



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Participación de las proteínas dAtrx y dAdd1 en el mantenimiento telomérico de  
*Drosophila melanogaster*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

IBT. Joselyn Cristina Chávez Fuentes

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Viviana Valadez Graham  
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Svetlana Shishkova  
Dr. José Luis Reyes Taboada  
Instituto de Biotecnología

Ciudad de México. Junio, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

Al Instituto de Biotecnología, UNAM donde se llevó a cabo todo el trabajo experimental de este proyecto.

A la Dra. Viviana Valadez por ser mi Tutora, por su completa disponibilidad y asesoría durante el desarrollo experimental del trabajo, así como por su invaluable apoyo y dirección durante la realización de mi Tesis.

Al Dr. Mario Zurita, por abrirme las puertas para formar parte de su grupo de trabajo, así como su consejo y asesoría durante mi estancia en su laboratorio.

Al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, por el Donativo CONACyT Joven Investigador: Ciencia Básica. Convocatoria 2012. DONATIVO No. 177393 y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica por el Donativo PAPIIT: Convocatoria 2012. Donativo No. IA200613 otorgados a la Dra. Viviana Valadez que hicieron posible la realización de este proyecto.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo brindado para asistir al XXXI Congreso Nacional de Bioquímica para presentar los resultados de mi trabajo.

Al personal técnico y administrativo del laboratorio, especialmente a Carmen Muñoz y Minerva Carcaño ya que sin su ayuda no podría haber llevado a cabo los experimentos con la agilidad requerida.

Al personal del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada Arturo Pimentel, Andrés Saralegui y Xochitl Alvarado por su apoyo durante la toma de fotografías para este trabajo.

Al personal administrativo del Instituto de Biotecnología, especialmente a Antonio Bolaños y Gloria Villa por su excelente trabajo y completa disposición para ayudarme cada vez que tuve una duda.

A todos los integrantes del laboratorio del Dr. Mario Zurita y del Dr. Enrique Reynaud que de forma solidaria y afectuosa me ofrecieron su ayuda durante mi estancia en el Instituto.

A Adrián, quien siempre se preocupa por nuestra seguridad y tuvo disposición para esperarme cinco minutos más siempre que fue necesario.

A mi familia y amigos por su gran comprensión, afecto y apoyo incondicional durante la realización de mi Tesis.

# ÍNDICE

Resumen .....	vi
Introducción.....	1
Los telómeros y su importancia .....	1
El mantenimiento telomérico .....	3
La regulación del mecanismo de retrotransposición .....	4
El silenciamiento en la línea germinal mediado por piRNAs .....	5
El silenciamiento de los retrotransposones y secuencias repetidas en células somáticas .....	6
La proteína de humano ATRX.....	6
La conservación de ATRX en <i>D. melanogaster</i> .....	8
Antecedentes.....	10
Hipótesis .....	13
Objetivos.....	13
Materiales y métodos.....	14
Obtención y mantenimiento de las líneas de moscas.....	14
Obtención de líneas transgénicas para ensayos de rescate.....	14
Separación de machos y testículos .....	15
Extracción de RNA total y DNA genómico .....	15
Determinación de la abundancia de transcritos y número de copias de los retrotransposones en el DNA genómico .....	15
Hibridación <i>in situ</i> de cromosomas politénicos.....	16
Análisis estadístico .....	17
Resultados.....	18
La disminución de las proteínas dAtrx y dAdd1 afecta el número de copias de los retrotransposones en el genoma de las células somáticas.....	18
La disminución de las proteínas dAtrx y dAdd1 afecta la abundancia de transcritos de los retrotransposones en células somáticas .....	21
El aumento en las copias de <i>Het-A</i> ocurre específicamente en los telómeros y causa fusiones teloméricas. ....	24
La expresión de las isoformas dAdd1-a y dAdd1-b rescata parcialmente el fenotipo de extensión de los telómeros .....	27
La deficiencia de la proteína dAdd1 provoca un aumento en el número de copias de los retrotransposones en el genoma de células de la línea germinal .....	31
La disminución de las proteínas dAtrx y dAdd1 provoca un aumento en la abundancia de transcritos de los retrotransposones en células de la línea germinal .....	33

Las proteínas dAtrx y dAdd1 podrían interaccionar genéticamente con la proteína Piwi como miembro de la vía de regulación de retrotransposones mediada por piRNAs en la línea germinal .....	35
La disminución de la proteína Piwi no provoca un aumento en el número de copias en el genoma ni en la abundancia de transcritos del arreglo HTT en células somáticas .....	39
Discusión .....	43
La regulación del arreglo HTT mediado por dAtrx y dAdd1 en células somáticas .....	43
La regulación del arreglo HTT mediado por dAtrx y dAdd1 en células de la línea germinal .....	45
Conclusiones .....	48
Perspectivas .....	49
Referencias .....	50
Anexo 1: Descripción de los alelos mutantes utilizados en este estudio .....	56
Anexo 2: Obtención de las moscas con combinaciones de alelos mutantes .....	58
Anexo 3: Estandarización de la extracción de DNA genómico y síntesis de cDNA.....	59
Anexo 4: Gráficas de correlación entre número de copias en el genoma y abundancia de transcrito.....	62
Anexo 5: Artículo sometido a revisión.....	63

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Oligonucleótidos utilizados en el análisis por qPCR.....	16
<b>Tabla 2.</b> Genotipos de moscas mutantes <i>datrx</i> , <i>piwi</i> y <i>dadd1</i> .....	58

## Índice de Figuras

Figura 1: Regiones teloméricas de <i>Drosophila</i> .....	2
Figura 2: Mecanismo de retrotransposición.....	4
Figura 3: Dominios de la proteína ATRX .....	7
Figura 4: Isoformas de las proteínas dAtrx y dAdd1 .....	9
Figura 5: Co-localización de la isoforma larga de dAtrx y HP1a.....	11
Figura 6: Mutaciones en <i>datrx</i> y <i>dadd1</i> afectan el número de copias de los retrotransposones en células somáticas.....	11
Figura 7. Mutaciones en <i>datrx</i> y <i>dadd1</i> afectan la abundancia de transcritos de retrotransposones en células somáticas .....	243
Figura 8. Hibridación <i>in situ</i> de cromosomas politénicos con la sonda <i>Het-A</i> .....	24
Figura 9. Fusiones teloméricas en cromosomas politénicos.....	25
Figura 10. Hibridación <i>in situ</i> de cromosomas politénicos con la sonda <i>TAHRE</i> .....	26
Figura 11. Rescate parcial del fenotipo silvestre al expresar las isoformas dAdd1-a y dAdd1-b ..	29
Figura 12: Modelo de acción de dAtrx y dAdd1 en las células somáticas .....	30
Figura 13: Mutaciones en <i>datrx</i> y <i>dadd1</i> afectan el número de copias de retrotransposones en la línea germinal .....	32
Figura 14: Mutaciones en <i>datrx</i> y <i>dadd1</i> afectan la abundancia de transcritos de los retrotransposones en la línea germinal.....	34
Figura 15: Mutaciones en <i>piwi</i> y <i>datrx/dadd1</i> no incrementan el número de copias de retrotransposones en línea germinal.....	36
Figura 16: Mutaciones en <i>piwi</i> y <i>datrx/dadd1</i> afectan la abundancia de transcritos de los retrotransposones en células de la línea germinal. ....	38
Figura 17: Mutaciones en <i>piwi</i> y <i>datrx/dadd1</i> no afectan el número de copias de retrotransposones en células somáticas. ....	40
Figura 18: Mutaciones en <i>piwi</i> y <i>datrx/dadd1</i> no afectan la abundancia de transcritos de los retrotransposones en células somáticas. ....	41
Figura 19: Modelo de acción de dAtrx y dAdd1 en células de la línea germinal.....	42
Figura 20: Corrimiento de DNA genómico antes y después del tratamiento con RNasa A.....	59
Figura 21: Amplificación de <i>RP2</i> y <i>Het-A</i> mediante PCR punto final .....	60
Figura 22: Corrimiento de RNA y prueba de cDNA.....	61

## Resumen

En los eucariotas, los telómeros constituyen el extremo de los cromosomas y generalmente están compuestos por arreglos en tándem de secuencias repetidas; sin embargo en el género *Drosophila* los telómeros están compuestos por tres regiones: las secuencias asociadas al telómero o TAS, el arreglo HTT conformado por los retrotransposones *Het-A*, *TART* y *TAHRE* y el CAP compuesto por diversas proteínas como HP1. A diferencia de los mamíferos, donde el mantenimiento de los telómeros está dado por la actividad de la telomerasa, *Drosophila* posee dos mecanismos para el mantenimiento telomérico: la retrotransposición del arreglo HTT y la recombinación homóloga. El mecanismo de retrotransposición es controlado mediante siRNAs en células somáticas y piRNAs en la línea germinal aunque existen diversas proteínas localizadas en los telómeros de *Drosophila* que pueden estar involucradas en la regulación de las secuencias teloméricas, entre ellas se encuentran las proteínas dAtrx y dAdd1.

La proteína ATRX de humano fue identificada porque mutaciones en el gen *hATRX* causan el síndrome de Alfa Talasemia con Retraso Mental asociado al cromosoma X (ATRAX). La proteína ATRX posee dos dominios: el dominio helicasa/ATPasa y el dominio ADD que reconoce la combinación de las marcas H3K9me3 y H3K4me0. ATRX es capaz de formar un complejo con la proteína DAXX para depositar la variante de histona H3.3 en regiones pericentroméricas y teloméricas donde co-localiza con HP1 $\alpha$ . ATRX está involucrada en la regulación del mantenimiento telomérico independiente de telomerasa y la pérdida en su función se ha asociado con diversos tipos de cáncer. Además ATRX regula negativamente elementos transponibles y es capaz de reconocer cuádruplex de guanina.

En *D. melanogaster* el dominio helicasa/ATPasa de ATRX se encuentra codificado en el gen *dattrx*, que da lugar a las isoformas dAtrx<sub>L</sub> y dAtrx<sub>S</sub> mientras que el gen *dadd1* codifica el homólogo del dominio ADD y da lugar a las isoformas dAdd1-a, dAdd1-b y dAdd1-c. Las proteínas dAtrx y dAdd1 son capaces de interactuar físicamente entre ellas y pueden unirse a la región telomérica TAS, además interactúan con HP1a la cual es importante para mantener el silenciamiento del arreglo HTT.

En este trabajo se evaluó si moscas con pérdida de dAdd1, dAtrx o ambas, perdían el silenciamiento del arreglo HTT, además se evaluó si esta regulación mostraba diferencias entre células somáticas y germinales. Se encontró que la combinación de la condición nula dAdd1 con la condición hipomorfa de las dos isoformas de dAtrx causa pérdida en el silenciamiento de *Het-A* y *TART* a nivel de transcrito y copias en el genoma en células somáticas, mientras que en la línea germinal solamente ocurre la pérdida del silenciamiento a nivel de transcrito. El aumento en el número de copias en el genoma y transcritos es parcialmente rescatado cuando se expresan las isoformas dAdd1-a o dAdd1-b en glándulas salivales. Además dAtrx y dAdd1 pueden estar involucradas con la vía de piRNAs para la regulación del arreglo HTT en la línea germinal.

# Introducción

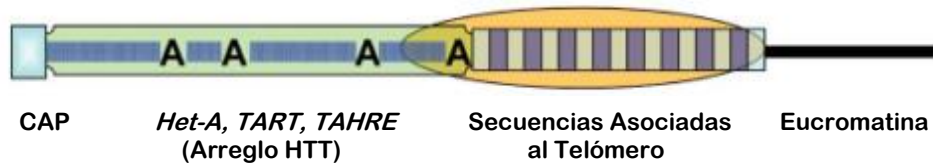
## Los telómeros y su importancia

A diferencia de los procariotas, el genoma de los eucariotas se encuentra organizado en el núcleo en cromosomas lineales que poseen extremos llamados telómeros. Los telómeros están constituidos por secuencias cortas repetidas de DNA en los extremos de los cromosomas lineales. A nivel celular los telómeros están involucrados en dos ámbitos: primero, la maquinaria de reparación del DNA debe distinguir entre el término real de los cromosomas y las posibles rupturas de doble cadena, evitando de esta manera la unión errónea entre cromosomas; por otro lado, ya que la DNA polimerasa es incapaz de replicar completamente la sección terminal de los cromosomas lineales, los telómeros cumplen la función de proteger el DNA codificante de la pérdida de secuencias a causa de este evento en la replicación<sup>1</sup>. Barbara McClintock demostró que las fusiones entre cromosomas causadas por defectos en el mantenimiento telomérico pueden generar inestabilidad cromosomal que involucra ciclos de ruptura, fusión y unión entre los cromosomas; estos ciclos resultan en la transferencia de DNA de un cromosoma a otro cuando los cromosomas fusionados se separan<sup>2</sup>.

Los telómeros están compuestos por DNA telomérico y proteínas asociadas a éste y se han identificado tres mecanismos de mantenimiento telomérico. En la mayoría de los eucariotas el DNA telomérico está formado por arreglos en tándem de repeticiones ricas en Guanina por ejemplo 5'-GGGTTA-3' en humanos, 5'-G<sub>1-3</sub>T-3' en la levadura *S. cerevisiae* y 5'-G<sub>2-8</sub>TTACA-3' en *S. pombe*<sup>3</sup> y su integración en el genoma es mediado por la acción de la telomerasa. Existen otros dos mecanismos encontrados en organismos que no poseen telomerasa. En los dípteros como *Chironomus* sp y *Anopheles gambiae* los telómeros contienen largos arreglos en tándem de complejas secuencias repetidas que son mantenidos mediante recombinación homóloga; mientras que en especies de *Drosophila* existen arreglos en tándem de retrotransposones no-LTR (*Long Terminal Repeat*) específicos de telómeros que pueden cooperar entre ellos para integrarse en el genoma mediante transposición<sup>4,5</sup>.

Los telómeros del género *Drosophila* se caracterizan por estar compuestos de tres regiones: un arreglo irregular de secuencias repetidas conocidas como TAS (Secuencias Asociadas al Telómero), el arreglo HTT compuesto de repeticiones de los retrotransposones *Het-A* (*HeT DNA-A*), *TART* (*Telomere-Associated Retrotransposon*) y *TAHRE* (*Telomere-Associated and HeT-A-Related Element*) y la región del CAP formado por diversas proteínas que actúan en conjunto y pueden reconocer secuencias específicas del DNA terminal como se muestra en la Figura 1<sup>6</sup>.





**Figura 1: Regiones teloméricas de *Drosophila*.** De derecha a izquierda se observa la región de secuencias repetidas conocidas como TAS (Secuencias Asociadas al telómero), después se encuentran repeticiones de los retrotransposones llamados *Het-A*, *TART* y *TAHRE* que conforman el arreglo HTT<sup>7</sup> y finalmente se encuentra el CAP en el extremo del cromosoma (Modificado de Mason *et al*, 2008)<sup>6</sup>.

Las proteínas HP1a (*Heterochromatin Protein 1 a*) y HOAP (*Heterochromatin protein 1/Origin recognition complex-Associated Protein*) son los mayores componentes del CAP de los telómeros de *D.melanogaster* y son requeridos para su estabilidad<sup>8</sup>.

HP1a, la primer proteína del grupo de las HP1 en ser descubierta, se identificó inicialmente en *D. melanogaster* mostrando su localización en heterocromatina y la capacidad de actuar como un supresor dominante del efecto de variegación por posición<sup>9,10</sup>. Todas las proteínas del tipo HP1 contienen un dominio amino terminal *chromo* (*Chromatin Organization Modifier*) que media la interacción con otras proteínas además de reconocer las marcas H3K9me2 y H3K9me3, una región conectora llamada *hinge* y un dominio carboxilo terminal *chromo shadow* que es requerido para la dimerización de HP1a y para la interacción con proteínas que poseen el motivo PXVXL; estas dos últimas regiones son determinantes para la diferencia en locación entre las proteínas HP1a y HP1c<sup>11</sup>.

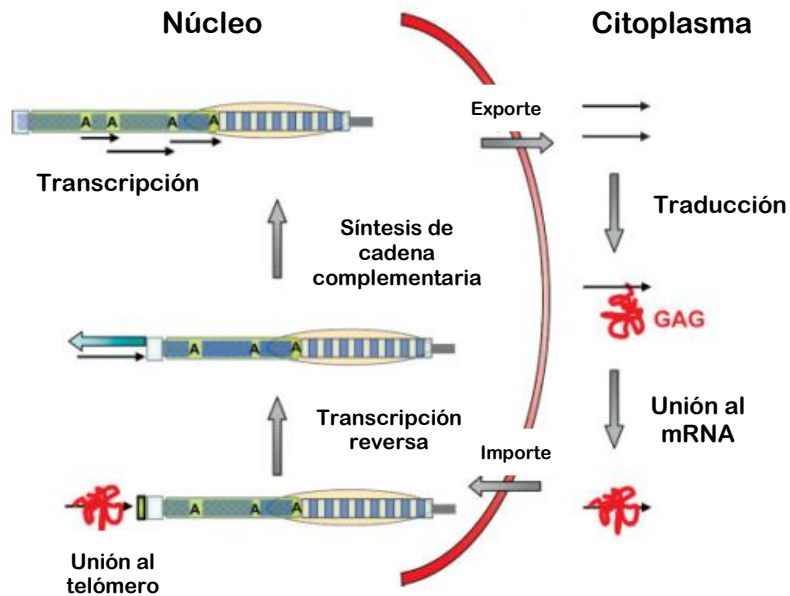
Las proteínas HP1 están altamente conservadas entre los eucariotas, desde *S. pombe* hasta humano; muchos de ellos tienen más de un parálogo de HP1, dando versatilidad en la localización y función de estas proteínas<sup>12</sup>. HP1 se puede unir directamente al DNA en la formación del CAP del cromosoma, además posee la capacidad de unión (a través de su cromodominio) a la cromatina donde interactúa con la histona H3 metilada en la lisina 9 formando un complejo que crea un estado de alta compactación de la cromatina que reprime la actividad génica<sup>13</sup>.

## El mantenimiento telomérico

Para contrarrestar la degradación debida a la replicación incompleta de los cromosomas, en levaduras y mamíferos las células con gran capacidad replicativa expresan una transcriptasa reversa especializada conocida como telomerasa. La telomerasa es reclutada con ayuda del complejo *capping* (que previene el reconocimiento de los telómeros como rupturas de doble cadena del DNA) y extiende los telómeros catalizando la adición de secuencias repetidas (TTAGGG en mamíferos y TG<sub>1-3</sub> en levadura) en el extremo 3' del cromosoma<sup>14,15</sup>. Este proceso parece estar coordinado con la maquinaria de replicación del DNA, de manera que la telomerasa extiende la cadena molde inmediatamente después de la replicación, mientras que la formación de la cadena complementaria se realiza en la fase S tardía<sup>16</sup>.

En mamíferos la telomerasa es expresada en células embrionarias, en células con gran capacidad de proliferación, en células progenitoras de células epiteliales y linfoides, así como en células cancerosas; sin embargo, la inactivación de la telomerasa es necesaria para la quiescencia, diferenciación y muerte de algunos tipos celulares, además de actuar en células somáticas como un mecanismo supresor de tumores<sup>17</sup>. Una excepción a esta situación es el comportamiento de las células cancerosas que para poder dividirse indefinidamente sin tener pérdida en la longitud de los telómeros vuelven a expresar a la telomerasa<sup>18</sup>; sin embargo aproximadamente el 15% de los cánceres muestran un mecanismo de mantenimiento telomérico llamado mantenimiento alternativo de los telómeros o ALT que se lleva a cabo mediante recombinación homóloga<sup>19</sup>. Existen otros casos en la naturaleza donde el mantenimiento de los telómeros no se da mediante la acción de la telomerasa, por ejemplo las plantas del género *Cestrum* de la familia Solanaceae tienen secuencias repetidas satelitales en los telómeros<sup>20</sup>, mientras que la cebolla (*Allium cepa*) posee tanto secuencias satelitales como repetidas de rDNA<sup>21</sup>.

En el género *Drosophila* la elongación de los telómeros ocurre de manera independiente de la telomerasa mediante una combinación de transposición de los elementos del arreglo HTT y una recombinación homóloga entre ellos. Se ha propuesto un mecanismo basado en la transposición de otros retroelementos no-LTR, con la diferencia de que en el caso de los elementos HTT no se necesita realizar un corte en el DNA, sino que se utiliza el extremo 3' al término del cromosoma como cebador para la transcripción reversa. Un importante prerrequisito en este mecanismo de elongación telomérica, descrito en la Figura 2, es la generación de transcritos de los elementos del arreglo HTT a partir de las secuencias de retrotransposones teloméricos utilizando la secuencia promotora localizada en la región 3'UTR<sup>6,22</sup>.



**Figura 2: Mecanismo de retrotransposición.** El transcrito formado a partir del retrotransposón es exportado al citoplasma para llevar a cabo la traducción que da lugar a la proteína tipo GAG que contiene tres señales de localización nuclear. La proteína GAG se une al mRNA y facilita que sea importado al núcleo; posteriormente, gracias a la interacción proteína-proteína entre GAG y el CAP, se une el transcrito al extremo del telómero para que una transcriptasa reversa utilice el grupo hidroxilo 3' en el extremo del cromosoma como cebador para copiar el RNA intermediario en la primera cadena de DNA, después ocurre la síntesis de la segunda cadena mediante un mecanismo de reparación de DNA y se completa la adición de un nuevo retrotransposón (Modificado de Mason *et al*, 2008) <sup>6</sup>.

### La regulación del mecanismo de retrotransposición

Diversos componentes de la cromatina telomérica se han asociado con la regulación de los retrotransposones y juegan un papel importante en la regulación de la elongación de los telómeros en *Drosophila*, tal es el caso de la proteína HP1a la cual está involucrada en el establecimiento de la heterocromatina y represión transcripcional<sup>23</sup>. El cromodominio de HP1a reconoce específicamente las marcas de di- y trimetilación de la H3K9<sup>24,25</sup> y se ha observado que al haber mutaciones por disrupción del cromodominio de la proteína HP1a, se incrementa la abundancia de los RNAs de *Het-A* y *TART* así como su frecuencia de adición en los extremos de los cromosomas<sup>13</sup>.

La proteína de unión a RNA Orf1p, codificada por el ORF del elemento *Het-A*, está presente durante la fase temprana S1 indicando que el reclutamiento de la maquinaria de retrotransposición coincide con la replicación de los telómeros, además se ha evidenciado que Orf1p es producida en células en proliferación formando estructuras esféricas de Orf1p dentro de las cuales se encuentran transcritos de *Het-A* y que este complejo proteínas-RNA

se une específicamente a regiones teloméricas, ya que co-localiza con la proteína HOAP que es un marcador de los telómeros<sup>26</sup>.

### **El silenciamiento en la línea germinal mediado por piRNAs**

En *Drosophila* la abundancia de los transcritos de los retrotransposones, así como la frecuencia de sus transposiciones en los cromosomas de la línea germinal son controladas por Piwi-RNAs, que son RNAs pequeños de 24 a 30 nucleótidos que se unen a proteínas Piwi y tienen la capacidad de regular las repeticiones teloméricas<sup>27</sup>. En el genoma de *D. melanogaster* se encuentran codificadas tres proteínas PIWI: Piwi, Aubergina (Aub) y Argonauta 3 (Ago3); en el citoplasma Aub y Ago3 actúan juntas para regular los transcritos de transposones mediante el reconocimiento de secuencias complementarias a los RNAs asociados a estas proteínas<sup>28</sup>, mientras que Piwi se localiza en el núcleo y se asocia a los piRNAs para reprimir elementos móviles en la línea germinal tanto de *Drosophila* como de mamíferos<sup>29</sup>. Las proteínas Piwi tienen una gran importancia ya que la pérdida de su función lleva a defectos en la gametogénesis y causa esterilidad debido a la pérdida en el silenciamiento de elementos móviles<sup>27</sup>.

La proteína HP1a no ha sido directamente implicada en la síntesis o el transporte de piRNAs, sin embargo, mutantes de *aub* y *piwi* alteran la localización de HP1a y otras proteínas organizadoras de la cromatina en células somáticas y existe evidencia bioquímica de que las proteínas Piwi interactúan con HP1a<sup>30</sup>.

Por otro lado, se ha evidenciado que alelos mutantes de *piwi* y de *Su(var)205* (el gen que codifica para HP1a) originan un aumento en la tasa de mutaciones letales ligadas al cromosoma X y afectan el silenciamiento asociado a elementos P teloméricos, por lo que las proteínas organizadoras de la cromatina podrían estar involucradas en la regulación de la transposición en colaboración con piRNAs. Además se ha observado que mutaciones de pérdida de función en componentes de la regulación por RNA asociado a proteínas de la familia PIWI llevan a la sobreexpresión y la movilización de retrotransposones en la línea germinal<sup>31</sup>.

El retrotransposon *Het-A*, que es el más abundante en los telómeros de *Drosophila*, sirve como templado para el ensamblaje del complejo Piwi-RNA que es funcionalmente similar al reclutamiento de proteínas teloméricas de unión a DNA<sup>32</sup>. Esto indica que el control del tamaño de los telómeros es complejo y depende tanto de los componentes de la cromatina como de la regulación por piRNAs.

## **El silenciamiento de los retrotransposones y secuencias repetidas en células somáticas**

En *Drosophila*, las células somáticas producen RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) a partir de RNA exógeno de cadena doble como mecanismo de defensa ante ataques virales; sin embargo, se han identificado también siRNAs endógenos de 21 nucleótidos correspondientes a transposones y secuencias heterocromáticas<sup>33</sup>. El movimiento de transposones causa inserciones, deleciones y rearrreglos cromosomales. La mayoría de las familias de transposones son transcritas tanto en dirección sentido como antisentido, además se ha observado que los transcritos de los retrotransposones LTR Dm297 y mdg1 así como los no-LTR *juan* y *jockey* son generados a partir de sitios de inicio de la transcripción dentro del propio elemento mediante promotores reconocidos de forma canónica por la RNA polimerasa II y se ha determinado que los transcritos antisentido de los retrotransposones se encuentran menos poliadenilados que los transcritos sentido, lo que podría promover la retención nuclear de los transcritos antisentido y la formación de RNAs de doble cadena. Para reprimir estos elementos y combatir con la inestabilidad genómica se han desarrollado mecanismos de defensa mediados por RNAs pequeños, en el caso específico de las células somáticas, los RNAs pequeños de interferencia endógenos o esiRNAs son producidos por Dicer-2 al procesar precursores de RNA de doble cadena y son capaces de suprimir la movilidad de retrotransposones; en mutantes de Dicer-2 se ha observado un incremento en la expresión de transcritos sentido y antisentido de retrotransposones apoyando este modelo de silenciamiento<sup>34</sup>.

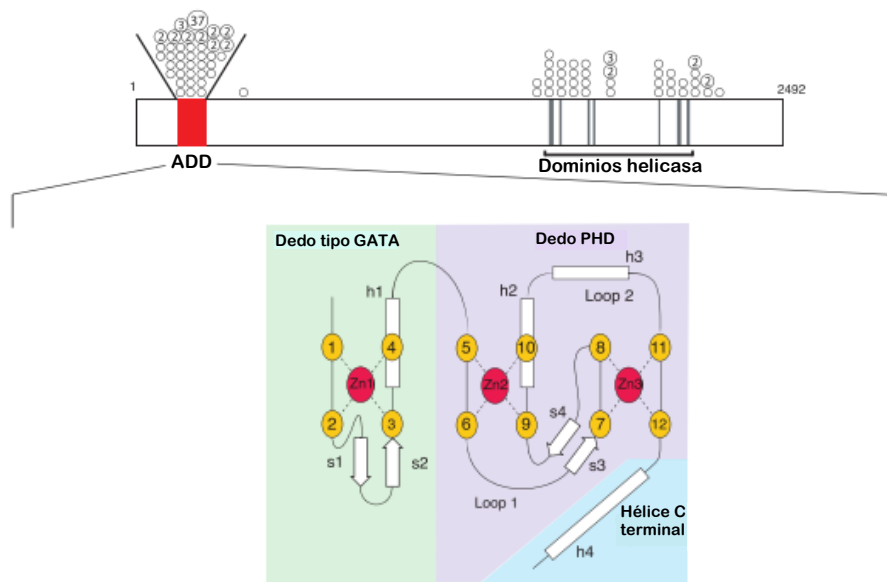
La generación de siRNAs endógenos ayuda al silenciamiento de elementos génicos propios de los organismos de una manera similar a como lo hacen los piRNAs en la línea germinal y para su acumulación requieren de la ribonucleasa Dicer-2 y la proteína Argonauta-2 (Ago2)<sup>33</sup>. Hasta el momento no se han identificado otros componentes en esta vía de silenciamiento aunque es posible, tal y como ocurre en la línea germinal, que se asocien factores que promuevan un estado heterocromático.

### **La proteína de humano ATRX**

El gen *ATRX* de humano (*ATRX*) fue identificado inicialmente porque al estar mutado genera el síndrome de Alfa Talasemia con Retraso Mental asociado al cromosoma X (*ATRX*)<sup>35</sup>. Este gen codifica para una proteína remodeladora de la cromatina del tipo SWI/SNF<sup>36</sup> que posee un dominio helicasa/ATPasa y un dominio ADD que reconoce y se une a los extremos amino-terminales de histonas, y media la unión de la proteína a regiones heterocromáticas reconociendo la trimetilación de la lisina 9 y el residuo no metilado de lisina 4 en la histona H3<sup>37</sup>, donde ATRX co-localiza con la proteína de heterocromatina HP1 $\alpha$ <sup>38</sup>; adicionalmente

ensayos de doble híbrido indican que estas proteínas de mamífero son capaces de interactuar<sup>39</sup>.

La proteína ATRX de humano actúa como una ATPasa dependiente de DNA y una translocasa, lo que la identifica como proteína remodeladora de la cromatina; como se mencionó anteriormente y se observa en la Figura 3, posee un dominio Helicasa/ATPasa y un dominio ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) nombrado así por su homología con la familia de DNA metiltransferasas<sup>35</sup>. Aproximadamente el 50% de las mutaciones del gen *ATRX* encontradas en pacientes están localizadas en el dominio ADD de la proteína, mientras que el 30% se presenta en el dominio helicasa, como se puede observar en la Figura 3. Las mutaciones en el dominio ADD están relacionadas con pacientes con retardo psicomotor más severo que los pacientes con mutaciones en el dominio helicasa<sup>40</sup>.



**Figura 3: Dominios de la proteína ATRX.** En el carboxilo terminal se muestra el dominio helicasa/ATPasa, que la caracteriza como miembro de la familia SNF2 de las proteínas asociadas a la cromatina y en su extremo amino terminal el dominio ADD, que consiste en un dominio PHD (*Plant Homeo Domain*) y un dominio tipo GATA. Los círculos en la parte superior representan mutaciones estructurales que han sido identificadas en pacientes con síndrome ATRX y el número de veces que cada mutación ha sido observada en pacientes independientes (Modificado de Argentaro *et al*, 2007)<sup>35</sup>.

En mamíferos, la histona H3 tiene algunas variantes. La variante H3.1 y la histona canónica H3.2 son sintetizadas durante la fase S del ciclo celular y son incorporadas *de novo* en la cromatina recién replicada, así como durante la reparación del DNA. La variante CENP-A es específica de centrómero<sup>41</sup>, mientras que la H3.3 es una variante de reemplazo expresada durante la interfase que difiere de H3.2 en la sustitución de cuatro aminoácidos (Ser<sub>31</sub>, Ala<sub>87</sub>,

Ile<sub>89</sub>, Gly<sub>90</sub>), es depositada en diversas regiones del genoma por proteínas chaperonas y se encuentra enriquecida en *loci* transcripcionalmente activos<sup>42</sup>.

La proteína ATRX interactúa con la proteína DAXX (*Death domain Associated Protein*), formando un complejo que actúa como catalizador para la deposición de la variante de histona H3.3 en regiones pericentroméricas y teloméricas, que es esencial para el mantenimiento de la cromatina en los telómeros<sup>43</sup>. Recientemente se ha observado que mutaciones en el complejo ATRX/DAXX promueven el mantenimiento telomérico alternativo independiente de telomerasa conocido como ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*) en diversos tipos de cáncer como en tumores pancreáticos, glioblastoma multiforme, oligodendrogliomas, meduloblastomas y neuroblastomas<sup>44</sup>.

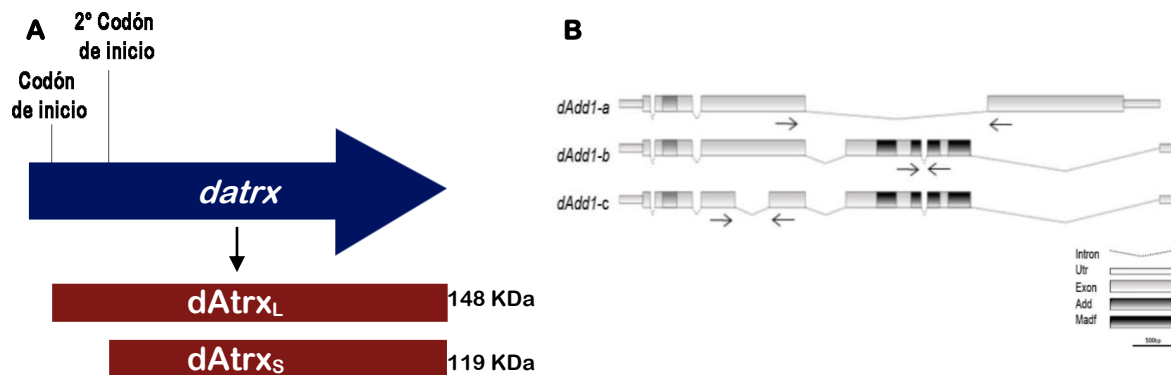
### **La conservación de ATRX en *D. melanogaster***

La proteína ATRX está altamente conservada, en *D. melanogaster* el gen *dattrx* (*xnp*) es el homólogo putativo de *hATRX* y codifica para la proteína dAtrx de 145 KDa, también llamada XNP (*X-linked Nuclear Protein*). Esta proteína conserva el dominio helicasa/ATPasa pero no incluye el dominio ADD, el cual está codificado por el gen *dadd1*<sup>45</sup>. Previamente se determinó que el ancestro común de los eucariotas superiores poseía la proteína con ambos dominios ADD y helicasa/ATPasa pero en los insectos ocurrió un evento de fisión en el que los dominios quedaron separados y son codificados por genes diferentes, siendo la proteína ADD el ortólogo funcional del dominio ADD de ATRX<sup>46</sup>.

dAtrx presenta dos isoformas debido al uso de dos codones de inicio para su traducción como se esquematiza en la Figura 4A. La isoforma larga (dAtrx<sub>L</sub>) que se localiza principalmente en la heterocromatina y el cromocentro de cromosomas politénicos obtenidos de glándulas salivales de mosca. Además dAtrx<sub>L</sub> co-localiza en la heterocromatina con la proteína HP1a e interactúa directamente con ella; mientras que la isoforma corta (dAtrx<sub>S</sub>) se localiza preferencialmente en la eucromatina y se une a diversos sitios eucromáticos en los brazos de los cromosomas<sup>47</sup>.

Recientemente se logró identificar al gen *CG8290*, nombrado *dadd1*<sup>45</sup> que codifica para tres isoformas del dominio ADD (dAdd1-a, dAdd1-b y dAdd1-c) generadas por *splicing* alternativo. Estas isoformas se localizan en regiones heterocromáticas, se expresan a lo largo del desarrollo y conservan un dominio ADD en su extremo N-terminal. Adicionalmente, las isoformas dAdd1-b y dAdd1-c también poseen en el extremo carboxilo terminal dominios MADF (*myb/Sant-like domain in Adf1*) que pueden reconocer secuencias repetidas de DNA, como se muestra en la Figura 4B<sup>46,48</sup>.

La proteína dAtrx es importante en el mantenimiento de la heterocromatina ya que es un supresor de la variegación<sup>47</sup> y se ha encontrado asociada a la heterocromatina tipo beta. A diferencia de la heterocromatina tipo alfa, que es transcripcionalmente inerte, la heterocromatina beta tiene un gran número de genes y elementos transponibles activos<sup>49</sup>.



**Figura 4: Isoformas de las proteínas dAtrx y dAdd1.** En el inciso A se esquematizan las dos isoformas de dAtrx expresadas a partir del cDNA de *dAtrx*, la proteína dAtrx<sub>L</sub> generada a partir del primer codón de inicio de la traducción y la dAtrx<sub>S</sub> sintetizada debido a la presencia de un segundo codón de inicio en el amino 266 (Basado en Bassett *et al*, 2008)<sup>47</sup>. En el inciso B se muestran las tres isoformas de dAdd1 generadas por *splicing* alternativo con sus diferentes dominios<sup>46</sup>.



## Antecedentes

Las mutaciones en *ATRX* causan diversas anormalidades en la regulación génica; pacientes con Alfa Talasemia presentan perturbaciones en la expresión de los genes de alfa-globina, así como un decremento en la metilación del DNA<sup>50</sup>. Por otro lado, utilizando ratones como modelo, se ha observado que la ausencia del gen *ATRX* es letal durante la embriogénesis temprana y causa defectos en la formación de trofoblastos extraembrionarios<sup>51</sup>; además, la inactivación condicional de *ATRX* en el cerebro anterior de ratones causa apoptosis durante la diferenciación de las neuronas corticales, indicando un papel importante de esta proteína en el desarrollo del cerebro<sup>52</sup>.

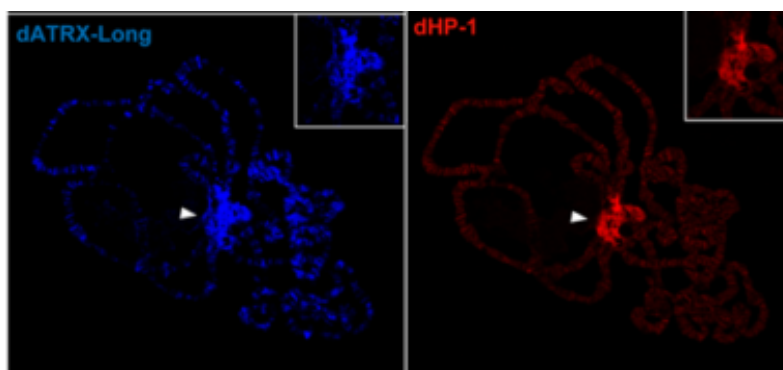
Como se mencionó previamente, *ATRX* forma un complejo con *DAXX* para mediar la deposición de la variante de histona H3.3. Se ha determinado que la localización de HP1a es dependiente de la asociación de *ATRX* con la histona H3.3 y que al mutar el residuo K4 de H3.3 se reduce su interacción con *ATRX*. Además, en los mutantes hipomorfos de *ATRX* se reduce el enriquecimiento de HP1a en los telómeros, sugiriendo que *ATRX* trabaja en conjunto con H3.3 y HP1a como un regulador de la cromatina telomérica<sup>53</sup>. Además *ATRX* y *DAXX* son capaces de interactuar con la variante de la histona H3 CENP-A, que se localiza específicamente en regiones centroméricas, y esta interacción se ve aumentada en células cancerosas humanas donde CENP-A pierde su regulación y su localización<sup>54</sup>.

Recientemente se ha determinado que *ATRX* actúa como regulador en el silenciamiento de retrotransposones IAP (Intracisternal A particle) ya que se une a estos elementos facilitando la formación de heterocromatina<sup>51</sup>. Por otro lado en células de ratón con mutaciones nulas de *ATRX* se presenta un incremento en la accesibilidad de la cromatina en secuencias de retrotransposones y *locus* heterocromáticos no repetitivos<sup>55</sup>. Adicionalmente se ha determinado que, como parte de la inactivación del cromosoma X, *ATRX* es capaz de unirse al RNA Xist para promover el reclutamiento del Complejo Represivo Polycomb 2 (PRC2) que está encargado del silenciamiento transcripcional en diversas regiones del genoma<sup>56</sup>.

*ATRX* es una de las pocas proteínas descritas hasta la fecha con capacidad de unirse a regiones ricas en guaninas (G) las cuales forman lo que se conoce como hélice cuádruple. Estas regiones ricas en G están presentes en los telómeros, sugiriendo un mecanismo por el cual genes asociados a estas secuencias pueden perder su regulación cuando *ATRX* se encuentra mutado<sup>57</sup>. Por otro lado, se ha descrito que la expresión de *locus* de genes  $\alpha$ -globina se ve afectada en individuos con mutaciones en *ATRX* pero estas mutaciones no afectan al *locus* de genes  $\beta$ -globina, lo que puede deberse a las diferencias entre ambos *loci* como el contenido de GC, la organización nuclear y el ambiente epigenético<sup>58,59</sup>, sugiriendo que las características estructurales podrían determinar si una secuencia es afectada o no por las mutaciones en *ATRX*.

La heterocromatina está comúnmente asociada con la represión génica y el mantenimiento de regiones especializadas de los cromosomas como los centrómeros y telómeros. La proteína HP1a es el mayor componente y marcador de la heterocromatina; en *D. melanogaster* HP1a está altamente concentrada en regiones pericéntricas y forma parte del CAP de los telómeros<sup>60</sup>; además se le ha asociado con la represión transcripcional y el *capping* de los telómeros a través de su unión directa al DNA y la formación de heterocromatina mediante la interacción de su cromodominio con H3K9me3<sup>13</sup>.

Como se muestra en la Figura 5, se ha observado que dAtrx co-localiza y es capaz de interactuar físicamente con HP1a<sup>47</sup> y que HP1a puede estimular la actividad de ATPasa de dAtrx *in vitro*<sup>49</sup>. Mutaciones en el gen *datrx* causan una deposición reducida de HP1a en la heterocromatina beta pericéntrica del cromosoma X, demostrando que dAtrx juega un papel importante en la función de la heterocromatina<sup>49</sup>.



**Figura 5: Co-localización de la isoforma larga de dAtrx y HP1a.** Realizando inmunotinciones en cromosomas politénicos de *D. melanogaster* se observó que la isoforma larga de dAtrx co-localiza en regiones heterocromáticas, específicamente en el cromocentro, con HP1a<sup>47</sup>.

Al realizar *pull-down* de las proteínas que interactúan con HP1a se identificó a dAdd1 como el principal interactante de esta proteína<sup>45</sup>. Adicionalmente, en un trabajo previo en el laboratorio se logró demostrar mediante *pull-down* y ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina que los productos del gen *dadd1* interactúan físicamente con la isoforma larga de dAtrx y con HP1a, proponiendo así a las proteínas dAdd1 como los ortólogos del dominio ADD de humano en *D. melanogaster*<sup>46</sup>.

Por otra parte en el grupo de Kingston *et al*, 2012<sup>61</sup>, mediante un análisis proteómico de segmentos aislados de cromatina (PICH) de *D. melanogaster* que involucra un *pull-down* y detección por espectrometría de masas, se purificaron y analizaron las proteínas asociadas a secuencias TAS. Estas proteínas fueron validadas mediante un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina, describiendo entre muchas otras, que dAtrx junto con dAdd1 están presentes en la región telomérica TAS.

La regulación de los mecanismos de mantenimiento telomérico es un aspecto crucial para el correcto funcionamiento de las células; en el caso de *D. melanogaster* el silenciamiento mediado por piRNAs y siRNAs se ha relacionado con la regulación de elementos móviles sin embargo aún no se han descrito todos los factores que pudieran estar involucrados en este proceso.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado la localización de dAtrx y dAdd1 en los telómeros y su interacción con proteínas de heterocromatina pero además se ha determinado que el retrotransposón *Het-A* contiene secuencias con tendencia a formar estructuras del tipo cuádruplex de guanina<sup>62</sup>, por lo que estas estructuras podrían ser un blanco para el reconocimiento y regulación del elemento *Het-A* por dAtrx o dAdd1.

Considerando las funciones reportadas hasta el momento para la proteína ATRX y sus homólogos en *D. melanogaster*, resulta de interés estudiar cuál es el papel que juegan estas proteínas en la regulación de la integración al genoma de las secuencias teloméricas y en el mantenimiento de la estabilidad cromosomal. Por esta razón hemos hipotetizado que alguna de las isoformas de dAtrx, o ambas, en conjunto con dAdd1 están involucradas en el correcto mantenimiento telomérico. En este trabajo decidimos analizar si moscas con alelos mutantes de *datrix* (como ortólogo del dominio helicasa/ATPasa de ATRX) y alelos mutantes de *dadd1* (como ortólogo del dominio ADD) tienen diferencias en la longitud de los telómeros al comparar con moscas silvestres, así como tratar de elucidar el mecanismo por el que estos factores pueden estar involucrados en el silenciamiento de los retrotransposones del arreglo HTT en células germinales y somáticas de *D. melanogaster*.

## Hipótesis

Las proteínas dAtrx y dAdd1 están involucradas en la regulación de los retrotransposones del arreglo HTT en *Drosophila melanogaster*.

## Objetivos

### Objetivo General

Determinar si las proteínas dAtrx y dAdd1 se requieren para el correcto mantenimiento de los telómeros de la mosca *Drosophila melanogaster*.

### Objetivos Particulares

1. Determinar si la disminución de las proteínas dAtrx y dAdd1 afecta el número de copias en el genoma de los retrotransposones del arreglo HTT en las células somáticas y en células de la línea germinal.
2. Analizar si la disminución de dAtrx y dAdd1 afecta la expresión de los retrotransposones del arreglo HTT en las células somáticas y en células de la línea germinal.
3. Evaluar si existe una interacción genética entre *dadd1* y *datrx* con la vía de silenciamiento de retrotransposones mediada por piRNAs.

## Materiales y métodos

### Obtención y mantenimiento de las líneas de moscas

La línea silvestre  $w^{1118}$  y las moscas con alelos mutantes se mantuvieron en comida estándar (Para 1L: levadura, 100g; melaza, 100g; agar, 9g; ácido propiónico, 10ml) a 25°C. Las líneas que llevan alelos mutantes de *datrx* y el driver *sgs3-Gal4* fueron obtenidas del Bloomington *Drosophila* Stock Center NIH P40OD018537. La línea de alelo mutante *dadd1*<sup>NP0793</sup> se obtuvo del *Drosophila* Genetic Resource Center, Kyoto Institute of Technology y la mutante nula *dadd1*<sup>2</sup> cuya obtención es descrita en el trabajo de Alekseyenko *et al*, 2014<sup>45</sup>, fue generosamente donada por la Dra. Mitzi Kuroda.

### Obtención de líneas transgénicas para ensayos de rescate

Las líneas que sobreexpresan las isoformas dAdd1a y dAdd1b se obtuvieron durante el trabajo de doctorado de la M.C. Silvia Meyer (datos no publicados). El cDNA de *dAdd1a* fue obtenido de la construcción previamente reportada utilizando el vector pAc5.1/V5-HisA y los sitios de restricción *EcoR* I-*Not* I del plásmido pUAST<sup>46</sup>. Para la isoforma *dAdd1b* el cDNA se amplificó de la clona LD24316 (BDGP Gold collection of *Drosophila* Genomics Resource Center) y se clonó en el plásmido pUAST utilizando los sitios de restricción *EcoR* V-*Not* I. Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados para asegurar la correcta inserción del fragmento de interés. El DNA de los plásmidos fue enviado a la compañía Bestgene para obtener las líneas transgénicas *UAS-dadd1a* y *UAS-dadd1b*. Las líneas que contenían inserciones en el tercer cromosoma fueron seleccionadas. Las moscas vírgenes de estas líneas se cruzaron con machos del stock disponible en el laboratorio  $w^{1118}; Sp/CyO; MKRS, Sb/ TM6B, Tb$  para obtener balanceadores en el segundo y tercer cromosoma. La inserción transgénica se siguió mediante la complementación con *white*. Se obtuvieron las líneas  $w^{1118}; Sp/CyO; UAS-dadd1a/ TM6B, Tb$  y  $w^{1118}; Sp/CyO; UAS-dadd1b/ TM6B, Tb$ . Después estas líneas se cruzaron con la línea  $w^{1118}; dadd1^2/ CyO; TM6B, Tb/ MKRS, Sb$  para obtener el stock  $w^{1118}; dadd1^2/ dadd1^2; UAS-dadd1a/ TM6B, Tb$  (o *UAS-dadd1a*). Para expresar de manera condicional las isoformas en las glándulas salivales, se utilizaron machos de las líneas  $w^{1118}; dadd1^2/ dadd1^2; UAS-dadd1a/ TM6B, Tb$  (*UAS-dadd1a*) o  $w^{1118}; dadd1^2/ dadd1^2; UAS-dadd1b/ TM6B, Tb$  (*UAS-dadd1b*) y se cruzaron con hembras vírgenes de la línea  $w^{1118}; dadd1^2/ dadd1^2; sgs3-Gal4/ TM6B, Tb$ . Todas las cruza se mantuvieron a 18°C. La expresión de las proteínas dAdd1a y dAdd1b se probó mediante inmunotinción con el anticuerpo pandAdd1. Posteriormente se extrajeron glándulas salivares provenientes de larvas machos de tercer instar para realizar la preparación de cromosomas politénicos e hibridaciones *in situ*.

### **Separación de machos y testículos**

Tanto para el análisis de DNA genómico como para el análisis de expresión, se analizaron líneas de *D. melanogaster* que llevan alelos mutantes de *dtrx*, *dadd1* y *piwi*. Como controles se utilizó la línea silvestre *w<sup>1118</sup>* y la línea *Gaiano (GIII)*, la cual lleva una mutación no mapeada que genera más copias de los retrotransposones del arreglo HTT.

Con ayuda de los balanceadores y marcadores presentes en los alelos mutantes, para cada genotipo se seleccionaron 20 machos adultos de entre 1 y 5 días post-eclosión por réplica biológica, posteriormente se anestesiaron utilizando CO<sub>2</sub> para realizar la disección de los testículos en solución PBS 1X (NaCl, 137 mM; KCl, 2.7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 mM).

### **Extracción de RNA total y DNA genómico**

Para realizar la extracción de RNA y DNA genómico se trató de manera separada a los testículos, que representaron a la línea germinal, y el resto de la mosca adulta que representó a las células somáticas.

La extracción de RNA se llevó a cabo utilizando TRIzol Reagent Total Isolation (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido se resuspendió en agua destilada estéril tratada con DEPC y se almacenó a -20°C.

Para la extracción de DNA genómico se probaron los protocolos descritos por Huang<sup>63</sup>, Sullivan<sup>64</sup> y Scott<sup>65</sup> para elegir el método que permitiera extraer DNA de alto peso molecular con la mayor calidad e integridad posible (Ver Anexo 3). Siguiendo el protocolo de Scott *et al*, 1983<sup>65</sup> se disectaron 10 adultos en PBS 1X y se homogenizaron en 500µl de Buffer 1 (sacarosa, 0.35M; EDTA, 0.1M; Tris pH 8, 50mM; Triton X-100, 0.5%), se centrifugó a 7Krpm por 10 min y se desechó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 500 µl de Buffer 2 (NaCl, 0.15M; Tris pH 8, 20mM; EDTA, 10mM), se agregó Proteinasa K 0.5mg/ml y SDS 1%, se incubó a 65°C por 1h, se realizó una extracción con fenol/cloroformo y se hicieron dos lavados con etanol 100% y 70%. El DNA obtenido se resuspendió en buffer TE y se trató con RNAsa A utilizando 0.1µg/µl e incubando a 37°C por 1h, posteriormente se almacenó a -20°C.

### **Determinación de la abundancia de transcritos y número de copias de los retrotransposones en el DNA genómico**

El RNA aislado de machos y testículos fue utilizado para sintetizar cDNA siguiendo el protocolo para la enzima M-MVL Reverse Transcriptase (Invitrogen); para esto se utilizó 1µg de RNA total, 0.025µg/µl de Random Primer, 0.025 µg/µl de Oligo dT y 10U/µl de M-MLV Reverse transcriptase. Posteriormente el cDNA sintetizado y el DNA genómico extraído se analizaron mediante qRT-PCR utilizando el LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green 1 en el equipo LightCycler 1.5 Instrument (Roche). Para la reacciones se utilizaron los

oligonucleótidos específicos enlistados en la Tabla 1, diseñados para determinar la expresión de los retrotransposones del arreglo HTT, así como la cantidad de inserciones en el DNA genómico de la línea germinal y células somáticas. Como referencia se cuantificará el gen unicopia *RP2* (*Rap2l*) que codifica para una proteína perteneciente a la familia de las RAS GTPasas que se encuentra de manera ubicua en el organismo en todas las etapas de desarrollo; además se encuentra entre los genes recomendados para utilizar como referencia en análisis por qRT-PCR<sup>66</sup>. Las muestras se mantuvieron primero a 95°C por 10 min, seguido por 45 ciclos a 95°C por 10s, la temperatura de alineamiento por 10s y a 72°C por 18s. Las temperaturas de alineamiento fueron 55°C para *Het-A*, 60°C para *TART* y *Rap2l* y 65°C para *TAHRE*. Las mediciones de fluorescencia se capturaron y analizaron utilizando el Software LightCycler 1.5 versión 3.5.3 (Roche), y el Ct se utilizó para obtener los niveles relativos de *Het-A*, *TART* and *TAHRE* comparado con *Rap2l* para la abundancia de transcritos y número de copias de DNA. Los niveles relativos en los genotipos mutantes se compararon con los niveles relativos en la línea silvestre para obtener el *fold difference* utilizando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT} = \frac{[(C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno}) \text{ muestra A} - (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno}) \text{ muestra B}]}{}$  reportada para cuantificación relativa por tiempo real<sup>67</sup>. Cada medición se realizó por triplicado (triplicado técnico) a partir de tres réplicas biológicas independientes.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados en el análisis por qPCR

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
Het-A 3'	GCCAGCGCATTTTCATGC
Het-A 5'	ACAGATGCCAAGGCTTCAG
TAHRE 3'	GCAGCTCCTCGACTATCCAC
TAHRE 5'	TCATCTTCCAGGAGCCCAGA
TART 5'	GCAAAGTGAATGGAAGCCA
TART 3'	TCTTAGTAGGCGGGTGACGA
RP2 F	GACTGGTGGTTCGGCCAAGA
RP2 R	TGTCAGGCCGCAAGATACG
Piwi F	AGAGCGAAAGCCGTGGGGTG
Piwi R	ACGATCCGCCATTCCGGCTT

### Hibridación *in situ* de cromosomas politénicos

Para complementar el análisis del número de copias de los retrotransposones en el DNA genómico y corroborar su localización en las regiones teloméricas, se realizaron hibridaciones *in situ* de cromosomas politénicos. Los cromosomas politénicos se extrajeron de glándulas salivales de larvas del tercer instar provenientes de las líneas control y mutantes. Para la extracción de los cromosomas, las glándulas se colocaron primero en una solución de ácido acético al 40%, seguido de una solución de ácido lactoacético (H<sub>2</sub>O; ácido acético, 50% y ácido láctico, 17%), posteriormente se realizó el *squash* en un portaobjetos tratado con Poly-L-Lisina y se guardaron en etanol a 4°C. Se sintetizaron sondas de DNA

específicas para *Het-A* y *TAHRE* utilizando como templado 200ng de DNA genómico proveniente de machos silvestres, marcadas con digoxigenina utilizando el Kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos: *Het-A* Forward 5'- TCAATTTTTCGGCACCTG -3', *Het-A* Reverso 5'- GGTGTGGAGTGGTGGAGATG -3', *TAHRE* Forward 5'- TCATCTCCAGGAGCCCAGA -3', *TAHRE* Reverso 5'- GCAGCTCCTCGACTATCCAC -3'. La hibridación *in situ* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por *Sullivan et al*<sup>64</sup>.

La sonda sintetizada se cuantificó y se utilizaron 200 ng de sonda de DNA por laminilla. La detección se realizó incubando las muestras con el anticuerpo 1:200 Anti-Digoxigenin-Rhodamine Fab Fragments (Roche). Para la tinción del DNA de los cromosomas se realizó una incubación con 3.5µg/ml de DAPI a temperatura ambiente por 10 minutos.

Las laminillas de los genotipos mutantes y los controles se trataron de manera simultánea con el fin de mantener las mismas condiciones de tratamiento. Las muestras se observaron utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000 con el objetivo 60x con una apertura 1.3. Las imágenes se procesaron utilizando el software ImageJ (Fiji) y Adobe Photoshop CS.

### **Análisis estadístico**

Para determinar las diferencias significativas entre los genotipos mutantes y la línea de tipo silvestre, se analizaron los datos obtenidos por PCR tiempo real mediante la prueba estadística U de Mann-Withney, utilizando el software RStudio. Se tomaron en cuenta las mediciones obtenidas en las tres réplicas biológicas con triplicados técnicos.



## Resultados

La disminución de las proteínas dAtrx y dAdd1 afecta el número de copias de los retrotransposones en el genoma de las células somáticas

Para analizar el número de copias de los retrotransposones en el genoma se utilizó el DNA genómico extraído de machos sin testículos pertenecientes a los genotipos con diferentes combinaciones de alelos mutantes *dadd1* y *datrx* (Ver Anexos 1 y 2), así como las muestras control  $w^{1118}$  que es el fondo genético sobre el cual se hicieron las mutaciones y *GIII* que es una cepa que posee telómeros más largos. Posteriormente se realizó la cuantificación mediante PCR tiempo real de las copias de cada uno de los retrotransposones del arreglo HTT en el genoma. Para realizar los cálculos de manera precisa de acuerdo a la eficiencia de los oligonucleótidos en cada genotipo, se realizaron curvas estándar considerando en la fórmula la eficiencia obtenida. Se utilizó el gen unicopia *RP2 (Rap2I)* como gen de referencia, y para normalizar se consideró como base la cantidad de copias encontradas en moscas de la línea silvestre  $w^{1118}$ , por lo que los valores mostrados en la Figura 6 están expresados como una diferencia entre el número de copias de retrotransposones en el genotipo mutante y la línea control.

Adicionalmente se colocó al inicio de cada gráfica la línea control  $w^{1118}$  para mostrar la variabilidad intrínseca del fondo genético utilizado (Fig. 6 genotipo 1). Con el fin de analizar si las diferencias respecto a la cepa control son significativas, se realizó la prueba estadística U de Mann Whitney que es una prueba no paramétrica que permite analizar diferencias significativas entre poblaciones pequeñas sin la condición de tener una distribución normal.

Como se puede observar en la Figura 6, la cepa *GIII* tuvo mayor cantidad de copias de *Het-A*, *TART* y *TAHRE* que coincide con los reportes previos en que se menciona que esta cepa se caracteriza por tener telómeros más largos, sin embargo no se ha descrito hasta ahora qué sucede con cada uno de los retrotransposones. De acuerdo a las mediciones obtenidas se puede observar que los tres retrotransposones presentaron un número de copias mayor al de la línea control ( $w^{1118}$ ); sin embargo, el *fold difference* no fue el mismo entre los diferentes transposones. La línea *GIII* mostró el doble de inserciones de *Het-A* que la cepa silvestre y tuvo 2.5 veces más inserciones de *TAHRE*, siendo estos los niveles más altos, mientras que se detectaron solamente 1.5 veces más copias de *TART* que el control.

Aunque existen genotipos que presentan una gran variabilidad en las mediciones, de manera general se determinó que *TART* y *Het-A* mantuvieron un número de copias cercano al de la línea silvestre en la mayoría de los genotipos, incluso algunos genotipos mostraron una tendencia a la baja en el número de copias. Sin embargo en moscas con genotipo doble mutante para el alelo nulo *dadd1* en combinación con el alelo *datrx*<sup>2</sup> (Fig. 6 genotipo 10) se observó un aumento en el número de copias en el genoma.

Por otro lado *TAHRE* mostró un comportamiento heterogéneo, presentó un aumento en moscas con diferentes combinaciones de alelos mutantes de *dadd1* y *datrx* (Fig. 6 genotipos 7 y 8) pero el mayor aumento en el número de copias respecto al control se observó en moscas que llevan una combinación heteroalélica con genotipo mutante para *datrx* (Fig. 6 genotipo 5), esta es una observación inesperada ya que este genotipo no mostró aumento en el número de copias de *Het-A* o *TART* en el genoma. Contrario a lo que se esperaba, en el fondo nulo *dadd1* no se observó un aumento en el número de copias de *TAHRE* en el genoma, esto tampoco se presentó en la combinación del fondo nulo *dadd1* con el alelo mutante *datrx*<sup>2</sup> como observamos en los retrotransposones *Het-A* y *TART*.

Estos resultados dan un primer indicio de que *dAtrx* y *dAdd1* tienen un papel en el silenciamiento de estos retrotransposones en células somáticas. Los resultados también indican que la regulación no está generalizada a todo el arreglo HTT sino que afecta de manera diferencial a algunos de los elementos de este arreglo.

Una observación importante en las mediciones de *TART* y *Het-A* es que si comparamos las mutantes en las que únicamente se afecta *dadd1* (Fig. 6 genotipos 6 y 9) con la mutante en donde se tiene la combinación del fondo nulo *dadd1* y el alelo mutante *datrx*<sup>2</sup> (Fig. 6 genotipo 10), se detectó pérdida del silenciamiento de estos retrotransposones. Además, en el caso de *Het-A* existen diferencias entre la combinación heteroalélica *dadd1* con *datrx*<sup>2</sup> o *datrx*<sup>3</sup> (Fig. 6 genotipos 7 y 8), mostrando mayor número de copias la combinación con el alelo que afecta a ambas isoformas de *dAtrx* (*datrx*<sup>2</sup>) que la condición donde solamente se afecta a la isoforma larga de *dAtrx* (*datrx*<sup>3</sup>).

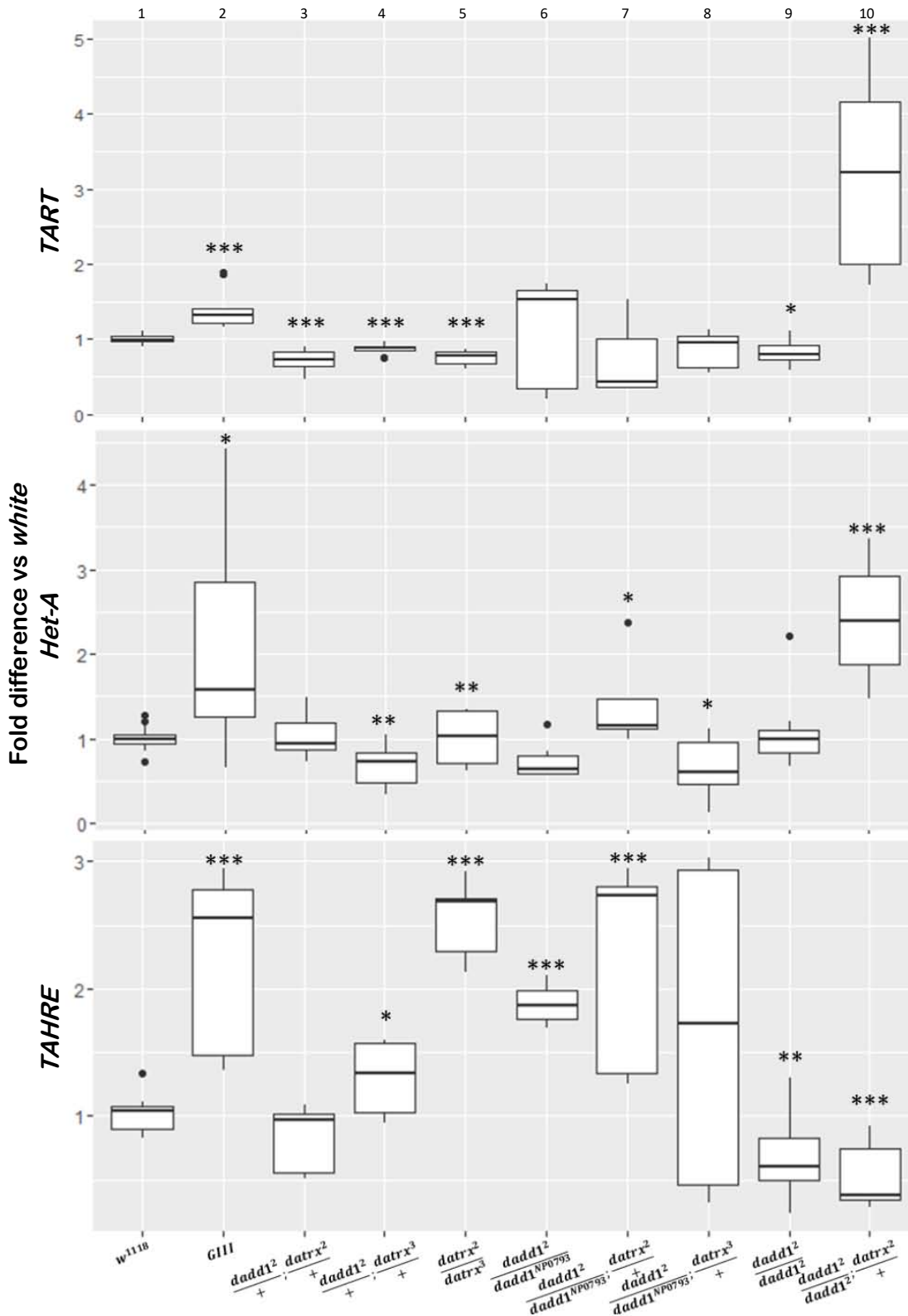


Figura 6: Mutaciones en *datrx* y *dadd1* afectan el número de copias de los retrotransposones en células somáticas. Los datos corresponden al número de copias de *Het-A*, *TART* y *TAHRE* respecto a la cepa control *w<sup>1118</sup>*. Se muestra el nivel de significancia valor P \*<0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.001 obtenido mediante el estadístico U de Mann Whitney.

## La disminución de las proteínas dAtrx y dAdd1 afecta la abundancia de transcritos de los retrotransposones en células somáticas

Como se observaron diferencias significativas en la cantidad de copias en el genoma con respecto a la cepa control en algunos de los genotipos analizados, se decidió analizar la abundancia de transcritos de los retrotransposones con el fin de elucidar si el aumento en la longitud telomérica se está llevando a cabo mediante retrotransposición.

Utilizando el cDNA sintetizado a partir de las extracciones de RNA total se realizó la cuantificación relativa por qPCR de los transcritos de *Het-A*, *TAHRE* y *TART* tomando como referencia la cantidad de transcritos del gen unicopia *RP2* como se muestra en la Figura 7.

En el caso de *GIII*, se observó una relación entre un mayor número de copias en el genoma (Fig.6 genotipo 2) y una mayor abundancia de transcrito respecto al control (Fig. 7 genotipo 2). Es importante decir que hasta el momento no se ha caracterizado el comportamiento de los retrotransposones del arreglo HTT en esta cepa por lo que resulta interesante ver diferencias en el nivel de expresión y la inserción de copia entre los tres elementos.

En el caso de *TART*, se observó de manera general un aumento en los niveles de transcrito, para todos los genotipos analizados (Fig. 7 genotipos 3 a 10). De manera interesante en la mutante nula *dadd1* (Fig. 7 genotipo 9) este aumento fue muy pronunciado aunque no se vio reflejado en el aumento de número de copias en el genoma. Por otro lado, el genotipo mutante *dadd1*<sup>2</sup> homocigoto en combinación con *dattrx*<sup>2</sup> (Fig. 7 genotipo 10) mostró un aumento en los transcritos de *TART* que correlaciona con el aumento en el número de copias en el genoma observado en la gráfica anterior. Esto indica que la mutación en *dadd1* afecta los niveles del transcrito, pero es necesario afectar también *dattrx* para completar el mecanismo de retrotransposición.

Por otro lado en los genotipos mutantes las mediciones de *Het-A* (Fig. 7 genotipos 3 a 6, 8 y 9) resultaron muy cercanas a la muestra silvestre, excepto por las combinatorias de alelos doble mutantes para *dadd1* con *dattrx*<sup>2</sup> (Fig. 7 genotipos 7 y 10) donde se observó un aumento significativo respecto al control aunque menor al observado en *TART*. Mientras que todas las mediciones de *TAHRE* (Fig. 7 genotipos 3 a 10) presentaron un comportamiento similar a la muestra silvestre.

Para el retrotransposón *TAHRE* en la condición heteroalélica para *dattrx* (Fig. 7 genotipo 5) no se observó una relación entre la abundancia de transcrito y la inserción de copias, lo que nos lleva a pensar que podría estar actuando el mecanismo de recombinación homóloga. Otra posible explicación a este comportamiento es que la secuencia de *TAHRE* evaluada mediante qPCR no corresponda únicamente a la región telomérica ya que se ha reportado que existen secuencias parciales de *Het-A* y *TART* en la región pericentromérica del cromosoma Y<sup>68,69</sup>. Aunque hasta el momento no se han reportado secuencias de *TAHRE* no teloméricas, existe la posibilidad de que la cuantificación tenga un aporte tanto de las

secuencias teloméricas como pericentroméricas, explicando el comportamiento heterogéneo que observamos en la tercera gráfica de la Figura 7.

Algo que debe notarse también es que la desregulación de los transcritos y el número de copias se vieron incrementados ante una disminución en la cantidad de la proteína dAdd1 ya que si comparamos el genotipo heteroalélico de *dadd1* (Fig. 7 genotipo 6) con la mutante homocigota en *dadd1* (Fig. 7 genotipo 9) vemos un incremento aún mayor en el número de copias en el genoma de *Het-A* y la abundancia de transcritos de *TART*. Lo mismo ocurre si comparamos en *Het-A* y *TART* la condición heteroalélica *dadd1* en combinación con *datrx*<sup>2</sup> (Fig. 7 genotipo 7) y la condición doble mutante homocigota *dadd1* en combinación con *datrx*<sup>2</sup> (Fig. 7 genotipo 10) que es el genotipo que muestra la mayor pérdida de silenciamiento. En el resto de los genotipos mutantes se presentaron diferencias significativas aunque la cuantificación fue muy cercana a la cepa silvestre, comportamiento que concuerda con lo observado en la gráfica del número de copias en el genoma.

Estos resultados indican que, aunque en algunas líneas mutantes la expresión de los transcritos de los retrotransposones no corresponde completamente con el número de copias en el DNA genómico, sí se observa una relación en la pérdida de regulación ante la falta de dAdd1 y dAtrx.

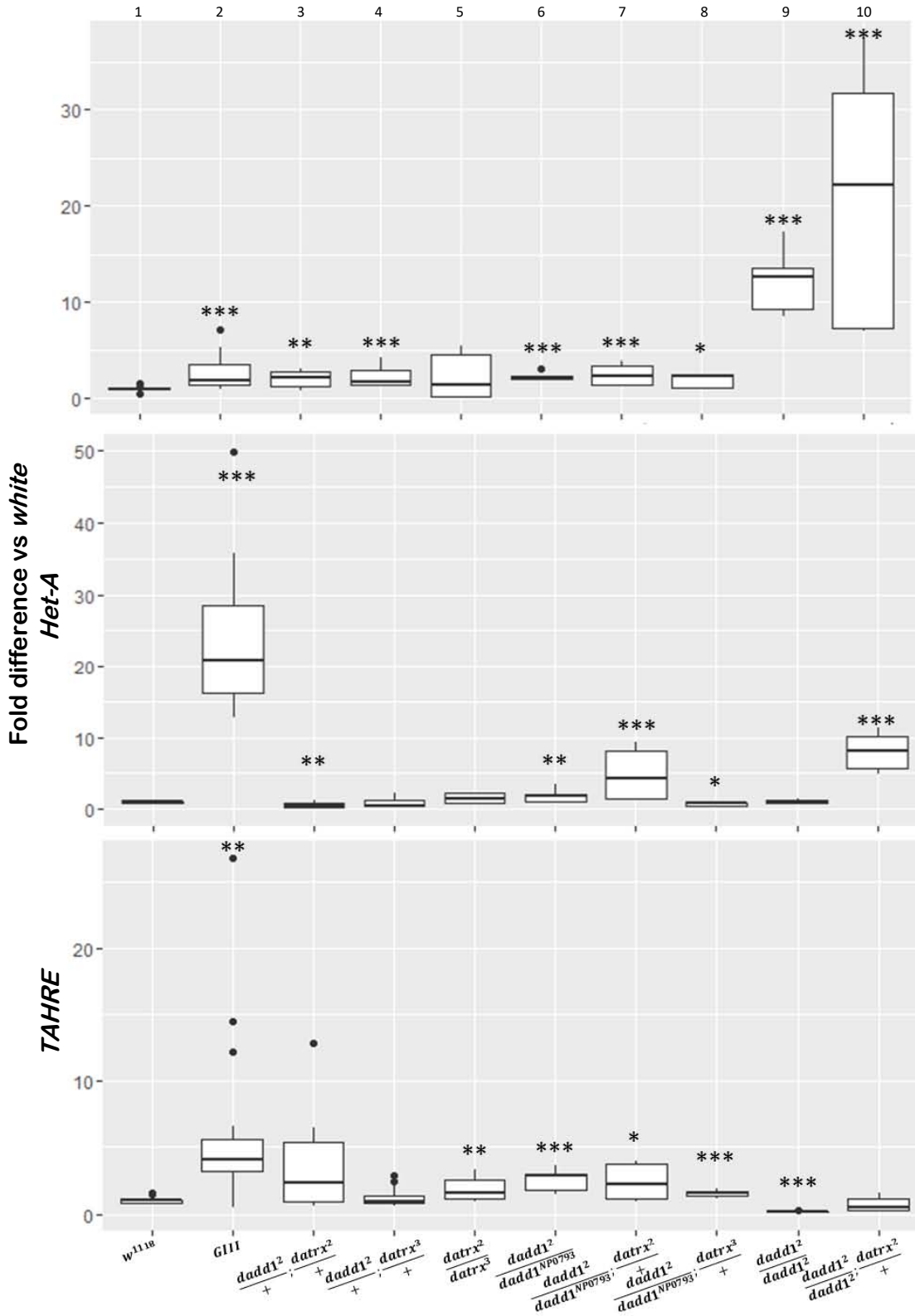
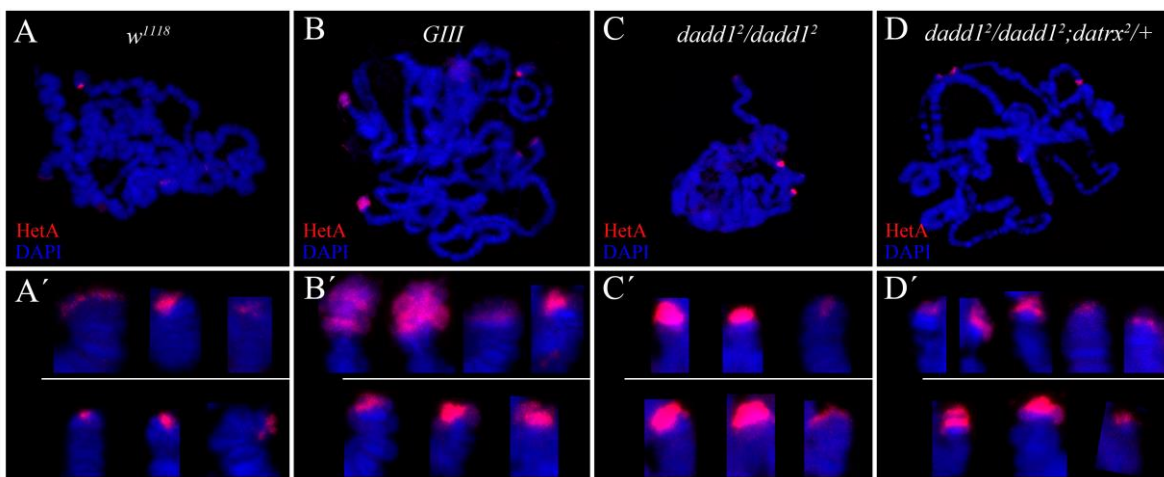


Figura 7: Mutaciones en *datrx* y *dadd1* afectan la abundancia de transcritos de retrotransposones en células somáticas. Los datos están representados como abundancia de transcritos respecto al silvestre. Se muestra el nivel de significancia valor P \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001.

El aumento en las copias de *Het-A* ocurre específicamente en los telómeros y causa fusiones teloméricas.

Una vez que se observó que en moscas con alelos mutantes de *datrx* y *dadd1* se tenía una pérdida en el silenciamiento de los retrotransposones del arreglo HTT en células somáticas, se realizaron hibridaciones *in situ* de cromosomas politénicos con el fin de conocer si estas secuencias de DNA se insertaron únicamente en la región telomérica o si son capaces de perder su localización e integrarse en otras regiones del cromosoma.

Utilizando la sonda de DNA correspondiente a *Het-A* marcada con Digoxigenina, se llevó a cabo la hibridación *in situ* de cromosomas politénicos provenientes de larvas de tercer instar. Se utilizaron moscas de la cepa silvestre  $w^{1118}$ , *GIII* como control positivo, la condición nula para dAdd1 ( $dadd1^2/dadd1^2$ ) y la doble mutante nula dAdd1 en combinación con la disminución de dAtrx ( $dadd1^2/dadd1^2; datrx^2/+$ ) que son los genotipos con mayor pérdida en el silenciamiento de los elementos del arreglo HTT. Posteriormente las muestras se observaron en el microscopio confocal obteniendo las imágenes mostradas en la Figura 8.

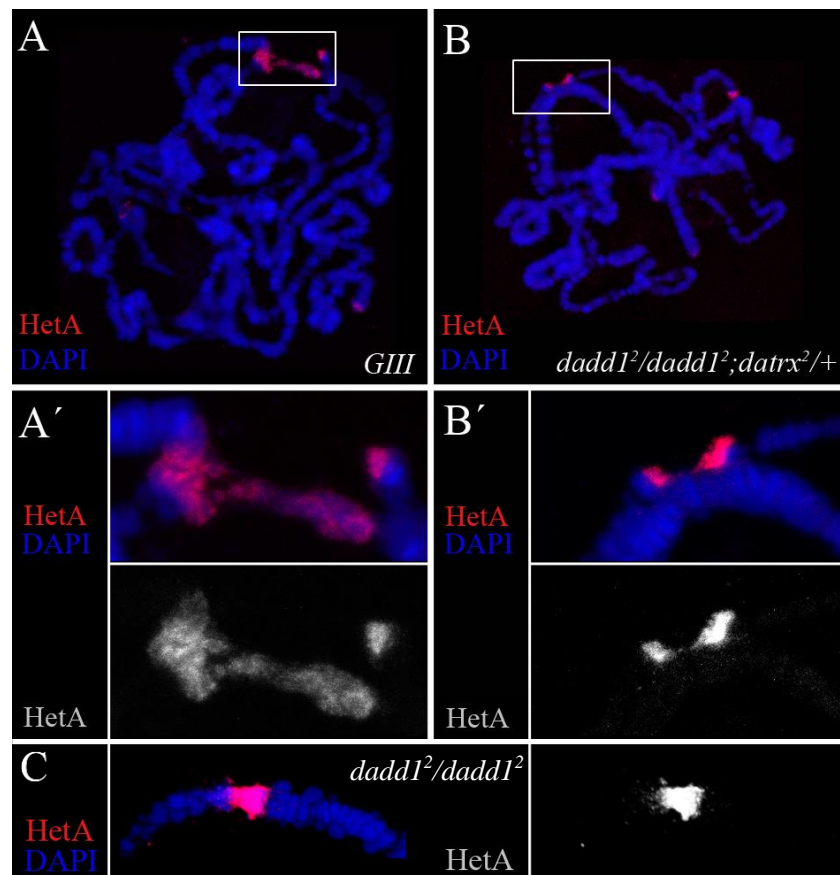


**Figura 8. Hibridación *in situ* de cromosomas politénicos con la sonda *Het-A*.** La señal correspondiente a la sonda de *Het-A* (en rojo) se localiza de manera específica en los telómeros. En los incisos A-D se muestran cromosomas provenientes de la cepa control  $w^{1118}$ , la cepa *GIII* como control positivo, el alelo nulo para dAdd1 y la combinatoria de alelos *dadd1* y *datrx* respectivamente. A'-D': se muestra una amplificación de la región telomérica de los diferentes brazos de los cromosomas.

Como podemos notar, en el caso de las muestras provenientes de cromosomas tipo silvestre ( $w^{1118}$ ), (Fig. 8A y A') se localiza la señal de *Het-A* únicamente en el extremo de los cromosomas. Si bien esta señal no se observó en todos los brazos de los cromosomas, sí podemos decir que es específica de la zona correspondiente a los telómeros y nos confirma que estas secuencias se encuentran únicamente en esta región. Al realizar la toma de

fotografías con un mayor aumento se perdió la nitidez y pareciera que los cromosomas están descondensados, esto probablemente se deba al tratamiento que se le da a las muestras durante la hibridación aunque la señal no pierde su localización telomérica.

En las muestras de la cepa *GIII* (Fig. 8B y B'), *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>* (Fig. 8C y C') y *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;datrx<sup>2</sup>/+* (Fig.8 D y D') se puede observar la señal de *Het-A* en un área más extendida, lo que sugiere un mayor número de copias de *Het-A* en los telómeros. Este resultado da mayor soporte a las mediciones de qPCR pues el número de copias observado tiene relación con la longitud telomérica. También nos confirma que el aumento de copias ocurre únicamente en la región telomérica en ausencia de las proteínas dAdd1 y dAtrx.



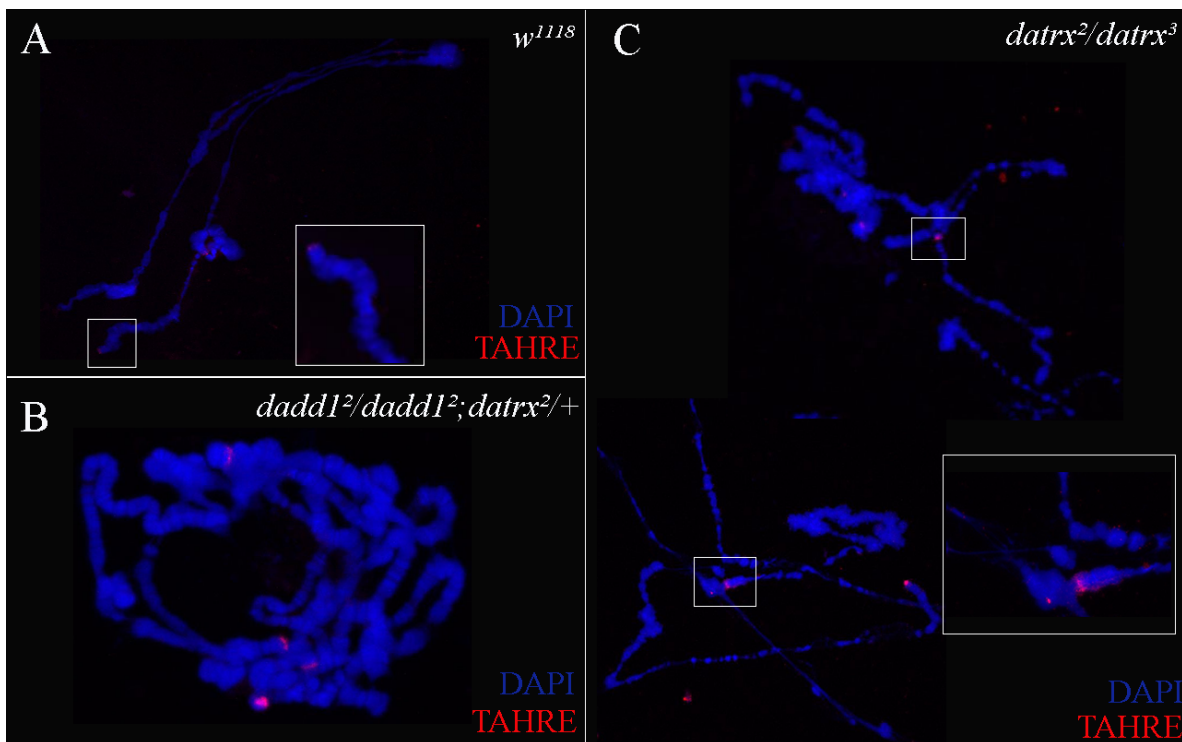
**Figura 9. Fusiones teloméricas en cromosomas politénicos.** Se observa que la señal correspondiente a la sonda de *Het-A* forma un puente entre dos cromosomas indicando la presencia de asociaciones teloméricas en *GIII* (A y A'), *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;datrx<sup>2</sup>/+* (B y B') y *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>* (C). El acercamiento a la región de las asociaciones se muestra en las imágenes inferiores.



Además, fue posible ver asociaciones teloméricas en los cromosomas politénicos provenientes de *GIII* (Fig. 9A y A'), previamente reportadas en esta cepa<sup>70</sup>. También se observaron fusiones teloméricas en los genotipos mutantes *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;datrx<sup>2</sup>/+* (Fig. 9B y B') y *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>* (Fig. 9C) que mostraron mayor pérdida del silenciamiento de los retrotransposones. Estas asociaciones probablemente están relacionadas con la inestabilidad cromosomal que se genera al tener una longitud telomérica desregulada.

Considerando que la cuantificación del número de copias de *TAHRE* insertadas en el genoma de las mutantes heteroalélicas de *datrx* (Fig. 6 genotipo 5) mostró un aumento con respecto a la cepa silvestre que no correlaciona con la abundancia de transcritos, se evaluó mediante hibridación *in situ* de cromosomas politénicos si este retrotransposón podía estar localizado en regiones fuera del telómero.

Utilizando una sonda específica para *TAHRE* marcada con digoxigenina se realizó la hibridación *in situ* en cromosomas politénicos de la cepa silvestre *w<sup>1118</sup>*, el genotipo mutante con mayor pérdida de silenciamiento (*dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;datrx<sup>2</sup>/+*) y la condición heteroalélica de *datrx* (*datrx<sup>2</sup>/datrx<sup>3</sup>*), como se muestra en la Figura 10.



**Figura 10. Hibridación *in situ* de cromosomas politénicos con la sonda *TAHRE*.** Se observa que la señal correspondiente a la sonda de *TAHRE* se encuentra únicamente en los telómeros de A) *w<sup>1118</sup>* y B) *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;datrx<sup>2</sup>/+* pero en C) *datrx<sup>2</sup>/datrx<sup>3</sup>* se encuentra en regiones teloméricas y pericentroméricas como se indica en el acercamiento.

Como se puede observar, en la cepa silvestre (Fig. 10A) y en la condición doble mutante *dadd1* en combinación con el alelo mutante *datrx* (Fig. 10B) el retrotransposón *TAHRE* solamente se encuentra en la región que corresponde a los telómeros; mientras que en la mutante heteroalélica *datrx* (Fig. 10C) el retrotransposón no solamente se encuentra en regiones teloméricas sino que se puede observar una banda clara en regiones pericentroméricas, como se hace notar en el recuadro del acercamiento hacia esta zona del cromosoma. Esta observación apoya la propuesta antes mencionada en la cual el aumento en el número de copias de *TAHRE* insertadas en el genoma de la mutante *datrx*<sup>2</sup>/*datrx*<sup>3</sup> puede estar dado por la presencia de secuencias teloméricas y pericentroméricas, aunque con los datos presentados hasta ahora no se podría descartar que ocurra también un mecanismo alternativo de recombinación homóloga que permita aumentar el número de copias de este retrotransposón. Sin embargo se puede decir que la regulación de este retrotransposón puede ser diferente a la de *Het-A* y *TART*.

La expresión de las isoformas dAdd1-a y dAdd1-b rescata parcialmente el fenotipo de extensión de los telómeros

Aunque en las cuantificaciones mediante PCR tiempo real no se observa un aumento en el número de copias de *Het-A* insertadas en el genoma de la mutante nula *dadd1* respecto a la cepa silvestre, este aumento en las secuencias insertadas sí fue visible mediante la hibridación *in situ* en los cromosomas politénicos (Fig. 8). Debemos tener presente que la cuantificación de los retrotransposones mediante qPCR se realizó en moscas adultas mientras que las hibridaciones *in situ* se realizaron en glándulas salivales de larvas por lo que no se puede descartar que las diferencias en las secuencias pueden deberse al tejido analizado. Además debe considerarse que la señal observada de *Het-A* no se analizó de manera cuantitativa debido a la pérdida de estructura de los cromosomas durante el tratamiento. Recordando que en *Drosophila* existen tres isoformas de dAdd1, se evaluó si expresando estas isoformas en un fondo nulo de dAdd1 se podía recuperar el fenotipo silvestre reflejado como inserción de copias del retrotransposón *Het-A* en regiones teloméricas de cromosomas politénicos. Se realizó la expresión de la isoforma dAdd1-a como representante del dominio ADD de la proteína y la expresión de la isoforma dAdd1-b para evaluar la importancia de la adición de los dominios MADF al dominio ADD.

Como se puede observar en la Figura 11, la señal correspondiente a la secuencia de *Het-A* es delgada aunque evidente en la cepa silvestre (Fig. 11A), mientras que en la condición nula dAdd1 la señal se encuentra más extendida (Fig.11B) lo que nos habla de un mayor número de secuencias insertadas en el telómero; esta abundancia es heterogénea pues si comparamos los telómeros del inciso B se puede observar que la extensión de la señal no es igual entre ellos. Cuando se expresa la isoforma dAdd1-a en el fondo nulo *dadd1* (Fig. 11C) la extensión de *Het-A* se ve disminuida en comparación con la condición nula y si bien

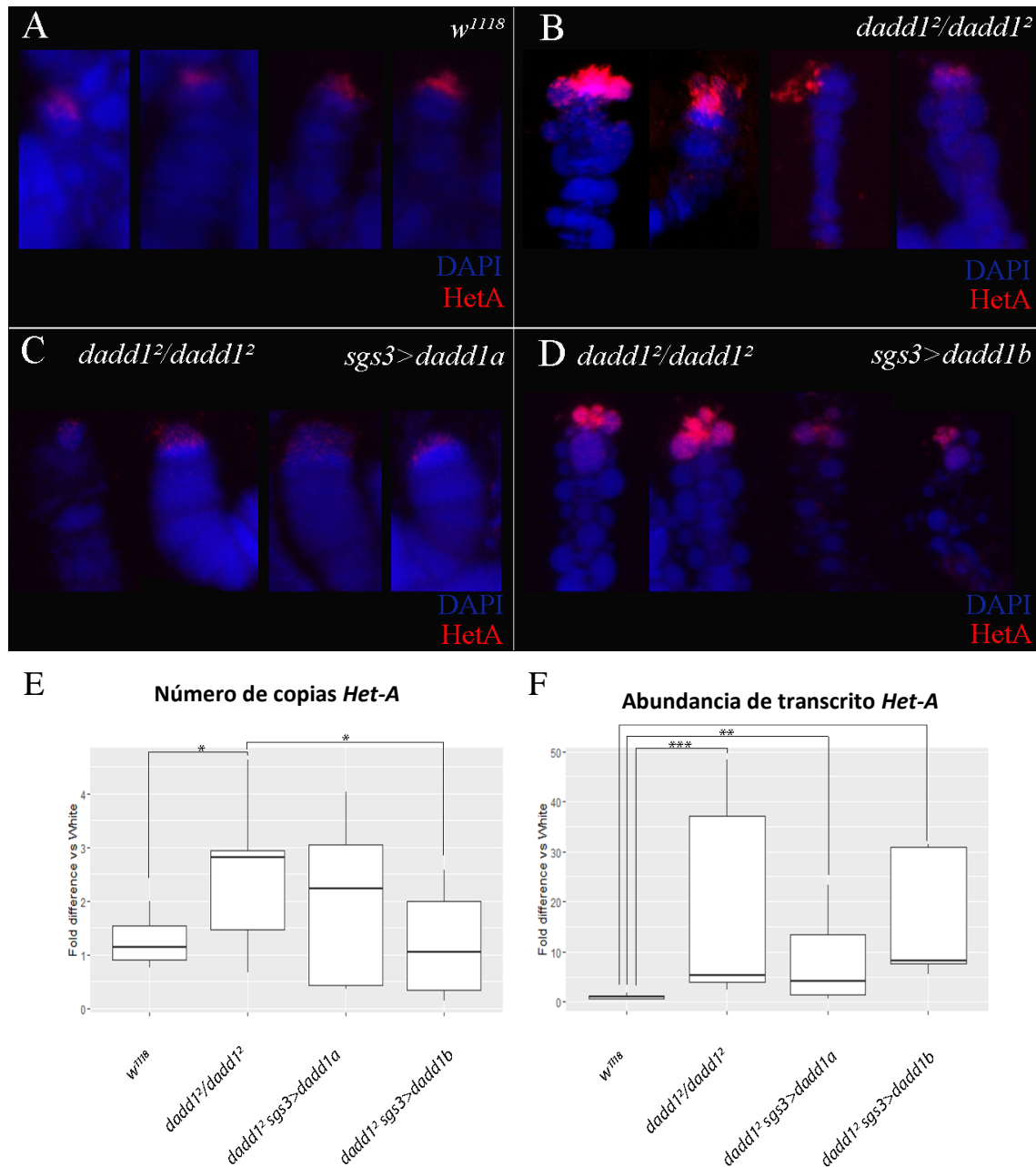
la señal es menos intensa, se puede observar su extensión a lo largo del telómero; además, el nivel de recuperación del fenotipo de inserción de *Het-A* es heterogéneo ya que se presenta variabilidad entre los telómeros observados. Al expresar la isoforma dAdd1-b en el fondo nulo *dadd1* (Fig. 15D) disminuyó la extensión de la señal de *Het-A* respecto a la condición nula aunque también es heterogénea entre los cromosomas observados.

Durante la preparación de los cromosomas politénicos de larvas con la expresión de las isoformas dAdd1-a y dAdd1-b se observó una mayor fragilidad de los cromosomas en comparación con aquéllos provenientes de la mutante nula y la cepa silvestre. Esta fragilidad cromosomal también fue evidente al realizar la hibridación *in situ*, pues como se puede observar en la Figura 11 los cromosomas se ven dañados e incluso pierden el bandeo y aparece un fenotipo de esferas. Debido a la pérdida en la morfología del cromosoma no fue posible hacer una comparación directa de la extensión de la señal de *Het-A* en los telómeros, por lo que se realizó la cuantificación mediante qPCR del número de copias insertadas en el genoma y la abundancia de transcritos en glándulas salivales para poder evaluar el rescate del fenotipo silvestre en estos cromosomas.

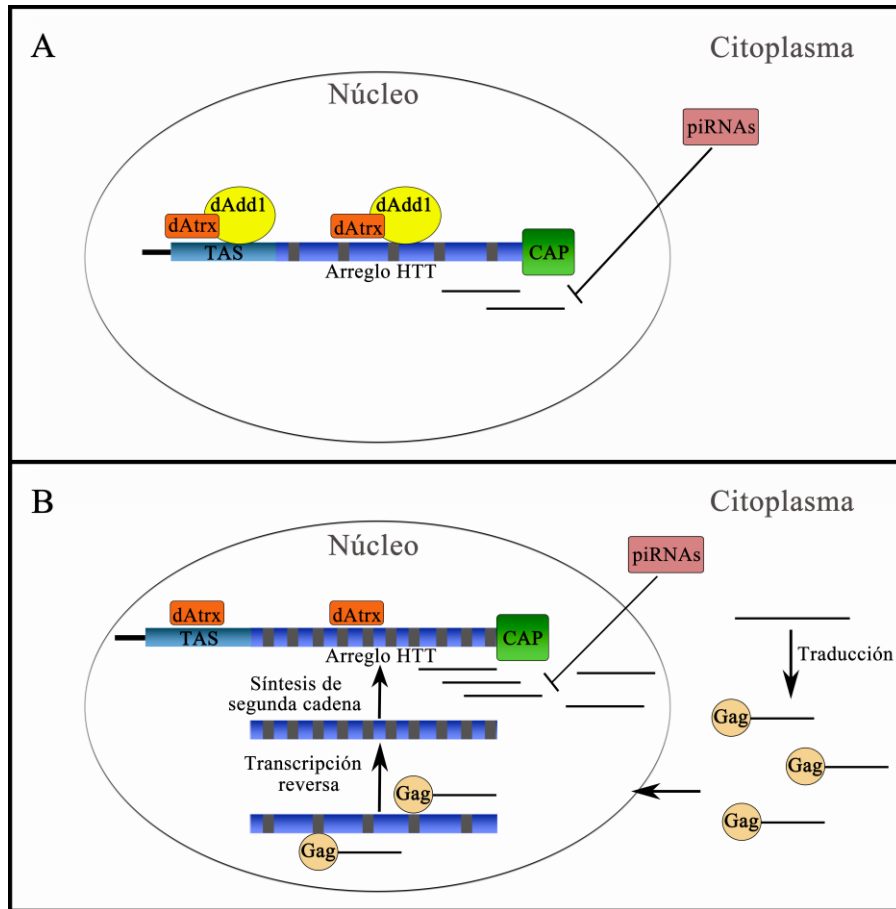
Al evaluar el número de copias de *Het-A* insertadas en el genoma de las glándulas salivales se pudo observar una diferencia significativa entre la cepa silvestre y la condición nula *dadd1*. Además se obtuvieron diferencias significativas entre la condición nula y las larvas que expresan a la isoforma dAdd1-b, lo que indica que se rescató parcialmente el fenotipo silvestre de inserciones de copias de *Het-A* en la región telomérica, mientras que al expresar la isoforma dAdd1-a no hubo una recuperación del fenotipo silvestre aunque la tendencia sí mostró una disminución en el número de copias de *Het-A* (Fig. 11E).

Por otro lado al evaluar la abundancia de transcritos de *Het-A* en las glándulas salivales (Fig. 11F) se observó un aumento significativo en la condición nula *dadd1* respecto a la cepa control, lo que correlaciona con el aumento en el número de copias insertadas en el genoma. Al expresar las isoformas dAdd1-a y dAdd1-b se observó que dAdd1-b muestra el mayor rescate de fenotipo. Para ambas isoformas se obtuvo una tendencia que muestra disminución en la abundancia de transcritos aunque no resultó significativa respecto a la condición nula y sí respecto a la cepa control, indicando que el fenotipo silvestre no se recupera completamente.

Tomando en cuenta los resultados observados hasta ahora, proponemos un modelo para explicar cómo dAtrx y dAdd podrían estar interviniendo en la regulación de los elementos del arreglo HTT en células somáticas (Fig. 12).



**Figura 11. Rescate parcial del fenotipo silvestre al expresar las isoformas dAdd1-a y dAdd1-b.** En la parte superior se muestra el acercamiento a los telómeros después de la hibridación *in situ* con la sonda de *Het-A* en cromosomas politénicos de A)  $w^{1118}$  B)  $dadd1^2/dadd1^2$  C) expresión de la isoforma dAdd1-a y D) expresión de la isoforma dAdd1-b. En la parte inferior se muestra la cuantificación por qPCR de E) número de copias de *Het-A* en el genoma y F) abundancia de transcritos de *Het-A* en glándulas salivales de larvas de tercer instar. Se muestra el nivel de significancia valor P  $* < 0.05$ ,  $** < 0.01$ ,  $*** < 0.001$  obtenido mediante la prueba estadística U de Mann Whitney.



**Figura 12: Modelo de acción de dAtrx y dAdd1 en las células somáticas.** A) Participación de dAtrx y dAdd1 en células tipo silvestre. Las proteínas dAtrx y dAdd1 como complejo reprimen la transcripción del arreglo HTT, posiblemente promoviendo la compactación de la cromatina para crear un estado transcripcionalmente inactivo. Además se mantienen niveles basales de expresión de todo el arreglo HTT que son regulados mediante siRNAs como anteriormente se ha descrito<sup>33</sup>, evitando la integración de copias al genoma. B) Comportamiento en células con bajos niveles de dAtrx y dAdd1. Ante la disminución de las proteínas del complejo dAtrx/dAdd1, los niveles de transcrito del arreglo HTT aumentan y aunque el mecanismo de regulación por siRNAs probablemente sigue activo, no es suficiente para contender con el aumento en la transcripción, por lo que el mRNA de los retrotransposones se traduce y sus productos son importados nuevamente al núcleo. Una vez dentro interactúan con las secuencias de *TART* y *Het-A*, promoviendo su inserción al genoma mediante la acción de la transcriptasa reversa, dando como resultado un aumento en el número de copias. De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo, el modelo de regulación podría ser más complejo para el retrotransposón *TAHRE*.

La deficiencia de la proteína dAdd1 provoca un aumento en el número de copias de los retrotransposones en el genoma de células de la línea germinal

Una vez que observamos que en las células somáticas la disminución o ausencia de dAdd1 y dAtrx causan pérdida del silenciamiento de los retrotransposones del arreglo HTT, nos preguntamos si esta desregulación ocurre también en células de la línea germinal, ya que el mecanismo de regulación de los retrotransposones en estas células está mediado por piRNAs y el efecto de las proteínas dAtrx y dAdd1 podría no ser el mismo que el observado en las células somáticas. Para contestar esta pregunta se realizó la cuantificación de número de copias en el genoma y abundancia de transcritos en la línea germinal representada por los testículos disectados de los machos adultos entre 1 y 5 días post eclosión utilizados para el análisis de las células somáticas.

En el control positivo *GIII* el número de copias de *Het-A* aumentó de manera evidente, mientras que *TART* y *TAHRE* aumentaron en menor medida (Fig. 13 genotipo 2). En la condición homocigota *dadd1* (Fig. 13 genotipo 9) el número de copias de *Het-A* y *TART* aumentó de manera significativa mientras que *TAHRE* no mostró diferencias significativas pero sí una tendencia al aumento en el número de copias. A diferencia de los resultados en las células somáticas, en la doble mutante *dadd1* homocigota en combinación con *datrix*<sup>2</sup> no hubo un aumento pronunciado en el número de copias de los retrotransposones aunque sí tendieron a aumentar (Fig. 13 genotipo 10). Este comportamiento nos podría indicar que el papel de dAdd1 en la línea germinal es independiente de dAtrx y que además se requiere tener una condición nula de la proteína dAdd1 para que se pierda la regulación en la inserción de copias de los retrotransposones.

De manera interesante los tres retrotransposones muestran un aumento en el número de copias en las mutantes heteroalélicas y homocigotas *dadd1* (Fig. 13 genotipos 6 y 9); sin embargo, cuando a este fondo mutante se adicionan los alelos mutantes *datrix* (Fig. 13 genotipos 7, 8 y 10) la pérdida en la regulación se revierte. Esto nos indica que la proteína dAdd1 podría regular la actividad de la proteína dAtrx en el proceso de integración de secuencias al genoma, probablemente mediante su asociación con otras proteínas de heterocromatina presentes en la región telomérica y al no estar presente dAtrx esta inserción descontrolada de secuencias no ocurre.

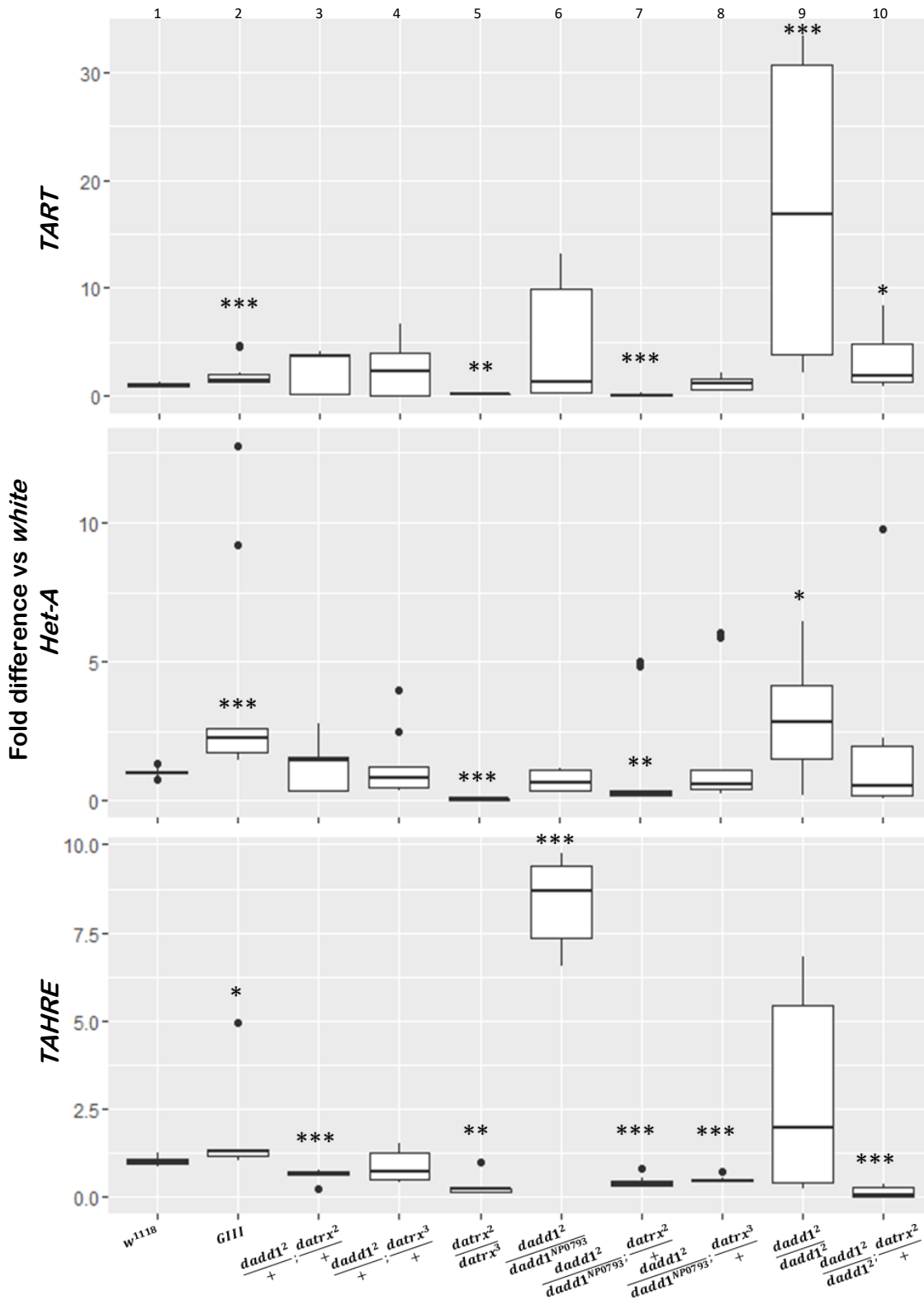


Figura 13: Mutaciones en *datrx* y *dadd1* afectan el número de copias de retrotransposones en la línea germinal. Los valores están normalizados respecto al número de copias en el tipo silvestre. Se muestra el nivel de significancia valor P \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$  calculadas mediante el estadístico U de Mann Whitney.

La disminución de las proteínas dAtrx y dAdd1 provoca un aumento en la abundancia de transcritos de los retrotransposones en células de la línea germinal

Ya que algunos de los genotipos mutantes evaluados mostraron un aumento en el número de secuencias del arreglo HTT insertadas en el genoma de la línea germinal, se evaluó si el nivel de transcritos también estaba alterado.

En el caso de la cepa *GIII* (Fig. 14 genotipo 2) se observa una mayor abundancia de transcrito para los tres retrotransposones, lo que nos podría indicar que se está llevando a cabo un proceso muy activo de retrotransposición y esto se ve reflejado en un mayor número de copias de los retrotransposones respecto a la cepa silvestre.

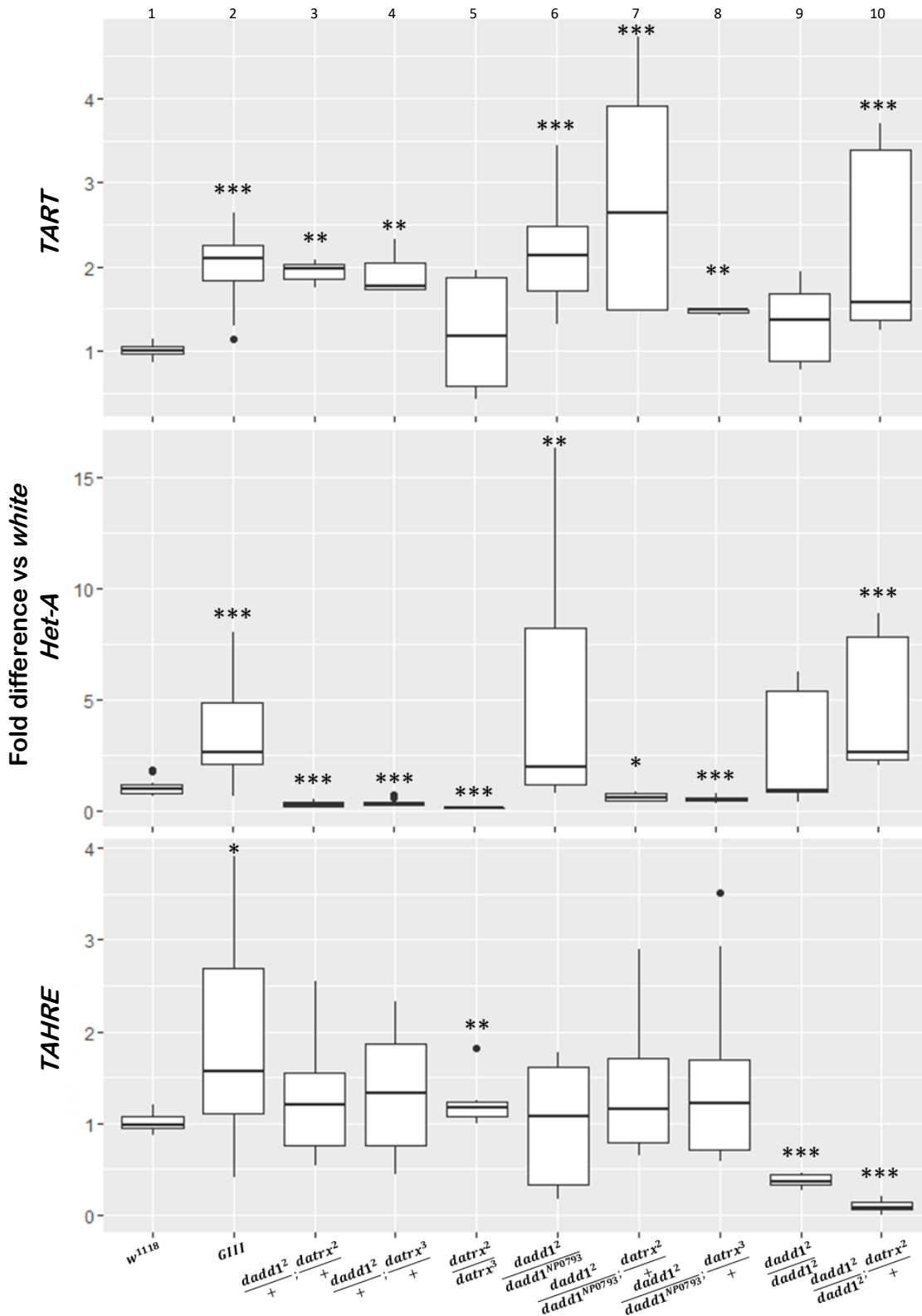
Cuando se analizan los niveles de los transcritos en la línea germinal de las líneas mutantes, se observa un aumento significativo de *TART* que resulta similar entre los diferentes genotipos, aunque se presenta una mayor abundancia en las combinaciones de alelos mutantes heterocigotos y homocigotos *dadd1* en combinación con el alelo mutante *datrx*<sup>2</sup> (Fig. 14 comparar genotipos 7 y 10 respectivamente).

Además se observó un aumento en la abundancia del transcrito de *Het-A* solamente en los genotipos mutantes heterocigotos y homocigotos *dadd1* (Fig. 14 genotipos 6 y 9) que correlaciona con el número de copias en el genoma (Fig. 14 genotipo 9). La doble mutante *dadd1* homocigota en combinación con el alelo mutante *datrx*<sup>2</sup> (Fig. 14 genotipo 10) presentó un aumento en la abundancia de transcritos de *Het-A* y *TART*, aunque esto no se vio reflejado en el número de copias en el genoma, mientras que *TAHRE* mostró niveles muy cercanos al de la cepa control.

Esto indica que en ausencia de la proteína dAdd1 aumenta la abundancia de transcritos que correlaciona con un aumento en el número de copias en el genoma para dos de los tres retrotransposones, mientras que en ausencia de las dos proteínas (dAdd1 y dAtrx) solamente incrementa la abundancia de transcrito pero el número de copias en el genoma no se ve afectado.

Una posible explicación a las observaciones en la línea germinal es que ante la pérdida de dAdd1 y dAtrx no solamente se necesita tener un mayor número de transcritos para la inserción de las secuencias del arreglo HTT, sino que existe un nivel de regulación más complejo que involucra a otras proteínas probablemente asociadas con la función de dAdd1 y dAtrx en la regulación del arreglo HTT.





**Figura 14: Mutaciones en *datrx* y *dadd1* afectan la abundancia de transcritos de los retrotransposones en la línea germinal.** Se muestra la cuantificación de la abundancia de transcritos respecto a la cepa control. El nivel de significancia valor P \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001 se obtuvo usando el estadístico U de Mann Whitney.

Las proteínas dAtrx y dAdd1 podrían interactuar genéticamente con la proteína Piwi como miembro de la vía de regulación de retrotransposones mediada por piRNAs en la línea germinal

Con el fin de elucidar si el mecanismo por el cual se está perdiendo el silenciamiento de los retrotransposones del arreglo HTT en la línea germinal mediado por dAtrx y dAdd1 involucra el silenciamiento mediado por piRNAs, se evaluó si la combinación de los alelos mutantes *datrx* y *dadd1* con el alelo mutante *piwi*<sup>1</sup> podían tener un efecto sumatorio en la pérdida del silenciamiento de los retrotransposones teloméricos. Además de utilizar *w*<sup>1118</sup> como cepa control, se realizó la medición del número de copias y abundancia de transcrito en adultos heterocigotos *piwi*<sup>1/+</sup> para conocer cuál es el cambio, si es que existe alguno, en la inserción de copias y abundancia de transcritos de los retrotransposones causado únicamente por la disminución de la proteína Piwi. Debe tomarse en cuenta que debido a que el alelo mutante de *piwi* se encuentra en el cromosoma 2, al igual que *dadd1*, no fue posible obtener la condición nula *dadd1* en combinación con la disminución de *piwi*, por lo que los efectos observados se deberán únicamente a la disminución pero no deficiencia de dAdd1.

De manera general los elementos *TART* y *TAHRE* no tuvieron un aumento en el número de copias en el genoma y el comportamiento se mantuvo similar al de la línea control (Fig. 15 genotipos 2 a 4, 6 y 7). Sin embargo se observó una tendencia al aumento de las copias de *TART* y *Het-A* en moscas con la combinación de alelos *dadd1*<sup>2</sup>/*piwi*<sup>1</sup>. Exceptuando el ejemplo anterior, *Het-A* no presentó un aumento en el número de copias, por el contrario se observó disminución en la abundancia de este retrotransposón (Fig. 15 genotipos 3, 4, 6 y 7).

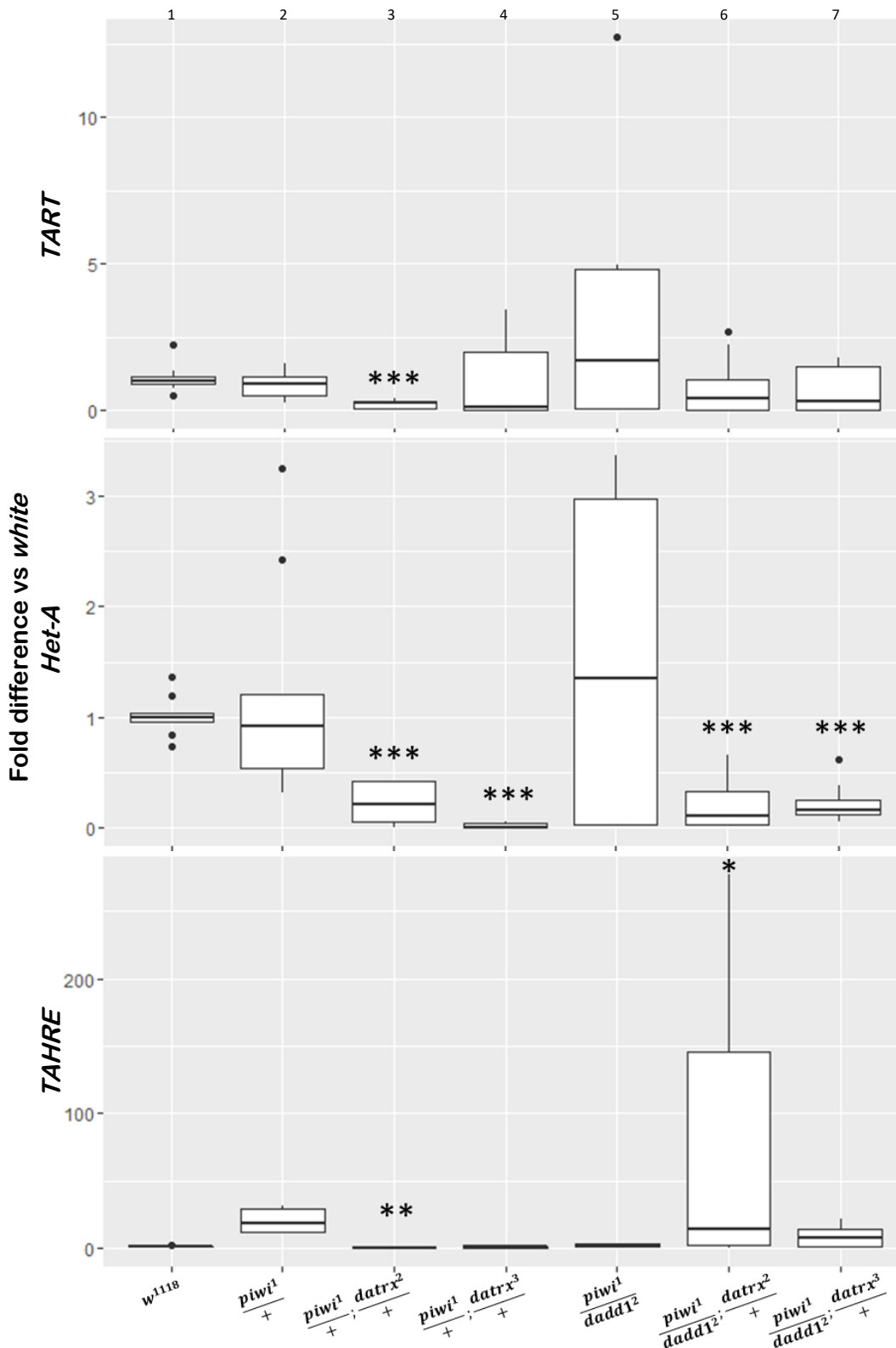
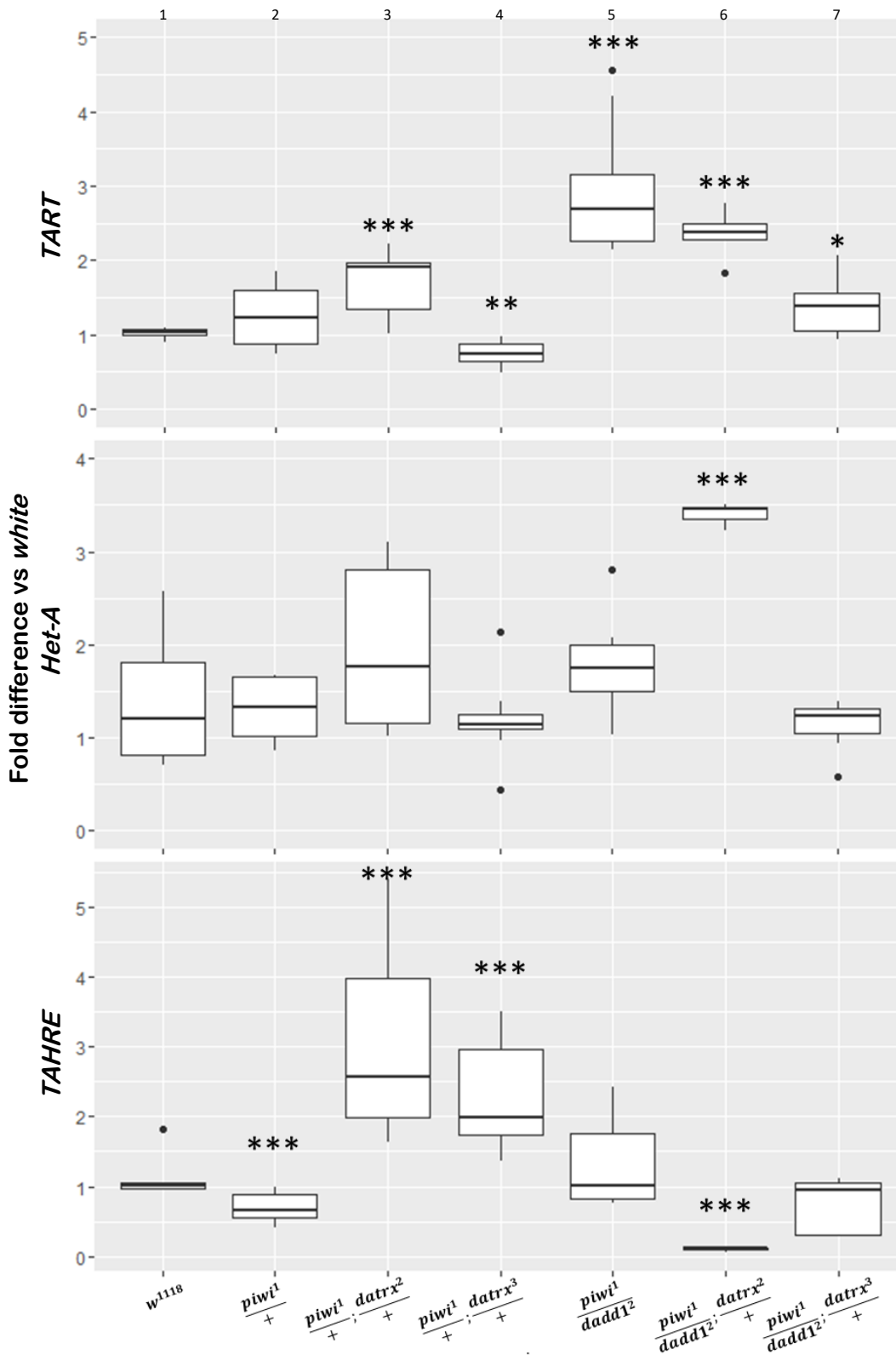


Figura 15: Mutaciones en *piwi* y *datrx/dadd1* no incrementan el número de copias de retrotransposones en línea germinal. Se muestra el número de copias del arreglo HTT respecto a la cepa control. Se muestra el nivel de significancia valor P  $* < 0.05$ ,  $** < 0.01$ ,  $*** < 0.001$  obtenido mediante el estadístico U de Mann Whitney.

Para conocer si en la línea germinal de las moscas con alelos mutantes *piwi* en combinación con los alelos mutantes *datrx* y *dadd1* está afectado el silenciamiento de los elementos del arreglo HTT a nivel transcripcional se evaluó si existe un aumento en la abundancia de transcritos respecto a la cepa silvestre. Los elementos *TART* y *Het-A* tienen un aumento notable en la abundancia de transcritos en las moscas con el alelo mutante de *piwi* en combinación con el alelo de *dadd1* (Fig. 16 genotipo 5) y en menor medida un aumento en la combinación con el alelo *datrx*<sup>2</sup> (Fig. 16 genotipo 6).

El retrotransposón *TAHRE* muestra un aumento en la abundancia de transcrito en las moscas con el alelo mutante de *piwi* en combinación con los alelos de *datrx* (Fig. 16 genotipos 3 y 4). Estos cambios en la abundancia de transcritos nos dan un primer indicio de la existencia de una interacción genética entre *piwi* y *dadd1/datrx* para mantener el silenciamiento de los retrotransposones del arreglo HTT en la línea germinal.

A pesar de que se tiene un aumento en la abundancia de los transcritos para algunos retrotransposones, esto no se refleja directamente en un aumento en el número de copias en el genoma, lo que nos sugiere que esta posible interacción entre *dAtrx/dAdd1* con la vía de regulación mediada por piRNAs cumple una función a nivel de la regulación de la expresión de los retrotransposones. Sin embargo estas alteraciones en los niveles de transcrito no dan lugar a un cambio en el número de copias, por lo tanto proponemos que existe un mecanismo independiente que previene la integración de secuencias al DNA en la línea germinal. Tomando estos resultados en cuenta, se propone el modelo mostrado en la Figura 19.



**Figura 16: Mutaciones en *piwi* y *datrx/dadd1* afectan la abundancia de transcritos de los retrotransposones en células de la línea germinal. Se muestra la abundancia de transcritos del arreglo HTT respecto a la cepa control. Se muestra el nivel de significancia valor  $P^* < 0.05$ ,  $** < 0.01$ ,  $*** < 0.001$  obtenido mediante el estadístico U de Mann Whitney.**

La disminución de la proteína Piwi no provoca un aumento en el número de copias en el genoma ni en la abundancia de transcritos del arreglo HTT en células somáticas

Para evaluar si la disminución de la proteína Piwi en combinación con la disminución de dAtrx y dAdd1 podía tener un efecto en las células somáticas, se realizó también la cuantificación de los retrotransposones. En las células somáticas no se observó un aumento en el número de copias de los retrotransposones del arreglo HTT (Fig. 17). El número de copias de *TART* presentó un comportamiento heterogéneo aunque cercano al nivel de la cepa control, mientras que *Het-A* y *TAHRE* tuvieron una menor cantidad de copias en el genoma en los genotipos que combinan el alelo mutante *piwi* con alelos mutantes de *dadd1* y *datrx* (Fig. 17 genotipos 3 a 7).

Este comportamiento concuerda con lo esperado, ya que el mecanismo de silenciamiento de los retrotransposones mediado por piRNAs no se ha asociado a células somáticas, aunque se ha visto que *piwi* sí se expresa en estas células durante todo el desarrollo de *Drosophila*<sup>71</sup>, por lo tanto, al tener la combinación de *piwi* con los alelos mutantes de *datrx* y *dadd1* era necesario corroborar si podía darse un evento de desregulación.

Aunque no se vio afectado el número de inserciones en el genoma, se evaluó la abundancia de transcritos en las moscas con alelos mutantes en *piwi* y combinaciones con alelos mutantes de *dadd1* y *datrx* para conocer si era posible una pérdida en la regulación únicamente a nivel transcripcional en las células somáticas. La abundancia de transcritos en las líneas mutantes no presentó aumento con respecto a la cepa control en las células somáticas (Fig. 18 genotipos 2 a 7), lo que coincide también con el comportamiento observado en el número de copias en el genoma.

Es importante observar que tanto en la condición heterocigota de *piwi* (Fig. 18 genotipo 2) como en las combinaciones con *datrx* (Fig. 18 genotipos 3 y 4) se presentó disminución significativa en el número de copias de *TART* y *TAHRE*. Esto nos podría indicar que ante la pérdida de estas proteínas la cromatina presenta un estado más compacto y por tanto se introduce un menor número de secuencias en el genoma o que ocurre una mayor degradación de los telómeros y por tanto un menor número de secuencias presentes.

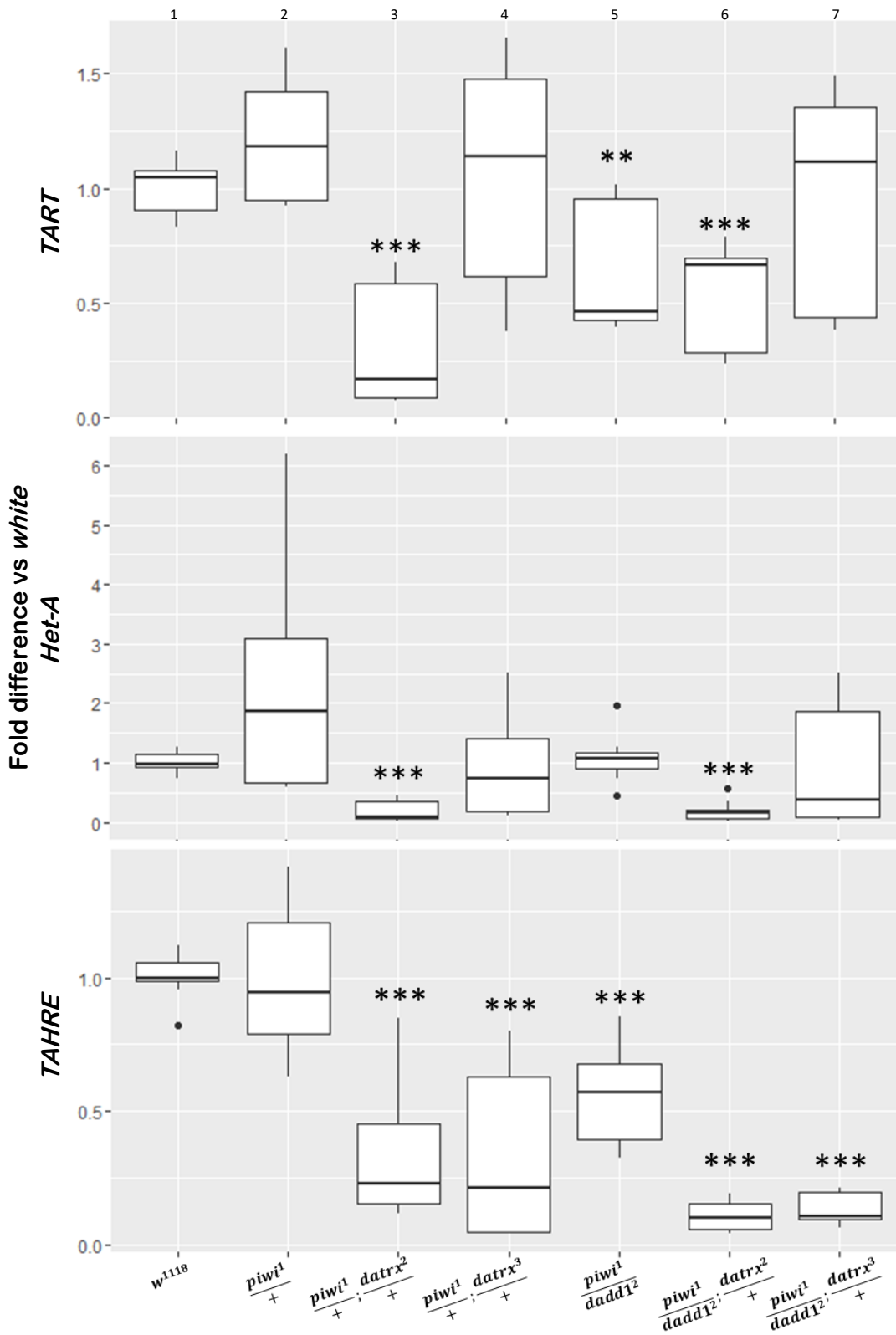
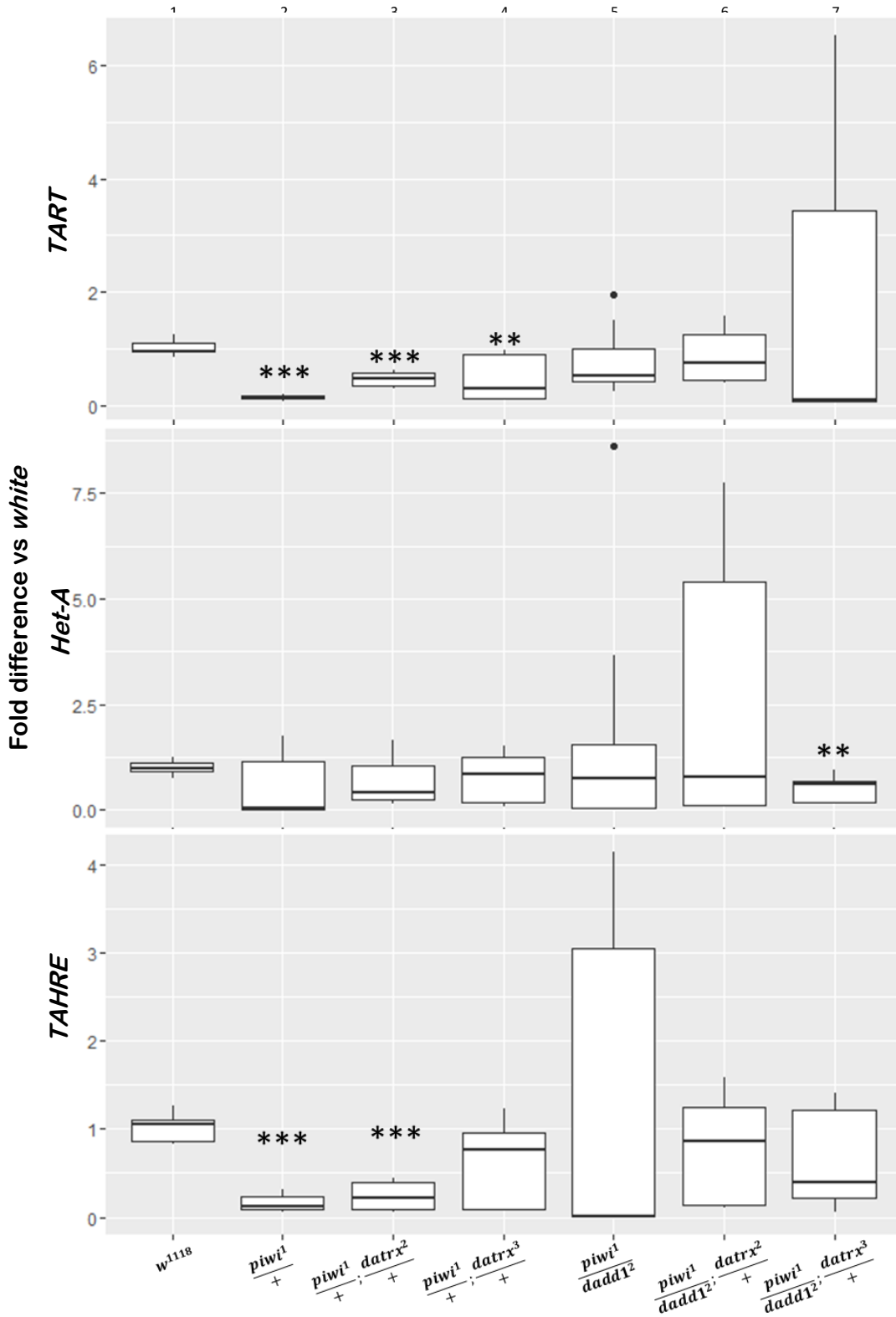
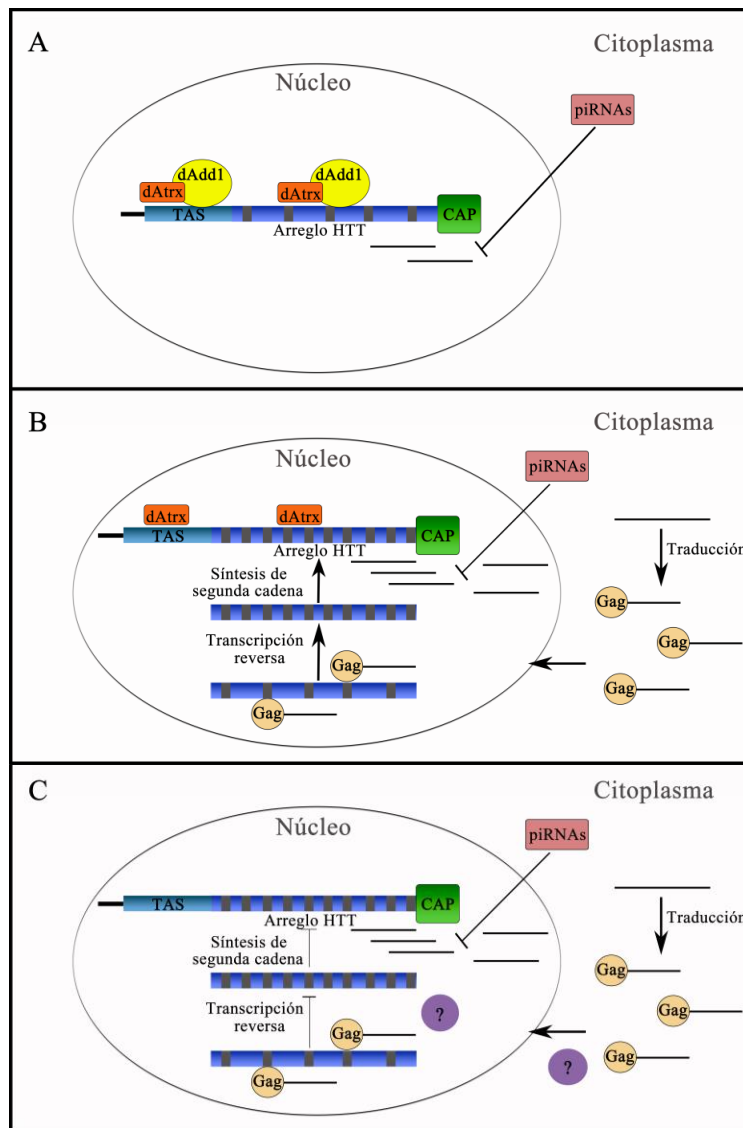


Figura 17: Mutaciones en *piwi* y *datrx/dadd1* no afectan el número de copias de retrotransposones en células somáticas. Se muestra el número de copias del arreglo HTT respecto a la cepa control. Se muestra el nivel de significancia valor P  $* < 0.05$ ,  $** < 0.01$ ,  $*** < 0.001$  obtenido mediante el estadístico U de Mann Whitney.



**Figura 18: Mutaciones en *piwi* y *datrx/dadd1* no afectan la abundancia de transcritos de los retrotransposones en células somáticas.** Se muestra el número de copias en el genoma respecto a la cepa control. Se muestra el nivel de significancia valor P \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$  obtenido en el estadístico U de Mann Whitney.





**Figura 19: Modelo de acción de dAtrx y dAdd1 en células de la línea germinal.** A) Células tipo silvestre. Al igual que en el caso de las células somáticas, las proteínas dAtrx y dAdd1 se encuentran regulando de forma negativa la expresión de *Het-A* y *TART*. Los niveles basales de expresión son regulados mediante piRNAs evitando su integración al genoma. B) Ante la ausencia de la proteína dAdd1 existe una pérdida en el silenciamiento del arreglo HTT, que se ve reflejado en un aumento en la abundancia de transcritos y número de copias en el genoma C) Ante la ausencia de dAdd1 y dAtrx se presenta pérdida del silenciamiento del arreglo HTT a nivel transcripcional, lo que genera un aumento en la abundancia de transcritos de *Het-A* y *TART*, sin embargo esto no es suficiente para dar como resultado un mayor número de copias en el genoma, probablemente por la acción de algún factor que podría actuar a nivel de citoplasma evitando la formación de los productos de traducción o en el núcleo evitando su interacción con los elementos del arreglo HTT.

## Discusión

### La regulación del arreglo HTT mediado por dAtrx y dAdd1 en células somáticas

Al analizar el número de copias en el genoma y la abundancia de transcritos de los elementos del arreglo HTT se observó una pérdida en el silenciamiento de los retrotransposones en las líneas con alelos mutantes *dadd1* y *datrx*, esto correlaciona con los reportes previos acerca de la función de ATRX en el silenciamiento de secuencias teloméricas<sup>72</sup>. El aumento en la longitud de los telómeros se ha reportado en ausencia de la proteína ATRX, donde se le ha involucrado en el secuestro del complejo MRN para regular negativamente la elongación de los telómeros<sup>44</sup>.

La cuantificación del número de copias de los retrotransposones y la abundancia de transcritos mostró el mayor aumento en las moscas doble mutantes con el alelo nulo *dadd1*<sup>2</sup> homocigoto en combinación con el alelo *datrx*<sup>2</sup>. Además se observó un incremento menos pronunciado en la inserción de copias y transcrito en el genotipo del fondo heteroalélico *dadd1* en combinación con *datrx*<sup>2</sup>, aumento que no se observó en la combinación con el alelo *datrx*<sup>3</sup>. Considerando que la única diferencia entre los dos alelos *datrx* mencionados es que en *datrx*<sup>3</sup> se afecta solamente la isoforma larga de dAtrx mientras que en *datrx*<sup>2</sup> se están afectando tanto la isoforma larga como la corta, esto nos podría hablar de un papel de la isoforma corta en el silenciamiento del arreglo HTT que hasta ahora no ha sido descrito. Además resulta de gran interés ya que la proteína de mamíferos ATRX trunca contiene al dominio ADD pero no al dominio helicasa/ATPasa y hasta el momento no se ha reportado una función que la relacione con el mantenimiento telomérico<sup>51</sup>.

Una observación importante es que el aumento de transcritos no siempre corresponde con un aumento en el número de copias presentes en el genoma en el caso de *TART* aunque parece existir una relación con el número de copias de *Het-A*. Hasta el momento no se conoce cómo es que *Het-A* completa el proceso de retrotransposición puesto que no codifica una transcriptasa reversa como *TART* y *TAHRE* y se ha propuesto que alguno de los dos retrotransposones provee de la actividad de retrotranscriptasa a *Het-A*. Considerando esto se podría pensar que la abundancia de transcrito observada en *TART* o *TAHRE* no esté dada con el fin de aumentar el número de copias del retrotransposón sino generar la enzima necesaria para la integración de *Het-A* en el genoma.

La coherencia entre el comportamiento observado de número de copias y abundancia de transcrito es importante, ya que hasta el momento no se puede descartar que el mecanismo de recombinación homóloga no está afectado en las mutantes. Debido a que la síntesis de los transcritos constituye el primer paso de la retrotransposición, los cambios en la abundancia de transcritos parecen indicar que la vía por la que se está llevando a cabo la regulación de los retrotransposones *Het-A* y *TART* del arreglo HTT (ya que para *TAHRE*

podría existir un mecanismo diferente de regulación) en células somáticas mediado por las proteínas dAtrx y dAdd1 es la retrotransposición. Es importante mencionar que esta coherencia entre los niveles de transcrito y número de copias se observó primordialmente en la combinación más fuerte de alelos, en la condición nula *dadd1* y el alelo *datrx*<sup>2</sup> (Ver Anexo 4).

Se han reportado otros factores involucrados con la regulación de las secuencias del arreglo HTT como JIL-1 el primer regulador positivo de *Het-A*, Z4 (Putzig) que es importante para mantener la estabilidad cromosomal en los telómeros y es capaz de interactuar con la proteína GAG de *Het-A*<sup>73</sup>. Recientemente se ha descrito también a NAP-1 (Nucleosome assembly protein 1), una chaperona de histonas involucrada en transporte nuclear, regulación transcripcional y remodelación de la cromatina, como parte de un complejo con la proteína GAG de *Het-A* que es capaz de regular la expresión de esta secuencia, además de ser necesaria para la estabilidad telomérica en células en división<sup>74</sup>. Dref/Trf2 y Ken, descritos previamente por estar asociados a Putzig, son reguladores negativos de la expresión de *Het-A* y *TART*, probablemente mediante la unión directa con las secuencias ya que *Het-A* y *TART* contienen secuencias específicas de unión para estas proteínas<sup>75</sup>. Además se sabe que Dref es capaz de interactuar directamente con dAtrx en la cromatina para regular la expresión de algunos genes, mediante el posicionamiento en sitios DRE (DNA-replication elements) en el promotor<sup>76</sup>. Esto nos lleva a preguntarnos si dAdd1 y dAtrx podrían estar colaborando con éste u otros complejos de proteínas para la regulación de los retrotransposones teloméricos o si su función en el silenciamiento de los retrotransposones es independiente de esta vía.

Al realizar la hibridación *in situ* de cromosomas politénicos utilizando la sonda de *Het-A* (Fig. 8 y 9) se observó una mayor extensión de la señal en los telómeros de las moscas con la condición nula *dadd1* y la combinatoria del alelo *dadd1*<sup>2</sup> homocigoto con el alelo *datrx*<sup>2</sup>, lo que correlaciona con las mediciones de número de copias en el genoma de las moscas con estos genotipos. El incremento en la extensión del retrotransposón *Het-A* se ha reportado previamente en moscas con alelos mutantes de genes involucrados en la regulación de la longitud telomérica de *Drosophila* como *Su(var)205 (Hp1)*, *Hrb87F/Hrp36*, *Enhancer of terminal gene conversion [E(tc)]*, *Telomere elongation (Tel)* y ortólogos de *Ku70* y *Ku80*<sup>6, 13,70,77,78,79</sup>. Esto sugiere que dAtrx y dAdd1 no son las únicas proteínas involucradas en la regulación de las secuencias del arreglo HTT y aunque se desconoce si estas proteínas pueden llegar a cumplir su función como complejo o si tienen un aporte de manera individual en el proceso de regulación, es notable que cada una de ellas cumple un papel importante en el correcto mantenimiento telomérico.

La presencia de *TAHRE* en regiones pericentroméricas en la mutante *datrx*<sup>2</sup>/*datrx*<sup>3</sup> es de gran interés debido al aumento en el número de copias en el genoma pero no en la abundancia de transcrito. Además en los otros genotipos mutantes *TAHRE* mostró una gran variabilidad tanto en el número de copias como en la abundancia de transcritos que no

necesariamente tiene una relación directa. Ya que el patrón particular de *TAHRE* únicamente se presentó en el genotipo donde se afectan ambas isoformas de dAtrx sin afectar la abundancia de dAdd1, es posible sugerir que dAtrx tiene un papel independiente de dAdd1 en la regulación de los elementos del arreglo HTT, además su función puede ser específica del elemento telomérico a silenciar y la secuencia de *TAHRE* podría poseer características que permiten esta regulación. Adicionalmente abre la pregunta de cuáles mecanismos pueden estar afectados en las moscas con el genotipo *datrx<sup>2</sup>/datrx<sup>3</sup>* que llevan a la inserción de estas secuencias en regiones pericentroméricas ya que en este estudio no se evaluaron otros mecanismos de integración de copias en el genoma como la recombinación homóloga, mecanismo que podría también estar afectado en estas mutantes.

Cuando se expresaron las isoformas dAdd1a y dAdd1b en el fondo nulo dAdd1 se observó un rescate parcial del fenotipo de extensión de señal de *Het-A* en los cromosomas politénicos y en el número de copias de esta secuencia evaluado mediante qPCR (Fig. 11). Es importante señalar que el nivel de rescate es diferente al expresar una u otra isoforma. Estas dos isoformas tienen diferencias en sus dominios; la proteína dAdd1a contiene el dominio ADD mientras que la isoforma dAdd1b contiene tanto el dominio ADD como los dominios MADF que pueden reconocer secuencias repetidas de DNA<sup>46</sup>. Resultados recientes obtenidos en el laboratorio (ver Anexo 5: artículo sometido a revisión) muestran que la condición nula *dadd1* lleva a la pérdida de la localización de HP1a de las regiones teloméricas, conservando su localización en regiones pericentroméricas, y que la expresión de la isoforma dAdd1a rescata el fenotipo de localización en los telómeros. Estos resultados son importantes ya que sugieren que el papel de las isoformas de dAdd1 tienen funciones diferenciales en la regulación de secuencias teloméricas y que esta función puede estar mediada por su interacción con otras proteínas involucradas en el mantenimiento de la heterocromatina como HP1a.

### La regulación del arreglo HTT mediado por dAtrx y dAdd1 en células de la línea germinal

La cuantificación del número de copias de los elementos del arreglo HTT en la línea germinal no solamente mostró un comportamiento distinto al obtenido en las células somáticas sino que además pareciera que las proteínas dAdd1 y dAtrx tienen funciones distintas pero de cierta forma dependientes una de la otra en la represión de los retrotransposones. Al perder únicamente la proteína dAdd1 se observó un aumento en la inserción de las secuencias pero cuando además se tienen bajos niveles de dAtrx en el fondo nulo para dAdd1 este fenómeno ya no ocurre (Fig. 13). Tal comportamiento podría indicar que dAdd1 regula la actividad específica de dAtrx en la integración de las secuencias en el genoma (ya sea de manera directa o mediante la interacción con otras proteínas) por lo que al no estar presente dAdd1, dAtrx puede tener una actividad aberrante llevando a la desregulación de las secuencias blanco. Esta observación concuerda con las funciones reportadas para la

proteína ATRX en mamíferos ya que se le ha descrito como un regulador negativo de la transcripción y de la elongación de los telómeros<sup>44,38,80</sup>. Tomando en cuenta que en la mosca las proteínas dAtrx y dAdd1 son los homólogos a los dos dominios de la proteína de mamíferos, nos hace preguntarnos si en el caso de la línea germinal las proteínas dAdd1 y dAtrx tienen una función específica en la que dAdd1 actúa como un regulador de la actividad de dAtrx.

Una vez que se evaluó la abundancia de transcritos del arreglo HTT en la línea germinal, se pudo observar que los niveles de transcrito no correlacionan completamente con el número de copias de estos elementos. Se sabe que el estado de la cromatina en la línea germinal en combinación con el mecanismo de silenciamiento por RNAs pequeños es importante para la regulación transcripcional de los retrotransposones. En ovarios provenientes de líneas mutantes en el gen *spn-E*, que presenta disminución en la cantidad de rasiRNAs (*repeat-associated small interfering RNAs*) derivados de elementos transponibles, se observa un estado abierto de la cromatina y ocurre un incremento en la H3K4me2, una disminución en la H3K9me2 y H3K9me3 así como un aumento en la expresión de *Het-A* y pérdida de la proteína HP1a sobre esta secuencia<sup>81</sup>. Además esta RNA-helicasa Spn-E es necesaria para mantener los niveles adecuados de las proteínas Aub y AGO3 para el silenciamiento mediado por piRNAs en la línea germinal<sup>82</sup>.

También existen proteínas que son capaces de regular negativamente las secuencias del arreglo HTT mediante una unión directa como la proteína PROD codificada por el gen *proliferation disrupter* que es capaz de unirse a una región río arriba del promotor de *Het-A* cumpliendo la función de represor transcripcional en ovarios<sup>83</sup>.

Como un primer acercamiento para elucidar si el mecanismo de regulación de los retrotransposones teloméricos mediado por dAtrx y dAdd1 en la línea germinal está relacionado con la vía de piRNAs, se analizó el número de copias de *Het-A*, *TART* y *TAHRE* en el genoma de moscas con el alelo mutante de *piwi* en combinación con alelos mutantes *dadd1* y *datrx*. No se observó un aumento en el número de copias de *TART* y *TAHRE*, además *Het-A* muestra una disminución en el número de copias respecto al control. Este resultado fue inesperado pues no solamente indica que no existe una mayor inserción de secuencias teloméricas en las líneas mutantes sino que además pareciera haber un acortamiento de los telómeros. Una hipótesis para explicar este comportamiento es que las proteínas Piwi, dAdd1 y dAtrx podrían actuar en la línea germinal también como protectores del genoma ante la degradación mediante su localización en las regiones teloméricas y que si bien, cuando está ausente dAdd1 se presenta una pérdida en el silenciamiento del arreglo HTT como se había descrito en las células somáticas, al perder también a las proteínas dAtrx y Piwi el genoma queda expuesto a la degradación y esto se ve reflejado como una disminución en el número de copias de las secuencias teloméricas.

Es importante mencionar que *Het-A* es el retrotransposón que se ve más afectado y de cumplirse la hipótesis de la degradación del telómero significaría que las secuencias de *Het-A* están sufriendo un mayor nivel de degradación. En ensayos reportados previamente de hibridación *in situ* de cromosomas politénicos se ha observado que *Het-A* está mayormente localizado en el extremo del telómero, seguido de *TART*, además de ser el retrotransposón más abundante<sup>13</sup>, por lo que su localización y abundancia podría explicar por qué está más propenso a la degradación.

Al analizar la abundancia de transcritos en la línea germinal de las moscas con alelos mutantes de *piwi* en combinación con los alelos mutantes *datrx* y *dadd1* se pudo observar un aumento en la abundancia de transcritos de los tres retrotransposones *Het-A*, *TART* y *TAHRE*, aunque este aumento en los transcritos no se ve reflejado en un mayor número de copias. La abundancia de transcritos en las moscas que tienen combinaciones de alelos mutantes no solamente es mayor que la cepa silvestre sino que también es mayor que la abundancia de transcritos observada en la línea con el genotipo *piwi*<sup>1/+</sup> y en los genotipos heterocigotos *dadd1*<sup>2/+</sup>;*datrx*<sup>2/+</sup> (Fig. 16). Este resultado sugiere que puede existir una interacción genética entre *piwi*, *datrx* y *dadd1* y que esta posible interacción tiene una función en el silenciamiento a nivel transcripcional de los elementos del arreglo HTT en la línea germinal. La falta de relación entre la abundancia de transcritos y el número de copias en estos genotipos podría deberse a la existencia de un regulador adicional en este paso del mecanismo o al hecho de que no se pudo tener una condición nula *dadd1* en combinación con los alelos mutantes de *datrx* y *piwi*, donde probablemente podríamos observar una pérdida de la regulación en la integración de las secuencias al genoma.

Una pregunta que surge ante esta posibilidad es si la interacción entre dAtrx, dAdd1 y Piwi es directa o está mediada por otras proteínas, ya que se ha reportado que Piwi es capaz de interaccionar físicamente con HP1a y co-localizar con esta proteína en regiones teloméricas, además de unirse a la cromatina de manera dependiente de RNA<sup>71</sup>. Se sabe también que HP1a está involucrada en el silenciamiento del retrotransposón *Het-A* y que la pérdida en la función de esta proteína lleva a un aumento en la longitud telomérica<sup>13</sup>. Por otra parte, resultados recientes obtenidos en el laboratorio relacionan la ausencia de dAdd1 con la pérdida de la localización de HP1a en los telómeros. Considerando esto y las evidencias previas de interacción entre dAdd1 y dAtrx con HP1a se podría hipotetizar que ante la falta de dAdd1 y dAtrx se pierde el reclutamiento de HP1a, quien a su vez ya no es capaz de dirigir a Piwi a las regiones teloméricas para cumplir su función reguladora de las secuencias teloméricas y esto trae como consecuencia el aumento en el número de transcritos del arreglo HTT en la línea germinal.

## Conclusiones

- En las células somáticas las proteínas dAtrx y dAdd1 están involucradas en el silenciamiento de los retrotransposones del arreglo HTT de *Drosophila* y tienen un papel en la regulación del mecanismo de retrotransposición tanto a nivel transcripcional como en la inserción de nuevas copias en el genoma.
- En células somáticas donde existen mutaciones que afectan a dAdd1 y a dAtrx, el retrotransposón *Het-A* conserva una localización telomérica en cromosomas politénicos, pero presenta una mayor extensión en esta región, indicando un mayor número de copias del retrotransposón. Estos datos ponen en evidencia el papel de las proteínas dAtrx y dadd1 en el mantenimiento del silenciamiento de estos retrotransposones.
- Las isoformas dAdd1a y dAdd1b participan en el mantenimiento del silenciamiento de los transposones del arreglo HTT, ya que la expresión ectópica independiente de estas isoformas en el fondo nulo dAdd1 revierte parcialmente el fenotipo de tener un mayor número de copias de *Het-A* en el genoma.
- En las células de la línea germinal dAtrx y dAdd1 tienen un papel en el silenciamiento de los retrotransposones del arreglo HTT a nivel transcripcional pero parece existir un factor de regulación adicional que impide que la pérdida en la regulación lleve a una mayor inserción de secuencias.
- En las células de la línea germinal *datrx* y *dadd1* parecen tener una interacción genética con *piwi*, uno de los elementos de la vía de silenciamiento de retrotransposones mediado por piRNAs, lo que sugiere que estos genes tienen un papel en el silenciamiento del arreglo HTT a nivel transcripcional.

## Perspectivas

Dado que en las células somáticas se demostró un papel de dAtrx y dAdd1 en el silenciamiento de los retrotransposones del arreglo HTT y considerando que no existe evidencia de su unión a esta región telomérica en específico (aunque se ha observado su localización en los telómeros), se pueden realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para determinar si las proteínas dAtrx y dAdd1 están ejerciendo la regulación negativa de la retrotransposición mediante la unión directa a estas secuencias y de ser así determinar si existe una región preferencial de reconocimiento.

Hasta el momento las mediciones de PCR tiempo real de número de copias en el genoma y abundancia de transcritos en la línea germinal parecen indicar que existe más factores involucrados en la regulación de la retrotransposición de los elementos del arreglo HTT por lo que el siguiente paso sería tratar de elucidar si algunas de las proteínas involucradas en el silenciamiento de los retrotransposones como HP1a, Tel, [E(tc)], Hrb87F/Hrp36 o componentes del CAP podrían actuar como reguladores de la inserción de secuencias al DNA ante la falta de dAdd1 y dAtrx.

Ya que en las células de la línea germinal dAdd1 parece tener un papel como regulador de la actividad de dAtrx, se podrían realizar ensayos bioquímicos para determinar la actividad de ATPasa de dAtrx y evaluar si en ausencia de dAdd1 esta actividad se ve afectada.

Como un primer acercamiento se observó una posible interacción genética entre dAtrx y dAdd1 con la vía de piRNAs sin embargo aún faltan experimentos que refuercen esta teoría (por ejemplo ensayos de fertilidad o supervivencia), además se desconoce cuáles elementos de esta vía además de *piwi* podrían estar involucrados o incluso ser afectados por la pérdida de regulación de los retrotransposones mediada por dAtrx y dAdd1.

En los experimentos presentados en este trabajo únicamente fue posible analizar condiciones heterocigotas para *dadd1* en combinación con un alelo mutante de *piwi* pero recordando que los genotipos en los que se observa una pérdida en el silenciamiento de los retrotransposones requiere una condición homocigota de *dadd1* sería importante tener mutantes recombinantes que permitan tener esta condición de homocigosis junto con el alelo mutante de *piwi*.



## Referencias

1. Nussey, D. H. *et al.* Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. *Methods Ecol. Evol.* **5**, 299–310 (2014).
2. McClintock, B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* **26**, 234–82 (1941).
3. Webb, C. J., Wu, Y. & Zakian, V. A. DNA repair at telomeres: keeping the ends intact. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
4. Mason, J., M., H. & Capkova, R. in *DNA Replication-Current Advances* (InTech, 2011). doi:10.5772/19348
5. Mason, J. M., Randall, T. A. & Capkova Frydrychova, R. Telomerase lost? *Chromosoma* **125**, 65–73 (2016).
6. Mason, J. M., Frydrychova, R. C. & Biessmann, H. *Drosophila* telomeres: An exception providing new insights. *BioEssays* **30**, 25–37 (2008).
7. Pardue, M.-L. & DeBaryshe, P. G. Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 485–511 (2003).
8. Cenci, G. *et al.* The Analysis of Pendolino (peo) Mutants Reveals Differences in the Fusigenic Potential among *Drosophila* Telomeres. *PLoS Genet.* **11**, e1005260 (2015).
9. James, T. C. & Elgin, S. C. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3862–3872 (1986).
10. Eissenberg, J. C. *et al.* Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9923–7 (1990).
11. Smothers, J. F. & Henikoff, S. The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2555–69 (2001).
12. Canzio, D., Larson, A. & Narlikar, G. J. Mechanisms of functional promiscuity by HP1 proteins. *Trends Cell Biol.* **24**, 377–386 (2014).
13. Perrini, B. *et al.* HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol. Cell* **15**, 467–76 (2004).
14. Shampay, J., Szostak, J. W. & Blackburn, E. H. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**, 154–7
15. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**, 405–13 (1985).
16. Zhao, Y. *et al.* Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell* **138**, 463–75 (2009).
17. Collins, K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 484–94 (2006).

18. Shay, J. W. & Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* **33**, 787–91 (1997).
19. Cesare, A. J. & Reddel, R. R. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 319–30 (2010).
20. Sykorova, E. *et al.* The absence of Arabidopsis-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae): first evidence from eudicots. *Plant J.* **34**, 283–91 (2003).
21. Pich, U. & Schubert, I. Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in *Allium cepa*. *Chromosome Res.* **6**, 315–21 (1998).
22. Biessmann, H. *et al.* Frequent transpositions of *Drosophila melanogaster* HeT-A transposable elements to receding chromosome ends. *EMBO J.* **11**, 4459–69 (1992).
23. Shpiz, S. *et al.* Mechanism of the piRNA-mediated silencing of *Drosophila* telomeric retrotransposons. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8703–11 (2011).
24. Bannister, A. J. *et al.* Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120–124 (2001).
25. Lachner, M., O’Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116–120 (2001).
26. Zhang, L., Beaucher, M., Cheng, Y. & Rong, Y. S. Coordination of transposon expression with DNA replication in the targeting of telomeric retrotransposons in *Drosophila*. *EMBO J.* **33**, 1148–58 (2014).
27. Guzzardo, P. M., Muerdter, F. & Hannon, G. J. The piRNA pathway in flies: highlights and future directions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 44–52 (2013).
28. Gunawardane, L. S. *et al.* A Slicer-Mediated Mechanism for Repeat-Associated siRNA 5’ End Formation in *Drosophila*. 1587–1590 (2007).
29. Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. & Aravin, A. a. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 246–258 (2011).
30. Josse, T. *et al.* Telomeric trans-silencing: an epigenetic repression combining RNA silencing and heterochromatin formation. *PLoS Genet.* **3**, 1633–43 (2007).
31. Simmons, M. J. *et al.* piRNA-mediated transposon regulation and the germ-line mutation rate in *Drosophila melanogaster* males. *Mutat. Res.* **773**, 16–21 (2015).
32. Savitsky, M., Kwon, D., Georgiev, P., Kalmykova, A. & Gvozdev, V. Telomere elongation is under the control of the RNAi-based mechanism in the *Drosophila* germline. 345–354 (2006). doi:10.1101/gad.370206.in
33. Ghildiyal, M. *et al.* Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science* **320**, 1077–81 (2008).
34. Russo, J., Harrington, A. W. & Steiniger, M. Antisense Transcription of Retrotransposons in *Drosophila*: The Origin of Endogenous Small Interfering RNA Precursors. *Genetics* (2016). doi:10.1534/genetics.115.177196

35. Argentaro, A. *et al.* Structural consequences of disease-causing mutations in the ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) domain of the chromatin-associated protein ATRX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11939–44 (2007).
36. Wada, T., Ban, H., Matsufuji, M., Okamoto, N., Enomoto, K., Kurosawa & Aida, N. Neuroradiologic Features in X-linked  $\alpha$ -Thalassemia/Mental Retardation Syndrome. *Orig. Res. Pediatr.* **34**, 2034–2038 (2013).
37. Dhayalan, A. *et al.* The ATRX-ADD domain binds to H3 tail peptides and reads the combined methylation state of K4 and K9. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2195–203 (2011).
38. McDowell, T. L. *et al.* Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 13983–13988 (1999).
39. Le Douarin, B. *et al.* A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* **15**, 6701–15 (1996).
40. Gibbons, R. J. *et al.* Mutations in the chromatin-associated protein ATRX. *Hum. Mutat.* **29**, 796–802 (2008).
41. Osley, M. A. The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 827–61 (1991).
42. Franklin, S. G. & Zweidler, A. Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* **266**, 273–5 (1977).
43. Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Noh, K.-M., Stadler, S. C. & Allis, C. D. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14075–80 (2010).
44. Clynes, D. *et al.* Suppression of the alternative lengthening of telomere pathway by the chromatin remodelling factor ATRX. *Nat. Commun.* **6**, 7538 (2015).
45. Alekseyenko, A. A. *et al.* Heterochromatin-associated interactions of Drosophila HP1a with dADD1, HIP1, and repetitive RNAs. *Genes Dev.* **28**, 1445–1460 (2014).
46. López-Falcón, B. *et al.* Characterization of the Drosophila group ortholog to the amino-terminus of the alpha-thalassemia and mental retardation X-linked (ATRX) vertebrate protein. *PLoS One* **9**, (2014).
47. Bassett, A. R., Cooper, S. E., Ragab, A. & Travers, A. a. The chromatin remodelling factor dATRX is involved in heterochromatin formation. *PLoS One* **3**, e2099 (2008).
48. Bhaskar, V. & Courey, A. J. The MADF – BESS domain factor Dip3 potentiates synergistic activation by Dorsal and Twist. *Gene* **299**, 173–184 (2002).
49. Emelyanov, A. V., Konev, A. Y., Vershilova, E. & Fyodorov, D. V. Protein complex of Drosophila ATRX/XNP and HP1a is required for the formation of pericentric beta-heterochromatin in vivo. *J. Biol. Chem.* **285**, 15027–15037 (2010).
50. Gibbons, R. J. *et al.* Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat. Genet.* **24**, 368–71 (2000).

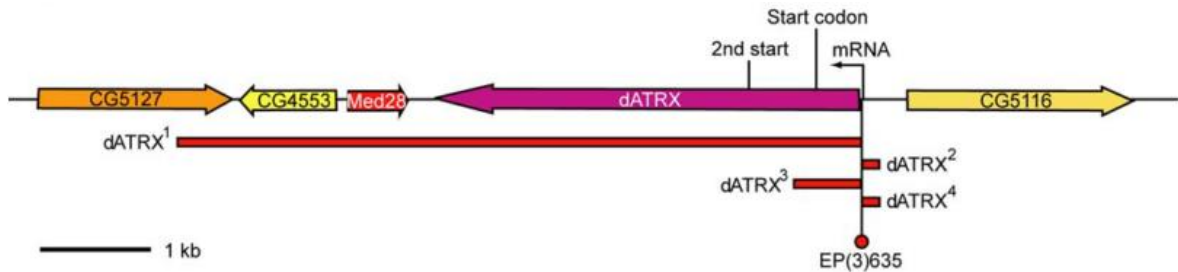
51. Garrick, D. *et al.* Loss of Atrx affects trophoblast development and the pattern of X-inactivation in extraembryonic tissues. *PLoS Genet.* **2**, 13 (2006).
52. Bérubé, N. G. *et al.* The chromatin-remodeling protein ATRX is critical for neuronal survival during corticogenesis. *J. Clin. Invest.* **115**, 258 (2005).
53. Wong, L. H. *et al.* ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res.* **20**, 351–60 (2010).
54. Athwal, R. K. *et al.* CENP-A nucleosomes localize to transcription factor hotspots and subtelomeric sites in human cancer cells. *Epigenetics Chromatin* **8**, 2 (2015).
55. Sadic, D. *et al.* Atrx promotes heterochromatin formation at retrotransposons. *EMBO Rep.* **16**, 836–50 (2015).
56. Sarma, K. *et al.* ATRX directs binding of PRC2 to Xist RNA and Polycomb targets. *Cell* **159**, 869–83 (2014).
57. Law, M. J. *et al.* ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner. *Cell* **143**, 367–78 (2010).
58. Gibbons, R. J., Wilkie, A. O., Weatherall, D. J. & Higgs, D. R. A newly defined X linked mental retardation syndrome associated with alpha thalassaemia. *J. Med. Genet.* **28**, 729–33 (1991).
59. Higgs, D. R., Sharpe, J. A. & Wood, W. G. Understanding alpha globin gene expression: a step towards effective gene therapy. *Semin. Hematol.* **35**, 93–104 (1998).
60. Fanti, L. & Pimpinelli, S. HP1: a functionally multifaceted protein. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 169–74 (2008).
61. Antão, J. M., Mason, J. M., Déjardin, J. & Kingston, R. E. Protein landscape at *Drosophila melanogaster* telomere-associated sequence repeats. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2170–82 (2012).
62. Abad, J. P. & Villasante, A. The 3' non-coding region of the *Drosophila melanogaster* HeT-A telomeric retrotransposon contains sequences with propensity to form G-quadruplex DNA. *FEBS Lett.* **453**, 59–62 (1999).
63. Huang, A. M., Rehm, E. J. & Rubin, G. M. Quick preparation of genomic DNA from *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2009**, pdb.prot5198 (2009).
64. W Sullivan, Michael Ashburner, R. S. H. *Drosophila Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2008). at <<http://www.amazon.com/Drosophila-Protocols-W-Sullivan/dp/0879698276>>
65. Scott, M. P. *et al.* The molecular organization of the Antennapedia locus of *drosophila*. *Cell* **35**, 763–776 (1983).
66. Ling, D. & Salvaterra, P. M. Robust RT-qPCR Data Normalization: Validation and Selection of Internal Reference Genes during Post-Experimental Data Analysis. *PLoS One* **6**, e17762 (2011).
67. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108 (2008).

68. Losada, A., Abad, J. P. & Villasante, A. Organization of DNA sequences near the centromere of the *Drosophila melanogaster* Y chromosome. *Chromosoma* **106**, 503–12 (1997).
69. Agudo, M. *et al.* Centromeres from telomeres? The centromeric region of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* contains a tandem array of telomeric HeT-A- and TART-related sequences. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3318–24 (1999).
70. Singh, A. K. & Lakhotia, S. C. The hnRNP A1 homolog Hrb87F/Hrp36 is important for telomere maintenance in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* (2015). doi:10.1007/s00412-015-0540-y
71. Brower-Toland, B. *et al.* *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev.* **21**, 2300–11 (2007).
72. Clynes, D. *et al.* Suppression of the alternative lengthening of telomere pathway by the chromatin remodelling factor ATRX. *Nat Commun* **6**, 7538 (2015).
73. Silva-Sousa, R., López-Panadès, E., Piñeyro, D. & Casacuberta, E. The Chromosomal Proteins JIL-1 and Z4/Putzig Regulate the Telomeric Chromatin in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* (2012). doi:10.1371/journal.pgen.1003153
74. López-Panadès, E. & Casacuberta, E. NAP-1, Nucleosome assembly protein 1, a histone chaperone involved in *Drosophila* telomeres. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **70**, 111–115 (2016).
75. Silva-Sousa, R., Varela, M. D. & Casacuberta, E. The Putzig partners DREF, TRF2 and KEN are involved in the regulation of the *Drosophila* telomere retrotransposons, HeT-A and TART. *Mob. DNA* **4**, 18 (2013).
76. Valadez-Graham, V. *et al.* XNP/dATRX interacts with DREF in the chromatin to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1460–74 (2012).
77. Melnikova, L. & Georgiev, P. Enhancer of terminal gene conversion, a new mutation in *Drosophila melanogaster* that induces telomere elongation by gene conversion. *Genetics* **162**, 1301–12 (2002).
78. Siriaco, G. M. *et al.* Telomere elongation (Tel), a new mutation in *Drosophila melanogaster* that produces long telomeres. *Genetics* **160**, 235–245 (2002).
79. Cenci, G., Ciapponi, L. & Gatti, M. The mechanism of telomere protection: a comparison between *Drosophila* and humans. *Chromosoma* **114**, 135–145 (2005).
80. Napier, C. E. *et al.* ATRX represses alternative lengthening of telomeres. *Oncotarget* **6**, 16543–58 (2015).
81. Klenov, M. S. *et al.* Repeat-associated siRNAs cause chromatin silencing of retrotransposons in the *Drosophila melanogaster* germline. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5430–8 (2007).
82. Ryazansky, S. S. *et al.* RNA helicase Spn-E is required to maintain Aub and AGO3 protein levels for piRNA silencing in the germline of *Drosophila*. *Eur. J. Cell Biol.* **95**, 311–322 (2016).
83. Török, T., Benitez, C., Takács, S. & Biessmann, H. The protein encoded by the gene proliferation disrupter (prod) is associated with the telomeric retrotransposon array in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **116**, 185–195 (2007).

84. Lin, H. & Spradling, A. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* **124**, 2463–2476 (1997).
85. Cox, D. N. *et al.* A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. 3715–3727 (1998).
86. Schneiderman, J. I., Sakai, A., Goldstein, S. & Ahmad, K. The XNP remodeler targets dynamic chromatin in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14472–14477 (2009).
87. Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M. & Pimpinelli, S. The Heterochromatin Protein 1 Prevents Telomere Fusions in *Drosophila* telomeric fragments from other chromosomes or were involved in other rearrangement breakpoints. However, terminal deletions have since been recovered in *Dro.* *Mol. Cell* **2**, 527–538 (1998).

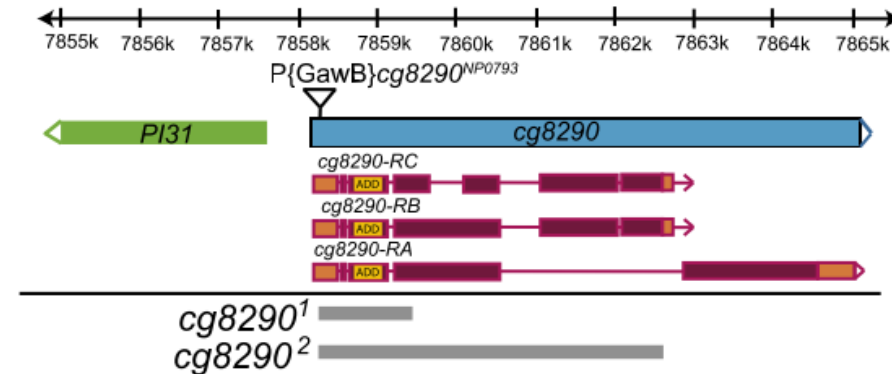
## Anexo 1: Descripción de los alelos mutantes utilizados en este estudio

- **Gen *datrx***

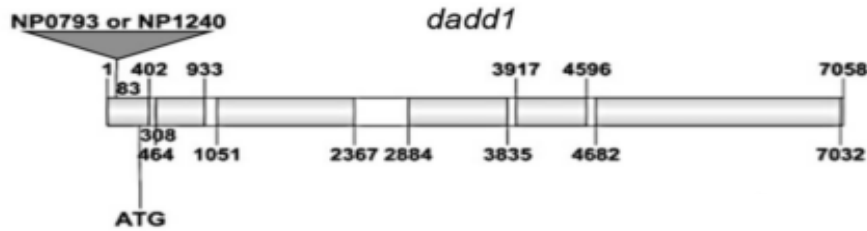


En el trabajo de Basset y colaboradores<sup>47</sup>, se describe la generación de líneas mutantes en el gen *datrx* mediante la inserción de un elemento P a 470pb del marco abierto de lectura, tras la escisión de este elemento se generaron varias deleciones, dando lugar a los alelos mutantes *datrx*<sup>1</sup>, *datrx*<sup>2</sup>, *datrx*<sup>3</sup> y *datrx*<sup>4</sup>. En este proyecto se utilizaron moscas con el alelo mutante *datrx*<sup>2</sup> causado por una delección de 238pb de la región promotora, incluyendo el inicio del mRNA por lo que afecta tanto la isoforma larga como la isoforma corta de dAtrx, así como el alelo mutante *datrx*<sup>3</sup> en la que la delección de 786pb incluye el primer codón de inicio de la traducción y los primeros 105 aminoácidos de la región codificante por lo que afecta solamente a la isoforma larga de dAtrx.

- **Gen *dadd1***

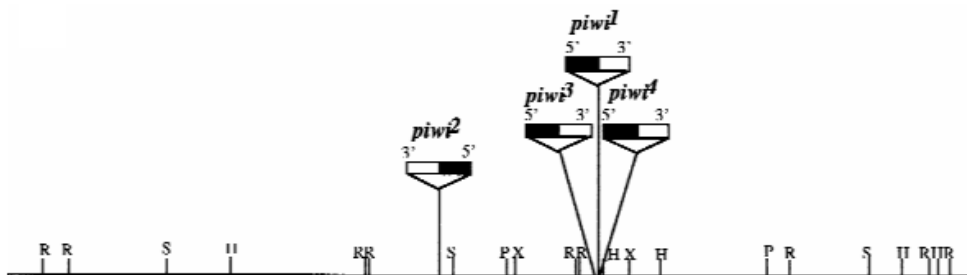


En el trabajo de Kuroda y colaboradores<sup>45</sup>, se describe la obtención de líneas mutantes en el gen *cg8290* (también llamado *dadd1*) mediante la inserción del elemento P P{GawB}ADD1[NP0793] en la región 5' UTR que al ser removido a través de la escisión promovida por la cruz de esta línea con la transposasa causó la delección parcial (*cg8290*<sup>1</sup>) y completa del gen (*cg8290*<sup>2</sup>). En este proyecto utilicé la mutante nula *dadd1*<sup>2</sup> (*cg8290*<sup>2</sup>), la cual es homocigota viable, lo que indica que este no es un gen esencial.



En el trabajo de López-Falcón, 2014<sup>46</sup> se obtuvo la mutante hipomorfa dada por el alelo  $dadd1^{NP0793}(w^*;P\{GawB\}^{NP0793}/Cyo)$  en el cual se insertó un elemento P en la posición +81pb del inicio de la transcripción y -225pb del codón de inicio de la traducción del gen  $dadd1$ , así como el alelo mutante  $dadd1^{NP1240}$  que resultó de la inserción de un elemento P en la posición -223pb del codón de inicio de la traducción. Sin embargo se observó que el alelo  $dadd1^{NP1240}$  posee otras mutaciones no mapeadas, por lo que únicamente utilicé el  $dadd1^{NP0793}$  para los experimentos de este proyecto.

- Gen *piwi*



Se utilizaron también moscas con el alelo mutante  $piwi^1$  que se refiere al alelo  $P\{PZ\}piwi^1$  en el cual se insertó un elemento PZ en el primer exón del gen *piwi* que está marcado con el gen *rosy(ry)* como marcador visible de selección y contiene el gen *lacZ* fusionado al promotor del elemento P. Esta inserción reside en la región 32C del cromosoma 2<sup>84,85</sup>. Este alelo es hipomorfo y los organismos homocigotos son viables.



## Anexo 2: Obtención de las moscas con combinaciones de alelos mutantes

Se realizaron cruzas de líneas de *Drosophila melanogaster* con alelos mutantes para obtener moscas con los diversos genotipos enlistados en la Tabla 2. La generación de estos alelos mutantes se encuentra descrita en el Anexo 1. Todos los alelos utilizados en este estudio con excepción del alelo *dadd1<sup>2</sup>* son alelos hipomorfos, es decir reducen la expresión del producto del gen mencionado o su función.

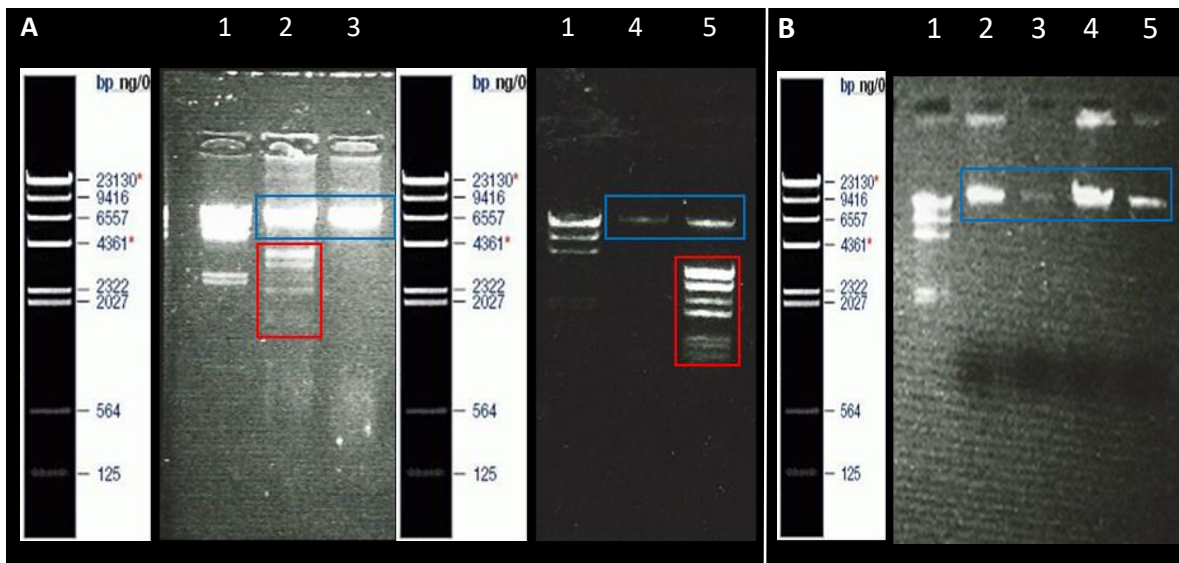
**Tabla 2.** Genotipos de moscas mutantes *datrx*, *piwi* y *dadd1*.

No.	Genotipo
1	<i>w<sup>*</sup>;+/+;datrx<sup>2</sup>/datrx<sup>3</sup></i>
2	<i>w<sup>*</sup>;dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>NP0793</sup>;+/+</i>
3	<i>w<sup>*</sup>;dadd1<sup>2</sup>/+;datrx<sup>2</sup>/+</i>
4	<i>w<sup>*</sup>;dadd1<sup>2</sup>/+;datrx<sup>3</sup>/+</i>
5	<i>w<sup>*</sup>;dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>NP0793</sup>;datrx<sup>2</sup>/+</i>
6	<i>w<sup>*</sup>;dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>NP0793</sup>;datrx<sup>3</sup>/+</i>
7	<i>w<sup>*</sup>;dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;+/+</i>
8	<i>w<sup>*</sup>;dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;datrx<sup>2</sup>/+</i>
10	<i>w<sup>1188</sup>;piwi<sup>1</sup>/+;w<sup>+</sup></i>
11	<i>w<sup>1188</sup>;piwi<sup>1</sup>/dadd1<sup>2</sup>;w<sup>+</sup></i>
12	<i>w<sup>1188</sup>;piwi<sup>1</sup>/+;datrx<sup>2</sup>/+</i>
13	<i>w<sup>1188</sup>;piwi<sup>1</sup>/+;datrx<sup>3</sup>/+</i>
14	<i>w<sup>1188</sup>;piwi<sup>1</sup>/dadd1<sup>2</sup>;datrx<sup>2</sup>/+</i>
15	<i>w<sup>1188</sup>;piwi<sup>1</sup>/dadd1<sup>2</sup>;datrx<sup>3</sup>/+</i>

Durante un primer experimento se obtuvieron moscas que presentan el alelo mutante deseado pero también tienen un balaceador (los cuales son cromosomas que tienen diversas mutaciones e inversiones). Posteriormente se descartaron los individuos que tuvieran balaceadores así como los genotipos homocigotos *datrx<sup>2</sup>/datrx<sup>2</sup>* y *datrx<sup>3</sup>/datrx<sup>3</sup>* para asegurar que el fenotipo observado se deba al alelo mutante y no a la presencia de posibles mutaciones extra-alélicas que causen alteraciones en el comportamiento del organismo de manera inespecífica.

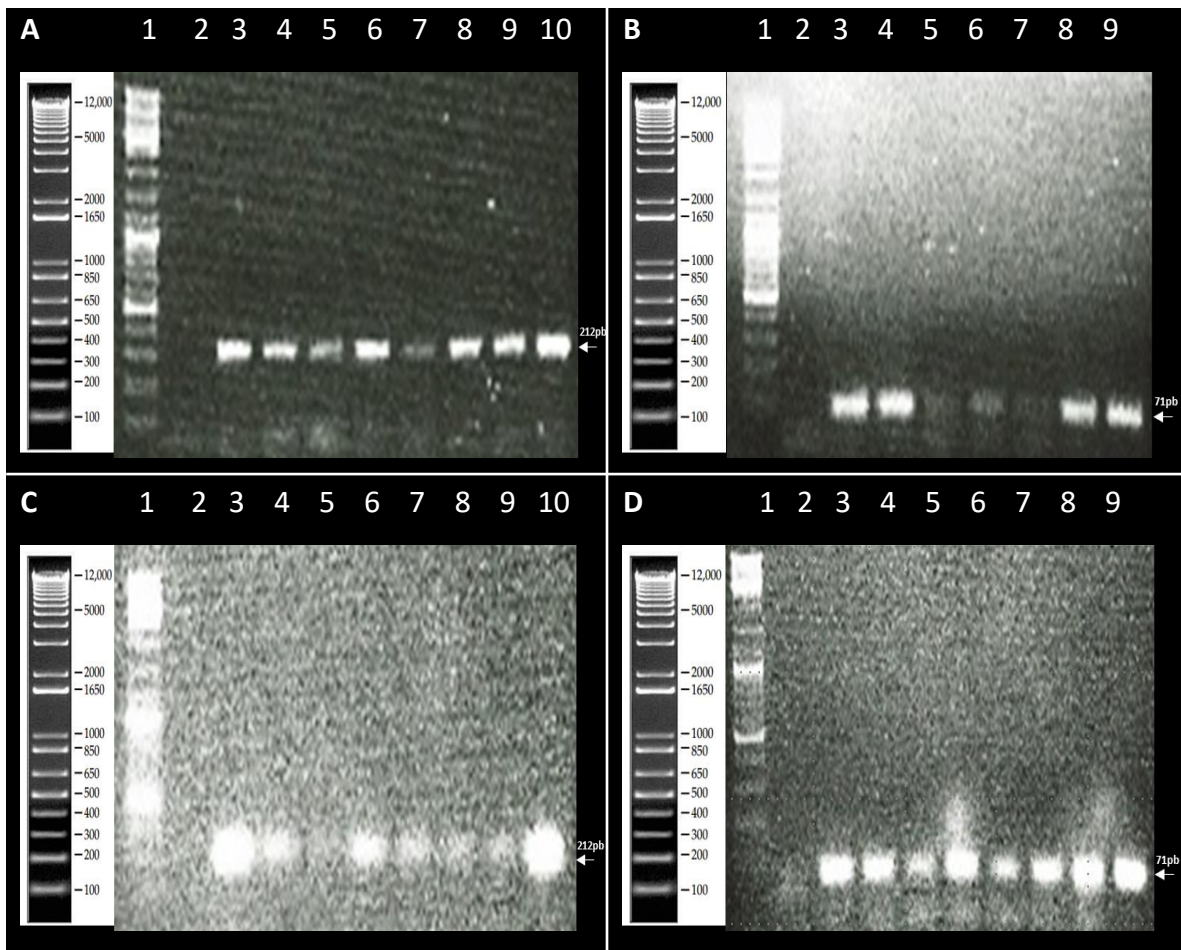
### Anexo 3: Estandarización de la extracción de DNA genómico y síntesis de cDNA

Para la extracción de DNA genómico se probaron diferentes protocolos que mostraron resultados similares entre sí y se seleccionó el protocolo de Scott y colaboradores<sup>65</sup> para aplicarlo en todos los experimentos. Con el fin de comprobar que el DNA estuviera íntegro, se corrieron 5µl (~150ng/µl) de cada una de las muestras en geles de agarosa 1% esperando obtener una banda de alto peso molecular, adicionalmente se corrieron 2µl del marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII de Thermo Scientific. La banda esperada fue observada, sin embargo también se obtuvieron bandas de menor peso molecular (Fig. 20A) que hicieron sospechar de una posible contaminación con RNA, por lo que se realizó un tratamiento con RNAsa A y se volvieron a correr las muestras observando que estas bandas desaparecieron (Fig. 20B) por lo que en adelante apliqué este tratamiento a todas las muestras.



**Figura 20: Corrimiento de DNA genómico antes y después del tratamiento con RNAsa A.** A) Corrimiento de DNA sin tratamiento de RNAsa A, 1: marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII, 2: w1118, 3: Oregon, 4: w1118 Machos, 5: datrix2/TM6B. B) DNA después del tratamiento con RNAsa A, 1: marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII, 2: w1118 Machos, 3: w1118 Testículos, 4: GIII Machos, 5: GIII Testículos. Marcado con el recuadro azul se muestra la banda de alto peso molecular esperada y marcado con el recuadro rojo se muestran las bandas correspondientes a RNA presente en la muestra.

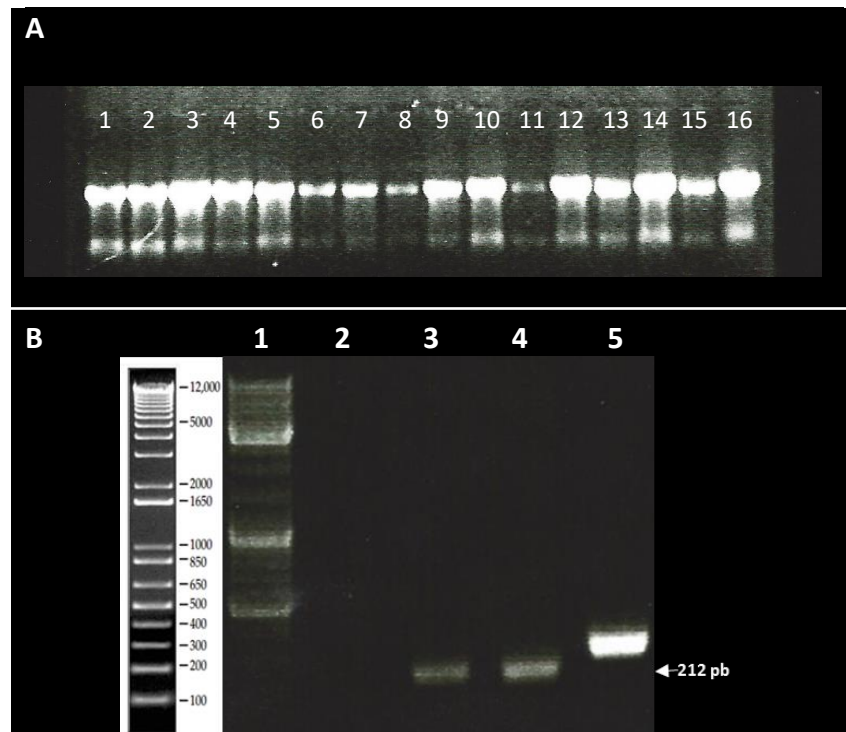
Utilizando el DNA genómico obtenido, se realizó una PCR punto final para confirmar la amplificación de los fragmentos esperados (212pb para *RP2*, 71pb para *Het-A*) al utilizar como templado el DNA perteneciente a los diversos genotipos (Fig. 21).



**Figura 21: Amplificación de *RP2* y *Het-A* mediante PCR punto final.** Se muestra el amplicón correspondiente a A) *RP2* 212pb y B) *Het-A* 71pb en células somáticas y el amplicón correspondiente a C) *RP2* y D) *Het-A* en la línea germinal. La numeración de las muestras es 1: Control negativo, 2: *dadd1*<sup>2/+</sup>;*datrx*<sup>2/+</sup>, 3: *dadd1*<sup>2/+</sup>;*datrx*<sup>3/+</sup>, 4: *dadd1*<sup>2/dadd1</sup><sup>NP0793</sup>;*datrx*<sup>2/+</sup>, 5: *dadd1*<sup>2/dadd1</sup><sup>NP0793</sup>;*datrx*<sup>3/+</sup>, 6: *datrx*<sup>2/datrx</sup><sup>2</sup>, 7: *datrx*<sup>3/datrx</sup><sup>3</sup>, 8: *datrx*<sup>2/datrx</sup><sup>3</sup>, 9: DNA genómico probado anteriormente como control positivo.

Para el análisis de abundancia de transcritos, una vez que se realizó la extracción de RNA total correspondiente a células somáticas (machos sin testículos) y línea germinal (testículos) de los diferentes genotipos mostrados en la Tabla 2, se hizo el corrimiento de estas muestras en gel desnaturalizante de agarosa al 1% para corroborar la integridad del RNA extraído (Fig. 22A).

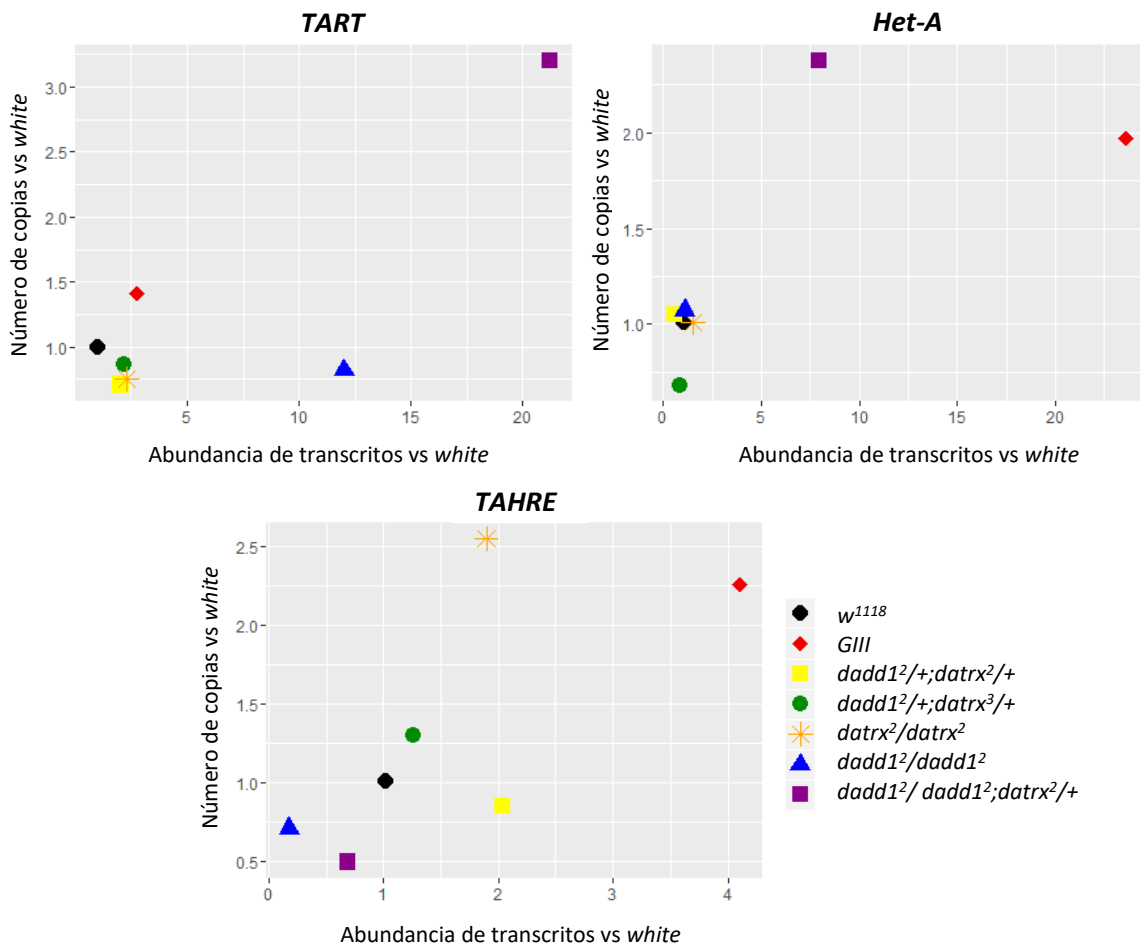
Ya que todas las muestras mostraron las dos bandas esperadas correspondientes a los rRNAs 18S y 5.8S, se prosiguió con la síntesis de cDNA. Al igual que en el caso del DNA genómico, las muestras pertenecientes a genotipos con balanceadores y homocigotos fueron descartadas, por lo que en adelante se utilizaron las extracciones pertenecientes únicamente a los genotipos de la Tabla 2. Utilizando como templado los cDNAs de las muestras  $w^{1118}$  y  $piwi^1/+$  se realizó un PCR de punto final (Fig. 22B) empleando oligonucleótidos específicos para *RP2* como prueba de que estos cDNAs fueron sintetizados correctamente para ser utilizados en el qPCR.



**Figura 22: Corrimiento de RNA y prueba de cDNA.** A) Se muestra el corrimiento en gel desnaturante del RNA total obtenido de células somáticas y germinales. Se corrió el RNA correspondiente a los genotipos 1 a 8 de la Tabla 2 de células somáticas (carriles 1-8) y línea germinal (carriles 9-16). Se observan las dos bandas correspondientes a los rRNAs 18s y 5.8s. B) Se muestra el producto de amplificación utilizando oligonucleótidos para *RP2*. El orden de las muestras es 1: marcador de peso molecular, 2: control negativo. 3: línea germinal de  $w^{1118}$ . 4: línea germinal de  $piwi^1/+$ . 5: DNA genómico de  $w^{1118}$  como control positivo.

## Anexo 4: Gráficas de correlación entre número de copias en el genoma y abundancia de transcrito

Se construyeron gráficas de correlación con el fin de representar la concordancia entre la cuantificación del número de copias de los retrotransposones y la abundancia de transcritos en las células somáticas. Ya que el DNA genómico y el RNA total no pudieron ser extraídos del mismo grupo de moscas para hacer la relación apropiada de la cuantificación, se tomó en cuenta la media de los datos obtenidos en los triplicados técnicos de las tres réplicas biológicas, por lo que únicamente se muestra un punto para cada genotipo.



## Anexo 5: Artículo sometido a revisión

Parte de los resultados de mi proyecto de maestría forman parte del siguiente artículo que actualmente está sometido a revisión.

### **dAdd1 and dXNP prevent genome instability by maintaining HP1a localization at *Drosophila* telomeres.**

Joselyn Chavez\*<sup>1</sup>, Juan Manuel Murillo-Maldonado\*<sup>1</sup>, Vanessa Bahena<sup>1</sup>, Ana Karina Cruz<sup>2</sup>, América Castañeda-Sortibrán<sup>2</sup>, Rosario Rodríguez-Arnaiz<sup>2</sup>, Mario Zurita<sup>1</sup>, Viviana Valadez-Graham<sup>1§</sup>.

\*Equal contribution

1. Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.

2. Laboratorio de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Col. Copilco-Universidad, Ciudad de México, México.

§ Corresponding author: vvaladez@ibt.unam.mx, ph: 52557773290867, fax: 52557773172388

Keywords: ATRX, HP1a, telomeres, HTT array, heterochromatin

### **ABSTRACT**

Telomeres are important contributors to genome stability, as they prevent linear chromosome end degradation and contribute to the avoidance of telomeric fusions. An important component of the telomeres is the Heterochromatin Protein 1a (HP1a). Mutations in *Su(var)205*, the gene encoding HP1a in *Drosophila*, result in telomeric fusions, retrotransposon regulation loss and larger telomeres, leading to chromosome instability. Previously, it was found that several proteins physically interact with HP1a, including dXNP and dAdd1 (orthologues to the mammalian *ATRX* gene). In this study, we found that mutations in the genes encoding the dXNP and dAdd1 proteins affect chromosome stability, causing chromosomal aberrations, including telomeric defects, similar to those observed in *Su(var)205* mutants. In somatic cells, we observed that dXNP and dAdd1 participate in the silencing of the telomeric HTT array of retrotransposons, preventing anomalous retrotransposon transcription and integration. Furthermore, the lack of dAdd1 results in the loss of HP1a from the telomeric regions without affecting other chromosomal HP1a binding sites, mutations in *dXNP* also affected HP1a localization but not at all telomeres, suggesting a specialized role for dAdd1 and dXNP proteins in locating HP1a at the tips of the chromosomes. These results place dAdd1 as an essential regulator of HP1a localization and function in the telomere heterochromatic domain.

### **INTRODUCTION**

Maintenance of chromosomal stability is an essential feature required for correct cell proliferation and overall cell survival. Specialized heterochromatic regions, such as telomeric and pericentromeric regions, are required for correct chromosome segregation (Mathieu et al. 2004; Deng and Chang 2007). The DNA sequences of these regions are rich in repetitive sequences, such as satellite DNA, and may also contain different kinds of LTR and non-LTR retrotransposons. These sequences are very promiscuous and in principle could align with similar sequences in other chromosomes, generating chromosomal aberrations. In somatic cells, the transcription of these sequences must be silenced; in

particular, retrotransposon sequences must be silenced to avoid retrotransposition mechanisms that could lead to the integration of these sequences into other genomic regions (Elbarbary et al. 2016; Goodier 2016). Several protein complexes participate in the establishment and maintenance of heterochromatin, and these complexes include proteins such as HP1a (CBX5 in mammals), which have specialized domains that recognize different histone post-translational modifications. In particular, HP1a is able to recognize the H3K9me3 mark on nucleosomes. The recognition of this mark and the oligomerization of HP1a are steps required for the establishment of a heterochromatic state (Canzio et al. 2011). In the last ten years, different laboratories have reported HP1a protein interactors obtained through several experimental approaches (Brower-Toland et al. 2007; Alekseyenko et al. 2014; Eissenberg and Elgin 2014). The ATRX protein has emerged as one of these interacting factors. In mammalian cells, ATRX recruits CBX5 to telomeric regions, and both proteins cooperate to maintain pericentric heterochromatin (Wong et al. 2010). In *Drosophila*, the homolog of the *ATRX* gene is divided into the ADD domain of the protein, encoded by the *dadd1* gene, which recognizes the trimethylated form of lysine 9 of the histone 3, and the ATPase-SNF2 domain, encoded by the *dxnp* gene (also called *datrx*) (Bassett et al. 2008; López-Falcón et al. 2014). The *dadd1* gene encodes three isoforms generated by differential splicing (López-Falcón et al. 2014). The three isoforms contain the ADD domain, but two of these isoforms contain 3 extra MADF domains that are not present in the human ATRX gene (López-Falcón et al., 2014). We have previously reported that the products of these genes interact physically and genetically (López-Falcón et al. 2014). Additionally, the *dxnp* gene encodes two protein isoforms, the *dXNP<sub>L</sub>* isoform which has an heterochromatic localization, and the *dXNP<sub>S</sub>* isoform which is observed at heterochromatic and euchromatic regions in polytene chromosomes<sup>47,86</sup>. The fact that the main domains of ATRX are divided in *Drosophila* provides us with a useful tool to study the possible specific roles of these domains. In the present study, we analyzed in further detail the contribution of each of these domains to the maintenance of heterochromatin. We found that organisms carrying mutant alleles of both *dadd1* and *dxnp* have up to threefold more chromosomal aberrations, including telomeric fusions, than wild-type individuals. We decided to analyze the telomeric fusion phenotype in more detail. First, we demonstrated that the dAdd1 and dXNP proteins play an important role in the maintenance of the silenced state of the telomeric *HTT* array in somatic cells, preventing aberrant transcription and integration of the retrotransposons, and second, we found they are necessary to maintain HP1a localization at the telomeric regions. Finally, through rescue experiments, we found that the dAdd1 isoforms play a differential role in the maintenance of telomeric heterochromatin. These experiments helped us to determine that the dAdd1a isoform is responsible for targeting HP1a to the telomeric regions.

## MATERIALS AND METHODS

### Fly stocks

Flies were maintained at 25°C with standard food (For 1L: 100g live baker's yeast, 100g molasses, 9g agar, propionic acid 10ml). All stocks used in this study were crossed with our *w<sup>1118</sup>* ; *Sp/CyO*; *MKRS*, *Sb/ TM6B*, *Tb*, *Hu* or *w<sup>1118</sup>* ; *Sp/CyO*; *MKRS*, *Sb/ TM2,Ubx<sup>1</sup>* stocks for

five generations in order to minimize background effects. The wild-type flies used in this study were  $w^{1118}$  (Bloomington Stock Center). The stocks that carried the  $dxnp^2$  (ID26643, Bloomington Stock Center),  $dxnp^3$  (ID26644, Bloomington Stock Center) and  $mwh^1$  (ID549, Bloomington Stock Center) alleles and the  $sgs3-Gal4$  driver,  $w^{1118};P\{w[+mC]=Sgs3-GAL4.PD\}TP1$  (ID6870, Bloomington Stock Center), were obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center NIH P400D018537. The  $dxnp$  alleles ( $dxnp^2$  and  $dxnp^3$ ) were described by (Bassett et al. 2008). These alleles were generated by an excision of the EP-element ( $EP(3)635$ ) that was present at the beginning of the mRNA, 470 bp from the start of the open reading frame. The  $dxnp^2$  allele is semi-lethal and removed 238 bp of the promoter region including the beginning of the dXNP mRNA, this allele affects both dXNP protein isoforms.  $dxnp^3$  allele is also semi-lethal, but removed 786 bp including the start codon of the  $dxnp$  gene and the first 105 amino acids of the coding region, this allele only affects the dXNP<sub>L</sub> isoform. The  $dadd1^2$  null allele was kindly donated by Dr. Mitzi Kuroda and has been described in (Alekseyenko et al. 2014).

### Generation of transgenic lines for rescue experiments

cDNA from the  $dAdd1a$  isoform was obtained from the previously described pAc5.1/V5-HisA vector constructs into the EcoR I-Not I restriction sites of the pUAST plasmid (Brand and Perrimon 1993; López-Falcón et al. 2014). For the  $dAdd1b$  isoform the cDNA was amplified from the LD24316 clone (BDGP Gold collection of Drosophila Genomics Resource Center) and cloned into the pUAST EcoR V-Not I restriction sites. Plasmids were then sequenced to ensure correct expression. Plasmid DNAs were sent to the Bestgene company to obtain the transgenic  $UAS-dadd1a$  or  $UAS-dadd1b$  lines. Lines harbouring insertions into the third chromosome were saved. Virgin flies from these lines were crossed to our  $w^{1118}; Sp/CyO; MKRS, Sb/ TM6B, Tb$  stock to be able to obtain balancers at the 2nd and third chromosomes. Transgene insertion was followed by *white* complementation. We obtained the  $w^{1118}; Sp/CyO; UAS-dadd1a/ TM6B, Tb$  line and the  $w^{1118}; Sp/CyO; UAS-dadd1b/ TM6B, Tb$  line. Then we crossed these lines with the  $w^{1118}; dadd1^2/ dadd1^2; TM6B, Tb/ MKRS, Sb$  to obtain  $w^{1118}; dadd1^2/ CyO; UAS-dadd1a/ TM6B, Tb$  (or  $UAS-dadd1b$ ). To achieve conditional expression in salivary glands, males from these lines were then crossed with  $w^{1118}; dadd1^2/ dadd1^2; sgs3-Gal4/ TM6B, Tb$ . All rescue experiments were performed at 18°C. Expression of the dAdd1a or dAdd1b proteins was assayed by immunostaining with the pandAdd1 antibody.

### Loss-of-heterozygosity (LOH) assays

The crosses were performed by mating virgin females  $mwh^1/ mwh^1$  to males of 48 hours of age of the following genotypes:  $w^{1118}; dxnp^2/ TM3, Sb, Ser$ ,  $w^{1118}; dadd1^2/ CyO-GFP$ ,  $w^{1118}; dadd1^2/ dadd1^2; dxnp^2/ TM6B, Tb, Hu$  To obtain flies homozygous for  $dadd1^2$  and heterozygous for  $dxnp^2$  the previously described line was crossed to the  $w^{1118}; dadd1^2/ dadd1^2; mwh^1/ TM6B, Tb, Hu$  line. Flies heterozygous for a mutation in the  $mwh$  gene were used for all experiments on LOH. Standard, genetic crosses were carried out to generate fly transheterocigotes for  $mwh^1$  (Papaconstantinou et al. 2010). To assay LOH, F1 wings were dissected, dehydrated in ethanol 70% and mounted on slides and coded before scoring, for the presence of cell clones showing mutant wing hairs expressing  $mwh$  markers



(spots). All intervein wing hair cells were examined and cells with two or more hairs were scored as *mwh*-phenotype. To eliminate any element of subjectivity when scoring the number of wing cells with multiple hairs, these counts were performed blind by two investigators. For each genotype and condition, adult male and female wings were counted (Supp. Table 2). For the evaluation of LOH, statistical comparisons were made using a contingency table (chi-square test) with Fisher Exact Probability Test:one tailed. Statistical analyses were performed for the total number of spots recovered.

### **Mitotic chromosome preparations**

Mitotic chromosomes were obtained from third instar larval brains using the protocol described in (Williams et al. 1992) with slight modifications. Briefly, third instar larvae were dissected in saline solution (0.7% NaCl), brains were separated and then incubated for 30 minutes in saline solution containing 1 $\mu$ M Colchicine (Sigma), brains were then transferred to a drop of hypotonic solution (Sodium citrate 0.5%) and incubated for 5 minutes, then brains were transferred to the fixative solution containing (45% acetic acid and 2% formaldehyde) and incubated for 2 minutes. Squash was then performed to obtain the metaphase chromosomes. Chromosomes were stained using DAPI (1 $\mu$ M) and cells and mitotic figures were counted on an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E600, Nikon, Tokyo, Japan) with a 100X 1.3 numerical aperture objective. Images of mitotic figures and aberrations were taken on an Olympus FV1000 confocal microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) with a 60x 1.3 numerical aperture objective. Images were processed using ImageJ (Fiji) and Photoshop CS software.

### **TUNEL ASSAY**

Larval brains were dissected in cold 1xPBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes at room temperature. Brains were washed with PBT (1xPBS with 0.3% TritonX-100). Apoptotic cells in larval brains were detected by TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP and labeling) assays, which were performed according to the manufacturer's instructions (*In Situ* Cell Death Detection Kit Fluorescein, Roche). To quantify the apoptosis, we determined the apoptotic cells number per larval brain analyzing ten brains per genotype and using the Image J (Fiji) software. A *t* student test was performed using RStudio software to evaluate significative differences between genotypes. Fluorescent images were obtained using an Olympus FV1000 confocal microscope with a 20x 0.75 numerical aperture objective. Images were processed using ImageJ (Fiji) and Adobe Photoshop CS software.

### **Antibodies**

The pandAdd1 antibody has been previously described (López-Falcón et al. 2014). The HP1a antibody was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa (C1A9). The anti H4K16Ac was obtained from Merck Millipore.

### **Immunostaining of polytene chromosomes**

Salivary glands from third instar larvae were fixed in solution I (PBS, 3.7% paraformaldehyde and 1% Triton X-100) and then in solution II (3.7% paraformaldehyde, 50% acetic acid).

Chromosomes were spread on poly-L-Lysine coated microscope slides. Anti-HP1a antibody was used at 1:100, antiH4K16Ac was used at 1:100 and pandAdd1 at 1:50. Secondary antibodies Alexa fluor 488 and 568 (Invitrogen) were used at 1:500. Slides of mutant and control genotypes were treated at the same time to maintain equal conditions on concentrations of antibodies and incubation time. Images were obtained using an Olympus FV1000 confocal microscope with a 60x 1.3 numerical aperture objective. Images were processed using ImageJ (Fiji) and Adobe Photoshop CS software.

### **Immunostaining of metaphase chromosomes**

Immunostaining of metaphase chromosomes was performed as described in <sup>87</sup> with slight modifications. Briefly, brains were dissected in saline solution (NaCl 0.7%), colchicine treatment was performed as described above. Brains were then transferred to hypotonic solution (0.5% sodium citrate) for 5 minutes. Fixation of metaphase chromosomes was performed with 45% acetic acid and 2% paraformaldehyde for 7 minutes. Squashing was performed and metaphase chromosomes were incubated for 10 minutes in PBST (PBS 1X and 1% triton X-100). Immunostaining protocol was then followed as in the mentioned reference. Images of mitotic figures were taken on an Olympus FV1000 confocal microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) with a 60x 1.3 numerical aperture objective. Images were processed using ImageJ (Fiji) and Photoshop CS software.

### ***In situ* Hybridization Assay**

Het-A DNA probes marked with Digoxigenin were synthesized using a PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche), and 200ng of genomic DNA from wild type males as template. Specific primers were designed: Het-A Forward 5'- TCAATTTTTCGGCACCCTG -3' Het-A Reverse 5'- GGTGTGGAGTGGTGGAGATG -3'. We performed *In Situ* Hybridization of polytene chromosomes according to the protocol described by (Sullivan et al. 2000). The probe was quantified and 200 ng of DNA probe were used per slide. Detection was performed incubating the slides with 1:200 Anti-Digoxigenin-Rhodamine Fab Fragments (Roche) antibody. Chromosome DNA staining was performed by using 3.5µg/µl of DAPI. Slides of mutant and control genotypes were treated at the same time to maintain equal conditions on concentrations and hybridization time. Slides were observed and images were taken using an Olympus FV1000 confocal microscope with a 60x 1.3 numerical aperture objective. Images were processed using ImageJ (Fiji) and Adobe Photoshop CS software.

### **Genomic DNA and RNA isolation**

Genomic DNA was isolated from young males (from 1 to 5 days post-hatching) without testis as described by (Scott et al. 1983). To avoid contamination with RNA we treated the isolated DNA with RNase A (0.1µg/µl) at 37°C for 1 hr. RNA was isolated using the TRIzol Reagent Total Isolation (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using 1µg of total RNA, 0.025 µg/µl Oligo(dT) (Invitrogen), 0.025µg/µl Random Primers (Invitrogen) and 10U/µl M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen).

### Real Time PCR Assay

For Real Time PCR and real time RT-PCR, specific primers of Het-A and TART were used: Het-A Forward 5'-ACAGATGCCAAGGCTTCAG-3' Het-A Reverse 5'-GCCAGCGCATTTTCATGC-3' (Silva-Sousa et al. 2012); TART Forward 5'-CAAACCTGCAATGGAAGCCA-3', TART Reverse 5'-GGGCATCAATATTTAGAATGAACAG -3' (Walter et al. 2007). We used primers Forward 5'-GACTGGTGGTTTCGGCCAAGA-3' and Reverse 5'-TGTCAGGCCGGCAAGATACG-3' of the Rap2l gene previously reported as reference gene for real time RT PCR (Ling and Salvaterra 2011). Reactions were set up in triplicates, and the LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green 1 was used (Roche). Real-time quantitative PCR was performed by using a LightCycler 1.5 Instrument by Roche. The reaction mixtures were first kept at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles at 95°C for 10s, alignment temperature for 10s and 72°C for 18s. The alignment temperature was 55°C for Het-A and 60°C for TART and Rap2l. Fluorescence output results were captured and analyzed by using LightCycler 1.5 Software version 3.5.3 (Roche), and the threshold cycle (Ct) was used for assessing relative levels of HeT-A and TART versus Rap2l transcripts and number of DNA copies. The relative levels on mutant genotypes were compared with the relative levels on wild type strain to obtain the fold difference using the formula  $2^{-\Delta\Delta CT} = \frac{[(C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{ sample A} - (C_T \text{ gene of interest} - C_T \text{ internal control}) \text{ sample B}]}$  previously reported for transcript relative quantification<sup>67</sup>. Quantification of transcript abundance and number of DNA copies were measured by triplicate and three independent biological replicates were analyzed.

### Chromatin immunoprecipitation, qPCR and data analyses

Chromatin immunoprecipitation from salivary glands was performed. Briefly, batches of 100 pairs of salivary glands (per antibody or irrelevant IgG) were dissected in ice-cold PBS with protease inhibitors (complete, Roche plus PMSF 0.2mM). Cross-linking was performed with 1% formaldehyde in PBS for 15 min at 37°C. Salivary glands were rinsed twice with 500µl PBS and snap frozen in 100 µl PBS with protease inhibitors in liquid nitrogen and stored at -70°C until used. Salivary glands were thawed on ice, PBS was removed and 130µl of SDS lysis buffer was added (1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA), incubation on ice was performed for 10 min. Sonication was performed by 11 cycles (30s on/ 30s off) on a Diagenode Bioruptor. After sonication the sample was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. At this point protein was quantified by Bradford (Bio-Rad). Lysate was diluted 1:5 with ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl, pH 8.0, 167mM NaCl) and pre-cleared with Rabbit IgG coupled to Dynabeads Protein G for 4h at 4°C. After pre-clearing, 10% of the lysate was reserved as input. Lysate corresponding to 360µg of protein was incubated with 25 µl Dynabeads coupled to 2.5µg of anti-HP1a antibody (C1A9 clone DSHB) or 2.5µg irrelevant IgG (purified Mouse IgG; Invitrogen) overnight at 4°C. Beads were then washed once with low-salt wash buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.0 and 150mM NaCl), once with high-salt wash buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.0 and 500mM NaCl), once with LiCl wash buffer (0.25M LiCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 1mM EDTA, and 10mM Tris-HCl, pH 8.0), and twice with TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 1 mM EDTA). Immunoprecipitated chromatin was eluted with elution buffer (1% SDS, 0.1 M

NaHCO<sub>3</sub> in 1xTE). Reverse cross-linking was performed by incubation at 65°C for 12h. After RNA and protein digestion, the DNA was recovered by phenol/chloroform extraction and ethanol/glycogen precipitation. DNA was suspended in water and analyzed by qPCR. The primers used in qPCR were previously reported, for the TAS-L sequences (López-Falcón et al. 2014), for *light* (Lu et al. 2009) and for the Het-A promoter fwd 5' AAGGCTGCAAAATCCGTCCA 3', and rev 5' CGTGGTTGTCGTCAGTAGGA 3'. The % Input was calculated as reported in (Lin et al. 2012). Briefly, % Input=100/E<sup>(dCt normalized ChIP)</sup>, where E represents the efficiency of each region primers and dCt normalized ChIP=Ct sample-[Ct input-Log<sub>2</sub> (input dilution factor)]. Three independent biological experiments were performed each with three technical replicates. P value: \*\* <0.001 indicates significant differences.

### Statistical Analysis

For the frequency of chromosome aberrations a *t* student test was performed using RStudio software in order to identify the genotypes with significant differences versus the number of aberrations found in the wild type strain. P value: \* <0.05, \*\* <0.01.

For the Real time PCR and RT-PCR, in order to determine significant differences, fold differences on transcript abundance and DNA copies among mutant genotypes and the wild type strain were analyzed through the Mann-Withney statistic test by using RStudio software considering Real time PCR quantifications from three independent biological assays with technical triplicates. Statistical analyses for the other experiments are mentioned at the specific section.

## RESULTS

### Mutations in *dadd1* and *dxnp* result in chromosomal aberrations

It has been previously reported that the dAdd1 and dXNP proteins cooperate with HP1a to maintain a heterochromatic state and that they act as suppressors of position effect variegation (Schneiderman et al. 2009; Emelyanov et al. 2010; Alekseyenko et al. 2014; López-Falcón et al. 2014). Maintenance of heterochromatin is important to avoid chromosomal aberrations that lead to chromosome instability. For instance, mutations in the gene *Su(var)205*, encoding the HP1a protein, lead to telomeric fusions, as this protein also forms part of the capping complex of *Drosophila* telomeres (Fanti et al. 1998; Perrini et al. 2004). Given that the dXNP and dAdd1 proteins interact physically and genetically with HP1a and that ATRX has an important role in telomeric maintenance in vertebrates, we decided to analyze whether mutations of the *dadd1* or *dxnp* genes could phenocopy the telomeric fusions observed in *Su(var)205* mutant flies. We analyzed mitotic chromosomes of 3rd instar larvae brains from organisms carrying different mutant alleles, which affected only the *dadd1* or *dxnp* genes or combinations between these alleles (see Materials and Methods). We found that larval brain cells from organisms carrying alleles that affect *dxnp* or *dadd1* presented severe chromosomal aberrations. Different types of chromosomal aberrations were observed, as shown in Fig. 1a-e. These aberrations included axial decondensations, in which the chromosome arms are longer if we evaluate the length from

the centromere to the telomere, (Fig. 1b) and centromeric or telomeric fusions (Fig. 1c, d, and Supp. Fig. 1 respectively).

We quantified these observed aberrations (Fig. 1e and Supp. Table 1) and found that heteroallelic or trans-heterozygous organisms had approximately twofold more aberrations than cells derived from wild-type organisms; for instance, compare the wild type (13%) versus the *dxnp<sup>2</sup>/dxnp<sup>3</sup>* (23%), whereas cells derived from organisms carrying the null *dadd1<sup>2</sup>* allele in a homozygous condition and the *dxnp<sup>2</sup>* allele, which affects both dXNP isoforms, in a heterozygous condition showed up to threefold more chromosomal aberrations (Fig. 1e; see the *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;dxnp<sup>2</sup>/+* genotype, which reached 36%). Next, we analyzed the frequency of the different types of aberrations present in these mutant combinations to assess if there was a preponderance of one of the phenotypes observed (Supp. Table 1). We found that the aberrations observed were heterogeneous among the different alleles, we did not notice any significant enrichment of a specific phenotype, except in the case of the *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;dxnp<sup>2</sup>/+* genotype, which showed an enrichment of telomeric fusions compared with the other phenotypes (Supp. Table 1). Interestingly, the *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;dxnp<sup>3</sup>/+* genotype (the *dxnp<sup>3</sup>* allele only affects the dXNP<sub>L</sub> isoform) did not show an enrichment of the telomeric fusions, indicating the importance of the dXNP<sub>S</sub> isoform in avoiding these type of aberrations (see Materials and Methods for a description of the alleles). These results suggest that the dAdd1 and dXNP proteins are involved in the maintenance of chromosomal stability.

Organisms carrying a null mutation in *dadd1* in a homozygous condition were semi-viable, with approximately 63% of the flies surviving to adulthood (Supp. Table 2). A homozygous line can be properly maintained under laboratory conditions. Since we observed that the null *dadd1* flies in combination with the *dxnp<sup>2</sup>* allele reach adulthood despite showing a high number of chromosomal aberrations, we decided to analyze whether these aberrations had an impact on cell survival. We performed a TUNEL assay to determine if larval brain cells of the mutant organisms displayed apoptosis. We found that there was a small amount of cell death only in brains of organisms carrying the *dadd1<sup>2</sup>* allele in a homozygous condition and in heteroallelic *dxnp<sup>2</sup>/dxnp<sup>3</sup>* flies, only a few cells of certain regions of the larval brain were affected (Fig. 1f, see arrows). Quantification of these data show that the apoptotic cells number was higher than the sporadic cell death observed in wild type brains (Fig. 1g). Nevertheless, there was a possibility that if the observed aberrations could not be resolved by apoptosis, they would accumulate during development and we would see the effects of these aberrations in a loss of heterozygosity assay (de Andrade et. al, 2004). We used the *mwh<sup>1</sup>* mutant allele, which, in a homozygous condition, leads to the appearance of three sensory bristles in the wing cells instead of the one observed in the wild-type condition; the combination of this allele in a heterozygous condition with other mutant alleles, which can affect chromosome stability (by deletions of segments or loss of the wild-type chromosome), generates a loss of heterozygosity. We tested the *mwh<sup>1</sup>* allele in combination with *dxnp<sup>2</sup>*, *dadd1<sup>2</sup>* or trans-heterozygous combinations of these alleles and found that mutations in *dxnp* and *dadd1* did in fact result in a loss of heterozygosity (Supp. Table 3). The LOH assay shows that the single and double mutants (*dadd1<sup>2</sup>* or *dxnp<sup>2</sup>*) increased loss of heterozygosity when compared to the control. However when we compare single and

double mutant, significant differences were obtained only in the cases of *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;mwh<sup>1</sup>/+* vs *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>; dxnp<sup>2</sup>/mwh<sup>1</sup>*.

Taken together, these data indicate that although the null *dadd1* flies were semi-viable, combinations between these and *dxnp* mutant alleles affected even more organism survival ((López-Falcón et al. 2014), (Supp. Table 2) leading to chromosome aberrations and loss of heterozygosity, revealing a cooperation between these proteins for the maintenance of chromosomal stability.

### **dAdd1 and dXNP maintain the silencing of *Het-A* and *TART* retrotransposons in somatic cells.**

An important feature of chromosome stability is the correct maintenance of silencing of retrotransposon regions and repetitive sequences (Goodier 2016). *Drosophila* telomeres have three main regions, the CAP (which includes the HP1a protein and others of the terminin complex), the HTT array (which is composed of three non-LTR transposons known as *Het-A*, *TART* and *TAHRE*) and a TAS (Telomeric Associated Sequences) region rich in repetitive sequences (Silva-Sousa et al. 2012). Given the phenotypes we observed and the previously reported HP1a involvement in the regulation of transcription of the HTT array, we decided to analyze whether the dXNP and dAdd1 proteins could maintain the silenced state of the retrotransposons present in the telomeric HTT region in somatic cells (Silva-Sousa et al. 2012). The mechanism of retrotransposition is highly regulated and silenced in somatic cells. In the case of non-LTR retrotransposons, such as the ones present in the HTT array, one of the first steps in the retrotransposition mechanism involves transcription of these elements. The retrotransposition mechanism is active in germ cells, but in somatic cells, this mechanism must be silenced to maintain chromosomal stability (Biessmann and Mason 2003; Capkova Frydrychova et al. 2009). Mutations that affect *Su(var)205* (the gene that encodes HP1a) result in telomeric fusions, loss of retrotransposon silencing and the production of longer telomeres that lead to chromosomal instability (Fanti et al. 1998; Perrini et al. 2004). The vertebrate ATRX protein has been identified as an essential regulator of the silencing of retro-elements (Sadic et al. 2015; He et al. 2015). Furthermore, the dXNP and dAdd1 proteins have also been found to bind to the TAS telomeric regions (Antao et al. 2012). To assess whether dXNP and dAdd1 were capable of mediating the silencing of these retro-elements, we first evaluated the number of integrated copies of the *TART* and *Het-A* retrotransposons, in somatic cells of the different *dadd1* and *dxnp* mutant backgrounds. The number of integrated copies was evaluated through qPCR using primers specific for each retrotransposon (see Materials and Methods); as a positive control, we used chromosomal DNA isolated from the *Gaiano III* (*GIII*) strain, which has more copies of these retrotransposons than a wild-type fly (Siriaco et al. 2002) and we used *w<sup>1118</sup>* as a wild-type control.

To evaluate whether the dAdd1 and dXNP proteins are involved in the retrotransposons transcript repression, we isolated RNA and used specific primers to amplify the sense transcript of each retrotransposon by qRT-PCR. As in the previous experiment, we used the *w<sup>1118</sup>* strain as the wild-type condition and the *GIII* strain as a positive control.

The retrotransposons in the *GIII* strain (positive control, second box on each plot, Fig. 2a) always had higher transcript levels and more integrated copies than the wild type (first box

in all the plots, Fig. 2a). When we analyzed the *TART* and *Het-A* retrotransposons in the different allelic combinations, we found that most of them were similar to the wild type; however, in the *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;dxnp<sup>2</sup>/+* genotype, they present more transcripts and a higher number of integrated copies (see the last box from left to right on the *TART* and *Het-A* plots, Fig. 2a). Interestingly, in flies of the null *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>* genotype, the *TART* element showed a higher number of transcripts than the wild type, but contrary to what was observed for the *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;dxnp<sup>2</sup>/+* genotype, it did not show a higher number of integrated copies (see 6th box from left to right on the *TART* plots, Fig. 2a). This result reveals that for the *TART* retrotransposon, *dadd1* and *dxnp* could have different activities in transcript repression and in preventing the integration of the retrotransposon copies into the genome and that an additional mutation (in this case on *dxnp*) is necessary to complete the retrotransposition mechanism. The *Het-A* element only showed a higher number of transcripts and number of integrated copies in the *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;dxnp<sup>2</sup>/+* genotype (last box from left to right on the *Het-A* plots, Fig. 2a). We also observed this result by DNA *in situ* hybridization of polytene chromosomes using a probe for *Het-A*. When we analyzed the *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>* genotype, we could see that the *Het-A* signal was not homogenous in all the telomeres and there were some telomeres that showed a weak *Het-A* signal (Fig. 2d and d'), we believe this result is reflected on the qPCR quantifications in which we do not see a significant increment in this retrotransposon copies versus the wild type (Fig. 2a), however we have to take into account that we used polytene chromosomes for the *in situ* hybridization and adult organisms for the copy number quantification. In the chromosomes obtained from the *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;dxnp<sup>2</sup>/+* genotype, the probe signal was higher compared to the wild-type and similar to the *GIII* strain (Compare Figures 2b, b' and 2c, 2c' to 2e, 2e'); additionally, we observed telomeric associations, which were apparently mediated by DNA (Supp. Fig. 2).

Overall, these data indicate that the dXNP and dAdd1 proteins maintain the repression of the HTT array and do so in part by inhibiting the transcription of these elements, which is the first step of the retrotransposition mechanism.

### **dAdd1 proteins maintain HP1a localization at telomeric regions**

The HP1a protein localizes to the three telomeric regions (CAP, HTT, and TAS) (Fanti et al. 1998; Antao et al. 2012; Silva-Sousa et al. 2012b), and mutations on *Su(var)205* that affect the wild-type levels of the protein (Fanti et al. 1998) result in telomeric fusions and a deregulation of retrotransposon silencing, which leads to longer telomeres. Interestingly, mutations in the HP1a chromodomain do not affect HP1a localization at the telomeric regions (Biessmann and Mason 2003). It has been demonstrated that HP1a can bind directly to telomeric DNA through its hinge region, which has been proposed to be one of the mechanisms by which HP1a is targeted to the telomeric region to achieve the capping function (Cenci et al. 2003; Perrini et al. 2004). Given these reports and the fact that the phenotypes observed in the telomeres of *dxnp* and *dadd1* mutants (telomeric fusions and loss of retrotransposon repression) resemble HP1a mutations, we decided to analyze whether the dXNP or dAdd1 proteins were necessary to retain HP1a at the telomeric regions. We analyzed the HP1a distribution in polytene chromosomes by immunolocalization using the C1A9 antibody (James et al. 1989). HP1a localization was well

defined at the chromocenter and at the tip of the chromosome arms in wild-type polytene chromosomes (Fig. 3a), and HP1a colocalized with dAdd1 proteins at this telomeric region (Fig. 4a''). Based on a closer view of the telomeric regions at the tip of the chromosome arms, the HP1a signal was present at all of the analyzed telomeres in the wild-type strain (Fig. 3a'), as previously reported (Fanti et al. 1998). We then evaluated the presence of HP1a in the polytene chromosomes of heteroallelic *dxnp<sup>2</sup>/dxnp<sup>3</sup>* flies. The localization of HP1a at the chromocenter was maintained (Fig. 3b), although the chromocenter was fragile, and breaks could occasionally be observed due to the squashing technique. A magnified view of the telomeric regions (Fig. 3b') reveals that the HP1a signal was retained at some of the telomeres analyzed. Next, we decided to analyze the null *dadd1<sup>2</sup>* allele in a homozygous condition, in which the chromosomes showed a defined signal at the chromocenter but a complete loss of the HP1a signal at the tip of the chromosomes (Fig. 3c and magnifications in Fig. 3c'); additionally, there was an overall decondensation that could be observed when we compared the wild-type or the *dxnp<sup>2</sup>/dxnp<sup>3</sup>* chromosomes with the genotypes that carry the *dadd1<sup>2</sup>* null allele (compare Fig. 3a' and 3b' to Fig. 3c' and 3d'). The loss of HP1a was also observed when we analyzed the polytene chromosomes derived from organisms carrying the null *dadd1<sup>2</sup>* allele in a homozygous condition in combination with the *dxnp<sup>2</sup>* (Fig 3d and d') or *dxnp<sup>3</sup>* (Supp. Fig. 3) alleles. In these genotypes, HP1a localization was retained at the chromocenter but was lost at all of the telomeres. These results indicate that the dAdd1 proteins are indispensable for HP1a localization at the telomeric regions. Indeed, immunostaining experiments in mitotic chromosomes in dAdd1 null organisms confirm the requirement of the products of this gene in the telomeric location of HP1a, but not in the centromeric regions (Supp. Fig. 4). In contrast, the *dxnp<sup>2</sup>/dxnp<sup>3</sup>* heteroallelic flies (Fig. 3b and b') retained HP1a binding at the telomeric regions of some chromosome arms, providing convincing evidence for the specific requirements of distinct chromatin proteins in regulating HP1a localization at different heterochromatic domains (Oikemus et al. 2004; Singh and Lakhota 2016).

Since the X chromosome of male flies is hyperacetylated for dosage compensation purposes (Gelbart et al. 2009). We decided to take advantage of this phenomena and mark the X chromosome of male derived polytene chromosomes with the H4K16Ac antibody. This would allow us to follow the X chromosome in all the mutant backgrounds, and help us determine if the X chromosome arm retained or not the HP1a signal in the *dxnp<sup>2</sup>/dxnp<sup>3</sup>* mutant background. Additionally this will help us determine without a doubt that the lost of HP1a signal we observe is in fact at the tip of these chromosomes and not derived from a possible chromosome breakage event. We found that in a wild type background, all X chromosomes retained HP1a signal (Fig. 3e), whereas in the *dadd1<sup>2</sup>* null chromosomes the HP1a signal was lost confirming our previous result (Fig. 3g). Nevertheless in the *dxnp<sup>2</sup>/dxnp<sup>3</sup>* mutant background, some HP1a signal remained at the X chromosome telomeres (Fig 3f) and also at the tip of other unmarked chromosomes (data not shown). We conclude that dAdd1 proteins are essential to maintain HP1a bound to the telomeric regions and that loss of dXNP proteins partially affects binding of HP1a at the telomeres.

The fact that HP1a was lost at all telomeric regions in the null *dadd1* background does not explain the differences observed in the frequency of the telomeric fusions between this mutant and the previously reported *Su(var)205* mutants (Fanti et al. 1998) One possible



explanation was that the immunohistochemistry experiments were not sensitive enough to detect low levels of HP1a in telomeric regions. Therefore to address this question we performed chromatin immunoprecipitation experiments in salivary glands of the wild type and null *dadd1* backgrounds to evaluate the presence of HP1a at three different heterochromatic regions, the *Het-A* promoter and the TAS-L region both telomeric and the *light* gene which is located at pericentromeric heterochromatin (López-Panadès et al.; Lu et al. 2009; Antao et al. 2012). We found that HP1a was enriched at all the three heterochromatic regions in the wild type strain (*w<sup>1118</sup>*), whereas in the null *dadd1* background HP1a was lost from the *Het-A* promoter but not entirely from the TAS-L region, furthermore, HP1a remained enriched at the pericentric *light* gene at similar levels as the wild type strain in the null *dadd1* background (Fig. 3h).

These results confirm our previous observations that showed a specific HP1a loss only at the telomeres without affecting the pericentromeric regions. Additionally the fact that some levels of HP1a still remain bound to the TAS regions provide a plausible explanation for the lower frequency of telomeric associations found in *dadd1* mutants with respect to *Su(var)205* mutants. In this case, not all the telomeric regions are affected equally as in the of *Su(var)205* mutants and this could eventually lead to a milder or a stronger telomeric fusions phenotype.

#### **dAdd1a, but not dAdd1b, is required for HP1a localization at the telomeres.**

Given that we used a null *dadd1* allele to evaluate the localization of HP1a, it is possible that only one of the isoforms encoded by this gene was responsible for the HP1a telomeric localization. The dAdd1a isoform has a conserved ADD domain at the amino-terminus and no other conserved domain. In contrast, the dAdd1b and dAdd1c isoforms also conserve the ADD domain but have extra domains at the carboxyl terminus known as MADF domains (López-Falcón et al. 2014). Hence, we decided to generate transgenic flies that conditionally expressed dAdd1a or dAdd1b isoforms, we chose dAdd1b to represent the isoforms with the MADF domains to assess which isoform could rescue HP1a telomeric localization (see Materials and Methods). In Figure 4, the immunolocalization of the dAdd1 proteins (using our previously reported pan-dAdd1 antibody) and HP1a in the telomeres of the wild-type flies could be observed (Fig. 4a and a' respectively), in which there was colocalization of both proteins at the telomeric regions (Fig. 4a''). In the null *dadd1* flies, the dAdd1 signal disappears (Fig. 4b) and the HP1a signal is only observed at the chromocenter (Fig. 4b') and not at the telomeric regions (Fig. 4b''). Next, we found that the conditional expression of the dAdd1a isoform in the salivary glands of individuals carrying the null *dadd1<sup>2</sup>* allele in homozygous condition led to a recovery of the HP1a localization signal at the telomeric region (Fig. 4c, c' and c''). Interestingly the dAdd1a protein isoform colocalizes at all the HP1a sites at the chromosome arms and at the chromocenter but its distribution is quite homogeneous and does not seem to be enriched at any particular site (Fig 4c). When we analyze the HP1a distribution, although exogenous expression of dAdd1a restores HP1a telomeric localization, it seems to lose its normal enrichment at the chromocenter (Compare Fig. 4a' to c'). Thus it is possible that exogenous expression of dAdd1a in a null *dadd1<sup>2</sup>* background sequesters HP1a from the chromocenter. In contrast, when we expressed the dAdd1b isoform, it also localizes to the telomeres (Fig. 4d and 4d''), however

the HP1a signal is not recovered at the telomeres and in this case, the enrichment of HP1a signal was conserved at the chromocenter (Fig 4d'' and 4d' respectively.) We also evaluated whether these proteins could revert the retrotransposon copy numbers to a wild type condition. We performed *in situ* hybridization of polytene chromosomes using the *Het-A* probe. In these chromosomes we can see that both dAdd1a and dAdd1b conditional expression prevent the integration of DNA copies of *Het-A*, even though dAdd1b fails to target HP1a to the telomeric regions (Supp. Fig. 5 a, b, c and d). We quantified the number of integrated retrotransposon copies by qPCR in salivary glands in which dAdd1a or dAdd1b was conditionally expressed and found that although dAdd1a targets HP1a to the telomeres, the qPCR results indicate that the integrated *Het-A* copies are very variable including samples close to wild type and others close to the *dadd1* null line. Conditional expression of dAdd1b result in integrated *Het-A* copies closer to the wild type condition (Supp. Fig. 5e). These results indicate that dAdd1b protein isoform is also preventing the integration of this retrotransposon at the telomeric region and does so independently of HP1a recruitment. Taken together, these results indicate that the dAdd1a protein is responsible for the targeting and maintenance of HP1a at the telomeric regions and provide additional evidence for a role of dAdd1b in the maintenance of the telomeric chromatin domain, a role that is independent of HP1a targeting to this region.

## DISCUSSION

Recent studies have described more than 100 HP1a interactors through different methodologies (Alekseyenko et al. 2014; Ryu et al. 2014; Swenson et al. 2016); furthermore, the importance of some of these interactors in the maintenance of HP1a immunolocalization-specific patterns has been proposed and recently assayed in cultured cells (Swenson et al. 2016). HP1a was described in the late 1980s as one of the major components of heterochromatin (James et al. 1989), and since that time, many HP1a variants have been described (Abel et al. 2009; Zhang et al. 2011). The main characteristic of these proteins is the presence of a chromodomain that is capable of recognizing primarily the di/tri-methylated state of H3K9. The research done on HP1a points towards a role for the protein as part of several protein complexes, each of which likely maintains different heterochromatic domains (Smothers and Henikoff 2001; Eissenberg and Elgin 2014).

The ATRX protein has been identified as a protein involved in the maintenance of heterochromatic regions, mainly pericentric and telomeric regions rich in repetitive sequences and transposable retro-elements (Ritchie et al. 2008; De La Fuente et al. 2011; Noh et al. 2016). Vertebrate ATRX has two important domains, the SNF2 (helicase/ATPase) domain and the ADD (H3K9me3/H3K4 unmodified recognition) domain. In *Drosophila*, these domains are separated and encoded by two different genes: the *dadd1* gene encodes three protein isoforms derived from alternative splicing events, which conserve an ADD domain, and the *dxnp* gene, which encodes two protein isoforms that conserve an SNF2 domain. Our group has previously demonstrated that the dAdd1 and dXNP proteins interact physically and that they co-localize with HP1a in several heterochromatic regions, including the chromocenter (López-Falcón et al. 2014). The independent study of these proteins in *Drosophila* can help in understanding the different roles played by these domains.

The results obtained in the present study demonstrate the cooperation between the ADD and the SNF2 domains to maintain chromosomal stability and in the targeting of the HP1a protein to telomeric domains.

The dAdd1 and dXNP proteins are HP1a interactors but clearly some of the protein isoforms may play different roles than HP1a in the regulation of the different telomeric domains. The chromosomal aberrations observed in the *dxnp* and *dadd1* mutants are not just restricted to telomeric fusions and are more generalized than the ones reported for HP1a. Mutations in *Su(var)205* often give rise to telomeric associations (in salivary glands) and telomeric fusions (in mitotic chromosomes), but mutations in this protein also affect HTT array retrotransposon expression, leading to chromosomal instability; thus, HP1a regulates both the CAP and the HTT array (Perrini et al. 2004). The phenotypes observed for the *dxnp* and *dadd1* alleles, in addition to the telomeric fusions, also include decondensations, in which the chromosome arms are longer, and centromeric fusions. These results are consistent with reports in the literature, as these proteins have a wide genomic distribution and have been shown to mediate the suppression of position effect variegation using pericentromeric reporters (Schneiderman et al. 2009; Emelyanov et al. 2010; López-Falcón et al. 2014). An interesting issue raised by our results is the fact that there seems to be a differential requirement for the specific isoforms of these proteins in selected heterochromatic compartments and in the prevalence of certain phenotypes analyzed. For instance, the *dxnp*<sup>2</sup> allele, which affects both dXNP isoforms, in combination with a null *dadd1* background, presented more telomeric fusions than any other of the genotypes analyzed (see Fig. 1e and Suppl. Table 1); the same combination, but with the *dxnp*<sup>3</sup> allele, which affects only the long dXNP isoform (dXNP<sub>L</sub>), did not show as many telomeric fusions. These data suggest that the short (dXNP<sub>S</sub>) isoform has an important role in preventing these types of chromosomal aberrations. Additionally, the frequency of telomeric fusions observed in *dadd1* and *dxnp* mutants is lower than the previously reported frequency when different allelic combinations of *Su(var)205* gene were assayed (Fanti et al. 1998). One possible explanation for the differences observed in the frequency of telomeric fusions is provided by our chromatin immunoprecipitation experiments which demonstrate that flies lacking the *dadd1* gene still have some levels of HP1a at the TAS-L region, providing evidence that at the telomeric heterochromatic domain the different regions (in this case the HTT array and the TAS regions) may have differential responses to the loss of dAdd1 proteins. When we analyzed the transcripts and copy numbers of the TART and Het-A retrotransposons, dAdd1 proteins appeared to have a major role in regulating the transposition and transcription of the TART and Het-A retrotransposons, as shown in Fig. 2a and 2b. These phenotypes are only evident in combinations of the null *dadd1* allele and the *dxnp*<sup>2</sup> allele. However, higher transcript levels do not always reflect on higher number of integrated copies as can be seen for the TART retrotransposon in the null *dadd1* background (Fig 2a). The lack of correlation between integrated copies and transcript abundance of this retrotransposon show that there must be another mechanism by which these proteins are maintaining the HTT array. Homologous recombination is the second mechanism by which *Drosophila* telomeres are maintained; interestingly, vertebrate ATRX has been shown to inhibit homologous recombination by sequestering the MRN complex (Clynes et al. 2015). Somatic mutations in vertebrate ATRX lead to an Alternative Lengthening of Telomeres

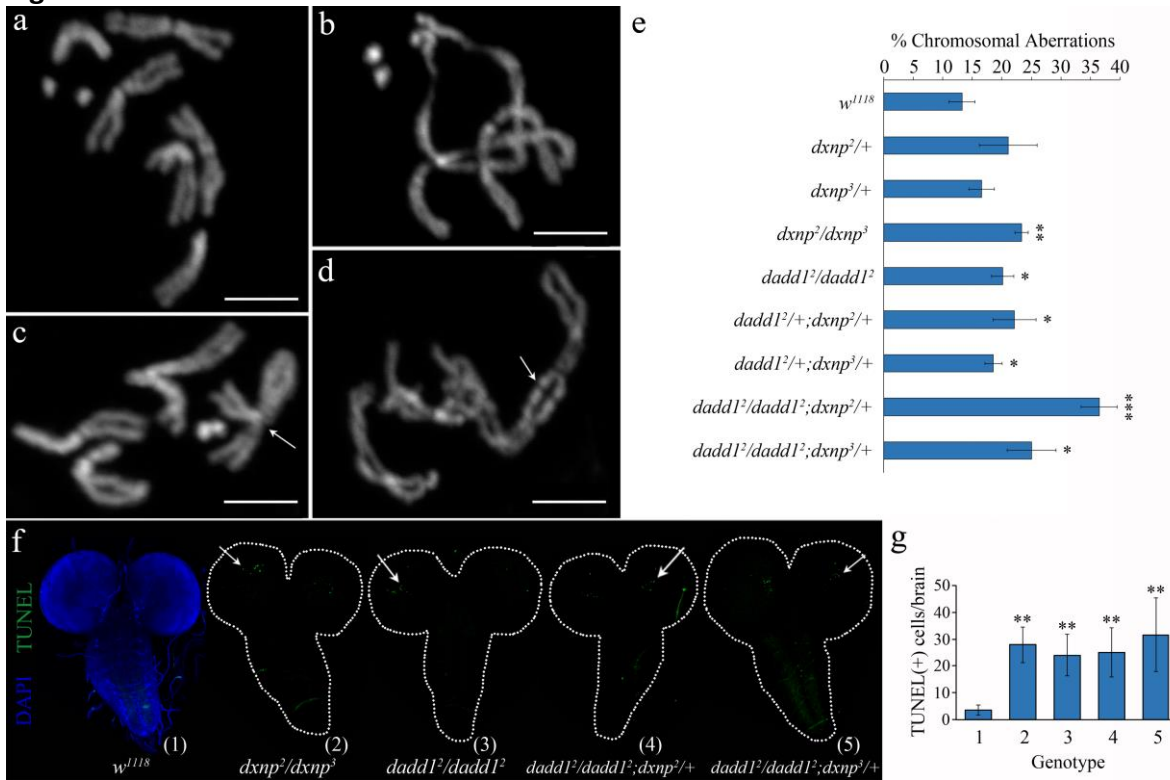
mechanism (ALT) in certain types of human cancers (Napier et al. 2015; Ramamoorthy and Smith 2015). Hence, it is possible that the *Drosophila* dXNP proteins could also prevent homologous recombination, and this could explain in part why an additional mutation in the null *dadd1* background in this case in *dxnp* is required to complete the retrotransposition mechanism, whereas the dAdd1 proteins, seem to have a role in regulating the transcription of these retro-elements. These data lead us to propose that the SNF2 (helicase/ATPase) domain is required to prevent the integration of the retrotransposons, while the ADD domain, possibly through the targeting of HP1a (and other activities), maintains a repressed transcriptional state of the retrotransposon elements in somatic cells. According to our results, the ADD-containing proteins are essential to maintain HP1a at all of the chromosomes telomeres, while dXNP appears to affect only a subset of the telomeres analyzed. As mentioned previously, the ADD domain is able to recognize the H3K9me3 histone mark when it is in combination with the H3K4 without methylation (Iwase et al. 2011; Alekseyenko et al. 2014), an interesting feature is that the ADD domain can keep binding to this mark even if the H3Ser10 is phosphorylated, whereas the chromodomain of HP1a cannot (Noh et al. 2014). There are reports in the literature that demonstrate that the Jil-1 kinase is present at the HTT telomeric domain, acting as a transcriptional activator for the expression of the Het-A retrotransposon (Silva-Sousa et al. 2012). Our results place the dAdd1 and dXNP proteins as negative regulators of HTT retrotransposon expression. When we performed the rescue experiments with the dAdd1a or dAdd1b protein isoforms in a null *dadd1* background it was interesting to observe that both proteins are localized at the telomeric regions. The dAdd1a signal is homogeneous at all the observed regions. However, only dAdd1a co-localized with HP1a at all the observed sites, as previously reported (Alekseyenko et al. 2014). An interesting observation is that in the chromosomes derived from the dAdd1a exogenous expression, the wild type enrichment of HP1a at the chromocenter is lost. Thus it is possible that in a null *dadd1* background the exogenous expression of the dAdd1a protein isoform is sequestering HP1a from this heterochromatic region. This result indicates the importance of maintaining the correct wild type levels of dAdd1 proteins. When we analyzed the localization of dAdd1b protein isoform we could see that this protein failed to target HP1a at the telomeres and at the chromosome arms, even though it does localize to the telomeres and other regions at the chromosome arms. Another interesting feature is that dAdd1b seems to be enriched at the chromocenter and this does not perturb HP1a localization and enrichment at this region (Fig. 4 c, c'', d and d' panels).

Thus, perhaps the dAdd1a protein is required to maintain correct levels of HP1a at the telomeres in regions where there is H3Ser10 phosphorylation, thereby maintaining the balance between an active transcriptional state (mediated by Jil-1) and a silenced state required to maintain correct levels of the retrotransposons and to avoid incorrect retrotransposition mechanisms. Whereas dAdd1b could also carry silencing activities independent of HP1a.

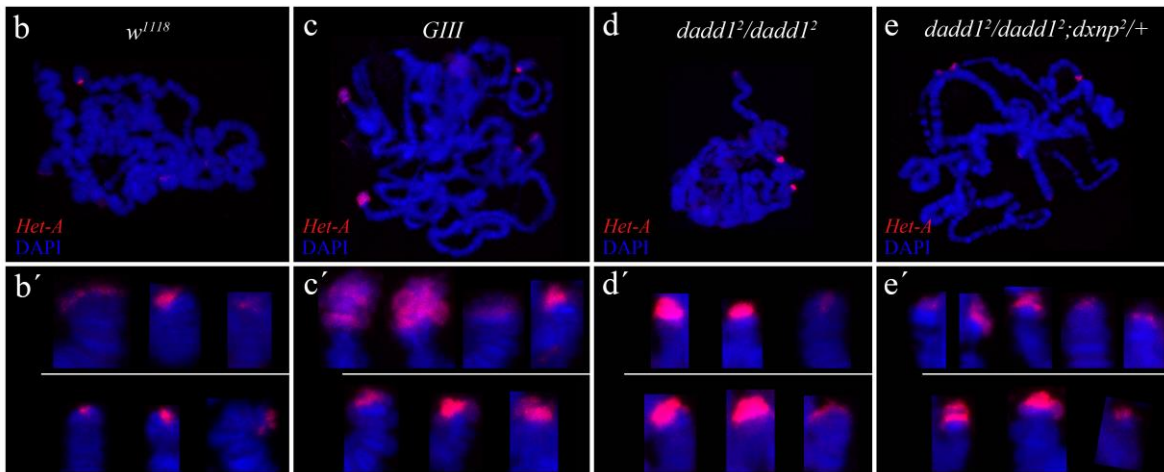
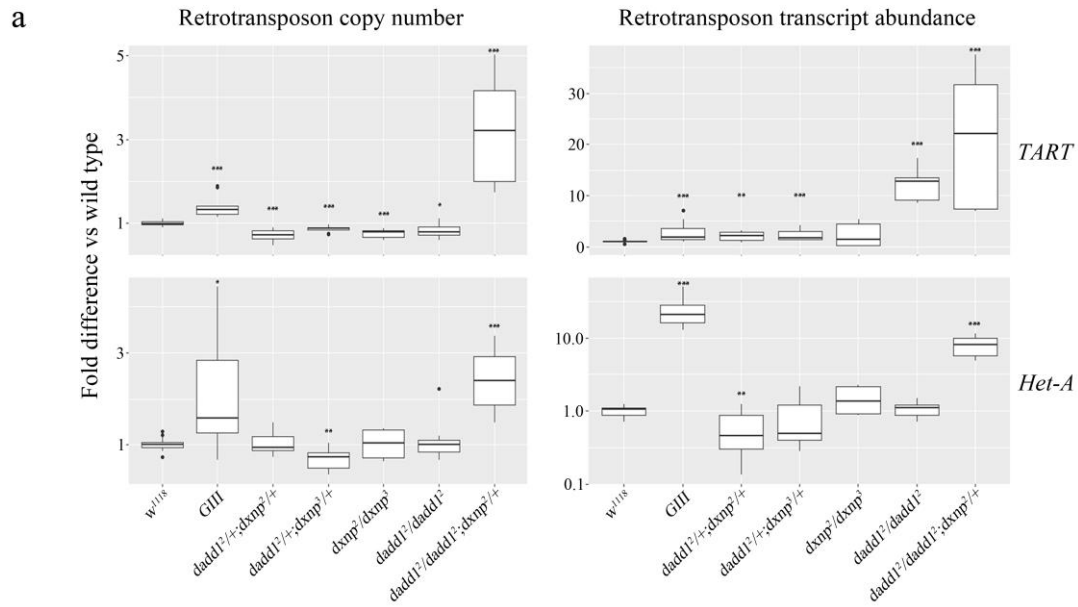
Based on these data, we propose a model in which the dXNP and dAdd1 proteins cooperate to maintain chromosomal stability by the transcriptional silencing of the retrotransposons of the HTT array and by promoting the correct targeting of HP1a to all of the telomeres (Fig. 5).

Other dXNP and dAdd1-interacting proteins have been identified also in *Drosophila* telomeres, including DREF (Silva-Sousa et al. 2012; Valadez-Graham et al. 2012), CG1910 (Alekseyenko et al. 2014) and dSETDB1 (Cardoso et al. 1998; Gou et al. 2010). It is interesting that dSETDB1 is also present at *Drosophila* telomeres, as SETDB1 has been established to participate in the retrotransposon silencing through a DNA methylation-dependent mechanism in vertebrates. Other dAdd1 interactors include Bonus (BON) (Alekseyenko et al. 2014), which has been conserved through evolution; the family of proteins in vertebrates most related to this protein are the TIF1 families, which include TIF1 alpha, beta and gamma. One of these families includes TIF1/TRIM28, which is also known as KAP1. In vertebrates, KAP1, Setdb1 and DAXX form a complex with ATRX that helps to maintain heterochromatin at the telomeres and IAP repeats (Sadic et al. 2015; Voon and Wong 2016). It would be important in the future to address whether these proteins participate in the maintenance of the silenced state of the HTT array along with the dXNP and dAdd1 proteins. In conclusion, we have demonstrated that the dAdd1 and dXNP proteins cooperate to maintain genomic stability through at least two different mechanisms, preventing retrotransposon transcription and integration of the retrotransposons in the HTT array, as well as targeting HP1a to telomeric regions in somatic cells. Our study has also revealed the specific roles of the different dXNP and dAdd1 protein isoforms in the maintenance of the telomeric heterochromatic domain.

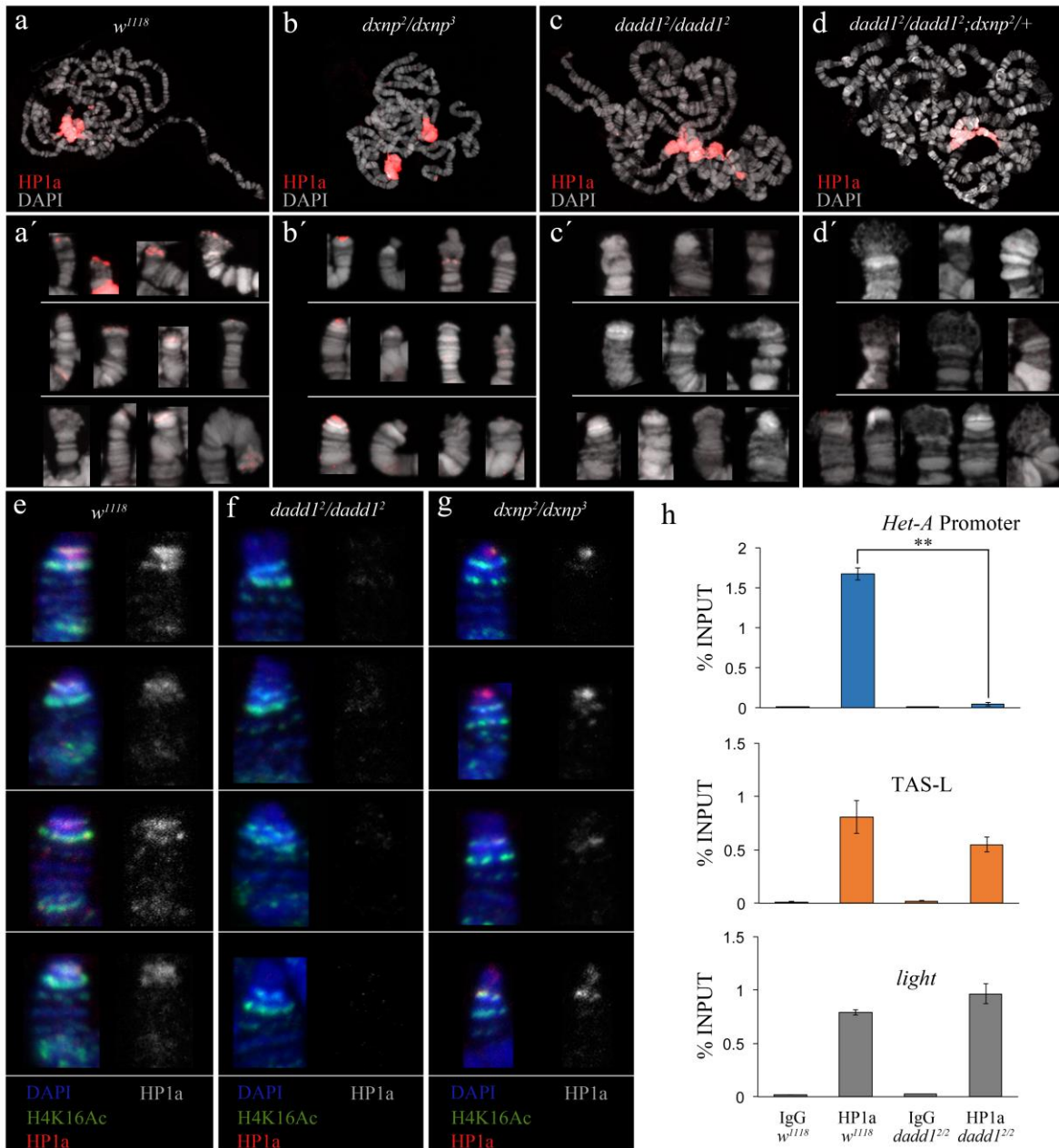
## Figures



**Figure 1.** Mutations in *dxnp* and *dadd1* generate chromosomal aberrations. a) Wild-type metaphase chromosomes: the two pairs of each chromosome (the sexual pair and chromosomes 2, 3 and 4 (dot chromosome)) can be observed. b) Example of chromosomal decondensations: it can be observed that the chromosome arms were larger than the wild-type chromosome arms (length from the centromere to the telomere). c) Centromeric fusions, with the arrow pointing to one of the centromeric fusions. d) Telomeric fusions, with the arrow pointing to one of the telomeric fusions. e) Percentage of observed chromosomal aberrations. The number of cells with aberrations/number of total mitoses is shown. Error bars represent standard deviation of aberrant mitoses of three independent experiment per genotype. Significance code: \*\*\* P<0.001; \*\* P<0.01; \* P<0.05. f) Cell death was evaluated using a TUNEL assay. The contours of larval brains are shown with a dotted white line. Wild-type flies did not show cell death; however, genotypes that harbored the null *dadd1<sup>2</sup>* allele and *dxnp<sup>2</sup>/dxnp<sup>3</sup>* showed a small amount of cell death in the brain lobes and thoracic ganglia (arrows). TUNEL signal outside the contoured white dotted lines belongs to tracheas or tissue such as the ring gland. g) Quantification of apoptotic cells per larval brain. The number of TUNEL positive cells per brain for each genotype in f) is shown. Error bars represent standard deviation of TUNEL positive cells number of ten brain per genotype. \*\* P<0.01 indicate significant differences with respect to wild type.



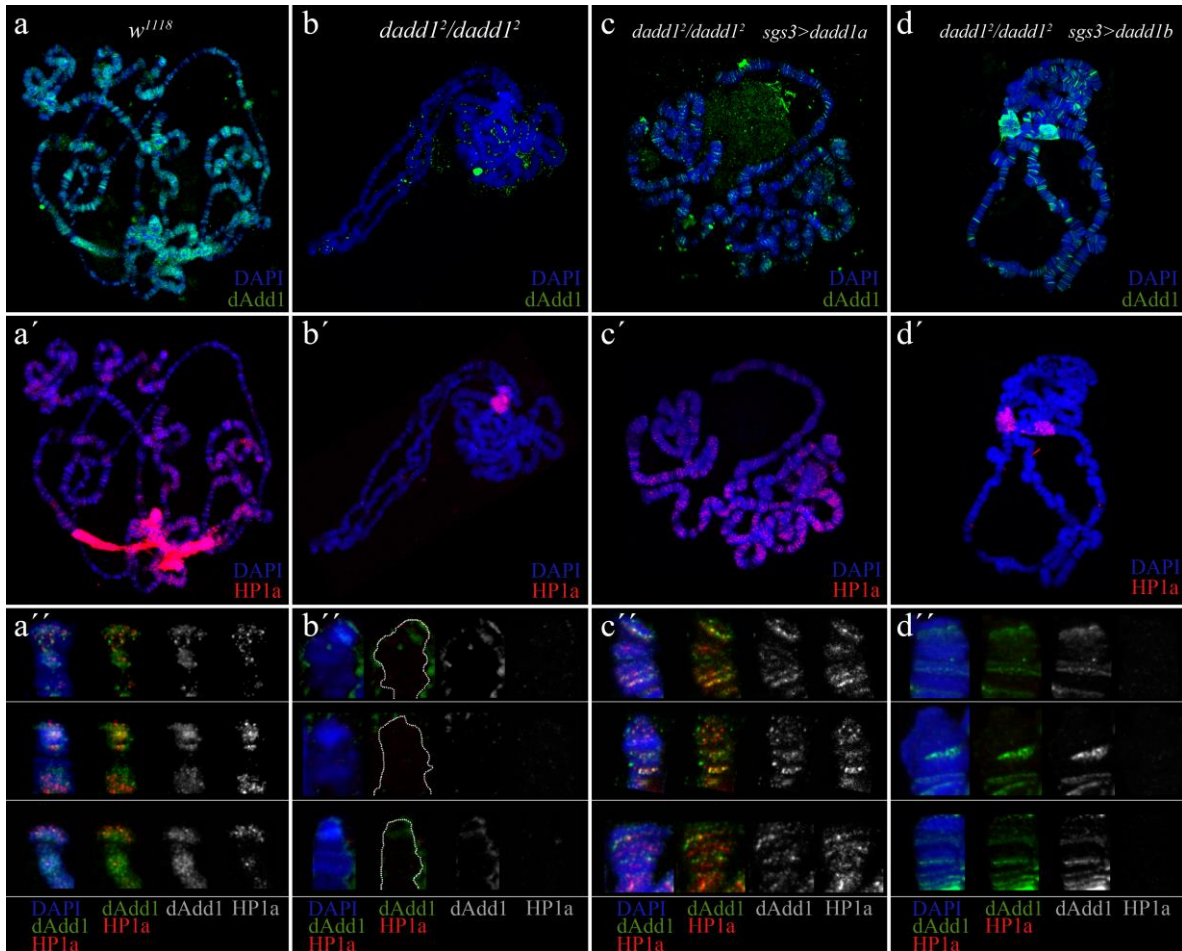
**Figure 2.** a) The *dxnp* and *dadd1* mutants show aberrant transcription and integration of the retrotransposons of the HTT array. Boxplot of the transcript abundance and number of integrated copies of the *TART* and *Het-A* retrotransposons are shown. The genotypes are shown in the bottom of the graphs. The fold difference versus *white* (wild-type strain) was evaluated through a Mann-Whitney test. Significance code: \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ . b, c, d, e) DNA *In situ* hybridization of wild type (*w<sup>1118</sup>*), *GIII*, *dadd1* null and *dadd1<sup>2</sup>/dadd1<sup>2</sup>;xnp<sup>2</sup>/+* polytene chromosomes, respectively, using a *Het-A* probe, a magnification of the chromosome tips is shown in b', c', d' and e'. Note that for the *GIII* genotype (positive control), the signal is amplified due to the number of integrated copies.



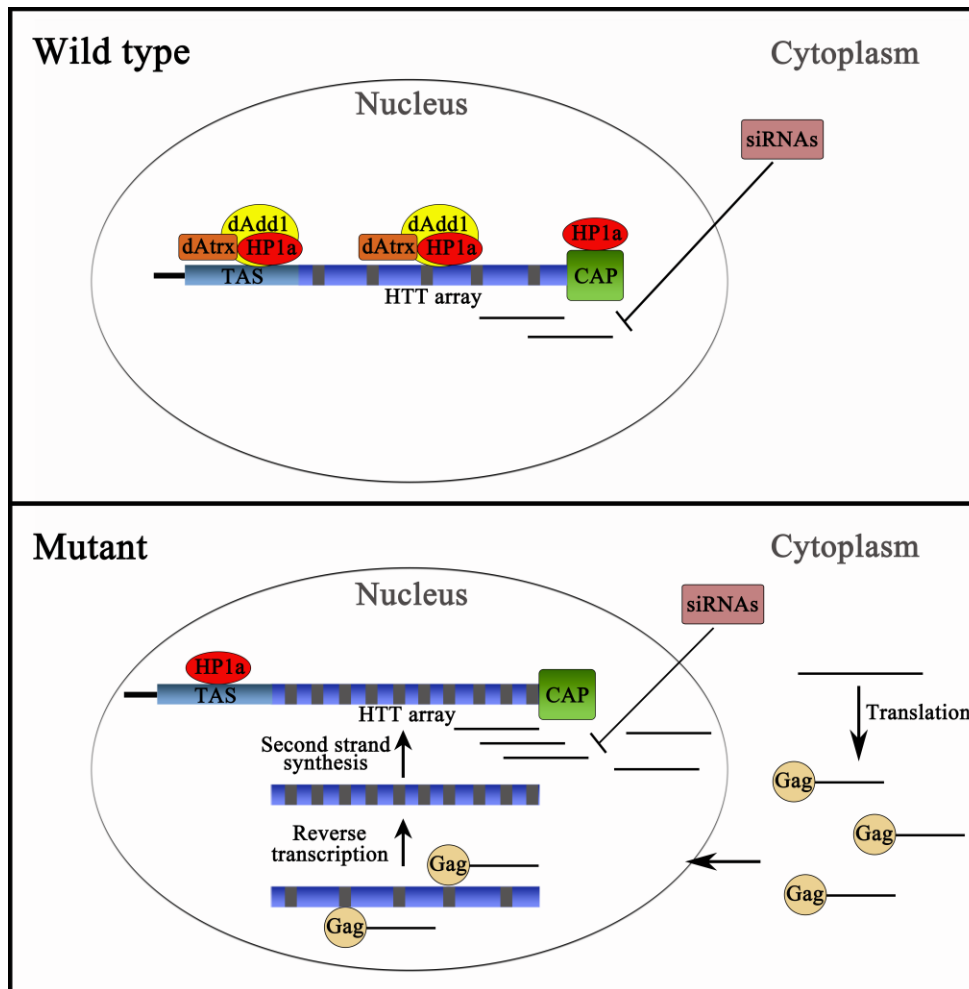
**Figure 3.** The dAdd1 proteins are essential to maintain telomeric HP1a protein localization. Polytene chromosomes preparations were immunostained with the C1A9 (anti-HP1a) monoclonal antibody. Chromosomes were visualized by confocal microscopy. a) Wild-type HP1a localization on polytene chromosomes: the signal can be observed at the chromocenter and on the telomeric regions (a'). b) Polytene chromosome from a heteroallelic mutant *dxnp* fly. In these chromosomes, the HP1a signal was still localized at the chromocenter but was lost at some telomeres, as shown in b'. The chromocenter was also fragile and subject to breaks due to the squashing technique. c) The null *dadd1* chromosomes maintained the HP1a signal at the chromocenter but lost all of the HP1a telomeric signal, as shown in c'. d) Chromosomes of the *dadd1<sup>2/dadd1<sup>2</sup>;dxnp<sup>2/+</sup></sup>* genotype maintained the HP1a signal at the chromocenter but also lost the telomeric signal;



furthermore, these chromosomes additionally showed decondensation of the telomeric regions, as shown in d'. In a', b', c' and d' magnification images of telomeric regions of different immunostained chromosomes are shown, only the first row of each magnification corresponds to the telomeres shown in the complete immunostained chromosome shown in 3a, b, c, and d. e) HP1a signal in telomeres of wild type X polytene chromosomes (*w<sup>1118</sup>*). In the wild type condition HP1a (red signal) is present at the tip of the chromosome. X chromosomes were marked by immunostaining with H4K16Ac (green signal). f) In the null *dadd1* condition, we can see that HP1a is lost from all X chromosomes analyzed g) In the *dxnp<sup>2</sup>/dxnp<sup>3</sup>* heteroallelic combination the HP1a signal is partially lost. h) The HP1a protein is lost from specific telomeric regions in the *dadd1* null genotype. Chromatin immunoprecipitation experiments were performed using the C1A9 antibody (anti-HP1a) and the *Het-A* promoter and TAS-L telomeric regions were evaluated as well as the *light* gene which has a pericentromeric localization. HP1a protein was present at all the analyzed sites in the wild type condition whereas in the *dadd1* null condition it was completely lost from the *Het-A* promoter. Error bars represent standard deviation. \*\* P<0.01.



**Figure 4.** The dAdd1a protein isoform is necessary to maintain HP1a localization at the telomeric region. a) Wild-type localization of the dAdd1 (green signal) proteins at the polytene chromosomes. a') Wild-type localization of the HP1a (red signal) protein. b and b') In the null *dadd1* mutant the dAdd1 signal was lost, however the HP1a signal is conserved at the pericentric heterochromatin. c) Rescue experiments performed by expressing the dAdd1a protein isoform show that dAdd1a localizes to heterochromatic regions. c' and c'') Conditional expression using the *sgs3-Gal4* driver showed that the HP1a signal was restored at these telomeres. d) Rescue experiments performed by the conditional expression of the dAdd1b protein isoform using the de *sgs3-Gal4* driver showed that the dAdd1b protein also has a heterochromatic distribution and becomes enriched at the chromocenter of polytene chromosomes. d' and d'') HP1a signal was not restored at the telomeres in which dAdd1b was conditionally expressed, however we can see that dAdd1b also has a telomeric location (green signal).



**Figure 5.** Model for the maintenance of chromosome stability mediated by dXNP and dAdd1. In somatic wild-type cells, dXNP, together with dAdd1a, cooperate to facilitate the localization of HP1a to telomeric regions, maintaining a silenced state. An RNAi mechanism is also involved in the maintenance of the silenced state (Ghildiyal et al. 2008). In the absence of dXNP and dAdd1, the HP1a protein is lost at all the chromosomes telomeres and the transcription of the HTT array is deregulated promoting the integration of retrotransposon copies into the genome. However, HP1a is not completely lost from the TAS regions. Our data also indicate that the RNAi mechanism is probably insufficient to maintain the silenced state in the *dxnp* and *dadd1* mutants, demonstrating the predominant role of these proteins for the maintenance of a silenced state in somatic cells.

**Compliance with ethical standards:**

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Abel J, Eskeland R, Raffa GD, et al (2009) *Drosophila* HP1c is regulated by an auto-regulatory feedback loop through its binding partner Woc.
- Alekseyenko AA, Gorchakov AA, Zee BM, et al (2014) Heterochromatin-associated interactions of *Drosophila* HP1a with dADD1, HIP1, and repetitive RNAs. *Genes Dev* 28:1445–1460. doi: 10.1101/gad.241950.114
- Antao JM, Mason JM, Dejardin J, Kingston RE (2012) Protein landscape at *Drosophila melanogaster* telomere-associated sequence repeats. *Mol Cell Biol* 32:2170–2182.
- Bassett AR, Cooper SE, Ragab A, Travers AA (2008) The chromatin remodelling factor dATRX is involved in heterochromatin formation.
- Biessmann H, Mason JM (2003) Telomerase-independent mechanisms of telomere elongation. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:2325–2333.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401 LP-415.
- Brower-Toland B, Findley SD, Jiang L, et al (2007) *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev* 21:2300–2311.
- Canzio D, Chang EY, Shankar S, et al (2011) Chromodomain-mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome bridging mechanism for heterochromatin assembly. *Mol Cell* 41:67–81. doi: 10.1016/j.molcel.2010.12.016
- Capkova Frydrychova R, Biessmann H, Mason JM (2009) Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenet. Genome Res.*
- Cardoso C, Timsit S, Villard L, et al (1998) Specific interaction between the XNP/ATR-X gene product and the SET domain of the human EZH2 protein. *Hum Mol Genet* 7:679–684.
- Cenci G, Siriaco G, Raffa GD, et al (2003) The *Drosophila* HOAP protein is required for telomere capping. *Nat Cell Biol* 5:82–4.
- Clynes D, Jelinska C, Xella B, et al (2015) Suppression of the alternative lengthening of telomere pathway by the chromatin remodelling factor ATRX. *Nat Commun* 6:7538.
- De La Fuente R, Baumann C, Viveiros MM (2011) Role of ATRX in chromatin structure and function: implications for chromosome instability and human disease. *Reproduction* 142:221–234. doi: 10.1530/REP-10-0380
- Deng Y, Chang S (2007) Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Lab Invest.* doi: 10.1038/labinvest.3700673
- Eissenberg JC, Elgin SCR (2014) HP1a: A Structural Chromosomal Protein Regulating Transcription. *Trends Genet* 30:103–110. doi: 10.1016/j.tig.2014.01.002
- Elbarbary RA, Lucas BA, Maquat LE (2016) Retrotransposons as regulators of gene expression. *Science* 351:aac7247–aac7247. doi: 10.1126/science.aac7247
- Emelyanov A V., Konev AY, Vershilova E, Fyodorov D V. (2010) Protein complex of *Drosophila* ATRX/XNP and HP1a is required for the formation of pericentric beta-heterochromatin in vivo. *J Biol Chem* 285:15027–15037.
- Fanti L, Giovinazzo G, Berloco M, Pimpinelli S (1998) The Heterochromatin Protein 1 Prevents Telomere Fusions in *Drosophila* telomeric fragments from other chromosomes or were involved in other rearrangement breakpoints. However, terminal deletions have since been recovered in *Dro*. *Mol Cell* 2:527–538.
- Gelbart ME, Larschan E, Peng S, et al (2009) *Drosophila* MSL complex globally acetylates H4K16 on the male X chromosome for dosage compensation. *Nat Struct Mol Biol* 16:825–832.
- Goodier JL (2016) Restricting retrotransposons: a review. *Mob DNA* 7:16. doi: 10.1186/s13100-016-0070-z
- Gou D, Rubalcava M, Sauer S, et al (2010) SETDB1 is involved in postembryonic DNA methylation and gene silencing in *Drosophila*.
- He Q, Kim H, Huang R, et al (2015) The Daxx/Atrx Complex Protects Tandem Repetitive Elements during DNA Hypomethylation by Promoting H3K9 Trimethylation. *Cell Stem Cell* 17:273–286.
- Iwase S, Xiang B, Ghosh S, et al (2011) ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nat Struct Mol Biol* 18:769–776.
- James TC, Eissenberg JC, Craig C, et al (1989) Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated

- nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol* 50:170–80.
- Lin X, Tirichine L, Bowler C (2012) Protocol: Chromatin immunoprecipitation (ChIP) methodology to investigate histone modifications in two model diatom species. *Plant Methods* 8:48.
- Ling D, Salvaterra PM (2011) Robust RT-qPCR Data Normalization: Validation and Selection of Internal Reference Genes during Post-Experimental Data Analysis. *PLoS One* 6:e17762. doi: 10.1371/journal.pone.0017762
- López-Panadès E, Gavis ER, Casacuberta E Specific Localization of the *Drosophila* Telomere Transposon Proteins and RNAs, Give Insight in Their Behavior, Control and Telomere Biology in This Organism. doi: 10.1371/journal.pone.0128573
- López-Falcón B, Meyer-Nava S, Hernández-Rodríguez B, et al (2014) Characterization of the *Drosophila* group ortholog to the amino-terminus of the alpha-thalassemia and mental retardation X-linked (ATRX) vertebrate protein. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0113182
- Lu X, Wontakal SN, Emelyanov A V, et al (2009) Linker histone H1 is essential for *Drosophila* development, the establishment of pericentric heterochromatin, and a normal polytene chromosome structure. *Genes Dev* 23:452–465. doi: 10.1101/gad.1749309
- Mathieu N, Pirzio L, Freulet-Marrière M-A, et al (2004) Telomeres and chromosomal instability. *Cell Mol Life Sci*. doi: 10.1007/s00018-003-3296-0
- Napier CE, Huschtscha LI, Harvey A, et al (2015) ATRX represses alternative lengthening of telomeres. *Oncotarget* 6:16543–58.
- Noh K-M, Maza I, Zhao D, et al (2014) ATRX tolerates activity-dependent histone H3 methyl/phos switching to maintain repetitive element silencing in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1–8.
- Noh KM, Allis CD, Li H (2016) Reading between the Lines: “aDD”-ing Histone and DNA Methylation Marks toward a New Epigenetic “sum.” *ACS Chem. Biol.* 11:554–563.
- Oikemus SR, McGinnis N, Queiroz-Machado J, et al (2004) *Drosophila* atm/telomere fusion is required for telomeric localization of HP1 and telomere position effect. *Genes Dev* 18:1850–1861.
- Papaconstantinou M, Pepper AN, Wu Y, et al (2010) Menin links the stress response to genome stability in *drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*.
- Perrini B, Piacentini L, Fanti L, et al (2004) HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.036
- Ramamoorthy M, Smith S (2015) Loss of ATRX Suppresses Resolution of Telomere Cohesion to Control Recombination in ALT Cancer Cells. *Cancer Cell* 28:357–369.
- Ritchie K, Seah C, Moulin J, et al (2008) Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects. *J Cell Biol* 180:315–324.
- Ryu HW, Lee DH, Florens L, et al (2014) Analysis of the heterochromatin protein 1 (HP1) interactome in *Drosophila*. *J Proteomics* 102:137–147.
- Sadic D, Schmidt K, Groh S, et al (2015) Atrx promotes heterochromatin formation at retrotransposons. *EMBO Rep* 16:836–50. doi: 10.15252/embr.201439937
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3:1101–1108.
- Schneiderman JI, Sakai A, Goldstein S, Ahmad K (2009) The XNP remodeler targets dynamic chromatin in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14472–14477.
- Silva-Sousa R, López-Panadès E, Piñeyro D, Casacuberta E (2012b) The Chromosomal Proteins JIL-1 and Z4/Putzig Regulate the Telomeric Chromatin in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1003153
- Singh AK, Lakhota SC (2016) The hnRNP A1 homolog Hrb87F/Hrp36 is important for telomere maintenance in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 125:373–388.
- Siriaco GM, Cenci G, Haoudi A, et al (2002) Telomere elongation (Tel), a new mutation in *Drosophila melanogaster* that produces long telomeres. *Genetics* 160:235–245.
- Smothers JF, Henikoff S (2001) The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol Cell Biol* 21:2555–69.
- Sullivan W, Ashburner M, Hawley RS (2000) *Drosophila* protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Swenson JM, Colmenares SU, Strom AR, et al (2016) The composition and organization of *Drosophila*

heterochromatin are heterogeneous and dynamic. *Elife* 5:e16096. doi: 10.7554/eLife.16096

Valadez-Graham V, Yoshioka Y, Velazquez O, et al (2012) XNP/dATRX interacts with DREF in the chromatin to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkr865

Voon HPJ, Wong LH (2016) New players in heterochromatin silencing: histone variant H3.3 and the ATRX/DAXX chaperone. *Nucleic Acids Res* 44:1496–1501. doi: 10.1093/nar/gkw012

Williams BC, Karr TL, Montgomery JM, Goldberg ML (1992) The *Drosophila* *l(1)zw10* gene product, required for accurate mitotic chromosome segregation, is redistributed at anaphase onset. *J Cell Biol* 118:759 LP-773.

Wong LH, McGhie JD, Sim M, et al (2010) ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res* 20:351–360. doi: 10.1101/gr.101477.109

Zhang D, Wang D, Sun F (2011) *Drosophila melanogaster* heterochromatin protein HP1b plays important roles in transcriptional activation and development. *Chromosoma* 120:97–108.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. James Mason for providing the *GIII* strain. We also thank Silvia Meyer for the construction of the plasmids used. We would like to thank Benjamín Hernández for his participation at the beginning of this work. We also thank Claudia Mónica Flores Loyola for their participation in the LOH assay. J.C. was supported by a Masters degree scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 404495). J.M.M-M was supported by a DGAPA-UNAM postdoctoral fellowship. We also thank Arturo Pimentel, Andrés Saralegui and Dr. Chris Wood from the LMNA for advice on the use of the microscopes. We thank Dr. Martha Vazquez for her valuable comments on this work. This work was supported by grants from CONACyT 219673 and DGAPA UNAM number IN200315 to MZ and grant 177393 from (CONACyT) and grants IN204915 and IA200613 from (PAPIIT-UNAM) to VV-G.