

Anàlisi de la localització subcel·lular i propietats funcionals de DDP1, la vigilina de *Drosophila melanogaster*

Marta Batlle Lacort

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

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

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



Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

TESI DOCTORAL

**Anàlisi de la localització subcel·lular i propietats funcionals
de DDP1, la vigilina de *Drosophila melanogaster***

Marta Batlle Lacort

Juliol de 2010



Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Programa de Biotecnologia
Bienni 2004-2006

**Anàlisi de la localització subcel·lular i propietats funcionals
de DDP1, la vigilina de *Drosophila melanogaster***

Memòria presentada per Marta Batlle Lacort per optar al títol de doctora per la Universitat de Barcelona. Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del Dr. Ferran Azorín Marín al Departament de Biologia Molecular i Cel·lular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC).

El director,

La tutora,

Dr. Ferran Azorín Marín

Dra. Laura Baldomà Llavínés

L'autora,

Marta Batlle Lacort

Barcelona, juliol de 2010

AGRAÏMENTS

Sembla mentida que, després d'haver escrit tota una tesi, quan només et queden per escriure els agraïments, no saps ni per on començar. Hi ha masses emocions i masses coses a dir per expressar-ho només en paraules.

A DDP1, la meva proteïna durant tots aquests anys, gràcies per tot. Perquè si no haguessis estat tan esquerpa i al mateix temps tant captivadora, no hagués hagut de donar-ho tot, d'arriscar al màxim. Gràcies per ajudar-me a créixer com a científica, i el que és més important, com a persona.

Al meu director de tesi, Ferran, moltes gràcies per haver-me donat l'oportunitat d'entrar en un nou món per a mi, apassionant i diferent com és la biologia molecular. No saps com t'agraeixo que confiessis en una química inexperta per portar a terme un projecte com el de DDP1, i la motivació que m'has donat per poder dur-lo a terme. Tot el meu agraïment a la Dori, amb la qual vaig iniciar el projecte, i que em va ensenyar gairebé tot el que sé sobre biologia. Però sobretot, gràcies pels consells i per ser sempre allà quan ho he necessitat.

A la resta de jefes del laboratori: gràcies per tot. Al Jordi, per haver compartit tantes converses al confocal i a la sala de mosques, i per haver-me ajudat sempre amb la recerca, ja fos passant-me un nou protocol, com resolent els meus dubtes sobre biologia. A la Lluïsa, per haver-me passat múltiples soques, mosques i protocols. Teu és el mutant nul que m'ha salvat la vida! Al Josep li agraeixo les converses científiques que hem mantingut i els ànims que m'ha donat sempre. A l'Elena, per ser una gran companya de taula (compartint música i barrets contra el fred!), i per ajudar-me sempre que li he demanat.

A la gent del PBA3, gràcies per fer del laboratori un lloc on dóna gust treballar. Ha estat un plaer compartir amb vosaltres tots aquests anys! A l'Olga en especial, gràcies per ser allà cada vegada que he necessitat ajuda per realitzar un experiment, per aconsellar-me sobre la paperassa o simplement per deixar que em desfogués amb ella (i a més, sempre amb un somriure a la cara!). A la Marta Orxeta per ser com és, i fer de les discussions

al voltant d'una pastilla de xocolata Valor grans moments. Gràcies Joan pels teus bons consells i idees sobre DDP1; formen part d'aquesta tesi. Al Xavi Marsellach, merci pels consells informàtics. No saps com et vam trobar a faltar quan vas marxar! Al Carles, per ajudar-me amb els complexos! A l'Olivera i al Salva, per tantes converses a la lupa de dissecció. A la Mònica, Sònia, Sergi, Roman, Sylvia Mancilla i Lorena, gràcies per ser tant bons companys de laboratori; sempre que us he necessitat heu estat allà per fer-me un favor. A les noves incorporacions del laboratori, gràcies per millorar, si és possible, l'ambient del laboratori: a l'Anne i la Katrin, per les seves aportacions al seminaris. Al Tomàs, pel seu bon humor i per iniciar-nos en el concurs de pastissos (llàstima que jo estava tancada a casa escrivint la tesi!). No puc oblidar-me de les millors tècniques del món: l'Alicia (que sempre m'ha aguantat els rotllos de matí amb aquest somriure seu) i la Gemma. El laboratori no seria igual sense vosaltres! Finalment, a la gent que ja no hi és però que, més que companys, eren amics: al Marc, per les hores compartides de camí cap a casa. Al Martí, perquè sota el seu frikisme amaga una gran persona. Al David, per fer que sempre tinguessis ganes d'esmorçar al bar a partir de les 10... A la Bet, per totes les converses de nenes que hem tingut. Finalment, a la Marta Blanch i a l'Esther, gràcies per ser unes grans amigues, per animar-me sempre, per ser allà fins al final. L'últim any no hagués estat el mateix sense vosaltres!!!

A l'Eva i la Xàntipa, per ser les millors amigues del món. Per aguantar tots els canvis de plans per culpa d'unes mosques. Perquè no és fàcil tenir una amiga científica.

Als meus pares, per tot. Per recolzar-me sempre, incondicionalment. Aquesta tesi també és vostra!

Finalment, aquesta tesi està dedicada a la persona que més m'estimo, en Nicolas. Per animar-me en els moments més durs. Per estimar-me tant.

I. ÍNDEX

ÍNDIX DE MATÈRIES

I. ÍNDEX	1
ÍNDIX DE MATÈRIES	3
ÍNDEXS DE TAULES I FIGURES	7
ABREVIATURES	11
II. INTRODUCCIÓ	13
1. EL DOMINI KH	15
1.1. Estructura del domini KH	15
1.2. Evolució dels dominis KH	17
1.3. Característiques generals d'unió a àcids nucleics per part del domini KH	18
1.3.1. Interaccions entre dominis KH	20
1.4. Dimerització dels dominis KH	23
1.5. Proteïnes amb dominis KH	25
2. LES VIGILINES	29
2.1. Característiques generals de les vigilines	29
2.2. Funcions de les vigilines	31
2.2.1. Les vigilines com a reguladores del metabolisme del RNA	32
2.2.2. Contribució de les vigilines a la formació d'heterocromatina	34
2.3. Localització de les vigilines	35
2.4. Scp160, la vigilina de <i>S. cerevisiae</i>	36
2.5. La vigilina humana	39
2.6. DDP1, la vigilina de <i>Drosophila melanogaster</i>	40
III. OBJECTIUS	45
IV. MATERIALS I MÈTODES	49
1. MATERIALS	51
1.1. Soques bacterianes i línies cel·lulars	51
1.1.1. Soques bacterianes d' <i>Escherichia coli</i>	51
1.1.2. Línies cel·lulars eucariotes: cèl·lules S2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	51
1.2. Vectors utilitzats en aquest treball	51

1.2.1. Vectors de clonatge	52
1.2.2. Vectors d'expressió a <i>Escherichia coli</i>	52
1.2.3. Vectors d'expressió a cèl·lules S2	52
1.2.4. Vectors d'expressió a <i>Drosophila melanogaster</i>	52
1.3. Oligonucleòtids	53
1.4. DNAs plasmídics utilitzats en aquest treball	53
1.4.1. Clonatge de les fusions amb GFP	55
1.4.2. Clonatge del <i>hairpin</i> de DDP1 per obtenir RNA d'interferència	55
1.4.3. Clonatge de les fusions amb LacI	56
1.4.4. Clonatge de DDP1-TAP	56
1.5. Generació del mutant nul <i>ddp1^A</i>	56
1.6. Mosques utilitzades en aquest treball	57
1.7. Anticossos utilitzats en aquest treball	59
2. MÈTODES	61
2.1. Mètodes de manipulació de DNA	61
2.1.1. Mètodes d'obtenció de DNA	61
2.1.2. Reacció en cadena de la polimerasa	62
2.2. Tècniques bàsiques per a l'estudi de proteïnes	62
2.2.1. Electroforesi de proteïnes en gel de SDS-poliacrilamida	62
2.2.2. <i>Western blot</i>	64
2.2.3. Expressió i purificació de proteïnes recombinants	65
2.3. Purificació d'anticossos	67
2.4. Mètodes de treball amb cèl·lules S2	68
2.4.1. Manteniment	68
2.4.2. Congelació	68
2.4.3. Descongelació	69
2.4.4. Obtenció de cèl·lules estables	69
2.4.5. Obtenció d'extractes proteics de cèl·lules S2	70
2.4.6. Immunolocalitzacions a cèl·lules S2	70
2.5. Mètodes de treball amb <i>Drosophila melanogaster</i>	71
2.5.1. Extracció de DNA genòmic d'embrions	71
2.5.2. Extracció de DNA genòmic de mosques	72
2.5.3. Obtenció d'extractes proteics d'embrions	72

2.5.4. Obtenció d'extractes proteics de glàndules salivals, discs imaginals i cervells de larves de tercer estadi	73
2.5.5. Immunolocalitzacions a embrions	73
2.5.6. Immunolocalitzacions a glàndules salivals, discs imaginals, cervells i ovaris	75
2.5.7. Immunolocalitzacions a cromosomes politènics	75
2.5.8. Immunolocalitzacions a neuroblastes	77
2.5.9. Experiments de PEV i reclutament ectòpic	77
2.6. Microscopia electrònica	78
2.7. Obtenció i purificació de complexos de DDP1	79
2.7.1. Proves d'expressió	79
2.7.2. Preparació dels extractes citoplasmàtics i nuclears	80
2.7.3. Purificació dels complexos	81
V. RESULTATS	83
1. ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE DDP1	85
1.1. Estudi de la localització de DDP1 mitjançant l'ús d'anticossos	85
1.1.1. Estudi de la localització de DDP1 a cèl·lules S2 i òrgans de <i>Drosophila</i>	85
1.1.2. Estudi de la localització de DDP1 durant el desenvolupament	87
1.2. Estudi de la localització de DDP1 mitjançant fusions amb GFP	91
1.2.1. Anàlisi de la localització de DDP1-GFP expressada sota el control del promotor de <i>ddp1</i>	91
1.2.2. Anàlisi de la localització de DDP1-GFP expressada sota el control del promotor de xoc tèrmic <i>hsp70</i>	96
1.2.3. Estudi de la contribució dels dominis KH 12-15 en la localització perinuclear de DDP1	97
1.3. Anàlisi de la localització de DDP1 al reticle endoplasmàtic rugós	99
1.4. Estudi de la localització de DDP1 en teixits de <i>Drosophila</i> tractats amb àcid acètic	101
1.5. Estudi de la localització de DDP1 a mutants <i>ddp1</i>	104
1.5.1. Descripció dels mutants <i>ddp1</i>	105
1.5.2. Estudi de la localització de DDP1 en els mutants hipomorfs <i>ddp1¹⁵⁻¹</i> i <i>ddp1^{RNAi}</i>	107
1.5.3. Estudi de la localització de DDP1 en mutants nuls <i>ddp1^Δ</i>	112

1.6. Anàlisi de la localització de DDP1-GFP en fons mutant <i>ddp1^A</i>	118
2. ESTUDI DE LA CONTRIBUCIÓ DE DDP1 A L'ESTRUCTURA I FUNCIO DE L'HETEROCROMATINA	123
2.1. Anàlisi dels efectes de <i>ddp1^A</i> sobre PEV	123
2.2. Estudi de la contribució de DDP1 al silenciament heterocromàtic	125
2.3. Estudi dels patrons de localització de HP1 i me2K9H3 en fons mutant <i>ddp1^A</i>	127
2.4. Anàlisi de les proteïnes associades a DDP1	130
VI. DISCUSSIÓ	133
1. DDP1 és citoplasmàtica i s'associa al reticle endoplasmàtic rugós	135
2. La contribució de DDP1 a l'estructura i formació de l'heterocromatina és indirecta	139
3. Les vigilines controlen l'expressió de nombrosos mRNAs	141
VII. CONCLUSIONS	145
VIII. BIBLIOGRAFIA	149
IX. APÈNDIX	165

ÍNDIXS DE TAULES I FIGURES

ÍNDIX DE TAULES

Taula M.1. Llistat d'oligonucleòtids emprats en aquest treball	54
Taula M.2. Llistat de les línies generades i utilitzades en aquest treball	58
Taula M.3. Resum dels anticossos utilitzats en aquest treball	59
Taula R.1. Viabilitat dels mutants <i>ddp1</i> i rescat pel transgèn DDP1-GFP sota el control del promotor de <i>ddp1</i>	119
Taula R.2. Proteïnes identificades per espectrometria de masses en la fracció citoplasmàtica de la mostra DDP1-TAP	132

ÍNDIX DE FIGURES

Figura I.1. Plegaments dels dominis KH tipus I i II	16
Figura I.2. Identitats de seqüència dels dominis KH dins d'una família de proteïnes	17
Figura I.3. Estructura en cinta d'un domini KH tipus I en complex amb un àcid nucleic	19
Figura I.4. Comparació de les estructures cristal·lines dels dominis KH1 i KH2 de hFMRP i NusA	21
Figura I.5. Estructures de les proteïnes NusA, PCBP-2 i ZBP en complex amb els seus substrats	22
Figura I.6. Superfície de dimerització dels dominis KH1 i KH2 de PCBP-2	23
Figura I.7. Possibles models d'unió a RNA o DNA cooperatius per part dels dominis KH de la proteïna PCBP-2	24
Figura I.8. Esquema comparatiu de les vigilines de mamífer, pollastre, <i>Drosophila</i> , <i>C. elegans</i> i <i>S. cerevisiae</i>	30
Figura I.9. Immunolocalitzacions de DDP1 a cromosomes politènics	42
Figura M.1. Esquema de l'ORF de DDP1 que s'ha eliminat en fer saltar els FRT dels transgens inserits en el gen <i>ddp1</i>	57
Figura R.1. Immunolocalització amb anticòs α DDP1 a cèl·lules S2	85

Figura R.2. Immunolocalitzacions amb α DDP1 a glàndules salivals, cervells i discs imaginals de larves de tercer estadi	86
Figura R.3. Immunolocalització amb α DDP1 a ovaris	87
Figura R.4. Anàlisi per <i>Western blot</i> dels nivells de DDP1 al llarg del desenvolupament embrionari	88
Figura R.5. Immunolocalització amb α DDP1 a embrions de 0-4 h	89
Figura R.6. Immunolocalitzacions a embrions cel·lulars (cicle 14) en interfase amb α DDP1 i α me2K9H3	90
Figura R.7. Localització de DDP1-GFP a diferents òrgans de <i>Drosophila</i>	92
Figura R.8. Localització de DDP1-GFP a embrions de 0-4 h	94
Figura R.9. Immunolocalització amb α DDP1 a embrions <i>PROM-DDP1-GFP</i> en estadi de blastoderm cel·lular	94
Figura R.10. Immunolocalització amb $\alpha\beta$ Tubulina a embrions <i>PROM-DDP1-GFP</i>	95
Figura R.11. Localització de DDP1-GFP a cervells i glàndules salivals	96
Figura R.12. Anàlisi de la localització a glàndules salivals de les construccions truncades de DDP1 fusionades amb GFP	98
Figura R.13. Immunolocalitzacions a glàndules salivals <i>hsp70-DDP1-GFP</i> amb α Lamina i α Calnexina	100
Figura R.14. Localització de DDP1 a glàndules salivals mitjançant microscopia electrònica	101
Figura R.15. Immunolocalitzacions amb anticòs α DDP1 a cèl·lules S2, neuroblastes, glàndules salivals i cromosomes politènics <i>white</i> fixats amb àcid acètic	103
Figura R.16. Immunolocalitzacions amb anticòs α GFP a glàndules salivals, neuroblastes i cromosomes politènics <i>hsp70-DDP1-GFP</i> i <i>PROM-DDP1-GFP</i> fixats amb àcid acètic	104
Figura R.17. Anàlisi per <i>Western blot</i> dels nivells de DDP1 en extractes de glàndules salivals, cervells i discs imaginals de mutants <i>ddp1^{RNAi}</i>	106
Figura R.18. Anàlisi per PCR de la deleció de l'ORF del gen <i>ddp1</i>	106
Figura R.19. Anàlisi per <i>Western blot</i> dels nivells de DDP1 en extractes de glàndules salivals, cervells i discs imaginals de mutants <i>ddp1^A</i>	107
Figura R.20. Immunolocalitzacions amb α DDP1 a glàndules salivals, discs imaginals i cervells de mutants <i>ddp1¹⁵⁻¹</i>	108

Figura R.21. Immunolocalitzacions amb α DDP1 a glàndules salivals i discs imaginals de mutants <i>ddp1^{RNAi}</i>	109
Figura R.22. Immunolocalitzacions amb α DDP1 a discs d'ala on s'expressa RNAi contra DDP1 amb diferents <i>drivers</i> i temperatures	111
Figura R.23. Immunolocalització amb α DDP1 a glàndules salivals de mutants <i>ddp1^A</i>	113
Figura R.24. Immunolocalització amb α DDP1 a cromosomes politènics de mutants <i>ddp1^A</i>	113
Figura R.25. Immunolocalització amb α DDP1 a discs imaginals de mutants <i>ddp1^A</i>	114
Figura R.26. Immunolocalització amb α DDP1 a ovaris de femelles mutants <i>ddp1^A</i>	114
Figura R.27. Immunolocalitzacions amb α DDP1 a glàndules salivals i discs imaginals de mutants <i>ddp1^A</i> on s'ha induït RNA d'interferència contra DDP1	116
Figura R.28. Immunolocalitzacions a cromosomes politènics <i>hsp70-DDP1-GFP</i> amb α GFP i α DDP1	117
Figura R.29. Localització de DDP1-GFP expressada pel promotor de <i>ddp1</i> en mutants <i>ddp1^A</i>	120
Figura R.30. Immunolocalització amb α DDP1 a glàndules salivals de mutants <i>ddp1^A</i> que expressen el transgèn DDP1-GFP sota control del promotor de <i>ddp1</i>	120
Figura R.31. Immunolocalització amb α DDP1 a glàndules salivals de mutants <i>ddp1^A</i> que expressen el transgèn DDP1-GFP sota control del promotor de xoc tèrmic <i>hsp70</i>	121
Figura R.32. Assaig de variegació del mutant <i>ddp1^A</i> en <i>In(1)w^{m4}</i>	124
Figura R.33. Assaig de variegació del mutant <i>ddp1^A</i> en la línia 39C-42	125
Figura R.34. Reclutament ectòpic de DDP1 a un gen <i>reporter</i>	127
Figura R.35. Determinació dels nivells de me2K9H3 i HP1 a cromosomes politènics de mutants <i>ddp1^A</i>	129
Figura R.36. Complexos obtinguts de la purificació de la proteïna DDP1-TAP	131

ABREVIATURES

BSA	Albúmina sèrica bovina
C	Carboxi
DAPI	4,6-Diamino-2-fenilindol diclorhidrat
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DO	Densitat òptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
EGTA	Àcid etilenglicoltetracètic
FBS	Sèrum fetal boví
Fig.	Figura
FRT	<i>Flipase recognition target</i>
HEPES	Àcid N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etansulfònic
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosid
Kd	Constant de dissociació
kDa	Quilodalton
KH	<i>K-homology</i>
LB	Medi de cultiu Luria Bertani
LC-MS	Cromatografia de líquids-espectrometria de masses
mRNA	RNA missatger
N	Amino
NES	Senyal d'export nuclear (<i>Nuclear export signal</i>)
NLS	Senyal de localització nuclear (<i>Nuclear localization signal</i>)
NP-40	Nonident P-40
ORF	<i>Open reading frame</i>
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PEV	<i>Position effect variegation</i>
pFA	Paraformaldehid
PIPES	Àcid piperazina-N,N-bis-2-etansulfònic
PLB	<i>Protein loading buffer</i>

PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
RER	Reticle endoplasmàtic rugós
RMN	Ressonància magnètica nuclear
RNA	Àcid ribonucleic
RNAi	RNA d'interferència
RNAsa	Ribonucleasa
rpm	Revolucions per minut
SB	<i>Squishing buffer</i>
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforesi en gel d'acrilamida-SDS
SPB	<i>Spindle pole body</i>
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i>
t.a	Temperatura ambient
TAP	<i>Tandem affinity purification</i>
TBS	Tampó Tris salí
TE	Tampó Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletildiamina
tRNA	RNA de transferència
UAS	<i>Upstream activating sequence</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>

II. INTRODUCCIÓ

1. EL DOMINI KH

El domini KH és un motiu altament conservat a través de l'evolució i es troba en moltes proteïnes d'archea, bacteris i eucariotes. Identificat per primera vegada en la proteïna hnRNP K (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K), se'l va anomenar domini KH per K-homology (Siomi *et al.*, 1993a). El seu descobriment en diverses proteïnes implicades en el metabolisme del RNA va fer que el domini KH fos descrit inicialment com a domini d'unió a RNA (Gibson *et al.*, 1993; Siomi *et al.*, 1993a). Estudis posteriors van demostrar que també podia unir DNA de cadena senzilla (ssDNA) (Takimoto *et al.*, 1993; Dejgaard *et al.*, 1996) i es va definir definitivament com a un domini d'unió a àcids nucleics de cadena senzilla.

1.1. Estructura del domini KH

L'estructura tridimensional d'alguns dominis KH s'ha resolt per RMN i difracció de raigs X, tant de dominis sols o en tàndem, com de dominis aïllats o en complex amb els seus substrats, RNA o ssDNA (Castiglione *et al.*, 1995; Musco *et al.*, 1996; Musco *et al.*, 1997; Baber *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Worbs *et al.*, 2001; Braddock *et al.*, 2002a,b; Ramos *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003; Backe *et al.*, 2005; Beuth *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2005; Maguire *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2007; Fenn *et al.*, 2007; Garcia-Mayoral *et al.*, 2007; Valverde *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2009; Chao *et al.*, 2010). El domini KH comprèn uns 70 aminoàcids de llarg i es caracteritza per tenir un motiu (I/L/V)-I-G-X-X-G-X-X-(I/L/V) molt conservat al mig del domini, en què X pot ser qualsevol aminoàcid. L'estructura secundària consta de tres fulles β i tres hèlices α amfipàtiques, que en l'estructura tridimensional es disposen formant un llit de fulles β amb els residus hidrofílics exposats al solvent, i amb els residus hidrofòbics empaquetats contra els residus hidrofòbics de tres hèlices α , formant el nucli hidrofòbic del domini (Musco *et al.*, 1996).

Tot i tenir l'estructura secundària conservada, hi ha dos tipus de plegaments diferents en funció de si el domini KH es troba en una proteïna eucariota o bé en una de procariota (Grishin, 2001). Ambdós tipus de plegament tenen una part comuna formada pel que s'anomena domini KH mínim, que consta d'uns 45 aminoàcids estructurats en un

plegament $\beta\alpha\alpha\beta$ en què les dues hèlices α es troben connectades per un *loop* de quatre aminoàcids que conté un motiu GxxG altament conservat en els dominis clàssics, en què x sol ser un residu bàsic (Musco *et al.*, 1996; Brykailo *et al.*, 2007a). Aquest motiu pot tenir insercions o delecions en dominis KH no conservats o divergents (Musco *et al.*, 1996). El plegament de tipus I es troba només en proteïnes eucariotes i presenta una extensió $\beta\alpha$ en C-terminal al motiu KH mínim (subratllat), amb una estructura $\beta_1\alpha_1\alpha_2\beta_2\beta_3\alpha_3$ en què les tres fulles β es disposen de manera antiparal·lela entre si. El plegament de tipus II es troba típicament en proteïnes procariotes i presenta una extensió $\alpha\beta$ en N-terminal al domini KH mínim (subratllat), amb una estructura $\alpha_1\beta_1\beta_2\alpha_2\alpha_3\beta_3$ en què les dues fulles β_2 i β_3 són paral·leles entre si i antiparal·leles a β_1 (figura I.1). Un segon *loop* menys conservat tant en seqüència d'aminoàcids com en llargada uneix les dues fulles β consecutives i se l'anomena *loop* variable. La localització d'aquest *loop* també és diferent segons el tipus de plegament: en el tipus I, el *loop* variable es troba entre les fulles β_2 i β_3 . En el tipus II, es troba entre β_1 i β_2 .

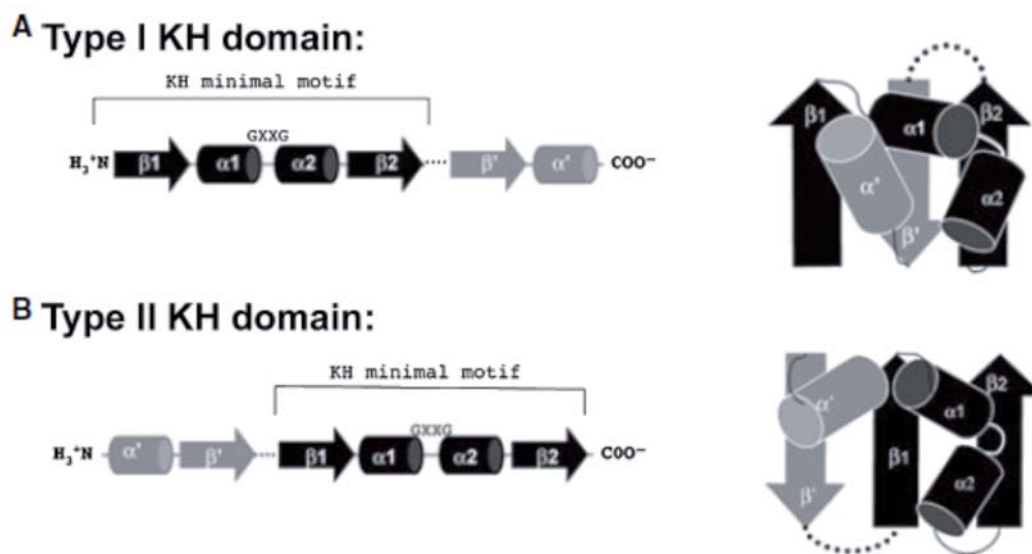


Fig. I.1. Plegaments dels dominis KH tipus I i II. A) Representació del domini KH tipus I (eucariòtic). **B)** Representació del domini KH tipus II (procariòtic). En negra es mostra el domini mínim KH. En gris es mostren les extensions N o C-terminal al domini mínim KH. El *loop* GxxG entre les hèlices α_1 i α_2 es mostra amb una línia blanca. El *loop* variable que connecta les dues fulles β consecutives es mostra amb una línia puntejada. (Extret de Valverde *et al.*, 2008)

1.2. Evolució dels dominis KH

El domini KH se sol trobar en múltiples còpies per proteïna: dues a FMRP (Siomi *et al.*, 1993b), tres a hnRNP K (Siomi *et al.*, 1993a), quatre a Vg1RBP (Deshler *et al.*, 1998), cinc a Bicaudal (Mahone *et al.*, 1995) i quinze a la Vigilina (Schmidt *et al.*, 1992; Musco *et al.*, 1996), entre d'altres. Una característica general de les proteïnes amb més d'un domini KH és que el primer domini KH sol ser més semblant al primer domini KH d'altres proteïnes de la mateixa família que al segon o tercer domini KH de la pròpia proteïna. El mateix passa en comparar el segon o el tercer domini KH (figura. I.2). Aquest fet es repeteix en diferents famílies i diverses espècies, i es dona el cas que dominis similars en membres de la mateixa família tenen més d'un 95% d'identitat i, en canvi, entre dominis dins de la mateixa proteïna, aquesta no sol superar el 50%.

	FMRP KH1	FMRP KH2	FXR1 KH1	FXR1 KH2	FXR2 KH1	FXR2 KH2	dmFMR1 KH1	dmFMR1 KH2
FMRP KH1	100.0	-	-	-	-	-	-	-
FMRP KH2	21.7	100.0	-	-	-	-	-	-
FXR1 KH1	82.0	23.0	100.0	-	-	-	-	-
FXR1 KH2	20.3	55.2	17.7	100.0	-	-	-	-
FXR2 KH1	64.3	20.0	68.6	19.0	100.0	-	-	-
FXR2 KH2	21.7	53.7	22.9	82.0	22.8	100.0	-	-
dmFMR1 KH1	54.4	22.1	58.8	23.1	58.8	25.6	100.0	-
dmFMR1 KH2	22.5	43.1	24.0	65.3	26.7	62.5	22.6	100.0

	NOVA-1 KH1	NOVA-1 KH2	NOVA-1 KH3	NOVA-2 KH1	NOVA-2 KH2	NOVA-2 KH3
NOVA-1 KH1	100.0	-	-	-	-	-
NOVA-1 KH2	35.3	100.0	-	-	-	-
NOVA-1 KH3	40.3	37.3	100.0	-	-	-
NOVA-2 KH1	95.5	36.8	36.8	100.0	-	-
NOVA-2 KH2	32.4	86.3	34.3	34.3	100.0	-
NOVA-2 KH3	38.8	35.8	90.9	37.3	35.4	100.0

	PCB1 KH1	PCB1 KH2	PCB1 KH3	PCB2 KH1	PCB2 KH2	PCB2 KH3
PCB1 KH1	100.0	-	-	-	-	-
PCB1 KH2	33.8	100.0	-	-	-	-
PCB1 KH3	35.4	33.8	100.0	-	-	-
PCB2 KH1	95.2	33.8	32.3	100.0	-	-
PCB2 KH2	35.4	93.8	31.0	35.4	100.0	-
PCB2 KH3	33.8	35.4	92.1	30.8	32.4	100.0
PCB3 KH1	88.7	32.3	36.9	90.3	33.8	35.4
PCB3 KH2	35.4	84.6	35.4	33.8	89.2	36.9
PCB3 KH3	36.4	38.5	84.1	33.3	40.0	84.1
PCB4 KH1	74.2	35.4	35.4	69.4	33.8	35.4
PCB4 KH2	35.4	76.9	36.9	33.8	80.0	38.5
PCB4 KH3	33.8	33.8	66.7	30.8	35.4	71.4

Fig. I.2. Identitats de seqüència dels dominis KH dins d'una família de proteïnes. Per a cada família, les seqüències dels dominis KH individuals estan aliniats amb dominis KH en diferents posicions dins de la mateixa proteïna, i amb dominis en la mateixa posició de diferents proteïnes. El percentatge més alt d'identitat correspon invariablement a aquells dominis KH en la mateixa posició en diferents membres de la mateixa família. (Extret de Valverde *et al.*, 2008)

S'han proposat algunes hipòtesis per explicar l'origen i l'evolució dels dominis KH. Per exemple, si múltiples dominis KH en una proteïna provenen de duplicacions de gens, aquestes haurien hagut de tenir lloc abans que ocorregués l'evolució divergent que donaria lloc a cada un dels membres de la mateixa família. Alternativament, es podria

raonar que les identitats interdominis són el resultat d'una evolució convergent de dominis diferents en una proteïna mare, abans que la subseqüent evolució divergent donés lloc a la resta de la família.

1.3. Característiques generals d'unió a àcids nucleics per part del domini KH

Com ja s'ha comentat anteriorment el domini KH se sol trobar en múltiples còpies, però també existeixen casos en què només hi ha un domini KH per proteïna. És el cas de Merp1 (Spingola *et al.*, 2004), família STAR (Chen *et al.*, 1997), S3 (Urlaub *et al.*, 1995), RbfA (Dammel *et al.*, 1995) i ERA (Chen *et al.*, 1999). Tant si es troba sol com en múltiples còpies, el domini KH uneix principalment RNA i ssDNA.

A partir de resolucions d'estructures de dominis KH del tipus I i II en complex amb el seu substrat (Lewis *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Braddock *et al.*, 2002a,b; Ramos *et al.*, 2002; Backe *et al.*, 2005; Beuth *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2007; Fenn *et al.*, 2007; Garcia-Mayoral *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2009; Chao *et al.*, 2010), es dedueix que la manera d'unir RNA o ssDNA pels dominis KH tipus I o II és molt semblant: el domini KH uneix l'àcid nucleic formant una cavitat amb el *loop* conservat GxxG, les dues hèlices α , la fulla β que les segueix ($\beta 2$ per al tipus KH I, i $\beta 3$ per al tipus KH II), i el *loop* variable (figura. I.3).

El centre de la cavitat és hidrofòbic, essent els enllaços de Van der Waals els més comuns en aquesta zona, mentre que les interaccions que es donen per acabar d'unir la proteïna i l'àcid nucleic són majoritàriament enllaços de ponts d'hidrogen o interaccions electrostàtiques. El domini KH, a diferència d'altres dominis com Pumillo (Wang *et al.*, 2002), no presenta interaccions de van der Waals π - π entre bases de l'àcid nucleic i residus aromàtics de la cadena lateral dels aminoàcids. La cavitat α/β hidrofòbica on s'encabeix el RNA o el ssDNA és força estreta, i explicaria per què el domini KH sol unir preferentment bases pirimidíniques i no púriques. Les bases pirimidíniques contenen un sol anell aromàtic i això les fa més petites que les púriques, que en tenen dos (Braddock *et al.*, 2002a,b; Beuth *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2005).

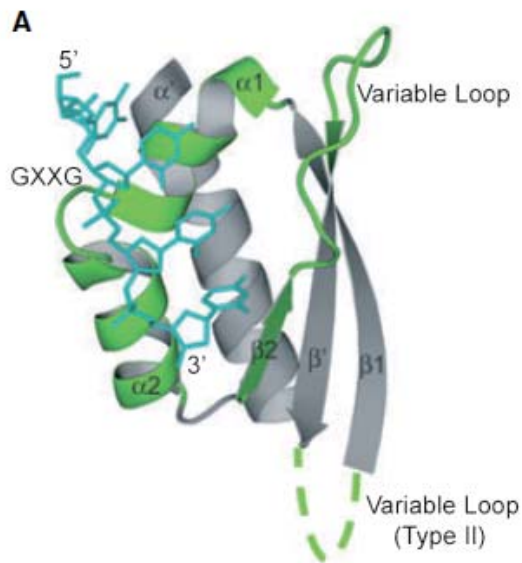


Fig. I.3. Estructura en cinta d'un domini KH tipus I en complex amb un àcid nucleic. La cavitat on s'uneix l'àcid nucleic està formada per l'hèlice $\alpha 1$, el *loop* GxxG, l'hèlice $\alpha 2$, la fulla $\beta 2$ i el *loop* variable. Les estructures implicades en la unió estan acolorides en verd. La línia verda puntejada representa la localització del *loop* variable en els dominis KH de tipus II. L'àcid nucleic es mostra en blau. (Extret de Valverde *et al.*, 2008)

Cada domini KH uneix un mínim de quatre nucleòtids (Braddock *et al.*, 2002a,b; Musunuru *et al.*, 2004; Backe *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2007), tot i que es pot ampliar el número de nucleòtids fins a un màxim de nou (Tu *et al.*, 2009) mitjançant diferents estratègies com ara tenir *loops* variables més llargs (és el cas de la família STAR (Liu *et al.*, 2001; Maguire *et al.*, 2005)), la presència de dominis addicionals (cas de la família STAR (Liu *et al.*, 2001; Maguire *et al.*, 2005) o la GTPasa ERA (Tu *et al.*, 2009)) o la juxtaposició de dominis (com el factor de transcripció NusA (Beuth *et al.*, 2005)). En totes les estructures trobades fins ara, el RNA/ssDNA s'orienta en l'espai de manera que el seus extrems 5' i 3' uneixen les regions C i N-terminal del domini KH, respectivament. L'estructura del domini es troba gairebé prefixada abans d'unir el RNA, excepte pels extrems N i C-terminals i els dos *loops*, i gairebé no canvia en unir-se al seu substracte, donant-se simplement una rigidificació dels *loops* (Liu *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2002; Backe *et al.*, 2005; Beuth *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2005).

Els dominis KH aïllats uneixen els seus substrats amb una constant de dissociació (K_d) bastant elevada, de l'ordre de micromols. Per exemple, els valors de K_d del domini KH de SF1 en complex amb RNA i del domini KH3 de hnRNP K en complex amb ssDNA són de $3 \mu\text{M}$ i $1 \mu\text{M}$ respectivament (Liu *et al.*, 2001; Braddock *et al.*, 2002a; Backe *et al.*, 2005). L'agrupació de diversos dominis KH en una mateixa proteïna és una tècnica per incrementar tant l'afinitat com l'especificitat cap al substracte, obtenint afinitats elevades, de l'ordre de nanomols: és el cas de la proteïna PSI, amb quatre dominis KH que uneixen el lligand cooperativament (Chmiel *et al.*, 2006). De la mateixa manera, els

dos dominis KH de la proteïna NusA uneixen el RNA amb una afinitat de nanomols (Beuth *et al.*, 2005), i els dominis KH3 i KH4 de la proteïna KSRP uneixen més fortament el seu substrat que per separat (Garcia-Mayoral *et al.*, 2007).

1.3.1. Interaccions entre dominis KH

Tot i que la majoria de proteïnes amb dominis KH solen presentar-ne més d'una còpia, la major part de les estructures resoltes fins ara només analitzen com actua un domini KH aïllat. Fins ara només s'han resolt sis estructures amb dominis KH en tàndem, amb i sense unió al seu substrat: la proteïna NusA aïllada (Worbs *et al.*, 2001) i en complex amb RNA (Beuth *et al.*, 2005), els dominis KH3 i KH4 de la proteïna Far-upstream element-binding (FBP) en complex amb ssDNA (Braddock *et al.*, 2002b), els dominis KH1 i KH2 de la proteïna de la Síndrome de X fràgil (FMRP) (Valverde *et al.*, 2007), els dominis KH3 i KH4 de la proteïna KH-type splicing regulatory (KSRP) (Garcia-Mayoral *et al.*, 2007), els dominis KH1 i KH2 de la proteïna humana PolyC-binding 2 (PCBP-2) (Du *et al.*, 2008) i els dominis KH3 i KH4 de la proteïna Zipcode binding (ZBP) (Chao *et al.*, 2010).

En tres de les sis estructures trobades els dominis KH no presenten cap interacció entre ells, i actuen de manera independent. És el cas de FBP, FMRP i KSRP (Braddock *et al.*, 2002b; Garcia-Mayoral *et al.*, 2007; Valverde *et al.*, 2007). En la proteïna FBP, els dos dominis KH es troben separats per un *linker* flexible de 30 aminoàcids ric en glicines. Una situació similar es dona en la proteïna KSRP, mentre que els dominis KH de FMRP es troben separats per un sol aminoàcid i queden formant un angle de 60°, amb poques interaccions entre ells.

Les altres tres proteïnes, NusA, PCBP-2 i ZBP, presenten interaccions entre els seus dominis KH. En el cas de NusA, els dos dominis KH es troben separats per un *linker* de sis aminoàcids flexible que permet que els dominis KH interaccionin entre ells per formar una superfície contínua juntament amb el domini S1, a la qual s'uneix el RNA, que és desestructurat per NusA abans d'unir-s'hi (Worbs *et al.*, 2001; Beuth *et al.*, 2005). (Compareu les disposicions que adopten els dominis KH1 i KH2 en FMRP i NusA, figura I.4)

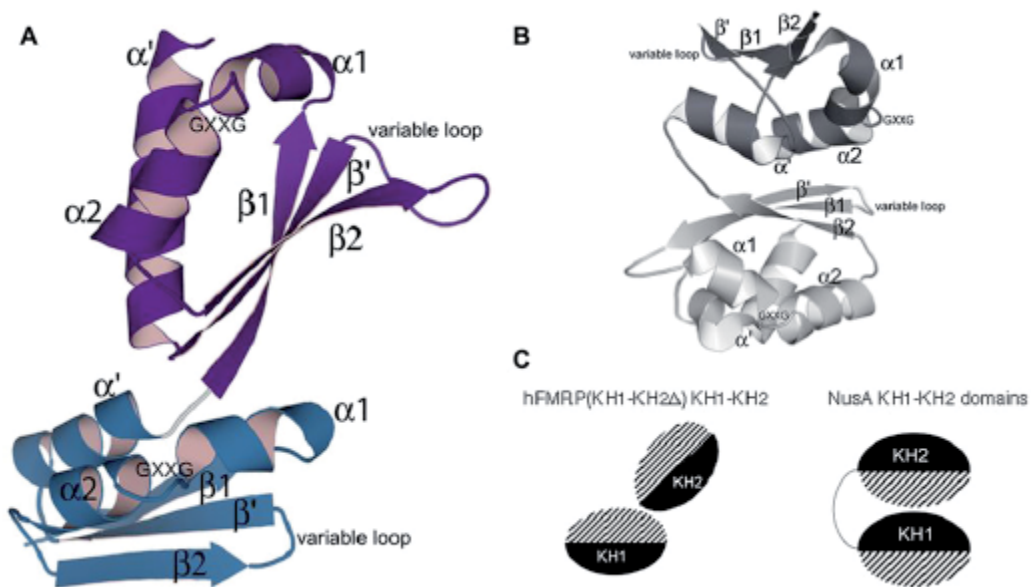


Fig. I.4. Comparació de les estructures cristal·lines dels dominis KH1 i KH2 de hFMRP i NusA. A) Estructura dels dominis KH1 i KH2 de hFMRP. Els dominis KH1 i KH2 estan colorejats en blau i morat respectivament. Els dos dominis KH, separats per un *linker* d'un sol aminoàcid, formen un angle de 60° que no permet formar prou interaccions entre els dos dominis. **B)** Estructura dels dominis KH1 i KH2 de NusA. Els dominis KH1 i KH2 estan acolorits en gris clar i gris fosc respectivament. Un *linker* de sis aminoàcids flexible permet juxtaposar els dos dominis KH un sobre l'altre, formant una superfície d'unió contínua. **C)** Representació esquemàtica dels dominis KH1 i KH2 de les proteïnes hFMRP i NusA. Cada domini KH és representat amb un oval; les tres fulles β es representen en negre; les tres hèlices α que s'empaqueten contra les fulles β es representen en ratlles negres i blanques. (Extret de Valverde *et al.*, 2007)

A PCBP-2 i ZBP, els dominis KH formen un pseudodímer en què els dominis KH s'alineen antiparal·lelament, formant una superfície de sis fulles β amb els *loops* conservats GxxG en direccions oposades (Du *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 2010). En el cas de ZBP, a més d'enllaços entre els dominis KH pròpiament dits, el pseudodímer es troba estabilitzat per interaccions amb els aminoàcids del *linker*, i mutacions en aquest aminoàcid provoquen la desestabilització del dímer i aboleixen la unió a RNA. Aquesta disposició dels dominis fa que els llocs d'unió a RNA dels dos dominis KH quedin en un angle de 180° en direccions oposades. Si el RNA reconegut és curt, cada substrat pot unir un domini KH per separat, però en el cas de ZBP, en què la seqüència zipcode conté 28 nucleòtids amb les seqüències d'unió als dos extrems (Chao *et al.*, 2010), aquesta disposició dels dominis obliga el RNA a plegar-se en un angle de 180° per poder unir els dos dominis KH simultàniament.

L'arquitectura del domini KH només permet la unió d'uns pocs nucleòtids per domini. Moltes proteïnes d'unió a àcids nucleics contenen diversos dominis KH per millorar l'afinitat i selectivitat cap als seus substrats. A més a més, aquests dominis KH poden arranjar-se en orientacions molt precises, interaccionant entre ells per afegir restriccions addicionals als substrats a unir (figura I.5).

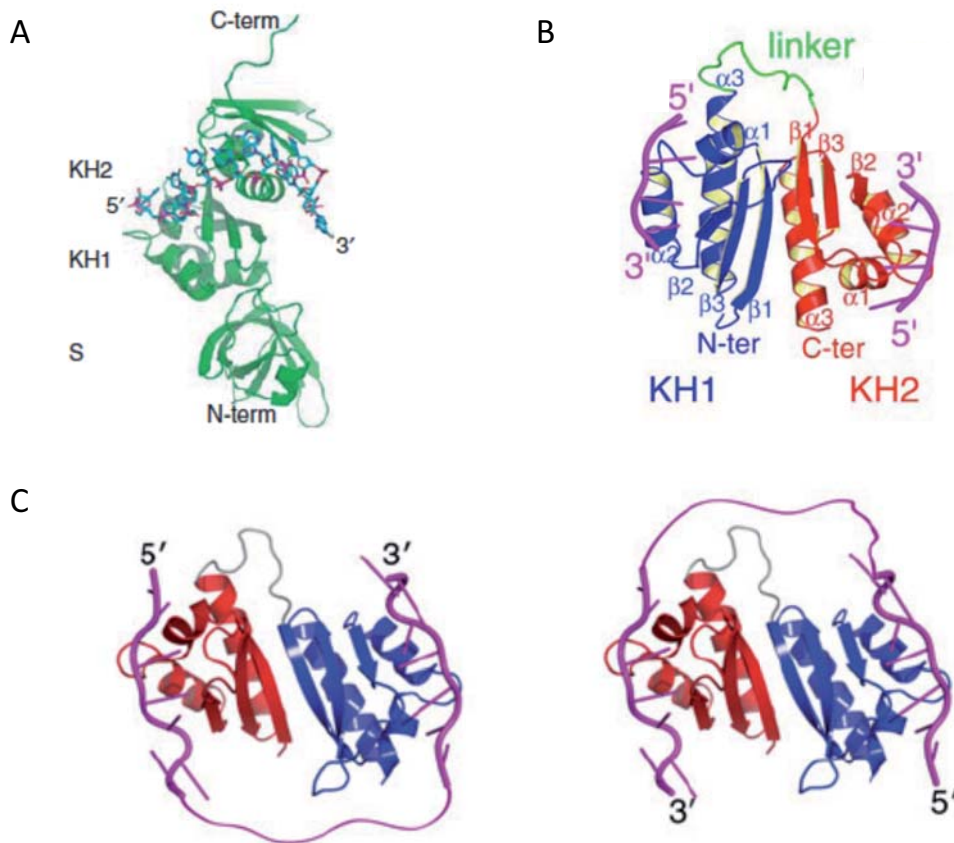


Fig. I.5. Estructures de les proteïnes NusA, PCBP-2 i ZBP en complex amb els seus substrats. A) La proteïna NusA uneix RNA mitjançant els seus dos dominis KH formant una superfície extensa de contacte. El RNA s'hi uneix en una conformació estesa i sense estructura secundària. **B)** Estructura en solució de PCBP-2 unida a ssDNA. Els dominis KH interaccionen en una conformació antiparal·lela formant una superfície estesa de sis fulles β . Les superfícies d'unió a RNA de cadascun dels dominis queden orientades en direccions oposades. **C)** Estructura en solució de ZBP en complex amb RNA. Els dominis KH3 i KH4 s'orienten d'una manera molt similar als de PCBP-2, amb les dues superfícies d'unió a RNA en extrems oposats, cosa que obliga el RNA a doblegar-se sobre si mateix si vol interaccionar amb els dos dominis KH. S'han proposat dos models d'unió. (Adaptat de Beuth *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2008 i Chao *et al.*, 2010)

1.4. Dimerització dels dominis KH

Diversos estudis estructurals havien observat la dimerització de dominis KH aïllats i s'havia proposat que podien actuar no solament com a dominis d'unió a àcids nucleics, sinó també com a dominis d'interacció proteïna-proteïna (Lewis *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2007). De totes maneres, no es podia descartar que les dimeritzacions entre dominis KH en les estructures cristal·lines fossin un artefacte que no es donés *in vivo*. Altres estudis bioquímics havien trobat algunes proteïnes amb dominis KH que dimeritzaven entre elles o interaccionaven amb altres proteïnes: la proteïna de *Xenopus* Vg1RBP dimeritzava amb si mateixa de forma dependent dels dominis KH (Git *et al.*, 2002), les proteïnes de la família STAR dimeritzaven entre elles (Chen *et al.*, 1997) i la proteïna S3 interaccionava amb p53 i MDM2 de forma dependent del domini KH (Yadavilli *et al.*, 2009). En cap cas, però, s'havia pogut demostrar que el domini KH aïllat fos el responsable de les interaccions.

La resolució de l'estructura dels dominis KH1 i KH2 de PCBP-2 va aportar una nova visió al tema (Du *et al.*, 2008). Els dominis KH1 i KH2 presenten una gran superfície hidrofòbica que comprèn residus de la fulla β 1 i l'hèlice α 3 (figura I.6).

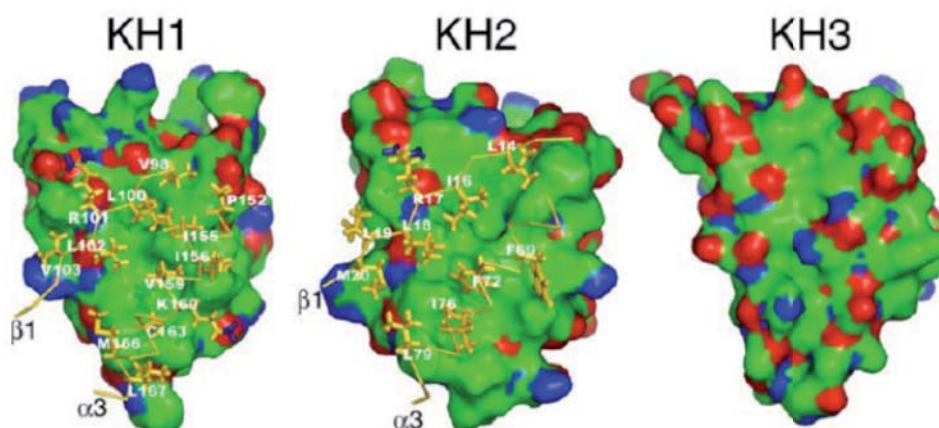


Fig. I.6. Superfície de dimerització dels dominis KH1 i KH2 de PCBP-2. Representació colorimètrica de la superfície de potencial electrostàtic. El color blau indica superfície carregada positivament (hidrofílica). El color vermell indica superfície carregada negativament (hidrofílica). El color verd marca la superfície hidrofòbica. Els dominis KH1 i KH2 de PCBP-2 presenten una gran superfície hidrofòbica d'aproximadament la mateixa mida. Com a comparació, es mostra la superfície de KH3 de PCBP-2. (Extret de Du *et al.*, 2007)

Aquesta superfície seria inestable si estigués exposada al solvent, fent-la molt adequada com a plataforma d'interacció proteïna-proteïna. La dimerització dels dos dominis a través d'interaccions hidrofòbiques entre les fulles $\beta 1$ i les hèlices $\alpha 3$ de cada domini evita aquesta interacció desfavorable al solvent, i forma una superfície de sis fulles β amb els *loops* conservats GxxG en direccions oposades. Aquest arranjament deixa la superfície d'interacció amb el RNA a la cara oposada de la superfície d'interacció proteïna-proteïna, i permet que aquestes tinguin lloc al mateix temps que les interaccions proteïna-àcid nucleic. Els autors proposen que aquesta superfície d'interacció proteïna-proteïna pot interaccionar no solament amb el domini KH adjacent, sinó que també pot fer-ho amb el domini KH d'una altra molècula de PCBP-2, o amb qualsevol altra proteïna (figura I.7).

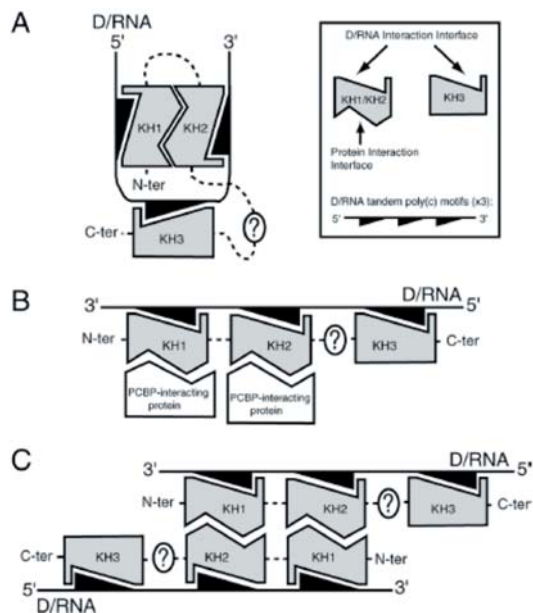


Fig. I.7. Possibles models d'unió a RNA o DNA cooperatius per part dels dominis KH de la proteïna PCBP-2. Els tres dominis KH de la proteïna PCBP-2 són capaços d'interaccionar amb RNA/DNA. Els dominis KH1 i KH2, a més, són capaços de mediar interaccions proteïna-proteïna. En el dibuix es mostren tres tipus d'unió de PCBP-2 a un àcid nucleic amb tres llocs d'unió (motius rics en C) separats per 2 o 3 nucleòtids. (Extret de Du *et al.*, 2008)

Aquesta superfície d'unió però, no s'ha trobat a tots els dominis KH. De fet, el domini KH3 de PCBP-2 no presenta cap superfície hidrofòbica prou gran com per ser una plataforma d'interaccions proteïna-proteïna, i la comparació d'estructures en solució del domini KH3 aïllat o en la proteïna sencera PCBP-2 demostren que KH3 actua sol i no dimeritza (figura I.6) (Fenn *et al.*, 2007).

1.5. Proteïnes amb dominis KH

Les proteïnes amb dominis KH es troben a tots els regnes animals, des d'arcea a mamífers, i es troben involucrades en funcions molt diverses, donant fe de la versatilitat del domini KH.

Entre les proteïnes procariotes trobem el factor de transcripció NusA, involucrat en elongació transcripcional, *pausing*, terminació, antiterminació i, com s'ha vist recentment, en la supressió de mutagènesi induïda per l'estrès (Ito *et al.*, 1991; Cohen *et al.*, 2010); la GTPasa ERA, implicada en la biogènesi dels ribosomes (Chen *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2005); RbfA (Ribosome-binding protein), una proteïna adaptadora de *cold-shock* (Dammel *et al.*, 1995), i la proteïna ribosomal S3, que forma part de la subunitat del ribosoma 30S i es troba involucrada en la traducció de proteïnes, la maduració de la subunitat 40S del ribosoma i la reparació del DNA (Urlaub *et al.*, 1995; Schäfer *et al.*, 2006; Yadavilli *et al.*, 2007). Com ja s'ha comentat al capítol 1.1, totes les proteïnes procariotes de les quals s'ha resolt l'estructura tridimensional presenten un plegament del domini KH de tipus II.

Entre les proteïnes eucariotes amb dominis KH, es troben proteïnes implicades en:

- I) Localització de mRNAs en compartiments cel·lulars determinats i repressió traduccional associada a aquesta localització: KHD1, proteïna de *S. cerevisiae* que reprimeix l'expressió del mRNA Ash1 (entre d'altres) en ser traslladat a la cèl·lula filla (Irie *et al.*, 2002); Bicardal, proteïna de *Drosophila* que localitza el mRNA Oskar al pol posterior de l'embrió i n'impedeix la seva traducció prematura (Mahone *et al.*, 1995; Saffman *et al.*, 1998); VgRBP1, proteïna de *Xenopus* implicada en la localització del mRNA Vg1 al còrtex vegetal (Deshler *et al.*, 1997; Deshler *et al.*, 1998).
- II) *Splicing*: PSI (P-element somatic inhibitor), proteïna de *Drosophila* implicada en la inhibició del *splicing* de diferents pre-mRNAs associats a processos d'especificitat de gènere o teixit, sobretot a la línia somàtica (Siebel *et al.*, 1994; Siebel *et al.*, 1995); la proteïna KSRP (KH-type splicing regulatory

protein) implicada també en el decaïment del mRNA i en la maduració de pri-miRNAs (Min *et al.*, 1997; Gherzi *et al.*, 2004); Mer1, proteïna de *S. cerevisiae* necessària per a la correcta segregació a meiosi (Engebrecht *et al.*, 1990; Spingola *et al.*, 2004); la proteïna SF1 (Splicing factor 1), membre de la família STAR, involucrada també en la retenció de pre-mRNAs al nucli (Krämer, 1992; Rutz *et al.*, 2000) i les proteïnes NOVA-1 i NOVA-2, implicades en la malaltia POMA, en què els pacients desenvolupen anticossos contra aquestes proteïnes impedit el correcte *splicing* de proteïnes implicades en funcions neuronals (Buckanovich *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1998).

- III) Transcripció: les proteïnes hnRNP K (Heterogeneous nuclear ribonucleo-protein K) i FBP (Fuse binding protein), activadores de la transcripció de l'oncogen *c-myc* (Matunis *et al.*, 1992; Takimoto *et al.*, 1993; Duncan *et al.*, 1994; He *et al.*, 2000).
- IV) Estabilització de mRNAs: les proteïnes PCBP1-4 (polyC-binding protein 1-4) estabilitzen el mRNA de la α -globulina d'eritròcits entre d'altres mRNAs i també es troben implicades en la regulació de la transcripció i de la traducció (Leffers *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2009).
- V) Regulació de la traducció: MEX-3, proteïna de *C. elegans* que actua com a repressor de la traducció de mRNAs implicats en la polaritat anteroposterior a l'embrió (Draper *et al.*, 1996); la proteïna Vigilina, implicada també en l'estabilització de mRNAs i en la segregació cromosòmica (Schmidt *et al.*, 1992) i la proteïna FMRP (Fragile X mental retardation protein), la mutació de la qual provoca la Síndrome de X fràgil, una de les causes més comunes de retard mental en humans (Pieretti *et al.*, 1991; Siomi *et al.*, 1994).
- VI) Transducció de senyal: proteïnes de la família STAR (Signal transduction activator of RNA metabolism), caracteritzades per presentar un domini d'unió a RNA d'uns 200 aminoàcids anomenat SGS que inclou un domini KH divergent flanquejat per unes seqüències en N i C-terminal anomenades QUA1 i QUA2. Són membres d'aquesta família les proteïnes Sam68, implicada en

múltiples processos com l'exportació de pre-mRNAs, *splicing* alternatiu, creixement celular, la proteïna GLD-1, requerida per la diferenciació de la línia germinal a *C. elegans*, SF1, la proteïna de *Drosophila* How, implicada en el desenvolupament de teixits, i la proteïna de ratolí Quaking, implicada en el procés de mielinització del sistema nerviós central (Vernet *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997).

Les proteïnes eucariotes de les quals s'ha resolt l'estructura tridimensional d'algun dels seus dominis KH presenten un plegament de tipus I. Malgrat que no s'ha descrit cap proteïna eucariota que presenti un plegament de tipus II, aquest fet no es pot descartar del tot ja que existeixen homòlegs a organismes eucariotes de les proteïnes ERA i S3 (Akiyama *et al.*, 2001; Yadavilli *et al.*, 2007), les quals adopten una estructura de tipus II a procariotes.

2. LES VIGILINES

2.1. Característiques generals de les vigilines

Com ja s'ha comentat en el capítol anterior, moltes proteïnes presenten més d'una còpia del domini KH o inclouen altres dominis per millorar l'afinitat i l'especificitat d'unió a l'àcid nucleic. En el cas de les vigilines, una família de proteïnes amb dominis KH, aquesta multiplicació s'ha portat a l'extrem. Les vigilines són una família de proteïnes trobades a tots els eucariotes analitzats fins ara que presenten una estructura molt característica: estan formades exclusivament per dominis KH de tipus I i en presenten catorze o quinze còpies consecutives, sense cap altre domini d'unió a RNA, quedant només regions curtes als extrems N-terminal i C-terminal que no estan formades per dominis KH.

Per comparació de seqüència, es va predir que les vigilines estaven formades per catorze dominis KH (Schmidt *et al.*, 1992), però la resolució de l'estructura tridimensional d'un d'ells (Musco *et al.*, 1996) va posar de manifest l'existència d'un quinzè domini KH degenerat a l'extrem N-terminal de la proteïna. Aquesta observació coincidia amb l'organització genòmica del gen en què, en el cas de la vigilina humana i de pollastre, s'havia vist que gairebé tots els dominis KH eren codificats per dos exons, un que codificava el motiu conservat (subdomini A) i un altre que codificava per una hèlix α en C-terminal (subdomini B) (Henkel *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1992). Aquesta organització genòmica es conservava en aquest quinzè domini KH (Kruse *et al.*, 1998b).

Les vigilines d'eucariotes superiors presenten una elevada homologia entre elles, que va des d'un 86% a *Xenopus laevis* (Dodson *et al.*, 1997) fins a un 97,7% a ratolí (Rohwedel *et al.*, 2003) si les comparem amb la vigilina humana. En general presenten dominis KH conservats, amb el loop GxxG intacte. També es conserva la presència d'un *loop* variable més llarg al domini KH12 (figura I.8). A eucariotes inferiors, aquesta homologia baixa fins a un 20% en el cas del llevat *S. cerevisiae* (Weber *et al.*, 1997), tot i que l'estructura secundària dels dominis és la mateixa en totes les proteïnes de la família. La vigilina de llevat, Scp160, presenta catorze dominis KH enlloc de quinze, dels quals set són degenerats (Weber *et al.*, 1997) (figura I.8). S'ha demostrat, però, que els dominis

ni la inhibició de qualsevol export nuclear altera la localització de la proteïna (Li *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007b). En la resta de vigilines no s'ha provat la funcionalitat del senyal d'export nuclear.

2.2. Funcions de les vigilines

El domini KH d'unió a àcids nucleics present en l'estructura de la vigilina involucra aquestes proteïnes en el metabolisme dels àcids nucleics de cadena senzilla, com ho reflecteixen les circumstàncies en què es van aïllar les vigilines de *Xenopus laevis* i *Drosophila* (Dodson *et al.*, 1997; Cortés *et al.*, 1999). Tot i que cada cop sabem més sobre la naturalesa dels àcids nucleics units per les vigilines, la disparitat de processos en què s'han vist implicades fa difícil assignar-los una funció en concret. Sembla clar, però, que la conservació de la seva peculiar estructura al llarg de l'evolució és biològicament rellevant, i la repetitivitat dels dominis KH deu ser important per a la funció o funcions que les vigilines puguin realitzar a la cèl·lula. Aquesta repetitivitat podria ser donada per requeriment dels seus substrats, o simplement li atorgaria una gran flexibilitat a l'hora de poder unir molts substrats diferents. Experiments realitzats a llevat suggereixen que no només el nombre de dominis KH determina la funcionalitat de Scp160 sinó que també compta en quin ordre es col·loquen, i que cada domini KH té funcions compartides i funcions úniques que fan que els dominis KH no siguin absolutament intercanviables entre si (Brykailo *et al.*, 2007a).

L'elevada flexibilitat funcional que li confereixen els quinze dominis KH es veu reflectida en els múltiples processos en què es va identificar la vigilina en els diferents organismes: la vigilina de pollastre va ser aïllada en estudiar diferències d'expressió de proteïnes entre cèl·lules de pollastre no diferenciades (condròcits) i cèl·lules diferenciades (fibroblasts) (Schmidt *et al.*, 1992); la vigilina humana es va clonar en buscar un receptor de membrana per a la proteïna HPL (High density lipoprotein) (McKnight *et al.*, 1992); la vigilina de *S. cerevisiae*, Scp160, va ser clonada per casualitat en fer un *screening* amb un anticòs que s'havia fet contra una fracció de llevat (Wintersberger *et al.*, 1995), i ja prèviament s'havia descrit un clon parcial que codificava per part de la proteïna, també clonada per la seva capacitat d'interaccionar amb un anticòs, en aquest cas contra una proteïna d'unió a DNA mitocondrial (Delahodde *et al.*, 1986); la proteïna

de *Xenopus laevis* va ser aïllada per la seva capacitat de protegir el mRNA de la vitel·logenina de la degradació provocada per estrogen (Dodson *et al.*, 1997), mentre que la proteïna de *Drosophila*, DDP1, es va clonar en buscar una proteïna que pogués unir la cadena pirimidínica de dodecasatèl·lit, un satèl·lit centromèric de *Drosophila* (Cortés *et al.*, 1999).

Les vigilines s'han vist implicades en múltiples i diferents processos cel·lulars, però en línies generals es proposen dues funcions principals: regulació de diferents aspectes del metabolisme del RNA, des de l'export de tRNA a la traducció del mRNA i contribució a la formació i/o manteniment de l'heterocromatina.

2.2.1. Les vigilines com a reguladores del metabolisme del RNA

Les vigilines es localitzen majoritàriament als poliribosomes de membrana i interaccionen amb proteïnes ribosomals (Weber *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 2000; Frey *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 2003; Vollbrandt *et al.*, 2004; Wen *et al.*, 2010). Aquesta localització suggereix un paper de les vigilines en la traducció de proteïnes. En funció dels RNAs que uneixen i dels fenotips que provoca la seva mutació, s'han proposat dues grans funcions per a les vigilines en la regulació del metabolisme del RNA: I) regulació general de la síntesi de proteïnes, II) regulació de la traducció de mRNAs específics.

I) Les vigilines com a reguladors generals de la síntesi de proteïnes: La funció de les vigilines com a reguladors generals de la síntesi proteica es fonamenta en dues dades: la primera és l'observació que la vigilina s'expressa en major quantitat en teixits o cèl·lules que es troben en procés de divisió i que tenen, per tant, uns elevats nivells de síntesi de proteïnes. L'aturada del creixement cel·lular d'aquests teixits o cèl·lules per diferenciació o per manca d'alimentació provoca una baixada dels nivells d'expressió de la vigilina (Neu-Yilik *et al.*, 1993; Kruse *et al.*, 1998a,b; Hilgendorf *et al.*, 2001; Hilgendorf *et al.*, 2003; Kruse *et al.*, 2003). La segona és l'observació que la vigilina humana forma part de dos complexos involucrats en el metabolisme del tRNA: la vigilina s'ha trobat en complexos citoplasmàtics i nuclears que contenen tRNA i eEF1A (Elongation factor 1A). Aquests complexos tenen composicions proteiques diferents en funció del compartiment cel·lular i són capaços d'unir tRNA i protegir-lo de la degradació (Kruse *et*

al., 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2000). A més a més, en el complex nuclear s'ha trobat la proteïna Exportin-t, el principal receptor d'export nuclear de tRNA (Kruse *et al.*, 2000; Kutay *et al.*, 1998). Segons els autors, la vigilina formaria part de complexos implicats en l'export de tRNA del nucli als ribosomes, contribuint d'aquesta manera a la síntesi proteica general de la cèl·lula (Kruse *et al.*, 2000; Vollbrandt *et al.*, 2004). Aquesta hipòtesi es veu corroborada pel fet que, la vigilina és capaç d'unir tRNA *in vitro*, injeccions al nucli de cèl·lules humanes amb vigilina recombinant o amb els complexos trobats incrementen l'export al citoplasma de tRNA marcat fluorescentment i que la coinjecció d'anticossos de la vigilina inhibeix aquesta estimulació (Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2000, Hilgendorf *et al.*, 2001; Hilgendorf *et al.*, 2003; Schuh *et al.*, 2003).

No obstant, experiments duts a terme per altres investigadors descriuen una baixa afinitat de les vigilines pel tRNA (Weber *et al.*, 1997; Kanamori *et al.*, 1998; Cortés *et al.*, 2000), i que la delecio de la vigilina mitjançant RNAi (RNA d'interferència) no provoca una baixada general de la síntesi de proteïnes mesurada per la incorporació de metionina marcada amb ³⁵S (Goolsby *et al.*, 2003).

II) Les vigilines com a reguladors de mRNAs específics: La primera evidència que es va tenir que les vigilines podien actuar com a reguladors de mRNAs específics va ser amb el descobriment de la vigilina de *Xenopus laevis* (Dodson *et al.*, 1997). Aquests autors van demostrar que la vigilina uneix l'extrem 3'-UTR del mRNA de la vitel·logenina i el protegeix de la degradació mediada per l'endonucleasa PMR-1, emmascarant-ne el lloc de tall (Cunningham *et al.*, 2000). Els autors van proposar que les vigilines actuarien com a estabilitzadors de mRNAs específics perquè el mRNA de l'albumina és degradat per PMR-1 en les mateixes condicions en què el mRNA de la vitel·logenina es troba protegit, i perquè anàlisis *in vitro* del lloc d'unió a RNA de la vigilina van demostrar que la vigilina podia unir altres mRNAs apart del de la vitel·logenina, sense que la seva unió fos causada per interaccions amb la cadena de poli(A) de l'extrem 3'-UTR dels mRNAs (Kanamori *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 2000).

Més endavant s'han trobat les vigilines en diversos complexos relacionats amb la traducció de mRNAs específics. A *Drosophila* s'ha trobat DDP1 formant part d'un complex amb Pab1p (Poli(A) binding protein 1) i Hrp48 (hnRNP 48) que uneix l'extrem

3'-UTR del mRNA de la proteïna Hsp83 (Nelson *et al.*, 2007). Els autors suggereixen que aquest complex actua com a estimulador de la traducció de mRNAs que contenen en 3'-UTR la seqüència HDE (Hsp83 element degradation). A llevat, Scp160 forma part de, com a mínim, dos complexos: un complex amb Bfr1 i la proteïna d'unió a poli(A) Pab1p (Lang *et al.*, 2000), i SESA, un complex amb l'inhibidor general de la traducció EAP1, el receptor de la kinasa-C activada Asc1, i la proteïna associada al reticle endoplasmàtic SMY2 (Sezen *et al.*, 2009). La purificació per afinitat dels RNAs units pel complex Scp160/Bfr1/Pab1p i la seva identificació per *microarrays* van donar enriquiments reproduïbles en un 1% dels mRNAs de llevat. En aquest cas Scp160 no regula l'estabilitat dels mRNAs, sinó que en regula la correcta localització als poliribosomes i molt possiblement la traducció (Li *et al.*, 2003a). El segon complex, SESA, inhibeix la traducció del mRNA de la proteïna POM34, una proteïna integral de membrana nuclear implicada en la biogènesi dels porus nuclears, quan el nou *Spindle Pole Body* no es pot inserir a la membrana nuclear (Sezen *et al.*, 2009).

Altres observacions que corroborarien la hipòtesi que les vigilines tenen un paper en la regulació de mRNAs específics serien les següents: a cèl·lules de mamífers la deleció de la vigilina mitjançant RNAi és letal tant en cèl·lules que es divideixen com en cèl·lules que no es troben en procés de divisió. Els autors van estudiar la incorporació de metionina marcada amb ³⁵S i van comprovar que la síntesi total de proteïnes no decreix en reduir el nivell de vigilina amb RNAi, fet que descarta que la mort de les cèl·lules sigui deguda a una aturada general de la síntesi de proteïnes (Goolsby *et al.*, 2003). A llevat, un anàlisi dels RNAs units per Scp160 va concloure que Scp160 uneix específicament un 25% dels mRNAs de *S. cerevisiae*, entre ells POM34, reforçant la possible funció de Scp160 com a regulador de mRNAs específics (Hogan *et al.*, 2008).

2.2.2. Contribució de les vigilines a la formació d'heterocromatina

Aquesta hipòtesi neix de la identificació de la vigilina de *Drosophila*, DDP1, com una proteïna capaç d'unir la cadena pirimidínica d'un satèl·lit centromèric de *Drosophila* (vegeu l'apartat 2.6). DDP1 s'ha trobat localitzada a l'heterocromatina centromèrica juntament amb HP1 (Heterochromatin protein 1), una proteïna associada a l'heterocromatina, i la seva mutació provoca mitosis aberrants en embrions i alteració

de marques heterocromàtiques a cromosomes politènics (Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2003; Huertas *et al.*, 2004; Piacentini *et al.*, 2009). A *S. cerevisiae*, s'ha proposat que Scp160 contribueix al silenciament telomèric i de *mating-type* (Marsellach *et al.*, 2006).

A mamífers, estudis de microscopia electrònica a cèl·lules de rata han trobat la vigilina a la cara interna de la membrana nuclear, associada amb regions heterocromàtiques (Klinger *et al.*, 1996, Kügler *et al.*, 1996a). La vigilina humana interacciona amb la metiltransferasa d'histones SUVAR39H1, localitza a satèl·lits centromèrics i l'expressió de dominants negatius de la vigilina causen alteracions de la ploïdia i canvis en les marques heterocromàtiques d'aquests satèl·lits (Wang *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008). En general es proposa que la vigilina contribueix a una correcta formació i/o manteniment de l'heterocromatina centromèrica, i que els defectes de segregació cromosòmica i alteracions de la ploïdia vistos a *Drosophila* i humans (Huertas *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008) podrien ser explicats per defectes en l'heterocromatina centromèrica (Kellum *et al.*, 1995a; Melcher *et al.*, 2000).

Per contra, semblaria que els defectes en la ploïdia i la segregació cromosòmica a *S. cerevisiae* causats per la manca de Scp160 serien causats per una incorrecta duplicació del *Spindle Pole Body* (SPB) (Sezen *et al.*, 2009). A més a més, en l'estudi sobre els mRNAs units per Scp160 apareixen mRNAs de proteïnes implicades en la duplicació del SPB i de proteïnes que formen complexos deacetiladors d'histones (Hogan *et al.*, 2008), suggerint que l'alleujament del silenciament telomèric observat en mutants de Scp160 podria explicar-se per una incorrecta traducció de trànscrips implicats en l'establiment de l'heterocromatina als telòmers i al *mating-type* (Wintersberger *et al.*, 1995; Marsellach *et al.*, 2006; Hogan *et al.*, 2008). D'altra banda, estudis recents suggereixen que a *S. pombe* la vigilina Vgl1 no es troba implicada en el manteniment de la ploïdia cel·lular (Wen *et al.*, 2010).

2.3. Localització de les vigilines

Les observacions discutides en els apartats anteriors suggereixen que les vigilines són unes proteïnes multifuncionals que podrien actuar al nucli i al citoplasma. Si la disparitat dels substrats que uneixen i dels processos en què s'han vist implicades fa

difícil assignar-los una funció en concret, l'anàlisi de la seva localització tampoc ajuda a aclarir-la: les dades que tenim sobre la localització de les vigilines són poques i fins a cert punt contradictòries.

Consistent amb una funció de les vigilines en la traducció de proteïnes, a *S. cerevisiae* i a *S. pombe*, les vigilines Scp160 i Vgl1 presenten una localització perinuclear consistent amb una associació als ribosomes del reticle endoplasmàtic rugós (Wintersberger *et al.*, 1995; Frey *et al.*, 2001; Marsellach *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2010). Estudis de microscopia electrònica han trobat que a cèl·lules de rata la vigilina es troba associada al reticle endoplasmàtic rugós (Klinger *et al.*, 1996; Kügler *et al.*, 1996a).

D'altra banda, recolzant la hipòtesi que la vigilina tindria una funció en la formació de l'heterocromatina, a *Drosophila* DDP1 es va trobar associada a cromosomes politènics, on colocalitza al cromocentre heterocromàtic i en algunes bandes discretes a l'eucromatina (Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2003; Piacentini *et al.*, 2009), mentre que estudis de microscopia electrònica a cèl·lules de rata han trobat la vigilina a la cara interna de la membrana nuclear, associada amb regions heterocromàtiques (Klinger *et al.*, 1996, Kügler *et al.*, 1996a). No obstant això, a *S. cerevisiae* Scp160 sembla exclosa del nucli (Li *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007b), mentre que a cèl·lules HEp-2 humanes no està clar que una petita part de la vigilina sigui nuclear (Neu-Yilik *et al.*, 1993; Kügler *et al.*, 1996a; Kruse *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008).

2.4. Scp160, la vigilina de *S. cerevisiae*

La vigilina de *S. cerevisiae*, Scp160, deu el seu nom, **S. cerevisiae** protein controlling the **p**loidy, al fenotip que provoca la seva deleció: increment de ploïdia i problemes de segregació cromosòmica (Wintersberger *et al.*, 1995). Més endavant, es va veure que era l'homòleg de les vigilines a *S. cerevisiae* i que presenta un 20 % d'homologia amb la vigilina humana (Weber *et al.*, 1997).

A diferència de les vigilines d'eucariotes superiors, Scp160 no és una proteïna essencial (Wintersberger *et al.*, 1995). La seva estructura també presenta diferències: consta de catorze dominis KH enlloc de quinze i el domini KH12 no té el *loop* variable més llarg

que els altres dominis. El percentatge de dominis KH degenerats també és més elevat, i només set dels catorze dominis tenen el motiu GxxG conservat (Weber *et al.*, 1997). Aquests dominis degenerats contribueixen a la funcionalitat de la proteïna en la mateixa proporció que els conservats, i ambdós tipus de domini són essencials per a la viabilitat de la soca mutant per SCP160/EAP1, en què *scp160* esdevé un gen essencial (Brykailo *et al.*, 2007a).

Scp160 presenta, per immunofluorescència i per fusions amb GFP, una localització perinuclear i citoplasmàtica (Wintersberger *et al.*, 1995; Frey *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Marsellach *et al.*, 2006; Brykailo *et al.*, 2007b). Scp160 conté un senyal de localització nuclear entre els dominis KH3 i KH4 i un senyal d'export nuclear en el domini N-terminal (Weber *et al.*, 1997). Aquests senyals de localització no semblen funcionals, ja que ni mutacions o delecions dels senyals de NLS o NES imparellen la localització o la funció de Scp160, ni la mutació de totes les vies d'export nuclear provoca l'acumulació de Scp160 al nucli (Li *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007b). A nivell més bioquímic, Scp160 s'ha trobat enriquida en els poliribosomes de reticle endoplasmàtic i citosòlics (Weber *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 2000; Frey *et al.*, 2001a). Els dominis N-terminal KH13 i KH14 són essencials per a aquesta localització (Baum *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007a).

Als poliribosomes, Scp160 existeix com a part d'un complex ribonucleoproteic amb les proteïnes Pab1p i Bfr1 (Lang *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2001). Pab1p (Poly(A) binding protein 1) és la proteïna majoritària d'unió a poly(A); es troba implicada en la biogènesi, estabilitat i traducció del mRNA i actua com a estimulador de la traducció interaccionant amb eIF4G (Adam *et al.*, 1986, Von der Haart *et al.*, 2000; Sonnenberg *et al.*, 2009). Bfr1 és un supressor de la letalitat produïda per Brefeldin A, té una localització perinuclear i per interacció de dos híbrids s'ha vist associada amb Bbp1p (Bfr1 binding protein 1), un component essencial per a la duplicació del *Spindle Pole Body* (SPB) (Jackson *et al.*, 1994; Xue *et al.*, 1996; Schramm *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2001). Aquest complex uneix mRNAs específics (Li *et al.*, 2003a) i suggereix un paper de Scp160 en la traducció de certs mRNAs.

Scp160 interacciona amb les proteïnes EAP1, SMY2 i Asc1p formant part d'un segon complex anomenat SESA (Sezen *et al.*, 2009). EAP1 és una proteïna d'unió al factor de l'inici de la traducció eIF4E, i actua com un inhibidor general de la traducció (Cosentino *et al.*, 2000). Smy2 és una proteïna de funcions desconegudes associada al reticle endoplasmàtic (Higashio *et al.*, 2008). Asc1p és una proteïna que forma part de la subunitat ribosomal 40S i es troba, entre altres funcions, implicada en transducció de senyal (Gerbasi *et al.*, 2004; Nilsson *et al.*, 2004; Zeller *et al.*, 2007). Aquest complex, en cooperació amb Bfr1, actuaria quan hi ha un problema en la inserció del nou SPB a la membrana nuclear durant la replicació del SPB, inhibint la traducció del mRNA de la proteïna POM34, una proteïna integral de membrana implicada en la biogènesi de porus nuclears (Miao *et al.*, 2006), i restaurant la viabilitat de la cèl·lula. Aquesta funció de Scp160 en la duplicació del SPB podria explicar els fenotips d'increment de ploïdia i problemes de segregació cromosòmica observats en mutants de Scp160 (Wintersberger *et al.*, 1995), alhora que reforça la idea de Scp160 com a regulador de mRNAs específics.

Un estudi posterior a gran escala de les interaccions entre proteïnes d'unió a RNA i RNAs va concloure que Scp160 uneix específicament un 25 % dels mRNAs de *S. cerevisiae*, entre ells POM34, reforçant la possible funció de Scp160 com a regulador de mRNAs específics (Hogan *et al.*, 2008). Aquest estudi també confirma que Scp160 i Bfr1 formen part d'un mateix complex, ja que les dues proteïnes uneixen gairebé el mateix grup de mRNAs.

A part de la seva funció en el metabolisme del RNA, s'ha proposat que Scp160 participa en la regulació del silenciament telomèric (Marsellach *et al.*, 2006). La mutació de Scp160 alleuja el silenciament telomèric i de *mating-type*, es troba associada a una menor deposició de Sir3 als telòmers i a una alteració de l'ancoratge dels telòmers a la membrana nuclear. Els autors suggereixen que Scp160 forma part de la membrana nuclear i juga un paper en l'ancoratge dels telòmers a la membrana nuclear, millorant el silenciament telomèric (Bupp *et al.*, 2007; Taddei *et al.*, 2009).

2.5. La vigilina humana

La vigilina humana va ser descoberta en buscar una proteïna receptora de membrana per a la lipoproteïna d'elevada densitat, HDL (McKnight *et al.*, 1992). Més endavant es va veure que era la vigilina humana (Plenz *et al.*, 1994), amb un 90 % d'homologia amb la vigilina de pollastre, la primera vigilina que es va descobrir (Schmidt *et al.*, 1992).

L'estructura del gen de la vigilina humana, igual que la vigilina de ratolí, presenta dos exons no traduïts de més a l'extrem 5' que no es troben en les vigilines de cap altre vertebrat superior (Kügler *et al.*, 1996b; Rohwedel *et al.*, 2003). Aquests exons no traduïts presenten *splicing* alternatiu (Kügler *et al.*, 1996b), i l'exó 1A, molt conservat entre humans i ratolins, conté una ORF que codifica per un pèptid de 13 aminoàcids que es localitza al reticle endoplasmàtic i regula negativament la traducció del mRNA de la vigilina (Kügler *et al.*, 1996b; Rohwedel *et al.*, 2003). Aquest resultat suggereix que la vigilina es troba regulada a nivell traduccional en resposta a canvis en la proliferació.

La vigilina humana és una proteïna essencial (Goolsby *et al.*, 2003) amb quinze dominis KH. Presenta tres dominis KH degenerats i conté un NLS entre els dominis KH3 i KH4 i un NES entre els dominis KH10 i KH11 (Plenz *et al.*, 1994). No està clar si aquests motius són funcionals: la fusió del NLS de la vigilina a una proteïna *reporter* n'altera la localització, que deixa de ser citoplasmàtica i es torna nuclear, suggerint que el NLS és funcional (Klügler *et al.*, 1996a). D'altra banda, fusions de GFP amb formes truncades de la vigilina en què s'han eliminat els dominis KH que contenen el motiu NES, no presenten acumulació al nucli, suggerint que el NLS no és funcional (Zhou *et al.*, 2008).

Les anàlisis per immunofluorescència i fusions amb GFP suggereixen que la vigilina humana es localitza majoritàriament al citoplasma i a la regió perinuclear i, en menor intensitat, al nucli (Neu-Yilik *et al.*, 1993; Kügler *et al.*, 1996a; Rohwedel *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008). Estudis mitjançant microscopia electrònica en cèl·lules de rata (97% d'homologia amb humans) han trobat la vigilina associada al reticle endoplasmàtic rugós i, en menor proporció, a la cara interna de la membrana nuclear, associada amb regions heterocromàtiques del nucli (Klinger *et al.*, 1996; Kügler *et al.*, 1996a).

Diversos estudis proposen que la vigilina humana té una funció en el metabolisme de diversos RNAs. S'ha trobat la vigilina humana en complexos citoplasmàtics i nuclears que contenen tRNA i eEF1A. Aquests complexos són capaços d'unir tRNA i protegir-lo de la degradació (Kruse *et al.*, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2000). A més a més, en el complex nuclear s'ha trobat la proteïna Exportin-t, el principal receptor d'export nuclear de tRNA (Kutay *et al.*, 1998; Kruse *et al.*, 2000). El fet que la vigilina s'associï als poliribosomes de membrana i uneixi proteïnes ribosomals (Vollbrandt *et al.*, 2004) suggereix un paper de la vigilina en el transport de tRNA del nucli als ribosomes. La vigilina humana també uneix amb afinitat RNAs hipereditats (Wang *et al.*, 2005). L'edició de RNAs més comuna consisteix a intercanviar el nucleòsid adenosina per inosina mitjançant una desaminació hidrolítica. La inosina és reconeguda per la maquinària de traducció com una guanosina. Aquesta edició és portada a terme per les proteïnes ADAR (Adenosine deaminases acting on RNA) (Nishikura, 2006). Consistent amb una funció en el metabolisme de l'edició del RNA, la vigilina formaria part d'un complex amb ADAR1 (Wang *et al.*, 2005).

S'ha proposat que la vigilina humana podria tenir una funció en la regulació de l'estructura de l'heterocromatina. A rata, la vigilina s'ha vist associada a l'heterocromatina per microscopia electrònica (Klinger *et al.*, 1996; Kügler *et al.*, 1996a). A més, s'ha trobat associada a seqüències del satèl·lit α heterocromàtic (Wang *et al.*, 2005) i formant un complex amb SUV39H1 (Zhou *et al.*, 2008), la metiltransferasa d'histones que metila la lisina 9 de la histona H3 i forma un lloc d'unió per HP1a (Aagaard *et al.*, 1999; Lachner *et al.*, 2001). L'expressió d'un dominant negatiu de la vigilina en cèl·lules humanes provoca canvis en les marques heterocromàtiques del satèl·lit β pericentromèric, altera el cicle cel·lular i augmenta el contingut de DNA a la cèl·lula, suggerint un defecte en la segregació cromosòmica que podria ser causat per alteracions en la heterocromatina centromèrica (Zhou *et al.*, 2008).

2.6. DDP1, la vigilina de *Drosophila melanogaster*

DDP1, la vigilina de *Drosophila melanogaster*, fou descoberta per la seva capacitat d'unir la cadena rica en pirimidines del dodecasatèl·lit de *Drosophila* (Cortés *et al.*, 1999). El dodecasatèl·lit és un satèl·lit del tipus *telomer-like* format per múltiples repeticions de la

seqüència GTACGGGACCGA, es troba localitzat al centròmer, en l'heterocromatina pericèntrica del braç dret del cromosoma 3, i és troba conservat al llarg de l'evolució (Abad *et al.*, 1992; Carmena *et al.*, 1993). Una característica dels satèl·lits del tipus *telomer-like* és la marcada asimetria que presenten les seves cadenes en la distribució de bases púriques i pirimidíniques, essent la cadena G rica en purines i la cadena C rica en pirimidines. La presència de seqüències amb aquesta distribució asimètrica de purines i pirimidines es troba conservada en els centròmers de la majoria d'espècies (Abad *et al.*, 1992; Grady *et al.*, 1992; Alfenito *et al.*, 1993; Carmena *et al.*, 1993). La conservació d'aquest tipus d'estructura al llarg de l'evolució pot reflectir que l'asimetria entre cadenes és necessària per al correcte funcionament de les seqüències centromèriques.

La cadena rica en purines del dodecasatèl·lit té la capacitat de formar estructures intramoleculares estables de tipus *hairpin in vitro*, deixant la cadena rica en pirimidines desestructurada (Ferrer *et al.*, 1995; Ortiz-Lombardía *et al.*, 1998). La formació d'aquest *hairpin* en la cadena G del dodecasatèl·lit seria molt desfavorable si la cadena C no estigués estabilitzada d'alguna manera. Mitjançant experiments de *band-shift* es va detectar la presència en extractes nuclears de cèl·lules S2 d'una proteïna que unia de manera selectiva la cadena pirimidínica desestructurada del dodecasatèl·lit (Ferrer *et al.*, 1995). La purificació de la proteïna responsable de la unió a la cadena C va resultar en la identificació de la vigilina de *Drosophila*, que es va anomenar DDP1 per la seva capacitat d'unir el dodecasatèl·lit (*Drosophila* dodecasatellite binding protein 1) (Cortés *et al.*, 1999).

DDP1 conté quinze dominis KH i presenta una homologia del 26 % amb Scp160 i un 47 % amb la vigilina humana. La seva estructura s'assembla a la dels eucariotes superiors, amb només quatre dominis KH degenerats i la conservació d'un *loop* variable més llarg al domini KH12 (Cortés *et al.*, 1999). Conté diversos senyals de localització nuclear (Cortés *et al.*, 1999) i un senyal d'export nuclear entre els dominis KH10 i KH11 (Rohewedel *et al.*, 2003). No s'ha demostrat la funcionalitat de cap dels motius de localització cel·lular.

DDP1 s'ha vist majoritàriament associada al nucli, tot i que en alguns òrgans de la mosca, sobretot a ovaris, s'ha trobat DDP1 al citoplasma (Huertas *et al.*, resultats no publicats).

Experiments d'immunofluorescència amb anticossos proposen que DDP1 es torna nuclear a partir del cicle 13 de l'embriogènesi, quan es forma l'heterocromatina (Cortés *et al.*, 1999). Al nucli, DDP1 s'ha trobat associada als cromosomes politènics, on no es troba restringida a regions que contenen el dodecasatèl·lit, sinó que es localitza a tot el cromocentre (lloc on es localitza l'heterocromatina dels quatre cromosomes de *Drosophila*), suggerint que podria estar associada a altres DNAs heterocromàtics. DDP1 localitza en llocs discrets dels braços eucromàtics dels cromosomes politènics, on colocalitza amb la proteïna HP1 (Heterochromatin protein 1a), una proteïna associada a l'heterocromatina (James *et al.*, 1986; Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2003; Piacentini *et al.*, 2009) (figura I.9).

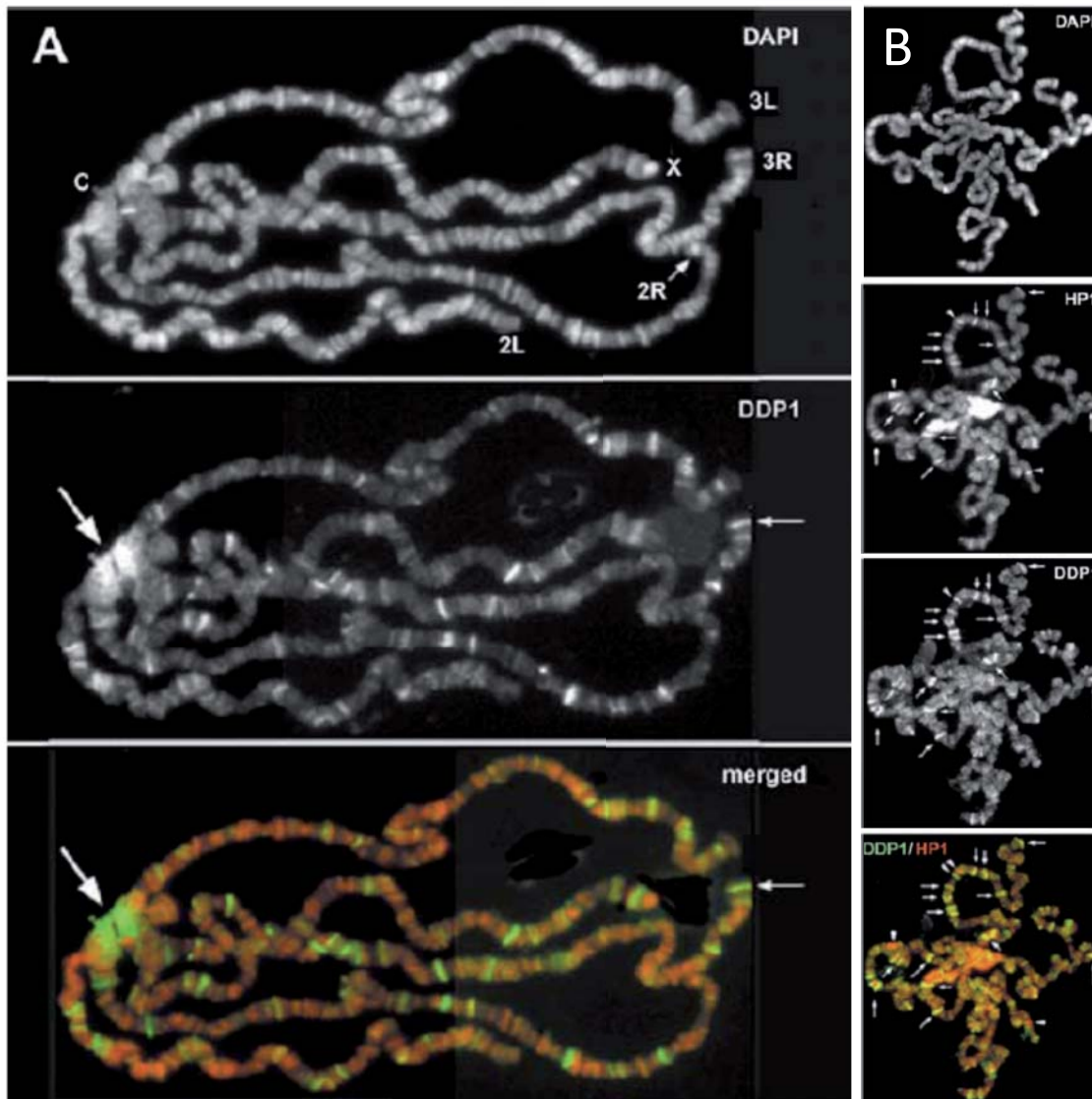


Fig. I.9. Immunolocalitzacions de DDP1 a cromosomes politènics. A) La proteïna DDP1 es localitza al cromocentre (fletxa grossa) i a altres localitzacions discretes als braços eucromàtics (fletxa petita). **B)** Colocalització de DDP1 i HP1. (Adaptat de Cortés *et al.*, 2003)

La seva localització en regions heterocromàtiques va suggerir que DDP1 podia tenir una funció en la formació i/o manteniment de la heterocromatina, estabilitzant les cadenes desestructurades riques en pirimidines dels satèl·lits tipus *telomer-like* centromèrics. Altres experiments reforcen aquesta hipòtesi: mutants hipomorfs de DDP1 es comporten com a supressors de la variegació (mecanisme mitjançant el qual un gen eucromàtic portat a prop de l'heterocromatina pateix silenciament per extensió de l'heterocromatina. El nivell de silenciament varia en cada cèl·lula i es transmet de pares a fills. Aquest fet es reflecteix en una expressió mosaica (variegada) del gen estudiat) i presenten alteracions de marques heterocromàtiques, amb disminució dels nivells de HP1 i me2K9H3. Al mateix temps, els mutants hipomorfs de DDP1 són molt poc viables i presenten problemes de segregació cromosòmica (Huertas *et al.*, 2004). També en cèl·lules S2 de *Drosophila* s'ha observat un efecte similar: la baixada dels nivells de DDP1 per RNAi provoca una deslocalització de HP1 i provoca problemes de ploïdia (Wang *et al.*, 2005).

Més recentment s'ha proposat una funció de DDP1 en l'estabilització de certs RNAs. DDP1 es troba formant part de, com a mínim, dos complexos diferents involucrats en l'estabilització de RNAs: un complex amb Pab1p, la proteïna majoritària d'unió a poly(A) implicada en la biogènesi, estabilitat i traducció del mRNA (Adam *et al.*, 1986; Von der Haart *et al.*, 2000; Sonnenberg *et al.*, 2009) i Hrp48 (hnRNP 48), una proteïna implicada en *splicing* (Hammond *et al.*, 1997). Aquest complex uneix l'extrem 3'UTR del mRNA de la proteïna Hsp83 i n'estimula la traducció (Nelson *et al.*, 2007). DDP1 forma un segon complex amb les proteïnes HP1, PEP i Hrb87F. PEP (Peptide on ecdysone puffs) és una proteïna d'unió a RNA i DNA associada als *puffs* (Hamman *et al.*, 1998). Hrb87F (hnRNA binding protein 87F) és la proteïna homòloga a hnRNP A-B a *Drosophila* i forma part dels complexos hnRNP (Haynes *et al.*, 1990; Raychaudhuri *et al.*, 1991). Aquest segon complex s'ha vist que localitza en llocs discrets dels braços eucromàtics on regularia positivament l'expressió de certs gens eucromàtics controlant l'estabilitat i/o l'empaquetament del transcrit sortint (Piacentini *et al.*, 2009). DDP1 també uneix amb afinitat RNAs hipereeditats i en humans s'ha trobat la vigilina humana en un complex amb ADAR1 (Wang *et al.*, 2005) (vegeu l'apartat 2.5).

III. OBJECTIUS

Les vigilines són una família de proteïnes altament conservades al llarg de l'evolució que en línies generals han estat implicades en dues funcions principals: la regulació de diferents aspectes del RNA, des de l'export de tRNA i edició de RNA a la traducció del mRNA (Kruse *et al.*, 1996; Dodson *et al.*, 1997; Kruse *et al.*, 1998b; Cunningham *et al.*, 2000; Kruse *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2000; Frey *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003a; Mendelsohn *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2007; Hogan *et al.*, 2008; Sezen *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2010), i la contribució a la formació i/o manteniment de l'heterocromatina (Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2000; Huertas *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Marsellach *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008). La disparitat de processos en què s'han vist implicades fa, però, difícil assignar-los una funció en concret. De fet, a l'hora d'estudiar la funcionalitat d'aquestes proteïnes, la seva localització també és font de controvèrsia: diferents estudis han relacionat les vigilines amb una localització citosòlica associada al reticle endoplasmàtic (Frey *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007b; Wen *et al.*, 2010), altres estudis han relacionat aquestes proteïnes amb una localització nuclear (Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2003; Piacentini *et al.*, 2009), i d'altres estudis han localitzat aquestes proteïnes en ambdues localitzacions (Klinger *et al.*, 1996; Kügler *et al.*, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008). Sembla doncs, que les vigilines són unes proteïnes multifuncionals que podrien actuar al nucli i al citoplasma.

L'objectiu general d'aquest treball ha estat aprofundir en l'estudi de la localització subcel·lular de DDP1, la vigilina de *Drosophila melanogaster*, per poder analitzar millor la seva funció, especialment en relació a la seva contribució a l'estructura i funció de l'heterocromatina.

IV. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Soques bacterianes i línies cel·lulars

1.1.1. Soques bacterianes d'*Escherichia coli*

A continuació es detallen les soques bacterianes emprades en aquest treball (Sambrook *et al.*, 2001):

- Soques per a l'ampliació de plasmidis:

- **DH5 α** : *F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17($r_K^- m_K^+$), λ^-*

- **GM2163**: *F-ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2*

- Soques per a la expressió de proteïnes:

- **BL21 (DE3)**: *F- ompT gal dcm lon hsdS_B($r_B^- m_B^-$) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])*

1.1.2. Línies cel·lulars eucariotes: cèl·lules S2 de *Drosophila melanogaster*

La línia cel·lular Schneider 2 (S2) deriva de cèl·lules d'embrions de 20 a 24 hores de *Drosophila melanogaster* (Schneider, 1972). Actualment és una de les línies cel·lulars de *Drosophila*, juntament amb la línia Kc (Kc(167)), més emprada per a cultius cel·lulars *in vitro*. Les cèl·lules S2 creixen en una monocapa semiadherent a temperatura ambient, sense CO₂.

1.2. Vectors utilitzats en aquest treball

A continuació es resumeixen les principals característiques dels vectors emprats en aquest treball per dur a terme els clonatges.

1.2.1. Vectors de clonatge

- **pGEM[®]-T easy vector** (Promega): Aquest vector permet el clonatge de fragments que han sigut amplificats per PCR mitjançant enzims que, com la Taq polimerasa, generen productes amb una desoxiadenina protuberant a l'extrem 3'.
- **PCR[®]2.1-TOPO** (Invitrogen): De la mateixa manera que el vector pGEM[®]-T easy vector, aquest vector permet el clonatge de fragments que han sigut amplificats per PCR mitjançant enzims que generen productes amb una desoxiadenina protuberant a l'extrem 3'.
- **pBluescript II KS** (Stratagene): Aquest vector conté una regió amb múltiples dianes de restricció. S'utilitza com a pas intermedi en els clonatges.
- **pEGFP-N1** (Clontech): Vector que permet la fusió de la proteïna d'interès a l'extrem amino-terminal de la proteïna GFP (Green fluorescent protein). En cèl·lules eucariotes permet l'expressió de la construcció directament. A *Drosophila* és un pas intermedi en els clonatges.

1.2.2. Vectors d'expressió a *Escherichia coli*

- **pET29b** (Novagen): Aquest plàsmid permet l'obtenció de proteïnes fusionades a una cua de 6 histidines en posició carboxi-terminal.
- **pET-DDP1**: cDNA de DDP1 inserit dins del vector pET. Plàsmid descrit a la tesi doctoral del Dr. Alfred Cortés (Cortés Alfred, 1999).

1.2.3. Vectors d'expressió a cèl·lules S2

- **pMK33-CTAP**: Vector que permet l'expressió de proteïnes fusionades al *tag* TAP en cèl·lules S2 sota el control del promotor *metal·lotionina*, induïble per Cu²⁺ (Veraksa *et al.*, 2005).

1.2.4. Vectors d'expressió a *Drosophila melanogaster*

- **pCaSpeR-hs-act**: Vector que permet l'expressió de proteïnes a *Drosophila* sota el control del promotor *hsp70*. Porta el gen *white* com a marcador del transgènic.

- **pCaSpeR 4:** Vector que permet l'expressió de proteïnes a *Drosophila*. Porta el gen *white* com a marcador del transgènic. No conté cap promotor, així que se n'ha d'introduir un juntament amb l'ORF de la proteïna d'interès.
- **pNHT4:** Vector que permet l'expressió de proteïnes a *Drosophila* sota el control del promotor *hsp70*. Porta el gen *rosy* com a marcador del transgènic.
- **pWIZ:** Vector que permet l'expressió d'un *hairpin* de RNAi a *Drosophila* sota el control del promotor *UAS*. Aquest promotor és induïble per les construccions Gal4. Porta el gen *white* com a marcador del transgènic (Lee *et al.*, 2003).

1.3. Oligonucleòtids

Els oligonucleòtids descrits a la taula M.1 es van fer servir com a encebadors, tant per a seqüenciar plasmidis com per l'amplificació de fragments de PCR per a l'obtenció de clonatges o per a la comprovació per PCR d'aquests.

1.4. DNAs plasmídics utilitzats en aquest treball

A continuació es detalla com es van obtenir cadascun dels plàsmids emprats en aquest treball. Els vectors en què s'insereixen els clonatges per facilitar la seva clonació o per expressar la construcció a *Drosophila* o a cèl·lules S2 són descrits a l'apartat 1.2 d'aquest capítol. El motlle de DNA a partir del qual s'han fet tots els clonatges de DDP1 es troba descrit a la tesi doctoral del Dr. Alfred Cortés (Cortés Alfred, 1999), i consta del cDNA de DDP1 inserit en el vector pNB40 (ClonI).

El cDNA de DDP1 té més de cinc mil parells de bases, la qual cosa fa difícil obtenir fragments de PCR sense cap mutació. Per evitar la inserció d'errors, es va substituir el cDNA amplificat mitjançant PCR pel mateix fragment de cDNA provinent de ClonI, el qual no ha patit mai una PCR. Es va comprovar per seqüenciació que la part del cDNA no intercanviada estigués lliure de mutacions. Aquesta substitució del cDNA s'ha realitzat a tots els clonatges de DDP1.

Nom	Seqüència (5' a 3')	Diana de restricció	Característiques/ Clonatge
Adriana	GAGCAGCAGCCCATCGCTCTC	---	cDNA DDP1
Anandamoyi	CGAGCAGGAGATCCGTCAGC	---	cDNA DDP1
Capitan Trueno	ATCGTGATAAACTCGCTCTC	---	cDNA DDP1
Cerdàlex	CTTGTGGTGTGCTGCTTGGC	---	cDNA DDP1
Cluisa	ACTCAATCATCGGCACTGGC	---	cDNA DDP1
Hi Van	GCGCCTGCCGTACTCCCTCC	---	cDNA DDP1
Judas	ACACGAGCTAGAGTCGAACC	---	cDNA DDP1
Neva	CGCCTAAGCGGGATGAACC	---	cDNA DDP1
Ranchero	CTGCGACTGAGTGTGGGC	---	cDNA DDP1
Silba	CTCTGCTTGATCTTATCCCC	---	cDNA DDP1
Prom upper	GACATGtCtAGATCCCGCATCACCTG	XbaI	Promotor DDP1
Prom low	cggccgATACGCCGACGCGGGTGCAGG	EagI	Promotor DDP1
GFPesq	CGACACCCAAGcTtTCAAACCTGG	HindIII	DDP1-GFP
GFPdre	GCAACGGGTACCAAGCCCCACACGGAGGTGAT	KpnI	DDP1-GFP
GFPdre D14	AACAAAGGAGgGtACCTCACGATC	KpnI	DDP1(ΔK ₁₄₋₁₅)
GFPdre D12	GATGGTcGaCTGCGCTTCCAGATC	SalI	DDP1(ΔK ₁₂₋₁₅)
Jondalar	AACGACTTGAACGAAAAAGatCTTT	BglII	LacI-DDP1
Ayla	TTCCAGTTCCAGCTTCTagaCCAGC	XbaI	LacI-DDP1
DDP1 5'-NdeI	catATGCAAGCAGCAGCAGTGATGGAC	NdeI	LacI-DDP1
DDP1 3'-BspMII	AAGCTCCGGATTGCGATTGAG	---	LacI-DDP1
Nicolinux	CAGTGTGCTGGAATTCGCCCT	---	DDP1-LacI
Marmoteta	GCGGCGGTGCACAATCTTCT	---	cDNA LacI
Aliena	CAACGATCAGATGGCGCT	---	cDNA LacI
LacI reverse	GGTCAGAGACATCAAGAAA	---	cDNA LacI
LacI-stopN	GCGGCCGGATCTTCAAACCTTCCTC	EagI	DDP1-LacI
GFPN	CGTCGCCGTCCAGCTGGACCAGG	---	cDNA pEGFP-N1
UP RNAi	CCCTACAtCtAGAACCTAAATAAGCTG	XbaI	RNAi DDP1
LOW RNAi	AATCTTCTaGaCCTTAGCTCCGAT	XbaI	RNAi DDP1
pWIZ-1L	CTGTAGGTAGTTTGTCCAATTATGTC	---	cDNA pWIZ
pWIZ-3L	GAGTTTCAAATTTGGTAATTGGACCCTTC	---	cDNA pWIZ
pWIZ-intro forward	TGAGTTTCTATTCGAGTCGG	---	cDNA pWIZ
Hsp70w forward	GCAACCAAGTAAATCAACTGC	---	cDNA pWIZ
XP5' plus	AATGATTCGCAGTGAAGGCT	---	DDP1Δ
WH5' minus	GACGCATGATTATCTTTTACGTGAC	---	DDP1Δ

Taula M.1. Llistat d'oligonucleòtids emprats en aquest treball. En minúscula es representen les bases mutades respecte a la seqüència original i se subratllen les dianes de restricció generades.

1.4.1. Clonatge de les fusions amb GFP

- **DDP1-GFP**: el fragment corresponent als aminoàcids 1-1298 de DDP1 es va amplificar a partir del ClonI amb els encebadors GFPesq i GFPdre, i es va inserir en el vector pEGFP-N1 mitjançant les dianes HindIII i KpnI.
- **DDP1(Δ K₁₄₋₁₅)-GFP**: el fragment corresponent als aminoàcids 1-1075 de DDP1 es va amplificar a partir del ClonI amb els encebadors GFPesq i GFPdreD14, i es va inserir en el vector pEGFP-N1 mitjançant les dianes HindIII i KpnI.
- **DDP1(Δ K₁₂₋₁₅)-GFP**: el fragment corresponent als aminoàcids 1-891 de DDP1 es va amplificar a partir del ClonI amb els encebadors GFPesq i GFPdreD12, i es va inserir en el vector pEGFP-N1 mitjançant les dianes HindIII i Sall.

Les diferents fusions DDP1-GFP es van treure del vector pEGFP-N1 amb les dianes de restricció adients i es van clonar al vector d'expressió pCaSpeR-hs-act per generar construccions que expressen les diferents fusions de DDP1-GFP a *Drosophila* sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70*.

Per obtenir la fusió DDP1-GFP sota el control del promotor propi es va treure DDP1-GFP del vector pEGFP-N1 amb les dianes de restricció adients, i es va clonar a un vector d'expressió pCaSpeR 4 que contenia la regió 5' reguladora de *ddp1* corresponent als nucleòtids -4445 a -3249, la qual s'havia amplificat prèviament a partir de DNA genòmic d'embrions *white* (vegeu apartat 2.5.1 d'aquest capítol) amb els encebadors Prom upper i Prom low.

1.4.2. Clonatge del *hairpin* de DDP1 per obtenir RNA d'interferència

El fragment corresponent als aminoàcids 258-545 del cDNA de DDP1 es va amplificar a partir del ClonI mitjançant els encebadors UP RNAi i LOW RNAi, i es va inserir per duplicat en el vector pWIZ mitjançant les dianes AvrII i XbaI (clonatge cedit per la Dra. Dori Huertas).

1.4.3. Clonatge de les fusions amb LacI

- **LacI-DDP1:** l'ORF de DDP1 es va amplificar a partir del ClonI amb els encebadors DDP1 5'-NdeI i Ayla, i es va inserir en un vector pBluescript II KS que contenia el cDNA de LacI (clonatge cedit pel Dr. Joan Font).
- **DDP1-LacI:** l'ORF de DDP1 es va amplificar a partir del ClonI amb els encebadors GFPesq i GFPdre, i es va inserir en un vector pGEM-T que contenia el cDNA de LacI, prèviament amplificat amb els encebadors Nicolinux i LacIstopN (clonatge cedit per la Dra. Mònica Torras).
- **LacI-HP1:** es va inserir el cDNA de HP1 en un vector pCR[®]2.1-TOPO que contenia el cDNA de LacI, prèviament amplificat amb els encebadors Nicolinux i LacIstopN (clonatge cedit per la Dra. Mònica Torras).

Les diferents fusions LacI es van treure dels vectors on es trobaven amb les dianes de restricció adients i es van clonar al vector d'expressió pNHT4 per generar construccions que expressen les diferents fusions LacI a *Drosophila*, sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70*.

1.4.4. Clonatge de DDP1-TAP

El cDNA de DDP1 inserit dins del vector pEGFP-N1 es va treure amb les dianes BglII i Acc65I, i es va inserir dins del vector pMK33-CTAP per generar una construcció que expressa la fusió DDP1-TAP a cèl·lules S2 sota el control del promotor *metal·lotionina*, induïble per Cu²⁺.

1.5. Generació del mutant nul *ddp1^A*

El mutant nul de DDP1, *ddp1^A*, es va generar per deleció completa de l'ORF de DDP1 mitjançant el mètode de recombinació de FRT (Parks *et al.*, 2004), utilitzant les línies *PBac{WH}CG5174[f00017]* (Bloomington Stock Center) i *P{XP}Dp1[d00066]* (Exelixis Collection, Harvard) com a font de FRT, i la línia *P{hsFLP}¹,w118;Adv¹* (Bloomington Stock Center) com a font de recombinasa. En la figura M.1 es mostra un esquema de la

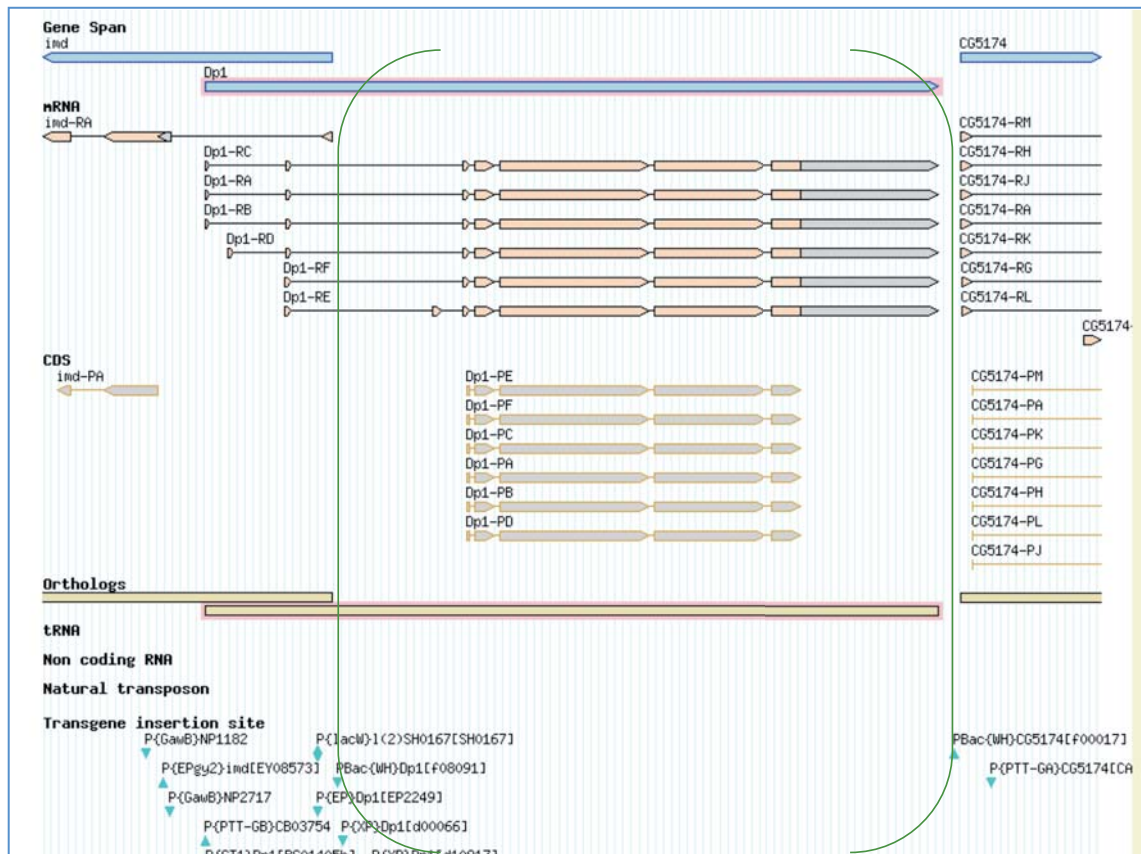


Fig. M.1. Esquema de l'ORF de DDP1 que s'ha eliminat en fer saltar els FRT dels transgens inserits en el gen *ddp1*. A la figura es mostra el gen *ddp1* tal i com es mostra a FlyBase. Entre parèntesis es mostra la zona que s'ha fet saltar en recombinar els FRT. La localització dels diferents transposons que es troben inserits dins del gen *ddp1* es mostra amb triangles blaus. Modificat de FlyBase.

localització en què es troben inserits els FRT en les línies *PBac{WH}CG5174[f00017]* i *P{XP}Dp1[d00066]*, i quina part del gen *ddp1* s'ha eliminat en fer-los saltar. La deleció de l'ORF es va confirmar per PCR amb els encebadors XP5' plus i WH5' minus per analitzar el salt dels FRT (dades no mostrades), i amb els encebadors corresponents al cDNA de DDP1 per comprovar que no hi ha ORF (vegeu l'apartat 1.5.1 del capítol de resultats). També es va analitzar el nivell de proteïna per *Western blot* (vegeu l'apartat 1.5.1 del capítol de resultats).

1.6. Mosques utilitzades en aquest treball

En la taula M.2 es mostra un resum de les línies de mosques utilitzades en aquest treball. S'indica el nom, la procedència de la línia i quines característiques té. No s'indiquen les mosques utilitzades per mapar i balancejar els transgènics. Les mosques *white* s'han fet

servir com a mosques salvatges en els experiments on s'analitza DDP1 endògena, i com a controls en experiments amb mosques transgèniques.

Línia	Procedència	Característiques
<i>PROM DDP1-GFP</i>	Aquest treball	Expressa DDP1-GFP sota promotor de <i>ddp1</i>
<i>Hsp70-DDP1-GFP</i>	Aquest treball	Expressa DDP1-GFP sota promotor de xoc tèrmic <i>hsp70</i>
<i>DDP1(ΔK₁₄₋₁₅)-GFP</i>	Aquest treball	Expressa DDP1(ΔK ₁₄₋₁₅)-GFP sota promotor de xoc tèrmic <i>hsp70</i>
<i>DDP1(ΔK₁₂₋₁₅)-GFP</i>	Aquest treball	Expressa DDP1(ΔK ₁₄₋₁₅)-GFP sota promotor de xoc tèrmic <i>hsp70</i>
<i>GFP</i>	Aquest treball	Expressa GFP sota promotor de xoc tèrmic <i>hsp70</i>
<i>LacI-DDP1</i>	Aquest treball	Expressa LacI-DDP1 sota promotor de xoc tèrmic <i>hsp70</i>
<i>DDP1-LacI</i>	Aquest treball	Expressa DDP1-LacI sota promotor de xoc tèrmic <i>hsp70</i>
<i>LacI-HP1</i>	Aquest treball	Expressa LacI-HP1 sota promotor de xoc tèrmic <i>hsp70</i>
<i>LacI</i>	Aquest treball	Expressa LacI sota promotor de xoc tèrmic <i>hsp70</i>
<i>shDDP1</i>	Aquest treball	Expressa <i>hairpin</i> RNAi sota promotor <i>UAS</i>
<i>ddp1¹⁵⁻¹</i>	Dra. Huertas	Mutant hipomorf <i>ddp1</i>
<i>ddp1^Δ</i>	Aquest treball	Mutant nul <i>ddp1</i>
<i>ddp1^Δ; shDDP1</i>	Aquest treball	Mutant nul <i>ddp1^Δ</i> que expressa <i>hairpin</i> RNAi
<i>ddp1^Δ; Act-Gal4/TM6b</i>	Aquest treball	Mutant nul <i>ddp1^Δ</i> que expressa Act-Gal4
<i>ddp1^Δ; Dpp-Gal4/TM6b</i>	Aquest treball	Mutant nul <i>ddp1^Δ</i> que expressa Dpp-Gal4
<i>ddp1^Δ; PROM DDP1-GFP/TM3</i>	Aquest treball	Mutant nul <i>ddp1^Δ</i> que expressa DDP1-GFP sota el control del promotor de <i>ddp1</i>
<i>ddp1^Δ; hsp70-DDP1-GFP</i>	Aquest treball	Mutant nul <i>ddp1^Δ</i> que expressa DDP1-GFP sota el control del promotor de xoc tèrmic <i>hsp70</i>
<i>ddp1¹⁵⁻¹; PROM DDP1-GFP/TM3</i>	Aquest treball	Mutant hipomorf <i>ddp1¹⁵⁻¹</i> que expressa DDP1-GFP sota el control del promotor de <i>ddp1</i>
<i>In(1)w^{m4}</i>	Dr. Pimpinelli	Presenta una inversió del gen <i>white</i>
<i>39C-42</i>	Dra. Wallrath	Expressen una construcció <i>hsp70-white</i>
<i>118E-5</i>	Dra. Wallrath	Expressen una construcció <i>hsp70-white</i>
<i>Act-Gal4</i>	---	Expressa Gal4 en la zona d'expressió d'Actina
<i>Ptc-Gal4</i>	---	Expressa Gal4 en la zona d'expressió de Patched
<i>En-Gal4</i>	---	Expressa Gal4 en la zona d'expressió d'Engrailed
<i>S9.2</i>	Dra. Wallrath	Conté llocs d'unió de LacI a 5' del gen <i>white</i>
<i>H2av-GFP/TM3</i>	Dr. Casanova	Expressa H2av-GFP sota el control del promotor de la <i>H2av</i>

Taula M.2. Llistat de les línies generades i utilitzades en aquest treball. S'indica el nom de la línia, d'on prové i quines són les característiques principals.

1.7. Anticossos utilitzats en aquest treball

Es resumeixen els anticossos utilitzats en aquesta tesi a la taula M.3. Se'n descriuen les característiques principals: nom, casa comercial i dilució utilitzada segons el mètode que s'hagi emprat.

Anticòs	Procedència	Dilució	Utilització
DDP1 ratolí	Dra. Huertas	1:800	Immunolocalitzacions
DDP1 conill purificat	Aquest treball	Sense diluir	Microscopia electrònica
DDP1 rata	Dra. Huertas	1:10.000	<i>Western blot</i>
GFP policlonal de conill	Molecular Probes	1:1.000	Immunolocalitzacions
		1:400	Cromosomes politènics
GFP monoclonal de ratolí	Roche	1:2.000	<i>Western blot</i>
		1:50	Cromosomes politènics
Lacl (Clone 9A5)	Millipore	1:2.000	<i>Western blot</i>
		1:200	Cromosomes politènics
Me2K9H3	Upstate	1:300	Immunolocalitzacions
		1:50	Cromosomes politènics
TAP	Open Biosystems	1:500	<i>Western blot</i>
		1:100	Immunolocalitzacions
Lamina ADL67.10	DSHB	1:500	Immunolocalitzacions
Calnexina	Abcam	1:200	Immunolocalitzacions
PDI	Abcam	1:100	Immunolocalitzacions
Actina	Sigma	1:750	<i>Western blot</i>
β Tubulina	CHEMICON	1:5.000	Immunolocalitzacions
HP1 ratolí	DSHB	1:100	Cromosomes politènics
HP1 rata	Dr. Font	1:10.000	<i>Western blot</i>

Taula M.3. Resum dels anticossos utilitzats en aquest treball. S'indica el nom de l'anticòs, la casa comercial (quan pertoca), i les dilucions emprades en els diferents experiments.

2. MÈTODES

2.1. Mètodes de manipulació de DNA

Per a l'obtenció dels plàsmids utilitzats en aquest treball (vegeu l'apartat 1.4 d'aquest capítol) es van seguir les tècniques bàsiques de biologia molecular (Sambrook *et al.*, 2001) i van ser comprovats per seqüenciació automàtica al Servei de Seqüenciació de l'IBMB-CSIC.

2.1.1. Mètodes d'obtenció de DNA

Minipreparacions de DNA plasmídic

Per a l'obtenció de petites quantitats de plàsmid es va emprar el mètode de lisi alcalina (Sambrook *et al.*, 2001). El DNA va ser ressuspès en 50 µl de tampó TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM) en presència de 1 µg de RNAsa A i es va incubar 30 min a 37°C.

Maxipreparacions de DNA plasmídic

Per a l'obtenció de grans quantitats de DNA plasmídic amb un alt grau de puresa es van utilitzar columnes comercials de Quiagen seguint les instruccions del fabricant, ressuspenent el DNA en tampó TE.

Transformació de DNA a bacteris

Les cèl·lules competents van ser prèviament preparades mitjançant el mètode del clorur de calci (Sambrook *et al.*, 2001), al·lquotades i congelades a -80°C fins al moment de ser utilitzades. Llavors, es van transformar per xoc tèrmic amb els diferents DNAs plasmídics. Les cèl·lules es van descongelar en gel, s'hi van afegir els microlitres necessaris de DNA segons si el DNA provenia d'una minipreparació, maxipreparació o lligació de DNA, es van incubar 20 minuts en gel i a continuació es va fer un xoc tèrmic de 2 minuts a 42°C. Els bacteris es van recuperar en presència de 500 µl de medi LB (triptona 10 g/l, extracte de llevat 5 g/l, NaCl 10 g/l, NaOH 1mM) durant 20 minuts a

37°C, i finalment es van plaquejar en plaques LB (LB + agar 15 g/l) amb el corresponent antibiòtic: 100 µg/ml d'ampicil·lina o 50 µg/ml de kanamicina. Les plaques es van incubar durant tota la nit a 37°C.

2.1.2. Reacció en cadena de la polimerasa

La reacció en cadena de la polimerasa és una tècnica que permet l'amplificació exponencial de petites quantitats de DNA *in vitro* utilitzant dos oligonucleòtids flanquejants a la regió que es vol amplificar i que hibriden en les cadenes oposades d'aquesta regió de DNA. Per a la reacció d'amplificació s'utilitza una DNA polimerasa termoestable que permet realitzar un procés cíclic de desnaturalització, hibridació dels oligonucleòtids i extensió dels oligonucleòtids per l'acció de la DNA polimerasa (Saiki *et al.*, 1988).

En aquest treball, per a l'amplificació de fragments de DNA utilitzant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa, es van utilitzar diferents polimerases comercials, utilitzant tant tampons proporcionats pel fabricant com tampons preparats al laboratori amb diferents combinacions de força iònica (diverses concentracions de Mg²⁺), per aconseguir una amplificació òptima dels fragments desitjats. Es van fer servir els següents enzims: Biotools DNA Polimerasa (Biotools) i Expand High Fidelity PCR System (Roche). Per a les amplificacions rutinàries es va utilitzar la polimerasa de Biotools. En aquelles amplificacions que requerien l'amplificació de grans fragments de DNA es va utilitzar la polimerasa Expand.

2.2. Tècniques bàsiques per a l'estudi de proteïnes

2.2.1. Electroforesi de proteïnes en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

L'electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) és una tècnica que permet separar les proteïnes segons el seu pes molecular. El SDS és un detergent aniònic que s'utilitza tant per desnaturalitzar les proteïnes i evitar que interaccionin entre si, com per revestir-les d'una càrrega neta negativa independentment del seu punt isoelèctric.

Així doncs, en un camp elèctric la velocitat de migració de les proteïnes és funció del seu pes molecular.

El sistema utilitzat per a la preparació dels gels de poliacrilamida es basa en un sistema discontinu de gels que consta d'una petita part del gel amb un baix percentatge d'acrilamida i pH acídic a la part superior (gel apilador o *stacking*: acrilamida-bisacrilamida 29:1 5 %, Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1 %, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,1%, TEMED 1 ml/l) seguida d'una altra part que conté una major proporció d'acrilamida i un pH més bàsic (gel separador o *resolving*: acrilamida-bisacrilamida 29:1 6-25 %, Tris-HCl 0,375 M pH 8,7, SDS 0,1 %, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,1%, TEMED 1 ml/l). En les condicions dels gel apilador les proteïnes formen una única banda sense separar-se en funció del seu pes molecular, de manera que les proteïnes es concentren a l'inici del front, mentre que les condicions del gel separador permeten la separació de les proteïnes en funció del seu pes molecular.

A les mostres se'ls va afegir tampó de càrrega desnaturalitzant de proteïnes PLB 5x (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 21,75 %, SDS 5 %, blau de bromofenol 0,25 %), fins a obtenir una concentració 1x i un 10 % de β -mercaptoetanol. Es van bullir 5 minuts a 95°C i es van carregar al gel immediatament. Com a tampó d'electroforesi es va utilitzar Laemmli 1x (Tris-HCl 25 mM pH 8,3-8,5, glicina 200 mM, SDS 0,1 %), i els gels es van córrer a 25 o a 40 mA segons si es tractava d'un gel tipus *Miniprotean* (8,5x8,5 cm) o gels grans de 20x20 cm, respectivament.

Visualització de les proteïnes

Per visualitzar les proteïnes un cop han estat corregudes en un gel de poliacrilamida, aquest es pot tenyir amb Comassie o es pot revelar amb nitrat de plata, segons la quantitat de proteïna que es tingui:

- **Tinció amb blau de Comassie:** aquesta tinció s'utilitza quan es té prou mostra, ja que no és un mètode molt sensible. Es va submergir el gel en una solució que contenia el colorant Blau de Comassie (EtOH 40 %, CH_3COOH 10 %, *Comassie blue brilliant* 0,05 %) i es va deixar en agitació entre 30 i 60 minuts. Un cop tenyit el gel, que queda d'un color

blau intens, aquest es va destenyir amb una solució d'àcid acètic al 10 %. S'ha d'hidratar el gel en aigua abans de dessecar-lo.

- **Revelatge amb nitrat de plata:** aquest mètode s'utilitza quan es té poca mostra, ja que és molt sensible. Hi ha molts tipus de revel·lat amb plata, i aquí es descriu el que s'ha utilitzat més sovint. Es va submergir el gel en una solució de metanol al 50 % a t.a durant un mínim d'1 hora (pot ser tota la nit). Es va preparar la següent solució: en un vas de precipitats es van dissoldre 0,8 g de AgNO_3 en 4 ml d'aigua. En un altre vas de precipitats es va preparar la següent solució: 40 ml H_2O + 190 μl NaOH 10 M + 1,4 ml NH_3 25%. Es va afegir la solució de plata gota a gota sobre la solució amoniacal, esperant que desaparegués l'hidròxid de plata que es forma abans d'afegir la següent gota. Ha de quedar una solució transparent. Es va descartar la solució de metanol en què es trobava el gel, i s'hi va afegir la solució de plata complexada. Es va incubar 15 minuts en agitació i es va llençar la solució. El gel es va rentar amb aigua corrent desionitzada durant 5 minuts, i es va revel·lar amb la solució revel·ladora (150 ml H_2O + 750 μl àcid cítric 1% + 75 μl de formaldehid 37 %) fins que les bandes van tenir la intensitat desitjada. El revel·lat es va aturar amb la solució àcida (MeOH 50 %, CH_3COOH 10 %). El gel es pot mantenir fins a dues setmanes a 4°C en aquesta solució. S'ha d'hidratar el gel en aigua abans de dessecar-lo.

2.2.2. Western blot

Aquesta tècnica permet la detecció de proteïnes presents en un gel de poliacrilamida-SDS transferit a una membrana de nitrocel·lulosa mitjançant l'ús d'anticossos específics. Així doncs, com a primer pas es va dur a terme una electroforesi SDS-PAGE (vegeu l'apartat anterior) i posteriorment es va transferir el gel a una membrana de nitrocel·lulosa Optitran (Schleicher & Schuell). Aquest pas es va realitzar emprant una cubeta amb tampó de transferència (Tris base 25 mM, glicina 40 mM, SDS 0,05%, EtOH 20%) i aplicant un voltatge de 80 V durant tres hores a 4°C amb agitació constant.

Un cop finalitzada la transferència, es va incubar la membrana en agitació durant un mínim d'una hora (normalment s'incuba tota la nit) amb la solució de bloqueig (PBS (NaCl 125 mM, Na_2HPO_4 17 mM, NaH_2PO_4 8 mM), llet en pols desnatada 5 %, Tween 20

0,1 %, azida sòdica 0,01 %) per tal d'evitar la unió inespecífica dels anticossos a la membrana. Posteriorment es van fer 3 rentats de 5 minuts amb PBS-Tween (PBS, Tween 20 0,1 %) i es va incubar amb la dilució d'anticòs primari adient en cada cas durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació constant (la dilució es va fer amb PBS-Tween). Llavors, es van fer 3 rentats més de 5 minuts amb PBS-Tween i es va incubar amb la dilució adequada d'anticòs secundari (diluint en PBS-Tween) durant 45 minuts a temperatura ambient i en agitació constant. Finalment, es van fer 3 rentats de 10 minuts amb PBS-Tween i es va procedir a la detecció mitjançant quimioluminescència.

Per a la detecció de l'anticòs secundari fusionat a la peroxidasa de rave (HRP) es van barrejar 2 ml de Solució de Luminol (Tris-HCl 0,1 M pH 8,6, luminol sòdic 1,25 mM, H₂O₂ 2,7 mM) amb 2 µl de Solució Enhancer (àcid p-hidroxicumarínic 0,1 % en DMSO), es va aplicar sobre la membrana i es va incubar durant 1 minut. Després es va assecar la membrana i es va exposar amb una pel·lícula fotogràfica Agfa Curix RP2 PLUS el temps adient per obtenir un senyal òptim.

2.2.3. Expressió i purificació de proteïnes recombinants

En aquest treball s'ha expressat en soques *d'E. coli* la proteïna DDP1 de *Drosophila* amb l'objectiu de purificar l'anticòs de conill policlonal que reconeix DDP1, i d'obtenir un control de DDP1 per a *Western blot*. Per tal d'obtenir la proteïna DDP1 de *Drosophila* de forma recombinant s'ha expressat aquesta proteïna fusionada a una cua d'histidines en posició C-terminal i s'ha purificat posteriorment mitjançant una cromatografia d'afinitat utilitzant una columna de Ni²⁺, el qual és capaç de retenir de forma específica les proteïnes que contenen aquest *tag*.

Amb aquest objectiu es va utilitzar el plàsmid d'expressió pET-DDP1 descrit a l'apartat 1.2.2 d'aquest capítol. L'expressió de proteïnes clonades als vectors pET es troba sota el control de senyals de transcripció i traducció del bacteriòfag T7. La soca BL21 conté una còpia cromosomal del gen de *T7 RNA Polimerasa* sota el control del promotor *lacUV5*, el qual és induïble per IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosid).

Expressió a gran escala de DDP1 recombinant

Es va transformar la soca BL21 amb el plàsmid pET-DDP1, i es van inocular cinc colònies independents en cinc cultius diferents de 4 ml de LB/kanamicina 50 µg/ml, els quals es van créixer a 37°C tota la nit. Al dia següent es van inocular 500 ml de LB amb els cinc minicultius i es va deixar créixer a 37°C fins a una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Llavors, es va agafar una alíquota d'un mil·lilitre i es va induir l'expressió amb IPTG 1 mM, deixant créixer el cultiu a 37°C durant 2,5 h més. Es va agafar una altra alíquota d'un mil·lilitre i es van recollir les cèl·lules centrifugant 15 minuts a 6.000 rpm a 4°C amb el rotor JA-14 (Beckman). El pellet es va rentar amb tampó STE (NaCl 1,1 M, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1mM) i es va congelar a -80°C durant tota la nit per facilitar la lisi. Al dia següent, es va ressuspendre amb 10 ml de tampó de lisi (NaCl 0,5 M, glicerol 20 %, Hepes 20 mM pH 7,9, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, NP-40 0,1 %, β-mercaptoetanol 20 mM) i es va sonicar en gel fins que la mostra adquirí una consistència més líquida. Es va utilitzar el sonicador Branson Digital Sonifier i es va sonicar amb el tip gruixut fent 8 cicles de 10 segons al 40% d'amplitud, amb intervals de descans de 30 segons. Llavors es va centrifugar a 3.500 rpm amb el rotor SW41 (Beckman) durant 1 hora a 4°C per tal de separar les fases solubles i insolubles (sobrenedant i sediment, respectivament). Finalment es van congelar amb neu carbònica i es van guardar a a -80°C.

Per analitzar si la proteïna d'interès s'ha expressat de forma soluble o formant cossos d'inclusió, es van carregar 10 µl de la fracció soluble i una mica de sediment (se'n va agafar una mica amb una punta groga, es va ressuspendre en 400 µl de tampó de càrrega i es van analitzar a 10 µl i 10 µl a una dilució 1:10), juntament amb 25 µl de les mostres d'abans i després d'induir.

Purificació a partir de la fracció soluble

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

En el nostre cas, es va fer la purificació a 4°C utilitzant 0,5 ml de la reïna *Ni-NTA Agarose* (Qiagen), la qual es va empaquetar en una columna *Econocolumn* (Biorad) i es va equilibrar amb 10 ml de tampó de lisi. Aquest pas i els posteriors es van realitzar amb l'ajut d'una bomba peristàtica *LKB Pump P-1* (Pharmacia) a una velocitat entre 6 i 8 de la posició 1. Un cop empaquetada la reïna, es van passar 2 cops els 10 ml de la mostra corresponent a la fracció soluble i es va recollir la fracció *Flow Through* (FT). Posteriorment, es van fer dos rentats: el primer amb 10 ml de tampó de lisi (W1) i el segon amb 10 ml de tampó D (W2) (glicerol 20 %, Hepes 20 mM pH 7,9, KCl 0,1 M, EDTA 0,2 mM, PMSF 0,1 mM, DTT 0,5 mM). Finalment es va eluir la proteïna per competició amb imidazole en un procés de 3 passos. Primer, es va fer un procés de preelució amb 3 ml de tampó D/imidazole 20 mM, recollint fraccions de 1 ml (PE1, PE2, PE3). Aquest pas amb baixa concentració d'imidazole serveix per eliminar contaminants que s'uneixen a la reïna amb una afinitat menor que la cua d'histidines. Després es va eluir amb 5 ml de tampó D/imidazole 100 mM i 5 ml de tampó D/imidazole 500 mM, recollint també fraccions de 1 ml (E1-E10). Per comprovar el funcionament de la cromatografia es van analitzar 10 µl de cadascuna de les fraccions per SDS-PAGE. La resta de mostres es va congelar a -80°C. En cas d'utilitzar la proteïna recombinant per a purificar anticossos, cal dialitzar-la tres vegades amb tampó D a 4°C en una funda de diàlisi de porus petit per extreure l'excés d'imidazole. Es va fer una primera incubació d'un hora, llavors es va canviar el tampó i es va deixar en agitació suau tota la nit. L'endemà es tornà a canviar el tampó i es va deixar incubar una hora més. La proteïna dialitzada es va aliquotar en petites quantitats i es va guardar a -80°C.

2.3. Purificació d'anticossos

Per aconseguir anticossos que es poguessin utilitzar en microscopia electrònica, es va purificar per afinitat l'anticòs de conill que havia obtingut prèviament la Dra. Dori Huertas. La purificació consisteix a unir l'antigen utilitzant un suport sòlid sobre el qual s'aplica el sèrum policlonal. D'aquesta manera només són retinguts a la columna els anticossos específics, els quals poden ser eluïts posteriorment.

Concretament, es va unir la proteïna de fusió recombinant DDP1-His dialitzada (vegeu l'apartat 2.2.3 d'aquest capítol) a la reïna *Ni-NTA Agarose* (Qiagen). Llavors es va rentar

la columna amb 10 ml de tampó B (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4) i es van passar 2 ml de sèrum. Posteriorment es van fer dos rentats amb 10 ml de tampó B i un tercer rentat amb 10 ml de tampó C (NaCl 2 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,4). Finalment, es va eluir amb una solució de MgCl₂ 4 M. L'anticòs es va dialitzar tres vegades amb tampó PBS a 4°C en una funda de diàlisi de porus petit per extreure l'excés de MgCl₂. Es va fer una primera incubació d'un hora, llavors es va canviar el tampó i es va deixar en agitació suau tota la nit. L'endemà es tornà a canviar el tampó i es va deixar incubar una hora més. Finalment l'anticòs dialitzat es va passar a un *ependorf* i es van afegir BSA, per estabilitzar la proteïna, i azida sòdica a una concentració final de 0,5 mg/ml i 0,02 %, respectivament. L'anticòs es va guardar a -80°C. Per comprovar si la purificació havia funcionat, es va realitzar un *Western blot* amb la proteïna recombinant, fent servir l'elut de la columna com a anticòs primari i comparant-lo amb el sèrum sense purificar.

2.4. Mètodes de treball amb cèl·lules S2

2.4.1. Manteniment

Les cèl·lules S2 es van créixer a 25°C sense CO₂ en medi Schneider (Sigma) suplementat amb 10 µg/ml d'estreptomicina (Gibco), 100 unitats/ml de penicil·lina (Gibco) i un 10 % de sèrum fetal boví (FBS) (Gibco), el qual s'havia inactivat durant 30 minuts a 56°C. Es van anar mantenint en flascons Corning de 75 cm² a una densitat de 3·10⁶ cèl·lules/ml en un volum de 5-6 ml, fent dilucions 1:3 cada 3-4 dies.

2.4.2. Congelació

Per congelar les cèl·lules es va créixer un flascó de 75 cm² fins a una densitat de 4-5·10⁶ cèl·lules/ml. En el cas de les cèl·lules estables es van utilitzar flascons de 175 cm² a la mateixa densitat. Per recollir les cèl·lules es va transferir el cultiu a un *falcon* de 15 ml i es va centrifugar 2 minuts a 1.500 rpm a temperatura ambient. Llavors, es va eliminar el sobrenedant i es va ressuspendre el sediment cel·lular en 900 µl de FBS (1.350 µl en el cas dels flascons de 175 cm²). Es va passar a un criotub i es va afegir gota a gota 100 µl de DMSO (150 µl en el cas dels flascons de 175 cm²). El procés de congelació ha de ser

lent. Per això, primer es va guardar el criotub a -20°C durant 2 hores, després tota la nit a -80°C i, finalment es va guardar en nitrogen líquid.

2.4.3. Descongelació

Prèviament a la descongelació, es va preparar un *falcon* de 15 ml amb 10 ml de medi Schneider. Llavors es va descongelar ràpidament el criotub de cèl·lules S2 amb les mans, i es van abocar les cèl·lules al *falcon*. Es va centrifugar 10 minuts a 200 g i es va ressuspendre el pellet amb 5 ml de medi Schneider suplementat. Finalment, es va passar a un flascó Corning de 25 cm² i es va deixar créixer durant 3-4 dies.

2.4.4. Obtenció de cèl·lules estables

Les cèl·lules establement transfectades es preparen de la mateixa manera que les cèl·lules transfectades transitòriament, però el plàsmid utilitzat per a la transfecció permet la utilització d'un antibiòtic per a la selecció de cèl·lules que hagin incorporat el plasmidi, resultant en una població de cèl·lules on totes expressen la proteïna d'interès.

En el nostre cas, els plasmidis utilitzats són PMK33-CTAP i DDP1-PMK33-CTAP, que permeten l'expressió en cèl·lules S2 del *tag* TAP i de DDP1 fusionada al *tag* TAP, respectivament. El vector PMK33-CTAP codifica per la resistència a l'antibiòtic higromicina (vegeu els apartats 1.2.3 i 1.4.4 d'aquest capítol). El primer pas és la transfecció de les cèl·lules amb el plàsmid d'interès: es van créixer cèl·lules S2 a una densitat aproximada de $6 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml. Un cop quantificada la concentració exacta mitjançant un comptatge amb la cambra de Neubauer, es van inocular $2,5 \cdot 10^6$ cèl·lules en 4 plaques de cultiu de 60 mm² (Corning) en un volum final de 5 ml, i es van incubar 24 hores a 25°C . Per cada placa es van transfectar 20 µg de DNA (obtingut a partir de maxipreparacions). Així doncs, es van preparar 4 *ependorfs* amb 20 µg de DNA i un volum final de 50 µl. Es van afegir 400 µl de CaCl_2 0,25 M (esterilitzat per filtració amb un filtre de 22 µm) a cada *ependorf*, i aquesta barreja es va transferir gota a gota sense deixar d'agitar a *falcons* de 15 ml que contenien 400 µl de HEBS 2x (NaCl 250 mM, KCl 9 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM, glucosa 10 mM, Hepes 50 mM pH 7,1), també esterilitzat per filtració. L'addició lenta i en agitació del DNA- CaCl_2 sobre el HEBS permet la formació de

cristalls petits i d'aspecte blanquinós. Aquests precipitats es van incubar 35 minuts a 25°C i, transcorregut aquest temps, es van ressuspendre amb la pipeta i es van afegir 850 µl per placa. Les plaques es van incubar durant 24 hores a 25°C.

A les 24 hores es va treure la solució de fosfat de calci, es van fer dos rentats amb medi Schneider suplementat amb FBS i penicil·lina/estreptomicina i es van ressuspendre les cèl·lules amb 5 ml de medi Schneider suplementat amb FBS i penicil·lina/estreptomicina. Les plaques es van incubar dos dies a 25°C.

Al cap de dos dies, es van centrifugar les cèl·lules i es van passar a un flascó de 25 cm² amb 5 ml de medi Schneider suplementat amb 6 µl/ml d'higromicina B 50 mg/ml esterilitzada per filtració (Sigma) i un 10 % de FBS. La selecció de les cèl·lules transfectades es va continuar durant 3-4 setmanes canviant el medi cada 4-5 dies. Un cop seleccionades les cèl·lules, es van congelar diverses línies abans de començar els experiments.

2.4.5. Obtenció d'extractes proteics de cèl·lules S2

Per obtenir extractes proteics de cèl·lules S2 es van créixer les cèl·lules fins a 4-6·10⁶ cèl·lules/ml. Es van desenganxar dels flascons amb l'ajuda d'una pipeta i es van passar a *falcons* de 15 ml. Es van centrifugar a 100 g durant 5 minuts i es va rentar el sediment cel·lular amb 5 ml de PBS fred dues vegades. Es van ressuspendre les cèl·lules en 500 µl de tampó de lisi (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 136 mM, glicerol 10 %, NP-40 1 %, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM), es van incubar 15 minuts en gel i es va sonicar la mostra durant 10 segons al 10% d'amplitud amb el microtip utilitzant un sonicador Brandson Sonifier. Durant la sonicació la mostra es va mantenir en fred. Finalment, es va centrifugar 5 minuts a 14.000 rpm a 4°C, i el sobrenedant es va guardar a -20°C.

2.4.6. Immunolocalitzacions a cèl·lules S2

Per determinar la localització de DDP1 a cèl·lules es van immobilitzar 20 µl de cèl·lules confluents durant 20 minuts a temperatura ambient en cobreobjectes rodons prèviament tractats amb 0,5 mg/ml de Concanavalina-A (Sigma). Es va retirar l'excés de

medi amb paper Whatman i es van fixar les cèl·lules amb paraformaldehid al 4 % (diluït en PBS) durant 10 minuts a temperatura ambient. Quan es van analitzar els efectes de l'àcid acètic, les cèl·lules es van fixar primer durant 1 minut amb formaldehid 3,7 % (diluït en PBS, NP-40 0,1 %) i després durant 7 minuts amb formaldehid 3,7 %/àcid acètic 50 %. Per permeabilitzar les cèl·lules i facilitar l'entrada d'anticossos es van fer 3 rentats de 5 minuts amb solució de rentat (PBS, Tween 20 0,2 %) i es van incubar 2 cops durant 20 minuts amb solució de bloqueig (tampó de rentat + BSA (fracció V) 2 %). Aleshores es van incubar les cèl·lules tota la nit a 4°C amb α DDP1 de ratolí 1:800 (diluït en tampó de bloqueig). Al dia següent es van fer 3 rentats de 5 minuts amb tampó de bloqueig i es va incubar durant 1 hora a temperatura ambient amb l'anticòs contra conill conjugat amb el fluorocrom Cy3 (1:400; Jackson ImmunoResearch). Un cop s'ha incubat la mostra amb l'anticòs secundari cal fer tots els passos protegint-la de la llum amb paper d'alumini. Posteriorment es van fer 3 rentats més de 5 minuts amb tampó de rentat per eliminar l'excés d'anticòs, dos rentats de 10 minuts amb PBS per eliminar l'excés de Tritó, i es va afegir una gota de medi de muntatge Mowiol-DAPI (500 μ l Mowiol (Calbiochem) + 50 μ l DAPI 2 ng/ml (Sigma)). Les cèl·lules es van analitzar amb un microscopi de fluorescència Eclipse E-1000 (Nikon) equipat amb càmera CoolSnapfx (Photometrics) i software Metamorph (versió 6.3r1).

2.5. Mètodes de treball amb *Drosophila melanogaster*

2.5.1. Extracció de DNA genòmic d'embrions

Es van recollir postes d'embrions *white* de l'edat desitjada i es van decorionar amb hipoclorit de sodi al 50 % durant dos minuts desenganxant-los amb l'ajuda d'un pinzell. Es van rentar amb Tritó X-100 0,1 % i es passaren a un *ependorf* que contenia Tritó X-100 0,1 %. Es van deixar precipitar al fons i es va extreure el Tritó X-100. Es van afegir 50 μ l de tampó HB (Tris-HCl 0,1 M pH 9,2, sacarosa 0,2 M, EDTA 50 mM, SDS 0,5 %) esterilitzat per filtració i es van esclafar els embrions amb un homogeneïtzador. Quan van començar a estar una mica esclafats, es van afegir 75 μ l de tampó HB més i es va seguir homogeneïtzant. Quan ja gairebé estaven del tot esclafats, es van afegir 125 μ l més de tampó HB i es van acabar d'homogeneïtzar. Aleshores, es van incubar durant 10

minuts a 68°C en un bany d'aigua. Posteriorment, es van afegir 250 µl de TE + SDS 0,5 % + 2,5 µl de Proteïnasa K (20 mg/ml), i es va incubar primer 1 hora a 37°C, i després 30 minuts a 50°C. Finalment, es van afegir 120 µl d'acetat de potassi 5 M, i es va incubar durant 10 minuts en gel. Es va centrifugar durant 15 minuts a 13.000 rpm i es va passar el sobrenedant a un nou *ependorf*. Es va repetir la incubació en gel i la centrifugació. Llavors, es van fer dues purificacions amb fenol/cloroform i una amb cloroform, sense vortexar, només invertint l'*ependorf* i centrifugant 1 minut a 13.000 rpm. Vam quedar-nos sempre la part aquosa. Llavors, es va precipitar el DNA afegint 0,1 volums d'acetat de sodi 3 M pH 5 i dos volums d'etanol. Es va centrifugar durant 30 minuts a 13.000 rpm i es va rentar el DNA amb etanol 70 %, centrifugant després durant 4 minuts. Es va decantar l'etanol i es va deixar assecar una mica el DNA abans de ressuspèndre'l en 50 µl de TE + RNAsa 20 µg/ml i incubar-lo 10 minuts a 65°C. El DNA es va guardar a -20°C.

2.5.2. Extracció de DNA genòmic de mosques

Per obtenir DNA genòmic d'una mosca adulta es va seleccionar la mosca d'interès i es va passar a un tub *ependorf* que es va incubar durant 5-10 minuts en gel per adormir-la. Aleshores, es va aixafar la mosca amb la punta d'una pipeta que contenia 50 µl de tampó SB (Tris-HCl 10 mM pH 8,1, EDTA 1 mM, NaCl 25 mM, Proteïnasa K 200 µg/ml), ressuspèndent-la en 50 µl de tampó SB un cop esclafada. Es va incubar durant 20-30 minuts a 37°C, i finalment durant 2 minuts a 95°C per desnaturalitzar la Proteïnasa K. El DNA es va guardar a 4°C. Normalment, es va utilitzar el DNA a una dilució 1:5 per evitar que estigués massa brut.

2.5.3. Obtenció d'extractes proteics d'embrions

Per a l'obtenció d'embrions es van preparar nius de posta i després d'aproximadament dos dies es van començar a recollir plaques amb embrions de les edats que es volia estudiar. Les plaques de posta es poden guardar a -80°C, precintades amb parafilm per evitar que s'hidratin, fins a obtenir la quantitat d'embrions que calgui. Llavors es van decorionar els embrions incubant-los amb hipoclorit de sodi 50 % durant 2 minuts i es van desenganxar amb l'ajuda d'un pinzell. Aleshores, es van rentar amb Tritó X-100 0,1 %, i amb l'ajut d'un pinzell net es van passar a un *ependorf* amb Tritó X-100 0,1 %. Es

va extreure el Tritó i els embrions es van ressuspèndre en 50 µl de tampó d'extracció (PLB 2,5x, PMSF 2 %). Es van esclafar els embrions amb un homogeneïtzador, mantenint sempre l'eppendorf en gel. Un cop esclafats, es va afegir 200 µl de tampó d'extracció i es va escalfar 1 minut a 95°C. Es va homogeneïtzar durant 1 minut en gel i es va sonicar durant 10 segons al 10% d'amplitud amb el microtip utilitzant un sonicador Brandson Sonifier. Durant la sonicació la mostra es va mantenir en fred. Aleshores, es va afegir β-mercaptoetanol fins a una concentració 0,5 M i es va bullir la mostra 5 minuts a 95°C. Es va centrifugar durant 10 minuts a 10.000 g a 4°C i es va guardar el sobrenedant a -20°C.

2.5.4. Obtenció d'extractes proteics de glàndules salivals, discs imaginals i cervells de larves de tercer estadi

Es van seleccionar aproximadament unes deu larves de tercer estadi de la línia d'interès i es van passar a un vidre de rellotge. Es van rentar amb PBS fred 3-4 vegades i es van dissecar les glàndules salivals, els discs imaginals i el cervell en PBS/NP-40 0,05%. Es van passar els teixits dissecats a un *eppendorf* amb l'ajuda d'una punta tallada, i es va afegir el mateix volum de tampó d'extracció (PLB 2x, PMSF 2 %). En total, ha de quedar un volum final de 10 µl/larva dissecada. Es va incubar en gel durant 10 minuts i es va homogeneïtzar la mostra pipetejant amunt i avall fins que la mostra es va tornar llefiscosa. Es va escalfar 5 minuts a 95°C, es va centrifugar 10 minuts a 10.000 g a 4°C i es va guardar el sobrenedant a -20°C.

2.5.5. Immunolocalitzacions a embrions

Per a l'obtenció d'embrions es van preparar nius de posta i després d'aproximadament dos dies es van començar a recollir plaques amb embrions de les edats que es volia estudiar. Per recollir els embrions de la placa i decoronar-los, es va afegir hipoclorit de sodi al 50 % i es van desenganxar amb l'ajuda d'un pinzell. El lleixiu es va deixar actuar 2 minuts i es van traspasar els embrions a una membrana per tal de filtrar-los, on es van rentar amb Tritó X-100 0,1 %. Amb el pinzell net es van recollir els embrions de la membrana i es van posar en un vial que contenia 2 ml de PEM (PIPES 0,1 M pH 6,9, MgSO₄ 2 mM, EGTA 1 mM), 2 ml d'heptà i 250 µl de formaldehid 37 % i es va deixar en agitació durant 20 minuts a t.a. En el cas que es vulgui fer una immunolocalització amb

α Tubulina, el mètode de fixació haurà de ser diferent, ja que el mètode descrit no preserva l'estructura dels microtúbuls. Per a la immunolocalització amb α Tubulina, un cop decorionats els embrions, aquests es van passar a un vial amb 2 ml d'heptà, al qual s'hi van afegir 2 ml de formaldehid 37 %.

Es va agitar durant 15 segons i es va deixar en agitació 5 minuts a t.a tapat de la llum. Un cop fixats els embrions es va extreure la fase aquosa (fase inferior) sense agafar els embrions, els quals queden a la interfase. Llavors se'ls va afegir 2 ml de metanol per treure'ls la membrana vitel·lina i es van vortexar durant 20 segons. Els embrions que són bons per immunolocalització són aquells que han estat fecundats i han perdut la membrana vitel·lina, i són els que baixen al fons del tub. Així doncs, es van recollir els embrions que queden al fons amb l'ajuda d'una pipeta *Pasteur* i es van passar a un *ependorf*. Finalment es van rentar 3 cops amb metanol i es van guardar a 4°C un mínim de 12 hores i un màxim de dues setmanes.

Per realitzar la immunolocalització es va eliminar el metanol, es van fer 3 rentats amb solució de rentat (PBS, Tritó X-100 0,3 %) i es va bloquejar fent 2 incubacions de 20 minuts amb solució de bloqueig (PBS, Tritó X-100 0,3 %, BSA 2 %). Després es va incubar tota la nit a 4°C amb tampó de rentat que contenia l'anticòs primari: α DDP1 policlonal de ratolí (1:800), α GFP policlonal de conill (1:1.000; Molecular Probes), α me2K9H3 policlonal de conill (1:300; Upstate), $\alpha\beta$ Tubulina monoclonal de ratolí (1:5.000; Millipore). Al dia següent es va treure l'anticòs primari, es van fer 3 rentats de 5 minuts amb la solució de rentat, es va bloquejar fent 2 incubacions de 20 minuts amb solució de bloqueig i es van incubar els embrions 1 hora a t.a amb una dilució 1:400 de l'anticòs secundari Cy2, Cy3 o Cy5 (Jackson ImmunoResearch) en solució de bloqueig. Un cop s'ha incubat la mostra amb l'anticòs secundari cal fer tots els passos protegint-la de la llum amb paper d'alumini. Finalment, es van fer 3 rentats de 10 minuts amb solució de rentat, 2 rentats de 10 minuts amb PBS i es va tenyir el DNA amb una solució de DAPI 0.02 ng/ml (Sigma) en PBS. Es va treure l'excés de DAPI amb 3 rentats de 10 minuts amb solució de rentat i es van muntar els embrions sobre un portaobjectes utilitzant 100 μ l de *Mowiol* (Calbiochem) i cobreobjectes de 24x24 mm. Les mostres es van analitzar en un microscopi confocal Leica TCS/SPE equipat amb el software LAS/AF (versió v.1.6.3).

2.5.6. Immunolocalitzacions a glàndules salivals, discs imaginals, cervells i ovaris

Els discs imaginals, els cervells i les glàndules salivals es van obtenir de larves de tercer estadi crescudes a la temperatura indicada segons l'experiment. Els ovaris es van obtenir de femelles verges de 2 dies crescudes amb llevat a 25°C. Els teixits es van dissecionar en PBS fred i es van fixar amb paraformaldehid 3,7 % durant 10-20 minuts a t.a. Quan es va analitzar la localització en teixits *in vivo*, sense fixar, aquests es van muntar ràpidament en oli 10A Voltalef (Prolabo) i es van analitzar de seguida al microscopi confocal. Quan es van analitzar els efectes de l'àcid acètic, els teixits es van dissecionar en PBS/NP-40 0,1 % fred i es van fixar primer durant 1 minut amb PBS/NP-40 0,1 %/formaldehid 3,7 % seguit de 7 minuts amb formaldehid 3,7 %/àcid acètic 50%.

La immunolocalització, muntatge i visualització dels teixits fixats es va realitzar de la mateixa manera que s'ha descrit a l'apartat anterior per a embrions. Els anticossos primaris utilitzats han estat: α DDP1 policlonal de ratolí (1:800), α GFP policlonal de conill (1:1.000; Molecular Probes), α Calnexina policlonal de conill (1:200; Abcam) i α Lamina ADL67.10 monoclonal de ratolí (1:500; DSHB). Com a anticossos secundaris s'han emprat Cy3 i Cy5 (1:400; Jackson ImmunoResearch).

2.5.7. Immunolocalitzacions a cromosomes politènics

Per a la preparació de cromosomes politènics es van realitzar diferents fixacions en funció de la proteïna estudiada:

- **Immunolocalització de DDP1:** les glàndules salivals de larves de tercer estadi es van dissecionar en PBS/NP-40 0,1 %, i es van fixar 1 minut amb PBS/NP-40 0,1%/formaldehid 3,7 %. A continuació es van transferir les glàndules a un cobreobjectes siliconat que conté 16 μ l d'una solució de formaldehid 3,7 %/àcid acètic 50 % i es van incubar durant 7 minuts abans de cobrir-les amb el portaobjectes i esclafar-les amb l'ajuda d'una agulla emmanegada. DDP1 també es pot visualitzar amb els dos protocols següents.

- **Immunolocalització de Su(var)3-9:** les glàndules salivals de larves de tercer estadi es van disseccionar en tampó de Cohen (MgCl₂ 10 mM, glicerol sòdic 3P pH 7 25 mM, CaCl₂ 3 mM, KH₂PO₄ 10 mM, KCl 30 mM, sacarosa 160 mM, NP-40 0,5 %) un màxim de 8 minuts i es van fixar 2 minuts amb PBS/formaldehid 0,74 %. A continuació es van transferir les glàndules a un cobreobjectes siliconat que conté 16 µl d'una solució de formaldehid 0,74 %/àcid acètic 45 % i es van incubar durant 3 minuts abans de cobrir-les amb el portaobjectes i esclafar-les amb l'ajuda d'una agulla emmanegada.

- **Immunolocalització de HP1:** les glàndules salivals de larves de tercer estadi es van disseccionar en tampó de Cohen un màxim de 8 minuts i es van fixar 25 minuts amb la solució fixadora 1 (NaCl 100 mM, KCl 2 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, NP-40 2 %, formaldehid 2%). A continuació es van transferir les glàndules a un cobreobjectes siliconat que conté 16 µl d'una solució d'àcid acètic 45 % i es van incubar durant 10 minuts abans de cobrir-les amb el portaobjectes i esclafar-les amb l'ajuda d'una agulla emmanegada. En aquest protocol s'utilitza TBS (Tris-HCl pH 8 20 mM, NaCl 17 g/l, Tween 20 0,1 %) com a solució de rentat.

Un cop s'havien esclafat les glàndules amb l'agulla, es va posar un tros de paper a sobre el cobreobjectes i es va prémer ben fort amb el polze durant 15 segons. Finalment, es va congelar en N₂ líquid i es van guardar els portes en una solució de glicerol 67 % en PBS a -20°C fins a la seva utilització. Es van fer 3 rentats de 5 minuts amb solució de rentat (PBS, Tween 20 0,05 %), es va bloquejar fent 2 incubacions de 20 minuts amb solució de bloqueig (PBS, Tween 20 0,05 %, BSA 2 %), i es va incubar tota la nit a 4°C amb tampó de bloqueig que contenia la dilució apropiada d'anticòs primari: αDDP1 policlonal de ratolí (1:800), αme2K9H3 policlonal de conill (1:50; Upstate), αGFP monoclonal de ratolí (1:50; Roche), αGFP policlonal de conill (1:400; Molecular Probes) o αHP1 monoclonal de ratolí (1:100, DSHB). Al dia següent es va treure l'anticòs primari, es van fer 3 rentats de 5 minuts amb la solució de rentat, es va bloquejar fent 2 incubacions de 20 minuts amb solució de bloqueig i es va incubar 1 hora a t.a amb una dilució 1:200 de l'anticòs secundari Cy2, Cy3 (Jackson ImmunoResearch) en solució de bloqueig (en el cas de αGFP monoclonal de ratolí, es va fer servir una dilució 1:300). Finalment es van fer 3 rentats de 5 minuts amb solució de rentat i les mostres es van muntar en 20 µl de medi de muntatge *Mowiol*-DAPI. Els cromosomes politènics es van analitzar amb un

microscopi de fluorescència Eclipse E-1000 (Nikon) equipat amb càmera CoolSnapfx (Photometrics) i software Metamorph (versió 6.3r1).

2.5.8. Immunolocalitzacions a neuroblastes

Per a l'obtenció de neuroblastes es van disseccionar els cervells de larves de tercer estadi en medi salí NaCl 0,7 %, i es van rentar en aquest medi durant uns 5 minuts. Després es van incubar 2 hores amb 100 µl de colcemida 5mg/ml (Roche) en medi salí a les fosques i en una cambra humida a temperatura ambient. Llavors es va fer un xoc hipotònic amb citrat sòdic 0.5 % durant 8 minuts i es van fixar els cervells amb formaldehid 3,7 % durant 30 minuts, preparant la solució en aigua just abans d'utilitzar-la. A continuació es van transferir els cervells a un cobreobjectes siliconat que conté 16 µl d'àcid acètic 60 %, es van cobrir amb el portaobjectes i es van esclafar amb l'ajuda d'una agulla emmanegada. Finalment es va posar un tros de paper a sobre el cobreobjectes i es va prémer ben fort amb el polze durant 15 segons. Es va congelar en N₂ líquid i els neuroblastes es van permeabilitzar i bloquejar incubant 1 hora a t.a en PBST-llet (PBS, Tritó X-100 1 %, llet en pols desnatada 1 %). Seguidament, es van incubar tota la nit a 4°C en una cambra humida amb αDDP1 policlonal de ratolí (1:800) o αGFP policlonal de conill (1:1.000; Molecular Probes) en PBST-llet. Al dia següent es van rentar les preparacions 3 cops durant 10 minuts amb PBST-llet i es van incubar durant 1 hora, en una cambra humida i a t.a, amb una dilució 1:200 en PBST-llet de l'anticòs secundari Cy3 (Jackson ImmunoResearch). Finalment es van fer 3 rentats de 10 minuts amb PBS/Tritó X-100 1 %, i es van muntar i visualitzar com s'ha descrit per als cromosomes politènics en l'apartat anterior.

2.5.9. Experiments de PEV i reclutament ectòpic

Per analitzar l'efecte de la mutació *ddp1^A* en un experiment de PEV (Position Effect Variegation) es van creuar mascles *w1118; ddp1^A/CyO* amb femelles *In(1)w^{m4}*, i es va analitzar el fenotip d'ulls de la descendència heterozigota *ddp1^A/+* comparada amb els seus germans *+/+*. Com a controls, es va realitzar el mateix experiment amb mosques *ddp1^{15.1}* i *su(var)2-5⁰⁵*. Tots tres experiments es van realitzar per triplicat de forma independent. Les imatges d'ulls es van prendre amb un macroscopi Olympus MVX10.

Quan es va analitzar l'efecte la mutació de *ddp1^A* amb les línies *39C-42* i *118E-5* es van creuar mascles *w*; *39C-42* i *w*; *118E-5* amb femelles *w1118*; *ddp1^A/CyO*, i es va analitzar el fenotip d'ulls de la descendència heterozigota *ddp1^A/+* comparada amb els seus germans *+/+*. Com a controls, es va realitzar el mateix experiment amb mosques *ddp1^{15.1}* i *su(var)2-5⁰⁵*. Les imatges d'ulls es van prendre amb un macroscopi Olympus MVX10.

Per dur a terme els experiments de reclutament de DDP1 mitjançant el sistema LacI es van creuar femelles *S9.2* amb mascles *w*; *LacI-DDP1/CyO* o *w*; *LacI-DDP1/TM3*. L'expressió de la fusió LacI-DDP1 es va induir fent un xoc tèrmic diari de 45 minuts a 37°C en un bany d'aigua, i es va analitzar el fenotip d'ulls la descendència heterozigota *LacI-DDP1/+* comparada amb els seus germans *+/+*. Es van realitzar els mateixos experiments amb DDP1-LacI, LacI-HP1 i LacI. Les imatges d'ulls es van prendre amb una lupa Leica MZ16F.

2.6. Microscopia electrònica

Per a les anàlisis de microscopia electrònica, es van disseccionar glàndules salivals de larves *white* de tercer estadi en PBS fred i es van fixar a 4°C amb paraformaldehid 2%/glutaraldehid 0,1 % en tampó PB. Després de rentar amb glicina 50 mM en solució PB, es van enllitar en gelatina al 12 % i infiltrar amb sucrosa 2,3 M. Els blocs de gelatina es van congelar en N₂ líquid. Amb un ultracriotom (Leica EM Ultracut UC6/FC6) es van tallar crioseccions ultrafines que es van recollir sobre metilcel·lulosa 2 % en sucrosa 2,3 M, i es van incubar a t.a amb gotes de gelatina al 2 % en PBS durant 20 minuts a 37°C, seguit d'una incubació amb glicina 50 mM en PBS durant 15 minuts, i dos rentats de 10 i 5 minuts amb FBS 10 % en PBS. Les mostres es van incubar amb l'anticòs α DDP1 de conill purificat per afinitat en PBS/FBS 5 % durant 30 minuts, i després de 3 rentats de 10 minuts amb PBS, es van incubar durant 20 minuts amb proteïna A marcada amb partícules d'or col·loïdals de 10 nm de diàmetre (Cell Microscopy Center, Department of Cell Biology, University Medical Center Utrecht, The Netherlands) a una dilució 1:60 en FBS 5 %/PBS. Aleshores, es van fer 3 rentats de 10 minuts amb PBS, seguits de 2 rentats amb aigua destil·lada. Com a control de l'anticòs secundari, es va fer una mostra sense anticòs primari. Les mostres es van visualitzar al microscopi electrònic Jeol 1010 equipat amb una càmera CCD SIS Megaview III. El tractament de les mostres i la seva

visualització es van realitzar a la Unitat de Microscopia Electrònica dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

Per al comptatge de partícules d'or es van dividir les imatges en seccions de $0,0625 \mu\text{m}^2$ i es va comptabilitzar el nombre de partícules d'or per cada secció corresponent a nucli, reticle endoplasmàtic, citoplasma i mitocòndries. Amb les dades recollides es va fer una anàlisi estadística per determinar la quantitat de partícules d'or per μm^2 segons el teixit. Les dades de les mitocòndries no s'han inclòs en el gràfic de la figura R.13 perquè no eren estadísticament rellevants.

2.7. Obtenció i purificació de complexos de DDP1

Per a la purificació de proteïnes que interaccionen amb DDP1 es van utilitzar les cèl·lules estables TAP i DDP1-TAP descrites a l'apartat 2.4.4 d'aquest capítol, i es van purificar els complexos mitjançant el mètode de TAP (Tandem Affinity Purification) adaptat de Veraksa *et al.*, 2005 i Przewloka *et al.*, 2007.

2.7.1. Proves d'expressió

El primer pas va ser determinar la concentració de Cu^{2+} adient per expressar la construcció DDP1-TAP a nivells endògens. Es van créixer les cèl·lules a una densitat de $6 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml aproximadament en flascons de 25 cm^2 i es va induir l'expressió de DDP1-TAP durant 24 hores mitjançant diferents concentracions de CuSO_4 (100, 200, 300, 400, 500 μM). Com a control de la inducció es va reservar un flascó en què no s'hi va afegir CuSO_4 . Al dia següent es van fer extractes proteics a partir de les cèl·lules control i induïdes, i es van analitzar els nivells de DDP1-TAP per *Western blot* amb els anticossos αTAP (1:500, Open Biosystems) i αDDP1 policlonal de rata (1:10.000). Es van anar variant les concentracions de CuSO_4 fins a obtenir una expressió el més semblant a la proteïna endògena, i d'entre elles es va triar la més petita: 440 μM de CuSO_4 . Un cop definida la concentració òptima, es van estudiar els temps d'inducció: es va induir l'expressió de DDP1-TAP a 440 μM de CuSO_4 a diferents temps (12, 24, 36 hores) i es van estudiar els efectes per *Western blot*. Finalment, es va determinar que la inducció amb 440 μM de CuSO_4 durant 24 hores era la millor.

2.7.2. Preparació dels extractes citoplasmàtics i nuclears

Es van créixer entre 20 i 30 flascons de 175 cm² fins a una concentració aproximada de 6·10⁶ cèl·lules/ml, es van desenganxar les cèl·lules amb l'ajut d'una pipeta i es van traspasar a un *spinner* fent una dilució 1:2. Es van deixar aclimatar al *spinner* durant 12 hores en agitació suau, i llavors se'ls va afegir CuSO₄ 100 mM fins a obtenir una concentració final de 440 µM. Al cap de 24 hores es van recollir les cèl·lules centrifugant-les 15 minuts a 500 g. Es van rentar les cèl·lules 3 cops amb 50 ml de PBS i es va congelar el pellet a -80°C. L'operació es va repetir fins a tenir aproximadament uns 10 g de cèl·lules i es van prendre alíquotes de cada inducció per fer-ne un control per *Western blot*.

Un cop es va tenir suficient material, es van preparar extractes proteics citoplasmàtics i nuclears amb el mètode Dignam. Es van ressuspèndre les cèl·lules congelades en 2 volums de tampó A fred (Hepes 10 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, Tritó X-100 0,05 %, DTT 0,5 mM, PMSF 0,1 mM, inhibidors de proteïnes 10 µg/ml), es van passar a un *Dounce* i es van trencar les cèl·lules fent com a mínim 40 passades amb un pistó L. Es va centrifugar a 3.000 rpm durant 15 minuts a 4°C i es va separar el sobrenedant (part citoplasmàtica) del pellet (part nuclear). Al sobrenedant s'hi van afegir 0,11 volums de tampó B (Hepes 0,3 mM pH 7,9, MgCl₂ 30 mM, KCl 1,4 M) per pujar la força iònica i es va centrifugar a 20.000 rpm durant 1 hora a 4°C. Es va recollir el sobrenedant, que va ser considerat com a extracte citoplasmàtic. D'altra banda, el pellet corresponent a la part nuclear es va rentar primer amb 2 volums de tampó A i després amb 2 volums de tampó C (Hepes 20 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, NaCl 0,42 M, glicerol 25 %, EDTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,1 mM, inhibidors de proteïnes 10 µg/ml). El pellet es va ressuspèndre en 1 ml de tampó C/ml pellet (en cap cas la concentració final de NaCl ha de ser menor a 0,35 M), es va passar a un *Dounce* i es van trencar els nuclis fent 40 passades com a mínim amb el pistó S. L'homogeneïtzat es va traspasar a un *falcon* i es va incubar durant 30 minuts a 4°C amb agitació constant. Finalment es va centrifugar a 15.000 rpm durant 30 minuts a 4°C i el sobrenedant va ser considerat com a extracte nuclear. Un cop obtinguts els extractes citoplasmàtics i nuclears, es pot continuar amb la purificació dels complexos directament o es poden congelar els extractes amb neu carbònic i guardar-los a -80°C fins a la seva utilització.

2.7.3. Purificació dels complexos

Els extractes obtinguts es van incubar 1,5 hores en agitació suau a 4°C amb Dynabeads M-270 Epoxy preequilibrats amb BSA segons les instruccions del fabricant (Invitrogen) per eliminar interaccions inespecífiques. Llavors, es van incubar tota la nit en agitació suau a 4°C amb Dynabeads preequilibrats amb IgG de conill (MP Biochemicals). Es van fer 10 rentats de 10 minuts amb els tampons en que estaven ressuspesos els extractes (tampó A+B per a la fracció citoplasmàtica i tampó C per a la nuclear) i un rentat amb TE per eliminar interaccions inespecífiques. Finalment, les mostres es van eluir fent dues incubacions de 1 minut amb NH_4OH 1M/EDTA 5 mM. Les proteïnes es van liofilitzar i es van analitzar per LC-MS a la Plataforma de Proteòmica dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Les proteïnes identificades es van analitzar mitjançant el programa Mascot utilitzant les bases de dades NCBi i SwissProt. Els complexos també es van analitzar per SDS-PAGE tenyits amb plata.

V. RESULTATS

1. ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE DDP1

1.1. Estudi de la localització de DDP1 mitjançant l'ús d'anticossos

1.1.1. Estudi de la localització de DDP1 a cèl·lules S2 i òrgans de *Drosophila*

En aquest treball s'ha volgut fer un estudi exhaustiu de la localització subcel·lular de DDP1 en diferents òrgans i teixits de *Drosophila melanogaster*. Amb aquest propòsit es van dissecar (en cèl·lules S2 aquest pas no és necessari) i fixar amb paraformaldehid al 4% els diferents teixits a estudiar: cèl·lules S2, glàndules salivals, cervells, discs imaginals i ovaris. Es van realitzar immunolocalitzacions de tots els teixits amb l'anticòs α DDP1 i se'n va determinar la localització mitjançant microscopia confocal de fluorescència.

En cèl·lules S2 la immunolocalització amb α DDP1 presenta un patró citoplasmàtic sense cap senyal visible al nucli (figura R.1).

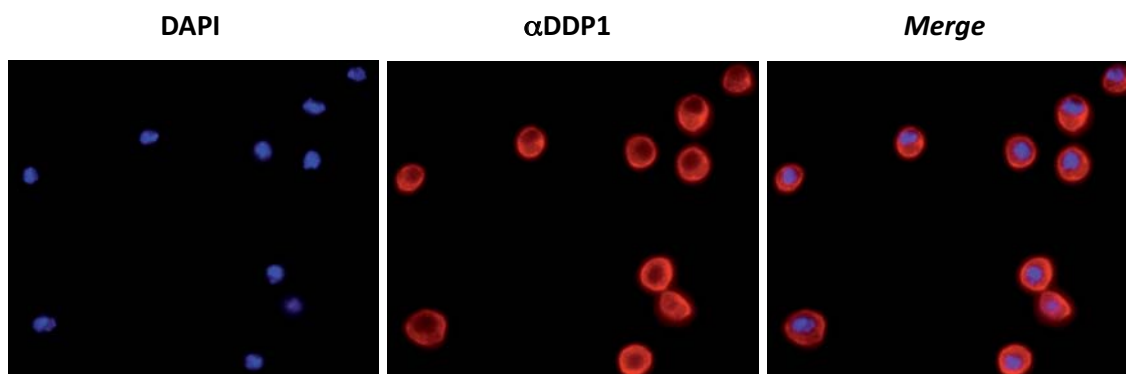


Fig. R.1. Immunolocalització amb anticòs α DDP1 a cèl·lules S2. El DNA es va tenyir amb DAPI (blau) i en vermell es mostra el senyal de fluorescència obtingut amb α DDP1.

Aquesta localització es repeteix a glàndules salivals, cervells i discs imaginals obtinguts de larves de tercer estadi i a ovaris de mosques adultes. A cervells i discs imaginals DDP1 presenta una localització citoplasmàtica mentre que, a glàndules salivals, DDP1 mostra una localització perinuclear i una estructura en forma de xarxa al citoplasma, similar a la formada pel reticle endoplasmàtic (figura R.2).

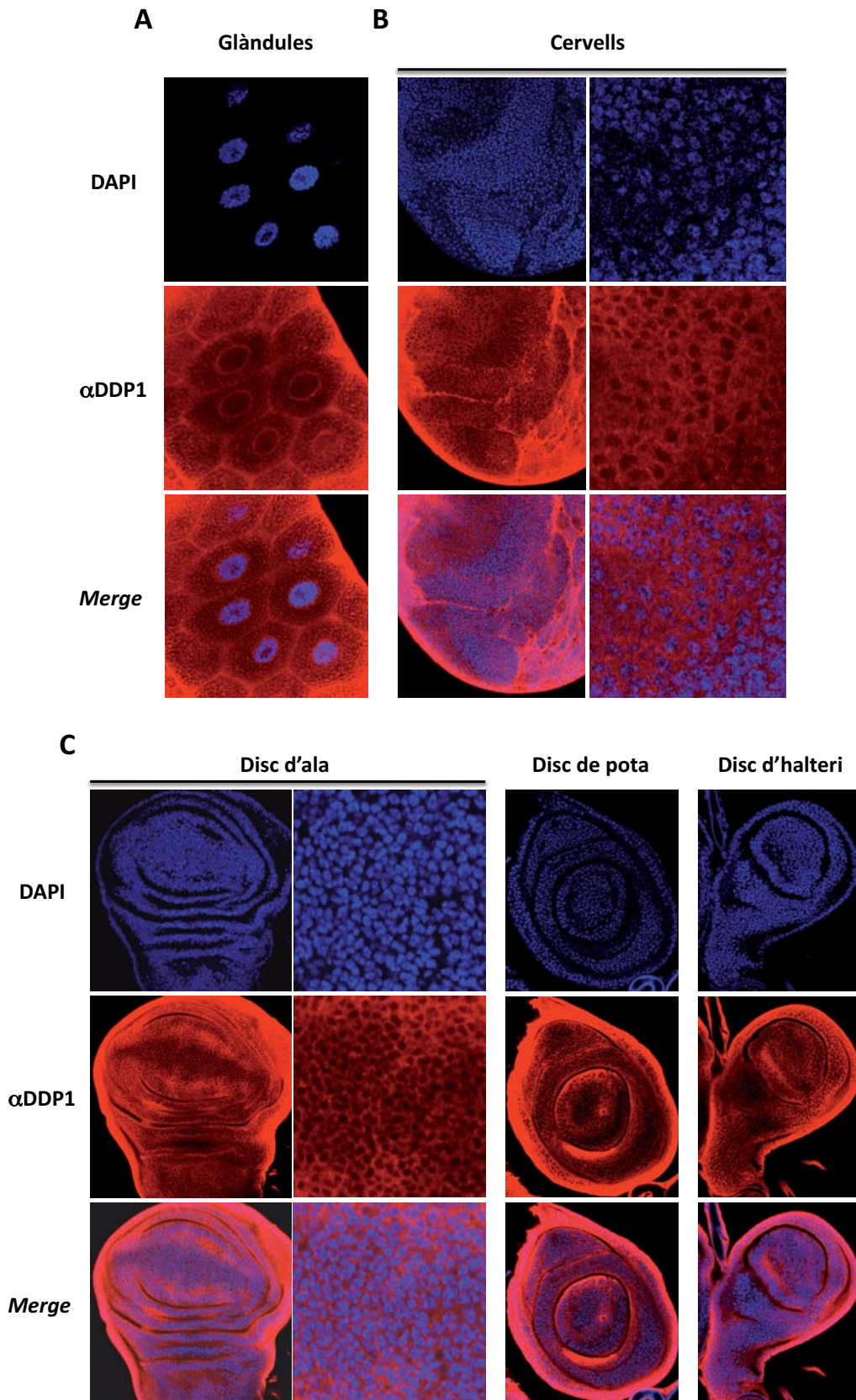


Fig. R.2. Immunolocalitzacions amb α DDP1 a glàndules salivals, cervells i discs imaginals de larves de tercer estadi. En blau es mostra el DAPI, que marca el DNA, i en vermell es mostra el senyal de fluorescència obtingut amb α DDP1. **A)** Glàndules salivals. **B)** Cervells. Es mostra una ampliació de la imatge per poder apreciar millor la localització de DDP1. **C)** Discs imaginals d'ala, pota i halteri. En el disc d'ala es mostra una ampliació de la imatge per poder apreciar millor la localització de DDP1.

A ovaris, DDP1 és present al citoplasma de les cèl·lules fol·liculars i, tot i que presenta una menor intensitat, al citoplasma de les cèl·lules *nurse* (figura R.3).

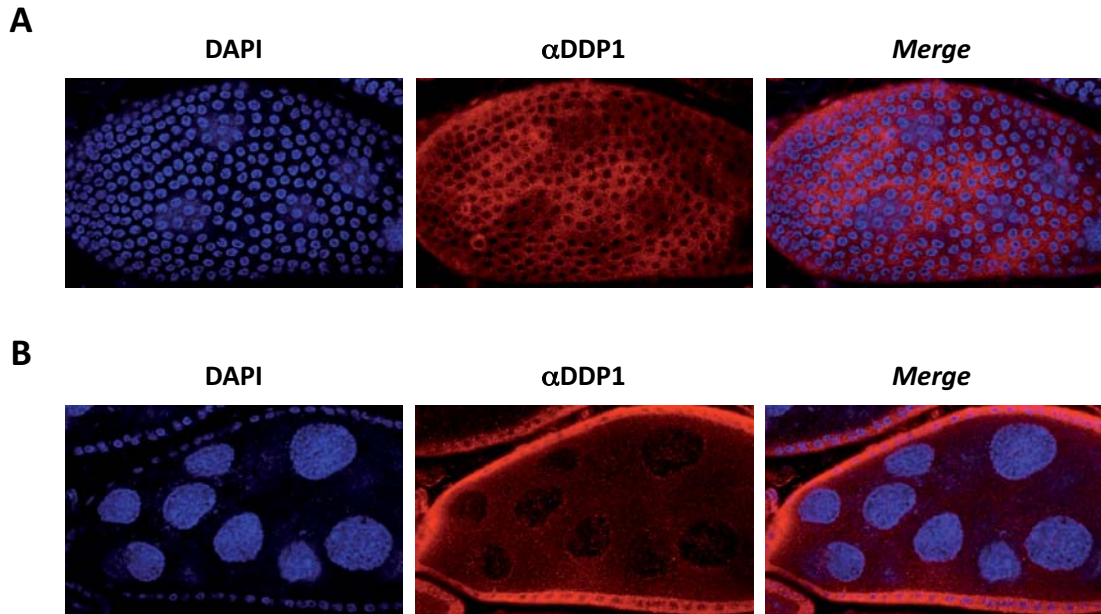


Fig. R.3. Immunolocalització amb α DDP1 a ovaris. El DNA es va tenir amb DAPI (blau) i en vermell es mostra el senyal de fluorescència obtingut amb α -DDP1. **A)** Cèl·lules fol·liculars de la part externa de l'ovari. **B)** Part interna de l'ovari, on es troben les cèl·lules *nurse*.

Així doncs, en òrgans de larves de tercer estadi i a ovaris de mosques femelles adultes, DDP1 presenta una localització citoplasmàtica, essent perinuclear en el cas de les glàndules salivals.

1.1.2. Estudi de la localització de DDP1 durant el desenvolupament

Per acabar de completar l'estudi, es va analitzar la localització de DDP1 al llarg del desenvolupament embrionari on, a més d'estudiar la localització de DDP1 en interfase, se'n pot estudiar el comportament en cèl·lules en procés de divisió. En primer lloc es van estudiar els nivells de DDP1 al llarg de les primeres sis hores del cicle embrionari per *Western blot*.

Es van recollir postes a intervals de dues hores per obtenir embrions de 0-2 h, 2-4 h i 4-6 h, i es van efectuar extractes proteics totals de cada una de les mostres. El contingut de DDP1 es va analitzar per *Western blot* utilitzant la proteïna Actina com a control de

càrrega (figura R.4). S'observa una gran abundància de DDP1 en les dues primeres hores de vida de l'embrió, entre els estadis de preblastoderm i blastoderm sinsticial. En les dues hores següents, corresponents a estadis avançats de blastoderm sinsticial (mitosi 13) fins a *rapid germ band elongation* s'observa una baixada significativa dels nivells de DDP1, que es recuperen cap a les 4-6 hores, sense arribar al nivell màxim observat entre les 0-2 hores. Aquests resultats suggereixen que DDP1 presenta efecte matern, ja que els nivells de proteïna observats entre les 0-2 hores, quan hi ha transcripció materna, decreixen cap a l'estadi de gàstrula, quan s'atura la transcripció materna i els nivells de transcripció zigòtics són encara molt baixos (Tadros *et al.*, 2007).

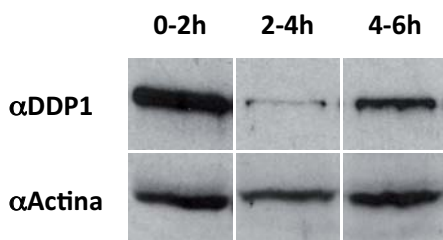


Fig. R.4. Anàlisi per *Western blot* dels nivells de DDP1 al llarg del desenvolupament embrionari. En la figura es mostren els nivells de DDP1 determinats per *Western blot* amb anticòs α DDP1 en extractes proteics d'embrions de 0-2 h, 2-4 h i 4-6 h. Es mostren els nivells d'Actina com a control de càrrega.

Un cop analitzats els nivells de DDP1 en els diferents estadis del desenvolupament, es van fixar embrions de 0-4 hores (vegeu l'apartat 2.5.5 de materials i mètodes) i es van realitzar immunolocalitzacions seguint el mateix procediment experimental que s'havia emprat en el cas de discs imaginals i cervells. La localització de DDP1 en cada cicle de divisió es va estudiar per microscopia confocal de fluorescència (figura R.5). A preblastoderm, DDP1 es troba distribuït heterogèniament al *yolk*, amb una major acumulació al voltant del nucli (figura R.5A). En embrions sinsticials, DDP1 presenta una localització citoplasmàtica que no es veu alterada durant la mitosi (figura R.5B). Aquesta localització citoplasmàtica es manté fins a la cel·lularització de l'embrió, en el cicle 14, en què el senyal amb α DDP1 es torna nuclear (figura R.5C). D'altra banda, en la mitosi del cicle 13, DDP1 no es localitza als cromosomes condensats, sinó que es troba fora de la placa metafàsica, envoltant els cromosomes en una estructura que s'assembla al fus mitòtic, i suggereix una associació als microtúbuls. La localització nuclear es manté en l'estadi de gàstrula, tot i que s'aprecia una baixada dels nivells de DDP1, i només es pot observar clarament senyal en els dominis mitòtics (grups de cèl·lules que estan en procés actiu de divisió), en què DDP1 es localitza sobre els cromosomes condensats (figura R.5D).

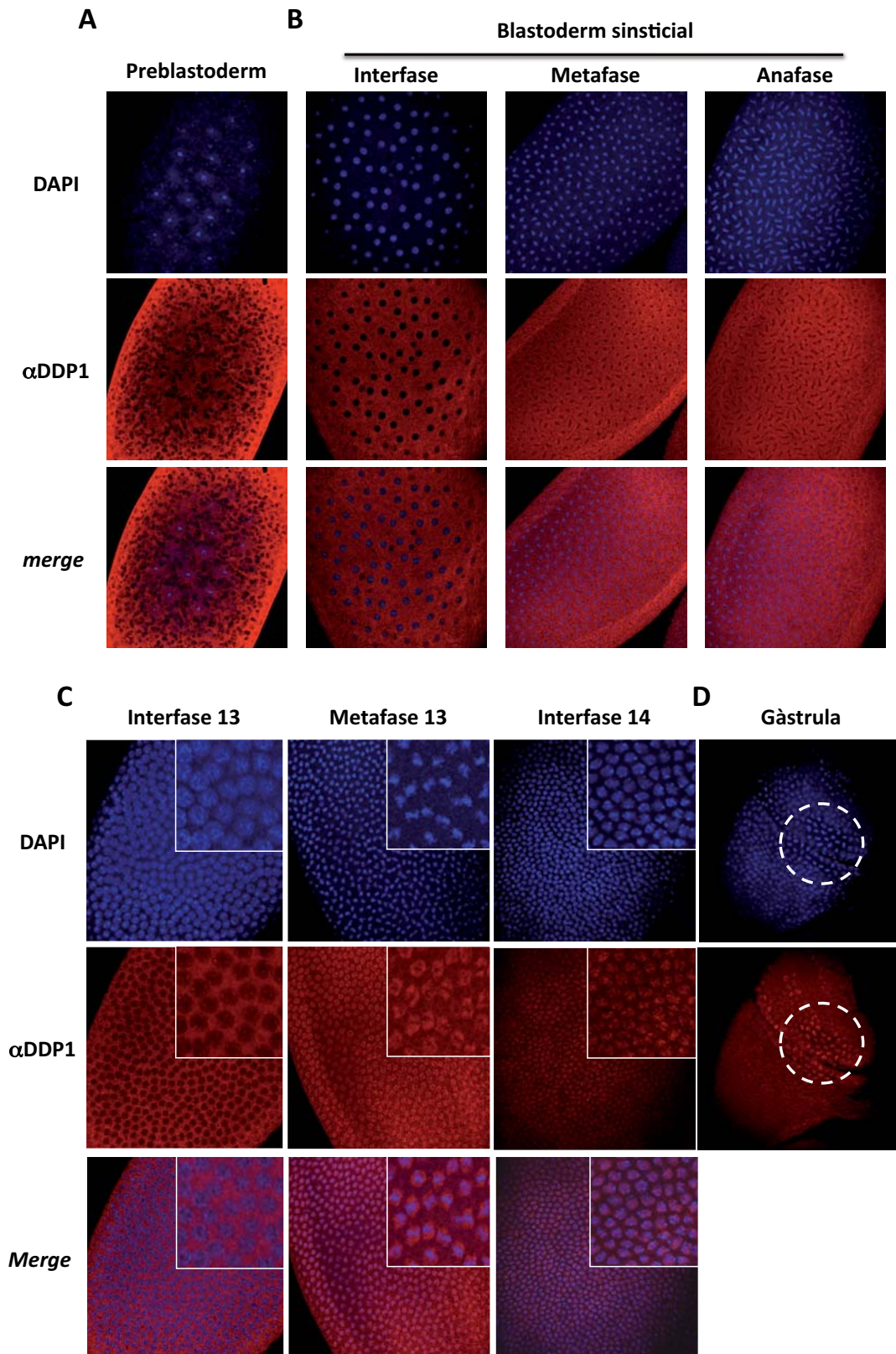


Fig. R.5. Immunolocalització amb α DDP1 a embrions de 0-4 h. El DNA es va tenir amb DAPI (blau) i en vermell es mostra el senyal obtingut amb α DDP1. **A)** Estadi de preblastoderm. **B)** Blastoderm sinsticial. Es mostren diferents estadis de la divisió cel·lular. **C)** Embrions en la divisió 13, en què es passa de blastoderm sinsticial a cel·lular. Es mostren diferents estadis de la divisió cel·lular amb ampliacions per poder apreciar millor la localització de DDP1. **D)** Embrió en estadi de gàstrula. Es senyalen els dominis mitòtics amb un cercle puntejat blanc.

La localització nuclear de DDP1 observada en interfase de blastoderm cel·lular sembla excloure l'heterocromatina. Aquesta es forma en el cicle 14, un cop han acabat les divisions ràpides i sincròniques de l'embrió sinsticial i se separen les cèl·lules amb membranes citoplasmàtiques individualitzades (Kellum *et al.*, 1995b). Moltes proteïnes que intervenen en la formació de l'heterocromatina colocalitzen amb ella en aquest moment (Rudolph *et al.*, 2007). Per comprovar si DDP1 exclou el cromocentre heterocromàtic en aquest estadi, es van realitzar immunolocalitzacions amb α DDP1 i α me2K9H3, un marcador heterocromàtic que colocalitza amb el cromocentre en la regió apical del nucli.

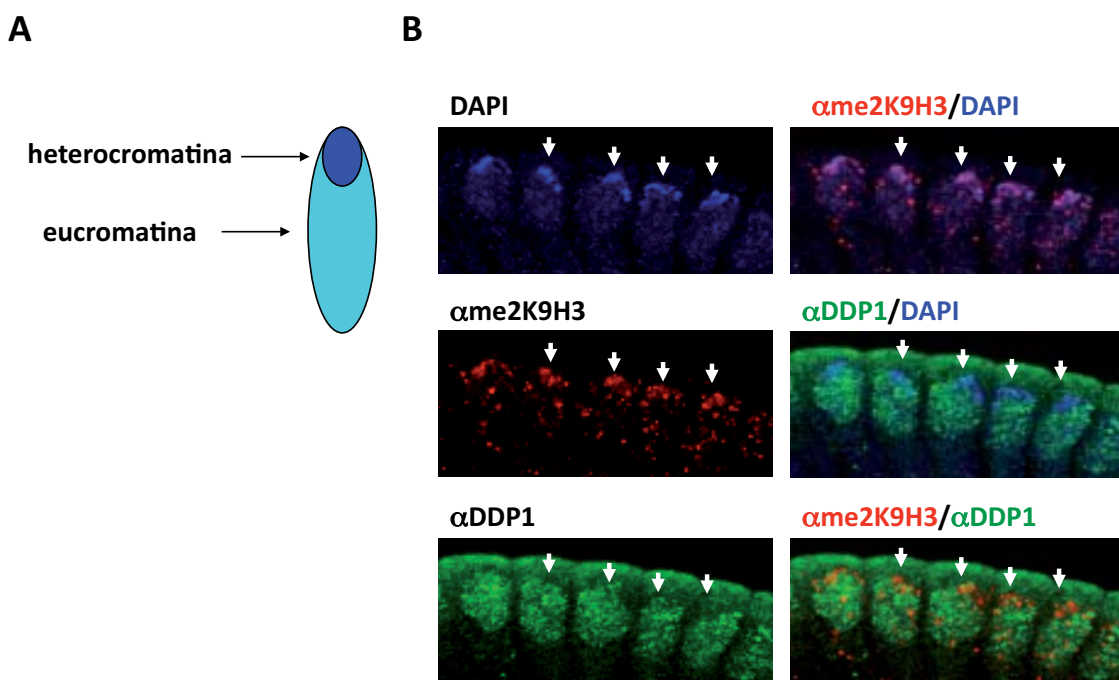


Fig. R.6. Immunolocalitzacions a embrions cel·lulars (cicle 14) en interfase amb α DDP1 i α me2K9H3. A) Esquema de la distribució entre heterocromatina i eucromatina al nucli. L'heterocromatina es localitza a la regió apical del nucli i es tenyeix amb DAPI intensament. B) L'heterocromatina, tenyida amb DAPI, es mostra en color blau. En vermell es mostra el senyal de α me2K9H3 i, en verd, el senyal de α DDP1. DDP1 no es troba a l'heterocromatina, ja no colocalitza ni amb DAPI ni amb α me2K9H3.

Com es pot observar en la figura R.6, en la interfase del cicle 14 el senyal amb α DDP1 es troba a les regions eucromàtiques del nucli i no colocalitza amb el DAPI ni amb α me2K9H3, que marquen l'heterocromatina situada en la zona apical del nucli. Sembla doncs que el senyal de DDP1, tot i ser nuclear, no es localitza al cromocentre heterocromàtic.

1.2. Estudi de la localització de DDP1 mitjançant fusions amb GFP

Amb l'objectiu de complementar l'estudi de la localització subcel·lular de DDP1 iniciat amb anticossos α DDP1 a l'apartat anterior, es va fusionar DDP1 a la proteïna verda fluorescent GFP. La proteïna de fusió es va expressar sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70* per obtenir elevats nivells d'expressió, o sota el control del promotor de *ddp1* per mimetitzar l'expressió endògena. L'expressió de proteïnes de fusió amb GFP permet evitar l'ús d'anticossos i de mètodes de fixació, ja que es pot observar la fluorescència directament.

1.2.1. Anàlisi de la localització de DDP1-GFP expressada sota el control del promotor de *ddp1*

Per estudiar la localització de DDP1-GFP en un context que mimetitzés el seu comportament endogen, es va clonar el promotor de *ddp1* (vegeu l'apartat 1.4.1 de materials i mètodes) i es va utilitzar per expressar la construcció DDP1-GFP. La localització de DDP1-GFP es va analitzar en els diferents òrgans de *Drosophila* utilitzant els mateixos procediments de dissecció i fixació que en l'apartat anterior, però en aquest cas no es van utilitzar anticossos sinó que es va visualitzar la fluorescència emesa per la proteïna GFP.

La localització observada amb DDP1-GFP mimetitzava completament l'observada per la proteïna DDP1 endògena, visualitzada amb l'anticòs α DDP1. DDP1-GFP és citoplasmàtica a discs imaginals, cervells i ovaris, i perinuclear a glàndules salivals (figura R.7).

Igual que en l'apartat anterior, es va realitzar un seguiment de la localització de DDP1-GFP al llarg del desenvolupament. Es van fixar embrions de 0-4 h i es va observar la localització de DDP1-GFP per fluorescència directa del GFP (figura R.8). DDP1-GFP recapitula, en general, la localització observada a embrions amb α DDP1: a preblastoderm, DDP1-GFP es troba distribuït heterogeniament al *yolk*, amb una major acumulació al voltant del nucli (figura R.8A). En embrions sinistricals, DDP1-GFP presenta una localització citoplasmàtica en interfase (figura R.8B).

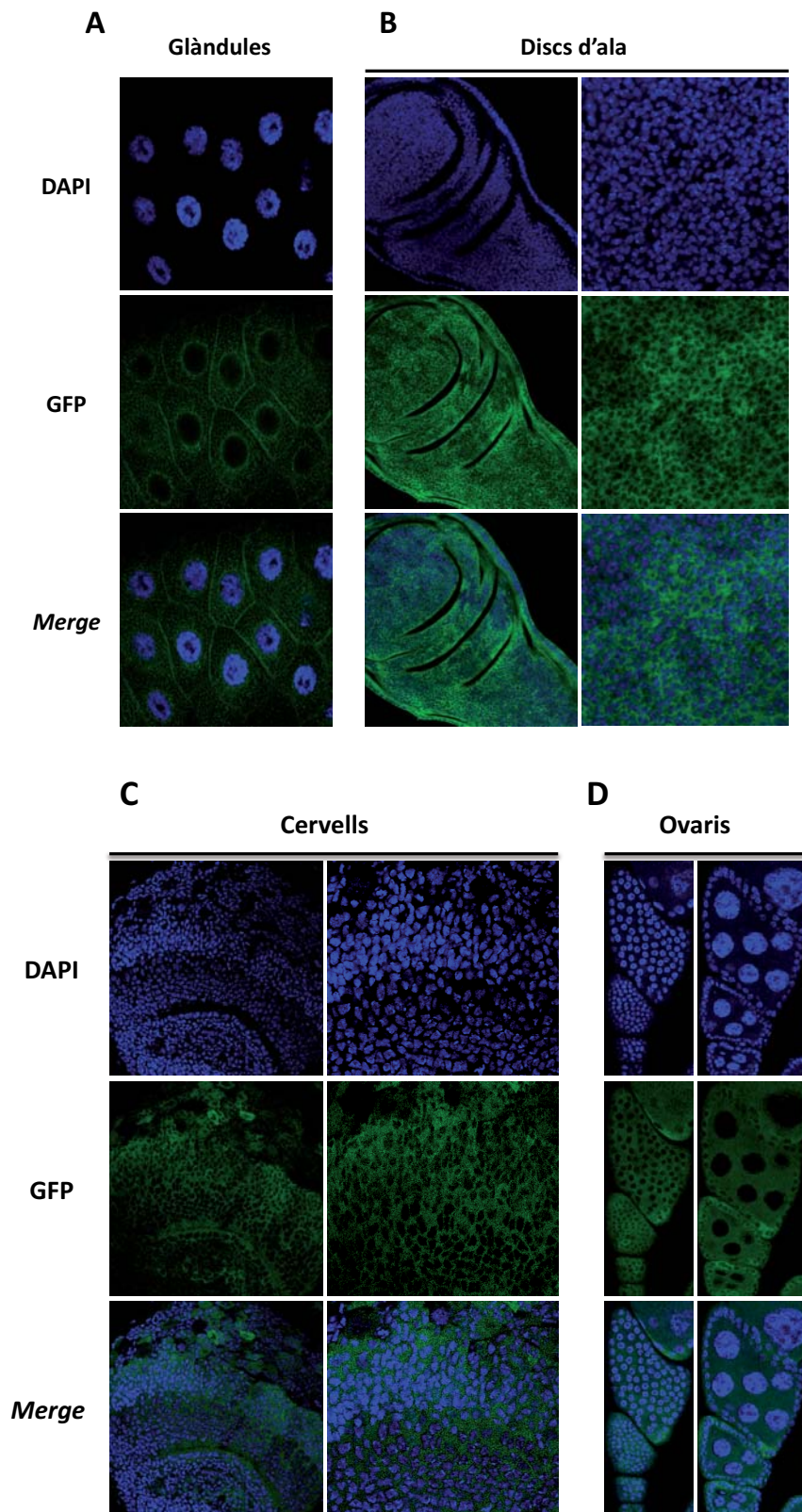
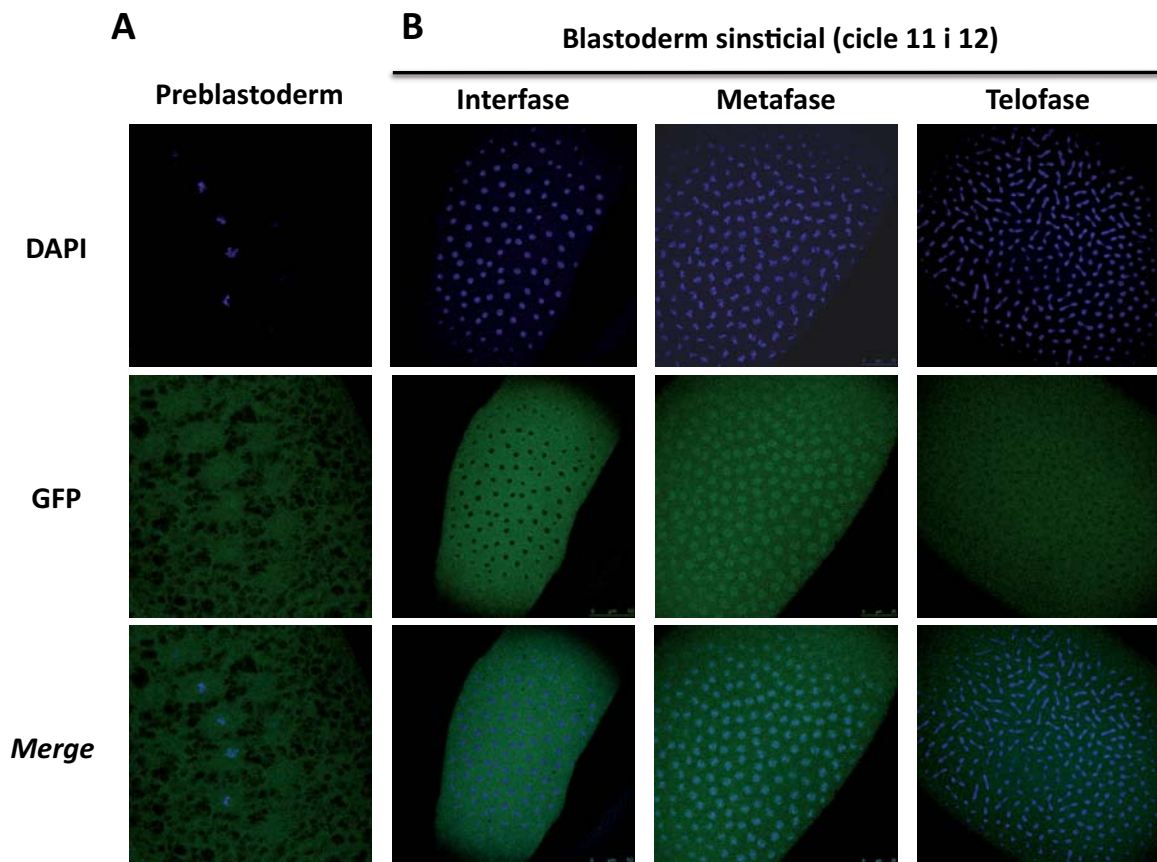


Fig. R.7. Localització de DDP1-GFP a diferents òrgans de *Drosophila*. El DNA es va tenyir amb DAPI (blau), i en verd es mostra la fluorescència emesa per la construcció DDP1-GFP. **A)** Glàndules salivals. **B)** Discs d'ala. Es mostra una ampliació de la imatge per poder apreciar millor la localització. **C)** Cervells. Es mostra una ampliació de la imatge per poder apreciar millor la localització. **D)** Ovaris. Es mostren les cèl·lules fol·liculars situades a l'exterior de l'ovari a la part esquerra de la imatge, i les cèl·lules *nurse* situades dins de l'ovari a la part dreta de la imatge.

La seva localització en mitosi varia segons l'estadi: en profase-metafase, DDP1-GFP es localitza fora de la placa metafàsica, envoltant els cromosomes en una estructura que s'assembla al fus mitòtic. Aquesta localització no s'aprecia a anafase i telofase, on DDP1-GFP envolta els cromosomes sense formar cap estructura en concret (figura R.8B).

És especialment destacable que DDP1-GFP no recapitula la localització nuclear observada amb l'anticòs α DDP1 a blastoderm cel·lular, essent DDP1-GFP citoplasmàtica (figura R.8C). A la figura R.9 es pot apreciar que, mentre que el senyal α DDP1 és clarament nuclear, DDP1-GFP es localitza al citoplasma, i no n'hi ha al nucli. En les imatges s'aprecia una certa localització citoplasmàtica amb l'anticòs α DDP1, on el senyal nuclear no és tan net, indicant que l'anticòs α DDP1 reconeix la proteïna DDP1-GFP citoplasmàtica. A gàstrula, DDP1-GFP mimetitzava la localització observada per DDP1 endògena als dominis mitòtics, on localitza als cromosomes condensats, però en cèl·lules en interfase difereix de la localització nuclear observada per DDP1 endògena, ja que DDP1-GFP és citoplasmàtica (figura R.8D).



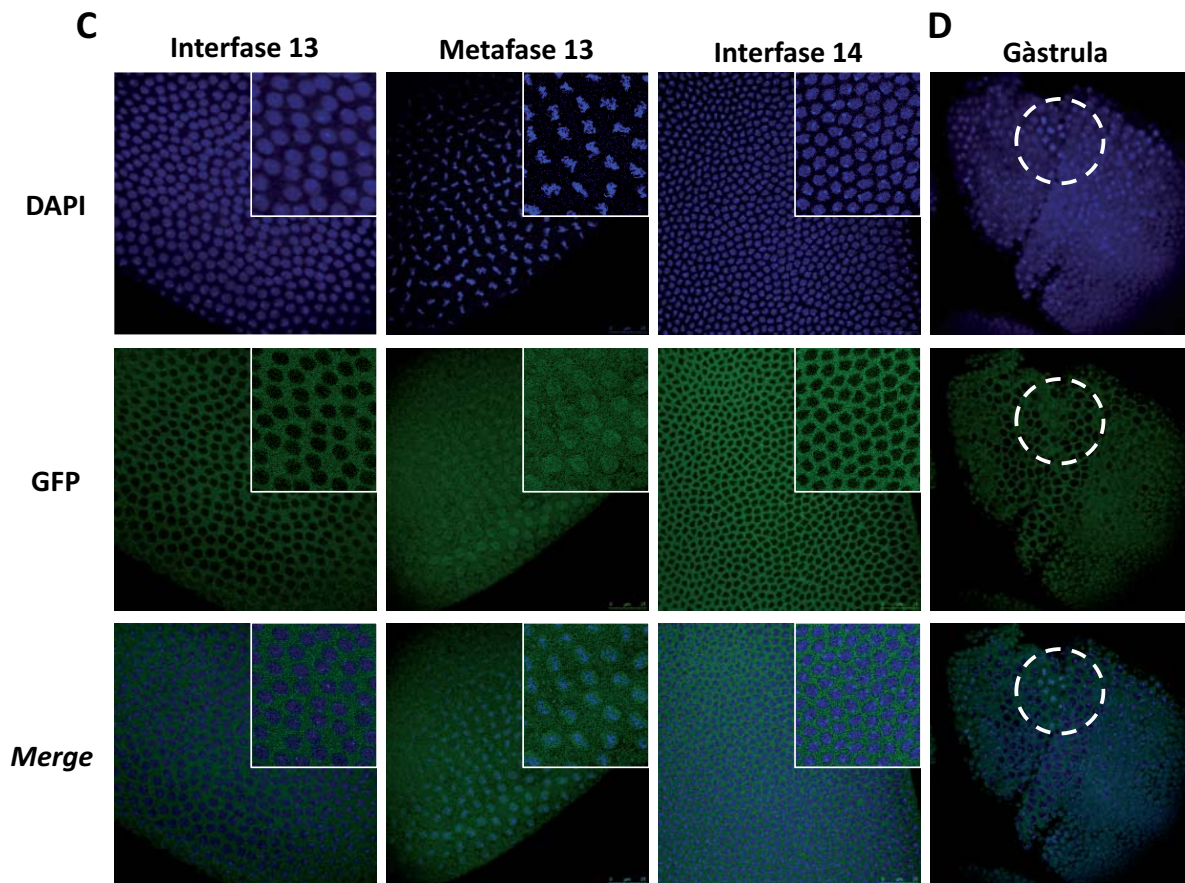


Fig. R.8. Localització de DDP1-GFP a embrions de 0-4 h. El DNA s'ha tenyit amb DAPI (blau) i en verd es mostra la fluorescència emesa per DDP1-GFP. **A)** Preblastoderm. **B)** Divisions mitòtiques dels cicles 11 i 12. **C)** Divisions mitòtiques del cicle 13 amb una ampliació de la imatge. **D)** Embrió en estadi de gàstrula, on se senyalen els dominis mitòtics amb un cercle puntejat blanc.

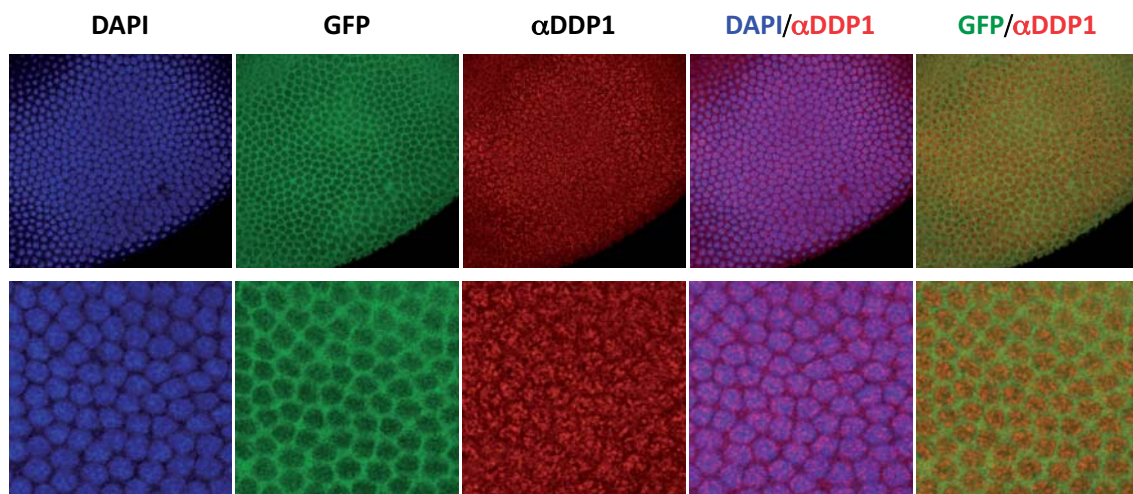


Fig. R.9. Immunolocalització amb α DDP1 a embrions *PROM-DDP1-GFP* en estadi de blastoderm cel·lular. El DNA està marcat amb DAPI (blau). En verd es mostra el senyal de DDP1-GFP, i en vermell el senyal de α DDP1. DDP1-GFP i el senyal de α DDP1 no colocalitzen, ja que DDP1-GFP es troba restringit al citoplasma, mentre que el senyal observat amb α DDP1 és sobretot nuclear.

A embrions, DDP1 envolta els cromosomes mitòtics en la profase-metafase d'una manera que recorda la forma del fus mitòtic. Per analitzar si l'estructura observada colocalitza amb el fus mitòtic, es van realitzar immunolocalitzacions tant a embrions que expressen DDP1-GFP sota el control del propi promotor amb $\alpha\beta$ Tubulina, com a embrions que expressen Tubulina-GFP amb α DDP1, els quals havien estat fixats amb un mètode que preserva els microtúbuls (vegeu l'apartat 2.5.5 de materials i mètodes). La colocalització de DDP1 amb la Tubulina en profase i metafase es va analitzar per microscopia confocal de fluorescència.

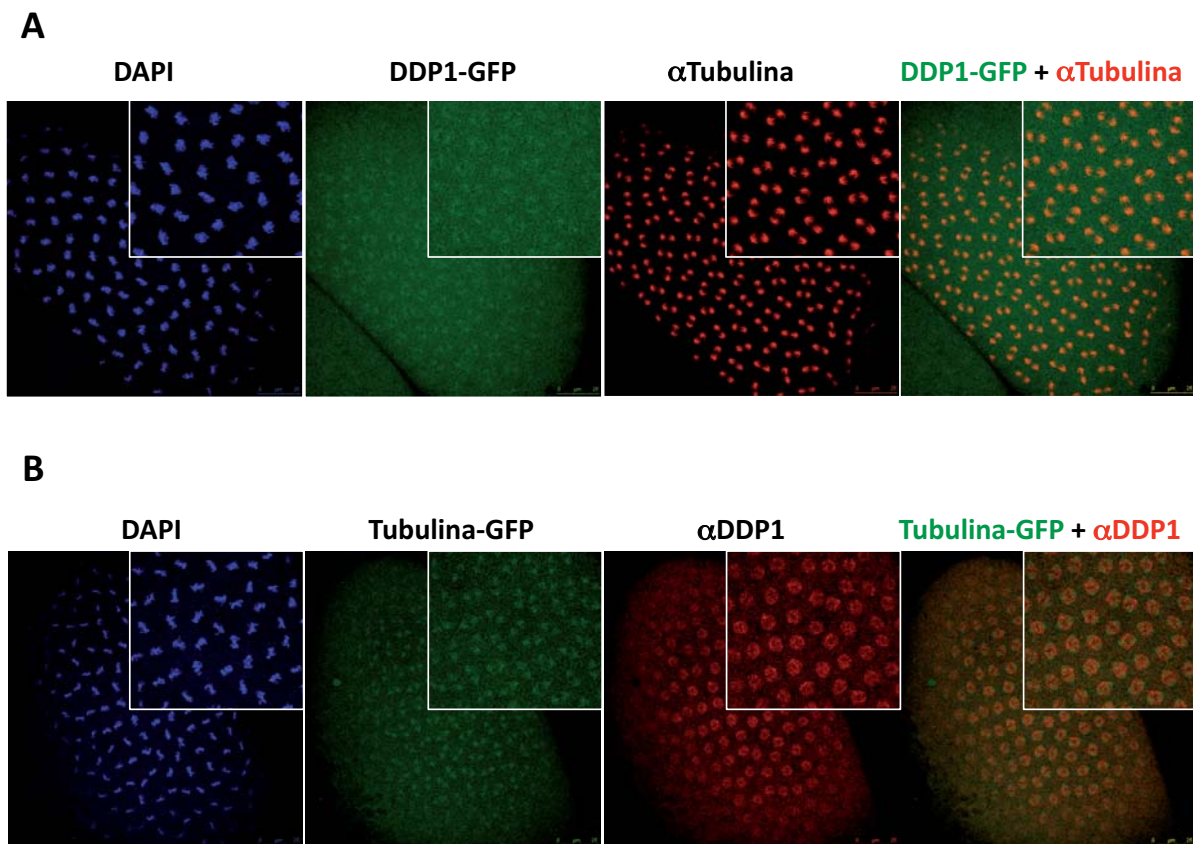


Fig. R.10. A) Immunolocalització amb $\alpha\beta$ Tubulina a embrions *PROM-DDP1-GFP*. El DNA s'ha tenyit amb DAPI (blau). En verd es mostra la fluorescència pròpia de DDP1-GFP. En vermell es mostra la localització de la Tubulina. **B) Immunolocalització amb α DDP1 a embrions *Tubulina-GFP*.** El DNA s'ha tenyit amb DAPI (blau). En verd es mostra la fluorescència pròpia de Tubulina-GFP. En vermell es mostra la localització de DDP1. Es mostra una ampliació de totes les imatges per apreciar millor la colocalització entre DDP1 i la Tubulina.

Com es mostra en la figura R.10, DDP1 colocalitza parcialment amb la Tubulina en profase i metafase, tot i que no en anafase (dades no mostrades), la qual cosa indica que DDP1 estaria parcialment associada als microtúbuls durant la mitosi.

1.2.2. Anàlisi de la localització de DDP1-GFP expressada sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70*

La localització de DDP1-GFP expressada sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70* es va analitzar a glàndules salivals i cervells fixats de la mateixa manera que en l'apartat anterior. La utilització d'un promotor més fort va permetre, a més, estudiar la localització de DDP1-GFP *in vivo*, sense cap mètode de fixació.

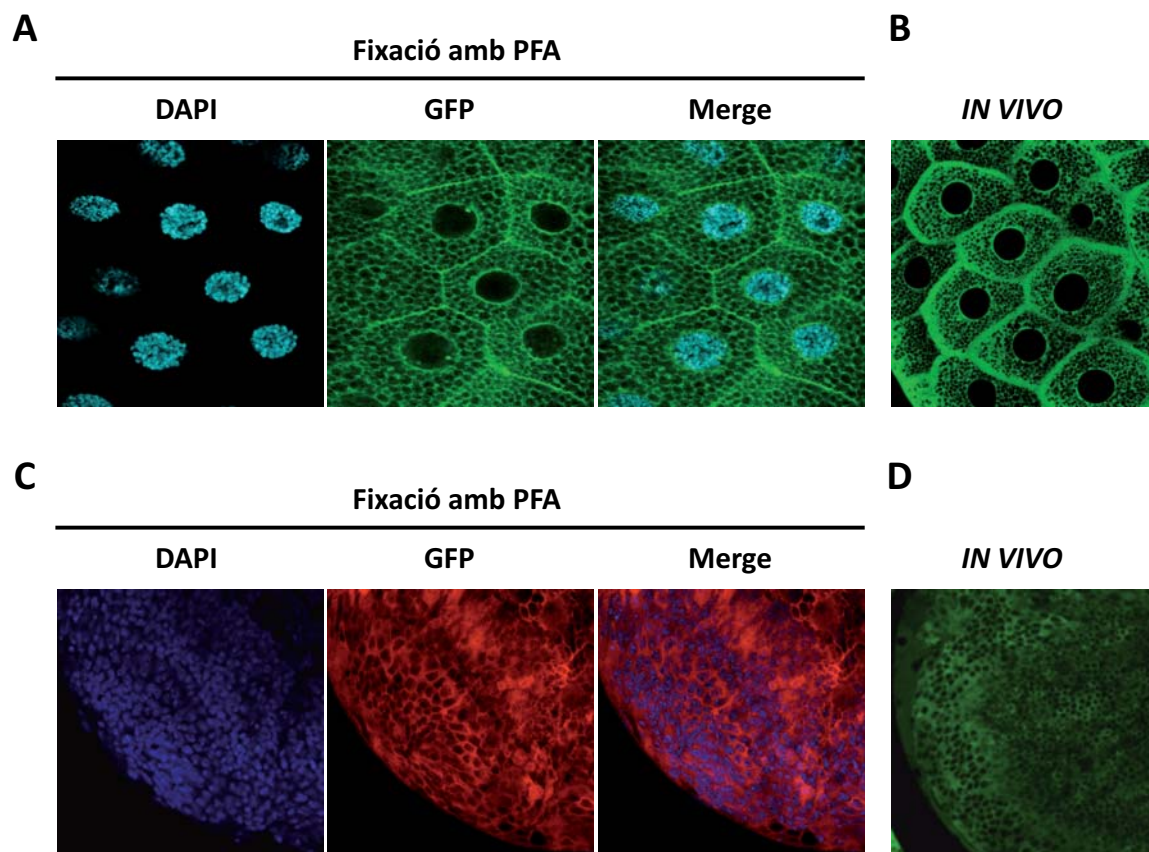


Fig. R.11. Localització de DDP1-GFP a cervells i glàndules salivals. L'expressió de DDP1-GFP es va induir mitjançant un xoc tèrmic d'una hora en totes les mostres. En blau es mostra el DAPI, que marca el DNA. En verd o vermell es mostra la fluorescència emesa per la GFP. **A)** Glàndules salivals fixades amb pFA. **B)** Glàndules salivals *in vivo*. **C)** Cervells fixats amb pFA. **D)** Cervells *in vivo*.

Es va estudiar la localització de DDP1-GFP a cervells i glàndules salivals en què s'havia induït l'expressió de la proteïna mitjançant un xoc tèrmic d'una hora. La fluorescència emesa pel GFP es va analitzar tant en teixits fixats amb paraformaldehid com en teixits sense fixar. En la figura R.11, es mostra la localització de DDP1-GFP a glàndules salivals i cervells. A cervells i glàndules salivals fixats DDP1-GFP és citoplasmàtica i perinuclear, respectivament. Aquesta localització es manté en els teixits sense fixar, indicant que la

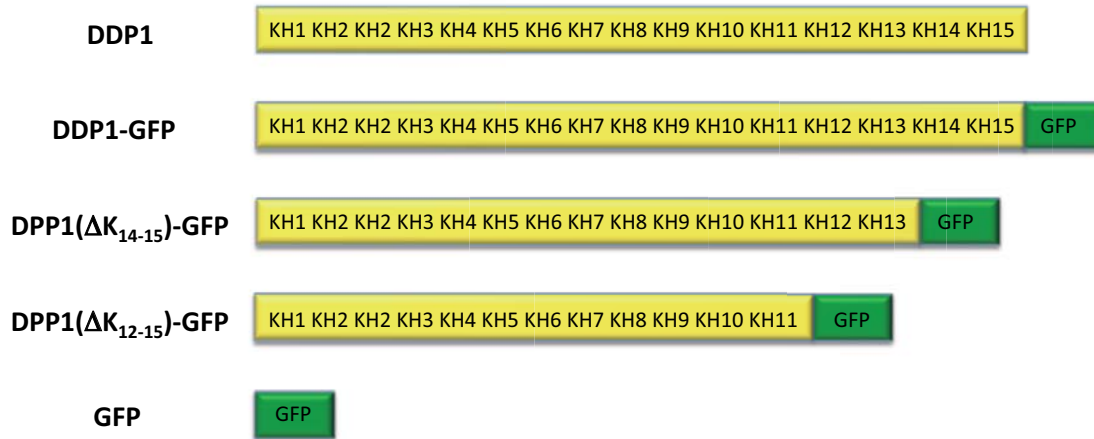
fixació no afecta la localització de la proteïna. Aquest experiment també suggereix que la localització perinuclear i citoplasmàtica de DDP1 no és causada per una sobreexpressió de la proteïna, ja que DDP1-GFP induïda amb el promotor de xoc tèrmic *hsp70* presenta la mateixa localització que en ser expressada amb el promotor de *ddp1*, que mimetitza el promotor endogen.

1.2.3. Estudi de la contribució dels dominis KH 12-15 en la localització perinuclear de DDP1

La localització perinuclear de DDP1 a glàndules salivals podria indicar una associació de la proteïna al reticle endoplasmàtic rugós. A llevat s'ha proposat que la localització de Scp160 al reticle endoplasmàtic rugós depèn de l'associació de Scp160 amb els poliribosomes associats a membrana a través dels dos últims dominis KH (Baum *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007a). Amb l'objectiu de determinar si els dos últims dominis KH de DDP1 contribueixen a la localització perinuclear de la proteïna, es van realitzar fusions amb GFP de formes truncades de DDP1 en què s'havien eliminat els dos últims dominis KH, KH15 i KH14, o els últims quatre dominis KH, KH12-KH15 (vegeu l'apartat 1.4.1 de material i mètodes), es van expressar sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70*, i la seva localització es va estudiar per microscopia confocal de fluorescència.

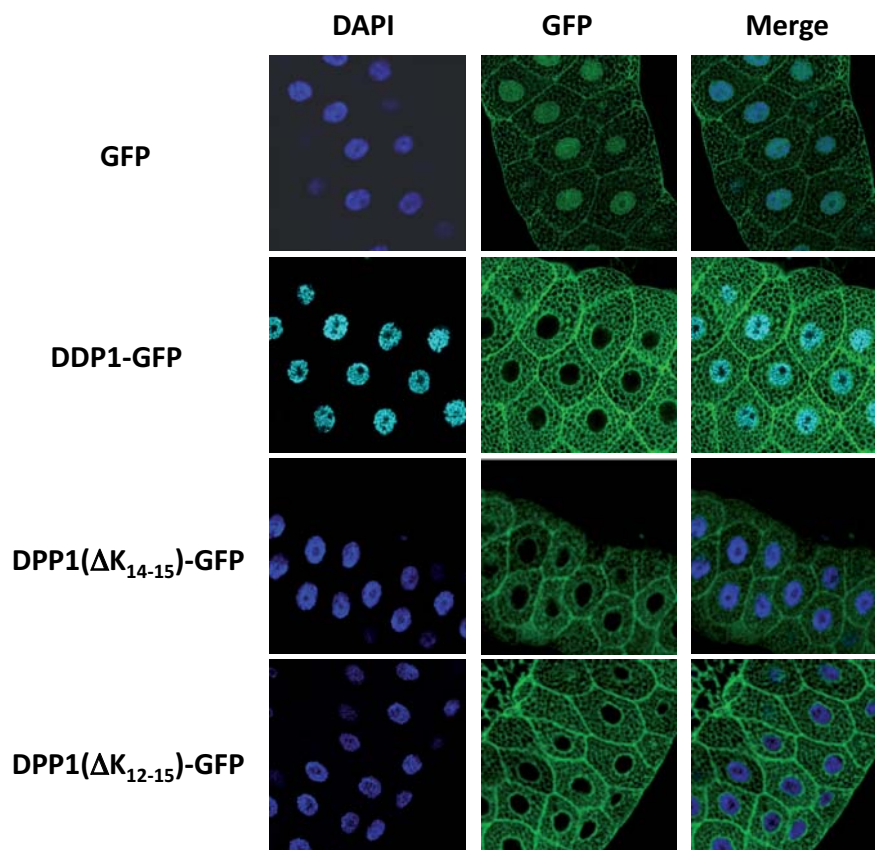
Es va estudiar la localització de DDP1-GFP i de les formes truncades a glàndules salivals en què s'havia induït l'expressió de les proteïnes mitjançant un xoc tèrmic d'una hora. La fluorescència emesa pel GFP es va analitzar tant a glàndules fixades amb paraformaldehid com a glàndules sense fixar. En la figura R.12 es mostren les fusions amb GFP realitzades i la seva localització a glàndules salivals fixades i *in vivo*. Les imatges mostren que totes les construccions són perinuclears i presenten l'estructura citoplasmàtica en forma de xarxa. Així doncs, els últims quatre dominis KH no tenen cap paper aparent en la localització perinuclear de DDP1, la qual cosa suggereix que si la localització perinuclear és causada per la unió de DDP1 als ribosomes de membrana, a *Drosophila* aquesta unió no depèn dels últims quatre dominis KH. El control GFP suggereix que la localització perinuclear no pot ser atribuïda a la proteïna GFP, ja que aquesta presenta una localització sobretot nuclear.

A



B

Fixació amb PFA



C

IN VIVO

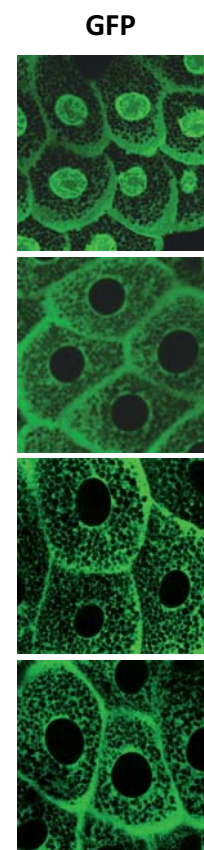


Fig. R.12. Anàlisi de la localització a glàndules salivals de les construccions truncades de DDP1 fusionades amb GFP. A) Esquema de les construccions analitzades. Totes les construccions es troben sota el control del promotor de xoc tèrmic. **B)** Glàndules fixades amb pFA. En blau es mostra el DAPI, que marca el DNA. En verd es mostra la fluorescència emesa per GFP. **C)** Glàndules sense fixar, *in vivo*. En verd es mostra la fluorescència emesa per la GFP.

1.3. Ànlisi de la localització de DDP1 al reticle endoplasmàtic rugós

En els apartats anteriors s'ha vist que DDP1 presenta una localització citoplasmàtica en tots els òrgans estudiats i que, a glàndules salivals, presenta una localització perinuclear que podria ser deguda a una associació de DDP1 al reticle endoplasmàtic rugós, tal i com s'ha descrit per Scp160, Vgl1 i les vigilines humanes (Wintersberger *et al.*, 1995; Klinger *et al.*, 1996; Kügler *et al.*, 1996a; Frey *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 2010). D'altra banda, la localització perinuclear de DDP1 podria ser causada pel fet que DDP1 formés part de la membrana nuclear, com s'ha proposat per Scp160 (Marsellach *et al.*, 2006), ja que l'eliminació dels últims dominis KH, descrits a llevat i a humans de ser els responsables d'unió als poliribosomes de membrana i citosòlics (Baum *et al.*, 2004; Vollbrandt *et al.*, 2004) no afecta la localització perinuclear de DDP1.

Per estudiar més en profunditat si DDP1 es troba associada al reticle o forma part de la membrana nuclear, es van fer immunolocalitzacions a glàndules salivals que expressen la proteïna DDP1-GFP sota el control del promotor de xoc tèrmic amb α Calnexina, una proteïna integral de membrana que marca el reticle endoplasmàtic rugós (Kleizen *et al.*, 2005) i amb α Lamina Dm₀, una proteïna de membrana nuclear que es troba a la part interna del nucli (Gruenbaum *et al.*, 2000). En la figura R.13 es mostren les localitzacions de DDP1-GFP amb Lamina i Calnexina a glàndules salivals en què s'ha induït l'expressió de DDP1-GFP mitjançant un xoc tèrmic d'una hora. Les imatges mostren una elevada colocalització entre DDP1-GFP i la Calnexina, tant a l'anell perinuclear com a la xarxa citoplasmàtica. En canvi, no mostren cap colocalització amb la Lamina, que marca la part interna de la membrana nuclear, suggerint que DDP1 no forma part de la estructura de la membrana nuclear *per se*, sinó que es localitza a la cara citoplasmàtica d'aquesta, a la regió corresponent al reticle endoplasmàtic rugós.

Per corroborar que la localització perinuclear de DDP1 es troba a la part citoplasmàtica de la membrana nuclear, es van realitzar experiments de microscopia electrònica. Així doncs, es van fixar químicament glàndules salivals de larves *white* i se'n van obtenir talls ultrafins, sobre els quals es van realitzar immunolocalitzacions amb α DDP1 de conill purificat per afinitat seguit d'un marcatge amb un anticòs secundari de conill marcat amb partícules d'or.

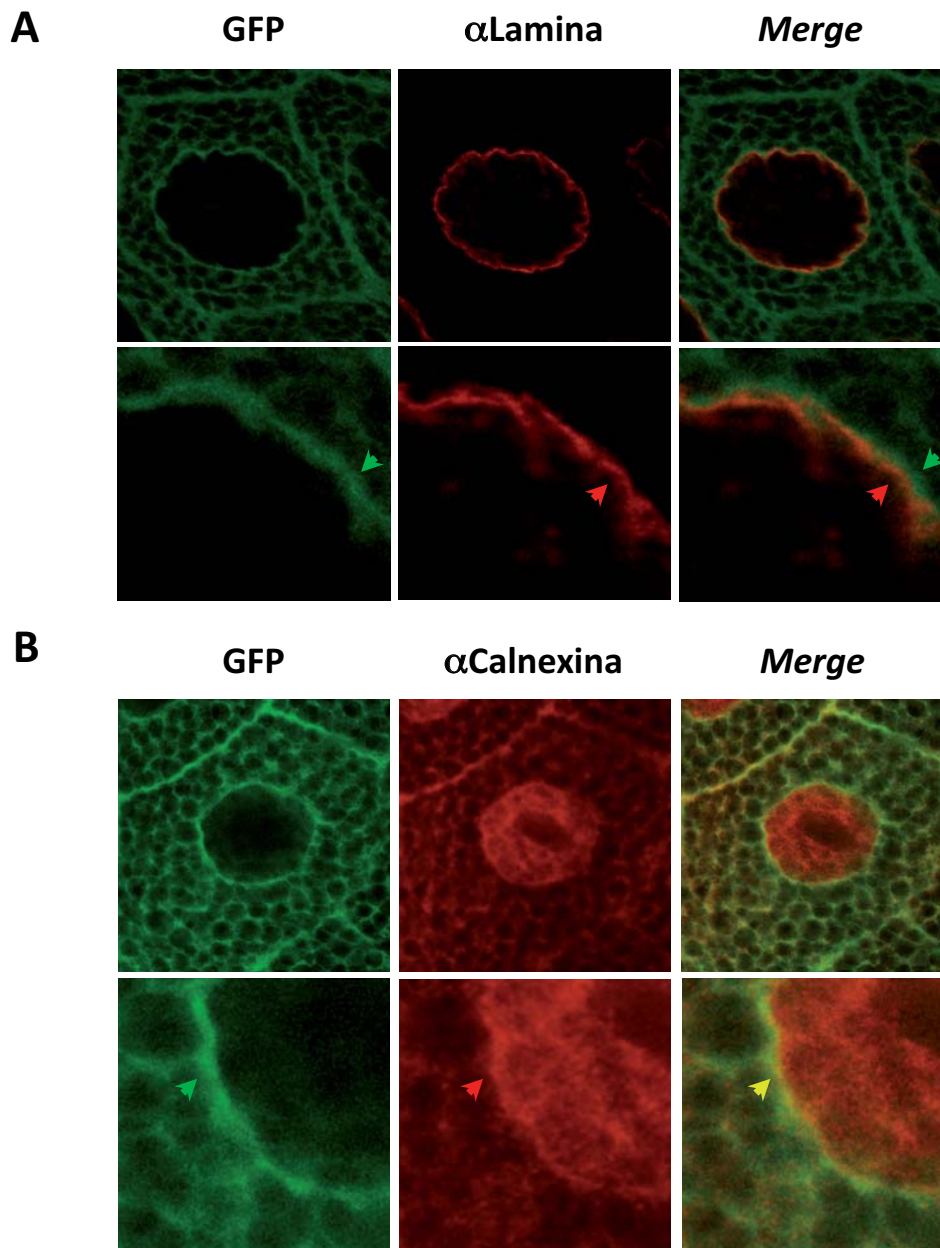


Fig. R.13. Immunolocalitzacions a glàndules salivals *hsp70-DDP1-GFP* amb α Lamina i α Calnexina.
A) Immunolocalització amb α Lamina. En verd es mostra la fluorescència de DDP1-GFP. En vermell es mostra el senyal de Lamina. Es mostra una ampliació de la zona propera a la membrana nuclear. Les fletxes verda i vermella indiquen la posició de DDP1-GFP i Lamina respectivament en la membrana nuclear. **B) Immunolocalització amb α Calnexina.** En verd es mostra la fluorescència de DDP1-GFP. En vermell es mostra el senyal de Calnexina. Es mostra una ampliació de la zona propera a la membrana nuclear. Les fletxes verda i vermella indiquen la posició de DDP1-GFP i Calnexina respectivament en la membrana nuclear.

La localització de DDP1 es va analitzar per microscopia electrònica, mitjançant la visualització de les partícules d'or lligades a l'anticòs secundari (vegeu l'apartat 2.6 de materials i mètodes). El que s'observa és que DDP1 es localitza a la part citoplasmàtica

de la membrana nuclear i no presenta cap acumulació a la cara interna d'aquesta. En la zona citoplasmàtica de la cèl·lula, DDP1 es troba enriquida en el reticle endoplasmàtic rugós, visible pels seu plecs característics, sense cap acumulació significativa en altres orgànuls cel·lulars com el nucli o les mitocondries (figura R.14).

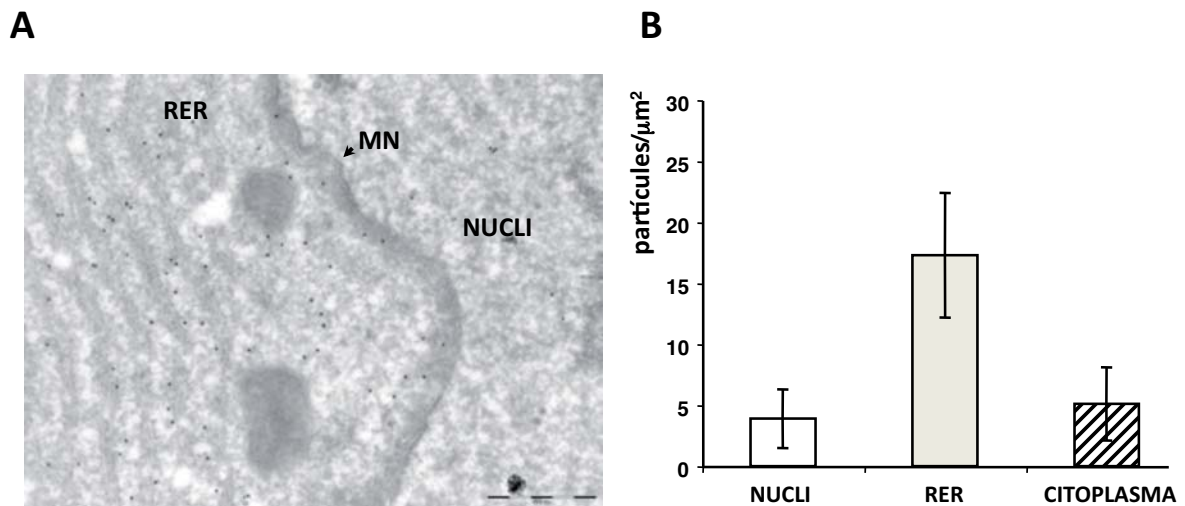


Fig. R.14. Localització de DDP1 a glàndules salivals mitjançant microscopia electrònica. A) Glàndula salival focalitzada sobre la zona propera a la membrana nuclear. Les diferents parts de la cèl·lula es troben indicades. RER: reticle endoplasmàtic rugós. MN: membrana nuclear. La proteïna DDP1 es visualitza com a punts negres. El reticle endoplasmàtic rugós es visualitza com a plecs paral·lels a la membrana nuclear. **B)** Anàlisi estadística del nombre de partícules d'or per superfície a nucli, reticle endoplasmàtic rugós i citoplasma.

Sembla doncs, que DDP1 es troba enriquida en la zona del reticle endoplasmàtic rugós, envoltant la membrana nuclear per la part citoplasmàtica d'aquesta. Aquest enriquiment és clarament visible a glàndules salivals, les quals presenten un reticle endoplasmàtic molt desenvolupat i cèl·lules molt grans, en què gairebé tot el citoplasma es troba ocupat pel reticle endoplasmàtic, mentre que en els altres òrgans de *Drosophila* no s'ha pogut apreciar una localització perinuclear distingible de la localització citoplasmàtica perquè segurament el citoplasma és massa petit o el reticle no es troba prou desenvolupat.

1.4. Estudi de la localització de DDP1 en teixits de *Drosophila* tractats amb àcid acètic

Dels resultats obtinguts en els apartats anteriors es pot concloure que DDP1 és una proteïna citoplasmàtica en tots els teixits estudiats, i que només presenta localització

nuclear a certs estadis a embrió. Aquests resultats són recapitulats per DDP1-GFP, que presenta la mateixa localització citoplasmàtica que l'observada amb α DDP1 excepte a blastoderm cel·lular i gàstrula, on el senyal amb l'anticòs es torna nuclear a partir del cicle 14 de l'embriogènesi. A blastoderm cel·lular DDP1-GFP és completament citoplasmàtica, però a gàstrula es veu nuclear als dominis mitòtics, en els quals es posiciona sobre els cromosomes mitòtics, mentre que no ho fa a les zones interfàsiques, on és citoplasmàtica.

Aquesta localització citoplasmàtica està en desacord amb els resultats obtinguts prèviament al laboratori, segons els quals DDP1 es trobaria associada als cromosomes politènics de glàndules salivals (Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2003; Piacentini *et al.*, 2009). La diferència més important entre els protocols utilitzats per preparar les mostres rau en l'ús d'àcid acètic en la preparació de mostres de cromosomes politènics. Podria donar-se el cas que la localització de DDP1 fos influenciada pel tipus de fixació emprada. Per respondre aquesta qüestió, es va estudiar la localització de DDP1 i de la fusió DDP1-GFP, expressada sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70* o el promotor de *ddp1*, a cèl·lules S2, glàndules salivals, neuroblastes i cromosomes politènics fixats amb àcid acètic utilitzant el mateix protocol que l'emprat per preparar cromosomes politènics.

Com es mostra a la figura R.15, DDP1 presenta una localització nuclear significativa a tots els teixits estudiats en ser tractats amb àcid acètic. A glàndules salivals fins i tot es poden apreciar bandes sobre els cromosomes politènics intactes, confirmant els resultats anteriors en què, en aquestes condicions experimentals, DDP1 s'associa a llocs específics dels cromosomes politènics.

El tractament amb àcid acètic també modifica la localització de DDP1-GFP, tant a glàndules salivals com a neuroblastes, en què DDP1-GFP presenta una clara senyal al nucli (figura R.16). Immunolocalitzacions amb α GFP a cromosomes politènics que expressen DDP1-GFP sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70*, mostren que DDP1-GFP també és capaç d'associar-se a llocs específics dels cromosomes politènics en ser tractada amb àcid acètic.

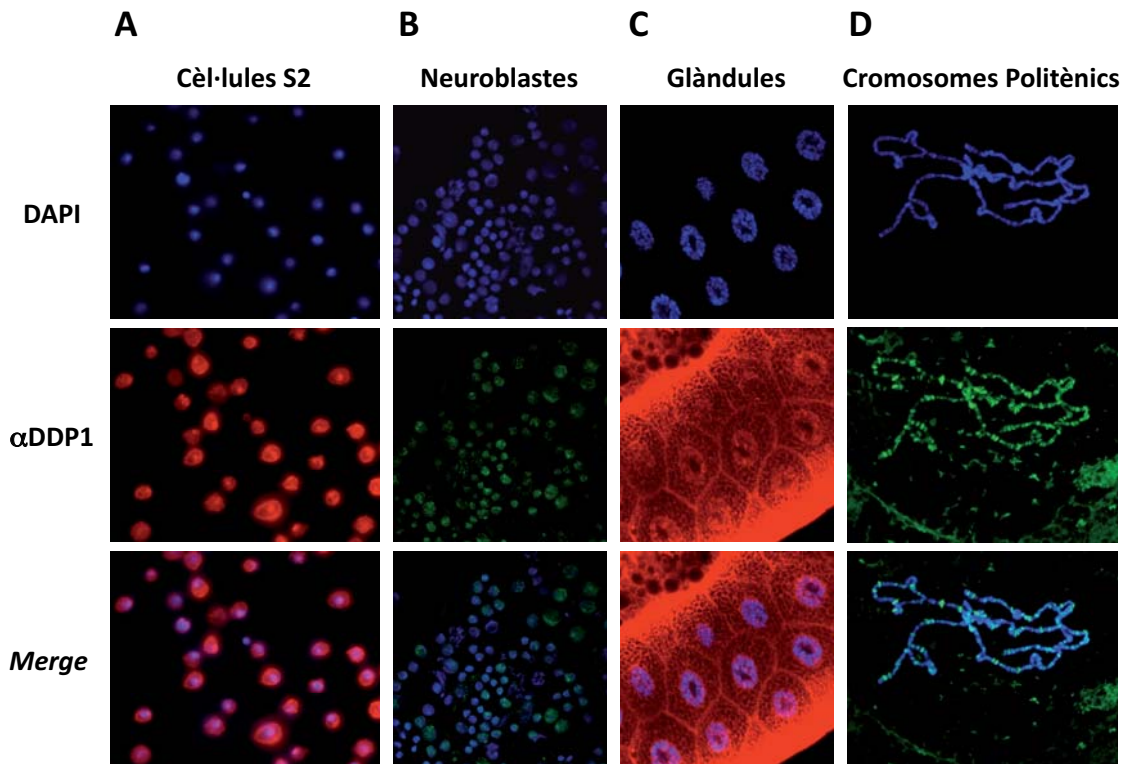


Fig. R.15. Immunolocalitzacions amb anticòs α DDP1 a cèl·lules S2, neuroblastes, glàndules salivals i cromosomes politènics *white* fixats amb àcid acètic. En blau es mostra el DAPI, que marca el DNA. En verd o vermell es mostra el senyal de α DDP1.

Aquests resultats suggereixen que l'àcid acètic afecta la localització de DDP1, que passa de ser citoplasmàtica a ser parcial o totalment nuclear, i explicarien per què s'ha observat DDP1 nuclear en teixits on DDP1 és majoritàriament citoplasmàtica. La localització nuclear de DDP1 amb àcid acètic no pot ser atribuïda a canvis conformationals que permetrien un millor exposició dels epítops reconeguts per α DDP1, ja que s'observa el mateix comportament per DDP1-GFP i, en canvi, la seva visualització a glàndules salivals no es troba influenciada per un millor reconeixement de la proteïna per part de l'anticòs, perquè s'observa la fluorescència directament, sense anticossos.

Sembla doncs, que depenent de les condicions experimentals, la localització de DDP1 es pot modificar fàcilment. Aquest tipus de comportament s'ha observat també per a la vigilina humana en cèl·lules Hep-2, on la vigilina té una localització nuclear només quan es deshidraten intensament les cèl·lules amb acetona, i és citoplasmàtica si es fixen les cèl·lules amb metanol (Kügler *et al.*, 1996).

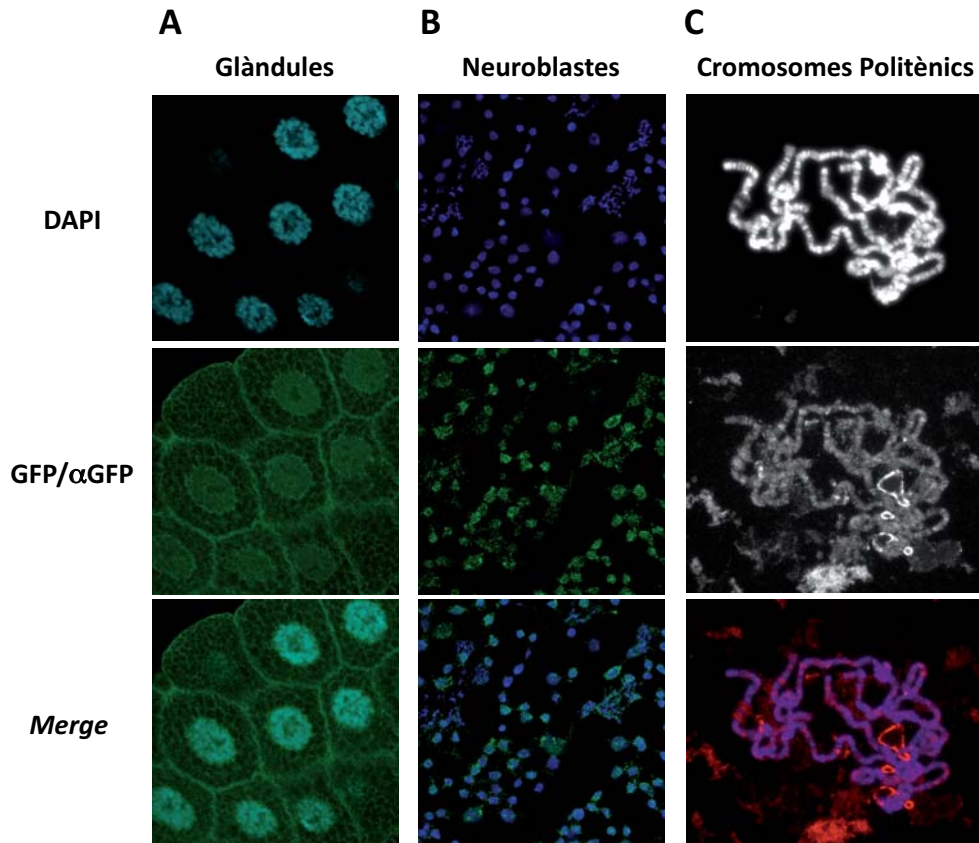


Fig. R.16. Immunolocalitzacions amb anticòs α GFP a glàndules salivals, neuroblastes i cromosomes politènics *hsp70-DDP1-GFP* i *PROM-DDP1-GFP* fixats amb àcid acètic. La senyal de DAPI marca el DNA. A glàndules salivals es mostra la fluorescència pròpia de DDP1-GFP, sense anticòs. A neuroblastes i cromosomes politènics es mostra el senyal de α GFP.

1.5. Estudi de la localització de DDP1 a mutants *ddp1*

En els apartats 1.1, 1.2 i 1.3 d'aquest capítol s'ha estudiat la localització subcel·lular de DDP1 a múltiples òrgans de *Drosophila* i a diferents estadis del desenvolupament. Els resultats obtinguts indiquen que DDP1 és una proteïna que es localitza extensament al citoplasma. Aquests resultats no concorden amb les funcions proposades anteriorment d'una contribució de DDP1 en la formació i/o el manteniment de l'heterocromatina (Cortés *et al.*, 1999, Cortés *et al.*, 2003; Huertas *et al.*, 2004). Mutants hipomorfs de DDP1, *ddp1¹⁵⁻¹*, es comporten com a supressors de la variegació i presenten alteracions de marques heterocromàtiques, amb disminució dels nivells de HP1 i me2K9H3. Al mateix temps, presenten problemes de segregació cromosòmica (Huertas *et al.*, 2004). La contribució de DDP1 a la formació de l'heterocromatina es veia reforçada per la colocalització a cromosomes politènics entre HP1 i DDP1 (Cortés *et al.*, 1999, Cortés *et al.*, 2003; Piacentini *et al.*, 2009). Aquesta colocalització es pot explicar per l'ús de l'àcid

acètic com a fixador, però no queda clar si els fenotips heterocromàtics observats en el mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹* són causats per aquesta colocalització. Per tal d'aclarir aquesta contradicció, es va analitzar la localització de DDP1 en fons mutant.

1.5.1. Descripció dels mutants *ddp1*

En primer lloc, es procedeix a fer una breu descripció de la generació dels diferents fons mutants *ddp1* utilitzats en aquest treball i de les seves principals característiques.

Mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹*: El mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹* va ser generat per la Dra. Dori Huertas i es descriu de forma exhaustiva a Huertas *et al.*, 2004. En poques paraules, el mutant *ddp1¹⁵⁻¹* es va generar fent saltar un transposó que es trobava inserit en la regió 5' UTR del gen *ddp1* (Huertas *et al.*, 2004). La condició mutant es va verificar per *Northern* i *Western blot*. Aquests mutants presenten una elevada letalitat i les femelles són estèrils, fins i tot creuades amb mascles salvatges.

Mutant RNAi *ddp1^{RNAi}*: Es va dissenyar un *hairpin* contra l'ORF de DDP1 clonant els nucleòtids corresponents als aminoàcids 258-545 del cDNA de DDP1, i inserint el fragment per duplicat en sentits contraris en el plàsmid pWIZ (vegeu apartats 1.2.4 i 1.4.2 de materials i mètodes). El *hairpin* es troba sota el control del promotor *UAS*, el qual és induïble per la proteïna Gal4. La interacció entre la proteïna Gal4 i el promotor *UAS* és màxima a 29°C, i decreix en baixar la temperatura. La proteïna Gal4 es pot expressar a diferents teixits i estadis del desenvolupament mitjançant l'ús de diferents *drivers*, fet que permet controlar quan i on s'expressarà la proteïna d'interès. Per comprovar que el *hairpin* fos el més selectiu possible, es va comparar la seva seqüència nucleotídica amb el genoma de *Drosophila* mitjançant un BLAST. No es va trobar cap altra seqüència coneguda que fos reconeguda per aquest *hairpin*.

L'eficiència del RNAi a l'hora de baixar els nivells de la proteïna DDP1 es va determinar per *Western blot* (figura R.17). Es van obtenir extractes proteics totals de glàndules salivals, cervells i discs imaginals provinents de larves de tercer estadi en què s'havia induït l'expressió del *hairpin* amb el *driver* Act-Gal4 a 30°C durant un mínim de tres dies. S'observa una clara disminució dels nivells de DDP1 comparats amb els nivells de DDP1

en larves que no expressen RNAi (control), tot i que els nivells de proteïna no disminueixen tant com en el mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹*.

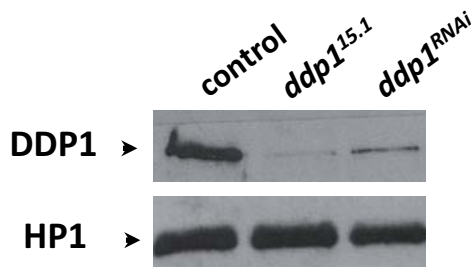


Fig. R.17. Anàlisi per *Western blot* dels nivells de DDP1 en extractes de glàndules salivals, cervells i discs imaginals de mutants *ddp1^{RNAi}*. Es mostren els nivells de DDP1 en el mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹* com a comparació. Es mostren els nivells de HP1 com a control de càrrega.

Mutant nul *ddp1^Δ*: El mutant nul es va generar per eliminació de l'ORF sencera de DDP1 mitjançant el mètode de recombinació de FRT descrit a Parks *et al.*, 2004 (vegeu l'apartat 1.5 de materials i mètodes). La deleció de l'ORF es va confirmar mitjançant PCR.

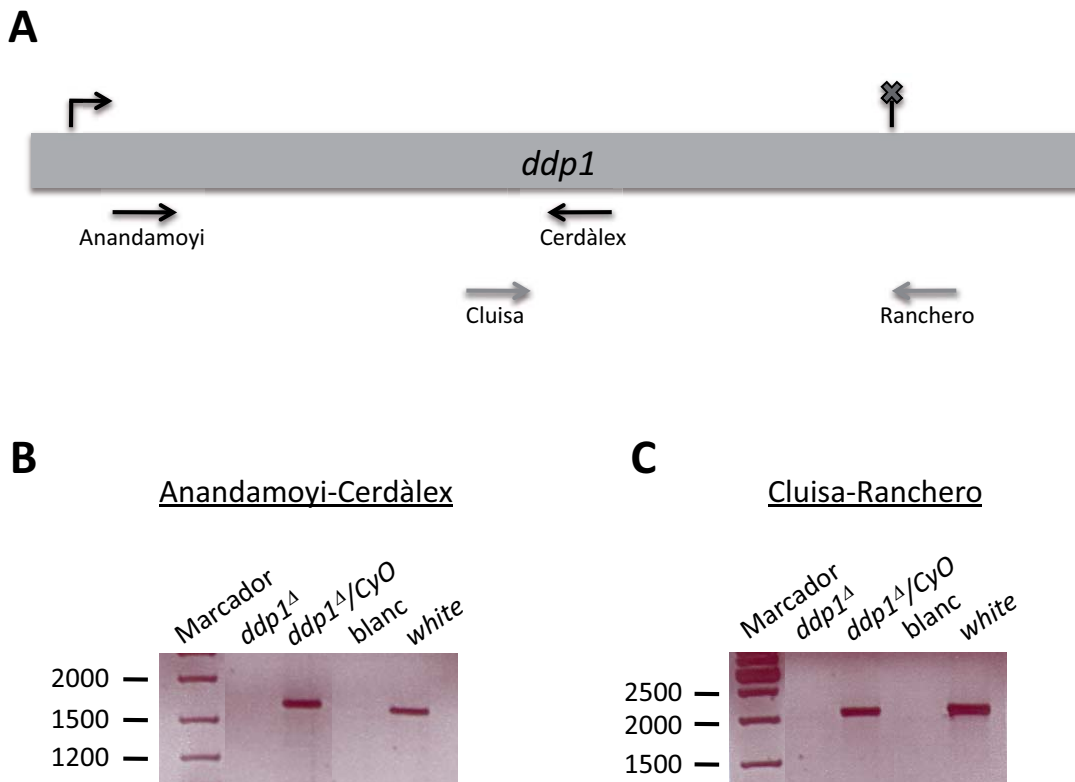


Fig. R.18. Anàlisi per PCR de la deleció de l'ORF del gen *ddp1*. **A)** Es mostra un esquema de l'ORF de *ddp1*, on es mostra el codó START amb una fletxa i el codó STOP amb una creu. S'indica la regió de l'ORF on hibriden els encebadors amb què es faran les PCR. Les parelles d'encebadors es mostren amb dos colors diferents, en negre per Anandamoyi-Cerdàlex i en gris per Cluisa-Rancharo. **B)** PCR amb el parell d'encebadors Anandamoyi-Cerdàlex. Com a controls s'utilitzen un blanc, sense DNA, i un control *white* positiu. Com a mostres s'han fet servir mutants nuls en homozigosi (*ddp1^Δ*) i en heterozigosi (*ddp1^Δ/CyO*). **C)** Igual que B) però amb el parell d'encebadors Cluisa-Rancharo. El marcador és el mateix en ambdues PCR i indica els parells de bases.

Com es pot veure a la figura R.18, mentre que el control positiu *white* i el mutant nul en heterozigosi *ddp1^Δ/CyO* presenten una banda corresponent a la zona del gen analitzada, el mutant nul en homozigosi *ddp1^Δ* no en presenta cap, confirmant la deleció del DNA. Per *Western blot* es va confirmar que els mutants nuls *ddp1^Δ* no mostren nivells detectables de DDP1 en larves de tercer estadi (figura R.19).

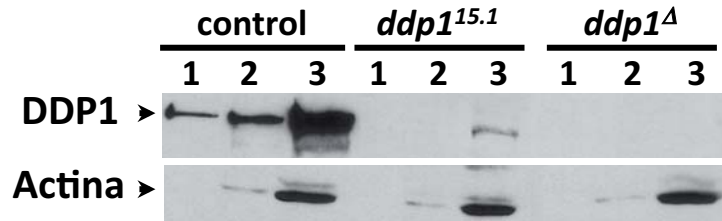


Fig. R.19. Anàlisi per *Western blot* dels nivells de DDP1 en extractes de glàndules salivals, cervells i discs imaginals de mutants *ddp1^Δ*. Es mostren els nivells de DDP1 en el mutant hipomorf *ddp1^{15.1}* com a comparació. Es mostren els nivells d'Actina com a control de càrrega.

1.5.2. Estudi de la localització de DDP1 en els mutants hipomorfs *ddp1^{15.1}* i *ddp1^{RNAi}*

Es va estudiar la localització de DDP1 a glàndules salivals, cervells i discs imaginals de larves homozigotes *ddp1^{15.1}* mitjançant immunolocalitzacions amb α DDP1, seguint el mateix procediment experimental que l'utilitzat per analitzar la localització de DDP1 en fons salvatge. Com es pot veure en la figura R.20, les immunolocalitzacions amb l'anticòs α DDP1 donen un clar senyal nuclear en tots els òrgans estudiats.

El fort senyal observat suggereix que, tot i ser un mutant hipomorf, la quantitat de proteïna expressada és suficient per ser reconeguda per l'anticòs. D'altra banda, la manca de concordància entre la localització citoplasmàtica de DDP1 en fons salvatge i la localització nuclear observada en el mutant hipomorf, fa pausable pensar que potser aquesta localització és deguda a que, en fer saltar el transposó, s'ha modificat una part de la seqüència codificant del gen *ddp1* implicada en la localització de la proteïna. Per poder aclarir si aquesta hipòtesi és correcta, es va generar un mutant de DDP1 alternatiu, per veure si en aquest fons mutant DDP1 era citoplasmàtica.

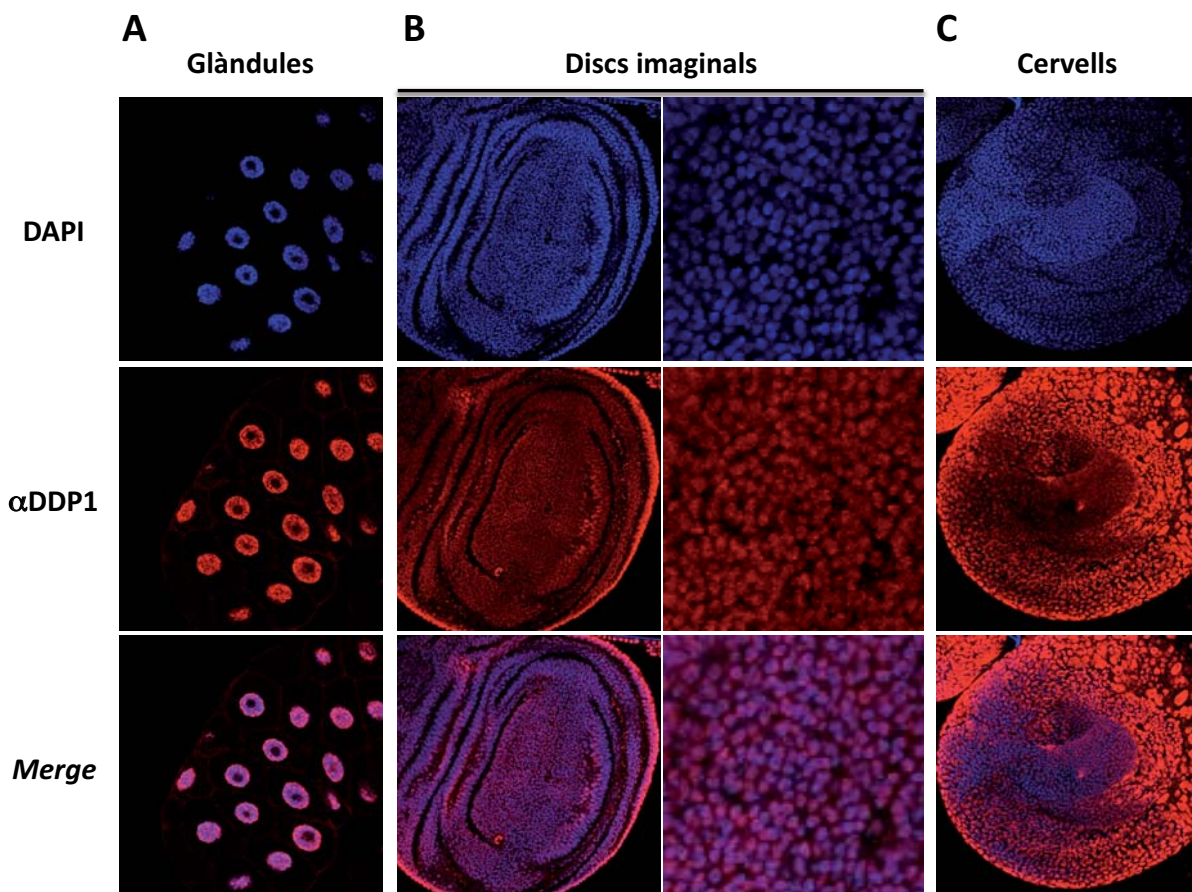


Fig. R.20. Immunolocalitzacions amb α DDP1 a glàndules salivals, discs imaginalls i cervells de larves mutants *ddp1¹⁵⁻¹*. El senyal de DAPI, en blau, marca el DNA. En vermell es mostra el senyal obtingut amb α DDP1. A discs imaginalls es mostra una ampliació de la imatge per apreciar millor la localització de DDP1.

A l'hora de dissenyar un nou mutant de DDP1, es van triar mutants de RNA d'interferència perquè permetien baixar els nivells de DDP1 sense afectar la seqüència aminoacídica de la proteïna. Un cop generat el mutant (vegeu l'apartat 1.5.1 d'aquest capítol) es va analitzar la localització de DDP1 mitjançant immunolocalització amb α DDP1 a glàndules salivals i discs imaginalls de larves *ddp1^{RNAi}* en les quals s'havia induït l'expressió del RNA d'interferència amb el *driver* Act-Gal4 durant un mínim de tres dies a 30°C.

Com es mostra en la figura R.21, DDP1 presenta la mateixa localització nuclear observada en el mutant hipomorf, suggerint que el senyal nuclear de DDP1 és característic de fons mutants per DDP1, i descarta la hipòtesi que el mutant hipomorf expressi una proteïna amb algun senyal de localització alterat.

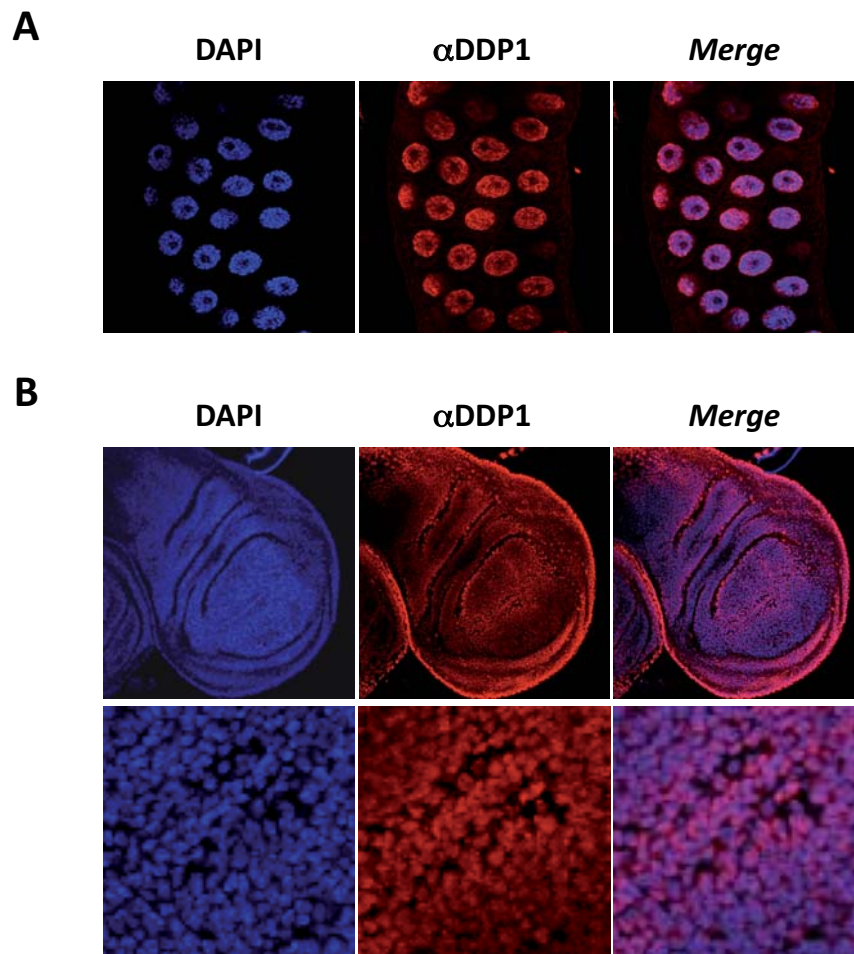


Fig. R.21. Immunolocalitzacions amb α DDP1 a glàndules salivals i discs imaginals de mutants *ddp1^{RNAi}*. El senyal de DAPI (en blau) marca el DNA. En vermell es mostra el senyal obtingut amb α DDP1. **A)** Glàndules salivals *ddp1^{RNAi}*. **B)** Disc imaginals *ddp1^{RNAi}*. Es mostra una ampliació de la imatge per apreciar millor la localització de DDP1.

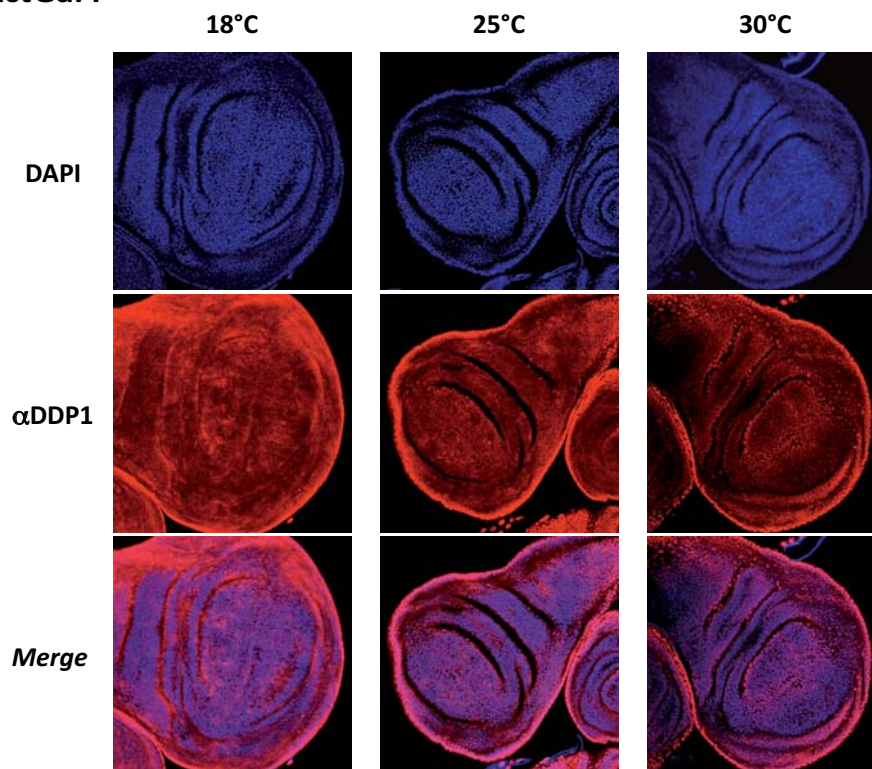
Aquestes dades suggereixen que, o bé DDP1 presenta una localització nuclear a baixos nivells de DDP1 a la cèl·lula, o bé l'anticòs reconeix una proteïna inespecífica. Per poder distingir entre aquestes dues hipòtesis, es va raonar que si el senyal nuclear observat amb l'anticòs en fons mutant era específic, en baixar dramàticament els nivells de proteïna, aquest hauria de desaparèixer.

Els nivells de proteïna observats per *Western blot* (figura R.17) en expressar el *hairpin* de RNAi amb el *driver* Act-Gal4 a 30°C són força similars als del mutant *ddp1¹⁵⁻¹*. El *driver* Act-Gal4 és ubic i fort, però existeixen *drivers*, com ara Ptc-Gal4 o En-Gal4, amb patrons d'expressió locals que tenen una expressió més forta. Seria possible doncs, mitjançant l'ús de *drivers* més forts i jugant amb les temperatures, baixar prou els nivells

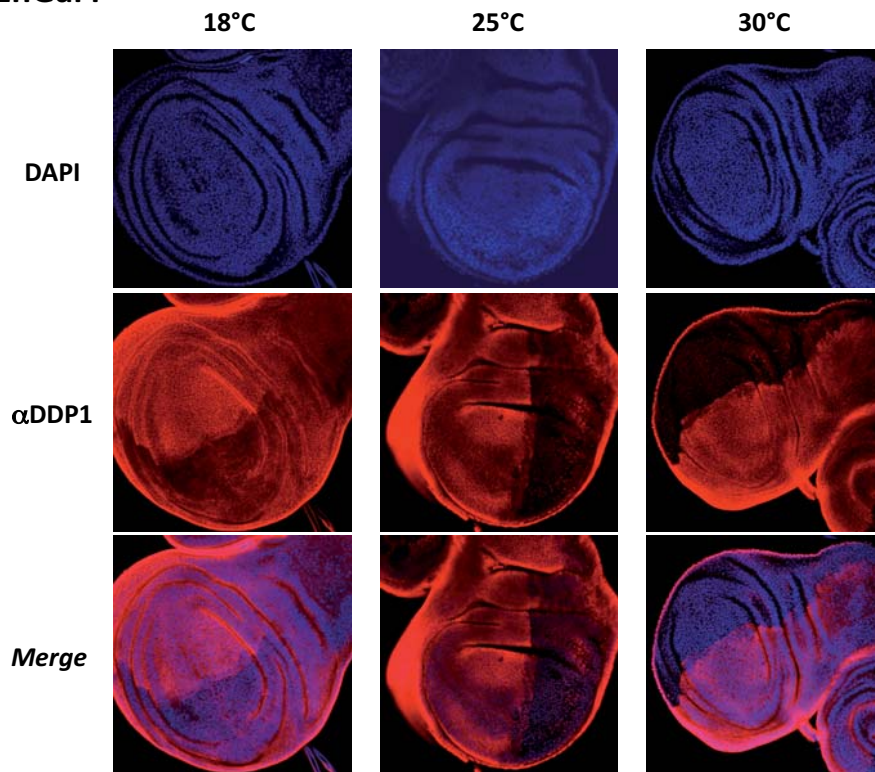
de DDP1 com per eliminar el senyal nuclear observat amb l'anticòs? Amb aquesta idea es van realitzar immunolocalitzacions amb α DDP1 a discs imaginals on es va expressar RNAi contra DDP1 amb tres *drivers* de potències diferents a tres temperatures creixents, per analitzar com variava la localització de DDP1 en aquests fons mutants. En concret, es van utilitzar els *drivers* Act-Gal4, En-Gal4 i Ptc-Gal4, i se'n va induir la seva expressió a 18, 25 i 30°C. La utilització dels *drivers* En-Gal4 i Ptc-Gal4, els quals s'expressen només en una zona del disc imaginal, permet tenir la mostra i el control en el mateix teixit, la qual cosa facilita la comparació de localitzacions.

A la figura R.22A es mostra la localització de DDP1 en fons RNAi induït pel *driver* ubic Act-Gal4. La localització de DDP1 a 18°C és citoplasmàtica, però no es veu tan ben definida com en fons salvatge. A 25°C DDP1 s'observa nuclear i citoplasmàtica. A 30°C és definitivament nuclear. A la figura R.22B es mostra la localització de DDP1 en fons RNAi induït pel *driver* En-Gal4, el qual s'expressa a la regió posterior del disc d'ala. A 18°C, DDP1 presenta una menor intensitat en la zona RNAi que la control, però la seva localització segueix sent citoplasmàtica. A 25°C, la intensitat de senyal en la zona RNAi

A) ActGal4



B) EnGal4



C) PtcGal4

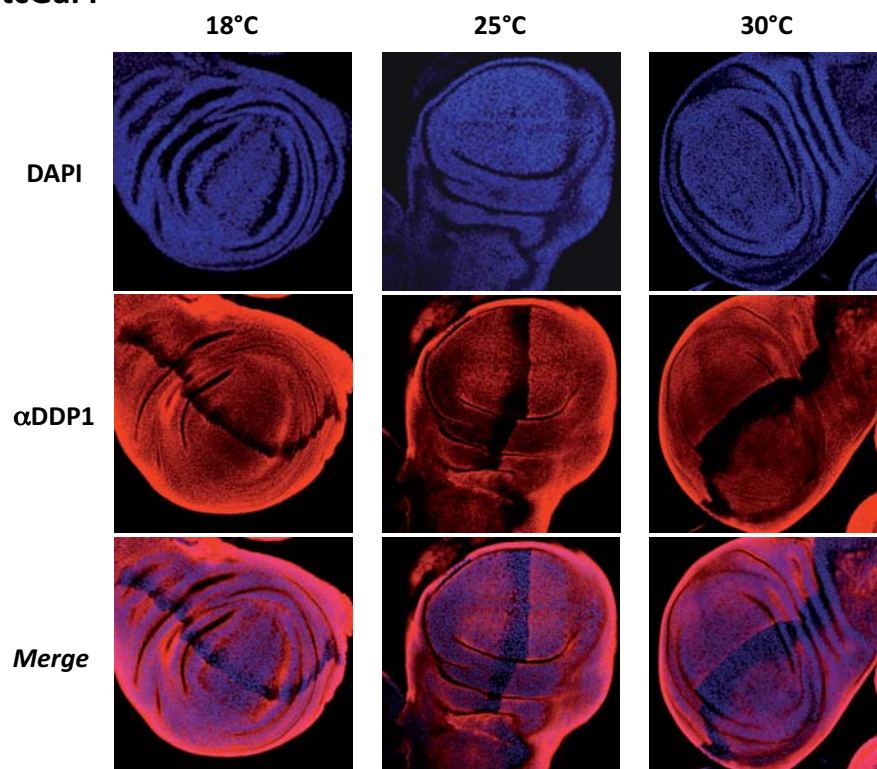


Fig. R.22. Immunolocalitzacions amb α DDP1 a discs d'ala on s'expressa RNAi contra DDP1 amb diferents *drivers* i temperatures. El DNA s'ha tenyit amb DAPI (blau). En vermell es mostra el senyal de α DDP1. **A)** Expressió del *hairpin* induïda amb el *driver* Act-Gal4 a 18, 25 i 30°C. **B)** Expressió del *hairpin* induïda amb el *driver* En-Gal4 a 18, 25 i 30°C. **C)** Expressió del *hairpin* induïda amb el *driver* Ptc-Gal4 a 18, 25 i 30°C.

és molt menor que en la zona control, i la localització de DDP1 és ara nuclear. A 30°C, la localització de DDP1 segueix sent nuclear, però el senyal és tan dèbil que costa distingir la localització. A la figura R.22C es mostra la localització de DDP1 en fons RNAi induït pel *driver* Ptc-Gal4, el qual s'expressa a la frontera entre les regions anterior i posterior del disc d'ala. A 18°C el senyal de DDP1 ha disminuït molt, però encara es pot apreciar una localització citoplasmàtica. A 25°C només s'aprecia senyal en unes quantes cèl·lules de la zona RNAi, i la seva localització és nuclear. A 30°C no es distingeix cap senyal de α DDP1, ni nuclear ni citoplasmàtic.

Aquests resultats indiquen que en baixar prou els nivells de DDP1 és possible eliminar completament el senyal nuclear observat amb l'anticòs, suggerint que el senyal observat no és un artefacte i que, a concentracions baixes de proteïna, DDP1 és nuclear. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi es va generar un mutant nul.

1.5.3. Estudi de la localització de DDP1 en mutants nuls *ddp1^A*

El mutant nul es va generar tal i com s'ha descrit en l'apartat 1.5.1 d'aquest capítol (vegeu també l'apartat 1.5 de materials i mètodes). Un cop verificat que el mutant nul era correcte, es van fer immunolocalitzacions amb α DDP1 a glàndules salivals, discs imaginals i politènics de larves de tercer estadi homozigotes per la mutació *ddp1^A*, i a ovaris de femelles *escapers* homozigotes *ddp1^A*.

A glàndules salivals s'observa encara la localització nuclear de DDP1, sobretot en forma de bandes sobre els cromosomes, però de menor intensitat que en el mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹* (figura R.23). Aquestes bandes observades als nuclis de les glàndules salivals es mantenen en els cromosomes politènics de mutants *ddp1^A* (figura R.24). El senyal nuclear observat en els mutants nuls *ddp1^A* no desapareix en analitzar discs imaginals, on el senyal nuclear és igual de fort que en el mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹* (figura R.25). En canvi, no s'observa senyal de cap tipus, ni nuclear ni citoplasmàtic, en analitzar ovaris de femelles *escapers* *ddp1^A* (figura R.26).

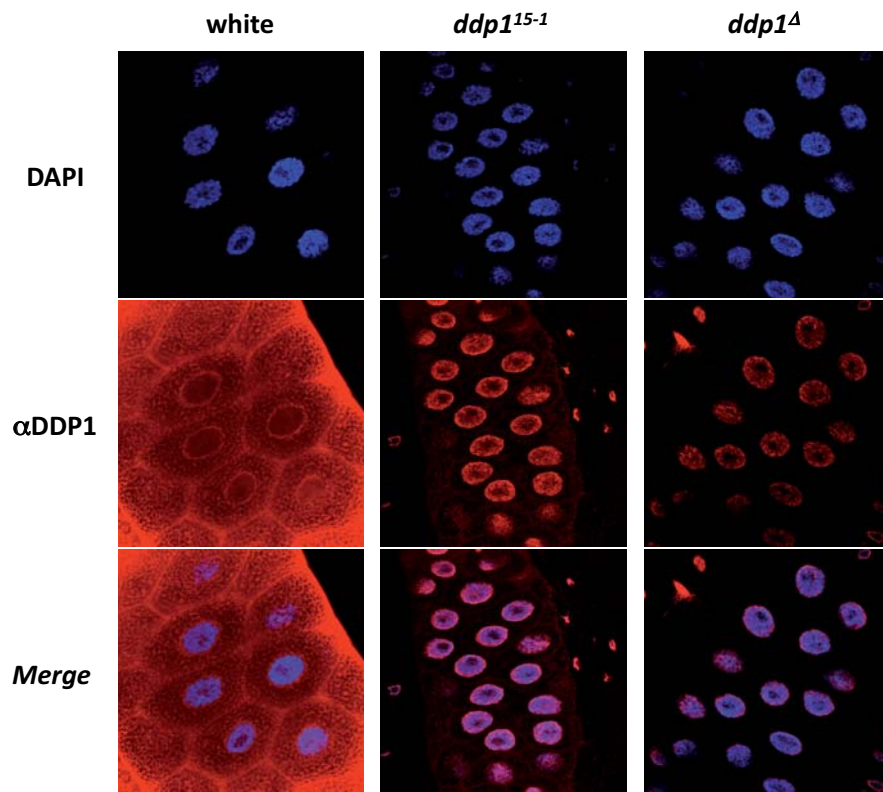


Fig. R.23. Immunolocalització amb α DDP1 a glàndules salivals de mutants *ddp1^Δ*. El DNA s'ha tenyit amb DAPI (blau). En vermell es mostra el senyal de α DDP1. Com a controls es mostren les localitzacions a glàndules salivals de larves salvatges i mutants *ddp1¹⁵⁻¹*.

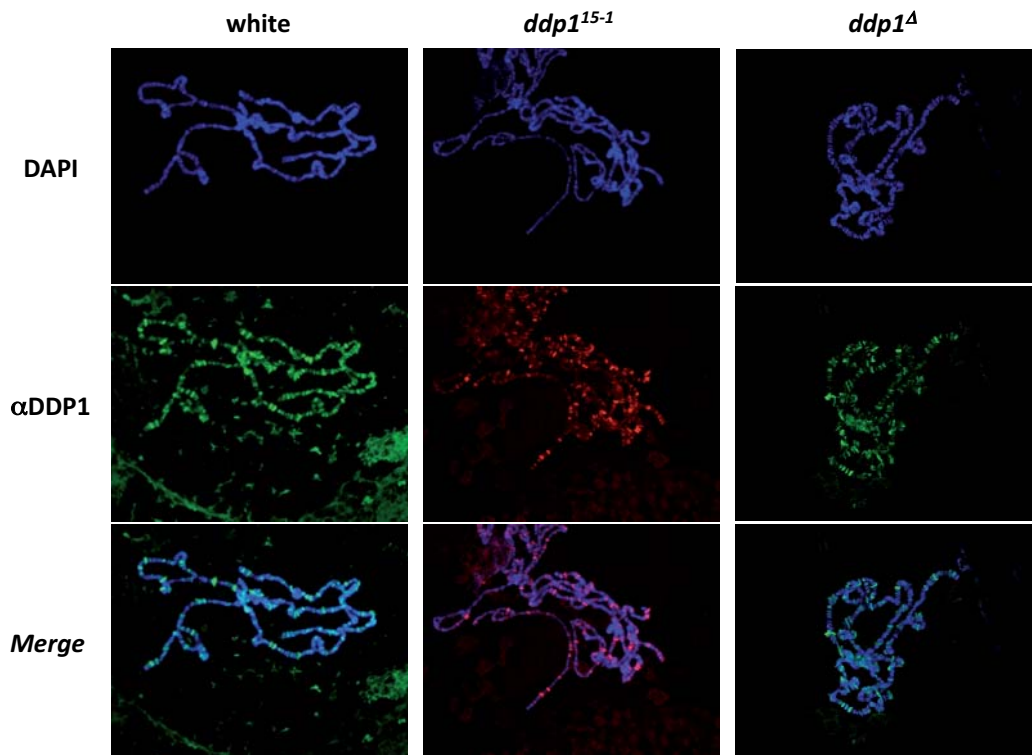


Fig. R.24. Immunolocalització amb α DDP1 a cromosomes politènics de mutants *ddp1^Δ*. El DNA s'ha tenyit amb DAPI (blau). En vermell es mostra el senyal de α DDP1. Com a controls es mostren cromosomes politènics de larves salvatges i de mutants *ddp1¹⁵⁻¹*.

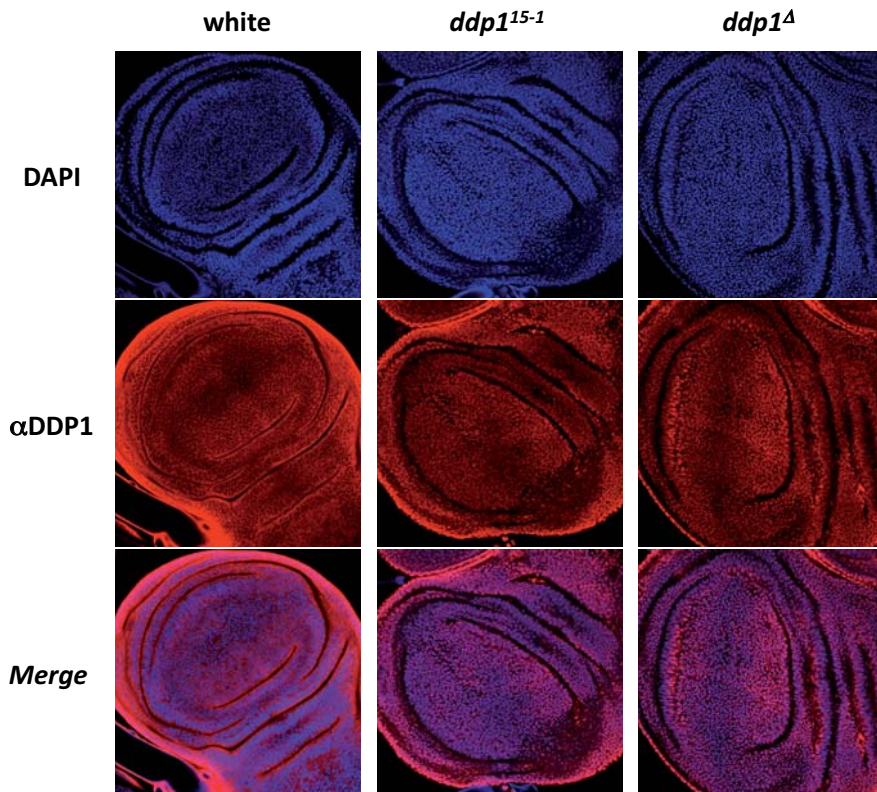


Fig. R.25. Immunolocalització amb α DDP1 a discs imaginals de mutants *ddp1^Δ*. El DNA s'ha tenyit amb DAPI (blau). En vermell es mostra el senyal de α DDP1. Com a controls es mostren discs de larves salvatges i de mutants *ddp1¹⁵⁻¹*.

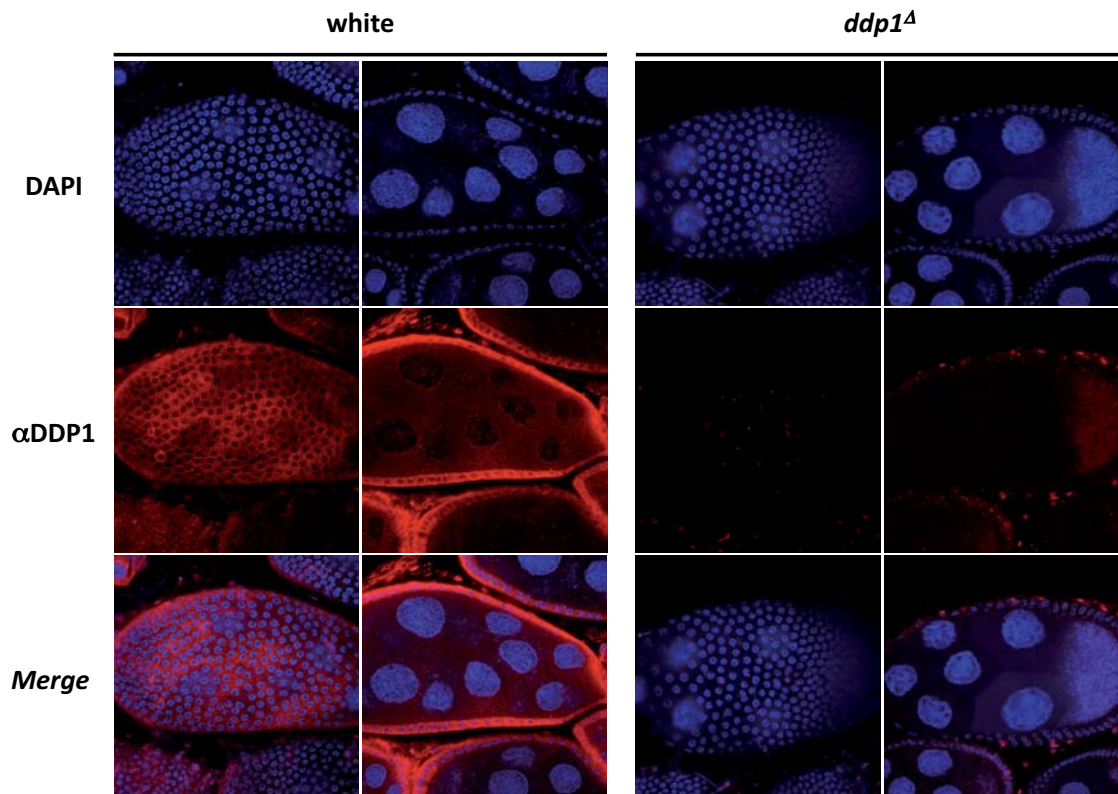
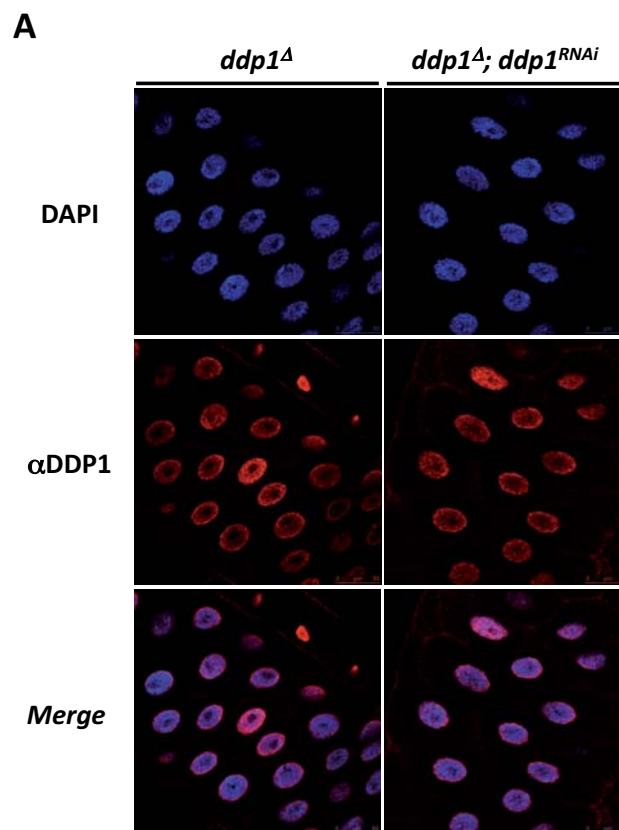


Fig. R.26. Immunolocalització amb α DDP1 a ovaris de femelles mutants *ddp1^Δ*. El DNA s'ha tenyit amb DAPI (blau). En vermell es mostra el senyal de α DDP1. Com a controls es mostren ovaris de femelles salvatges.

L'observació que el senyal de DDP1 desapareix a ovaris de mosques mutants *ddp1^Δ*, mentre que a larves de tercer estadi la intensitat depèn del teixit (a discs, igual que en el mutant hipomorf; a glàndules salivals, de menor intensitat), obre la possibilitat que la proteïna DDP1 observada a larva de tercer estadi sigui d'origen matern. DDP1 té un component matern elevat, tal i com mostra la figura R.4, i podria donar-se el cas que perdurés fins a larva de tercer estadi, en més o menys intensitat segons l'òrgan, i es perdés durant la pupació, precisament l'estadi en què la majoria dels mutants *ddp1^Δ* moren. Per adreçar aquesta qüestió es va estudiar si la inducció de RNAi en un fons mutant *ddp1^Δ* era capaç de disminuir el senyal nuclear observat a discs i glàndules salivals, ja que el RNAi hauria d'actuar també contra la proteïna d'origen matern.

Així doncs, es va introduir el RNAi de DDP1 en un fons mutant *ddp1^Δ*. El *driver* que es va triar per discs imaginals, Dpp-Gal4, permet observar la inducció del RNAi en el mateix teixit on tenim la mostra control, ja que Dpp-Gal4, igual que Ptc-Gal4, s'expressa a la línia anteroposterior del disc imaginal. A glàndules no hi ha cap *driver* que permeti tenir un control intern en la mateixa glàndula, i finalment es va triar Act-Gal4.



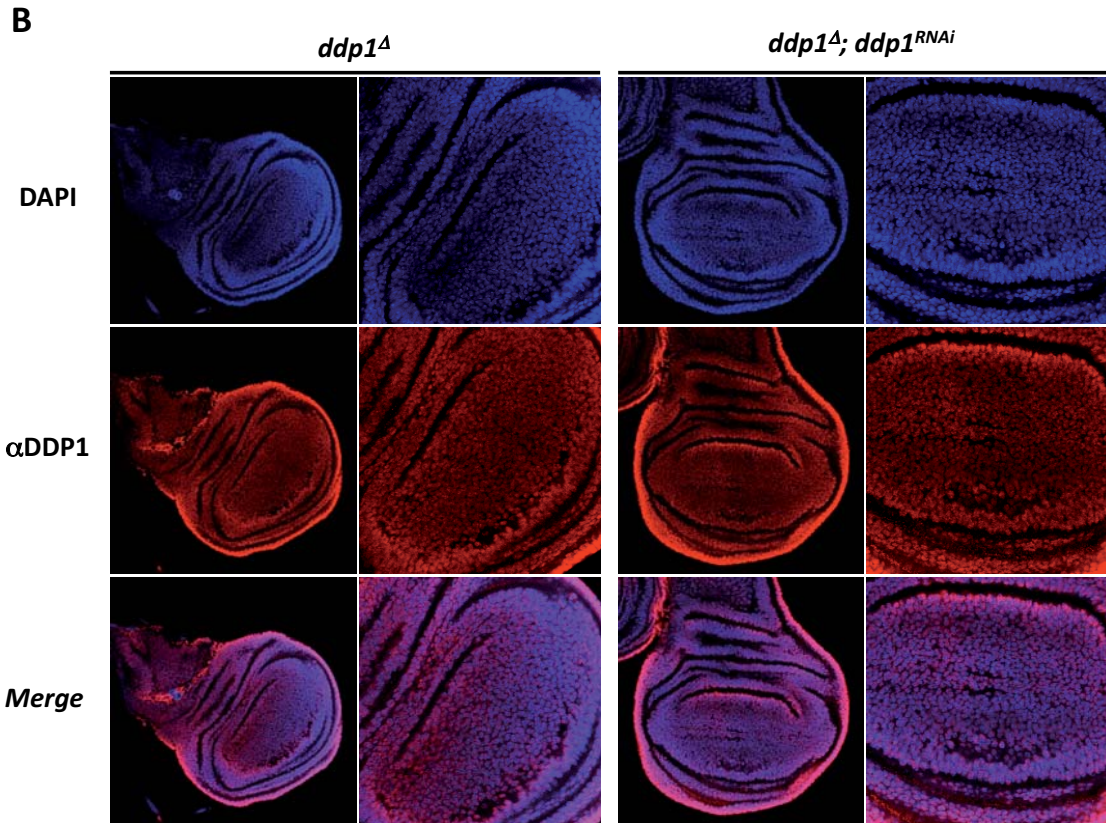


Fig. R.27. Immunolocalitzacions amb α DDP1 a glàndules salivals i discs imaginals de mutants *ddp1^Δ* on s'ha induït RNA d'interferència contra DDP1. El DAPI (en blau) marca el DNA. En vermell s'observa el senyal de α DDP1. **A) Glàndules salivals. **B)** Disc imaginal d'ala. Es mostra una ampliació de la imatge per apreciar millor la localització de DDP1.**

La inducció del RNAi en el mutant de DDP1 no disminueix el senyal nuclear observat amb α DDP1 ni a glàndules salivals ni a discs imaginals (figura R.27). Aquest resultat suggereix que el senyal nuclear observat no és causat per DDP1 d'origen matern, i que l'anticòs deu reconèixer inespecíficament una altra proteïna nuclear que no deu ser present a ovaris.

Aquesta conclusió ens porta a reexaminar el senyal observat a cromosomes politènics. No podem estar segurs que les bandes observades amb α DDP1 corresponguin a DDP1 i no a la proteïna nuclear que és reconeguda inespecíficament per l'anticòs. Per respondre a aquesta qüestió, es van realitzar immunolocalitzacions amb α DDP1 i α GFP a cromosomes politènics salvatges que expressen el transgèn DDP1-GFP sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70*, i es va comparar si les bandes visualitzades amb α DDP1 concordaven amb les bandes observades per α GFP. Com a control es va realitzar

el mateix experiment en cromosomes politènics salvatges que expressen el transgèn GFP sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70*.

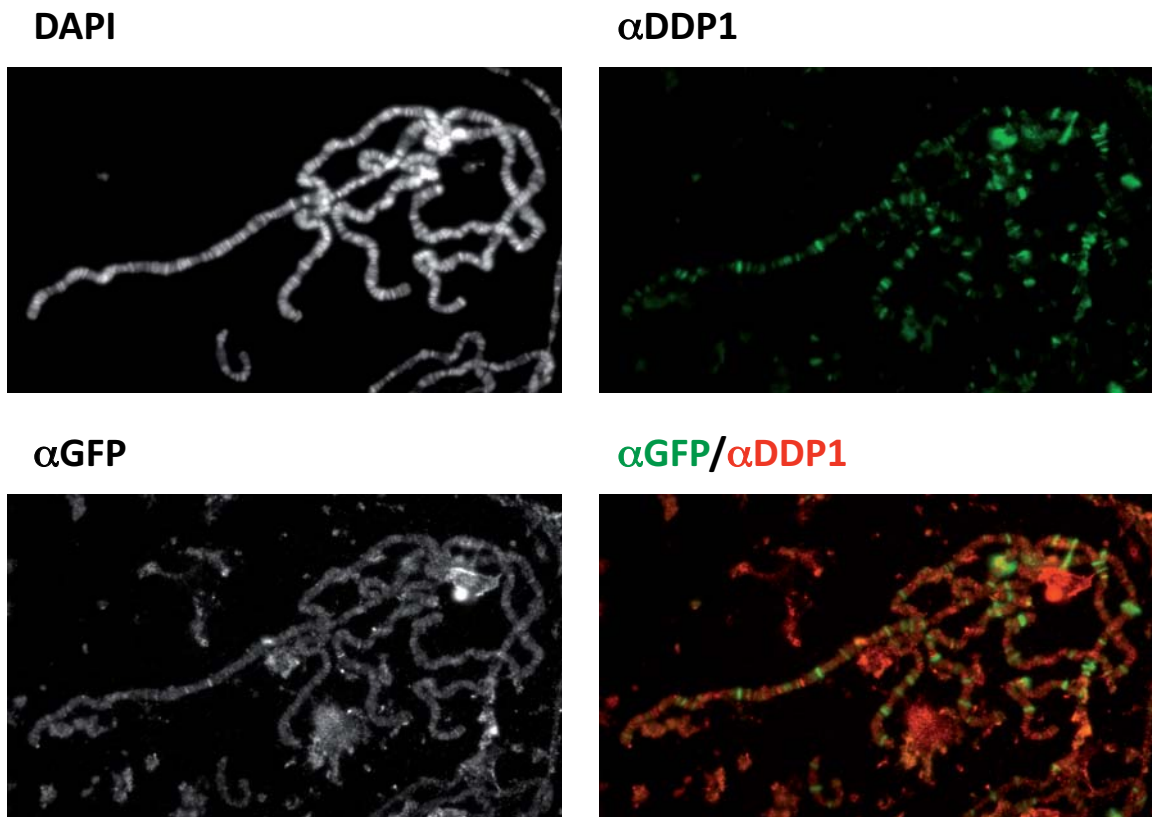


Fig. R.28. Immunolocalitzacions a cromosomes politènics *hsp70-DDP1-GFP* amb α GFP i α DDP1. L'expressió de DDP1-GFP s'ha induït mitjançant un xoc tèrmic d'una hora. El DAPI marca el DNA.

Com es mostra en la figura R.28, no s'aprecia cap localització clara entre les bandes detectades amb α GFP i les observades amb α DDP1. Les bandes observades amb α GFP no són inespecífiques de l'anticòs perquè en el control GFP no s'observa cap banda als cromosomes (dades no mostrades).

Així doncs, les bandes dels cromosomes politènics atribuïdes a DDP1 són, en realitat, causades per una proteïna nuclear reconeguda inespecíficament per l'anticòs α DDP1 perquè, si bé DDP1-GFP dóna certes bandes als cromosomes, aquestes no coincideixen amb les observades amb α DDP1.

1.6. Anàlisi de la localització de DDP1-GFP en fons mutant *ddp1^A*

Els experiments amb els mutants hipomorfs *ddp1¹⁵⁻¹* i *ddp1^{RNAi}* ens havien portat a la conclusió que, si bé DDP1 era una proteïna citoplasmàtica en condicions normals, a baixos nivells de proteïna DDP1 era nuclear, descartant la hipòtesi que l'anticòs reconegués una proteïna nuclear inespecífica, ja que, en disminuir dràsticament els nivells de DDP1 en regions localitzades, no s'observava cap senyal amb l'anticòs. En intentar confirmar aquesta hipòtesi amb un mutant nul *ddp1^A*, ens vam trobar amb resultats oposats, que indicaven que l'anticòs reconeix inespecíficament una altra proteïna nuclear, ja que observem un senyal nuclear en òrgans de larves mutants homozigotes que no és atribuïble a certa fracció residual de DDP1, perquè l'expressió de RNAi no afecta la seva intensitat. Semblaria que l'anticòs només reconeix la proteïna inespecífica quan els nivells de DDP1 endògena són molt baixos, perquè en fons salvatge el senyal és citoplasmàtic, com l'observat per DDP1-GFP.

De totes maneres, el fet que l'anticòs reconegui una proteïna nuclear inespecífica no significa forçosament que DDP1 no pugui tenir una petita fracció nuclear que només pugui ser observada a baixos nivells de DDP1, quan els nivells citoplasmàtics de DDP1 són baixos. Aquesta hipòtesi no es pot respondre amb l'anticòs α DDP1. Per tant, es va intentar respondre fent ús de la proteïna DDP1-GFP.

Abans, però, d'utilitzar DDP1-GFP per respondre a aquesta pregunta, es va voler analitzar si DDP1-GFP és funcional. Els mutants nuls *ddp1^A*, igual que els mutants hipomorfs *ddp1¹⁵⁻¹*, tenen una letalitat molt elevada i les femelles *escapers* són estèrils, fins i tot creuades amb mascles salvatges (Huertas *et al.*, 2004). Una bona via per analitzar si DDP1-GFP és funcional, era veure si podia rescatar aquests fenotips. Per respondre a aquesta qüestió es va comparar el percentage d'*escapers* provinents de mosques mutants per DDP1, tant *ddp1^A* com *ddp1¹⁵⁻¹*, amb el percentage d'*escapers* de mosques mutants per DDP1 que expressen una còpia del transgèn DDP1-GFP expressat pel promotor propi (no es va poder estudiar amb dues còpies del transgèn perquè la línia que es va utilitzar no era viable en homozigosi).

A) Viabilitat dels mutants					
Encreuaments	N^a	Genotip	N^b_{exp}	N^b_{obs}	Viabilitat
<i>ddp1¹⁵⁻¹/CyO x ddp1¹⁵⁻¹/CyO</i>	278	<i>ddp1¹⁵⁻¹/ ddp1¹⁵⁻¹</i>	93	7	8%
<i>ddp1^Δ/CyO x ddp1^Δ/CyO</i>	382	<i>ddp1^Δ/ ddp1^Δ</i>	127	5	4%
B) Rescat per DDP1-GFP					
Encreuaments	N^a	Genotip	N^b_{exp}	N^b_{obs}	Viabilitat
<i>ddp1¹⁵⁻¹/CyO;DDP1-GFP/TM3 x ddp1¹⁵⁻¹/CyO; DDP1-GFP/TM3</i>	186	<i>ddp1¹⁵⁻¹/ddp1¹⁵⁻¹; DDP1-GFP/TM3</i>	62	44	70%
<i>ddp1^Δ/CyO;DDP1-GFP/TM3 x ddp1^Δ/CyO; DDP1-GFP/TM3</i>	240	<i>ddp1^Δ/ddp1^Δ; DDP1-GFP/TM3</i>	80	32	40%

Taula R.1. Viabilitat dels mutants *ddp1* i rescat pel transgèn DDP1-GFP sota el control del promotor de *ddp1*. N^a, nombre total d'individus analitzats en l'encreuament. N^b_{exp}, nombre d'individus amb el genotip indicat esperats a partir del nombre de mosques totals analitzades. N^b_{obs}, nombre observat d'individus amb el genotip indicat.

Com es pot apreciar a la taula R.1, una única còpia del transgèn DDP1-GFP expressat sota el control del promotor de *ddp1* és suficient per augmentar la viabilitat de les mosques mutants unes deu vegades. En analitzar aquestes dades cal tenir en compte que, a part d'expressar només una còpia del transgèn, l'expressió d'aquest és fluixa (dades no mostrades). Seria de suposar que, amb dues còpies, la viabilitat es doblaria, arribant gairebé al 100 %. El que no es rescata expressant una còpia del transgèn DDP1-GFP és la fertilitat de les femelles *escapers*, que segueixen sent estèrils. Aquestes dades són molt similars a les obtingudes en rescatar el mutant hipomorf amb l'expressió d'una còpia ectòpica de DDP1 expressada sota el control del promotor *armadillo* (Huertas *et al.*, 2004), la qual cosa suggereix que la proteïna DDP1-GFP és funcional.

Un cop vist que DDP1-GFP és funcional, es va introduir DDP1-GFP expressada sota el control del promotor de *ddp1* en fons mutant *ddp1^Δ* i se'n va analitzar la seva localització a glàndules salivals i ovaris d'individus homozigots per la mutació *ddp1^Δ* per microscopia confocal de fluorescència. DDP1-GFP és perinuclear i citoplasmàtica a glàndules salivals i citoplasmàtica a ovaris, sense cap senyal de localització nuclear (figura R.29).

L'expressió de DDP1-GFP en fons mutant no altera el senyal nuclear obtingut amb α DDP1 (figura R.30). D'altra banda, DDP1-GFP és reconeguda per l'anticòs α DDP1 ja que

la majoria de les glàndules presenten una localització perinuclear que colocalitza amb la mostrada per DDP1-GFP, indicant que l'anticòs reconeix alhora DDP1-GFP i la proteïna nuclear inespecífica.

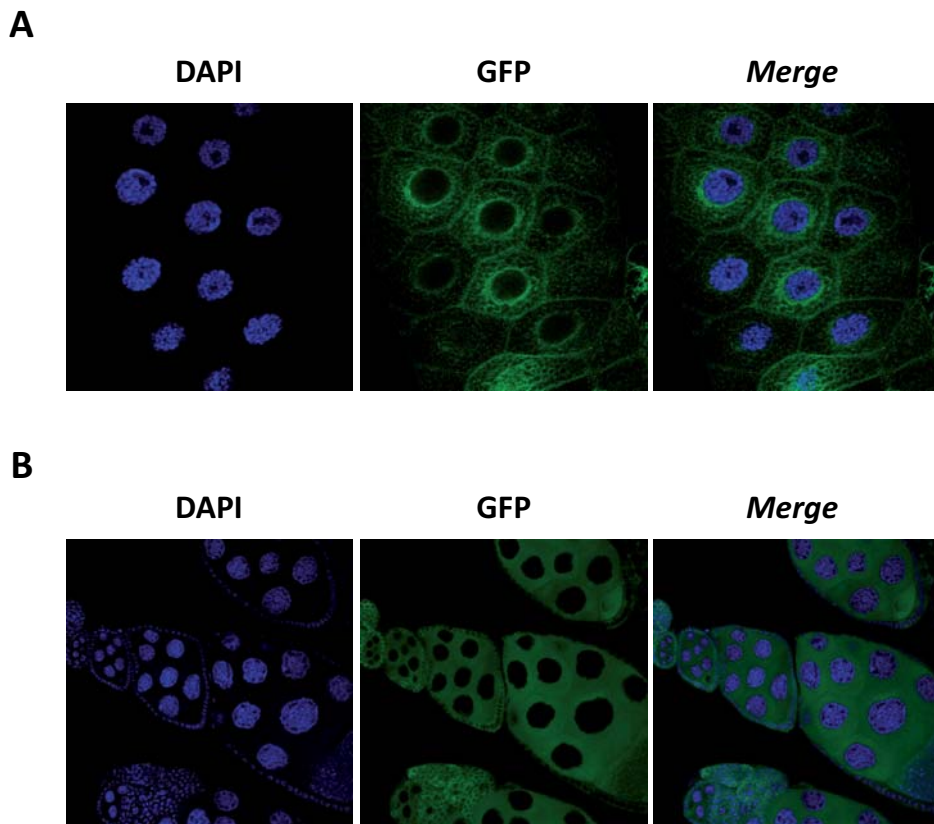


Fig. R.29. Localització de DDP1-GFP expressada pel promotor de *ddp1* en mutants *ddp1^A*. El DAPI marca el DNA (blau). En verd, la fluorescència de DDP1-GFP. A) Glàndules salivals. B) Ovaris.

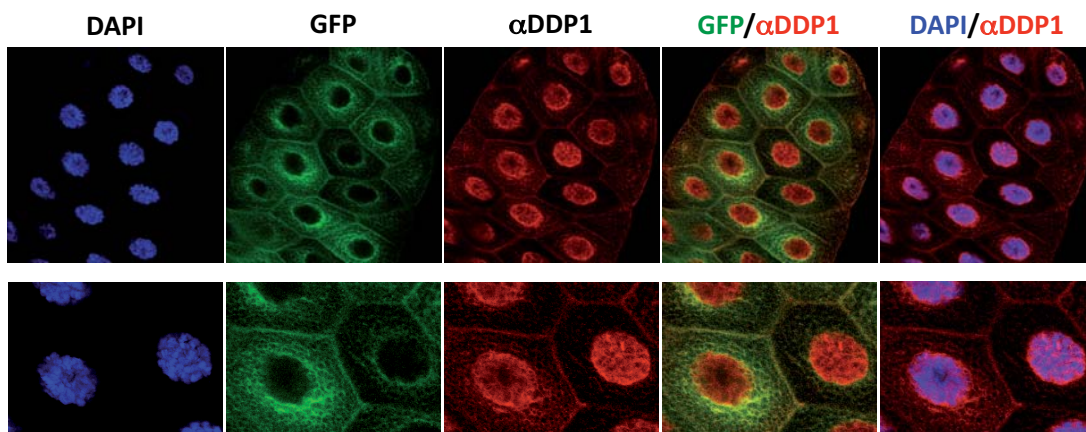


Fig. R.30. Immunolocalització amb α DDP1 a glàndules salivals de mutants *ddp1^A* que expressen el transgèn DDP1-GFP sota control del promotor de *ddp1*. En blau es mostra el DAPI, que marca el DNA. En verd, la fluorescència de DDP1-GFP. En vermell, el senyal de α DDP1. Es mostra una ampliació de cada imatge.

Seria possible doncs, que l'anticòs només reconegués DDP1-GFP si aquest s'expressés amb prou proporció respecte la proteïna nuclear inespecífica? Per aconseguir nivells més elevats d'expressió, es va utilitzar la construcció DDP1-GFP expressada sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70* en fons mutant *ddp1^A* i es va analitzar el senyal de α DDP1 a glàndules salivals després d'induir l'expressió de DDP1-GFP amb un xoc tèrmic de dues hores. L'expressió de DDP1-GFP sota el control del promotor de xoc tèrmic *hsp70* és capaç de revertir parcialment en algunes cèl·lules la localització nuclear observada amb l'anticòs α DDP1 en fons mutant (figura R.31). En aquestes cèl·lules, s'observa una localització perinuclear amb α DDP1 que concorda amb la localització perinuclear observada per DDP1-GFP. El fet que la localització amb α DDP1 no es vegi perinuclear a totes les cèl·lules indica que es necessita arribar a una concentració de DDP1 determinada en la qual l'anticòs deixa de reconèixer la proteïna inespecífica i passa a reconèixer DDP1.

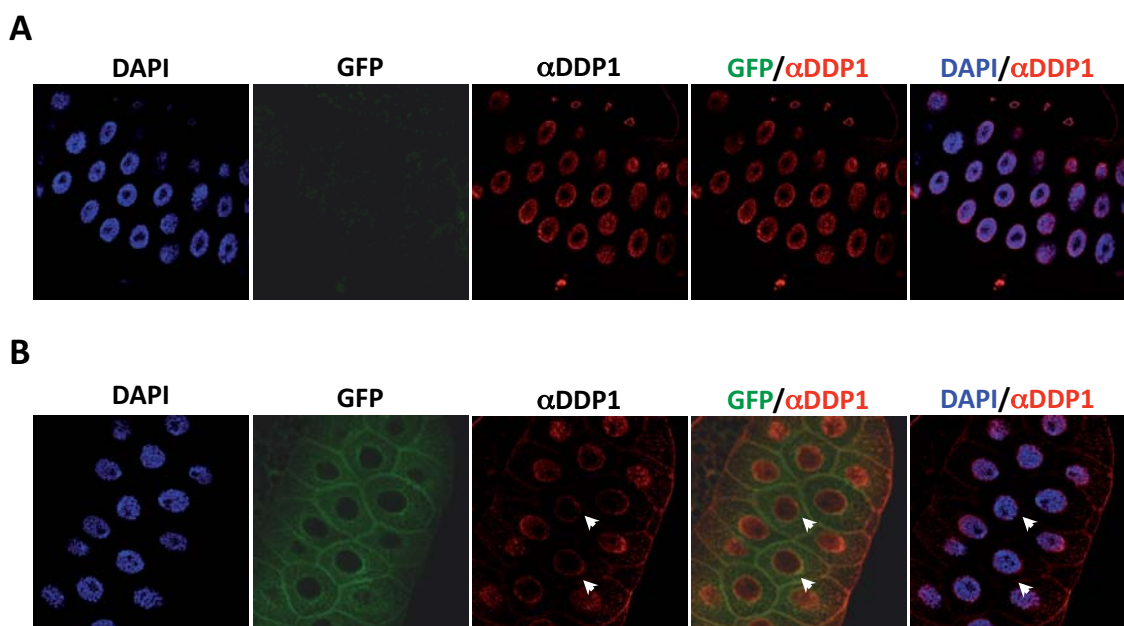


Fig. R.31. Immunolocalització amb α DDP1 a glàndules salivals de mutants *ddp1^A* que expressen el transgèn DDP1-GFP sota control del promotor de xoc tèrmic *hsp70*. En blau es mostra el DAPI, que marca el DNA. En verd es mostra la fluorescència de DDP1-GFP. En vermell es mostra el senyal de α DDP1. **A)** Glàndules mutants que no expressen el transgèn i que han patit el mateix xoc tèrmic que la mostra. **B)** Glàndules mutants que expressen DDP1-GFP, l'expressió de la qual ha estat induïda amb un xoc tèrmic de dues hores. Les fletxes blanques indiquen les cèl·lules on el senyal amb α DDP1 és sobretot perinuclear.

L'anticòs α DDP1 té una major afinitat per DDP1 i en circumstàncies normals reconeix la proteïna DDP1. Només quan els nivells de DDP1 són baixos es pot observar la proteïna nuclear inespecífica, que es reconeguda per l'anticòs amb una afinitat menor.

2. ESTUDI DE LA CONTRIBUCIÓ DE DDP1 A L'ESTRUCTURA I FUNCIÓ DE L'HETEROCROMATINA

La contribució de DDP1 a l'estructura i/o manteniment de l'heterocromatina proposada en treballs anteriors (Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2003; Huertas *et al.*, 2004) es basa en l'associació de DDP1 als cromosomes politènics colocalitzant amb la proteïna heterocromàtica HP1 (Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2003; Piacentini *et al.*, 2009), i en els fenotips observats en els mutants hipomorfs *ddp1¹⁵⁻¹*, els quals es comporten com a supressors de la variegació i presenten una menor deposició de HP1 i me2K9H3 al cromocentre (Huertas *et al.*, 2004). En el primer apartat d'aquest capítol s'ha vist que DDP1 localitza de manera majoritària al citoplasma, i que el senyal nuclear observat als cromosomes politènics colocalitzant amb HP1 és degut al reconeixement inespecífic d'una proteïna nuclear en absència de DDP1. Per tant, la colocalització entre DDP1 i HP1 als cromosomes politènics no pot explicar els fenotips heterocromàtics obtinguts amb els mutants hipomorfs *ddp1¹⁵⁻¹* (Huertas *et al.*, 2004). Aquestes dades ens van portar a reexaminar l'efecte de DDP1 sobre l'heterocromatina.

2.1. Anàlisi dels efectes de *ddp1^A* sobre PEV

Per analitzar si DDP1 té algun efecte sobre l'heterocromatina es va utilitzar el nou mutant nul generat *ddp1^A*. Normalment, els mutants de proteïnes associades a la formació i/o manteniment de l'heterocromatina són modificadors de PEV (Position Effect Variegation) (Wallrath *et al.*, 1995). Per tant, un bon mètode per analitzar si DDP1 té algun efecte sobre l'heterocromatina consisteix a analitzar els efectes de la mutació *ddp1^A* en un assaig de variegació.

Per a la realització d'aquest experiment es va estudiar el canvi en la variegació del gen *white* produït per l'eliminació d'una còpia del gen *ddp1* utilitzant la inversió de *white* *In(1)w^{m4}*. En *In(1)w^{m4}*, el gen *white* es troba prop de l'heterocromatina centromèrica a causa d'una inversió i s'expressa de forma variegada. El grau de variegació depèn dels nivells d'heterocromatina. L'augment o disminució dels nivells d'heterocromatina es reflecteix en el color d'ulls de les mosques estudiades: es tornen més vermells si

eliminem factors que augmentin els nivells d'heterocromatina, i més blancs si eliminem factors que disminueixin els nivells d'heterocromatina. Els factors que no es troben implicats en el manteniment o formació de l'heterocromatina no produeixen cap canvi en el color d'ulls.

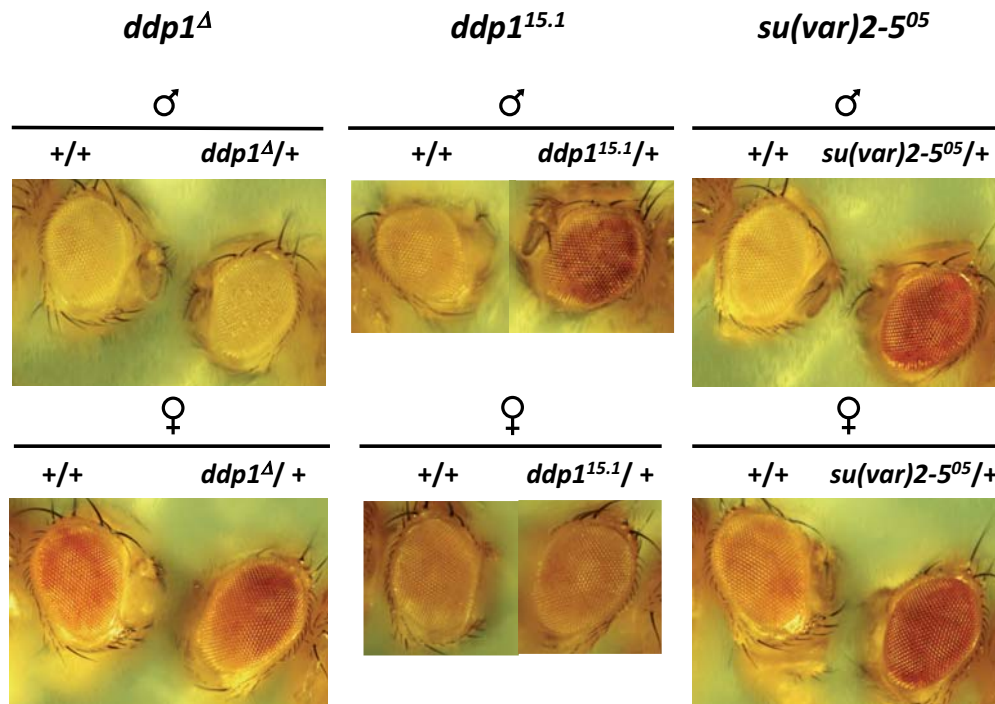


Fig. R.32. Assaig de variegació del mutant *ddp1^Δ* en *In(1)w^{m4}*. Es mostren mascles i femelles del mateix encreuament El mateix experiment es mostra amb el mutant hipomorf *ddp1^{15.1}* i el mutant de *su(var)2-5⁰⁵*, que codifica per la proteïna HP1.

Com es pot veure en la figura R.32, les femelles *ddp1^Δ/+* mostren una lleugera supressió de la variegació respecte el control *+/+*, mentre que els mascles no presenten cap efecte. És el contrari del que s'observa amb la mutació hipomòrfica *ddp1^{15.1}*, en què un 50 % dels mascles presenta una elevada supressió de la variegació, mentre que les femelles no en presenten gens. Com a control dels efectes causats per un supressor de la variegació fort, es va realitzar el mateix experiment amb mutants de *su(var)2-5⁰⁵*, el gen que codifica per HP1.

Es va realitzar el mateix experiment amb les línies *39C-42* (figura R.33) i *118E-5* (no es mostren les imatges). Aquestes línies porten una construcció *reporter hsp70-white⁺* inserida en diferents regions heterocromàtiques del cromosoma 4, donant una expressió variegada del gen *white*. En aquestes condicions *ddp1^Δ* no mostra cap efecte, mentre que

en el cas de *ddp1¹⁵⁻¹* el 40% dels mascles presenta una moderada supressió i les femelles una supressió fluixa (figura R.33).

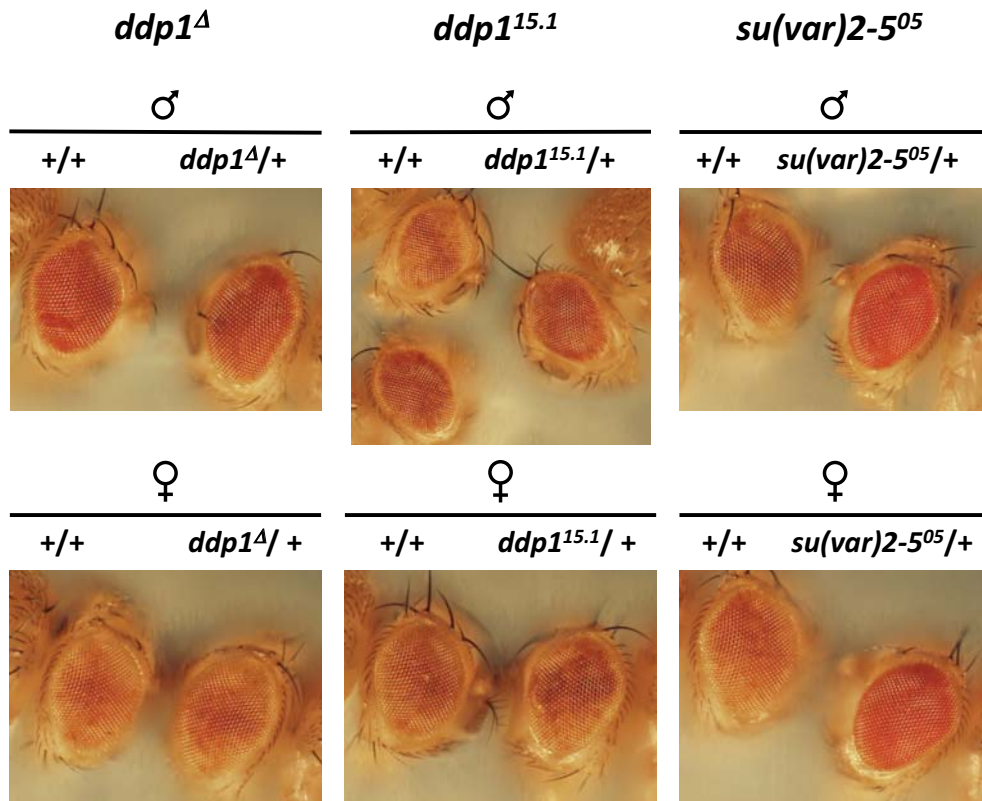


Fig. R.33. Assaig de variegació del mutant *ddp1^Δ* en la línia 39C-42. Es mostren mascles i femelles del mateix encreuament. El mateix experiment es mostra amb el mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹* i el mutant *su(var)2-5⁰⁵*, que codifica per la proteïna HP1.

2.2. Estudi de la contribució de DDP1 al silenciament heterocromàtic

Els resultats obtinguts en l'apartat anterior suggereixen que la contribució sobre l'heterocromatina descrita anteriorment pel mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹* és indirecta, perquè només s'observa un efecte molt lleuger sobre PEV en mutants nuls *ddp1^Δ*.

Per corroborar aquesta hipòtesi es va utilitzar el sistema LacI (Li *et al.*, 2003b), el qual permet estudiar si la localització de la proteïna d'interès en un lloc concret del genoma pot modificar l'estructura de la cromatina en aquella regió. Aquest sistema consta de dues parts: les mosques *S9.2* tenen inserides a 5' de la regió reguladora d'un gen *white* 46 repeticions del lloc d'unió reconegut pel domini d'unió a DNA de la proteïna LacI. En unes altres mosques s'insereix la proteïna d'interès fusionada a la proteïna LacI. En

B

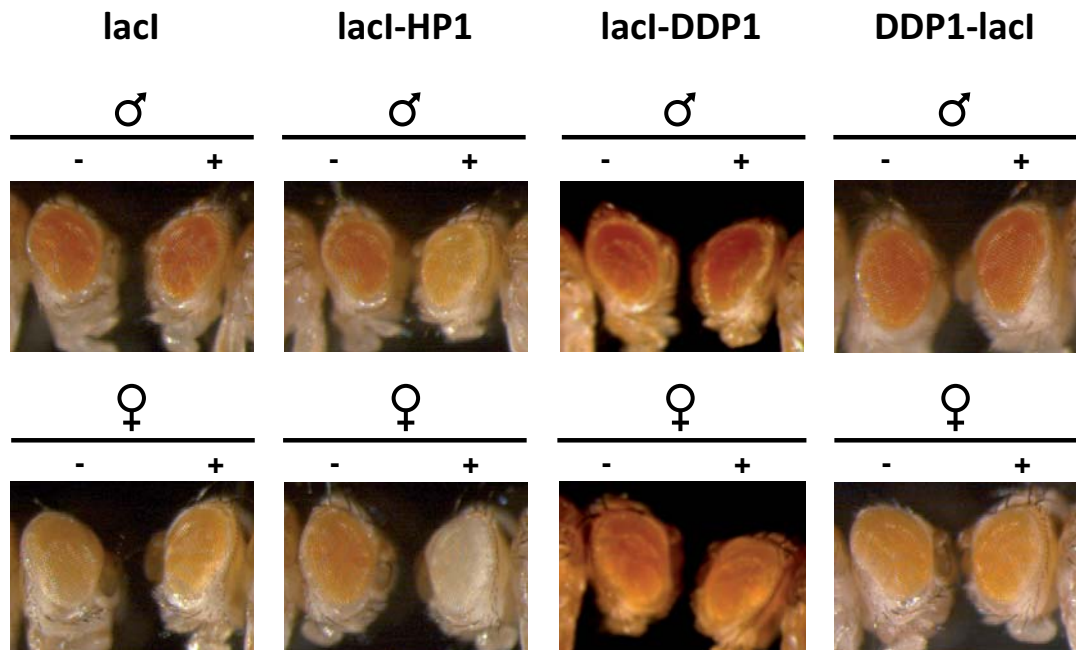


Fig. R.34. Reclutament ectòpic de DDP1 a un gen *reporter*. A) Esquema del funcionament del sistema LacI. Les femelles *S9.2* contenen llocs d'unió de la proteïna LacI a 5' del gen *reporter white*. Els mascles LacI-DDP1 expressen la proteïna de fusió sota el promotor de xoc tèrmic. B) Es mostren mascles i femelles d'un mateix creuament. Es mostra l'expressió de la proteïna LacI com control negatiu. L'expressió de la proteïna LacI-HP1 es mostra com a control positiu. L'expressió de DDP1 s'ha dut a terme fusionant la proteïna en N- i C- terminal a la proteïna LacI.

2.3. Estudi dels patrons de localització de HP1 i me2K9H3 en fons mutant *ddp1^A*

Els resultats obtinguts fins ara mostren que DDP1 no afecta el silenciament de manera apreciable, i que els forts efectes observats en els mutants hipomorfs *ddp1¹⁵⁻¹* podrien ser conseqüència d'efectes secundaris. Aquesta conclusió ens va portar a reexaminar els efectes de la mutació de DDP1 en la deposició de dues marques heterocromàtiques, HP1 i me2K9H3, ja que estudis previs havien mostrat una reducció en els nivells de HP1 i me2K9H3 a l'heterocromatina en mutants hipomorfs *ddp1¹⁵⁻¹* (Huertas *et al.*, 2004).

Es van analitzar els nivells de HP1 i me2K9H3 en cromosomes politènics *ddp1^A*. Per a una millor comparació dels nivells observats en les diferents mostres, es va recórrer a un control intern: les glàndules salivals mutants *ddp1^A* es van barrejar i fixar amb glàndules salivals control, les quals expressen el transgèn H2av-GFP sota el control del

promotor d'*H2av*. D'aquesta manera, els cromosomes politènics mutants i control, els quals es poden reconèixer mitjançant immunolocalització amb anticòs α GFP, són processats de la mateixa manera i observats en les mateixes condicions que la mostra mutant.

Així doncs, es van preparar les mostres tal i com s'ha descrit i es van realitzar immunolocalitzacions amb anticòs α me2K9H3 o α HP1. Els resultats es van analitzar per microscopia de fluorescència. Un 50 % dels cromosomes mutants *ddp1^Δ* presenten nivells reduïts de me2K9H3 al cromocentre si es comparen amb cromosomes salvatges, i d'aquest 50 %, només un 25 % presenta una disminució forta (figura R.35A). En analitzar els nivells de HP1 constatem que els nivells de HP1 al cromocentre no es troben afectats en els mutants *ddp1^Δ*, però que un 50 % dels cromosomes mutants presenten una disminució de HP1 a les bandes dels braços respecte a cromosomes salvatges (figura R.35B).

Sembla doncs, que el mutant nul *ddp1^Δ* es comporta de manera similar al mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹* en el cas de me2K9H3, amb nivells reduïts de me2K9H3 al cromocentre. En el cas de HP1, ambdós mutants presenten una baixada de HP1, però mentre que en el mutant hipomorf la baixada s'observa al cromocentre, en el mutant nul el nivell de HP1 al cromocentre es manté invariable i, en canvi, sí que baixen els nivells de HP1 als braços dels cromosomes.

Aquests resultats suggereixen que el mutant nul *ddp1^Δ* mimetitzava parcialment la baixada de HP1 i me2K9H3 observada amb el mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹*, tot i que els resultats obtinguts en els experiments de PEV i LacI, juntament amb la localització gairebé exclusivament citoplasmàtica de DDP1, fan pensar que la contribució de DDP1 a la formació i/o manteniment de l'heterocromatina és indirecta.

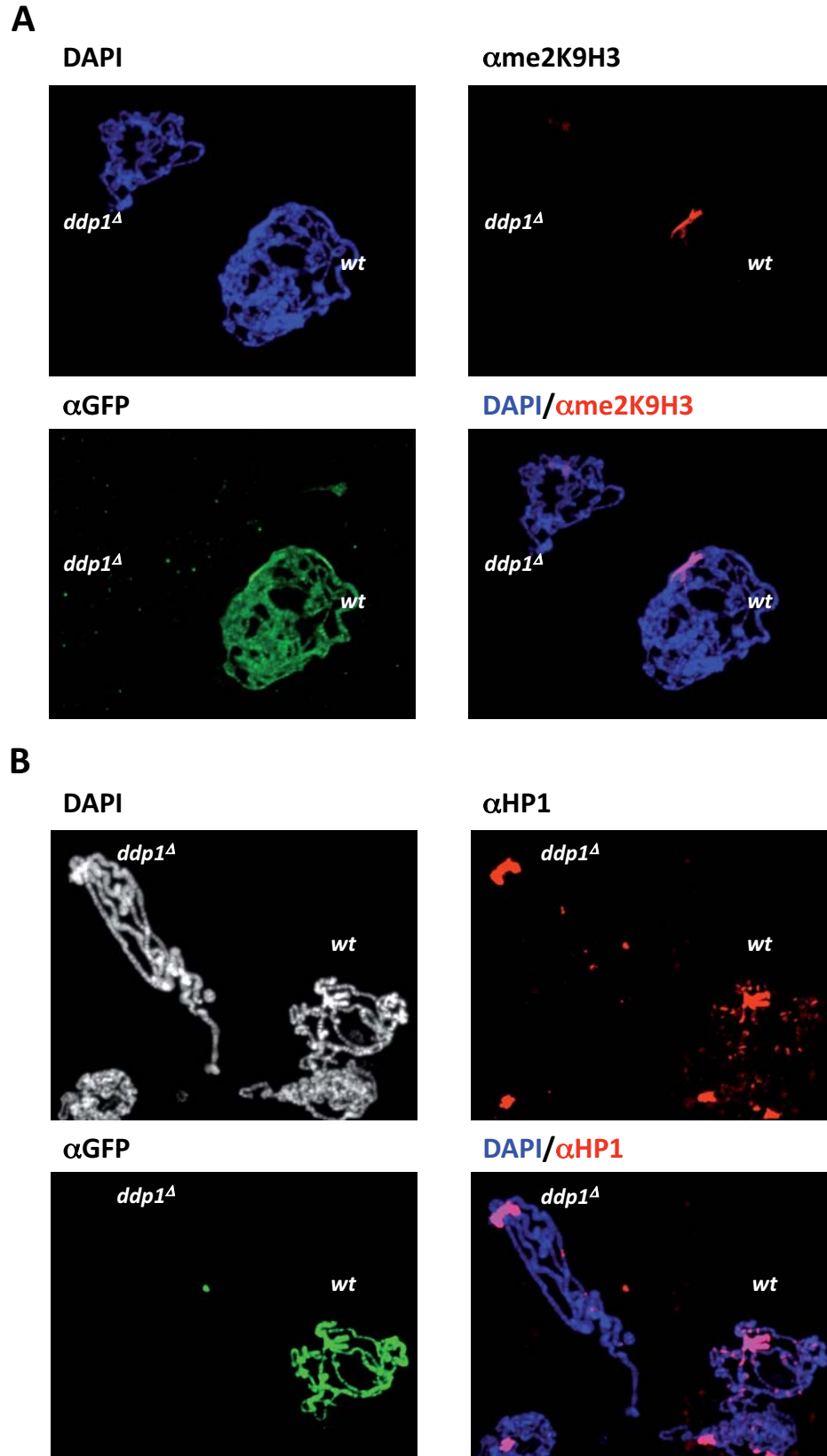


Fig. R.35. Determinació dels nivells de me2K9H3 i HP1 a cromosomes politènics de mutants *ddp1 Δ* .
A) Immunolocalització amb α me2K9H3 i α GFP. El DAPI, en blau, marca els cromosomes. En verd es mostra el senyal de α GFP, que marca els cromosomes control. En vermell es mostra el senyal de α me2K9H3. **B)** Immunolocalització amb α HP1 i α GFP. El DAPI, en blau, marca els cromosomes. En verd es mostra el senyal de α GFP, que marca els cromosomes control. En vermell es mostra el senyal de α HP1.

2.4. Anàlisi de les proteïnes associades a DDP1

En aquest treball s'ha analitzat la localització subcel·lular de DDP1 i la seva contribució a l'organització de l'heterocromatina. Les dades indiquen que DDP1 és una proteïna citoplasmàtica i que el senyal de DDP1 associada a HP1 als braços eucromàtics i al cromocentre de cromosomes politènics és el resultat del reconeixement inespecífic d'una altra proteïna nuclear en absència de DDP1. En concordància amb aquests resultats, la contribució de DDP1 a la reducció de les marques heterocromàtiques HP1 i me2K9H3 en cromosomes mutants *ddp1Δ* sembla ser indirecta, ja que *ddp1^A* no és un modificador de PEV i el reclutament de la proteïna DDP1 a llocs ectòpics no causa silenciament del gen *reporter*. Sembla doncs que la funció atribuïda a DDP1 en l'organització de l'heterocromatina és indirecta i que les funcions de DDP1 es trobarien restringides al citoplasma, segurament implicada en la traducció de proteïnes vista la seva associació amb el reticle endoplasmàtic. Per tal d'analitzar aquesta hipòtesi, es va analitzar amb quines proteïnes interacciona DDP1 utilitzant el mètode de purificació de complexos TAP (Tandem Affinity Purification) (Puig *et al.*, 2001; Veraksa *et al.*, 2005).

Es va fusionar DDP1 al *tag* TAP i la proteïna de fusió es va expressar a cèl·lules S2 sota el control del promotor de la metal·lotionina. Després d'obtenir extractes proteics citoplasmàtics i nuclears, es van purificar els complexos per unió del *tag* TAP a IgGs i les proteïnes purificades es van analitzar per SDS-PAGE i espectrometria de masses (vegeu els apartats 2.4.4 i 2.7 de materials i mètodes). Com a control negatiu es va realitzar el mateix procediment amb la proteïna TAP.

Com es pot apreciar en la figura R.36, DDP1-TAP només és detectable en la fracció citoplasmàtica, en concordància amb els resultats del primer capítol. La fracció citoplasmàtica mostra, a més de la banda corresponent a DDP1-TAP, una sèrie de bandes de baix pes molecular que no es detecten en la mostra citoplasmàtica del control negatiu TAP. L'anàlisi per espectrometria de masses de la barreja de proteïnes purificades va resultar en la identificació de diverses proteïnes ribosomals en la fracció citoplasmàtica de la mostra DDP1-TAP, les quals no es van trobar en el control citoplasmàtic TAP (taula R.2) (Chooi *et al.*, 1980; Chooi *et al.*, 1982; Burns *et al.*, 1984;

Stewart *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 2007). L'anàlisi de la fracció nuclear de DDP1-TAP no va identificar cap proteïna excepte IgGs.

A) Citoplasmàtica

B) Nuclear

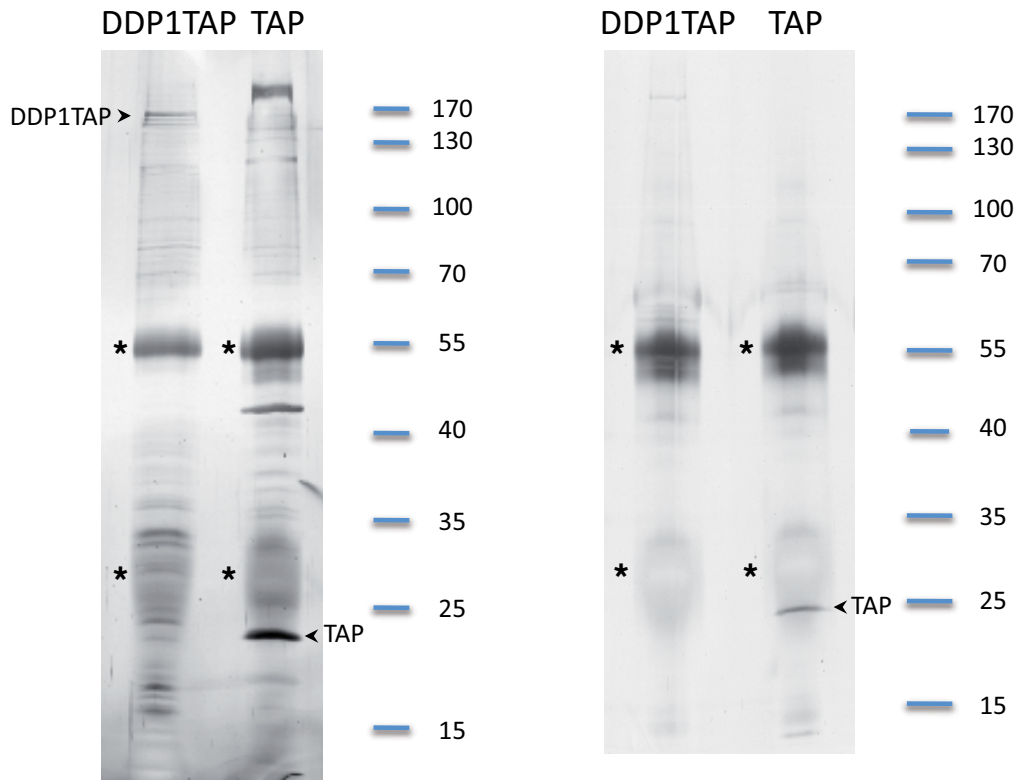


Fig. R36. Complexos obtinguts de la purificació de la proteïna DDP1-TAP. Els pesos moleculars es troben indicats en kDa. Els asteriscs indiquen les bandes de les IgG. **A)** Fracció citoplasmàtica. Es comparen les bandes obtingudes de la purificació de la mostra DDP1-TAP amb les obtingudes a la mateixa fracció amb el control TAP. Les proteïnes DDP1-TAP i TAP es troben indicades amb una fletxa. **B)** Fracció nuclear. Es comparen les bandes obtingudes de la purificació de la mostra DDP1-TAP amb les obtingudes a la mateixa fracció amb el control TAP. La proteïna TAP es troba indicada amb una fletxa.

La copurificació de DDP1 amb múltiples proteïnes ribosomals suggereix que DDP1 interacciona amb els ribosomes i reforça el resultat trobat en l'apartat 1.3 d'aquest capítol, segons el qual DDP1 es troba enriquida al reticle endoplasmàtic rugós. La localització de DDP1 al reticle endoplasmàtic rugós i la seva associació amb proteïnes ribosomals semblen indicar una funció de DDP1 en la traducció, tal i com s'ha proposat per Scp160 (Lang *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003a; Mendelsohn *et al.*, 2003; Baum *et al.*, 2004; Hogan *et al.*, 2008; Sezen *et al.*, 2009) i la vigilina humana (Neu-Yilik *et al.*, 1993; Goolsby *et al.*, 2003; Kruse *et al.*, 2003; Vollbrandt *et al.*, 2004). El fet que no s'hagi trobat DDP1 en la fracció nuclear dels complexos, també corrobora els resultats obtinguts en aquesta

tesi, bàsicament que DDP1 és una proteïna citoplasmàtica que té la seva funció principal al citoplasma, segurament en la traducció de proteïnes.

Identificació de les proteïnes aïllades en la purificació de la fracció citoplasmàtica de DDP1-TAP			
Score	Proteïna	Coverage	Pèptids identificats
100	Ribosomal Protein L23a	16%	K.EAAPSAAKPAAAAAPK.K K.KEAAPSAAKPAAAAAPK.K R.DYDALDIANKIGII.- K.KIEDNNTLVFLTHLR.A
70	Ribosomal protein L24	11%	R.AIVGASLAEILAKR.N
62	H/ACA ribonucleoprotein subunit 4	2%	K.IAELDTSQWPLLLK.N
51	Ribosomal protein S6	3%	R.LITPVVLQR.K
47	Ribosomal protein L12	9%	K.HSGNIGFEDILAIAR.V
44	Ribosomal protein S25	11%	K.QVVQHHSQVIYTR.A
39	Ribosomal protein S8	7%	K.YGKVEQALEDQFTSGR.I
38	Ribosomal protein L6	8%	R.FVPNEQR.K K.YLQNMFALHSSQYPHR.M
33	DDP1	3%	K.ILMGFSTQASR.Q K.SVEINAAHWIHK.Y R.QVTITIPTPQENTDIVK.L

Taula R.2. Proteïnes identificades per espectrometria de masses en la fracció citoplasmàtica de la mostra DDP1-TAP. El *score* és la probabilitat que l'assignació de la proteïna sigui bona. El *coverage* indica quin percentage de la proteïna solapen els pèptids identificats. Es mostra la seqüència aminoacídica dels pèptids identificats.

VI. DISCUSSIÓ

Com ja s'ha comentat a la introducció, les vigilines són una família de proteïnes la funció cel·lular de les quals, avui en dia, encara no es coneix amb claredat. S'ha proposat que les vigilines actuen al citoplasma, on s'associen a poliribosomes i estarien implicades en la regulació de diferents aspectes del RNA (Kruse *et al.*, 1996; Dodson *et al.*, 1997; Kruse *et al.*, 1998b; Cunningham *et al.*, 2000; Kruse *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2000; Frey *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003a; Mendelsohn *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2007; Hogan *et al.*, 2008; Sezen *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2010). D'altra banda, s'ha proposat un paper de les vigilines al nucli, on contribuirien a la correcta funció i manteniment de l'heterocromatina (Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2000; Huertas *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Marsellach *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008). Aquestes hipòtesis suggereixen que les vigilines actuen tant al nucli com al citoplasma però, de fet, la seva localització també és font de controvèrsia: alguns estudis han localitzat les vigilines exclusivament al citoplasma (Frey *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007b; Wen *et al.*, 2010), altres estudis les han relacionat amb una localització nuclear (Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2003; Piacentini *et al.*, 2009) i, finalment, també s'han localitzat aquestes proteïnes en ambdós compartiments cel·lulars (Klinger *et al.*, 1996; Kügler *et al.*, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008). Un cop vista la disparitat de localitzacions assignades a les vigilines, l'objectiu d'aquesta tesi ha estat aprofundir en l'estudi de la localització subcel·lular de DDP1 a *Drosophila melanogaster* per poder analitzar millor la seva funció.

1. DDP1 és citoplasmàtica i s'associa al reticle endoplasmàtic rugós

La localització de DDP1 s'ha estudiat a diversos òrgans de *Drosophila* mitjançant immunolocalitzacions amb anticòs α DDP1. Els resultats obtinguts mostren que DDP1 és una proteïna citoplasmàtica en tots els teixits estudiats al llarg del desenvolupament de la mosca i no presenta cap localització nuclear apreciable. Aquests resultats s'han corroborat mitjançant fusions de DDP1 amb la proteïna GFP expressades sota el control del promotor de *ddp1*, per mimetitzar l'expressió de la proteïna endògena, i del promotor de xoc tèrmic *hsp70*. En el cas de les glàndules salivals, DDP1 presenta una localització perinuclear que correspon a l'associació de DDP1 amb el reticle endoplasmàtic rugós, molt desenvolupat en les cèl·lules d'aquest òrgan. Aquesta

observació s'ha corroborat tant per estudis d'immunolocalització a glàndules salivals que expressen la fusió DDP1-GFP amb anticossos contra Lamina i Calnexina, proteïnes que marquen l'interior de la membrana nuclear i el reticle endoplasmàtic rugós respectivament (Gruenbaum *et al.*, 2000; Kleizen *et al.*, 2005), com per microscopia electrònica. DDP1 presenta una elevada colocalització amb la Calnexina, però no amb la Lamina. Al mateix temps, l'elevada resolució de la microscopia electrònica permet observar que DDP1 s'acumula a la part citoplasmàtica de la membrana nuclear on localitza amb el reticle endoplasmàtic rugós, clarament visible en forma de plectes que envolten la membrana nuclear, sense que s'aprecii cap acumulació significativa de DDP1 al nucli. D'altra banda, en un moment puntual de la divisió cel·lular a embrions, concretament en profase i metafase, DDP1 colocalitza parcialment amb la Tubulina al fus mitòtic. S'ha descrit que el reticle endoplasmàtic es divideix associant-se a les fibres de Tubulina, fet que li permet dividir-se més o menys equitativament entre les dues cèl·lules filles (Bobinnec *et al.*, 2003; Gupton *et al.*, 2006). L'associació de DDP1 al fus mitòtic podria suggerir que DDP1 s'associa al reticle endoplasmàtic no solament a glàndules, sinó també a embrions. Aquestes observacions permeten suggerir que a *Drosophila*, de la mateixa manera que a *S. cerevisiae*, *S. pombe* i humans, DDP1 es localitza al reticle endoplasmàtic rugós (Klinger *et al.*, 1996; Kügler *et al.*, 1996a; Frey *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 2010). Aquesta localització al reticle només és clarament apreciable a glàndules salivals, mentre que en altres òrgans de la mosca la localització és citoplasmàtica, sense cap enriquiment al voltant del nucli. Una primera hipòtesi seria que només les glàndules salivals tenen un reticle endoplasmàtic rugós prou desenvolupat com per poder apreciar aquesta localització perinuclear. Una segona hipòtesi, no necessàriament excloent amb l'anterior, seria que DDP1 s'associa al reticle endoplasmàtic gràcies a la seva unió als poliribosomes, tal i com s'ha vist a llevats i humans (Kruse *et al.*, 2003; Baum *et al.*, 2004; Vollbrandt *et al.*, 2004; Wen *et al.*, 2010) i s'ha confirmat en aquest treball, els quals es deuen localitzar a glàndules salivals majoritàriament al reticle endoplasmàtic rugós, ja que les glàndules salivals sintetitzen majoritàriament proteïnes per excretar.

La localització citoplasmàtica de DDP1 en tots els teixits estudiats, però sobretot a glàndules salivals, està en contra dels nostres resultats anteriors en què s'havia vist DDP1 associada als cromosomes politènics (Cortés *et al.*, 1999, Cortés *et al.*, 2003; Piacentini *et*

al., 2009). La diferència més important a l'hora de comparar els dos resultats rau en l'ús de l'àcid acètic com a fixador en el cas dels cromosomes politènics. Per intentar reproduir la localització nuclear de DDP1 s'han tractat les glàndules salivals amb el protocol que s'utilitza per preparar cromosomes politènics. La utilització d'àcid acètic en la fixació permet observar DDP1 al nucli, apreciand-se fins i tot bandes als cromosomes que podrien correspondre a les observades en els cromosomes politènics. Aquest canvi en la localització de DDP1 no es troba restringit només a glàndules salivals, sinó que també es dona en cèl·lules S2 i neuroblastes tractats amb àcid acètic. Es podria argumentar que l'àcid acètic no altera la localització subcel·lular de DDP1, sinó que facilita l'entrada de l'anticòs al nucli o bé que exposa epítops de la proteïna que normalment queden emmascarats. Ara bé, dels nostres experiments es desprenen diverses dades que van en contra d'aquestes possibilitats: DDP1-GFP presenta una localització citoplasmàtica, sense que aquest fet pugui atribuir-se a problemes de penetrabilitat de l'anticòs ni a l'emascament d'un epítop de la proteïna, ja que en aquest cas s'observa la fluorescència directa, sense emprar cap anticòs. A més a més, aquesta localització citoplasmàtica (i perinuclear a glàndules salivals) es manté en estudiar la localització de DDP1-GFP *in vivo*, sense utilitzar fixacions. Tampoc es pot atribuir la localització citoplasmàtica a la sobreexpressió de la proteïna de fusió, perquè en expressar-la sota el control del promotor de *ddp1* en un fons mutant, sense proteïna endògena, DDP1-GFP segueix sent citoplasmàtica. D'altra banda, es podria argumentar que la proteïna GFP impedeix l'entrada de DDP1-GFP al nucli o fa que DDP1-GFP no sigui funcional. No obstant, DDP1-GFP sí que pot entrar al nucli en ser tractada amb àcid acètic, i a més a més és funcional, ja que l'expressió d'una sola còpia rescata la letalitat observada en mutants de DDP1 en una proporció similar a l'observada per DDP1 (Huertas *et al.*, 2004), passant del 8 % al 70 % de viabilitat. Aquests resultats suggereixen que l'àcid acètic afecta la localització subcel·lular de DDP1 alterant-ne la localització citoplasmàtica i facilitant-ne l'entrada al nucli. Aquest comportament és similar a l'observat per altres autors en cèl·lules humanes Hep-2, en què la vigilina humana presenta una localització citoplasmàtica en ser fixades en metanol, i només es pot observar nuclear si es deshidraten prolongadament les cèl·lules en acetona (Kügler *et al.*, 1996a). Totes aquestes observacions suggereixen que les condicions experimentals que alteren la integritat de la membrana nuclear afecten la localització citoplasmàtica de DDP1. En aquests casos, DDP1 pot entrar al nucli i associar-se als

cromosomes, tal i com ho demostra l'associació de DDP1-GFP als cromosomes politènics.

Els experiments realitzats amb els diferents fons mutants han permès constatar que l'anticòs α DDP1 reconeix inespecíficament una proteïna nuclear en absència de DDP1. Immunolocalitzacions amb l'anticòs α DDP1 en el fons mutant *ddp1^Δ* donen reactivitat nuclear, sense cap senyal citoplasmàtic. Aquest senyal nuclear no reflecteix una contribució materna de DDP1 perquè no es veu afectat per l'expressió del *hairpin* sintètic de RNA que, en condicions *wild-type*, disminueix de forma eficient els nivells de DDP1. La reactivitat creuada de l'anticòs només ocorre en absència de DDP1, perquè en fons salvatge el senyal amb α DDP1 és citoplasmàtic i coincideix plenament amb l'observat per DDP1-GFP. A més a més, l'anticòs és capaç de reconèixer la localització perinuclear de DDP1-GFP si s'expressa en quantitats suficients a glàndules salivals de mutants *ddp1*. Les immunolocalitzacions realitzades a cromosomes politènics dels mutants *ddp1¹⁵⁻¹* i *ddp1^Δ* han permès determinar que l'associació de DDP1 als cromosomes politènics, colocalitzant amb HP1 als braços eucromàtics, observada en fons salvatge (Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2003) és en realitat un artefacte i que les bandes assignades a DDP1 corresponen en realitat a la proteïna nuclear reconeguda inespecíficament per l'anticòs. Aquesta observació s'ha corroborat a cromosomes politènics salvatges que expressen el transgèn DDP1-GFP, on s'han comparat les bandes de DDP1-GFP observades amb α GFP amb les bandes observades amb l'anticòs α DDP1. En cap cas s'aprecia una colocalització entre les bandes detectades amb α GFP i les observades amb α DDP1. D'altra banda, la proteïna nuclear reconeguda inespecíficament per l'anticòs podria ser la responsable que DDP1 es vegi nuclear en el cicle 14 de l'embriogènesi. Per un costat, l'estudi de la localització de DDP1-GFP a embrions mostra que DDP1-GFP és citoplasmàtica en aquest moment del desenvolupament. Per l'altre, aquest moment del cicle correspon amb l'inici de la transcripció zigòtica (Tadros *et al.*, 2007), quan la contribució materna de DDP1 s'ha extingit i els nivells de DDP1 són encara molt baixos, fet que permetria observar la proteïna inespecífica nuclear.

Així doncs, totes aquestes dades suggereixen que DDP1 és una proteïna que es troba restringida al citoplasma, i que les dades anteriors on s'observava DDP1 associada als cromosomes eren causades per una proteïna nuclear reconeguda inespecíficament per

l'anticòs o per tractaments que pertorbaven la integritat de la membrana nuclear. Aquesta localització restringida al citoplasma es correspon amb les observades per Scp160 a *S. cerevisiae* (Wintersberger *et al.*, 1995; Frey *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007b) i per Vgl1, a *S. pombe*, on recentment s'han realitzat experiments d'immunofluorescència amb Vgl1 fusionada amb la proteïna GFP que mostren una localització citoplasmàtica i perinuclear de la proteïna (Wen *et al.*, 2010) (vegeu també la figura 6 de l'apèndix), suggerint que la localització nuclear de les vigilines estaria restringida a mamífers (Klinger *et al.*, 1996; Kügler *et al.*, 1996a; Kruse *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008). Malgrat que l'existència d'una petita fracció nuclear indetectable a *Drosophila* no es pot descartar, totes les observacions afavoreixen una localització citoplasmàtica de la proteïna. Tot i que no s'ha demostrat la manca de funcionalitat dels senyals d'export i localització nuclear presents a DDP1, els resultats obtinguts indiquen que aquests senyals no serien funcionals, tal i com s'ha demostrat per Scp160 (Li *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007b). Estudis recents mostren que Scp160 es troba restringida al citoplasma, ja que la mutació dels senyals d'export i localització nuclear no afecta la localització ni la funcionalitat de la proteïna, i la mutació de les vies implicades en diversos tipus de transport nucli-citoplasma tampoc n'afecta la localització (Li *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007). A més a més, experiments preliminars realitzats en aquest treball a cèl·lules S2 en les quals s'ha inhibit l'export nuclear amb l'inhibidor general Leptomicina B (Wolff *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2006), no mostren canvis en la localització citoplasmàtica de DDP1 (dades no mostrades). De totes maneres es podrien realitzar estudis posteriors complementaris per determinar la funcionalitat d'aquests senyals, com per exemple mutar els senyals d'export i localització nuclear i analitzar tant la localització de la proteïna com la seva funcionalitat, o fer experiments de *photobleaching* amb DDP1-GFP irradiant el nucli per veure si baixa la fluorescència citoplasmàtica.

2. La contribució de DDP1 a l'estructura i formació de l'heterocromatina és indirecta

En els diferents estudis funcionals realitzats fins a la data s'han proposat diferents hipòtesis sobre la funció principal de les vigilines. L'associació d'aquestes proteïnes al reticle endoplasmàtic i, més especialment, als ribosomes dels diferents organismes on

s'ha estudiat (Wintersberger *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 2000; Frey *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 2003; Baum *et al.*, 2004; Vollbrandt *et al.*, 2004; Wen *et al.*, 2010) ha portat a suggerir que la funció principal d'aquestes proteïnes és la regulació dels diferents aspectes del metabolisme del RNA. S'han proposat dues hipòtesis per explicar el paper de les vigilines en aquest procés. D'una banda s'han relacionat les vigilines com a part activa en el procés de síntesi proteica de la cèl·lula participant en el transport de tRNAs entre nucli i citoplasma (Kruse *et al.*, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2000; Hilgendorf *et al.*, 2001; Hilgendorf *et al.*, 2003; Kruse *et al.*, 2003) i, per l'altra banda, s'ha associat a aquestes proteïnes un paper regulador de mRNAs específics (Dodson *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003a; Nelson *et al.*, 2007; Hogan *et al.*, 2008; Sezen *et al.*, 2009). Finalment també se les ha relacionat amb la formació d'heterocromatina per la seva associació amb proteïnes heterocromàtiques i pels defectes de segregació cromosòmica presentats pels mutants (Klinger *et al.*, 1996; Kügler *et al.*, 1996a; Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2003; Huertas *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Marsellach *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008).

La hipòtesi d'una contribució de les vigilines a la formació i/o el manteniment de l'heterocromatina s'ha basat, en part, en els nostres resultats anteriors segons els quals DDP1 tenia una contribució en la formació i/o el manteniment de l'heterocromatina. Aquesta afirmació se sustentava en el fet que el mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹* es comportava com a supressor de la variegació i afectava la deposició de marques heterocromàtiques (Huertas *et al.*, 2004). Aquesta hipòtesi era recolzada per l'associació de DDP1 als cromosomes politènics, on es localitzava a l'heterocromatina pericentromèrica així com en els braços eucromàtics colocalitzant amb HP1 (Cortés *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2003; Piacentini *et al.*, 2009).

La localització citoplasmàtica observada per DDP1 en tots els teixits analitzats, així com el descobriment que la localització nuclear observada és causada per una proteïna nuclear reconeguda inespecíficament per l'anticòs, ens han portat a plantejar-nos si els efectes sobre l'heterocromatina vistos amb el mutant hipomorf són reals. Els efectes observats en experiments de PEV amb el mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹*, on s'aprecia una forta supressió de la variegació en mascles i més fluixa en femelles, no s'han pogut reproduir amb el mutant nul *ddp1⁴*: en aquest cas s'aprecia una supressió molt dèbil en

les femelles, sense cap efecte en els mascles. L'expressió ectòpica de DDP1 a un gen *white reporter* mitjançant el sistema LacI confirma que DDP1 no indueix silenciament. Aquests resultats suggereixen que la contribució de DDP1 a PEV és indirecta, i que la forta supressió observada amb el mutant hipomorf podria ser causada per un efecte secundari. Aquests resultats concorden amb els observats a *S. pombe*, on Vgl1 no té cap contribució significativa a la formació i/o manteniment de l'heterocromatina (vegeu les figures 6 i S8 de l'apèndix). En estudiar la deposició de HP1 i me2K9H3 en cromosomes politènics de mutants nuls *ddp1^Δ* s'observa una baixada dels nivells de me2K9H3 al cromocentre en un 50% dels casos (essent forta només en un 25% dels casos), i una reducció dels nivells de HP1 als braços eucromàtics, però no al cromocentre, també en un 50% dels casos. Aquests resultats coincideixen parcialment amb els obtinguts amb el mutant hipomorf *ddp1¹⁵⁻¹*, en el qual s'observa una baixada de HP1 i de me2K9H3 al cromocentre (Huertas *et al.*, 2004). Malgrat tot, les dades obtingudes en els experiments de variegació i silenciament, juntament amb la localització citoplasmàtica de DDP1, suggereixen fortament que la contribució de DDP1 a la formació i/o manteniment de l'heterocromatina és indirecta.

3. Les vigilines controlen l'expressió de nombrosos mRNAs

En relació amb la funció proposada per a les vigilines en la regulació dels diferents aspectes del metabolisme del RNA, els resultats obtinguts en aquesta tesi en combinació amb els recents descobriments a *S. cerevisiae* (Hogan *et al.*, 2008; Sezen *et al.*, 2009), semblen concordar amb la hipòtesi que associa aquestes proteïnes amb un paper en la regulació de mRNAs específics (Dodson *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2007; Hogan *et al.*, 2008; Sezen *et al.*, 2009). A llevat Scp160 uneix mRNAs específics (Li *et al.*, 2003a; Hogan *et al.*, 2008; Sezen *et al.*, 2009) i s'associa amb els ribosomes (Weber *et al.*, 1997; Frey *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2001; Baum *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007a), i a *Drosophila* s'ha descrit que DDP1 forma part d'un complex involucrat en la regulació positiva de la traducció (Nelson *et al.*, 2007), interacciona amb diverses riboproteïnes (Piacentini *et al.*, 2009) i s'associa amb ribosomes (aquest treball).

L'estudi de les proteïnes associades amb DDP1 mitjançant una purificació de complexos amb el mètode TAP (Puig *et al.*, 2001; Veraksa *et al.*, 2005) ha permès purificar set proteïnes ribosomals que formen part de les subunitats 40S i 60S del ribosoma (Chooi *et al.*, 1980; Chooi *et al.*, 1982; Burns *et al.*, 1984; Stewart *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 2007). Un estudi detallat del gel permet apreciar que algunes de les proteïnes que copurifiquen amb DDP1-TAP es troben en quantitats no estequiomètriques, suggerint que DDP1, a part d'unir ribosomes, uneix poliribosomes. Aquest resultat és compatible amb una associació de DDP1 al reticle endoplasmàtic rugós, tal i com hem observat per microscopia electrònica. Totes aquestes observacions semblen indicar que a *Drosophila melanogaster*, tal i com s'ha descrit per llevats i humans (Weber *et al.*, 1997; Frey *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 2003; Baum *et al.*, 2004; Vollbrandt *et al.*, 2004; Coyle *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2010), la vigilina es troba associada a proteïnes ribosomals i uneix poliribosomes solubles i de membrana.

Aquests resultats suggereixen que la localització citoplasmàtica, la unió a ribosomes i l'associació al reticle endoplasmàtic rugós, però no la contribució a l'organització de l'heterocromatina, són característiques de les vigilines conservades al llarg de l'evolució de llevat a humans. De fet, hi ha fortes evidències que els defectes de segregació cromosòmica i increment de ploïdia observats en mutants *scp160* serien causats per defectes en la duplicació del SPB (McGrew *et al.*, 1992). Scp160, en un complex amb altres proteïnes anomenat SESA, es troba implicada en la duplicació del SPB a través de la regulació de la traducció del mRNA POM34 (Sezen *et al.*, 2009). De manera similar, els defectes d'establiment del silenciament als telòmers i al *mating-type* podrien ser conseqüència d'una traducció alterada de mRNAs. Recentment s'ha vist que Scp160 uneix mRNAs que codifiquen per proteïnes implicades en aquests processos, com ara la deacetilasa d'histones RPD3 i Dhh1p, una helicasa de RNA requerida per la localització de Rap1p als telòmers (Li *et al.*, 2003a; Hogan *et al.*, 2008). En el mateix sentit, resultats observats a *S. pombe* indiquen que Vgl1 no té cap efecte sobre la formació i/o manteniment de l'heterocromatina (vegeu les figures 6 i S8 de l'apèndix), i recentment s'ha vist que no es troba implicada en el manteniment de la ploïdia (Wen *et al.*, 2010). Aquestes dades semblen indicar que la contribució a l'organització de l'heterocromatina no és una propietat conservada a totes les vigilines, i que les vigilines de *S. cerevisiae* i *Drosophila* no tenen una contribució directa a la formació de l'heterocromatina. De fet,

és molt probable que els fenotips relacionats amb l'heterocromatina observats en mutants d'aquestes proteïnes (Wintersberger *et al.*, 1995; Huertas *et al.*, 2004) siguin causats per defectes en la regulació de certs mRNAs implicats en el correcte manteniment tant de la ploïdia com de l'heterocromatina, que podrien variar segons l'espècie donant lloc als diferents fenotips observats. Aquest escenari no exclou, però, la possibilitat que a mamífers les vigilines hagin adquirit una localització parcialment nuclear al llarg de l'evolució i tinguin una funció directa en la formació de l'heterocromatina. Experiments d'immunoprecipitació per analitzar els RNAs units per DDP1 i l'anàlisi de canvis en els patrons d'expressió de proteïnes en fons mutant *ddp1^Δ* comparats amb un fons *wild-type*, permetrien distingir més clarament si DDP1, i les vigilines en general, regulen mRNAs específics. Aquesta hipòtesi també sembla vàlida a humans, ja que la vigilina s'associa als ribosomes i uneix eIF-1a (Kruse *et al.*, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2003; Vollbrandt *et al.*, 2004), i no és exclouent amb una funció de la vigilina humana en la formació de l'heterocromatina. D'altra banda, la hipòtesi que relaciona les vigilines en el procés de síntesi proteica de la cèl·lula com a reguladors generals participant en el transport de tRNAs entre nucli i citoplasma (Kruse *et al.*, 1996; Kruse *et al.*, 1998b; Kruse *et al.*, 2000; Hilgendorf *et al.*, 2001; Hilgendorf *et al.*, 2003; Kruse *et al.*, 2003), només sembla vàlida a mamífers, perquè a llevats i a *Drosophila*, les vigilines semblen excloses del nucli (Wintersberger *et al.*, 1995; Frey *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004; Brykailo *et al.*, 2007b; Wen *et al.*, 2010; figura 6 de l'apèndix).

VII. CONCLUSIONS

1. L'anàlisi de la localització subcel·lular de DDP1 mitjançant immunolocalitzacions amb α DDP1, fusions DDP1-GFP i microscopia electrònica indica que DDP1 és una proteïna citoplasmàtica, associada al reticle endoplasmàtic rugós.
2. En absència de DDP1, l'anticòs α DDP1 reconeix inespecíficament una altra proteïna nuclear.
3. La purificació de complexos mitjançant el mètode TAP mostra que DDP1 interacciona amb proteïnes ribosomals que formen part de les subunitats 40S i 60S del ribosoma, suggerint una implicació de DDP1 en la traducció.
4. La mutació *ddp1^Δ* presenta un efecte molt lleuger sobre la variegació i l'expressió ectòpica de DDP1 no produeix silenciament del gen *reporter*, suggerint que la contribució de DDP1 a l'organització de l'heterocromatina és indirecta.
5. Les conclusions anteriors indiquen que la localització citoplasmàtica, l'associació al reticle endoplasmàtic rugós i la interacció amb els ribosomes, però no la contribució a l'organització de l'heterocromatina, són característiques conservades per les vigilines al llarg de l'evolució des de llevat fins a humans.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aagaard L, Laible G, Selenko P, Schmidt M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebersorger A, Singh P, Reuter G, Jenuwein T (1999). Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J* **18**, 1923-1238.
- Abad J, Carmena M, Baars S, Saunders R, Glover D, Ludeña P, Sentis C, Tyler-Smith C, Villasante A (1992). Dodecasatellite: a conserved G+C-rich satellite from the centromeric heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4663-4667.
- Adam S, Nakagawa T, Swanson M, Woodruff T, Dreyfuss G (1986). mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol Cell Biol* **6**, 2932-2943.
- Akiyama T, Gohda J, Shibata S, Nomura Y, Azuma S, Ohmori Y, Sugano S, Arai H, Yamamoto T, Inoue J (2001). Mammalian homologue of *E. coli* Ras-like protein homologue leads to cell cycle arrest at G1 phase and apoptosis. *Genes Cells* **11**, 987-1001.
- Alfenito M, Birchler JA (1993). Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics* **135**, 589-597.
- Baber J, Libutti D, Levens D, Tjandra N (1999). High precision solution structure of the C-terminal KH domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, a c-myc transcription factor. *J Mol Biol* **289**, 949-962.
- Backe P, Messias A, Ravelli R, Sattler M, Cusack S (2005). X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. *Structure* **13**, 1055-1067.
- Baum S, Bittins M, Frey S, Seedorf M (2004). Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160 with polysomes. *Biochem J* **380**, 823-830.
- Beuth B, Pennell S, Arnvig K, Martin S, Taylor I (2005). Structure of a *Mycobacterium tuberculosis* NusA-RNA complex. *EMBO J* **24**, 3576-3587.
- Bobinnec Y, Marcaillou C, Morin X, Debec A (2003). Dynamics of the endoplasmic reticulum during early development of *Drosophila melanogaster*. *Cell Motility Cytoskeleton* **54**, 217-225.
- Braddock DT, Baber J, Levens D, Clore M (2002a). Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA. *EMBO J* **21**, 3476-3485.
- Braddock DT, Louis J, Baber J, Levens D, Clore M (2002b). Structure and dynamics of KH domains from FBP bound to single-stranded DNA. *Nature* **415**, 1051-1056.
- Brykailo M, Corbett A, Fridovich-Keil J (2007a). Functional overlap between conserved and diverged KH domains in *S. cerevisiae* SCP160. *Nucleic Acids Res* **35**, 1108-1118.

Brykailo M, McLane L, Fridovich-Keil J, Corbett A (2007b). Analysis of a predicted nuclear localization signal: implications for the intracellular localization and function of the *S. cerevisiae* RNA-binding protein Scp160. *Nucleic Acids Res* **35**, 6862-6869.

Buchanovich R, Posner J, Darnell R (1993). Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* **11**, 657-72.

Bupp J, Martin A, Stensrud E, Jaspersen S (2006). Telomere anchoring at the nuclear periphery requires the budding yeast Sad1-UNC-84 domain protein Mps3. *J Cell Biol* **179**, 845-854.

Burns D, Stark B, Macklin M, Chooi W (1984). Isolation and characterization of cloned DNA sequences containing ribosomal protein genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **4**, 2643-2652.

Carmena M, Abad J, Villasante A, Gonzalez C (1993). The *Drosophila melanogaster* dodecasatellite: a conserved G+C-rich satellite sequence is closely related to the centromer and can form connections between sister chromatids during mitosis. *J Cell Science* **105**, 41-50.

Castiglione MA, Stier G, Gibson T, Joseph C, Musco G, Pastore A, Travè G (1995). The KH module has an $\alpha\beta$ fold. *FEBS Letters* **358**, 193-198.

Chao J, Patskovsky Y, Patel V, Levy M, Almo S, Singer R (2010). ZBP1 recognition of b-actin zipcode induces RNA looping. *Genes Dev* **24**, 148-158.

Chen X, Court D, Ji X (1999). Crystal structure of ERA: a GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8396-8401.

Chen T, Damaj B, Herrera C, Lasko P, Richard S (1997). Self-association of a single-KH-domain family members Sam68, GLD-1, Qk1: role of KH domain. *Mol Cell Biol* **17**, 5707-5718.

Chmiel N, Rio D, Doudna J (2006). Distinct contributions of KH domains to substrate binding affinity of *Drosophila* P-element somatic inhibitor protein. *RNA* **12**, 283-291.

Choi H, Hwang C, Song K, Law P, Wei L, Loh H (2009). Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **380**, 431-436.

Chooi H (1980). Purification and characterization of ribosomal proteins. Purification of *Drosophila* ribosomal proteins. Isolation of proteins S8, S13, S14, S16, S19, S20/L24, S22/L26, S24, S25/S27, S26, S29, L4, L10/L11, L12, L13, L16, L18, L19, L27, 1, 7/8, 9, and 11. *Biochemistry* **19**, 3469-3476.

Chooi Y, Macklin M, Leiby K, Hong T, Scofield S, Sabatini L, Burns D (1982). Purification of *Drosophila* acidic ribosomal proteins. *Eur J Biochem* **127**, 199-205.

Cohen S, Walker G (2010). The transcription elongation factor NusA is required for stress-induced mutagenesis in *E. coli*. *Curr Biol* **20**, 80-85.

Cortés Alfred (1999). Caracterització de DDP1, una nova proteïna d'unió a àcids nucleics de cadena senzilla que s'associa a l'heterocromatina centromèrica de *Drosophila*. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona

Cortés A, Azorín F (2000). DDP1, a heterochromatin-associated multi-KH-domain protein of *Drosophila melanogaster*, interacts specifically with centromeric satellite DNA sequences. *Mol Cell Biol* **20**, 3860-3869.

Cortés A, Huertas D, Fanti L, Pimpinelli S, Marsellach X, Piña B, Azorín F (1999). DDP1, a single-stranded nucleic acid-binding protein of *Drosophila*, associates with pericentric heterochromatin and is functionally homologous to the yeast Scp160, which is involved in the control of cell ploidy. *EMBO J* **18**, 3820-3833.

Cortés A, Huertas D, Marsellach X, Ferrer-Miralles N, Ortiz-Lombardía M, Fanti L, Pimpinelli S, Piña B, Azorín F (2003). Analysing the contribution of nucleic acids to the structure and properties of centric heterochromatin. *Genetica* **117**, 117-125.

Cosentino G, Schmelzle T, Haghghat A, Helliwell S, Hall M, Sonenberg N (2000). Eap1, a novel eukaryotic translation initiation factor 4E-associated protein in *S. cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **20**, 4604-4613.

Cunningham K, Dodson R, Nagel M, Shapiro D, Schoenberg D (2000). Vigilin binding selectively inhibits cleavage of the vitellogenin mRNA 3' untranslated region by the mRNA endonuclease polysomal ribonuclease 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12498-12502.

Dammel C, Noller H (1995). Suppression of a cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor, RbfA. *Genes Dev* **9**, 626-637.

Dejgaard K, Leffers H (1996). Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains. *Eur J Biochem* **241**, 425-431.

Delahodde A, Becam A, Perea J, Jacq C (1986). A yeast protein HX has homology with the histone H2AF expressed in chicken embryo. *Nucleic Acids Res* **14**, 9213-9214.

Deshler J, Highett M, Abramson T, Schnapp B (1998). A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr Biol* **8**, 489-496.

Deshler J, Highett M, Schnapp B (1997). Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* **276**, 1128-1131.

Dodson R, Shapiro D (1997). Vigilin, a ubiquitous protein with 14 K homology domains, is the estrogen-inducible vitellogenin mRNA 3' untranslated region-binding protein. *J Biol Chem* **272**, 12249-12252.

Draper B, Mello C, Bowerman B, Hardin J, Priess J (1996). MEX-3, is a KH domain protein that regulates blastomere identity in early *C. elegans* embryos. *Cell* **87**, 205-216.

Du Z, Lee J, Fenn S, Tjhen R, James T (2008). Structure of a construct of a human PolyC-binding protein containing the first and the second KH domains reveals insights into its regulatory mechanisms. *J Biol Chem* **283**, 28757-28766.

Du Z, Lee J, Fenn S, Tjhen R, Stroud R, James T (2007). X-ray crystallographic and NMR studies of protein-protein and protein-nucleic acid interactions involving the KH domains from human PolyC-binding protein-2. *RNA* **13**, 1043-1051.

Du Z, Lee J, Tjhen R, Li S, Pan H, Stroud R, James T (2005). Crystal structure of the first KH domain of human PolyC-binding-protein-2 in complex with a C-rich strand of human telomeric DNA at 1.7Å. *J Biol Chem* **280**, 38823-38830.

Duncan R, Bazar L, Michelotti G, Tomonaga T, Krutzsch H, Avigan M, Levens D (1994). A sequence-specific, single-stranded binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif. *Genes Dev* **8**, 465-480.

Engbrecht J, Roeder S (1990). MER1, a yeast gene required for chromosome pairing and genetic recombination is induced in meiosis. *Mol Cell Biol* **10**, 2379-2389.

Fenn S, Du Z, Lee J, Tjhen R, Stroud R, James T (2007). Crystal structure of the third KH domain of human PolyC-binding protein-2 in complex with a C-rich strand of human telomeric DNA at 1.6Å resolution. *Nucleic Acids Res* **35**, 2651-2660.

Ferrer N, Azorín F, Villasante A, Gutiérrez C, Abad J (1995). Centromeric dodeca-satellite DNA sequences form fold-back structures. *J Mol Biol* **245**, 8-21.

Frey S, Pool M, Seedorf M (2001). Scp160, an RNA-binding, polysome-associated protein, localizes to the endoplasmic reticulum of *S. cerevisiae* in a microtubule-dependent manner. *J Biol Chem* **276**, 15905-15912.

Garcia-Mayoral MF, Hollingworth D, Masino L, Díaz-Moreno I, Kelly G, Gherzi R, Chou C, Chen C, Ramos A (2007). The structure of the C-terminal KH domains of KSRP reveals a noncanonical motif important for mRNA degradation. *Structure* **15**, 485-498.

Gerbasí V, Weaver C, Hill S, Friedman D, Link A (2004). Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol Cell Biol* **24**, 8276-8287.

Gherzi R, Lee K, Briata P, Wegmüller D, Moroni C, Karin M, Chen C (2004). A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell* **14**, 571-583.

Gibson T, Thompson J, Heringa J (1993). The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and its probably involved in binding to nucleic acid. *FEBS Letters* **3**, 361-366.

Git A, Standart N (2002). The KH domains of *Xenopus* Vg1RBP mediate RNA binding and self-association. *RNA* **8**, 1319-1333.

Goolsby K, Shapiro D (2003). RNAi-mediated depletion of the 15 KH domain protein, vigilin, induces death of dividing and non-dividing human cells but does not initially inhibit protein synthesis. *Nucleic Acids Res* **31**, 5644-5653.

Grady D, Ratcliff R, Robinson D, McCanlies E, Meyne J, Moyzis R (1992). Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1695-1699.

Grishin N (2001). KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acid Res* **29**, 638-643.

Gruenbaum Y, Wilson K, Harel A, Goldberg M, Cohen M (2000). Review: nuclear lamins-structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol* **129**, 313-323.

Grünweller A, Purschke W, Kügler S, Kruse C, Müller P (1997). Chicken vigilin gene: a distinctive pattern of hypersensitive sites is characteristic for its transcriptional activity. *Biochem J* **326**, 601-607.

Gupton S, Collings D, Allen N (2006). Endoplasmic reticulum targeted GFP reveals ER organization in tobacco NT-1 cells during cell division. *Plant Physiol Biochem* **44**, 95-105.

Hamman S, Strätling W (1998). Specific binding of *Drosophila* nuclear protein PEP (protein on ecdysone puffs) to hsp70 DNA and RNA. *Nucleic Acids Res* **26**, 4108-4115.

Hammond L, Rudner D, Kanaar R, Rio D (1997). Mutations in *hrp48* gene, which encodes a *Drosophila* heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle protein, cause lethality and developmental defects and affect P-element third-intron splicing in vivo. *Mol Cell Biol* **17**, 7260-7267.

Haynes S, Johnson D, Raychaudhuri G, Beyer A (1990). The *Drosophila* *Hrb87F* gene encodes a new member of the A and B hnRNP protein group. *Nucleic Acids Res* **19**, 25-31.

He L, Liu J, Collins I, Sanford S, O'Connell B, Benham C, Levens D (2000). Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression. *EMBO J* **19**, 1034-1044.

Henkel B, Schmidt C, Zorbas H, Pöschl E, Gloe T, Purschke W, Müller P (1992). Chicken vigilin gene organization and expression pattern. The domain structure of the protein is reflected by the exon structure. *Eur J Biochem* **209**, 321-328.

Higashio H, Sato K, Nakano A (2008). Smy2p participates in COPII vesicle formation through the interaction with Sec23p/Sec24p subcomplex. *Traffic* **9**, 79-93.

Hilgendorf I, Gellersen O, Emmrich J, Mikkat U, Rohwedel J, Krammer HJ, Müller P, Kruse C (2001). Estradiol has a direct impact on the exocrine as demonstrated by vigilin and enzyme expression. *Pancreatology* **1**, 24-29.

- Hilgendorf I, Van de Perck M, Emmrich J, Krammer HJ, Kruse C (2003). Vigilin and enzyme expression in isolated pancreatic acini after mellitin and gamma-interferon treatment. *Pancreatology* **3**, 336-341.
- Hogan D, Riordan D, Gerber A, Herschlag D, Brown P (2008). Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *Plos Biology* **6**, 2297-2313.
- Huang Y, Swapna G, Rajan P, Ke H, Xia B, Shukla K, Inouye M, Montelione G (2003). Solution NMR structure of ribosome-binding factor A (RbfA), a cold-shock adaptation protein from *E. coli*. *J Mol Biol* **327**, 521-536.
- Huertas D, Cortés A, Casanova J, Azorín F (2004). *Drosophila* DDP1, a multi-KH-domain protein, contributes to centromeric silencing and chromosome segregation. *Curr Biol* **14**, 1611-1620.
- Irie K, Tadauchi T, Takizawa P, Vale R, Matsumoto K, Herskowitz I (2002). The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *EMBO J* **21**, 1158-1167.
- Ito K, Egawa K, Nakamura Y (1991). Genetic interaction between the β 'subunit of RNA polymerase and the arginine-rich domain of *E. coli* NusA protein. *J. Bacteriol* **173**, 1492-1501.
- Jackson C, Kèpés F (1994). BFR1, a multicopy supressor of Brefeldin A-induced lethality, is implicated in secretion and nuclear segregation in *S. cerevisiae*. *Genetics* **137**, 423-437.
- James T, Elgin S (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* **6**, 3862-3872.
- Kanamori H, Dodson R, Shapiro D (1998). In vitro genetic analysis of the RNA binding site of vigilin, a multi-KH-domain protein. *Mol Cell Biol* **18**, 3991-4003.
- Kellum R, Alberts R (1995a). Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* **108**, 1419-1431.
- Kellum R, Raff J, Alberts B (1995b). Heterochromatin protein 1 distribution during development and during cell cycle in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* **108**, 489-496
- Kleizen B, Braakman I (2005). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 343-349.
- Klinger M, Kruse C (1996). Immunocytochemical localization of vigilin, a tRNA-binding protein, after cell fractionation and within the exocrine pancreatic cell of the rat. *Ann Anat* **178**, 331-335.
- Krämer A (1992). Purification of splicing factor SF1, a heat-stable protein that functions in the assembly of a presplicing complex. *Mol Cell Biol* **12**, 4545-4552.

Kruse C, Emmrich J, Rumpel E, Klinger M, Grünweller A, Rohwedel J, Krammer H, Kühnel W, Müller P (1998a). Production of trypsin by cells of the exocrine pancreas is paralleled by the expression of the KH protein vigilin. *Exp Cell Res* **239**, 111-118.

Kruse C, Grünweller A, Notbohm H, Kügler S, Purschke W, Müller P (1996). Evidence for a novel cytoplasmic tRNA-protein complex containing the KH-multidomain protein vigilin. *Biochem J* **320**, 247-252.

Kruse C, Grünweller A, Willkomm D, Pfeiffer T, Hartmann R, Müller P (1998b). tRNA is entrapped in similar, but distinct, nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein complexes, both of which contain vigilin and the elongation factor 1 α . *Biochem J* **329**, 615-621.

Kruse C, Willkomm D, Gebken J, Schuh A, Stossberg H, Vollbrandt T, Müller P, (2003). The multi-KH protein vigilin associates with free and membrane-bound ribosomes. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2219-2227.

Kruse C, Willkomm D, Grünweller A, Vollbrandt T, Sommer S, Busch S, Pfeiffer T, Brinkmann J, Hartmann R, Müller P (2000). Export and transport of tRNA are coupled to multi-protein complex. *Biochem J* **346**, 107-115.

Kügler S, Grünweller A, Probst C, Klinger M, Müller P, Kruse C (1996a). Vigilin contains a functional nuclear localisation sequence and is present in both the cytoplasm and the nucleus. *FEBS Letters* **382**, 330-334.

Kügler S, Plenz G, Müller P (1996b). Two additional 5' exons in the human vigilin gene distinguish it from the chicken gene and provide the structural basis for the differential routes of gene expression. *Eur J Biochem* **238**, 410-417.

Kumar S, Saradhi M, Chaturvedi N, Tyagi R (2006). Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: An overview. *Mol Cell Endocrinol* **246**, 147-156.

Kutay U, Lipowsky G, Izaurralde E, Bischoff R, Schwarzmaier P, Hartmann E, Görlich D (1998). Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol Cell* **1**, 359-369.

Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-120.

Lang B, Fridovich-Keil J (2000). Scp160, a multiple KH-domain protein, is a component of mRNP complexes in yeast. *Nucleic Acids Res* **28**, 1576-1584.

Lang B, Li A, Black-Brewster H, Fridovich-Keil J (2001). The brefeldin A resistance protein Bfr1 is a component of polyribosomes-associated mRNP complexes in yeast. *Nucleic Acids Res* **29**, 2567-2574.

Lee Y, Carthew R (2003). Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of introns spacers. *Methods* **30**, 322-329.

- Leffers H, Dejgaard K, Celis J (1995). Characterization of two major cellular Poly(rC)-binding human proteins, each containing three K-homologous (KH) domains. *Eur J Biochem* **230**, 447-453.
- Lewis H, Chen H, Edo C, Buckanovich R, Yang Y, Musunuru K, Zhong R, Darnell R, Burley S (1999). Crystal structures of Nova-1 and Nova-2 K-homology RNA-binding domains. *Structure* **7**, 191-203.
- Lewis H, Musunuru K, Jensen K, Edo C, Chen H, Darnell R, Burley S (2000). Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. *Cell* **100**, 323-332.
- Li A, Vargas C, Brykailo M, Openo K, Corbett A, Fridovich-Keil J (2004). Both KH and non-KH domain sequences are required for polyribosome association of Scp160 in yeast. *Nucleic Acids Res* **32**, 4768-4775.
- Li A, Watson A, Fridovich-Keil J (2003a). Scp160 associates with specific mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res* **31**, 1830-1837.
- Li Y, Danzer J, Alvarez P, Belmont A, Wallrath L (2003b). Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the *Drosophila* genome. *Development* **130**, 1817-1824.
- Liu Z, Luyten I, Bottmley M, Messias A, Houngninou-Molango S, Sprangers R, Zanier K, Krämer A, Sattler M (2001). Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1. *Science* **294**, 1098-1101.
- Maguire M, Guler-Gane G, Nietlispach D, Raine A, Zorn A, Standart N, Broadhurst W (2005). Solution structure and backbone dynamics of the KH-QUA2 region of the Xenopus STAR/GSG Quaking protein. *J Mol Biol* **348**, 265-279.
- Mahone M, Saffman E, Lasko P (1995). Localized Bicaudal-C RNA encodes a protein containing a KH domain, the RNA binding motif of FMR1. *EMBO J* **14**, 2043-2055.
- Marsellach X, Huertas D, Azorín F (2006). The multi-KH domain protein of *S. cerevisiae* Scp160 contributes to the regulation of telomeric silencing. *J Biol Chem* **281**, 18227-18235.
- Matunis M, Michael M, Dreyfuss G (1992). Characterization and primary structure of the PolyC-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. *Mol Cell Biol* **12**, 164-171.
- McGrew J, Goetsch L, Byers B, Baum P (1992). Requirement for *ESP1* in the nuclear division of *S. cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **3**, 1443-1454.
- McKnight G, Reasoner J, Gilbert T, Sundquist K, Hokland B, McKernan P, Champagne J, Johnson C, Bailey M, Holly R, O'Hara P, Oram J (1992). Cloning and expression of a cellular high density lipoprotein-binding protein that is up-regulated by cholesterol loading of cells. *J Biol Chem* **267**, 12131-12141.

- Melcher M, Schmidt M, Aagaard L, Selenko P, Laible G, Jenuwein T (2000). Structure-function analysis of SUVAR39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation and mitotic progression. *Mol Cell Biol* **20**, 3728-3741.
- Mendelsohn B, Li A, Vargas C, Riehm K, Watson A, Fridovich-Keil J (2003). Genetic and biochemical interactions between Scp160 and EAP1 in yeast. *Nucleic Acids Res* **31**, 5838-5847.
- Miao M, Ryan K, Wenthe S (2006). The integral membrane Pom34 functionally links nucleoporin subcomplexes. *Genetics* **172**, 1441-1457.
- Min H, Turck C, Nikolic J, Black D (1997). A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes Dev* **11**, 1023-1036.
- Musco G, Kharrat A, Stier G, Fraternali F, Gibson T, Nilges M, Pastore A (1997). The solution structure of the first KH domain of FMR1, the protein responsible for the fragile X syndrome. *Nat Struct Biol* **4**, 712-716.
- Musco G, Stier G, Joseph C, Castiglione MA, Nilges M, Gibson T, Pastore A (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell* **85**, 237-245.
- Musunuru K, Darnell R (2004). Determination and augmentation of RNA sequence specificity of Nova K-homology domains. *Nucleic Acid Res* **32**, 4852-4861.
- Nelson M, Luo H, Vari H, Cox B, Simmonds A, Krause H, Lipshitz H, Smibert C (2007). A multiprotein complex that mediates translational enhancement in *Drosophila*. *J Biol Chem* **282**, 34031-34038.
- Neu-Yilik G, Zorbas H, Gloe T, Raabe H, Hopp-Christensen T, Müller P (1993). Vigilin is a cytoplasmic protein. A study on its expression in primary cells and in established cell lines of different species. *Eur J Biochem* **213**, 727-736.
- Nilsson J, Sengupta J, Frank J, Nissen P (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* **5**, 1137-1141.
- Nishikura K (2006). Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Mol Cell Biol* **7**, 919-931.
- Ortiz-Lombardía M, Cortés A, Huertas D, Eritja R, Azorín F (1998). Tandem 5'-GA:GA-3' mismatches account for the high stability of the fold-back structures formed by the centromeric *Drosophila* dodeca-satellite. *J Mol Biol* **277**, 757-762.

Parks AL, Cook KR, Belvin M, Dompe NA, Fawcett R, Huppert K, Tan LR, Winter CG, Bogart KP, Deal JE, Deal-Herr ME, Grant D, Marcinko M, Miyazaki WY, Robertson S, Shaw KJ, Tabios M, Vysotskaia V, Zhao L, Andrade RS, Edgar KA, Howie E, Killpack K, Milash B, Norton A, Thao D, Whittaker K, Winner MA, Friedman L, Margolis J, Singer MA, Kopczynski C, Curtis D, Kaufman TC, Plowman GD, Duyk G, Francis-Lang HL (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nature Genetics* **36**, 288-292.

Piacentini L, Fanti L, Negri R, Del Vescovo V, Fatica A, Altieri F, Pimpinelli S (2009). Heterochromatin protein (HP1a) positively regulates euchromatic gene expression through RNA transcript association and interaction with hnRNPs in *Drosophila*. *Plos Genetics* **5**, 1-17.

Pieretti A, Zhang F, Fu Y, Warren S, Oostra B, Caskey T, Nelson D (1991). Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* **66**, 817-822.

Plenz G, Kügler S, Schnittger S, Rieder H, Fonatsch C, Müller P (1994). The human vigilin gene: identification, chromosomal localization and expression pattern. *Hum Genet* **93**, 575-582.

Pozdnyakova I, Regan L (2005). New insights into the fragile X syndrome. Relating genotype to phenotype at the molecular level. *FEBS J* **272**, 872-878.

Przewloka M, Zhang W, Costa P, Archambault V, D'Avino P, Lilley K, Laue E, McAinsh A, Glover D (2007). Molecular analysis of core kinetochore composition and assembly in *Drosophila melanogaster*. *Plos One* **5**, 1-13.

Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Séraphin B (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.

Ramos A, Hollingworth D, Major S, Adinolfi S, Kelly G, Muskett F, Pastore A (2002). Role of dimerization in KH/RNA complexes: the example of NOVA KH3. *Biochemistry* **41**, 4193-4201.

Raychaudhuri G, Haynes S, Beyer A (1992). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes and proteins in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **12**, 847-855.

Rohwedel J, Kügler S, Engebrecht T, Purschke W, Müller P, Kruse C (2003). Evidence for posttranscriptional regulation of the multi K homology domain protein vigilin by a small peptide encoded in the 5' leader sequence. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1705-1715.

Ross C, Patel R, Mendelson T, Ware V (2007). Functional conservation between structurally diverse ribosomal proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: fly L23a can substitute for yeast L25 in ribosome assembly and function. *Nucleic Acid Res* **35**, 4503-4514.

- Rudolph T, Yonezawa M, Lein S, Heidrich K, Stefan S, Schäfer C, Phalke S, Walther M, Schmidt A, Jenuwein T, Reuter G (2007). Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell* **26**, 103-115.
- Rutz B, Séraphin B (2000). A dual role for BBP/ScSF1 in nuclear pre-mRNA retention and splicing. *EMBO J* **19**, 1873-1886.
- Saffman E, Styhler S, Rother K, Li W, Richard S, Lasko P (1998). Premature translation of Oskar in oocytes lacking the RNA-binding protein Bicaudal-C. *Mol Cell Biol* **18**, 4855-4862.
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erhlich H (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook J, Rusell D (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schäfer T, Maco B, Petfalski E, Tollervey D, Böttcher B, Aebi U, Hurt E (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature* **441**, 651-655.
- Schmidt C, Henkel B, Pöschl E, Zorbas H, Purschke W, Gloe T, Müller P (1992). Complete cDNA sequence of chicken vigilin, a novel protein with amplified and evolutionary conserved domains. *Eur J Biochem* **206**, 625-634.
- Schneider I (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morph* **27**, 353-365.
- Schramm C, Elliott S, Shevchenko A, Shevchenko A, Schiebel E (2000). The Bbp1-Mps2 complex connects the SPB to the nuclear envelope and is essential for SPB duplication. *EMBO J* **19**, 421-433.
- Schuh A, Assmuth K, Hilgendorf I, Müller P, Kruse C (2003). Protein synthesis of eucaryotic cells could be decreased by antisense-DNA of the multi KH domain protein vigilin. *Int J Mol Med* **12**, 35-43.
- Sezen B, Seedorf M, Schiebel E (2009). The SESA network links duplication of the yeast centrosome with the protein translation machinery. *Genes Dev* **23**, 1559-1570.
- Sharma M, Barat C, Wilson D, Booth T, Kawazoe M, Hori-Takemoto C, Shirouzu M, Yokoyama S, Fucini P, Agrawal R (2005). Interaction of ERA with the 30S ribosomal subunit: implications for the 30S subunit assembly. *Mol Cell* **18**, 319-329.
- Siebel C, Admon A, Rio D (1995). Soma-specific expression and cloning of PSI, a negative regulator of P-element pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **9**, 269-283.

Siebel C, Kanaar R, Rio D (1994). Regulation of tissue-specific P-element pre-mRNA splicing requires the RNA-binding protein PSI. *Genes Dev* **8**, 1713-1725.

Siomi H, Choi M, Siomi M, Nussbaum R, Dreyfuss G (1994). Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* **77**, 33-39.

Siomi H, Matunis M, Michael M, Dreyfuss R (1993a). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acid Res* **21**, 1193-1198.

Siomi H, Siomi M, Nussbaum R, Dreyfuss R (1993b). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* **74**, 291-298.

Sonenberg N, Hinnebusch A (2009). Regulation of translation initiation in eucaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**, 731-745.

Spingola M, Armisen J, Ares M (2004). Merp1 is a modular splicing factor whose function depends on the conserved U2 snRNP protein Snu17p. *Nucleic Acid Res* **32**, 1242-1250.

Stewart M, Denell R (1993). Mutations in the *Drosophila* gene encoding ribosomal protein S6 cause tissue overgrowth. *Mol Cell Biol* **13**, 2524-2535.

Taddei A, Van Houwe G, Nagai S, Erb I, Van Nimwegen E, Gasser S (2009). The functional importance of telomere clustering: global changes in gene expression result from Sir factor disperion. *Genome Res* **19**, 611-625.

Tadros W, Westwood T, Lipshitz H (2007). The Mother-to-Child Transition. *Dev Cell* **12**, 847-849.

Takimoto M, Tomonaga T, Matunis M, Avigan M, Krutzsch H, Dreyfuss G, Levens D (1993). Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro. *J Biol Chem* **24**, 18249-18258.

Tu C, Zhou X, Tropea J, Austin B, Waugh D, Court D, Ji X (2009). Structure of ERA in complex with the 3' end of 16S rRNA: implications for ribosome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 14843-14848.

Urlaub H, Kruff V, Bischof O, Müller EC, Wittman-Liebold B (1995). Protein-rRNA binding features and their structural and functional implications in ribosomes as determined by cross-linking studies. *EMBO J* **14**, 4578-4588.

Valverde R, Edwards L, Regan L (2008). Structure and function of KH domains. *FEBS J* **275**, 2712-2726.

Valverde R, Pozdnyakova I, Kajander T, Venkatraman J, Regan L (2007). Fragile X mental retardation syndrome: structure of KH1-KH2 domains of fragile X mental retardation protein. *Structure* **15**, 1090-1098.

- Veraksa A, Bauer A, Atavanis-Tsakonas S (2005). Analysing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification mass spectrometry. *Developmental Dynamics* **232**, 827-834.
- Vernet C, Artz K (1997). STAR, a gene family involved in signal transduction and activation of RNA. *TIG* **13**, 479-484.
- Vollbrandt T, Willkomm D, Stossberg H, Kruse C (2004). Vigilin is colocalized with 80S ribosomes and binds to the ribosomal complex through its C-terminal domain. *IJBCB* **36**, 1306-1318.
- Von der Haart T, Ball P, McCarthy J (2000). Stabilization of eucaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'cap by domains of eIF4G. *J Biol Chem* **275**, 30551-30555.
- Wallrath L, Elgin S (1995). Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev* **9**, 1263-1277.
- Wang X, McLachlan J, Zamore P, Tanaka Hall T (2002). Modular recognition of RNA by a human Pumilio-homology domain. *Cell* **110**, 501-512.
- Wang Q, Zhang Z, Blackwell K, Carmichael G (2005). Vigilins bind to promiscuously A-to-I-edited RNAs and are involved in the formation of heterochromatin. *Curr Biol* **15**, 384-391.
- Weber V, Wernitznig A, Hager G, Harata M, Frank P, Wintersberger U (1997). Purification and nucleic-acid-binding properties of a *S. cerevisiae* protein involved in the control of ploidy. *Eur J Biochem* **249**, 309-317.
- Wen W, Stevenson A, Wang C, Chen H, Kearsey S, Norbury C, Watt S, Bähler J, Wang S (2010). Vgl1, a multi-KH domain protein, is a novel component of fission yeast stress granules required for cell survival under thermal stress. *Nucleic Acid Res doi 101093*, 1-12.
- Wintersberger U, Kühne C, Karwan A (1995). Scp160, a new yeast protein associated with the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum, is necessary for maintenance of exact ploidy. *Yeast* **11**, 929-944.
- Wolff B, Sanglier JJ, Wang Y (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chemistry and Biology* **4**, 139-147.
- Worbs M, Bourenkov G, Bartunik H, Huber R, Wahl M (2001). An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH domains in transcription factor NusA. *Mol Cell* **7**, 1177-1189.
- Xue Z, Shan X, Sinelnikov A, Mélése T (1996). Yeast mutants that produce a novel type of ascus containing asci instead of spores. *Genetics* **144**, 979-989.

Yadavilli S, Hedge V, Deutsch W (2007). Translocation of human ribosomal protein S3 to sites of DNA damage is dependant on ERK-mediated phosphorylation following genotoxic stress. *DNA Repair* **6**, 1453-1462.

Yadavilli S, Mayo L, Higgins M, Lain S, Hedge V, Deutsch W (2009). Ribosomal protein S3: a multifunctional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain. *DNA Repair* **8**, 1215-1224.

Yang Y, Yin G, Darnell R (1998). The neuronal RNA-binding protein Nova-2 is implicated as the autoantigen targeted in POMA patients with dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13254-59.

Zeller C, Parnell S, Dohlman H (2007). The RACK1 ortholog Asc1p functions as a G-protein β subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J Biol Chem* **282**, 25186-25176.

Zhou J, Wang Q, Chen L, Carmichael G (2008). On the mechanism of induction of heterochromatin by the RNA-binding protein vigilin. *RNA* **14**, 1-9.

IX. APÈNDIX

***DROSOPHILA* VIGILIN, DDP1, LOCALISES TO THE CYTOPLASM, BINDS RIBOSOMES,
AND ASSOCIATES TO THE ROUGH-ENDOPLASMIC RETICULUM**

Marta Batlle, Francesc-Xavier Marsellach⁺, Dori Huertas⁺⁺ and Fernando Azorín*.

Institute of Molecular Biology of Barcelona, CSIC, and Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona). Barcelona Science Park. Barcelona. Spain.

Running title: Subcellular localisation of DDP1

Key words: KH-domain/ vigilin/ DDP1/ heterochromatin/ mRNA translation/ *S. pombe*

*corresponding author:

Dr. F. Azorín

Institute of Molecular Biology of Barcelona, CSIC

Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona)

Barcelona Science Park

Baldiri Rexac, 12. 08028 Barcelona. Spain

Phone#: 3493 4034958

Fax#: 3493 4034979

e-mail: fambmc@ibmb.csic.es

⁺present address:

Department of Genetics, Evolution and Environment. University College London.
London. United Kingdom.

⁺⁺ present address:

Bellvitge Institute for Biomedical Research Institute (IDIBELL) and Catalan Institute of Oncology (ICO). Barcelona. Spain.

ABSTRACT

Functional characterisation of vigilin, a highly conserved multi-KH-domain protein that binds RNA and ssDNA, remains elusive and, to some extent, controversial. Studies performed in *S. cerevisiae* and human cells indicate that vigilin localises to the cytoplasm, binds ribosomes, associates to RER and regulates mRNA translation. On the other hand, a contribution to heterochromatin-mediated gene silencing (PEV) and chromosome segregation was reported in *S. cerevisiae*, *Drosophila* and human cells. Whether this contribution is direct remains, however, unclear. Here, we report that *Drosophila* vigilin, DDP1, vastly localises to the cytoplasm, being largely excluded from the nucleus. We also show that DDP1 binds ribosomes and associates to RER, showing only a weak, likely indirect, contribution to PEV. In *S. pombe*, vigilin also associates to RER, having no contribution to PEV. Altogether, these results favour a model by which vigilin acts in the cytoplasm, regulating RNA metabolism, and affects nuclear functions only indirectly.

INTRODUCTION

Vigilin is a highly evolutionarily conserved protein present in all eukaryotic organisms analysed to date, from the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* (Scp160p) and *Schizosaccharomyces pombe* (Vgl1) to nematodes, *Drosophila* (DDP1) and vertebrates [1-6]. A most striking feature of vigilin is the presence of multiple KH-domains that mediate high affinity binding to single-stranded nucleic acids, both RNA and ssDNA [1,2,5,7-9].

Vigilin was shown to participate in the regulation of multiple aspects of RNA metabolism, from tRNA export and mRNA translation to RNA editing [2,9-18]. In particular, in *S. cerevisiae*, Scp160p binds both soluble and membrane-bound polyribosomes [19-21], associates to specific mRNAs [16,22], and forms part of, at least, two multiprotein complexes involved in mRNA translation [20,23]. In human cells, vigilin was also found to bind ribosomes, specific mRNAs and tRNAs [15,24,25]. In addition, in human cells, vigilin interacts with the RNA-editing enzyme ADAR1 and, both in human cells and *Drosophila*, vigilin binds promiscuously edited RNAs [18].

Vigilin has also been proposed to act in the nucleus, regulating different aspects of chromosome structure and function [1,5-7,18,26-28]. In *S. cerevisiae*, Scp160p was shown to contribute to heterochromatin-mediated gene silencing (PEV) at telomeres and the mating-type *locus*, being required for maintenance of correct cell ploidy [6,28]. A similar situation is found in human cells, where vigilin was found to associate to heterochromatic α -satellite sequences, being involved in the control of cell ploidy [18,24,26]. Similarly, in *Drosophila*, DDP1 was reported to associate to centromeric heterochromatin, contributing to PEV and the regulation of chromosome condensation and segregation [1,7,27].

Observations discussed above suggest that vigilin is a highly multifunctional protein, which acts both in the cytoplasm and the nucleus. Data on the actual pattern of subcellular localisation of vigilin is, however, scarce and, to some extent, contradictory. Previous results indicated that, in *S. cerevisiae*, Scp160p shows a distinct perinuclear localisation consistent with an association to ribosomes of the rough endoplasmic reticulum (RER) [6,19,28]. Immuno-electron microscopy studies showed that, also in human HEP-2 cells, vigilin associates to RER [24]. On the other hand, in *Drosophila*, DDP1 was found associated to polytene chromosomes, where it localises to the heterochromatic chromocentre and a few discrete sites in euchromatin [1]. In *S.*

cerevisiae, however, Scp160p appears to be excluded from the nucleus while, in HEP-2 cells, it is unclear whether a minor fraction of vigilin shows nuclear localisation [24].

Here, we have extensively analysed subcellular localisation of *Drosophila* vigilin, DDP1. Our results show that DDP1 vastly localises to the cytoplasm all through development, and in different organs and tissues of the fly, being excluded from the nucleus. DDP1 likely contributes to mRNA translation, as it binds ribosomes and preferentially associates to RER. In the light of these results, the actual contribution of DDP1 to PEV was re-examined. Here, we show that a newly generated null *ddp1^A* mutation is only a weak suppressor of PEV. Moreover, targeting DDP1 to an ectopic reporter construct does not induce silencing of the reporter gene. Similar results were obtained in the fission yeast *S. pombe*, where vigilin (Vgl1) shows a distinct perinuclear localisation, having no significant contribution to PEV at centromeres, telomeres and the mating-type *locus*. These results indicate that cytoplasmic localisation, binding to ribosomes and association to RER, but not contribution to heterochromatin organisation, are evolutionarily conserved features of vigilin.

MATERIALS AND METHODS

For a detailed description of the Materials and Methods see the Supplemental Material.

***Drosophila* stocks, transgenic lines and mutants**

ddp1^{15.1} mutation was described elsewhere [27]. Transgenic line *S9.2* is described in [29]. *In(1)w^{m4}* and *Su(var)2-5⁰⁵* strains were obtained from Dr. Pimpinelli and *His2av::GFP* strain was obtained from Dr. Casanova. *ddp1^A* mutation, transgenic *ddp1^{RNAi}* lines and transgenic lines expressing DDP1-GFP and lacI-DDP1 fusions were obtained here by conventional methods. *ddp1^A* and *ddp1^{RNAi}* mutants were characterised by Western blot analyses (Figure S1) (see Supplemental Information for a detailed description).

***S. pombe* strains**

S. pombe strains used in these experiments are summarised in Table S1. Strains FY336, FY498 and FY648 are described in [30]. Strain JM1058 was obtained from Dr. Aligué. The rest of strains were constructed in this study by conventional methods.

α DDP1 antibodies

Polyclonal α DDP1 antibodies used in these experiments were raised in mice, rat and rabbit using bacterially expressed DDP1. Mouse antibodies were used for immunolocalisation experiments, while rat and rabbit antibodies were used in Western blot and immuno-gold electron microscopy analyses, respectively.

Immunolocalisation experiments

Immunolocalisation experiments with the indicated antibodies were performed in cultured S2 cells, *Drosophila* embryos, and polytene chromosomes, whole salivary glands, imaginal discs and brains obtained from third-instar larvae, and ovaries from adult females using conventional methods. When the effects of acid fixation were analysed, samples were treated with acetic acid prior to immunostaining (see Supplemental Information for a detailed description).

Immunogold electron microscopy analyses

For electron microscopy analyses, salivary glands from third instar larvae were embedded in gelatine blocks and ultrathin cryosections were incubated with affinity-purified rabbit polyclonal α DDP1 antibodies followed by incubation with protein A coupled to 10nm diameter colloidal gold particles. Electron microscopy analyses were performed at the Electron Microscopy Unit of the Barcelona Science Park (PCB) (see Supplemental Information for a detailed description).

Tandem affinity purification (TAP)

For TAP purification, cytoplasmic and nuclear extracts were obtained from stable S2-cell lines expressing DDP1-TAP or the TAP-domain alone. Extracts were, first, incubated with Dynabeads (Invitrogen) conjugated to BSA to remove unspecific interactions and, then, with Dynabeads conjugated to rabbit IgG (MP Biochemicals). Associated proteins were eluted, lyophilised and analysed by LC/MS at the Proteomics Platform of the Barcelona Science Park (PCB) (see Supplemental Information for a detailed description).

Silencing experiments

Silencing experiments in *Drosophila* were performed by crossing *ddp1^Δ/+* males to *In(1)w^{m4}* females and, for targeting experiments, *S9.2* females were crossed to *DDP1-lacI/+* males. In both cases, the eye phenotype of heterozygous *ddp1^Δ/+* and *DDP1-lacI/+* progeny were compared to that of their wild-type siblings. In *S. pombe*, silencing experiments were performed using strains bearing an *ura4+* marker inserted at the indicated silenced locus (see Table S1), and the extent of silencing of the *ura4+* marker

determined by plating serial dilutions of a freshly growing cultures in selective medium with or without FOA (see Supplemental Information for a detailed description).

RESULTS

***Drosophila* vigilin DDP1 localises to the cytoplasm all through development and in different tissues/organs of the fly**

Subcellular localisation of DDP1 was determined in cultured S2 cells and in different tissues and organs of the fly (Figures 1, S2 and S3). In S2 cells, immunostaining with α DDP1 antibodies results in strong cytoplasmic signal (Figure 1A). Similar results were obtained when subcellular localisation of DDP1 was determined in imaginal discs (Figures 1B, S2A and S2B), brains (Figure S2C) and whole salivary glands (Figure 1C) obtained from third instar larvae. Also in ovaries, DDP1 strongly accumulates in the cytoplasm of follicular cells and, to a lesser extent, of nurse cells (Figure S3).

During embryo development, DDP1 also shows cytoplasmic localisation (Figures 2, S4 and S5). In preblastoderm embryos, α DDP1 signal is heterogeneously distributed through the yolk, showing a higher accumulation in the region surrounding chromatin (Figure S4A). In syncytial blastoderm embryos, a distinct cytoplasmic localisation is observed, which is not altered during mitosis (Figure S4B-D). Cytoplasmic localisation of DDP1 is observed until cellularisation when, at cycle 14, α DDP1 reactivity is detected at the nucleus during interphase, being largely absent from the cytoplasm (Figure 2C), which is opposite to what is observed at earlier divisions, where DDP1 localises to the cytoplasm during interphase (Figure 2A and S4B). On the other hand, at metaphase, DDP1 does not localise to the condensed chromosomes but, on the contrary, it is found outside of the metaphase plate, showing a distribution that resembles the spindle (Figure 2B). Nuclear α DDP1 signal observed at cycle 14 does not significantly overlap with the heterochromatic chromocentre, which locates apical and stains intensively both with DAPI and α H3K9me2 (Figure 2D). At later developmental stages, nuclear α DDP1 reactivity decreases. So that, when at gastrula stage cells divide asynchronously, α DDP1 reactivity is constrained to mitotic domains, where cells are actively dividing (Figure S5).

Cytoplasmic localisation of DDP1 was confirmed in transgenic flies expressing DDP1-GFP constructs. In these experiments, expression of DDP1-GFP was driven by the *hsp70* promoter that, after heat-shock treatment, induces high expression levels, or by

the *ddp1* promoter, which mimics expression of endogenous DDP1 and results in lower expression levels. Subcellular localisation of DDP1-GFP was determined in different tissues and organs of the fly by direct fluorescence (Figures 1D and S6). In all cases, DDP1-GFP shows a pattern of subcellular localisation that recapitulates that determined for endogenous DDP1 by immunostaining with α DDP1 antibodies. In particular, in salivary glands, DDP1-GFP shows a distinct perinuclear/cytoplasmic localisation together with a well-defined cytoplasmic network, no DDP1-GFP being detected in the nuclear compartment (Figure 1D), which is similar to what is observed for endogenous DDP1 (Figure 1C). DDP1-GFP also localises to the cytoplasm all throughout embryo development (Figure S7) and, most remarkably, it fails to localise to the nucleus even when, at cycle 14, α DDP1 reactivity is nuclear (Figure S7C).

***Drosophila* vigilin DDP1 associates to the RER and binds ribosomes**

As shown in Figures 1C and 1D, in salivary glands, DDP1 shows a distinct perinuclear/cytoplasmic localisation, which might reflect association to RER that, in these secretory cells, is extensively developed. High-resolution immunogold electron microscopic analyses support this hypothesis, as perinuclear DDP1 lies at the cytoplasmic-side of the nuclear envelope (Figure 3A, top), which corresponds to the position of the RER, but not at the nuclear-side. As a matter of fact, quantitative analyses indicate that only the region of the RER is significantly enriched in DDP1 (Figure 3A, bottom). Moreover, DDP1 strongly co-localises with the general ER-markers calnexin (Figure 3B) and PDI (not shown), both around the nucleus and in the cytoplasmic network. On the other hand, perinuclear DDP1 shows no significant colocalisation with nuclear lamin (Figure 3C), which marks the nuclear-side of the nuclear envelope.

Next, we asked whether DDP1 binds ribosomes. For this purpose, cytoplasmic and nuclear extracts were obtained from stable S2-cell lines expressing a DDP1-TAP fusion protein. In good agreement with results shown above, DDP1-TAP was only detectable in the cytoplasmic fraction (Figure 4). Affinity purification of DDP1-TAP from the cytoplasmic fraction rendered, in addition to DDP1-TAP, several low molecular weight proteins (Figure 4), which were not detected when similar control experiments were performed from cells expressing the TAP-domain alone (not shown). LC/MS-analysis of the mixture of proteins co-purifying with DDP1-TAP resulted in the identification of several ribosomal proteins (Table 1), which were absent in mock

extracts prepared from TAP-expressing cells. Co-purification with different ribosomal proteins strongly supports binding of DDP1 to ribosomes.

DDP1 contributes only weakly to PEV

We reported earlier that a strong hypomorphic *ddp1*^{15.1} mutation is a dominant suppressor of PEV [27], suggesting a contribution of DDP1 to heterochromatin organisation and function. Results discussed above, showing that DDP1 vastly localises to the cytoplasm, prompted us to re-examine the actual contribution of DDP1 to PEV. For this purpose, a null *ddp1*^A mutation was generated by FRT-induced deletion of the complete ORF. As judged by Western-blot analysis, homozygous *ddp1*^A flies show no detectable DDP1 at the third instar larvae stage (Figure S1A). Similar to *ddp1*^{15.1} [27], *ddp1*^A shows high lethality and female escapers are sterile, showing strongly altered ovary development and morphology. To analyse the effects of *ddp1*^A on PEV, we used the classical *In(1)w^{m4}* X-chromosome inversion that brings the *white* gene in close proximity to centromeric heterochromatin, resulting in its variegated silencing. As shown in Figure 5A, a weak suppression is observed in *ddp1*^A/+ females while no effects are detected in males, which is opposite to what is observed in the case of *ddp1*^{15.1}, where a significant percentage of males (~50%) show strong suppression (Figure 5A) [27]. Similar results were obtained when transgenic lines 39C-42 and 118E-5 were used. These lines carry an *hsp70-white*⁺ reporter construct inserted at different heterochromatic regions on the fourth chromosome, resulting in its variegated expression [31-33]. Also in these cases, *ddp1*^A shows weak suppression only in females (not shown). It was also reported earlier that polytene chromosomes from homozygous *ddp1*^{15.1} flies show reduced H3K9me2 at the chromocentre [27]. *ddp1*^A shows a similar effect (Figure 5B). In these experiments, mutant *ddp1*^A salivary glands were mixed and squashed together with glands prepared from control wild-type larvae, which express an *H2Av::GFP* construct under the control of the *H2Av*-promoter and, therefore, incorporate H2Av-GFP in polytene chromosomes. In this way, mutant and control polytene chromosomes, which are identified by their staining with α GFP antibodies, are immunostained and observed under exactly the same experimental conditions. Under these conditions, 50% (N= 40) of mutant *ddp1*^A chromosomes show reduced H3K9me2 at the chromocentre when compared to control wild-type chromosomes, though only 25% show strong reduction (Figure 5B).

Results discussed above indicate that *ddp1* affects H3K9me2 at the chromocentre and PEV only weakly, suggesting that its contribution is indirect. Consistent with this hypothesis, ectopic targeting of DDP1 to a reporter construct does not induce silencing (Figure 5C). In these experiments, transgenic *S9.2* flies were used, which carry a reporter *white*-transgene containing 46 tandemly repeated binding sites for the *lacI* repressor at the regulatory region [29]. In this background, expression of fused proteins carrying the *lacI*-DNA-binding domain results in ectopic targeting to the transgenic construct, thus allowing determination of their contribution to silencing of the reporter. Actually, in *S9.2* flies, expression of HP1a-*lacI* proteins results in strong silencing of the reporter [29,34]. In this context, expression of N-terminal *lacI*-DDP1 (Figure 5C) or C-terminal DDP1-*lacI* fused proteins (not shown) does not induce silencing of the *white*-reporter gene.

In *S. pombe*, vigilin (Vgl1) shows cytoplasmic/perinuclear localisation and it does not contribute to heterochromatin-mediated gene silencing

Results reported above and elsewhere indicate that cytoplasmic localisation, binding to ribosomes and association to RER are conserved features of vigilin. Whether vigilin contribution to PEV is also conserved is unclear, as this question has not been analysed in human cells and results reported above indicate that, in *Drosophila*, DDP1 has only a weak, likely indirect, contribution to PEV. Here, in order to address this question, we have analysed vigilin contribution to heterochromatin formation in the fission yeast *S. pombe*.

In *S. pombe* vigilin (Vgl1) shows a distinct cytoplasmic/perinuclear localisation, as determined by both direct fluorescence observation of the endogenous GFP-tagged protein (Figure 6A). In addition, Vgl1 is also detected in the cytoplasm, where it shows a rather diffuse distribution. On the other hand, no significant reactivity is detected in the nucleus. This pattern of localisation is highly reminiscent of that observed in the budding yeast *S. cerevisiae*, where perinuclear localisation of Scp160p is microtubule-dependent [19] and $\Delta scp160$ cells are hypersensitive to microtubule destabilising drugs, such as benomyl [28]. In *S. pombe*, deletion of *Vgl1* also results in hypersensitivity to benomyl (not shown).

Next, we analysed the potential contribution of Vgl1 to heterochromatin-mediated gene silencing. In *S. pombe*, heterochromatin occurs at centromeres, which

consist of a non-homologous *central-core (cc)* domain flanked by homologous *otr(dg/dh)* repeats, which assemble into heterochromatin (for recent reviews see [35,36]. Homologous *imr*-repeats insulate the *central-core (cc)* domain from the flanking *otr(dg/dh)* heterochromatin domains. Reporter constructs inserted within *otr(dg/dh)* repeats are subjected to heterochromatin-mediated silencing that is dependent on both Swi6 and Crl4, which are the fission yeast homologues of HP1 and Su(var)3-9, respectively. To analyse the potential contribution of Vgl1 to centromeric silencing, strain FY648 carrying an *ura4⁺* reporter construct inserted at the *otr(dg/dh)* region on chromosome I was used. In wild-type FY648 cells, the *ura4⁺* reporter is strongly silenced, so that cells grow poorly in the absence of uracil and strongly in the presence of FOA (Figure 6B, row wt). Silencing of the *ura4⁺* reporter is relieved in *crl4Δ* (Figures 6B, row *crl4Δ*) or *swi6Δ* (not shown) mutants, which show extremely poor growth in the presence of FOA and increased growth in the absence of uracil. On the other hand, deletion of *vgl1* does not relieve silencing, as growth of *vgl1Δ* cells is not significantly affected both in the presence of FOA or absence of uracil (Figure 6B, rows *vgl1Δ*). These results indicate that Vgl1 is not required for maintenance of centromeric heterochromatin. As shown above (Figure 2C), in *Drosophila*, significant nuclear α DDP1 reactivity is observed at cycle 14 during embryo development, which is precisely when heterochromatin is fully assembled [37-39], suggesting that, rather than in maintenance, vigilin could participate in establishment of heterochromatin. Here, we have also addressed this question in *S. pombe* (Figure 6C). In these experiments, centromeric heterochromatin was first disrupted in a *crl4Δ* background and, then, the efficiency of heterochromatin establishment determined in both *vgl1Δ* and wild-type cells, by crossing to mutant *vgl1Δcrl4⁺* and wild-type *vgl1⁺crl4⁺* cells. As judged from the extent of silencing of the *ura4⁺* reporter, heterochromatin establishment occurs as efficiently in the absence as in the presence of Vgl1 (Figure 6C, compare rows *vgl1Δcrl4⁺* and *vgl1⁺crl4⁺*). On the other hand, in the absence of Crl4, heterochromatin fails to establish (Figure 6C, row *vgl1⁺crl4Δ*). Reporter genes inserted at the centromeric *cc*-domain and the *imr*-repeats are also silenced. At these regions, deletion of *vgl1* shows no silencing defects either (Figure S8).

In *S. pombe*, in addition to centromeres, heterochromatin also occurs at telomeres and the mating-type *locus*. Reporter genes inserted at these *loci* are also silenced in a Swi6/Crl4-dependent manner (Figure 6D and 6E, rows *wt* and *crl4Δ*). Again, deletion of

vgl1 does not significantly affect silencing at these *loci* (Figure 6D and 6E, rows *vgl1Δ*). Altogether, these results indicate that, in *S. pombe*, Vgl1 has no significant contribution to heterochromatin establishment and maintenance.

DISCUSSION

Vigilin is a highly conserved multi-KH-domain protein that was proposed to act both in the cytoplasm, regulating RNA metabolism, and the nucleus, regulating different aspects of chromosome structure and function. Results reported here and elsewhere [6,19,24,26,28], indicate, however, that vigilin is largely excluded from the nucleus. Here, we have shown that *Drosophila* vigilin DDP1 localises to the cytoplasm all through development, being undetectable in the nucleus (Figures 1, 2, S2, S3, S4, S5, S6 and S7). In particular, we have shown that, in whole salivary glands, DDP1 is excluded from the nucleus (Figures 1C and 1D), which is in contrast to our own previous results showing an association of DDP1 to polytene chromosomes [1]. A fundamental difference between these two sets of experiments is the type of fixation used that, for polytene spreads, involves treatment with acetic acid. As a matter of fact, upon treatment with acetic acid, significant α DDP1 reactivity is detected at the nucleus in cultured S2 cells, whole salivary glands and brain squashes (Figure 7A-C). Moreover, in whole salivary glands, distinct bands can be detected on the polytene chromosomes (Figure 7C), confirming previous results [1]. Treatment with acetic acid might facilitate antibody penetration and/or unmask nuclear DDP1 epitopes. However, contrary to this possibility, no significant DDP1-GFP is detected at the nucleus by direct fluorescence visualisation (Figures 1D and S6), when no antibodies are used. It might be argued that presence of the GFP-tag prevents nuclear localisation of DDP1-GFP. However, DDP1-GFP is functional, as it rescues lethality of *ddp1* mutants (from 8% to 70% viability) and, moreover, treatment with acetic acid alters its pattern of subcellular localisation, resulting in nuclear localisation both in whole salivary glands and brain squashes (Figure 7D and 7E). These results indicate that acidic treatment alters subcellular DDP1 localisation, disrupting cytoplasmic localisation and promoting nuclear association. Interestingly, in human HEP-2 cells, nuclear localisation of vigilin is detected only when cells are extensively dehydrated by prolonged treatment with acetone, but not when they are fixed with methanol [24]. Altogether, these observations suggest that,

depending on the experimental conditions, subcellular localisation of vigilin can be easily perturbed.

During embryo development, significant nuclear α DDP1 reactivity is detected at cycle 14 (Figure 2C) that, most interestingly, corresponds to the stage of embryo development when heterochromatin is assembled [37-39]. Several observations, however, suggest that nuclear α DDP1 reactivity detected at this stage might not reflect recognition of DDP1. On one hand, a functional DDP1-GFP fusion fails to localise to the nucleus at this stage (Figure S7C). Moreover, immunolocalisation experiments performed in null *ddp1^A* mutants indicate that, in the absence of DDP1, α DDP1 antibodies might recognise an unrelated nuclear protein(s), as significant reactivity is detected in the nucleus while no signal is detected in the cytoplasm (Figure 8A, panel *ddp1^A*). Nuclear α DDP1 reactivity observed in mutant *ddp1^A* salivary glands does not reflect residual maternal DDP1, as it is not affected by expression of a synthetic RNA-hairpin (Figure 8A, panel *ddp1^A/ddp1^{RNAi}*) that, in wild-type glands, efficiently knockdowns DDP1 through RNAi (Figure S1B). It must be noticed, however, that nuclear crossreactivity of α DDP1 antibodies is only significant in the absence of DDP1, as no such crossreaction is detected in wild-type flies (Figure 1A-C). Therefore, it is possible that, at cycle 14, when the maternal contribution is extinguished and DDP1 content is low (Figure 8B), α DDP1 antibodies would show nuclear crossreactivity.

DDP1 was proposed to contribute to heterochromatin organisation and function. At least in part, this hypothesis was based on our own previous work showing that a hypomorph *ddp1^{15.1}* mutant is a dominant suppressor of PEV [27]. Suppression by *ddp1^{15.1}* is weak in females but much stronger in males (Figure 5A) [27]. These effects, however, have not been totally confirmed using a null *ddp1^A* mutant, which shows weak suppression only in females, males showing no significant suppression at all (Figure 5A). Moreover, targeting DDP1 to an ectopic *white*-reporter fails to induce silencing (Figure 5C). These results strongly suggest that the contribution of DDP1 to PEV is indirect, strong suppression observed in *ddp1^{15.1}* males being likely the consequence of a secondary effect. Furthermore, in *S. pombe*, vigilin (Vgl1) has no significant contribution to heterochromatin formation and maintenance (Figures 6 and S8).

Our results also show that, in *Drosophila*, DDP1 associates to RER (Figure 3), which is similar to what is observed both in *S. cerevisiae* and human cells [6,19,24,28]. Here, we have also show that, in *S. pombe*, Vgl1 shows a distinct perinuclear localisation

that reflects association to RER (Figure 6A). Moreover, affinity purification of DDP1-TAP results in the identification of several ribosomal proteins (Table 1), indicating binding to ribosomes. Some of the proteins that co-purify with DDP1-TAP are present in greater than stoichiometric amounts (Figure 4), suggesting that DDP1 associates to polyribosomes. Actually, binding of vigilin to both soluble and membrane-bound polyribosomes was reported in *S. cerevisiae* and human cells [15,19-21,25].

These results indicate that cytoplasmic localisation, binding to ribosomes and association to the RER, but not contribution to heterochromatin organisation, are evolutionarily conserved features of vigilin from yeasts to humans. On the other hand, results reported here and elsewhere [6,19,24,26,28], provide no solid experimental evidence in favour of a nuclear localisation of vigilin in *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Drosophila* and human cells. Moreover, though vigilin contains putative nuclear localisation (NLS) and nuclear export (NES) signals, they are not conserved and appear not to be functional since, in *S. cerevisiae*, their mutation does not affect vigilin localisation or function [40]. Although the possibility that a minor, currently undetectable, fraction of vigilin localises to the nucleus cannot be fully excluded, all these observations favour a model by which vigilin acts in the cytoplasm and affects nuclear functions only indirectly. Actually, increasing evidence indicates that, through the regulation of translation of specific mRNAs, vigilin indirectly regulates multiple cellular processes, including various nuclear functions. In particular, in *S. cerevisiae*, Scp160p binds numerous mRNAs [16,22] and associates with SESA, a complex involved in mRNA translation that plays a role in centrosome duplication through the regulation of *POM34* mRNA translation [23]. A contribution to centrosome functionality likely accounts for the chromosome segregation defects of *scp160Δ* mutants. This contribution might be conserved in higher eukaryotes, as DDP1 rescues the ploidy defects of *scp160Δ* cells [1]. Similarly, other nuclear defects of *scp160Δ* mutants, such as defective telomeric silencing, might be the consequence of altered translation of mRNAs encoding proteins involved in these processes. As a matter of fact, Scp160p binds mRNAs encoding for factors involved in the regulation of telomeric chromatin, such as the histone deacetylase Rpd3p and Dhh1p, a putative RNA-helicase required for Rap1p localisation to telomeres [16,22]. The contribution of vigilin to mRNA translation is conserved since, in *Drosophila*, DDP1 forms part of a complex involved in translational enhancement [41], interacts with various ribonucleoproteins [42] and, as shown here, binds ribosomes. In addition, in

human cells, vigilin also binds ribosomes and interacts with the elongation factor eIF-1a [12,13,25].

ACKNOWLEDGEMENTS

We are most thankful to Dr. R.C. Allshire for hosting F-X.M. in his lab to perform initial experiments on the characterisation of *S. pombe* vigilin, Vgl1. We are also thankful to Dr. R. Aligué, Dr. J. Casanova and Dr. S. Pimpinelli for materials, to Dr. L. Espinàs, Dr. J. Font-Burgada and Dr. C. Bonet for helpful advices and discussions, and to Dr. A. Cortés for critical reading of the manuscript. The technical contribution of Mrs. E. Fuentes is also acknowledged. This work was supported by grants from MICINN (BFU2006-1627, CSD2006-49 and BFU2009-07111) and the Generalitat de Catalunya (SGR2005-678 and SGR2009-1023). M.B. acknowledges receipt of a PhD fellowship from MEC. F-X.M. acknowledges receipt of an EMBO short-term fellowship and an I3P postdoctoral contract from CSIC. D.H. acknowledges receipt of an I3P postdoctoral contract from CSIC and a “Ramón y Cajal” postdoctoral contract from MEC. This work was carried out within the framework of the “Centre de Referència en Biotecnologia” of the Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

1. Cortés, A., Huertas, D., Fanti, L., Pimpinelli, S., Marsellach, F.X., Piña, B. and Azorín, F. (1999) DDP1, a single-stranded nucleic acid-binding protein of *Drosophila*, associates with pericentric heterochromatin and is functionally homologous to the yeast Scp160p, which is involved in the control of cell ploidy. *EMBO J.*, **18**, 3820-3833.
2. Dodson, R.E. and Shapiro, D.J. (1997) Vigilin, a ubiquitous protein with 14 K homology domains, is the estrogen-inducible vitellogenin mRNA 3'-untranslated region-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12249-12252.
3. Plenz, G., Kügler, S., Schnittger, S., Rieder, H., Fonatsch, C. and Müller, P.K. (1994) The human vigilin gene: identification, chromosomal localization and expression pattern. *Hum. Genet.*, **93**, 575-582.
4. Schmidt, C., Henkel, B., Pöschl, E., Zorbas, H., Purschke, W.G., Gloe, T.R. and Müller, P.K. (1992) Complete cDNA sequence of chicken vigilin, a novel protein with amplified and evolutionary conserved domains. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 625-634.

5. Weber, V., Wernitzing, A., Hager, G., Harata, M., Frank, P. and Wintersberger, U. (1997) Purification and nucleic-acid-binding properties of a *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in the control of ploidy. *Eur. J. Biochem.*, **249**, 309-317.
6. Wintersberger, U., Kühne, C. and Karwan, A. (1995) Scp160p, a new yeast protein associated with the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum, is necessary for maintenance of exact ploidy. *Yeast*, **11**, 929-944.
7. Cortés, A. and Azorín, F. (2000) DDP1, a heterochromatin associated multi KH-domain protein of *Drosophila*, interacts specifically with centromeric satellite DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3860-3869.
8. Dejgaard, K. and Leffers, H. (1996) Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains. Different properties of different domains. *Eur J. Biochem.*, **241**, 425-431.
9. Kanamori, H., Dodson, R.E. and Shapiro, D.J. (1998) In vitro genetic analysis of the RNA binding site of vigilin, a multi-KH-domain protein. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3991-4003.
10. Cunningham, K.S., Dodson, R.E., Nagel, M.A., Shapiro, D.J. and Schoenberg, D.R. (2000) Vigilin binding selectively inhibits cleavage of the vitellogenin mRNA 3'-untranslated region by the mRNA endonuclease polysomal ribonuclease 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12498-12502.
11. Goolsby, K.M. and Shapiro, D.J. (2003) RNAi-mediated depletion of the 15 KH domain protein, vigilin, induces death of dividing and non-dividing human cells but does not initially inhibit protein synthesis. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 5644-5653.
12. Kruse, C., Grünweller, A., Notbohm, H., Kügler, S., Purschke, W.G. and Müller, P.K. (1996) Evidence for a novel cytoplasmic tRNA-protein complex containing the KH-multidomain protein vigilin. *Biochem J.*, **320**, 247-252.
13. Kruse, C., Grünweller, A., Willkomm, D.K., Pfeiffer, T., Hartmann, R.K. and Müller, P.K. (1998) tRNA is entrapped in similar, but distinct, nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein complexes, both of which contain vigilin and elongation factor 1 α . *Biochem J.*, **329**, 615-621.
14. Kruse, C., Willkomm, D.K., Grünweller, A., Vollbrandt, T., Sommer, S., Busch, S., Pfeiffer, T., Brinkmann, J., Hartmann, R.K. and Müller, P.K. (2000) Export and transport of tRNA are coupled to a multi-protein complex. *Biochem J.*, **346**, 107-115.

15. Kruse, C., Willkomm, D., Gebken, J., Schuh, A., Stossberg, H., Vollbrandt, T. and Müller, P.K. (2003) The multi-KH protein vigilin associates with free and membrane-bound ribosomes. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 2219-2227.
16. Li, A.-M., Watson, A. and Fridovich-Keil, J.L. (2003) Scp160p associates with specific mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1830-1837.
17. Mendelsohn, B.A., Li, A.-M., Vargas, C.A., Riehm, K., Watson, A. and Fridovich-Keil, J.L. (2003) Genetic and biochemical interactions between *SCP160* and *EAP1* in yeast. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 5838-5847.
18. Wang, Q., Zhang, Z., Blackwell, K. and Carmichael, G.G. (2005) Vigilins bind to promiscuously A-to-I-edited RNAs and are involved in the formation of heterochromatin. *Curr. Biol.*, **15**, 384-391.
19. Frey, S., Pool, M. and Seedorf, M. (2001) Scp160p, an RNA-binding, polysome-associated protein, localizes to the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* in a microtubule-dependent manner. *J.Biol.Chem.*, **276**, 15905-15912.
20. Lang, B., D., and Fridovich-Keil, J.L. (2000) Scp160p, a multiple KH-domain protein, is a component of mRNP complexes in yeast. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1576-1584.
21. Lang, B.D., Li, A.-M., Black-Brewster, H.D. and Fridovich-Keil, J.L. (2001) The brefeldin A resistance protein Bfr1p is a component of polyribosome-associated mRNP complexes in yeast. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2567-2574.
22. Hogan, D.J., Riordan, D.P., Gerber, A.P., Herschlag, D. and Brown, P.O. (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol.*, **6**, e255.
23. Sezen, B., Seedorf, M. and Schiebel, E. (2009) The SESA network links duplication of yeast centrosome with the protein translation machinery. *Genes Dev.*, **23**, 1559-1570.
24. Kügler, S., Grünweller, A., Probst, C., Klinger, M., Müller, P.K. and Kruse, C. (1996) Vigilin contains a functional nuclear localisation sequence and is present in both the cytoplasm and the nucleus. *FEBS Lett.*, **382**, 330-334.
25. Vollbrandt, T., Willkomm, D.K., Stossberg, H. and Kruse, C. (2003) Vigilin is co-localized with 80S ribosomes and binds to the ribosomal complex through its C-terminal domain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 1306-1318.

26. Zhou, J., Wang, Q., Chen, L.-L. and Carmichael, G.G. (2008) On the mechanism of induction of heterochromatin by the RNA-binding protein vigilin. *RNA*, **14** 1773-1781.
27. Huertas, D., Cortés, A., Casanova, J. and Azorín, F. (2004) *Drosophila* DDP1, a multi-KH-domain protein, contributes to centromeric silencing and chromosome segregation. *Curr. Biol.*, **14**, 1611-1620.
28. Marsellach, F.X., Huertas, D. and Azorín, F. (2006) The multi-KH-domain protein of *Saccharomyces cerevisiae* Scp160p contributes to the regulation of telomeric silencing. *J. Biol. Chem.*, **281**, 18227-18235.
29. Li, Y., Danzer, J.R., Alvarez, P., Belmont, A.S. and Wallrath, L.L. (2003) Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the *Drosophila* genome. *Development*, **130**, 1817-1824.
30. Nakagawa, H., Lee, J.-K., Hurwitz, J., Allshire, R.C., Nakayama, J.-I., Grewal, S.I.S., Tanaka, K. and Murakami, Y. (2002) Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications. *Genes Dev.*, **16**, 1766-1778.
31. Cryderman, D.E., Morris, E.J., Biessmann, H., Elgin, S.C.R. and Wallrath, L.L. (1999) Silencing at *Drosophila* telomeres: nuclear organization and chromatin structure play critical roles. *EMBO J.*, **18**, 3724-3733.
32. Sun, F.-L., Cuaycong, M.H., Craig, C.A., Wallrath, L.L. and Elgin, S.C.R. (2000) The fourth chromosome of *Drosophila melanogaster*: interspersed euchromatic and heterochromatic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5340-5345.
33. Wallrath, L.L. and Elgin, S.C.R. (1995) Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev.*, **9**, 1263-1277.
34. Font-Burgada, J., Rossell, D., Auer, H. and Azorin, F. (2008) *Drosophila* HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC (ROW) to regulate gene expression. *Genes Dev.*, **22**, 3007-3023.
35. Allshire, R.C. and Karpen, G.H. (2008) Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nature Rev. Genet.*, **9**, 923-937.
36. Torras-Llort, M., Moreno-Moreno, O. and Azorín, F. (2009) Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *EMBO J.*, **28**, 2337-2348.

37. Edgar, B.A., Kiehle, C.R. and Schubiger, G. (1986) Cell cycle control by the nucleocytoplasmic ratio in early *Drosophila* development. *Cell*, **44**, 365-372.
38. Kellum, R., Raff, J.W. and Alberts, B.M. (1995) Heterochromatin protein 1 distribution during development and during cell cycle in *Drosophila* embryos. *J. Cell Sci.*, **108**, 489-496.
39. Mahowald, A.P. and Hardy, P.A. (1985) Genetics of *Drosophila* development. *Annu. Rev. Genet.*, **19**, 149-177.
40. Brykailo, M.A., McLane, L.M., Fridovich-Keil, J. and Corbett, A.H. (2007) Analysis of a predicted nuclear localization signal: implications for the intracellular localization and function of the *Saccharomyces cerevisiae* RNA-binding protein Scp160. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6862-6869.
41. Nelson, M.R., Luo, H., Vari, H.K., Cox, B.J., Simmonds, A.J., Krause, H.M., Lipshitz, H.D. and Smibert, C.A. (2007) A multiprotein complex that mediates translational enhancement in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, **282**, 34031-34038.
42. Piacentini, L., Fanti, L., Negri, R., Del Vescovo, V., Fatica, A., Altieri, F. and Pimpinelli, S. (2009) Heterochromatin protein 1 (HP1a) positively regulates euchromatic gene expression through RNA transcript association and interaction with hnRNPs in *Drosophila*. *PLoS Genet.*, **5**, e1000670.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.- *Drosophila* vigilin DDP1 localises to the cytoplasm. (A-C) The pattern of subcellular localisation of DDP1 was determined in cultured S2 cells (A), wing imaginal discs (B) and salivary glands (C) by immunostaining with mouse polyclonal α DDP1 antibodies (in red). (D) The pattern of subcellular localisation of DDP1-GFP, expressed under the control of the *hsp70*-promoter (left) or the own *ddp1*-promoter (right) was determined in whole salivary glands by direct fluorescence visualisation (in green). In panel B, enlarged images are shown on the right for easier visualisation. DNA was stained with DAPI (in blue). See also Figures S2, S3 and S6 in supplemental information for determination of the patterns of subcellular localisation of DDP1 and DDP1-GFP in other tissues and organs of the fly.

Figure 2.- *Drosophila* vigilin DDP1 localises to the cytoplasm during embryo development. Subcellular localisation of DDP1 was determined by immunostaining with mouse polyclonal α DDP1 antibodies (in red) at different stages of embryo development during cellularisation: (A) interphase of cycle 13, (B) metaphase of cycle 14 and (C) interphase of cycle 14. Enlarged images are shown on the right of each panel for easier visualisation. Panel D, shows a high-resolution analysis of the nuclear α DDP1 reactivity (in green) detected at interphase of cycle 14, where the position of the heterochromatic chromocentre (arrows) is determined by immunostaining with α H3K9me2 antibodies (in red). DNA was stained with DAPI (in blue). See also Figures S4 and S5 in supplemental material for determination of the patterns of subcellular localisation of DDP1 at earlier/later developmental stages and Figure S7 for determination of the pattern of subcellular localisation of DDP1-GFP during embryo development.

Figure 3.- DDP1 associates to the RER. (A) High-resolution immunogold electron microscopy analyses of whole salivary glands showing that perinuclear DDP1 lies at the cytoplasmic-side of the nuclear envelope (NE), which corresponds to the position of the rough endoplasmic reticulum (RER). Quantitative analysis of the results is presented at the bottom, where the average density of gold-particles (particles/mm²) at the region of the RER, the rest of the cytoplasm and the nucleus is shown. In (B) and (C), the patterns of subcellular localisation of DDP1-GFP and calnexin B, a general ER-marker, and

nuclear lamin, which marks the nuclear side of the NE, are determined in whole salivary glands by direct fluorescence (in green) and immunostaining with α calnexin and α lamin antibodies (in red), respectively. Enlarged images are shown at the bottom for easier visualisation. Arrows indicate perinuclear signals. Yellow arrows indicate co-localisation.

Figure 4.- DDP1 binds ribosomes. TAP-affinity purification was performed from cells expressing TAP-DDP1 and associated proteins were analysed by SDS-PAGE. Purification was performed from both cytoplasmic (lane CYT) and nuclear (NU) extracts. Bands corresponding to DDP1-TAP are indicated. Bands labelled with an asterisk correspond to IgGs. Lanes M, correspond to molecular weight markers.

Figure 5.- The contribution of DDP1 to PEV is weak and likely indirect. (A) The effect on the PEV of *In(1)w^{m4}* is presented for null *ddp1^A* (top) and hypomorphic *ddp1^{15.1}* mutations (middle). The eye phenotypes of both male and female siblings of the indicated genotypes are shown. The effect of *Su(var)2-5⁰⁵* (HP1) mutation is also presented for comparison (bottom). (B) Immunostaining with α H3K9me2 antibodies (in red) of polytene chromosomes from homozygous *ddp1^A* mutant flies (*ddp1^A*) and control wild-type flies (*wt*). Control polytene chromosomes express an *H2Av::GFP* construct and are recognised by immunostaining with α GFP antibodies (see Materials and Methods for details). DNA was stained with DAPI. Arrows indicate the position of the chromocentre. (C) The eye phenotype of *S9.2* flies, which carry a reporter *white*-transgene containing multiple lacI-binding sites at the regulatory region, is presented for both male and female flies expressing a lacI-DDP1 fused proteins (+) and siblings expressing no fused protein (-). Expression was induced by heat-shock treatment.

Figure 6.- *S. pombe* vigilin Vgl1 shows perinuclear/cytoplasmic localisation and it does not contribute to heterochromatin-mediated gene silencing. (A) The pattern of subcellular localisation of tagged Vgl1-GFP is determined by direct fluorescence visualisation. (B) The effect of deleting *vgl1* on heterochromatin mediated silencing is determined in FY648 cells, which carry a *ura4⁺* reporter inserted at the centromeric *otr(dg/dh)* region of chromosome I. (C) The effect of deleting *vgl1* on heterochromatin establishment is determined in FY648 cells. Heterochromatin was, first, disrupted in

crl4Δ cells and, then, the efficiency of heterochromatin establishment determined in *vgl1Δcrl4⁺*, *vgl1⁺crl4⁺* and *vgl1⁺crl4Δ* cells. (D-E) The effects of deleting *vgl1* on heterochromatin mediated silencing at telomeres (D) and the mating-type *locus* (E) are determined in FY1868 and FY597 cells, which carry an *ura4⁺* reporter inserted at the left telomere on chromosome 2 or at the *mat3*-region of the mating-type *locus*, respectively. Exponentially growing cells of the indicated genotypes were plated as 10-fold serial dilutions (lanes 1-5/6) onto selective media with (panels EMM) or without uracil (panels -URA), or in the presence of FOA (+ FOA). The results obtained with two independent *vgl1Δ* isolates are presented. See also Figure S8 in supplemental material for the effects of deleting *vgl1* on silencing at the centromeric *cc*-domain and the *imr*-region.

Figure 7.- Acidic treatment perturbs DDP1 localisation. Subcellular localisation of endogenous DDP1 (A-C) and tagged DDP1-GFP (D and E), was determined in cultured S2 cells (A), brain squashes (B and E) and whole salivary glands (C and D) after treatment with acetic acid, as described under Materials and Methods. DDP1 localisation was analysed by immunostaining with mouse polyclonal α DDP1 antibodies (A-C). DDP1-GFP localisation was determined by direct fluorescence visualisation (D) and immunostaining with α GFP antibodies (E). DNA was stained with DAPI.

Figure 8.- In the absence of DDP1, α DDP1 antibodies crossreact with an unrelated nuclear protein(s). (A) Salivary glands from homozygous *ddp1^Δ* larvae show significant nuclear α DDP1 reactivity (left) that is not affected in homozygous *ddp1^Δ; ddp1^{RNAi}* glands (right), which express a synthetic RNA-hairpin against DDP1 under the control of the *actin5C-Gal4* driver that efficiently knock-downs endogenous DDP1 in control wild-type flies (see Figure S1B). (B) DDP1 levels were determined by Western-blot using rat polyclonal α DDP1 antibodies in extracts obtained from embryos collected at increasing times: 0-2h (lane 1); 2-4h (lane 2) and 4-6h (lane 3). Cycle 14 corresponds to 2-4h blastoderm embryos (lane 2). The signal obtained with α Actin antibodies is used as loading control.

FIGURES

Figure 1

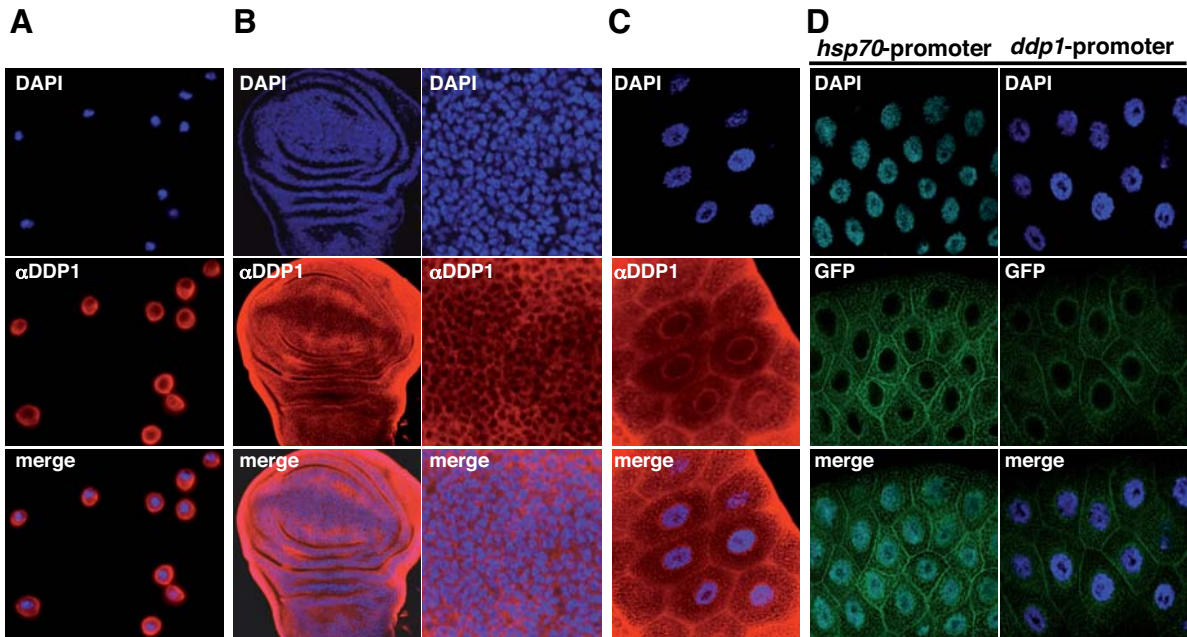


Figure 2

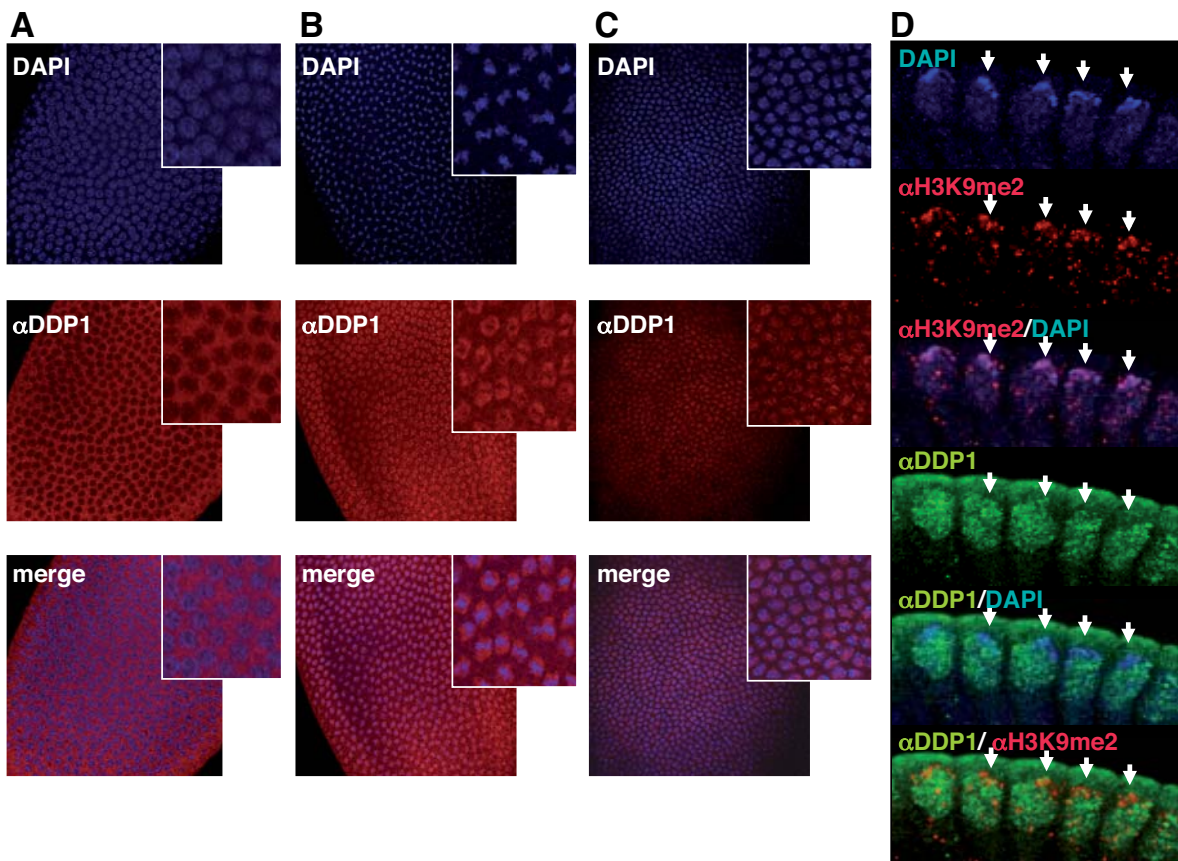


Figure 3

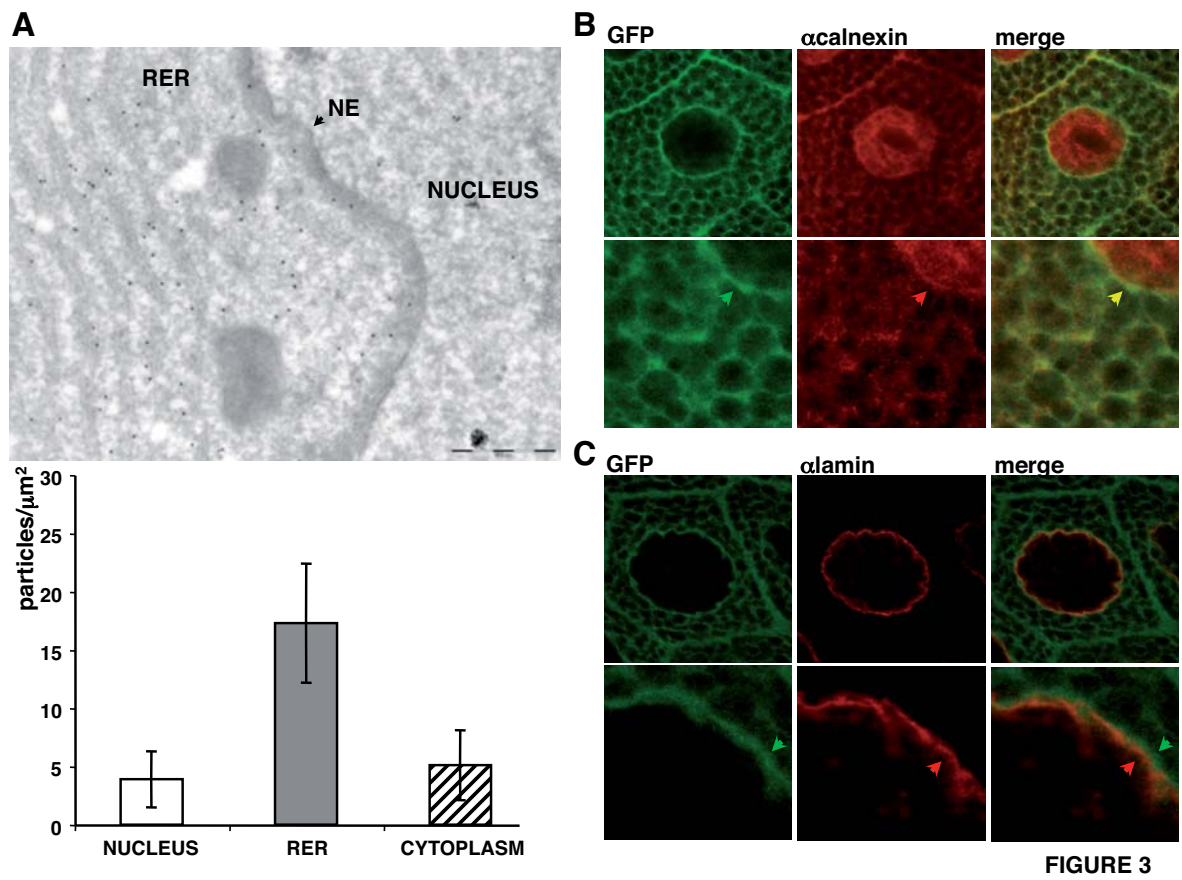


Figure 4

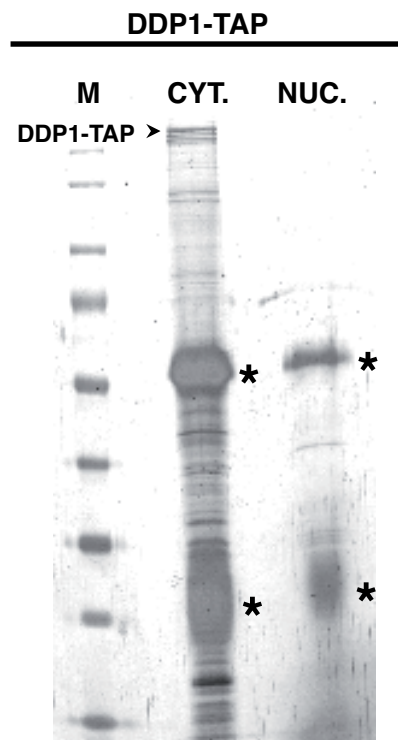


Figure 5

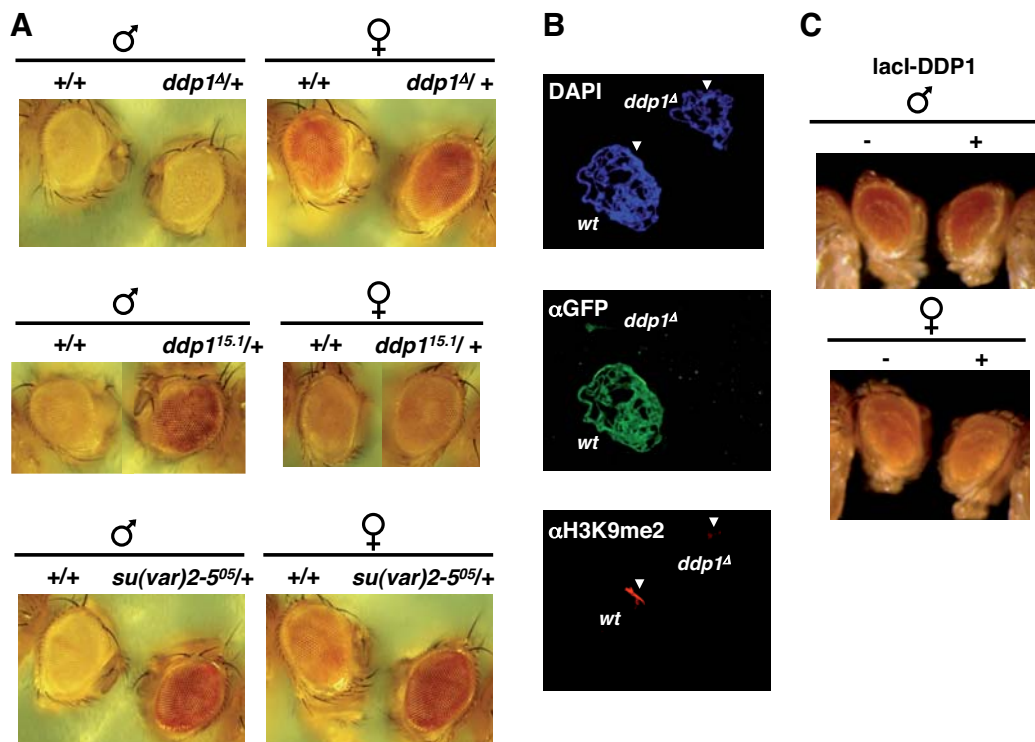


Figure 6

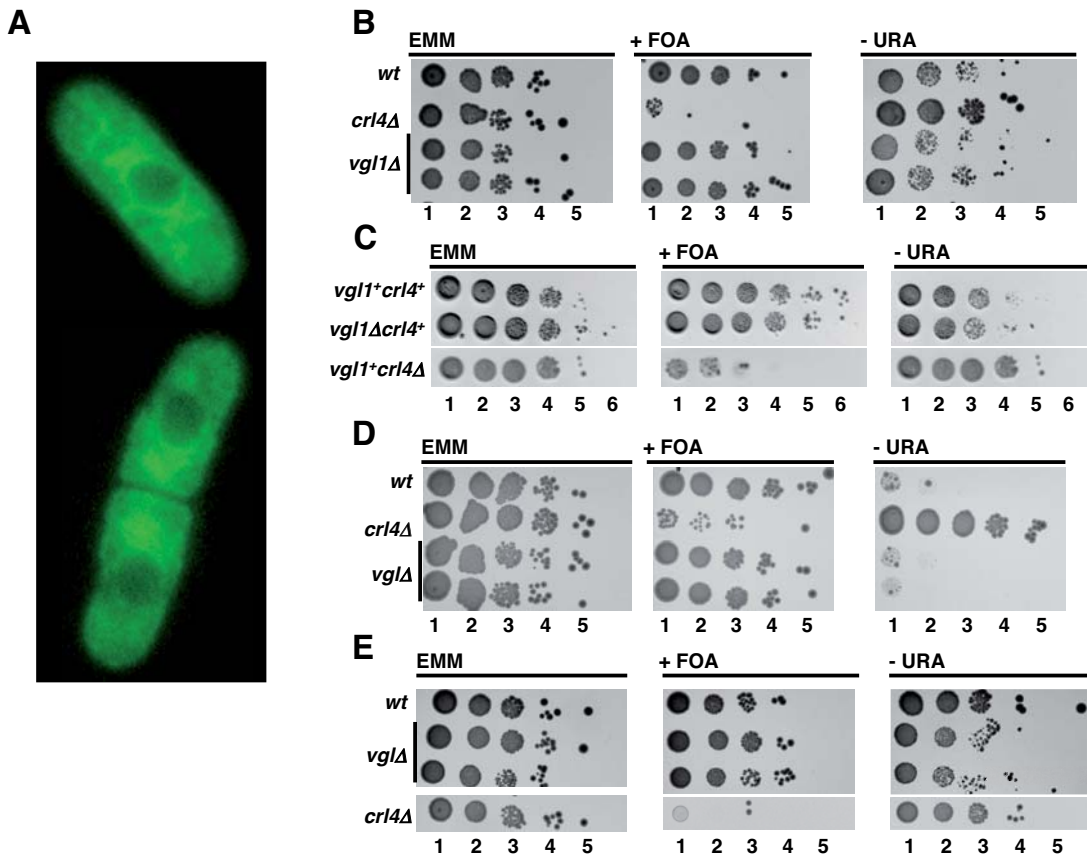


Figure 7

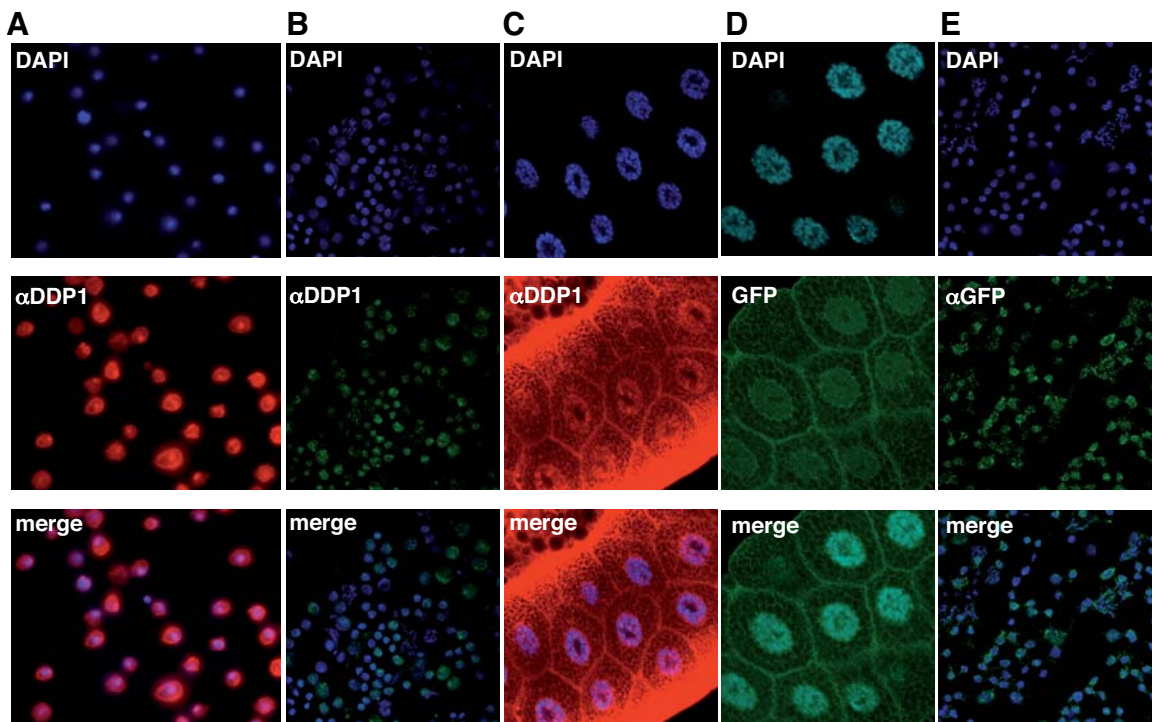


Figure 8

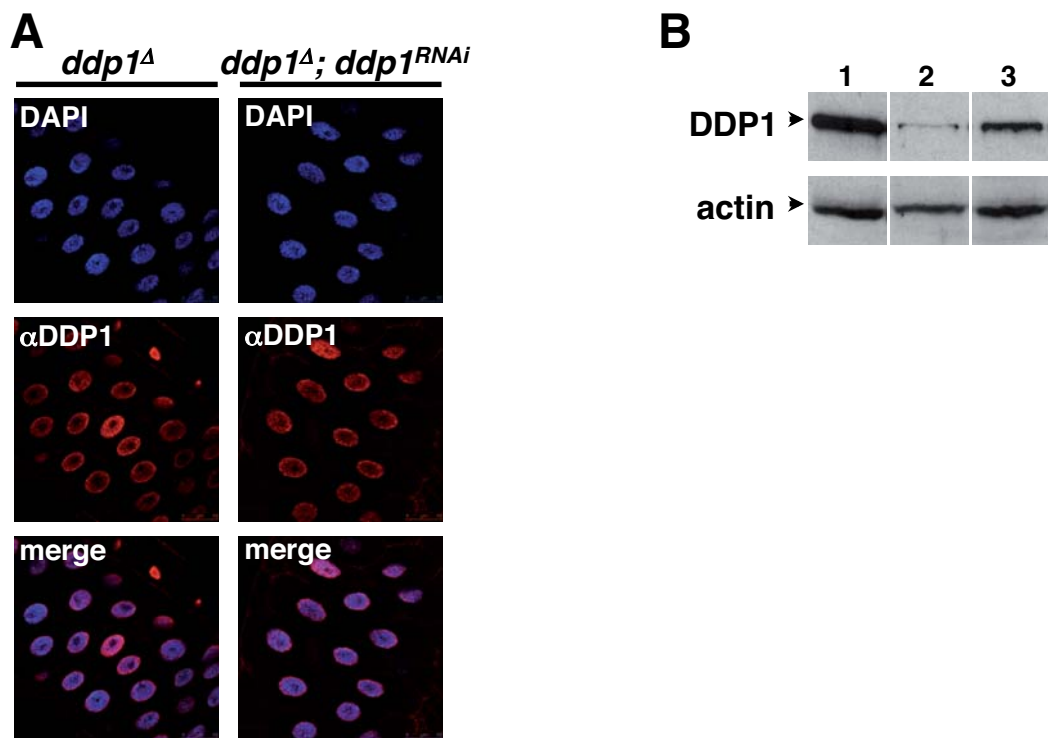


Table 1

TABLE 1.- LC/MS-analysis of the mixture of proteins co-purifying with DDP1-TAP
 The nine best Mascot Search scores are presented. Sequence coverage corresponding to the identified peptides is indicated

Score	Protein	Coverage	Peptides
100	Ribosomal protein L23a	16%	K.EAAPSAAKPAAAAPK.K K.KEAAPSAAKPAAAAPK.K R.DYDALDIANKIGII.- K.KIEDNNTLVFLTHLR.A
70	Ribosomal protein L24	11%	R.AIVGASLAEILAKR.N
62	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	2%	K.IAELDTSQWPLLLK.N
51	Ribosomal protein S6	3%	R.LITPVVLQR.K
47	Ribosomal protein L12	9%	K.HSGNIGFEDILAIAR.V
44	Ribosomal protein S25	11%	K.QVVQHHSQVIYTR.A
39	Ribosomal protein S8	7%	K.YGKVEQALEDQFTSGR.I
38	Ribosomal protein L6	8%	R.FVPNEQR.K K.YLQNMFALHSSQYPHR.M
33	DDP1	3%	K.ILMGFSTQASR.Q K.SVEINAAHWIHK.Y R.QVTITIPQENTDIVK.L

LEGENDS TO SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1.- Characterisation of *ddp1^D* and *ddp1^{RNAi}* mutants. Protein extracts were obtained from a mixture of salivary glands, brains and imaginal discs of: (A) homozygous *ddp1^D* larvae and (B) *ddp1^{RNAi}; actin5C-Gal4* larvae, which express a synthetic RNA-hairpin against DDP1 under the control of the *actin5C-Gal4* driver. DDP1 levels were determined by Western-blot using rat polyclonal aDDP1 antibodies. DDP1 levels of homozygous *ddp1^{15.1}* mutant larvae are also presented for comparison. In A, increasing amounts of extract are analysed (lanes 1-3) and the signal obtained with aActin antibodies is used as loading control. In B, a single amount of extract is analysed and the signal obtained with aHP1 antibodies is used as loading control.

Figure S2.- The patterns of subcellular localisation of DDP1 in halter (A) and leg imaginal discs (B), and brains (C) obtained from third instar larvae are shown. Enlarged images are shown on the right for easier visualisation. Samples were immunostained with polyclonal mouse aDDP1 antibodies (in red). DNA was stained with DAPI (in blue).

Figure S3.- The patterns of subcellular localisation of DDP1 in ovaries of adult females are shown. (A) and (B) correspond to egg chambers at different stages of development. In each panel, follicular cells are shown on the left and nurse cells on the right. Samples were immunostained with mouse polyclonal aDDP1 antibodies (in red). DNA was stained with DAPI (in blue).

Figure S4.- The patterns of subcellular localisation of DDP1 are presented in preblastoderm (A) and in syncytial blastoderm embryos at different stages of mitosis: interphase (B), metaphase (C) and late anaphase (D). Samples were immunostained with mouse polyclonal aDDP1 antibodies (in red). DNA was stained with DAPI (in blue).

Figure S5.- The patterns of subcellular localisation of DDP1 are presented at gastrula stage. Samples were immunostained with mouse polyclonal aDDP1 antibodies (in red). DNA was stained with DAPI (in blue). Circles indicate mitotic domains.

Figure S6.- The patterns of localisation of DDP1-GFP expressed under the control of the *ddp1*-promoter are presented in: (A) wing imaginal discs from third instar larvae; (B) whole brains from third instar larvae, and (C) ovaries from adult females. In A, enlarged images are shown on the right for easier visualisation. In C, follicular cells are shown on the left and nurse cells on the right. DNA was stained with DAPI (in blue).

Figure S7.- The patterns of localisation of DDP1-GFP, expressed under the control of the *ddp1*-promoter, are presented at different stages of embryo development: (A) syncytial blastoderm (cycle 11); (B) at cycle 13 during cellularisation at metaphase (left) and interphase (right), and (C) at cycle 14 at interphase. In A and B, DDP1-GFP localisation was determined by immunostaining with aGFP antibodies (in red). In C, DDP1-GFP localisation was determined by direct fluorescence visualisation (in green), which detects DDP1-GFP but not endogenous DDP1, and immunostaining with mouse polyclonal aDDP1 antibodies (in red), which also detects endogenous DDP1. Note that in C, DDP1-GFP exclusively localises to the cytoplasm but significant aDDP1 reactivity is also detected at the nucleus (see also Figure 2C). DNA was stained with DAPI (in blue).

Figure S8.- *S. pombe* vigilin Vgl1 does not contribute to silencing at the centromeric *cc*-domain (A) and *imr*-region (B). On top of each panel, the effect of deleting *vgl1* on heterochromatin-mediated silencing is determined in FY336 and FY498 cells, which carry an *ura4⁺* reporter inserted at the centromeric *cc*-domain and the *imr*-region of chromosome I, respectively. Bottom panels show the effect of deleting *vgl1* on heterochromatin establishment (see Materials and Methods, and legend of Figure 7, for details). Exponentially growing cells were plated as 10-fold serial dilutions (lanes 1-5/6) onto selective media with (panels EMM) or without uracil (panels -URA), or in the presence of FOA (+ FOA). Top panels show results obtained with two independent *vgl1D* isolates and the effect of a *crl4D* deletion is also presented for comparison.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1

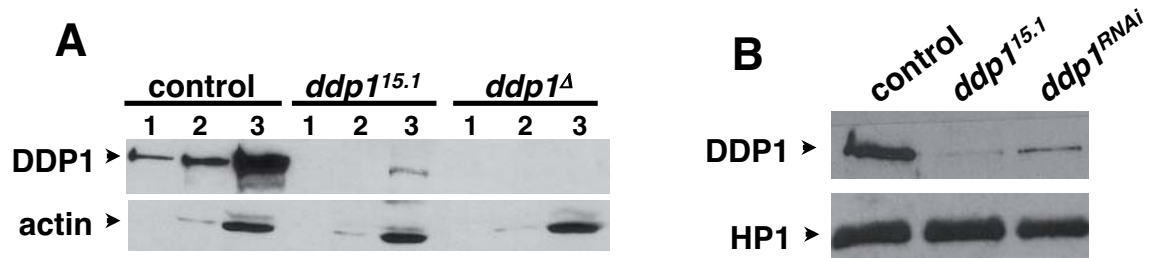


Figure S2

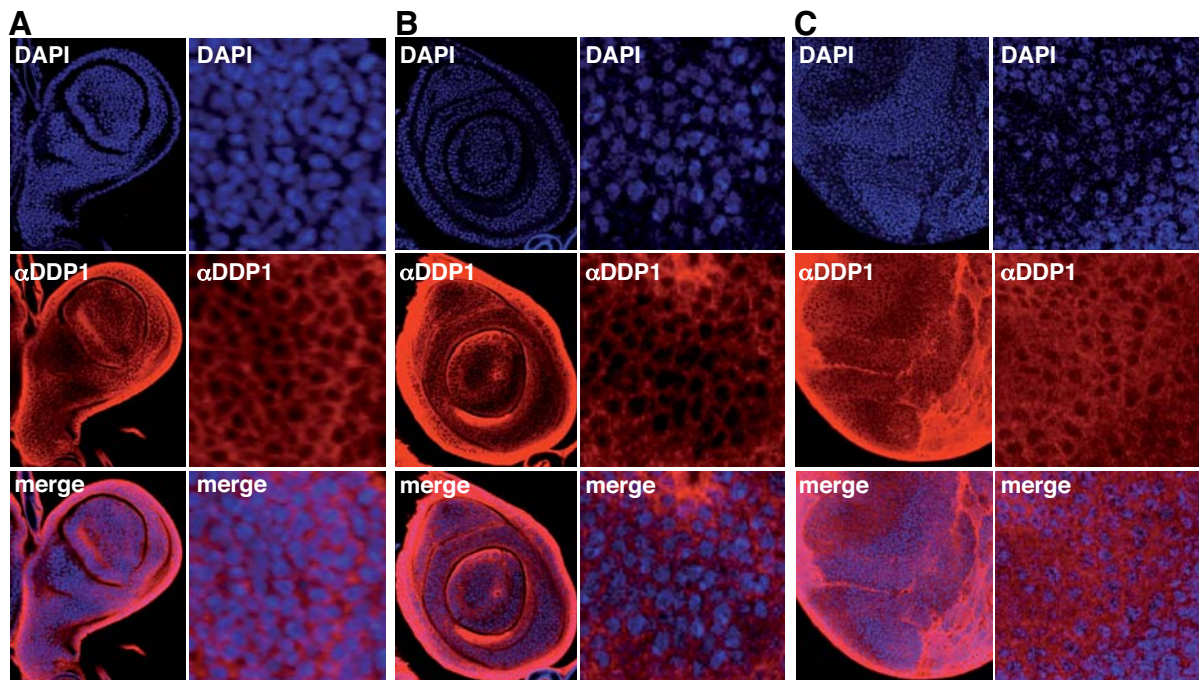


Figure S3

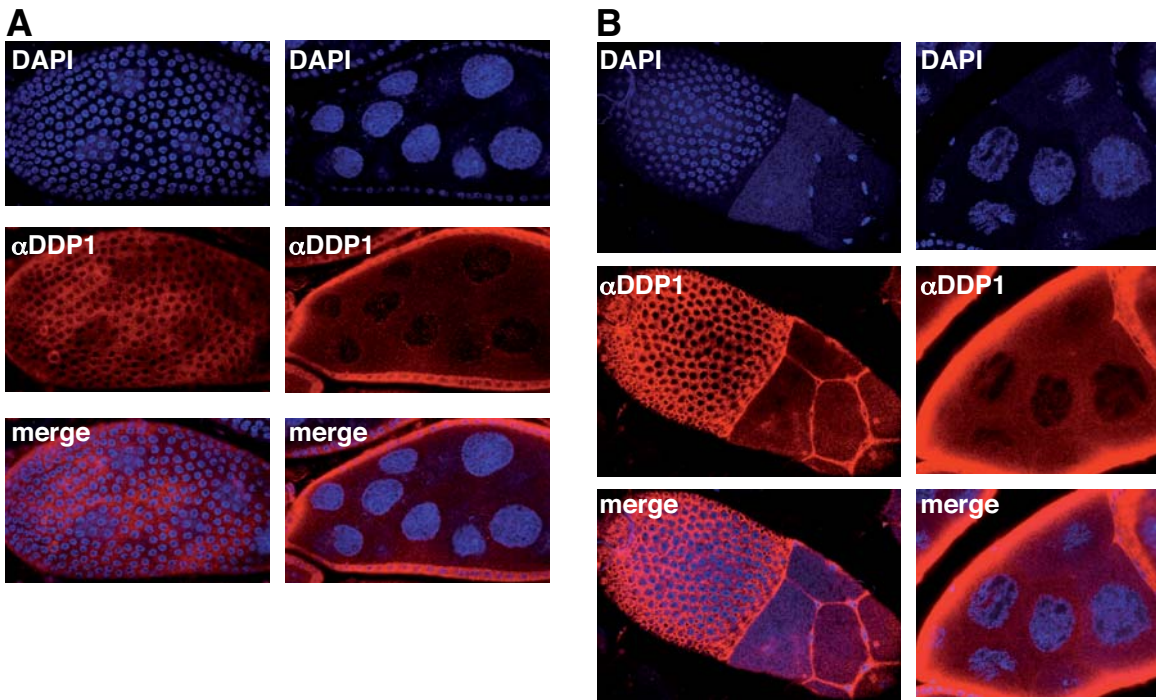


Figure S4

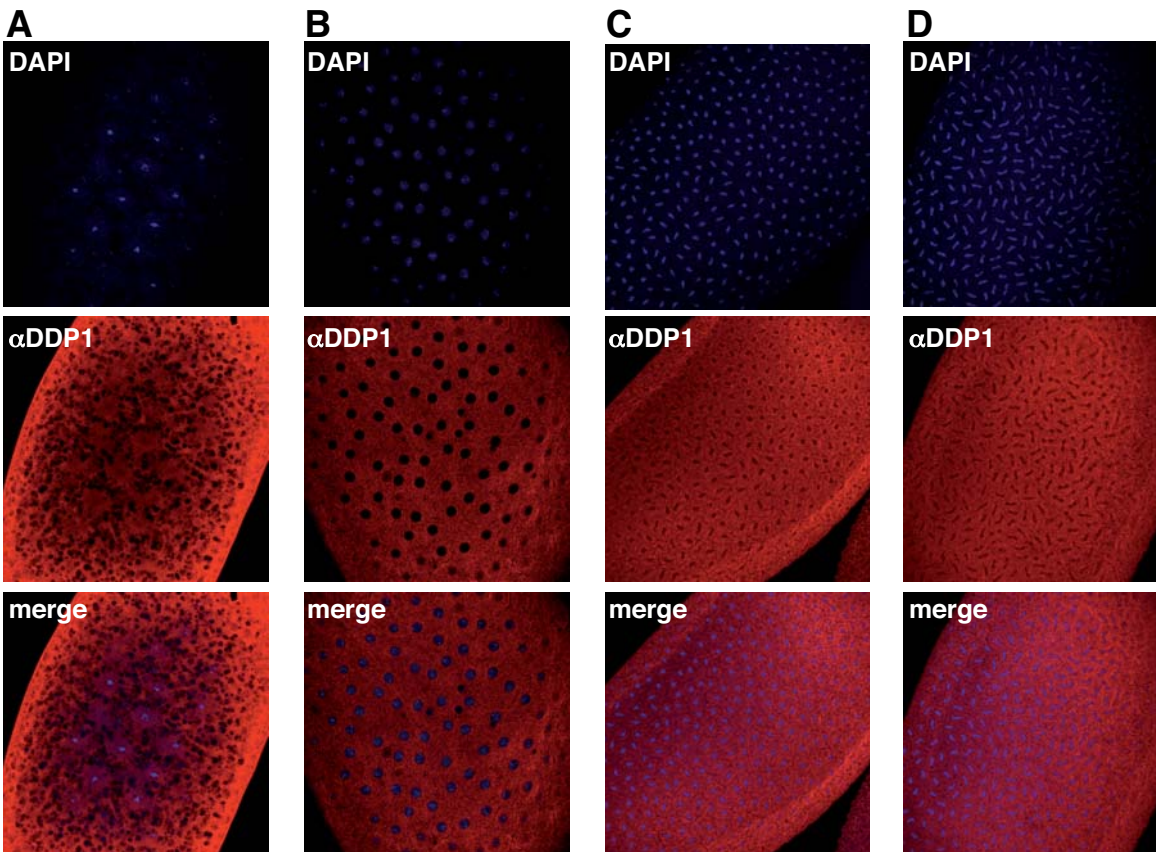


Figure S5

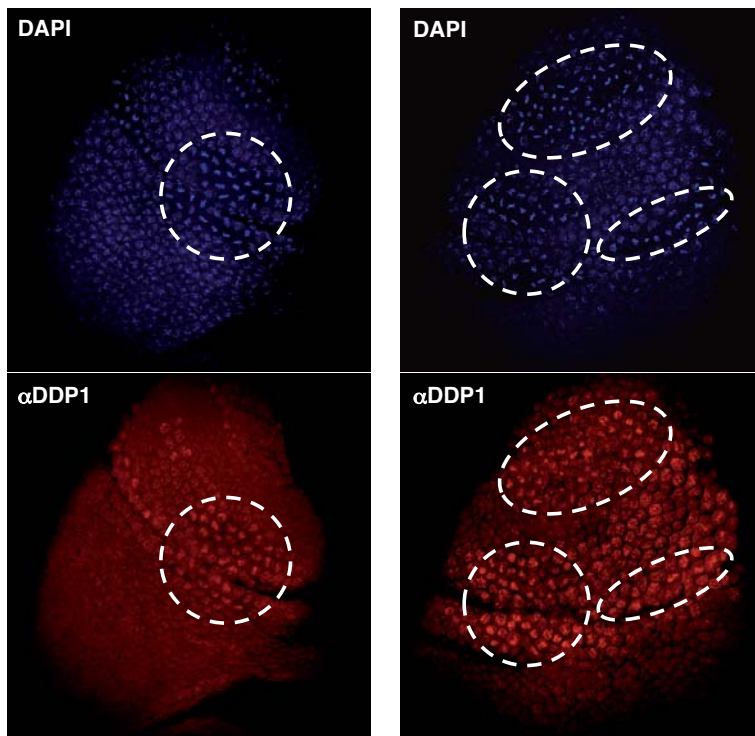


Figure S6

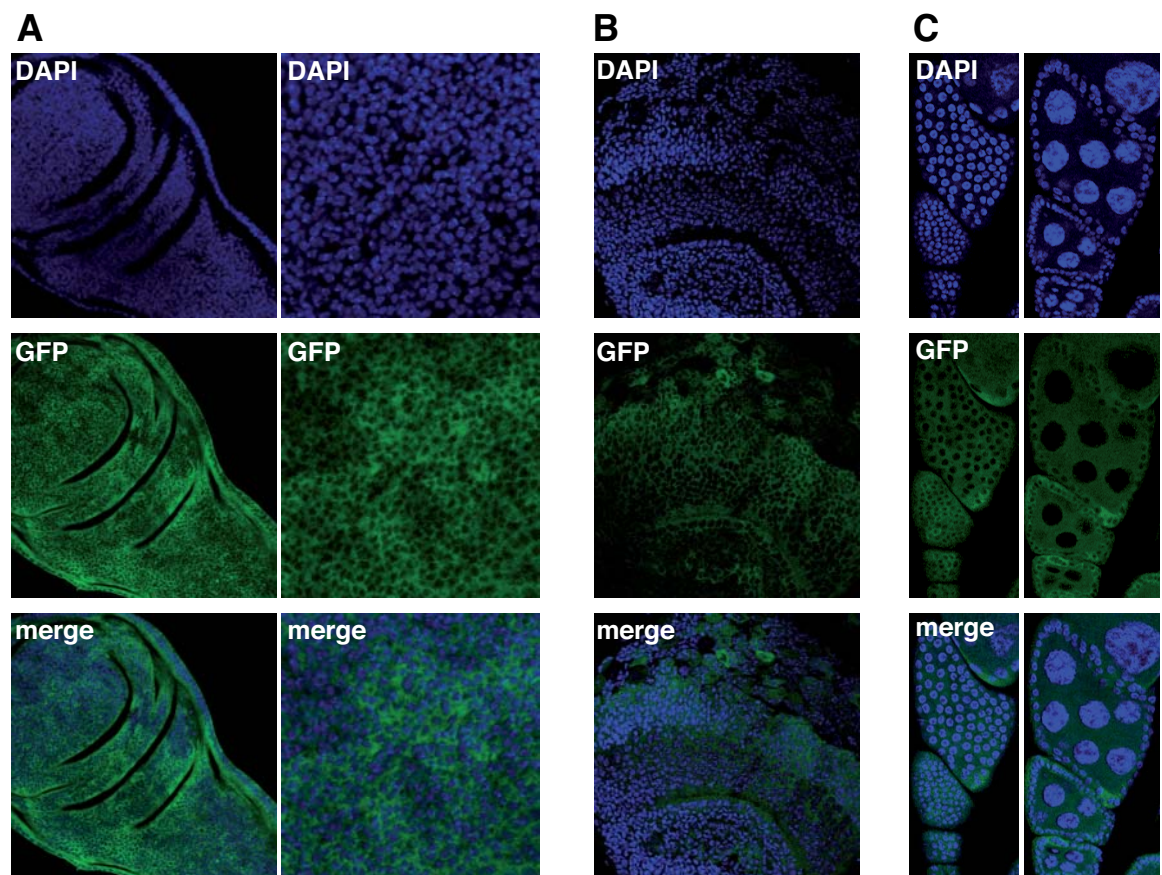


Figure S7

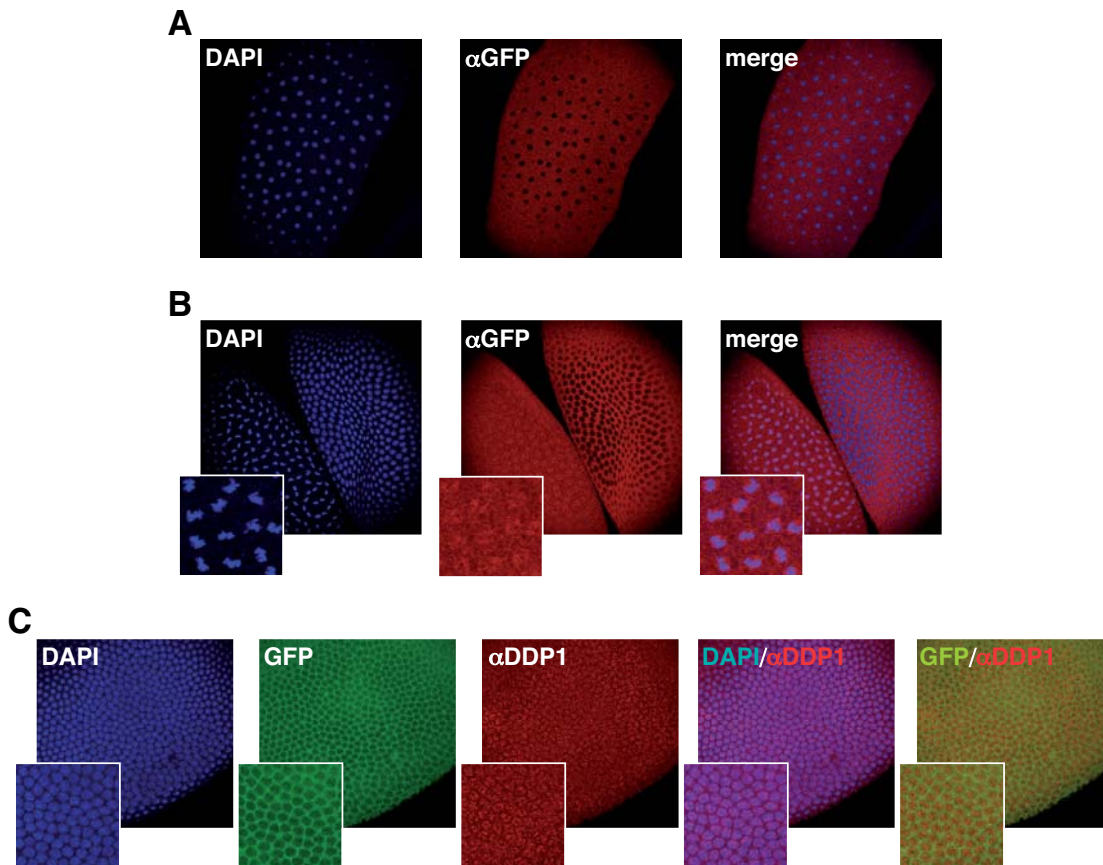


Figure S8

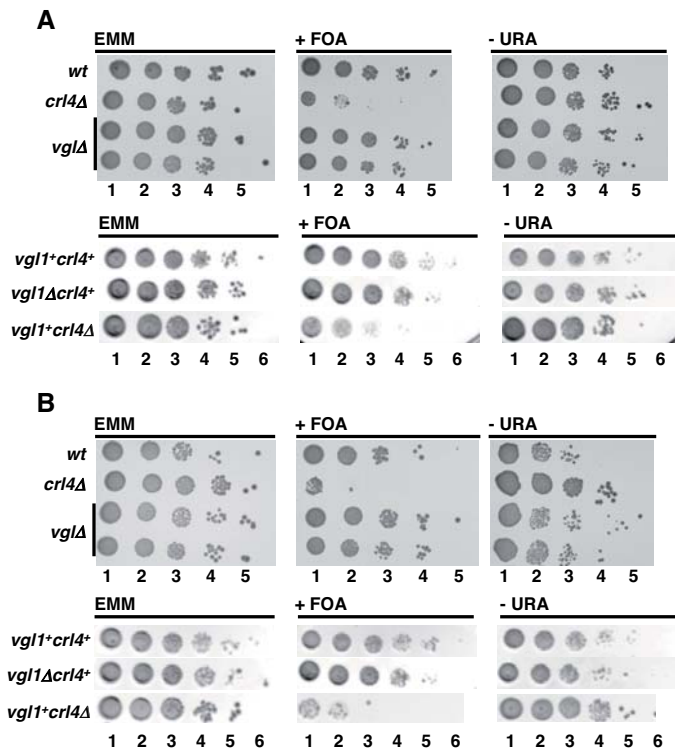


Table S1**TABLE S1. *S. pombe* STRAINS USED IN THESE EXPERIMENTS**

STRAIN	GENOTYPE
SP18	h+ vgl1D::KanMX6 ade6-m210 leu1-32 ura4-DS/E his3D arg3D
JM1058	h+ ade6-m210 leu1-32 ura4-D18 his7-366
FY336	h- leu1-32 ura4DS/E ade6-m210 cnt1/TM(NcoI)-ura4+
FY498	h+ ura4-DS/E leu1-32 ade6-m210 imr1R(NcoI)::ura4+
FY648	h+ ura4DS/E leu1-32 ade6-m210 otr1R(NcoI)::ura4+
FY597	h90 mat3-M(EcoRV)::ura4+ ade6-m210 leu1-32 ura4-DS/E h90 ade6-m210 his3-D1 leu1-32 ura4-DS/E otr1RSph1::ade6+ Tel1L-his3+ Tel2L-
FY1868	ura4+
FY2017	h+ clr4D::LEU2+ ade6-m210 leu1-32 ura4-
FY2018	h- clr4D::LEU2+ ade6-m210 leu1-32 ura4-
FY6567	h- vgl1D::LEU2+ leu1-32 ura4-DS/E ade6-m210 arg3D his3D
FY6568	h+ vgl1D::LEU2+ leu1-32 ura4-DS/E ade6-m210 arg3D his3D
FY6750	h? vgl1D::LEU2+ ade6-m210 leu1-32 ura4-DS/E cnt1/TM(NcoI)-ura4+
FY6751	h- clr4D::LEU2+ ade6-m210 leu1-32 ura4- cnt1/TM(NcoI)-ura4+
FY6752	h? vgl1D::LEU2+ ade6-m210 leu1-32 ura4-DS/E imr1R(NcoI)::ura4+
FY6753	h- clr4D::LEU2+ ade6-m210 leu1-32 ura4-) imr1R(NcoI)::ura4+
FY6754	h? vgl1D::LEU2+ ade6-m210 leu1-32 ura4-DS/E otr1R(NcoI)::ura4+
FY6755	h- clr4D::LEU2+ ade6-m210 leu1-32 ura4-DS/E otr1R(NcoI)::ura4+ h? vgl1D::LEU2+ ade6-m210 leu1-32 ura4-DS/E his3D otr1RSph1::ade6+ Tel1L-
FY6756	his3+ Tel2L-ura4+
FY6759	h? vgl1D::LEU2+ ade6-m210 leu1-32 ura4-DS/E mat3-M(EcoRV)::ura4+

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Obtention and characterisation of *Drosophila* mutants and transgenic lines

ddp1^A mutation was generated by FRT-induced deletion of the complete DDP1 ORF (Parks et al., 2004), using strains *PBac{WH}CG5174[f00017]* (Bloomington Stock Center) and *P{XP}Dp1[d00066]* (Exelixis Collection, Harvard). *P{hsFLP}¹,w118;Adv¹* (Bloomington Stock Center) was used to express FLP-recombinase. *ddp1^A* was characterized by PCR and Western blot (Figure S1A).

Transgenic *ddp1^{RNAi}* lines, carrying a synthetic RNA-hairpin against DDP1, were obtained by cloning a 836bp long DDP1 cDNA fragment (aa, 258 to 545) into pWIZ, where transgene expression is under the control of UAS_{GAL4} sequences. Efficient DDP1 depletion was determined by Western blot upon crossing to appropriate GAL4-expressing lines (Figure S1B).

To obtain transgenic lines expressing DDP1-GFP fusions, DDP1 cDNA fragments were prepared by PCR amplification with appropriate primers and cloned into pEGFP-N1 (Clontech). The following constructs were made: DDP1-GFP (aa, 1 to 1298), DDP1ΔK₁₄₋₁₅-GFP (aa, 1 to 1075) and DDP1ΔK₁₂₋₁₅-GFP (aa, 1 to 891). The various DDP1-GFP fusions were, then, excised from the corresponding pEGFP-N1 vector (Clontech) and cloned into pCaSpeR-hs-act vector, to generate constructs expressing the different DDP1-GFP fusions under the control of the *hsp70* promoter. To induce expression of DDP1-GFP fusion proteins, larvae were subjected to heat shock at 37°C for 1h and, then, let to recover at 25°C for 2h prior to dissection. When expression was driven by the own *ddp1* promoter, GFP-constructs were cloned into pCaSpeR4 vector carrying the 5' regulatory region of *ddp1* (nucleotide position -4445 to -3249). To obtain transgenic lines expressing N-terminal lacI-DDP1 or C-terminal DDP1-lacI fusions, DDP1 cDNA was cloned into a pBluescript II KS vector (Stratagene) or a pGEM-T vector (Promega) containing the lacI cDNA, respectively. Constructs were, then, cloned into pNHT4 vector to express the corresponding fused proteins under the control of the *hsp70* promoter. Transgenic lines were obtained by conventional methods.

Immunostaining of S2 cells

Drosophila S2 cells were grown at 25°C in Schneider's medium (Sigma) supplemented with 10% FBS (Gibco), 100mg/ml Streptomycin and 100 mg/ml Penicillin. For immunostaining, about 20ml of confluent S2 cells were immobilized for 20min at room temperature on round coverslides, pretreated with 10ml of 0.5mg/ml

Concanavalin-A (Sigma), and then fixed for 10min at room temperature with 4% paraformaldehyde. When the effects of acetic acid fixation were analysed, coverslides were fixed for 1min at room temperature with 3.7% formaldehyde, 0.1% NP40 in PBS and, then, treated for 7min with 3.7% formaldehyde, 50% acetic acid. After fixation, coverslides were washed three times in washing buffer (PBS, 0.2% Tween), blocked twice in blocking buffer (PBS, 0.2% Tween, 2% BSA) and incubated overnight at 4°C in blocking buffer containing mouse polyclonal α -DDP1 antibodies (1:800). Coverslides were washed three times with blocking buffer, and incubated with Cy3-conjugated antibody (1:400; Jackson laboratories) for 1h at room temperature. Slides were washed three times in washing buffer and mounted in Mowiol antifade medium with 0.2ng/ml DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole). Cells were visualized in an Eclipse E-1000 (Nikon) fluorescence microscope equipped with a CoolSnapfx camera (Photometrics) and Metamorph software (version 6.3r1).

Immunostaining of salivary glands, imaginal discs, brains and ovaries

Salivary glands, imaginal discs and brains were obtained from third instar larvae raised at 25°C. Ovaries were obtained from 2-3 days old virgin females fed with yeast extract. All tissues were dissected in cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 10-20min at room temperature. When the effects of acetic acid fixation were analysed, salivary glands were dissected in cold PBS, 0.1% NP40 and fixed, first, 1min with PBS, 0.1% NP40, 3.7% formaldehyde followed by 7min with 3.7% formaldehyde, 50% acetic acid. After fixation, samples were washed three times with washing buffer (PBS, 0.3% Triton X-100), blocked twice in blocking buffer (PBS, 0.3% Triton X-100, 2% BSA) and incubated overnight at 4°C in washing buffer containing mouse polyclonal α -DDP1 (1:800), rabbit polyclonal α -calnexin (1:200; Abcam), mouse monoclonal α -lamin ADL67.10 (1:500; DSHB) or rabbit polyclonal α -GFP (1:1.000; Molecular Probes) antibodies. Then, samples were washed three times with washing buffer, blocked twice in blocking buffer and incubated 1h at room temperature in blocking buffer containing Cy3- or Cy5-conjugated antibodies (1:400; Jackson laboratories). Afterwards, samples were washed three times with washing buffer, twice with PBS and incubated for 20min at room temperature with 0.02ng/ml DAPI in PBS. After three more washes with washing buffer, they were mounted in Mowiol antifade medium and visualized in a Leica TCS/SPE confocal microscope equipped with LAS/AF software (version v.1.6.3). Neuroblasts squashes were prepared from brains dissected in 0.7% NaCl and incubated

2h at room temperature in 5mg/ml colcemide. After 8min incubation in hypotonic buffer (0.5% sodic citrate), brains were fixed for 30min with 3.7% formaldehyde and squashed in 60% acetic acid. Slides were frozen in liquid nitrogen, permeabilised and blocked in antibody solution (PBS, 1% Triton X-100, 1% milk) for 1h at room temperature, and incubated overnight at 4°C with mouse polyclonal a-DDP1 antibody (1:800) or a-GFP rabbit polyclonal antibody (1:1.000; Molecular Probes). Following primary antibody incubation, slides were washed three times in antibody buffer, and then incubated with Cy3-conjugated antibody (1:200; Jackson laboratories) for 1h at room temperature. Slides were washed with PBS, 1% Triton X-100, and mounted and visualised as indicate above.

Immunostaining of embryos

For immunostaining, *Drosophila* embryos were dechorionated 2min with 50% NaClO, washed with 0.1% Triton X-100, and fixed for 20min with 50% heptane, 50% PEM, 4% formaldehyde at room temperature. The vitalline membrane was removed with MeOH and the embryos at the bottom of the MeOH phase were collected. Fixed embryos were immunostained, mounted and visualised as described above for salivary glands, imaginal discs, brains and ovaries. Primary antibodies used were mouse polyclonal a-DDP1 (1:800), rabbit polyclonal a-GFP (1:1.000; Molecular Probes) and rabbit polyclonal aH3K9me2 (1:300; Upstate). The secondary Cy2-, Cy3-, Cy5-conjugated antibodies (Jackson laboratories) were used at 1:400.

Immunostaining of polytene chromosomes

For immunostaining of polytene chromosomes, salivary glands from third instar larvae were dissected in Cohen buffer for no longer than 8min, fixed 2min in PBS, 0.74% formaldehyde, transferred to 45% acetic acid, 0.74% formaldehyde for 3min and squashed in the same solution. Slides were frozen in liquid nitrogen and stored in PBS, 67% glycerol at -20 °C until use. Slides were washed three times in washing buffer (PBS, 0.05% Tween), blocked twice in blocking buffer (PBS, 0.05% Tween, 2% BSA), and then incubated overnight at 4°C in blocking buffer containing rabbit polyclonal aH3K9me2 (1:50; Upstate) and mouse monoclonal a-GFP (1:50; Roche). Following primary antibody incubation, slides were washed three times in washing buffer, blocked twice in blocking buffer, and incubated for 1h at room temperature in blocking buffer containing Cy3- and Cy2-conjugated antibodies (Jackson laboratories) at 1:200 and 1:300, respectively. Slides were washed again, mounted in Mowiol anti fade medium with 0.2ng/ml DAPI

and visualised in an Eclipse E-1000 (Nikon) fluorescence microscope equipped with a CoolSnapfx camera (Photometrics) and Metamorph software (version 6.3r1).

Immunogold electron microscopy analyses

For electron microscopy analyses, salivary glands from third instar larvae were dissected in cold PBS, fixed at 4 °C with 2% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde in PB buffer and, after washing with PB containing 50mM glycine, embedded in 12% gelatine and infused in 2.3M sucrose. Mounted gelatine blocks were frozen in liquid nitrogen. Thin sections were prepared in an ultracryomicrotome (Leica EM Ultracut UC6/FC6, Vienna, Austria). Ultrathin cryosections were collected with 2% methylcellulose in 2.3M sucrose and incubated at room temperature on drops of 2% gelatine in PBS for 20min at 37°C, followed by 50mM glycine in PBS during 15min, 10% FBS in PBS during 10min and 5% FBS in PBS for 5min. Then, samples were incubated with affinity-purified rabbit polyclonal aDDP1 antibodies in 5% FBS in PBS for 30min and, after three washes with drops of PBS for 10min, incubated for 20min with protein A coupled to 10nm diameter colloidal gold particles (Cell Microscopy Center, Department of Cell Biology, University Medical Center Utrecht, The Netherlands), at 1:60 dilution in 5% FBS/PBS. This was followed by three washes with drops of PBS for 10min and two washes with distilled water. As a control for non-specific binding of the colloidal gold-conjugated protein A, the primary polyclonal antibody was omitted. Samples were visualised in an Electron Microscope Jeol 1010 (Jeol, Japan) with a CCD camera SIS Megaview III. Electron microscopy analyses were performed at the Electron Microscopy Unit of the Barcelona Science Park (PCB).

Tandem affinity purification (TAP)

For TAP purification, stable S2-cell lines expressing DDP1-TAP were obtained by cloning DDP1 cDNA into pMK33-CTAP vector, where expression is driven by the metallothionein promoter. Expression of DDP1-TAP was induced for 24h with 440mM CuSO₄ and cytoplasmic and nuclear extracts were obtained. Extracts were incubated with Dynabeads (Invitrogen) conjugated to BSA for 2h at 4°C to remove unspecific interactions, and then overnight at 4°C with Dynabeads conjugated to rabbit IgG (MP Biochemicals). Washes were made to remove unspecific interactions, and associated proteins were eluted with 1M NH₄OH-5mM EDTA. The samples were then lyophilised and analysed by LC/MS at the Proteomics Platform of the Barcelona Science Park (PCB).

Similar experiments were performed with stable S2-cell lines expressing the TAP-domain alone.

PEV experiments in *Drosophila*

To analyze the effect of *ddp1*^A mutation on PEV, *w1118; ddp1*^A/*CyO* males were crossed to *In(1)w^{m4}* females, and the eye phenotype of heterozygous *ddp1*^A/*+* progeny compared to that of their wild-type siblings. Three independent crosses were carried out. Similar experiments were performed with *ddp1*^{15.1} and *Su(var)2-5*⁰⁵ alleles, as controls.

For targeting experiments, *S9.2* females were crossed to *w; lacI-DDP1/CyO* or *w; lacI-DDP1/TM3* males. Expression lacI-DDP1 was induced by daily heat-shock treatment at 37°C for 45min and the eye phenotype of heterozygous *DDP1-lacI/+* progeny compared to that of their wild-type siblings. Similar experiments were performed with flies expressing DDP1-lacI, HP1a-lacI or lacI alone.

Silencing experiments in *S. pombe*

To determine the contribution of Vgl1 to heterochromatin-mediated silencing, strains FY336, FY498, FY597, FY648 and FY1868, which bear an *ura4*⁺ marker inserted at the indicated silenced *locus*, and their *vgl1*Δ or *clr4*Δ derivatives were used (see Table S1). The extent of silencing of the *ura4*⁺ marker was determined by plating 10μl of serial 10-fold dilutions of a freshly growing (1 A₆₀₀) yeast culture in selective medium (EMM) with or without 1g/L of 5-Fluoroorotic acid monohydrate (5-FOA) (Apollo Scientific LTD). To determine the efficiency of heterochromatin establishment, FY6751, FY6753 and FY6755 strains were used (see Table S1). These strains, which carry a *clr4*Δ mutation that disrupts heterochromatin, were crossed with a *vgl1*Δ strain and, from these crosses, spores that were *clr4*⁺, bore the *ura4*⁺ marker and were either *vgl1*Δ or *vgl1*⁺ were analysed. As a control, the same strains were crossed with a wild-type JM1058 strain and *clr4*Δ and *clr4*⁺ spores were analysed. The extent of silencing of the *ura4*⁺ marker was determined in 5-FOA EMM plates as before.

