4K16 (Sun et al., 2015). En las cámaras ováricas, dH1 se detecta en las NC de todos los estadios del desarrollo (**Figura 59**). En el oocito, dH1 se detecta hasta el estadio 4 de desarrollo (**Figura 59B**), aunque a partir del estadio 3 los niveles empiezan a disminuir, cuando los cromosomas empiezan a condensarse y forman el cariosoma en el estadio 4 (King, 1970). Esta coincidencia temporal sugiere que la eliminación de dH1 es necesaria para la formación del cariosoma. Experimentos adicionales, como la expresión ectópica de dH1 a partir del estadio 3, son necesarios para confirmar esta hipótesis.

Durante la embriogénesis temprana, dBigH1 se expresa mientras el genoma zigótico está transcripcionalmente silenciado y se reemplaza por dH1 cuando se activa (Ner and Travers, 1994; Pérez-Montero et al., 2013; Tadros and Lipshitz, 2009). Por otra parte, durante la espermatogénesis, dBigH1 se expresa en células transcripcionalmente activas, como son las GSC, los GB y los espermatozoides (Carbonell et al., 2017; Olivieri and Olivieri, 1965; Vibranovski et al., 2009; Vibranovski et al., 2010; White-Cooper et al., 1998), aunque, en espermatozoides, existe una correlación negativa entre el contenido de dBigH1 y el grado de expresión de un gen (Carbonell et al., 2017; Vibranovski et al., 2009). Durante la oogénesis se observa una situación similar ya que células transcripcionalmente activas (GSC, CB y cámaras ováricas emergentes) contienen dBigH1. Así mismo, dBigH1 se detecta en algunas NC que también son activas transcripcionalmente (**Figura 59D**). De hecho, en todos estos casos, se ha detectado señal correspondiente a la forma elongante de la RNA polimerasa II (Ilo<sup>ser2</sup>).

Respecto al oocito, se sabe que es activo transcripcionalmente durante el desarrollo de las cámaras ováricas hasta el estadio 3, cuando se silencia para volver a activarse entre los estadios 9 y 11 (Mahowald and Tiefert, 1970; Navarro-Costa et al., 2016). De hecho, aunque con menor intensidad que en las NC, se detecta Ilo<sup>ser2</sup> en el oocito hasta el estadio 3, cuando prácticamente desaparece hasta el estadio 8 (**Figura 59E**). Esto difiere un poco de lo observado en estudios anteriores (Mahowald and Tiefert, 1970; Navarro-Costa et al., 2016), en los que por lo general se ha observado que la transcripción se retoma en el estadio 9. No obstante, en algunos casos se ha observado transcripción ya en el estadio 8 (Mahowald and Tiefert, 1970). En algunos casos se detecta Ilo<sup>ser2</sup> en estadios intermedios, pero, en estos casos, la señal no colocaliza con el cariosoma. En resumen, durante la oogénesis se da una situación similar a la observada en espermatogénesis detectándose dBigH1 en células transcripcionalmente activas. Podría darse una situación similar a la observada en espermatozoides, donde los genes con mayor contenido de dBigH1 están reprimidos (Carbonell et al., 2017). Es posible que en las células donde coexisten dBigH1 y dH1, las regiones en las que dH1 está presente sean competentes para la transcripción, mientras que las ricas en dBigH1 estén silenciadas. De esta manera, la combinación de dBigH1 y dH1 determinaría un programa de expresión específico durante la gametogénesis.



**Figura 59. Esquemización del patrón de expresión de dBigH1 y dH1 durante la ovogénesis y de la transcripción.** A-C) Patrón de expresión de dBigH1 y dH1. En verde se indica las células que expresan dH1, en rojo las que expresan dBigH1 y en amarillo/naranja las que expresan ambas variantes. G: germario; E1-E9: estadios 1 al 9; NC: nurse cell; oo: oocito. D) Actividad transcripcional en las NC según la presencia de la forma elongante de la RNA polimerasa II ( $Ilo^{ser2}$ ). E) Periodos en los que el oocito es activo transcripcionalmente de acuerdo a la presencia de  $Ilo^{ser2}$ . Imagen modificada de Navarro-Costa et al., 2016.

### 5.2.2. La expresión de dBigH1 se regula postranscripcionalmente en los cistos a través de señales contenidas en el 3'UTR

El mantenimiento de las GSC y la diferenciación de las células hijas son procesos altamente controlados en los que la regulación postranscripcional juega un papel importante. Existen diferentes complejos que regulan la traducción de los factores implicados en el mantenimiento de las GSC y la diferenciación de la línea germinal como son los complejos Nos/Pum, Brat/Pum, Bam/Bgcn/Sxl/Mei-P26 en ovarios (Harris et al., 2011; Lavoie et al., 1999; Li et al., 2012a; Li et al., 2013; Newton et al., 2015; Shen et al., 2009b) o Bam/Bgcn en testículos (Insko et al., 2009; Insko et al., 2012; McKearin and Ohlstein, 1995; McKearin and Spradling, 1990). Además, la maquinaria de miRNA también participa en la regulación del mantenimiento de las GSC (Eun et al., 2012; Jin and Xie, 2007; Park et al., 2007; Pek et al., 2009; Yang et al., 2007). En el caso de dBigH1, su expresión en testículos está regulada postranscripcionalmente durante las divisiones mitóticas por Bam (Carbonell et al., 2017).

En cuanto a la posible regulación postraduccional de dBigH1 en la ovogénesis, analizamos en primer lugar la posible existencia de eventos APA, ya que, mientras en la línea germinal masculina hay una preferencia por el uso de señales de poliadeniación y corte próximas, en ovarios suelen existir isoformas con 3'UTR intermedios (Smibert et al., 2012; Zhang et al., 2005). En el caso concreto de dBigH1, se ha visto que no existen

diferentes isoformas que se expresen en los diferentes tejidos analizados: ovarios, testículos y embriones. Nuestros resultados sugieren que, en ovarios, la expresión de dBigH1 se regula postranscripcionalmente en los cistos a través de elementos localizados en su 3'UTR, puesto que este elemento es capaz de silenciar la expresión de una construcción reportera *vasa-EGFP* específicamente durante las divisiones mitóticas de los cistos.

Uno de los reguladores postranscripcionales que regulan la oogénesis es Brat. En los cistos, Brat forma un complejo con Pum que reprime la traducción de diferentes factores de mantenimiento de las GSC (Harris et al., 2011; Newton et al., 2015). La represión se produce gracias al reclutamiento del complejo CCR4-NOT que acorta las colas de poli(A) de los mRNA diana del complejo Brat/Pum, entre estos mRNA se encuentran los miembros de la vía de señalización de BMP Mad, Med y Shn (Newton et al., 2015). A este respecto, nuestros resultados muestran que la depleción de Brat aumenta la expresión de dBigH1 en los cistos. Esto sugiere que Brat regula negativamente la traducción del mRNA de dBigH1. De hecho, el 3'UTR de dBigH1 contiene dos posibles dianas de Brat. Además, Brat interacciona con el mRNA de dBigH1 en embriones y lo regula negativamente durante la transición materno-zigótica (Laver et al., 2015). Los estudios que se han realizado de los mutantes de los motivos de unión de Brat no son concluyentes, ya que, si bien se observa un incremento en la señal de dBigH1 total en los cistos cuando se muta uno de ellos, no se pudo detectar específicamente un efecto sobre la expresión de la forma mutada. Como se ha indicado anteriormente (ver apartado 4.2.2.2), esto se puede deber a problemas metodológicos, pero también puede ser debido a que el efecto de Brat sea indirecto o que las mutaciones introducidas no sean suficientemente fuertes para evitar por completo su unión. De hecho, se ha visto que el intercambio de la G por una A en la secuencia consenso de unión de Brat disminuye, aunque no elimina por completo, la unión de Brat (Loedige et al., 2015).

Por otro lado, la traducción de Brat está regulada indirectamente por Bam. En las GSC, el mRNA de *brat* se expresa, pero el complejo Nos/Pum evitan su traducción (Harris et al., 2011). No obstante, cuando la GSC se divide, el CB resultante expresa Bam que forma un complejo con Bgcn, Sxl y Mei-P26 e inhiben la traducción de Nos (Li et al., 2013). De este modo, Brat se acumula en los cistos y puede formar el complejo con Pum para reprimir la expresión de diferentes factores de renovación. Esto sugiere que, si Brat regula negativamente la expresión de dBigH1, Bam también lo debería hacer. De hecho, en testículos, donde Brat no se expresa de acuerdo con la información disponible en Flybase, Bam regula la expresión de dBigH1 durante las divisiones mitóticas (Carbonell

## DISCUSIÓN

---

et al., 2017). Del mismo modo, en los ovarios tumorales resultantes de la depleción de Bam, se puede detectar dBigH1 en algunos cistos, marcados por la presencia de fusoma, a diferencia de lo que ocurre en ovarios normales, lo cual sugiere que, en efecto, Bam también regula la expresión de dBigH1 en ovarios.

## **6.CONCLUSIONES**



1. dBigH1 se distribuye de forma uniforme en la cromatina y reemplaza la forma somática dH1 cuando se expresa ectópicamente en células S2.
2. La expresión ectópica de dBigH1 en células S2 regula negativamente la transcripción.
3. dBigH1 interfiere con la unión de la RNA polimerasa II y la acetilación de las histonas.
4. El CTD de dBigH1 es necesario para su unión a la cromatina.
5. El dominio ácido ED situado en el NTD de dBigH1 es responsable del reemplazo de dH1, la represión de la transcripción y los efectos sobre la unión de la RNA polimerasa II y la acetilación de las histonas.
6. En ovarios, dBigH1 se expresa en las GSC y CB, desaparece de la región de divisiones mitóticas correspondiente a los cistos para volver a expresarse en las cámaras ováricas. En las cámaras ováricas menos desarrolladas, dBigH1 se detecta en todas las células y, a medida que progresa el desarrollo, su expresión queda restringida al oocito. En estadios de desarrollo avanzados, también se detecta dBigH1 en las NC próximas al oocito.
7. La variante somática dH1 se detecta en las células germinales femeninas coexistiendo con dBigH1, aunque, cuando el genoma está totalmente silenciado a partir del estadio 5, no se detecta en el oocito donde se acumula dBigH1.
8. La forma elongante de la RNA polimerasa II se detecta en células que contienen dBigH1, como las GSC y los oocitos de las cámaras ováricas tempranas. En estadios posteriores, la acumulación de dBigH1 en el oocito va acompañada del silenciamiento transcripcional, aunque en los estadios 8-11 se reactiva la transcripción en el oocito.

## CONCLUSIONES

---

9. Durante las divisiones mitóticas de los cistos, la expresión de dBigH1 se regula negativamente a nivel postranscripcional mediante señales contenidas en la región 3'UTR del mRNA de dBigH1.
10. Brat regula negativamente la expresión de dBigH1 probablemente de manera directa a través de su unión al 3'UTR del mRNA de dBigH1.

## **7.BIBLIOGRAFÍA**



**Ables, E. T.** (2015). *Drosophila* Oocytes as a Model for Understanding Meiosis: An Educational Primer to Accompany “Corolla Is a Novel Protein That Contributes to the Architecture of the Synaptonemal Complex of *Drosophila*.” *Genetics* **199**, 17–23.

**Agalioti, T., Chen, G. and Thanos, D.** (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* **111**, 381–392.

**Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P.** (2002). *Molecular biology of the cell*. Garland Science.

**Allan, J., Mitchell, T., Harborne, N., Bohm, L. and Crane-Robinson, C.** (1986). Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location. *J. Mol. Biol.* **187**, 591–601.

**Bannister, A. J. and Kouzarides, T.** (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381–395.

**Bannister, A. J., Schneider, R., Myers, F. A., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C. and Kouzarides, T.** (2005). Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *J. Biol. Chem.* **280**, 17732–17736.

**Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K.** (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823–37.

**Bayona-Feliu, A., Casas-Lamesa, A., Reina, O., Bernués, J. and Azorín, F.** (2017). Linker histone H1 prevents R-loop accumulation and genome instability in heterochromatin. *Nat. Commun.* **8**,.

**Becker, P. B. and Wu, C.** (1992). Cell-free system for assembly of transcriptionally repressed chromatin from *Drosophila* embryos. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2241–9.

**Bednar, J., Hamiche, A. and Dimitrov, S.** (2016). H1-nucleosome interactions and their functional implications. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1859**, 436–443.

**Bell, O., Wirbelauer, C., Hild, M., Scharf, A. N. D., Schwaiger, M., MacAlpine, D. M., Zilbermann, F., van Leeuwen, F., Bell, S. P., Imhof, A., et al.** (2007). Localized H3K36

methylation states define histone H4K16 acetylation during transcriptional elongation in *Drosophila*. *EMBO J.* **26**, 4974–84.

**Bernstein, B. E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Huebert, D. J., McMahon, S., Karlsson, E. K., Kulbokas, E. J., Gingeras, T. R., et al.** (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**, 169–181.

**Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S. and Sander, C.** (2007). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.* **36**, D149–D153.

**Bharath, M. M. S., Chandra, N. R. and Rao, M. R. S.** (2002). Prediction of an HMG-box fold in the C-terminal domain of histone H1: Insights into its role in DNA condensation. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **49**, 71–81.

**Boija, A., Mahat, D. B., Zare, A., Holmqvist, P. H., Philip, P., Meyers, D. J., Cole, P. A., Lis, J. T., Stenberg, P. and Mannervik, M.** (2017). CBP Regulates Recruitment and Release of Promoter-Proximal RNA Polymerase II. *Mol. Cell.*

**Braunschweig, U., Hogan, G. J., Pagie, L. and van Steensel, B.** (2009). Histone H1 binding is inhibited by histone variant H3.3. *EMBO J.* **28**, 3635–45.

**Brown, D. T., Izard, T. and Misteli, T.** (2006). Mapping the interaction surface of linker histone H10 with the nucleosome of native chromatin in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 250–255.

**Buratowski, S.** (2009). Progression through the RNA Polymerase II CTD Cycle. *Mol. Cell* **36**, 541–546.

**Burgio, G., La Rocca, G., Sala, A., Arancio, W., Di Gesù, D., Collesano, M., Sperling, A. S., Armstrong, J. A., van Heeringen, S. J., Logie, C., et al.** (2008). Genetic Identification of a Network of Factors that Functionally Interact with the Nucleosome Remodeling ATPase ISWI. *PLoS Genet.* **4**, e1000089.

**Bushati, N. and Cohen, S. M.** (2007). microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 175–205.

**Cao, K., Lailier, N., Zhang, Y., Kumar, A., Uppal, K., Liu, Z., Lee, E. K., Wu, H., Medrzycki, M., Pan, C., et al.** (2013). High-Resolution Mapping of H1 Linker Histone Variants in Embryonic Stem Cells. *PLoS Genet.* **9**, e1003417.

**Carbonell, A., Pérez-Montero, S., Climent-Cantó, P., Reina, O. and Azorín, F.** (2017). The Germline Linker Histone dBigH1 and the Translational Regulator Bam Form a Repressor Loop Essential for Male Germ Stem Cell Differentiation. *Cell Rep.* **21**, 3178–3189.

**Caterino, T. L., Fang, H. and Hayes, J. J.** (2011). Nucleosome linker DNA contacts and induces specific folding of the intrinsically disordered H1 carboxyl-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2341–8.

**Chen, D. and McKearin, D. M.** (2003). A discrete transcriptional silencer in the bam gene determines asymmetric division of the Drosophila germline stem cell. *Development* **130**, 1159–70.

**Chen, C.-Y. A., Chen, T.-M. and Shyu, A.-B.** (1994). Interplay of Two Functionally and Structurally Distinct Domains of the c-fos AU-Rich Element Specifies Its mRNA-Destabilizing Function. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 416–426.

**Chiba, K., Yamamoto, J., Yamaguchi, Y. and Handa, H.** (2010). Promoter-proximal pausing and its release: Molecular mechanisms and physiological functions. *Exp. Cell Res.*

**Churchill, M. E. and Suzuki, M.** (1989). “SPKK” motifs prefer to bind to DNA at A/T-rich sites. *EMBO J.* **8**, 4189–95.

**Clapier, C. R. and Cairns, B. R.** (2009). The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 273–304.

**Cooper, G. M.** (2000). Eukaryotic RNA Polymerases and General Transcription Factors. In *The Cell: A Molecular Approach.*, p. Sinauer Associates.

**Cutter, A. R. and Hayes, J. J.** (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett.* 1–9.

**Dansereau, D. A. and Lasko, P.** (2008). *The development of germline stem cells in Drosophila*.

**Daujat, S., Zeissler, U., Waldmann, T., Happel, N. and Schneider, R.** (2005). HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. *J. Biol. Chem.* **280**, 38090–5.

**de Cuevas, M., Lee, J. K. and Spradling, A. C.** (1996). alpha-spectrin is required for germline cell division and differentiation in the Drosophila ovary. *Development* **122**, 3959–3968.

**Decotto, E. and Spradling, A. C.** (2005). The Drosophila ovarian and testis stem cell niches: Similar somatic stem cells and signals. *Dev. Cell* **9**, 501–510.

**Dej, K. J. and Spradling, A. C.** (1999). The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during Drosophila oogenesis. *Development* **126**, 293–303.

**Deng, W. and Lin, H.** (1997). Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in Drosophila. *Dev. Biol.* **189**, 79–94.

**Di Cerbo, V., Mohn, F., Ryan, D. P., Montellier, E., Kacem, S., Tropberger, P., Kallis, E., Holzner, M., Hoerner, L., Feldmann, A., et al.** (2014). Acetylation of histone H3 at lysine 64 regulates nucleosome dynamics and facilitates transcription. *Elife* **3**,.

**Di Nocera, P. P. and Dawid, I. B.** (1983). Transient expression of genes introduced into cultured cells of Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 7095–8.

**Downs, J. A., Kosmidou, E., Morgan, A. and Jackson, S. P.** (2003). Suppression of homologous recombination by the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone. *Mol. Cell* **11**, 1685–1692.

**Drabent, B., Kardalidou, E. and Doenecke, D.** (1991). Structure and expression of the human gene encoding testicular H1 histone (H1t). *Gene* **103**, 263–268.

**Drabent, B., Bode, C. and Doenecke, D.** (1993). Structure and expression of the mouse testicular H1 histone gene (H1t). *BBA - Gene Struct. Expr.* **1216**, 311–313.

**Duffy, J. B.** (2002). GAL4 System in *Drosophila*: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife. *Genesis* **34**, 1–15.

**Elkon, R., Ugalde, A. P. and Agami, R.** (2013). Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat. Rev. Genet.* 496–506.

**Enright, A. J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C. and Marks, D. S.** (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* **5**, R1.

**Eun, S. H., Stoiber, P. M., Wright, H. J., McMurdie, K. E., Choi, C. H., Gan, Q., Lim, C. and Chen, X.** (2012). MicroRNAs downregulate Bag of marbles to ensure proper terminal differentiation in the *Drosophila* male germline. *Development* **140**, 23–30.

**Fan, Y., Sirotkin, A., Russell, R. G., Ayala, J. and Skoultchi, A. I.** (2001). Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H1(0) replacement subtype. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7933–43.

**Fan, Y., Nikitina, T., Morin-Kensicki, E. M., Zhao, J., Magnuson, T. R., Woodcock, C. L. and Skoultchi, A. I.** (2003). H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4559–4572.

**Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T. J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E. E., Stein, A., Woodcock, C. L. and Skoultchi, A. I.** (2005). Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* **123**, 1199–212.

**Felsenfeld, G. and Groudine, M.** (2003). Controlling the double helix. *Nature* **421**, 448–453.

**Ferreira, H., Flaus, A. and Owen-Hughes, T.** (2007). Histone Modifications Influence the Action of Snf2 Family Remodelling Enzymes by Different Mechanisms. *J. Mol. Biol.* **374**, 563–579.

**Font-Burgada, J., Reina, O., Rossell, D. and Azorín, F.** (2014). chroGPS, a global chromatin positioning system for the functional analysis and visualization of the epigenome. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2126–2137.

**Fox, C. A., Sheets, M. D. and Wickens, M. P.** (1989). Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: Distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUAU. *Genes Dev.* **3**, 2151–2162.

**Fujisawa, T. and Filippakopoulos, P.** (2017). Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 246–262.

**Gao, S., Chung, Y. G., Parseghian, M. H., King, G. J., Adashi, E. Y. and Latham, K. E.** (2004). Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Dev. Biol.* **266**, 62–75.

**Gates, L. A., Shi, J., Rohira, A. D., Feng, Q., Zhu, B., Bedford, M. T., Sagum, C. A., Jung, S. Y., Qin, J., Tsai, M.-J., et al.** (2017). Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *J. Biol. Chem.* **292**, 14456–14472.

**Goytisolo, F. A., Gerchman, S. E., Yu, X., Rees, C., Graziano, V., Ramakrishnan, V. and Thomas, J. O.** (1996). Identification of two DNA-binding sites on the globular domain of histone H5. *EMBO J.* **15**, 3421–9.

**Hake, L. E. and Richter, J. D.** (1994). CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* **79**, 617–27.

**Hamaratoglu, F., Affolter, M. and Pyrowolakis, G.** (2014). Dpp/BMP signaling in flies: From molecules to biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **32**, 128–136.

**Hansen, J. C.** (2002). Conformational Dynamics of the Chromatin Fiber in Solution: Determinants, Mechanisms, and Functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 361–392.

**Hansen, J. C., Lu, X., Ross, E. D. and Woody, R. W.** (2006). Intrinsic protein disorder, amino acid composition, and histone terminal domains. *J. Biol. Chem.* **281**, 1853–1856.

**Harris, R. E., Pargett, M., Sutcliffe, C., Umulis, D. and Ashe, H. L.** (2011). Brat Promotes Stem Cell Differentiation via Control of a Bistable Switch that Restricts BMP Signaling. *Dev. Cell* **20**, 72–83.

- Harshman, S. W., Young, N. L., Parthun, M. R. and Freitas, M. A.** (2013). H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Res.* **41**, 9593–9609.
- Hashimoto, H., Sonoda, E., Takami, Y., Kimura, H., Nakayama, T., Tachibana, M., Takeda, S. and Shinkai, Y.** (2007). Histone H1 variant, H1R is involved in DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*.
- Hellauer, K., Sirard, E. and Turcotte, B.** (2001). Decreased expression of specific genes in yeast cells lacking histone H1. *J. Biol. Chem.* **276**, 13587–13592.
- Henzel, M. J., Lever, M. a., Crawford, E. and Th'Ng, J. P. H.** (2004). The C-terminal Domain Is the Primary Determinant of Histone H1 Binding to Chromatin in Vivo. *J. Biol. Chem.* **279**, 20028–20034.
- Hong, A., Lee-Kong, S., Iida, T., Sugimura, I. and Lilly, M. A.** (2003). The p27<sup>cip/kip</sup> ortholog dacapo maintains the Drosophila oocyte in prophase of meiosis I. *Development* **130**, 1235–1242.
- Huynh, J.-R. and St Johnston, D.** (2004). The Origin of Asymmetry: Early Polarisation of the Drosophila Germline Cyst and Oocyte. *Curr. Biol.* **14**, R438–R449.
- Hyeseong, C. and Wolffe, A. P.** (1994). Xenopus laevis B4, an intron-containing oocyte-specific linker histone-encoding gene. *Gene* **143**, 233–238.
- Inaba, M., Yuan, H., Salzmann, V., Fuller, M. T. and Yamashita, Y. M.** (2010). E-Cadherin is required for centrosome and spindle orientation in Drosophila male germline stem cells. *PLoS One* **5**,.
- Insko, M. L., Leon, A., Ho Tam, C., Mckearin, D. M. and Fuller, M. T.** (2009). Accumulation of a differentiation regulator specifies transit amplifying division number in an adult stem cell lineage. *PNAS* **106**, 22311–22316.
- Insko, M. L., Bailey, A. S., Kim, J., Olivares, G. H., Wapinski, O. L., Tam, C. H. and Fuller, M. T.** (2012). A Self-Limiting Switch Based on Translational Control Regulates the Transition from Proliferation to Differentiation in an Adult Stem Cell Lineage. *Cell Stem Cell* **11**, 689–700.

**Izzo, A., Kamieniarz, K. and Schneider, R.** (2008). The histone H1 family: Specific members, specific functions? *Biol. Chem.*

**Izzo, A., Kamieniarz-Gdula, K., Ramírez, F., Noureen, N., Kind, J., Manke, T., van Steensel, B. and Schneider, R.** (2013). The genomic landscape of the somatic linker histone subtypes H1.1 to H1.5 in human cells. *Cell Rep.* **3**, 2142–2154.

**Ji, Z. and Tian, B.** (2009). Reprogramming of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation in generation of pluripotent stem cells from different cell types. *PLoS One* **4**, e8419.

**Ji, Z., Lee, J. Y., Pan, Z., Jiang, B. and Tian, B.** (2009). Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

**Jiang, C. and Pugh, B. F.** (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: Advances through genomics. *Nat. Rev. Genet.*

**Jin, Z. and Xie, T.** (2007). Dcr-1 Maintains Drosophila Ovarian Stem Cells. *Curr. Biol.* **17**, 539–544.

**Joly, W., Chartier, A., Rojas-Rios, P., Busseau, I. and Simonelig, M.** (2013). The CCR4 Deadenylation Acts with Nanos and Pumilio in the Fine-Tuning of Mei-P26 Expression to Promote Germline Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports* **1**, 411–424.

**Jullien, J., Astrand, C., Halley-Stott, R. P., Garrett, N. and Gurdon, J. B.** (2010). Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 5483–5488.

**Jullien, J., Miyamoto, K., Pasque, V., Allen, G. E., Bradshaw, C. R., Garrett, N. J., Halley-Stott, R. P., Kimura, H., Ohsumi, K. and Gurdon, J. B.** (2014). Hierarchical molecular events driven by oocyte-specific factors lead to rapid and extensive reprogramming. *Mol. Cell* **55**, 524–536.

**Juven-Gershon, T. and Kadonaga, J. T.** (2010). Regulation of gene expression via the

core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev. Biol.*

**Karam, C. S., Kellner, W. A., Takenaka, N., Clemmons, A. W. and Corces, V. G.** (2010). 14-3-3 Mediates Histone Cross-Talk during Transcription Elongation in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **6**, e1000975.

**Kawase, E., Wong, M. D., Ding, B. C. and Xie, T.** (2004). Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing bam transcription in the *Drosophila* testis. *Development* **131**, 1365–1375.

**Khadake, J. R. and Rao, M. R.** (1995). DNA- and chromatin-condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec; H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry* **34**, 15792–15801.

**Khadake, J. R. and Rao, M. R. S.** (1997). Condensation of DNA and Chromatin by an SPKK-Containing Octapeptide Repeat Motif Present in the C-Terminus of Histone H1. *Biochemistry* **36**, 1041–1051.

**Kim, T. H., Barrera, L. O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M. A., Richmond, T. A., Wu, Y., Green, R. D. and Ren, B.** (2005). A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* **436**, 876–880.

**King, R. C.** (1970). The Meiotic Behavior of the *Drosophila* Oocyte. *Int. Rev. Cytol.* **28**, 125–168.

**Kizer, K. O., Phatnani, H. P., Shibata, Y., Hall, H., Greenleaf, A. L. and Strahl, B. D.** (2005). A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3305–3316.

**Koch, E. A., Smith, P. A. and King, R. C.** (1967). The division and differentiation of *Drosophila* cystocytes. *J. Morphol.* **121**, 55–70.

**Kouzarides, T.** (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705.

**Kuo, M. H., vom Baur, E., Struhl, K. and Allis, C. D.** (2000). Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription. *Mol. Cell* **6**, 1309–1320.

**Lasko, P. F. and Ashburner, M.** (1988). The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature*.

**Lasko, P. F. and Ashburner, M.** (1990). Posterior localization of *vasa* protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev*.

**Laver, J. D., Li, X., Ray, D., Cook, K. B., Hahn, N. A., Nabeel-Shah, S., Kekis, M., Luo, H., Marsolais, A. J., Fung, K. Y., et al.** (2015). Brain tumor is a sequence-specific RNA-binding protein that directs maternal mRNA clearance during the *Drosophila* maternal-to-zygotic transition. *Genome Biol.* **16**,.

**Lavoie, C. ., Ohlstein, B. and McKearin, D. .** (1999). Localization and Function of Bam Protein Require the benign gonial cell neoplasm Gene Product. *Dev. Biol.* **212**, 405–413.

**Li, L. and Xie, T.** (2005). STEM CELL NICHE: Structure and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 605–631.

**Li, M. A., Alls, J. D., Avancini, R. M., Koo, K. and Godt, D.** (2003a). The large Maf factor traffic jam controls gonad morphogenesis in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.*

**Li, B., Howe, L., Anderson, S., Yates, J. R. and Workman, J. L.** (2003b). The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **278**, 8897–8903.

**Li, B., Carey, M. and Workman, J. L.** (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707–719.

**Li, Y., Maines, J. Z., Tastan, Ö. Y., McKearin, D. M. and Buszczak, M.** (2012a). Mei-P26 regulates the maintenance of ovarian germline stem cells by promoting BMP signaling. *Development* **139**,.

**Li, J.-Y., Patterson, M., Mikkola, H. K. A., Lowry, W. E. and Kurdistani, S. K.** (2012b). Dynamic Distribution of Linker Histone H1.5 in Cellular Differentiation. *PLoS Genet.* **8**, e1002879.

**Li, Y., Zhang, Q., Carreira-Rosario, A., Maines, J. Z., McKearin, D. M. and Buszczak, M.** (2013). Mei-P26 Cooperates with Bam, Bgcn and Sxl to Promote Early Germline Development in the *Drosophila* Ovary. *PLoS One* **8**, e58301.

- Liang, G., Lin, J. C. Y., Wei, V., Yoo, C., Cheng, J. C., Nguyen, C. T., Weisenberger, D. J., Egger, G., Takai, D., Gonzales, F. A., et al.** (2004). Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7357–7362.
- Lin, H. and Spradling, A. C.** (1995). Fusome Asymmetry and Oocyte Determination in *Drosophila*. **16**, 6–12.
- Lin, H., Yue, L. and Spradling, A. C.** (1994). The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* **120**, 947–956.
- Loedige, I., Jakob, L., Treiber, T., Ray, D., Stotz, M., Treiber, N., Hennig, J., Cook, K. B., Morris, Q., Hughes, T. R., et al.** (2015). The Crystal Structure of the NHL Domain in Complex with RNA Reveals the Molecular Basis of *Drosophila* Brain-Tumor-Mediated Gene Regulation. *Cell Rep.* **13**, 1206–1220.
- Lorch, Y. and Kornberg, R. D.** (2015). Chromatin-remodeling and the initiation of transcription. *Q. Rev. Biophys.*
- Lu, X. and Hansen, J. C.** (2004). Identification of specific functional subdomains within the linker histone H10 C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 8701–7.
- Lu, X., Wontakal, S. N., Emelyanov, A. V., Morcillo, P., Konev, A. Y., Fyodorov, D. V. and Skoultschi, A. I.** (2009a). Linker histone H1 is essential for *Drosophila* development, the establishment of pericentric heterochromatin, and a normal polytene chromosome structure. *Genes Dev.* **23**, 452–465.
- Lu, X., Hamkalo, B., Parseghian, M. H. and Hansen, J. C.** (2009b). Chromatin Condensing Functions of the Linker Histone C-Terminal Domain Are Mediated by Specific Amino Acid Composition and Intrinsic Protein Disorder †. *Biochemistry* **48**, 164–172.
- Lunde, B. M., Moore, C. and Varani, G.** (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 479–490.
- Mahowald, A. P. and Tiefert, M.** (1970). Fine structural changes in the *Drosophila*

oocyte nucleus during a short period of RNA synthesis - An autoradiographic and ultrastructural study of RNA synthesis in the oocyte nucleus of *Drosophila*. *Wilhelm Roux. Arch. Entwickl. Mech. Org.* **165**, 8–25.

**Maines, J. and Wasserman, S.** (1998). Regulation and Execution of Meiosis in *Drosophila* Males. *Curr. Top. Dev. Biol.* **37**, 301–332.

**Margolis, J. and Spradling, A.** (1995). Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* **121**, 3797–3807.

**Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P. and Davidson, I.** (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2808–2813.

**Mayor, R., Izquierdo-Bouldstridge, A., Millán-Ariño, L., Bustillos, A., Sampaio, C., Luque, N. and Jordan, A.** (2015). Genome distribution of replication-independent histone H1 variants shows H1.0 associated with nucleolar domains and H1X associated with RNA polymerase II-enriched regions. *J. Biol. Chem.* **290**, 7474–7491.

**McGrew, L. L., Dworkin-Rastl, E., Dworkin, M. B. and Richter, J. D.** (1989). Poly(A) elongation during *Xenopus* oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element. *Genes Dev.* **3**, 803–815.

**McKearin, D. and Ohlstein, B.** (1995). A role for the *Drosophila* Bag-of-marbles protein in the differentiation of cystoblasts from germline stem cells. *Development* **121**, 2937–2947.

**McKearin, D. M. and Spradling, A. C.** (1990). bag-of-marbles: a *Drosophila* gene required to initiate both male and female gametogenesis. *Genes Dev.* **4**, 2242–51.

**Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E., Scambler, P. J., Brown, D. T. and Misteli, T.** (2006). Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev. Cell* **10**, 105–116.

**Millán-Ariño, L., Islam, A. B. M. M. K., Izquierdo-Bouldstridge, A., Mayor, R., Terme, J.-M., Luque, N., Sancho, M., López-Bigas, N. and Jordan, A.** (2014). Mapping of six

somatic linker histone H1 variants in human breast cancer cells uncovers specific features of H1.2. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4474–4493.

**Millar, C. B. and Grunstein, M.** (2006). Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 657–666.

**Miller, M. A. and Olivas, W. M.** (2011). Roles of Puf proteins in mRNA degradation and translation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.*

**Mizusawa, Y., Kuji, N., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ikeda, E., Komatsu, S., Kato, S. and Yoshimura, Y.** (2010). Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization. *Fertil. Steril.* **93**, 1134–1141.

**Mizzen, C. A., Yang, X. J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T., et al.** (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**, 1261–70.

**Müller, K., Thisse, C., Thisse, B. and Raz, E.** (2002). Expression of a linker histone-like gene in the primordial germ cells in zebrafish. *Mech. Dev.* **117**, 253–257.

**Nagel, S. and Grossbach, U.** (2000). Histone H1 genes and histone gene clusters in the genus *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*

**Nalabothula, N., McVicker, G., Maiorano, J., Martin, R., Pritchard, J. K. and Fondufe-Mittendorf, Y. N.** (2014). The chromatin architectural proteins HMGD1 and H1 bind reciprocally and have opposite effects on chromatin structure and gene regulation. *BMC Genomics* **15**, 92.

**Navarro-Costa, P., McCarthy, A., Prudêncio, P., Greer, C., Guilgur, L. G., Becker, J. D., Secombe, J., Rangan, P. and Martinho, R. G.** (2016). Early programming of the oocyte epigenome temporally controls late prophase I transcription and chromatin remodelling. *Nat. Commun.* **7**, 12331.

**Nechaev, S. and Adelman, K.** (2011). Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim. Biophys. Acta* **1809**, 34–45.

**Ner, S. S. and Travers, A. A.** (1994). HMG-D, the *Drosophila melanogaster* homologue of HMG 1 protein, is associated with early embryonic chromatin in the absence of histone H1. *EMBO J.* **13**, 1817–1822.

**Neumüller, R. A., Betschinger, J., Fischer, A., Bushati, N., Poernbacher, I., Mechtler, K., Cohen, S. M. and Knoblich, J. A.** (2008). Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the *Drosophila* ovarian stem cell lineage. *Nature* **454**, 241–245.

**Newton, F. G., Harris, R. E., Sutcliffe, C. and Ashe, H. L.** (2015). Coordinate post-transcriptional repression of Dpp-dependent transcription factors attenuates signal range during development. *Development* **142**, 3362–3373.

**Ng, H. H., Robert, F., Young, R. A. and Struhl, K.** (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol. Cell* **11**, 709–719.

**Nightingale, K., Dimitrov, S., Reeves, R. and Wolffe, A. P.** (1996). Evidence for a shared structural role for HMG1 and linker histones B4 and H1 in organizing chromatin. *EMBO J.* **15**, 548–561.

**Öberg, C. and Belikov, S.** (2012). The N-terminal domain determines the affinity and specificity of H1 binding to chromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

**Ohlstein, B. and McKearin, D.** (1997). Ectopic expression of the *Drosophila* Bam protein eliminates oogenic germline stem cells. *Development* **124**, 3651–3662.

**Olivieri, G. and Olivieri, A.** (1965). Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2**, 366–380.

**Park, J. K., Liu, X., Strauss, T. J., McKearin, D. M. and Liu, Q.** (2007). The miRNA Pathway Intrinsically Controls Self-Renewal of *Drosophila* Germline Stem Cells. *Curr. Biol.* **17**, 533–538.

**Pek, J. W., Lim, A. K. and Kai, T.** (2009). *Drosophila* Maelstrom Ensures Proper Germline Stem Cell Lineage Differentiation by Repressing microRNA-7. *Dev. Cell* **17**, 417–424.

**Pérez-Montero, S., Carbonell, A., Morán, T., Vaquero, A. and Azorín, F.** (2013). The embryonic linker histone H1 variant of *Drosophila*, dBigH1, regulates zygotic genome activation. *Dev. Cell* **26**, 578–590.

**Pérez-Montero, S., Carbonell, A. and Azorín, F.** (2015). Germline-specific H1 variants: the “sexy” linker histones. *Chromosoma*.

**Petty, E. and Pillus, L.** (2013). Balancing chromatin remodeling and histone modifications in transcription. *Trends Genet.* **23**, 621–629.

**Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., Bell, G. W., Walker, K., Rolfe, P. A., Herbolzheimer, E., et al.** (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* **122**, 517–527.

**Poli, J., Gasser, S. M. and Papamichos-Chronakis, M.** (2017). The INO80 remodeller in transcription, replication and repair. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **372**,.

**Ponte, I., Vidal-Taboada, J. M. and Suau, P.** (1998). Evolution of the vertebrate H1 histone class: evidence for the functional differentiation of the subtypes. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 702–708.

**Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L. and Sweet, R. M.** (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* **362**, 219–223.

**Ramesh, S., Bharath, M. M. S., Chandra, N. R. and Rao, M. R. S.** (2006). A K52Q substitution in the globular domain of histone H1t modulates its nucleosome binding properties. *FEBS Lett.* **580**, 5999–6006.

**Ravi Ram, K. and Wolfner, M. F.** (2007). Seminal influences: *Drosophila* Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integr. Comp. Biol.* **47**, 427–445.

**Reinke, H. and Hörz, W.** (2003). Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol. Cell* **11**, 1599–1607.

**Ricci, M. A., Manzo, C., García-Parajo, M. F., Lakadamyali, M. and Cosma, M. P.**

(2015). Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell* **160**, 1145–58.

**Richter, J. D.** (1999). Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 446–56.

**Robinson, P. J. and Rhodes, D.** (2006). Structure of the “30 nm” chromatin fibre: A key role for the linker histone. *Curr. Opin. Struct. Biol.*

**Roh, T., Ngau, W. C., Cui, K., Landsman, D. and Zhao, K.** (2004). High-resolution genome-wide mapping of histone modifications. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1013–1016.

**Roque, A., Iloro, I., Ponte, I., Arrondo, J. L. R. and Suau, P.** (2005). DNA-induced secondary structure of the carboxyl-terminal domain of histone H1. *J. Biol. Chem.* **280**, 32141–7.

**Roque, A., Ponte, I. and Suau, P.** (2015). Interplay between histone H1 structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.*

**Saeki, H., Ohsumi, K., Aihara, H., Ito, T., Hirose, S., Ura, K. and Kaneda, Y.** (2005). Linker histone variants control chromatin dynamics during early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5697–5702.

**Sallés, F. J., Lieberfarb, M. E., Wreden, C., Gergen, J. P. and Strickland, S.** (1996). Coordinate initiation of *Drosophila* development by regulated polyadenylation of maternal messenger RNAs. *Science (80- )*. **266**, 1996–1999.

**Sancho, M., Diani, E., Beato, M. and Jordan, A.** (2008). Depletion of Human Histone H1 Variants Uncovers Specific Roles in Gene Expression and Cell Growth. *PLoS Genet.* **4**, e1000227.

**Sano, H., Nakamura, A. and Kobayashi, S.** (2002). Identification of a transcriptional regulatory region for germline-specific expression of vasa gene in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.* **112**, 129–139.

**Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al.** (2012). Fiji: an open-source

---

platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682.

**Schlissel, M. S. and Brown, D. D.** (1984). The transcriptional regulation of *Xenopus* 5s RNA genes in chromatin: the roles of active stable transcription complexes and histone H1. *Cell* **37**, 903–13.

**Schneider, I.** (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Embryol. exp. Morph* **27**, 353–365.

**Schones, D. E. and Zhao, K.** (2008). Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 179–191.

**Schübeler, D., MacAlpine, D. M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., van Leeuwen, F., Gottschling, D. E., O'Neill, L. P., Turner, B. M., Delrow, J., et al.** (2004). The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**, 1263–1271.

**Shao, W. and Zeitlinger, J.** (2017). Paused RNA polymerase II inhibits new transcriptional initiation. *Nat. Genet.* **49**, 1045–1051.

**Shen, R., Weng, C., Yu, J. and Xie, T.** (2009a). eIF4A controls germline stem cell self-renewal by directly inhibiting BAM function in the *Drosophila* ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 11623–11628.

**Shen, R., Weng, C., Yu, J. and Xie, T.** (2009b). eIF4A controls germline stem cell self-renewal by directly inhibiting BAM function in the *Drosophila* ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 11623–8.

**Shimamura, A., Sapp, M., Rodriguez-Campos, A. and Worcel, A.** (1989). Histone H1 represses transcription from minichromosomes assembled in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5573–84.

**Shivdasani, A. A. and Ingham, P. W.** (2003). Regulation of Stem Cell Maintenance and Transit Amplifying Cell Proliferation by TGF- $\beta$  Signaling in *Drosophila* Spermatogenesis. *Curr. Biol.*

**Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Jian-Min Sun, Pazin, M. J., Davie, J. R. and Peterson,**

**C. L.** (2006). Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. *Science* (80-. ). **311**, 844–847.

**Shyu, A. B., Belasco, J. G. and Greenberg, M. E.** (1991). Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev.*

**Simpson, R. T.** (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* **17** (25), 5524–5531.

**Sirotkin, A. M., Edelman, W., Cheng, G., Klein-Szanto, A., Kucherlapati, R. and Skoultchi, A. I.** (1995). Mice develop normally without the H1(0) linker histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6434–8.

**Smibert, P., Miura, P., Westholm, J. O., Shenker, S., May, G., Duff, M. O., Zhang, D., Eads, B. D., Carlson, J., Brown, J. B., et al.** (2012). Global Patterns of Tissue-Specific Alternative Polyadenylation in Drosophila. *Cell Rep.*

**Smith, R. C., Dworkin-Rastl, E. and Dworkin, M. B.** (1988). Expression of a histone H1-like protein is restricted to early Xenopus development. *GenesDev* **2**, 1284–1295.

**Song, X., Zhu, C. H., Doan, C. and Xie, T.** (2002). Germline stem cells anchored by adherens junctions in the Drosophila ovary niches. *Science* (80-. ).

**Song, X., Wong, M. D., Kawase, E., Xi, R., Ding, B. C., McCarthy, J. J. and Xie, T.** (2004). Bmp signals from niche cells directly repress transcription of a differentiation-promoting gene, bag of marbles, in germline stem cells in the Drosophila ovary. *Development* **131**, 1353–1364.

**Sterner, D. E. and Berger, S. L.** (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 435–59.

**Strickland, W. N., Strickland, M., Brandt, W. F., Von Holt, C., Lehmann, A. and Wittmann-Liebold, B.** (1980). The primary structure of HistoneH1 from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. *Eur.J.Biochem.* **104**, 567–578.

**Sun, J., Wei, H. M., Xu, J., Chang, J. F., Yang, Z., Ren, X., Lv, W. W., Liu, L. P., Pan, L. X., Wang, X., et al.** (2015). Histone H1-mediated epigenetic regulation controls

germline stem cell self-renewal by modulating H4K16 acetylation. *Nat. Commun.* **6**, 8856.

**Suzuki, M.** (1989). SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone. *EMBO J.* **8**, 797–804.

**Swygart, S. G. and Peterson, C. L.** (2014). Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1839**, 728–736.

**Tadros, W. and Lipshitz, H. D.** (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* **136**, 3033–3042.

**Takami, Y., Nishi, R. and Nakayama, T.** (2000). Histone H1 variants play individual roles in transcription regulation in the DT40 chicken B cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

**Takata, H., Matsunaga, S., Morimoto, A., Ono-Maniwa, R., Uchiyama, S. and Fukui, K.** (2007). H1.X with different properties from other linker histones is required for mitotic progression. *FEBS Lett.* **581**, 3783–3788.

**Tanaka, M., Hennebold, J. D., Macfarlane, J. and Adashi, E. Y.** (2001). A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development* **128**, 655–664.

**Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., Onishi, M., Masai, K., Maekawa, M., Toshimori, K., et al.** (2005). HANP1/H1T2, a Novel Histone H1-Like Protein Involved in Nuclear Formation and Sperm Fertility. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7107–7119.

**Teranishi, T., Tanaka, M., Kimoto, S., Ono, Y., Miyakoshi, K., Kono, T. and Yoshimura, Y.** (2004). Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer. *Dev. Biol.* **266**, 76–86.

**Thoma, F., Koller, T. and Klug, A.** (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.*

83, 403–427.

**Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T. K., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., et al.** (2015). Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* **527**, 389–393.

**Thurmond, J., Goodman, J. L., Strelets, V. B., Attrill, H., Gramates, L. S., Marygold, S. J., Matthews, B. B., Millburn, G., Antonazzo, G., Trovisco, V., et al.** (2019). FlyBase 2.0: the next generation. *Nucleic Acids Res.* **47**, D759–D765.

**Tropberger, P., Pott, S., Keller, C., Kamieniarz-Gdula, K., Caron, M., Richter, F., Li, G., Mittler, G., Liu, E. T., Bühler, M., et al.** (2013). Regulation of transcription through acetylation of H3K122 on the lateral surface of the histone octamer. *Cell* **152**, 859–872.

**Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S. and Saga, Y.** (2003). Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development. *Science*. **301**, 1239–1241.

**Ura, K., Nightingale, K. and Wolffe, A. P.** (1996). Differential association of HMG1 and linker histones B4 and H1 with dinucleosomal DNA: structural transitions and transcriptional repression. *Embo J* **15**, 4959–4969.

**Van Doren, M., Williamson, A. L. and Lehmann, R.** (1998). Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr. Biol.* **8**, 243–6.

**Van Steensel, B.** (2011). Chromatin: Constructing the big picture. *EMBO J.* **30**, 1885–1895.

**Veraksa, A., Bauer, A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (2005). Analyzing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Dev. Dyn.* **232**, 827–834.

**Vibrantovski, M. D., Lopes, H. F., Karr, T. L. and Long, M.** (2009). Stage-Specific Expression Profiling of *Drosophila* Spermatogenesis Suggests that Meiotic Sex Chromosome Inactivation Drives Genomic Relocation of Testis-Expressed Genes. *PLoS Genet.* **5**, e1000731.

- Vibranovski, M. D., Chalopin, D. S., Lopes, H. F., Long, M. and Karr, T. L.** (2010). Direct evidence for postmeiotic transcription during *Drosophila melanogaster* spermatogenesis. *Genetics* **186**, 431–433.
- Villalba, A., Coll, O. and Gebauer, F.** (2011). Cytoplasmic polyadenylation and translational control. *Curr. Opin. Genet. Dev.*
- Voog, J., D'Alterio, C. and Jones, D. L.** (2008). Multipotent somatic stem cells contribute to the stem cell niche in the *Drosophila* testis. *Nature* **454**, 1132–1136.
- Vujatovic, O., Zaragoza, K., Vaquero, A., Reina, O., Bernués, J. and Azorín, F.** (2012). *Drosophila melanogaster* linker histone dH1 is required for transposon silencing and to preserve genome integrity. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5402–14.
- White-Cooper, H., Schafer, M. A., Alphey, L. S. and Fuller, M. T.** (1998). Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*. *Development* **125**, 125–134.
- Wibrand, K. and Olsen, L. C.** (2002). Linker histone H1M transcripts mark the developing germ line in zebrafish. *Mech. Dev.* **117**, 249–252.
- Wolffe, A.** (1998). *Chromatin : structure and function*. 3rd ed. San Diego: Academic Press.
- Woodcock, C. L., Skoultchi, A. I. and Fan, Y.** (2006). Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosom. Res.* **14**, 17–25.
- Xiao, T., Hall, H., Kizer, K. O., Shibata, Y., Hall, M. C., Borchers, C. H. and Strahl, B. D.** (2003). Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Genes Dev.* **17**, 654–63.
- Xie, T. and Spradling, A. C.** (1998). decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell* **94**, 251–60.
- Xie, T. and Spradling, A. C.** (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science (80- )*. **290**, 328–330.

**Xingwu, L., Wontakal, S. N., Kavi, H., Kim, B. J., Guzzardo, P. M., Emelyanov, A. V., Xu, N., Hannon, G. J., Zavadil, J., Fyodorov, D. V., et al.** (2013). Drosophila H1 Regulates the Genetic Activity of Heterochromatin by Recruitment of Su(var)3-9. *Science (80-. )*. **340**, 78–81.

**Xu, N., Emelyanov, A. V, Fyodorov, D. V and Skoultchi, A. I.** (2014). Drosophila linker histone H1 coordinates STAT-dependent organization of heterochromatin and suppresses tumorigenesis caused by hyperactive JAK-STAT signaling. *Epigenetics Chromatin* **7**, 16.

**Yamashita, Y. M., Jones, D. L. and Fuller, M. T.** (2003). Orientation of Asymmetric Stem Cell Division by the APC Tumor Suppressor and Centrosome. *Science (80-. )*. **301**, 1547–1550.

**Yan, W., Ma, L., Burns, K. H. and Matzuk, M. M.** (2003). HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 10546–10551.

**Yang, L., Chen, D., Duan, R., Xia, L., Wang, J., Qurashi, A., Jin, P. and Chen, D.** (2007). Argonaute 1 regulates the fate of germline stem cells in Drosophila. *Development* **134**, 4265–4272.

**Yap, K. L. and Zhou, M.-M.** (2010). Keeping it in the family: diverse histone recognition by conserved structural folds. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 488–505.

**Yin, H., Sweeney, S., Raha, D., Snyder, M. and Lin, H.** (2011). A High-Resolution Whole-Genome Map of Key Chromatin Modifications in the Adult Drosophila melanogaster. *PLoS Genet.* **7**, e1002380.

**Yun, Y., Zhao, G. M., Wu, S. J., Li, W. and Lei, A. M.** (2012). Replacement of H1 linker histone during bovine somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* **78**, 1371–1380.

**Zaccai, M. and Lipshitz, H. D.** (1996). Differential distributions of two adducin-like protein isoforms in the Drosophila ovary and early embryo. *Zygote*.

**Zhang, H., Lee, J. Y. and Tian, B.** (2005). Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biol.* **6**,.

---

**Zhang, Y., Cooke, M., Panjwani, S., Cao, K., Krauth, B., Ho, P.-Y., Medrzycki, M., Berhe, D. T., Pan, C., McDevitt, T. C., et al.** (2012). Histone H1 Depletion Impairs Embryonic Stem Cell Differentiation. *PLoS Genet.* **8**, e1002691.

**Zhang, T., Cooper, S. and Brockdorff, N.** (2015). The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep.* **16**, 1467–1481.

**Zhao, J., Herrera-Diaz, J. and Gross, D. S.** (2005). Domain-wide displacement of histones by activated heat shock factor occurs independently of Swi/Snf and is not correlated with RNA polymerase II density. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8985–8999.

**Zhou, B.-R., Feng, H., Kato, H., Dai, L., Yang, Y., Zhou, Y. and Bai, Y.** (2013). Structural insights into the histone H1-nucleosome complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 19390–19395.

**Zhou, B.-R., Jiang, J., Feng, H., Ghirlando, R., Xiao, T. S. and Bai, Y.** (2015). Structural Mechanisms of Nucleosome Recognition by Linker Histones. *Mol. Cell* **59**, 628–638.



## **8.ANNEXO**

