



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Localización de la maquinaria transcripcional durante el desarrollo embrionario
de *Drosophila melanogaster*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Miguel Angel Jiménez Beltrán

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
Instituto de Biotecnología, UNAM

COMITÉ TUTORAL

Dra. Denhi Schnabel Peraza
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Martin Gustavo Pedraza Alva
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos, Diciembre, 2020



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.

COMITÉ SINODAL

Dr. Jean-Louis Charli
[Instituto de Biotecnología](#)

Dr. Enrique Salas Vidal
[Instituto de Biotecnología](#)

Dra. Diana Escalante Alcalde
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dra. Susana Castro Obregón
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Enrique Merino Pérez
[Instituto de Biotecnología](#)

ÍNDICE

ÍNDICE	3
Resumen.....	4
Introducción.....	5
Gametogénesis	5
Gametogénesis Masculina	5
Gametogénesis Femenina	8
Fecundación y Transición embrionaria	18
Desarrollo embrionario temprano en <i>Drosophila melanogaster</i>	20
Divisiones nucleares en el desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	20
Activación de la transcripción cigótica y regulación	24
Transcripción durante la Activación de la Transcripción Cigótica	29
Transición de la Blástula Media (MBT) y Celularización	32
Inicio de la Transcripción en Eucariontes	34
Antecedentes.....	36
Justificación	39
Hipótesis.....	39
Objetivo General.....	39
Objetivos Particulares.....	39
Estrategia experimental.....	40
Metodología	41
Colecta de Embriones.....	41
Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)	42
Hibridación <i>In Situ</i> (ISH)	43
Elaboración de sondas de para ISH	45
Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT- PCR)	46
Selección y tinción de embriones.....	47
Análisis Estadísticos.....	48
Resultados y Discusión.....	49
Modelo.....	67
Conclusión.....	69
Perspectivas	69
Anexos	70
Bibliografía.....	72

Resumen

El desarrollo embrionario temprano es regulado por los transcritos maternos; posteriormente, son degradados, dando lugar a la activación de la transcripción cigótica (ATC). Durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*, la ATC se da en dos olas; la primera inicia en el ciclo mitótico 8 y la segunda al finalizar la Transición de la Blástula Media (MBT), en el ciclo nuclear 13. En conjunto, los ciclos mitóticos previos a la ATC, son muy rápidos (8 min en promedio) y sincrónicos; sin embargo, estos se alargan entre la primera y segunda ola de transcripción, es decir, entre los ciclos nucleares 8 al 13. Para asegurar que la transcripción de los primeros genes se lleve a cabo correctamente, estos presentan promotores de tipo TATA y sitios de unión reconocidos por el factor transcripcional Zelda, pues gran parte de los genes transcritos en este periodo del desarrollo embrionario son reconocidos por este factor transcripcional.

Debido a que los ciclos mitóticos, durante este periodo del desarrollo temprano de *Drosophila melanogaster* son muy rápidos, probablemente la maquinaria basal de transcripción se encuentre unida a los promotores de los genes transcritos; incluso durante la mitosis, asegurando una rápida reactivación de la transcripción. Esto debido a que se ha reportado la presencia de factores generales de transcripción, en promotores de algunos genes (TBP y RNA Pol II) o su colocalización nuclear (TFIIH) durante la mitosis. Al mismo tiempo, experimentos han mostrado procesos de transcripción *de novo* durante la mitosis en líneas celulares humanas. Ello sugiere que la maquinaria basal de transcripción, durante la embriogénesis temprana de *Drosophila melanogaster*, no solo esté unida a los promotores de los genes, sino también transcripcionalmente activa.

En el siguiente trabajo se observó la presencia de la RNA Polimerasa II, en el promotor de las histonas H3 y H4 durante la mitosis, por CHIP en embriones tempranos de *Drosophila melanogaster*. Al mismo tiempo, se determinó que la RNA Polimerasa II se encuentra transcripcionalmente activa, ya se observó la presencia de transcritos *de novo* de la histona H3 en la mitosis, por medio de RT-PCR. Al mismo tiempo la concentración de la RNA Polimerasa II en los promotores y los respectivos transcritos, de H3, eran menores con respecto a los presentes en interfase.

A partir de los experimentos desarrollados en el presente trabajo, se estableció que la maquinaria basal de transcripción se encuentra en los promotores de los genes, y es capaz de transcribir durante la mitosis, al menos para los genes de las histonas, como H3, durante la embriogénesis temprana de *Drosophila melanogaster*.

Introducción

Los organismos multicelulares están compuestos por dos tipos celulares principales: Las células somáticas y germinales. Las células somáticas se diferencian en muchos tipos celulares, los cuales, a su vez, se organizan en tejidos y órganos. En contraste, las células germinales conllevan a la formación de los gametos. La fusión de ambos gametos, masculino y femenino, darán como resultado la formación de un nuevo organismo, el cual llevará la mitad del material genético de cada uno de los progenitores **(Nakamura et al., 2010)**.

Gametogénesis

Gametogénesis Masculina

La formación de los gametos masculinos o espermatogénesis, tiene lugar en los testículos, por células troncales o *stem cells*. En *Drosophila melanogaster* existen 3 poblaciones celulares de *stem cells*: células del racimo o *hub cells*, células troncales del quiste somático o *somatic cyst stem cells (CysSC)* y células troncales germinales o *germinal stem cells (GSC)*. Las GSC, están unidas a las células del racimo, dividiéndose mitóticamente cada 24 h de forma asimétrica en dos tipos celulares, una GSC y una célula diferenciada, gonioblasto (GB). Posteriormente, a partir del GB se llevarán a cabo cuatro divisiones mitóticas sin una citocinesis completa, formando un sincitio, llamada espermatogonia. Las espermatogonias se diferenciarán a espermatocitos, que formarán los espermatozoides maduros **(Sheng y Matunis, 2011)**.

Las CysSC, al igual que las GSC, se dividen asimétricamente; produciendo una CysSC y una *cyst cell*. Las *cyst cell* están físicamente en contacto con las *hub cells*, pues dos de ellas encapsulan una GB, ayudando en su diferenciación, similar a las células de Sertoli. Posteriormente, el GB entran en mitosis llevando a cabo cuatro ciclos mitóticos, con una citocinesis incompleta, generando un quiste con 16 espermatogonias (fusoma). A su vez, el factor *bag of marbles (bam)*, promueve la diferenciación, ya que su pérdida parcial causa retrasos o diferenciación prematura. Una vez terminado el 4 ciclo mitótico, inician una fase S premeiotica, donde aumenta el volumen celular de 20 a 25 veces. Posteriormente, los espermatocitos primarios realizan los 2 ciclos meióticos, con una citocinesis incompleta, resultado un conjunto de 64 células haploides (Figura 1) **(Demarco et al., 2014)**.

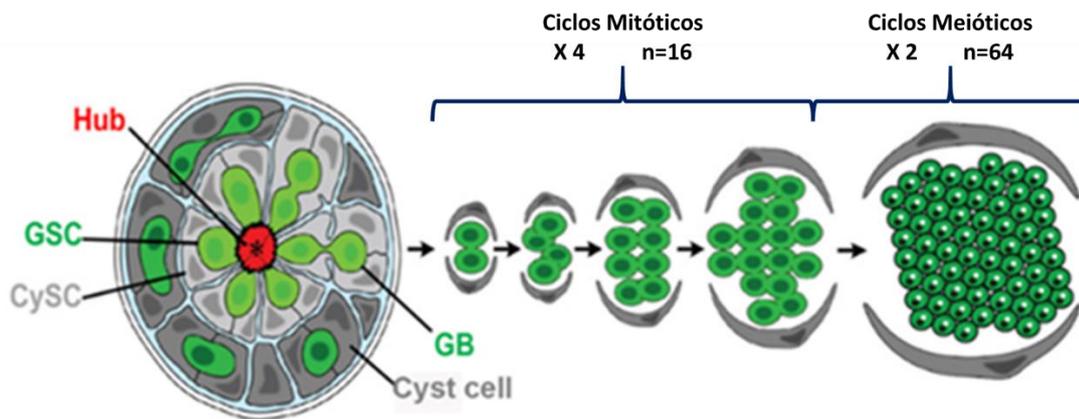


Figura 1. Esquema de la espermatogénesis. Las *germinal stem cells* (GSC, verde claro) y las *somatic cyst stem cells* (CySC, gris claro) entran en contacto con las *hub cells* (rojas). Las GSC se dividen, en una GSC y un gonioblasto (GB). Los GB se someten a 4 ciclos mitóticos, formando un quiste de 16 espermatogonias (verde oscuro). Las espermatogonias, se someten a ciclos 2 meióticos, con una citocinesis incompleta, generando 64 espermátidas haploides (Demarco *et al.*, 2014).

Durante la meiosis en *Drosophila melanogaster*, hay un cambio en la conformación de la cromatina, lo que conlleva al remplazamiento de histonas por protaminas. Este intercambio consta de varios pasos, entre ellos las modificaciones postraduccionales de histonas. Las primeras modificaciones vistas son la mono ubiquitinación de las histonas H2A y H2B, siendo degradadas. Posterior a la degradación de H2A y H2B, se hiperacetila la histona H4 en distintos residuos de Lys (5, 8, 12 y 16); y se fosforila el de residuo de Ser 1; estas modificaciones permiten y facilitan la accesibilidad de la cromatina, para el recambio por las histonas por protaminas. Además, al mismo tiempo están presentes marcas de silenciamiento y compactación, como son: la mono, di y tri metilación de la Histona 3 en la Lys 4, 9 y 27 (Rathke *et al.*, 2007; Binder *et al.*, 2017).

Con relación al intercambio de las histonas, la Histona H1 es reemplazada por las proteínas *don juan* (DJ), *don juan like* (DJL) y *male-specific transcript 77F* (Mst77F); durante la meiosis y maduración. DJ y DJL están presentes en las células germinales durante la meiosis, pero son eliminadas en la maduración o espermiogénesis; mientras que, Mst77F es depositada en la espermiogénesis en conjunto con las protaminas. Además, las variantes de histonas H2Av y H3.3 se mantienen en la cromatina; perdiéndose progresivamente al avanzar la meiosis. Previo a la deposición de las protaminas, se ha identificado la presencia de las proteínas de transición (TPs); entre ellas Tpl94D. Tpl94D, así como las TPs, presenta una alta afinidad al DNA, debido a regiones ricas en Arg y Lys. Además, las TPs ayudan a la reparación de las rupturas de doble cadena de DNA presentes durante la meiosis, ya que permiten los procesos de recombinación. Otro aporte importante de las TPs, es el facilitar el intercambio de las protaminas, por el reclutamiento de UbcD6. En conjunto, estos pasos ayudan a la deposición de las protaminas, que, en *Drosophila melanogaster*, son

dos tipos: las Protaminas A (Mst35Ba) y B (Mst35Bb), ricas en Cys y Arg (**Figura 3**) (Rathke, *et al.*, 2014).

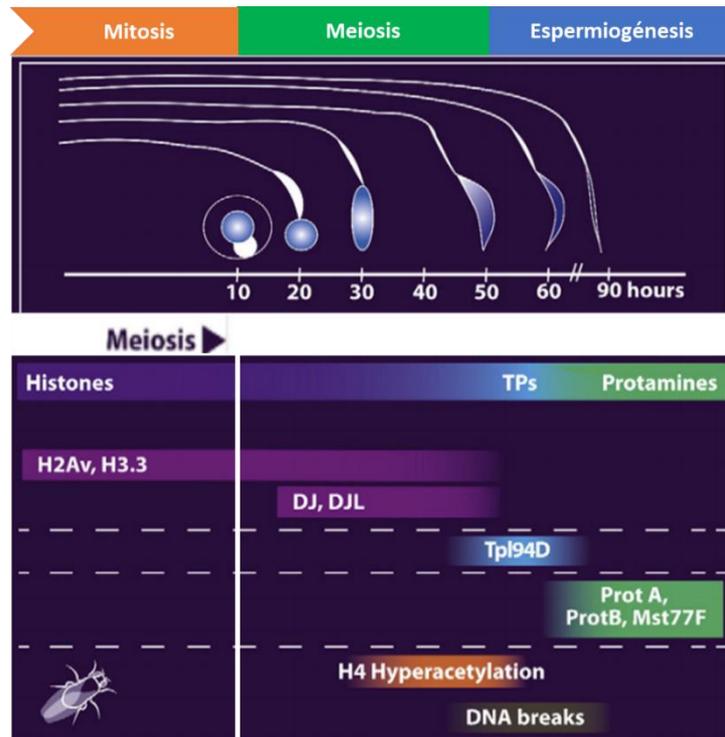


Figura 2. Esquema donde se muestran los procesos que acontecen durante el recambio de las histonas por protaminas, durante la diferenciación espermática, en *Drosophila melanogaster*, desde la meiosis, hasta su finalización y maduración o Espermiogénesis. (Rathke, *et al.*, 2014).

Al terminar de los dos ciclos meióticos, las células haploides (espermátidas) mantendrán conexiones entre sí, llamadas canales anulares. Subsecuentemente, sus núcleos se compactarán y formarán los flagelos; completándose la citocinesis al eliminarse los canales anulares. La citocinesis e individualización espermática, se lleva a cabo gracias a un complejo de actina, llamado complejo de individualización (CI), siendo uno por cada espermátida. El CI necesita de la formación de una malla de actina, en forma de cono, la cual se da a partir de la proteína Arp 2/3, permitiendo la nucleación de los monómeros de actina, que son estabilizados por Miosina VI. A medida que avanza CI, este se aleja sincrónicamente de los núcleos al extremo caudal del quiste (a velocidad ~3 mm/min); permitiendo la remoción del contenido citoplásmico del quiste e individualizando cada espermátida en su propia membrana plasmática (**Figura 3**) (Steinhauer, 2015).

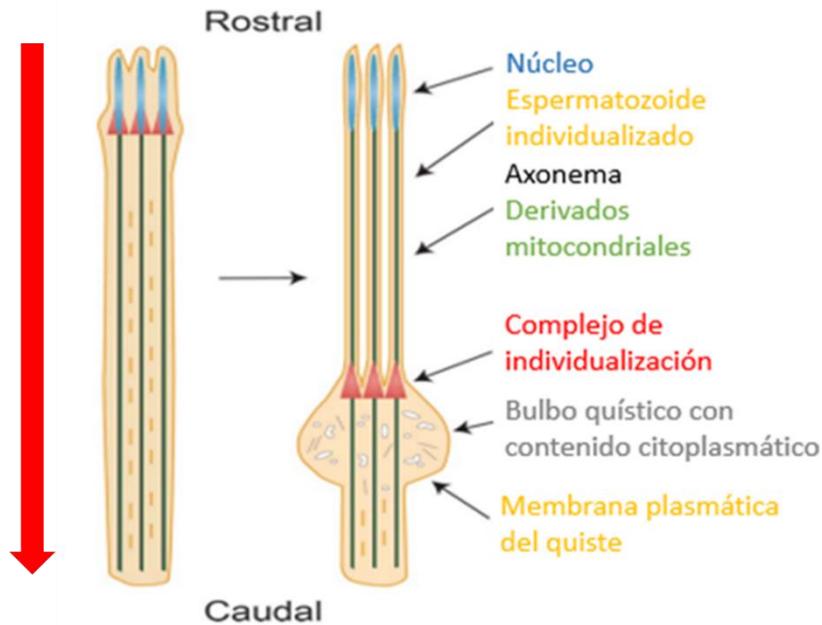


Figura 3. Individualización de espermátida en *Drosophila melanogaster*. Los conos de actina, del complejo de individualización (rojo), se forman alrededor de los núcleos de las espermátidas, ubicados rostralmente. A medida que el CI se mueve al extremo caudal, se elimina el contenido citoplasmático (Bulbo quístico), dividiendo cada espermatozoide en su propia membrana plasmática. La flecha roja señala la dirección del movimiento del CI (**Steinhauer, 2015**).

Gametogénesis Femenina

Oogénesis

La formación de los gametos femeninos, en *Drosophila melanogaster*, se lleva a cabo en los ovarios. Cada hembra tiene dos ovarios, los cuales contienen de 16 a 20 ovariolas. Cada ovariola se divide en 3 regiones: (de anterior a posterior) filamento terminal (FT), germinarium y vitellarium. El FT está formado por 8 a 9 células aplanadas, que conectan al germinarium con la vaina de la ovariola, determinando la orientación del desarrollo de la ovariola. A su vez, el germinarium está dividido en cuatro regiones (región 1, 2A, 2B y 3); siendo aquí donde residen las células nodrizas, ovocito y las células troncales germinales (GSC). El proceso de diferenciación del ovocito, comienza con las GSC, en la región 1 y termina en la región 3 con el ovocito, donde se forma un quiste germinal. Posteriormente, el ovocito y las células nodrizas pasan al vitellarium, donde se dará la vitelogénesis y coriogénesis. A partir de la región 3 del germinarium, hasta la ovulación, el desarrollo del ovocito se divide en 14 estadios que abarcan desde la profase I, hasta la metafase I (Figura 4 y 5) (**McLaughlin y Bratu, 2015**).

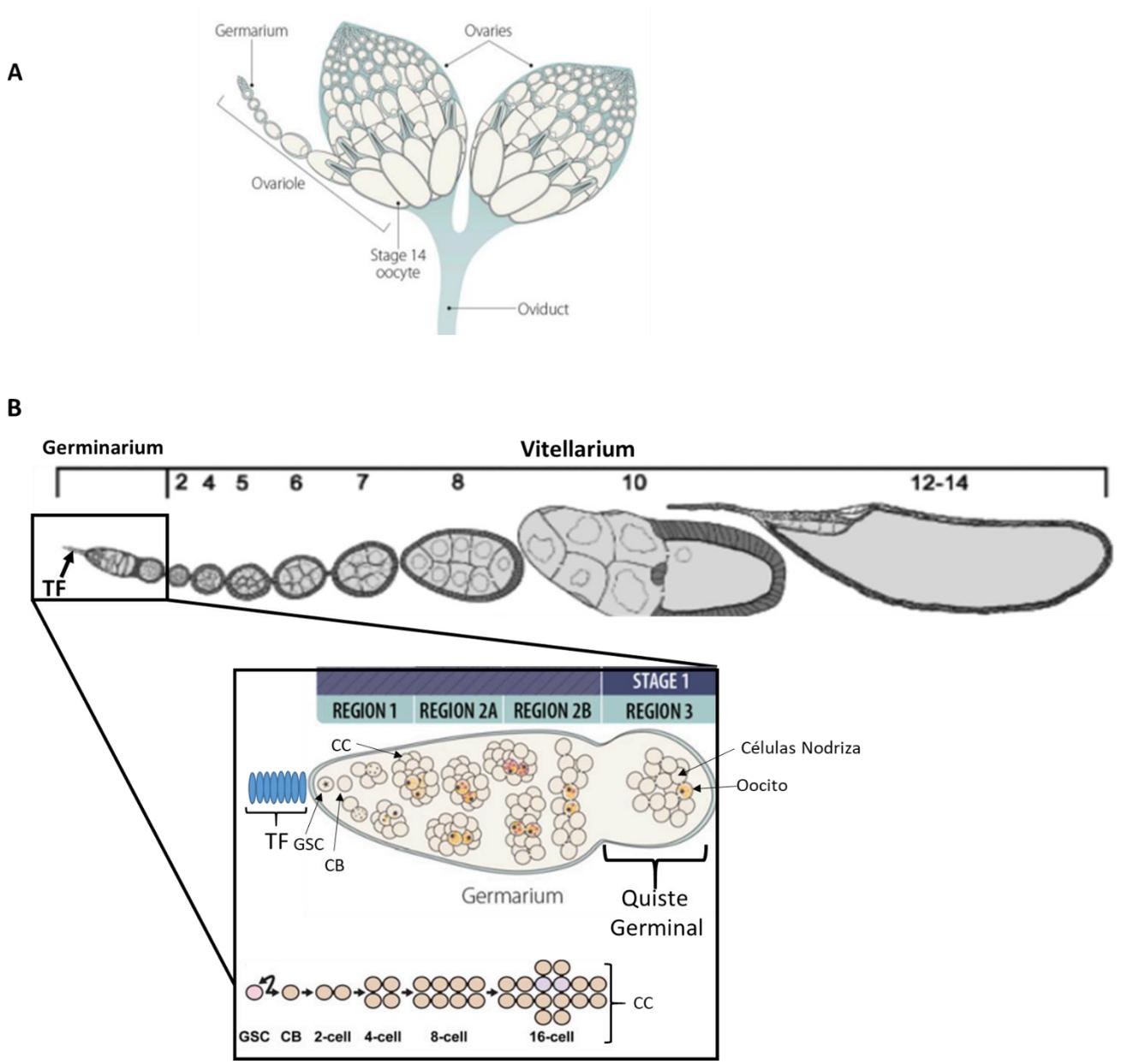


Figura 4. Esquema del desarrollo de oocitos. A) El aparato reproductor femenino en *Drosophila melanogaster*. Se muestran los dos ovarios los cuales contienen de 12 a 16 ovarioles cada uno. Cada ovariole a su vez, es una progresión de distintos folículos; comenzando con el germarium en la punta anterior, hasta un ovocito en estadio 14 completamente desarrollado en el extremo posterior. B) Regiones que forman la ovariole: Filamento terminal (TF), Germarium y Vitellarium. Además, se muestran las regiones en que se divide el Germarium (Región 1, 2A, 2B y 3). Se marcan las *Germinal Stem Cells* (GSC) y su división asimétrica a citoblasto (BC) y las subsecuentes 4 divisiones asimétricas incompletas, formando un quiste con 16 células, cistocitos (CC) (en la región 1). Además, se colocan en naranja los pro-oocitos desde la región 2A y 2B (en amarillo). En la región 3A se marca el oocito y la formación del quiste.

En la parte superior se marcan en números los estadios de desarrollo del oocito, del 1 al 14 (**Modificado de Hughes et al., 2018; Lindley et al., 2011**).

Para que la diferenciación del oocito se lleve a cabo, primero las GSC, presentes en el germinarium, se dividen asimétricamente formando una GSC y un citoblasto (BC). Ahora, el BC llevará a cabo cuatro ciclos mitóticos, con una citocinesis incompleta, formando un quiste de 16 células conocidas como cistocitos (todo esto en la región 1 del germinarium); estos cistocitos están unidas por conexiones citoplasmáticas llamadas canales anulares y a su conjunto se denominan fusoma. Posteriormente, en la región 2A, dos de los primeros cistocitos formados en la primera división mitótica, mantienen cuatro canales anulares con los cistocitos vecinos, estos serán los pro-oocitos. Al llegar a la región 3 del germinarium, uno de ellos será seleccionado como oocito y el otro, como el resto de los cistocitos, fungirá como célula nodriza. Los canales anulares, proporcionarán nutrientes al oocito en desarrollo. Todo este proceso tendrá una duración aproximada de 12 h (**Figura 4**) (**Lin, 2004; Ables, 2015; McLaughlin, 2015**).

Meiosis en el Oocito

Fase Premeiótica y Profase I Meiótica

Para que la meiosis comience, primero es necesario el ensamblaje del complejo sinaptonémico (SC), para que el apareamiento y recombinación de los cromosomas homólogos se lleve a cabo; el establecimiento y rupturas de doble cadena de DNA (DSBs) en la recombinación, es realizada por *mei-W68*, *mei-P22* y *vilya*. El ensamblaje del SC ocurre en la región 2A del germinarium, en la profase meiótica, entre la 2ª y 3ª división mitótica de los cistocitos. Además, este complejo estará presente en los cuatro primeros cistocitos (en la región 2A); posteriormente, solo en dos en la región 2B, los pro-oocitos. Al final, en la región 3, solo se mantendrá el SC en uno de ellos, el futuro oocito; el resto serán células nodrizas no continuara la meiosis, entrando en un ciclo endoreplicativo y sin división celular. Esto se debe a la represión de CDKs y la continua expresión de Ciclina E, por *Polycomb repressive complex 2* (PRC2), por lo que este conjunto de células se encargará de la síntesis de mRNA y proteínas necesarias para el desarrollo del oocito (**Hinnant et al., 2020**).

La reparación de las DSBs en el oocito seleccionado se llevarán a cabo en la región 3 (estadio 1); necesarias para continuar al siguiente estadio. Posteriormente, entre el segundo y tercer estadio, se formará el cariosoma, proceso dependiente de la quinasa de histona *NnKk1* y de la quinasa SR (*SRPK*). Durante los estadios 4 y 5, el SC, formado en el estadio 1, comenzará a desensamblarse; terminando este proceso entre los estadios 6 al 8. Sin embargo, algunos componentes del SC se mantendrán en los centrómeros hasta el estadio 9. Se considera que la oogénesis tendrá un arresto temporal de la

profase entre los estadios 5 al 8; posteriormente, en los estadios 9 y 10, hay un proceso de descondensación parcial de los cromosomas, donde probablemente estén llevándose a cabo procesos de transcripción. Al finalizar el estadio 10 y comienzo del 11, los cromosomas se recondensarán e iniciará la preparación de la ruptura de las vesículas germinales (GVBD); que comenzará al finalizar el estadio 12. Todos estos estadios de desarrollo del oocito, desde la región 2A dentro del germinarium, hasta el estadio 12, están contenidos dentro de la profase meiótica del oocito (Figura 5) (Hughes *et al.*, 2018).

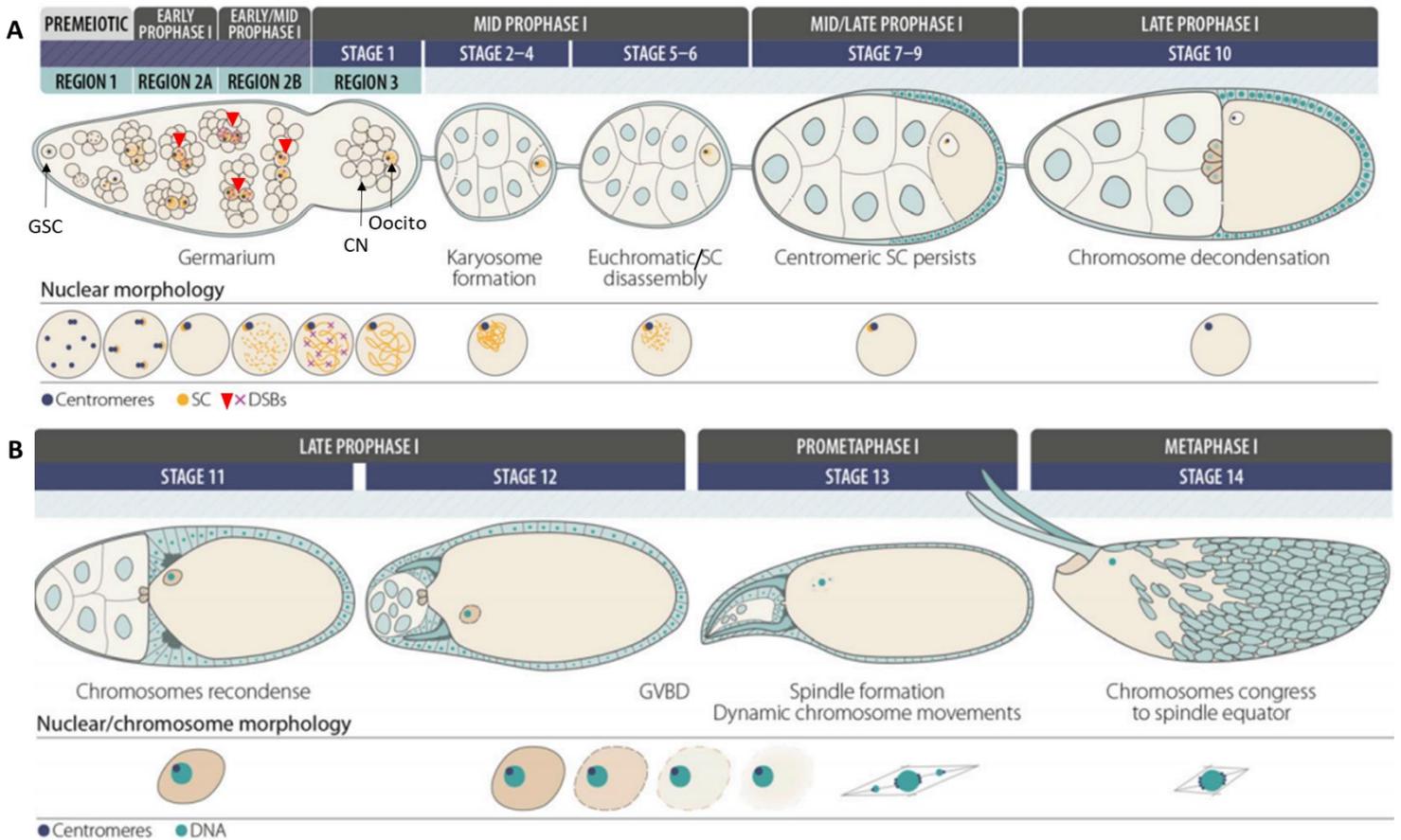


Figura 5. Esquema de desarrollo del oocito; desde el germinarium, con las células *germinal stem cells* (GSC) y la diferenciación del oocito (de la región 1 a la 3 del germinarium) hasta el estadio 14 de la oogenesis. Se coloca, en la parte superior: Los estadios del desarrollo del oocito y el ciclo meiótico al cual corresponde. En la parte inferior, la morfología nuclear y la cromatina; desde las GSC al desarrollo de los distintos estadios del oocito. A) Diferenciación de GSC (región 1 a 3) hasta desarrollo estadio 10 del oocito. En amarillo el complejo sinaptonémico (SC), desde su formación, en la región 2A, su mantenimiento y desensamble, en el estadio 4, y remanentes (estadio 9). Se marcan con “X” morada y triángulos rojos, las rupturas de doble cadena de DNA (DSBs) sobre los citocitos; durante la recombinación (región 2A a la 2B). Con un punto morado se marca la presencia de los centrosomas (tanto en A como en B), desde el

germinarium, hasta la el estadio 14. En el estadio 2 y 3 se reorganizan los cromosomas, restaura el cariosoma y descondensa parcialmente la cromatina (estadios 9 y 10). B) Estadios 11 al 14. En el estadio 11 se da la condensación de la cromatina; entre el 12 y 13, el inicio de la metafase con la ruptura de las vesículas germinales (GVBD) y la polimerización de tubulina; para el anclaje de los cromosomas y formación del huso bipolar. Por último, entre el estadio 13 y 14, los cromosomas se biorientaran hacia los polos **(Hughes, 2018)**.

Metafase I meiótica

Previo al inicio de la metafase I, es necesaria la activación de la quinasa Cdk1, en conjunto con las ciclinas B, B3 y A (A1 y A2). Estas ciclinas, ayudan en la fosforilación de las lamininas de la membrana nuclear, para así iniciar la *germinal vesicle breakdown* (GVBD) (o ruptura de la membrana nuclear (*NEB*)) y formación de huso meiótico. Para evitar que la *NEB* se dé antes de tiempo, son inhibidas las Cdks/ciclina; la regulación de las ciclinas B y B3, se da gracias a la proteína Bruno que regula negativamente la traducción de Ciclina A en profase, por lo que en los estadios 12 y 13 de la oogénesis, la concentración de Bruno disminuye, permitiendo el *NEB*. Al mismo tiempo, la fosfatasa 2A (*PP2A*) inhibe a Cdk1, por desfosforilación; la reactivación de Cdk1, se da gracias a α -*endosulfine* (*Endos*), que se une a la subunidad *B55/Twins* de *PP2A*, inhibiéndola. Para que *Endos* pueda inhibir a *PP2A*, es necesario su activación, por lo que *greatwall* (*Gwl*) la fosforila; permitiendo su unión. De igual manera, es necesaria la regulación de *Gwl*, para evitar que este proceso ocurra de manera promiscua; para ello, *Gwl* mantiene en el núcleo y, al ser fosforilada por Cdk1 y Polo, puede ingresar al citoplasma para su unión con *Endos* (Figura 6) **(Arur, 2017; Wang et al., 2013)**.

Con relación al proceso de segregación de los cromosomas, durante el inicio de la metafase, Polo promueve la activación de Cdk1, ya que fosforila y activa a la fosfatasa Ccd25 (*Twine*), que activa a Cdk1/Ciclina A; también se considera que el aumento en la concentración de *Matrimony* (*Mtrm*), podría inducir la activación de *Twine*. Para regular la actividad de Polo, *Mtrm* actúa como un inhibidor, por lo que el aumento en la concentración de Polo desde los estadios 10 al 13 y disminución de *Mtrm* a partir del 12, permite su presencia activa. Durante el estadio 13, la concentración de Polo es superior, por lo que deja de inhibirlo en parte (Figura 6) **(Avilés et al., 2018; Bourouh y Swan, 2018)**.

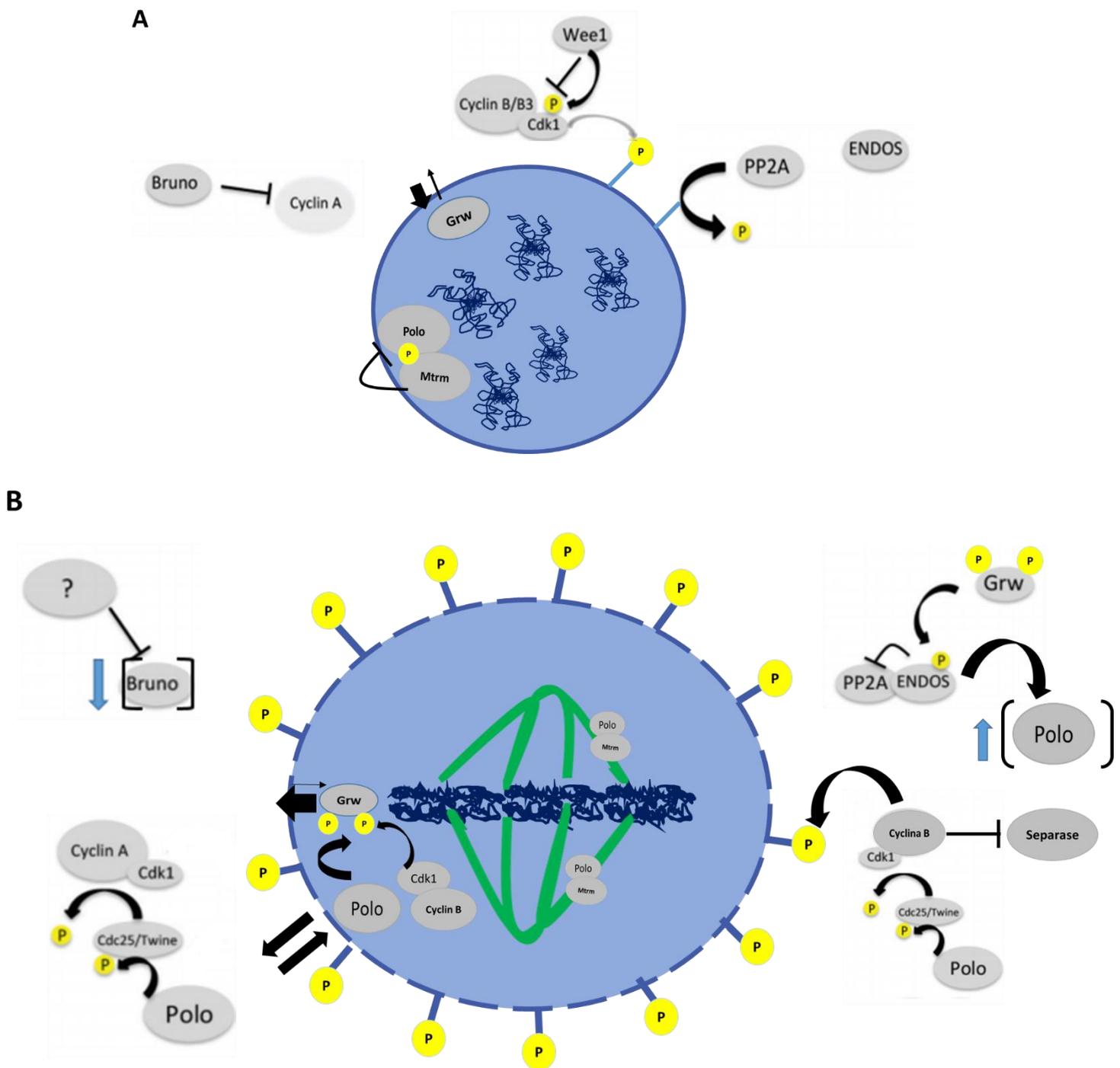


Figura 6. Modelo de regulación de la ruptura de la envoltura nuclear (NEB) en la meiosis previa al inicio de la metafase I. A) Proteínas que reprimen y previenen el inicio temprano de NEB, estadio ≤ 12 . B) Proteínas que participan en la NEB en estadio 13 al 14; la NEB se esquematiza como una línea punteada, además se marcan el aumento y descenso de las concentraciones de Polo y Bruno, respectivamente.

El inicio de la metafase I, durante la oogenesis de *Drosophila melanogaster*, se da a partir del estadio 13 y 14. Para ello, es necesaria la formación del huso meiótico; el cual tiene la particularidad de ser anastral; es decir, con ausencia de

centrosomas. Por lo tanto, el movimiento de los cromosomas se dará gracias a proteínas motoras y tubulina, las cuales se anclarán a los cromosomas a través del cinetocoro (estadio 13). La transición entre la profase tardía y metafase (estadios 13/14), conlleva a un arresto temporal del ciclo meiótico (Figura 7). Al continuar la metafase, hay una unión inestable entre los microtúbulos y el cinetocoro del huso meiótico por la ausencia de centrosomas, por lo que son necesarias proteínas que estabilicen la unión, como son: Mei38, Augmina, XMAP215/Msps y TAAC. La unión de estas proteínas se da en los polos, estabilizándolos de 1 a 2 h después de la GVBD; y sobre el ecuador las proteínas *Subito*, *PRC1/Feo*, quinesina-5/ *Klp61F* y *MKlp1/Pav*, se agrupan durante la metafase I. Estas proteínas alcanzan su máximo pico después de 5 h. Se sabe que *MKlp1/Pav* estabilizan al huso, aumentando la concentración de tubulina sobre el ecuador y promoviendo el acortando de la longitud del huso; sin embargo, quinesina-5/*Klp61F* también es indispensable, pues su pérdida interrumpe la formación del huso (Figura 7) (Costa y Ohkura, 2019).

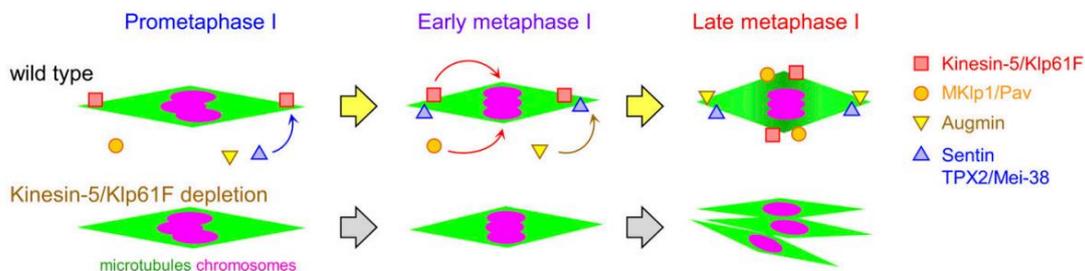


Figura 7. Esquema de la dinámica en algunas proteínas durante la formación del huso meiótico I, entre la prometafase y metafase y tardía. En la parte superior WT se muestra la presencia de quinesina-5/ *Klp61F* sobre los polos, durante la prometafase y su desplazamiento hacia el ecuador, conforme avanza la metafase tardía. Tiempo después, durante la metafase temprana, se reclutan Augmina y *MKlp1/Pav*. Al igual que la quinesina-5/ *Klp61F*, *MKlp1/Pav* se desplaza al ecuador conforme progresa la metafase. En la parte inferior se muestra la interrupción del huso meiótico por ausencia de quinesina-5/ *Klp61F*. Microtúbulos en color verde y cromosomas en rosado (Costa y Ohkura, 2019).

Una vez establecido el huso meiótico y alineados los cromosomas en el ecuador, se da un segundo arresto del ciclo celular, en el desarrollo del oocito (estadio 14). Como se mencionó con anterioridad, *Mtrm* regula a Polo, restringiendo su localización en el huso meiótico; por lo tanto, la degradación de *Mtrm* al comienzo del anafase, es necesaria. Una vez degradado *Mtrm*, Polo cambia su localización, probablemente reclutado por *Mei-S332*, hacia regiones subtelméricas. Al avanzar a anafase, *Mei-S332* es degradado, liberando a Polo, permitiendo su participación en la remoción de las cohesinas; por lo que la activación de Polo es indispensable en la maduración del oocito (Bonner *et al.*, 2020).

Otras proteínas que regulan el paso entre la metafase y anafase I son los complejos cinasas CDK1/ Ciclina A, B y B3. Este conjunto proteico participa durante la división celular. Se sabe que las ciclinas A y B son imprescindibles en la NEB. Al mismo tiempo, parece que la ciclina B regula este paso, entre la metafase y anafase I; inhibiendo la activación de Separasa. Al inhibir la separación de las cromátides hermanas se mantiene el arresto de la metafase I; impidiendo la progresión a anafase (Figura 6). Una vez iniciada la anafase, se activa la ciclina B3 que activa al complejo APC/C; degradando a la Securina y permitiendo la separación de las cromátidas hermanas (**Bourouh et al., 2016; Braun et al., 2018**).

Cromatina y Transcripción durante la Oogénesis

Durante la meiosis, en la oogénesis, la cromatina del oocito presenta distintos cambios, entre ellas modificaciones postranscripcionales de histonas (*HPTMs*). Por ejemplo, previo al arresto de la profase I (entre los estadios 5 al 8), el oocito presenta bajos y constantes niveles de H3K4me₃; en contraste los niveles de H3K27me₃ son mayores. Sin embargo, esta relación se invertirá al finalizar el estadio 8 e inicio del 9; debido a un decaimiento de la marca de H3K27me₃, mientras que los de H3K4me₃ se mantienen, aunque bajos, constantes. Se ha identificado que la desmetilasa dKDM5 regula negativamente la H3K4me₃, ya que su ausencia conlleva a una descondensación prematura del cariosoma (Figura 5). Un aspecto interesante es que, a pesar del alto grado de compactación de la cromatina, el descenso en la H3K27me₃ permite la reactivación de la transcripción, a partir del estadio 9 hasta el 11. Al mismo tiempo, se ha observado la presencia de RNA Polimerasa II, fosforilada en la Ser 5 y 2 del *C-terminal domain*, durante este estadio. En general, estos eventos parecen ser indispensables para la salida del arresto en la profase I; siendo regulados por dKDM5, quien restringe y regula la transcripción durante esta corta ventana de tiempo (**Navarro et al., 2016**).

Para asegurar el correcto silenciamiento de la cromatina, durante la oogénesis, la *HPTM* de H3K9m₃, es colocada por la *histone lysine methyltransferase* (HKMT) *Eggless* (*Egg*). Otras *HKMT* que también contribuyen en la deposición de esta marca son *dG9a* y *Su (var) 3-9*. A diferencia de *dG9a* y *Su (var) 3-9*, *Egg* es indispensable desde el inicio de la oogenesis, estando presente en las regiones 1 y 2a del germinarium, sobre las GSC y células foliculares; permitiendo la supervivencia del oocito hasta el estadio 5 (**Clough et al., 2014**).

Otra marca represiva de la transcripción, presente en la oogénesis es la H3K27me₃, es dada depuesta por el complejo PRC2, enhancer de zeste E (z), que participa en la determinación de las células nodriza, por la represión de la ciclina E y *decapo*. Otras modificaciones importantes son la deubiquitinación de la Histona H2B, dada por la deubiquinasa Scrawny. Scrawny, en GSC, evita la expresión temprana de algunos genes; entre ellos genes que participan en la vía de Notch. Al mismo tiempo se han encontrado otras HTPMs durante el desarrollo

del oocito, como son: H2AT119p, H1p, H3ac, H4ac, H4K5ac, H3K14ac y H4K12ac. Sin embargo, su papel durante el desarrollo aún no está del todo claro (Lovino, 2014).

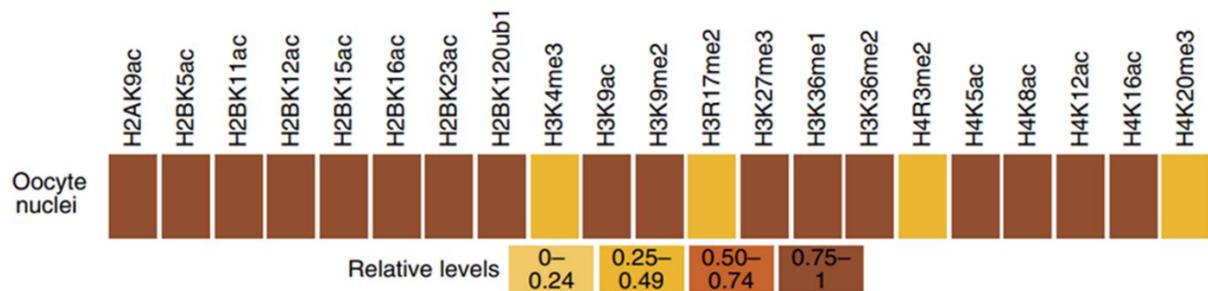


Figura 8. Algunas HTPMs, del oocito, durante la meiosis. En la parte inferior se muestran los niveles relativos de expresión, de mayor (café) a menor (amarillo claro) (Navarro *et al.*, 2016).

Aparte de las HTPMs, otro factor importante durante la ovogénesis es la regulación de los transcritos, proporcionados por las células nodriza. Esta regulación en la expresión, es dada por el cambio en la longitud de las colas de poli (A) en los mRNAs. La proteína *GLD-2 like cytoplasmic poly(A) polymerase (wispy (wisp))*, es responsable de la poliadenilación de los transcritos, aumentando su longitud; durante la maduración y activación del oocitos. En contraste, el acortamiento de las colas de poly (A), conllevarán a una traducción a la baja o negativa. Los mRNA en el oocito, serán regulados a alta o a la baja, dependiendo de estadio. Por ejemplo, algunos regulados al alza son: *Cyclin B* y *fizzy*, en los estadios 11 al 14, es decir proteínas implicadas den la meiosis. (Eichhorn *et al.*, 2016).

Activación del Oocito

Posterior a la maduración del oocito (estadio 14), hay segundo arresto del ciclo celular, en la meiosis I, por lo que es necesario su reactivación, denominada activación del huevo. Durante este periodo se tendrán que producir los transcritos necesarios durante y posterior a su activación. En mamíferos, la activación se da por un aumento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático, proceso dependiente de la fecundación. A diferencia de mamíferos, en *Drosophila melanogaster* el aumento en la concentración de Ca^{2+} , sobre la parte posterior de huevo, es producto del tránsito del huevo a través del tracto reproductivo de la hembra (oviducto). Durante este tránsito (foliculogénesis), hay un cambio osmótico mediado por inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3); lo que permite la reestructuración del citoesqueleto (F-actina) y, al mismo tiempo, ayuda en la difusión del Ca^{2+} (Figura 9) (York *et al.*, 2015).

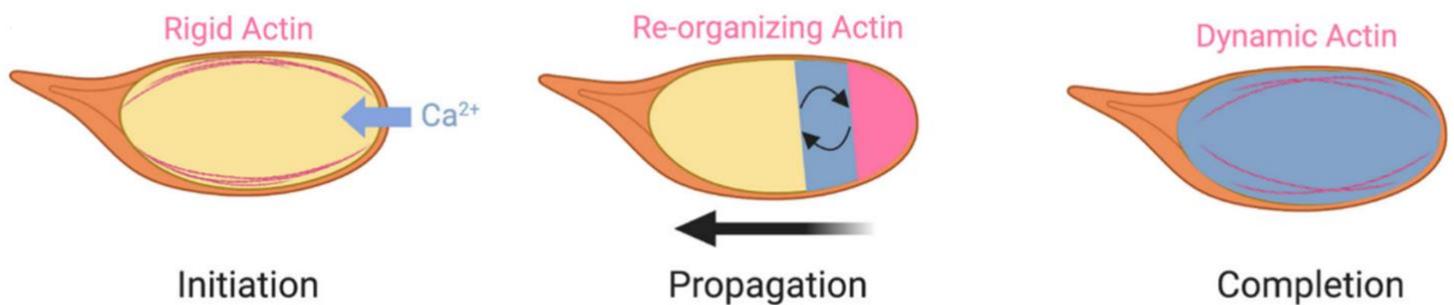


Figura 9. Diagrama de la reorganización de citoesqueleto (actina, en rosa) previo, durante y posterior a la entrada de Ca^{2+} . Se marca el punto de entrada de Ca^{2+} en el huevo (parte posterior) (azul) y como se propaga a lo largo del huevo (fleja negra). Al mismo tiempo, se da la reorganización de actina, haciéndose más dinámica; ya que, previo al ingreso de Ca^{2+} , el citoesqueleto es relativamente rígido (**Andersen et al., 2019**).

Además del ingreso de Ca^{2+} al citoplasma del huevo, la proteína *Cortex* (*cort*), miembro de la familia Cdc20, participan en la activación del oocito o huevo; por la activación del complejo APC/C. Al activarse APC/C, marca la de gradación de varias proteínas, entre ellas a ciclina B y *Mtrm*, lo que activa nuevamente a Polo (Figura 6). Además, *Cort* promueve la reorganización de microtúbulos y la traducción de algunos transcritos, necesarios durante el desarrollo del embrión, como son: *Toll*, *Torso* y *Bidoid* (**Avilés et al., 2018; Bourouh y Swan, 2017**).

Otro complejo proteico importante para la activación del huevo es la cinasa PAN GU (PNG). Al degradarse Ciclina B, no se puede formar el complejo Ciclina B/CDK 1, el cual reprime a Giant Nuclei (GNU). Al no ser fosforilada por Ciclina B/CDK1, puede unirse al dímero de PNG- Plutonium (PLU), formando un complejo activo (PNG-PLU-GNU). Al mismo tiempo, este trímero se autorregula al fosforilar en otro sitio a GNU, siendo reconocido por SCF (ubiquitin ligasa E3), lo que conlleva a su degradación. A su vez, el complejo activo promueve la traducción de ciclina B, lo que inactiva nuevamente el complejo. (**Hara et al., 2017**).

En conjunto el complejo activo de PNG (PNG-PLU-GNU), participa en la regulación de la traducción de genes al alza o a la baja de 608 y 323, respectivamente; por interacción directa con los transcritos. Algunos de los genes traducidos al alza son quinasas, factores morfogénicos, entre otros. Estos transcritos tienen un nivel de traducción, 4.1 veces mayor, con respecto a los traducidos a la baja (4.1 veces menos, como *Mtrm*). La represión en la traducción probablemente sea dada por PLU; ya que su ausencia causa el aumento de la traducción en transcritos normalmente inhibidos. Sin embargo, no toda la traducción es regulada por este complejo, pues se conocen genes que su activación e inhibición de la traducción, 133 y 37 genes respectivamente, es independiente a PNG (**Kronja, 2014**). La activación de la traducción dependiente del complejo PNG se da por la fosforilación e inactivación de múltiples inhibidores de la traducción (TRAL, RNA Helicasa ME31B, Cup y BICC). En ausencia del

complejo activo PNG, TRAL puede inhibir libremente la traducción, en unión con ME31B y Cup (**Hara et al., 2018**).

Otra manera por la cual se regula eficientemente la traducción de los mensajeros durante la activación del huevo y la embriogénesis temprana, es por el cambio en la longitud de las colas de poli (A). Esto se debe a la unión de las *poly(A)-binding proteins* (PABPs), las cuales alargan las colas de poli (A) en los transcritos, teniendo un efecto positivo en la eficiencia de traducción (**Tadros y Lipshitz, 2005**).

Fecundación y Transición embrionaria

La fertilización, es el último paso en el desarrollo del oocito, ya que va de la mano con la transición e inicio del desarrollo embrionario. Para ello, el espermatozoide se desplaza al citoplasma del oocito, a través del micrópilo; ubicado en la parte anterior del huevo. Esto proveerá al embrión en desarrollo de dos elementos: DNA haploide y un centriolo. El reconocimiento y desplazamiento del espermatozoide hacia el micrópilo se debe a la presencia de beta-N-acetilhexosaminidasas y alfa-L-fucosidasa en su membrana; carbohidratos presentes en la membrana del oocito (**Avilés y Weaver, 2018**).

La entrada del espermatozoide al oocito conlleva a la descondensación de la cromatina del pronúcleo paterno, así como a la eliminación y recambio de las protaminas por histonas. Dicho proceso de recambio es dependiente de las proteínas presentes en el citoplasma del oocito, entre ellas Lid/KDM5 y Sin3A-HDAC1. Lid y Sin3A regulan la activación de la transcripción de *deadhead* (*DHD*) (**Campana et al., 2020**). *DHD* es una Tiorredoxina, que reduce los puentes disulfuro entre las proteínas, evitando su plegamiento o agregación. Con ello, *DHD* facilita la pérdida de interacción de las protaminas con el DNA paterno, favoreciendo su descondensación (**Freier et al., 2020**). Al mismo tiempo, el complejo remodelador de cromatina ISWI, es necesario durante la descondensación; su ausencia es letal, pues impide la unión entre los pronúcleos materno y paterno, resultando en ciclos nucleares asincrónicos durante la embriogénesis temprana (**Doyen et al., 2015**).

El remplazo de las protaminas paternas por las histonas es dado por las chaperonas NAP-1 y HIRA. NAP-1 se encarga del remplazo de las histonas dependientes de la replicación (H3.1/2, H2B, H2A, H2Av), mientras que HIRA de las histonas independientes de la replicación (H3.3 y H4) (**Horard y Loppin, 2015**).

Al finalizada la descondensación y el recambio de las protaminas por histonas, se da la fusión entre los pronúcleos materno y paterno. Para ello, el espermatozoide tiene dos proteínas llamadas *proximal centriole-like* (*PCL*); precursor centriolar, y *giant centriole* (*GC*). En conjunto *PCL* y *GC* interactuarán entre sí, reclutando al material pericentriolar (*PCM*) materno, formado los

centrosomas y los ásteres de microtúbulos. Estos asteres comienzan a extenderse hacia el pronúcleo materno más cercano. Al término de la segunda división meiótica el oocito presentará 4 pronúcleos, siendo únicamente uno de ellos el que se fusionará con el pronúcleo paterno. Se ha observado que las proteínas *kinesin-like protein 3A* (KLP3A), *Polo*, *Subito* y *non-claret disjuntional* (*Ncd*), juegan un papel importante durante la migración de los pronúcleos. Una vez juntos los pronúcleos, comienza la primera división mitótica, considerada división gonómica; debido a que la cromatina materna y paterna no se unen, sino hasta la anafase/telofase de ese primer ciclo mitótico. Los pronúcleos femeninos remanentes (cuerpos polares) se condensan y unen en uno solo, sin participación en el resto del desarrollo embrionario (Figura 10) (Loppin et al., 2015).

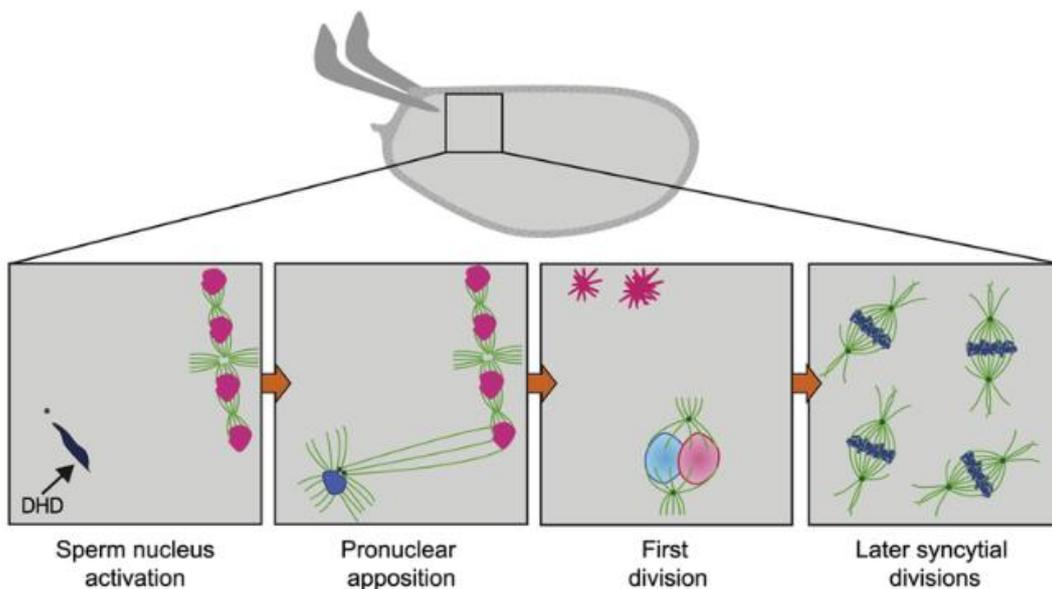


Figura 10. Esquema de fertilización del oocito por el espermatozoide (Azul oscuro). El espermatozoide ingresa al óvulo a través del micropilo; para unirse con uno de los pronúcleos femeninos (rosado). Inicialmente, el pronúcleo masculino, se desconcensa por acción de DHD, reemplazándose las protaminas por histonas. Posteriormente, se forman los centrosomas (puntos verdes) y los asteres de microtúbulos (verde claro), que se extienden hasta alcanzan a uno de los pronúcleos femeninos. Ambos pronúcleos se juntan e inicia la primera división mitótica; mezclándose al finalizar el primer ciclo mitótico (azul). Los pronúcleos femeninos restantes se condensan y permanecen como cuerpos polares (rosa oscuro en forma de estrellas) (Avilés y Weaver, 2018).

Desarrollo Embrionario Temprano en *Drosophila melanogaster*

Una vez fecundado el huevo, el desarrollo temprano del cigoto, en muchas especies es dirigido por las proteínas y transcritos depositados por la madre; previamente presentes en el huevo. Por ello, durante este intervalo de tiempo, no hay transcripción cigótica; sin embargo, esto no es permanente, ya que la cromatina del cigoto pasará de estar silenciada a transcripcionalmente activa. A este momento del desarrollo embrionario se conoce como: activación de la transcripción cigótica (ATC). El tiempo en que se da la ATC varía entre los organismos (**Memili y Fist, 2000; Zurita et al., 2007**).

Por ejemplo, la ATC en *Danio rerio* (pez cebra) y *Xenopus*, se da hasta las divisiones celulares número 10 y 13, respectivamente; mientras que en *C. elegans*, se lleva a cabo tras 100 divisiones celulares. Para el caso de los mamíferos, la ATC se da con un menor número de divisiones mitóticas, por ejemplo, en ratones se da durante la segunda división mitótica. Aunque el número de divisiones mitóticas requeridas para la ATC en mamíferos es menor, el tiempo en que demora cada una es mayor; llegando a demorar un día o más. Para el caso del pez cebra, *Xenopus* y *C. elegans*, el proceso demora unas cuantas horas (**Lee et al., 2014**). Al igual que ellos, *Drosophila melanogaster* también presenta una ATC muy rápida, iniciando en un lapso aproximado de 2.5 h posteriores a la fecundación (**Schulz y Harrison, 2019**).

Divisiones nucleares en el desarrollo de *Drosophila melanogaster*

Como se dijo anteriormente, la ATC en *Drosophila melanogaster* es muy rápida, por lo tanto, los ciclos mitóticos también lo son. La rapidez de estas divisiones, conllevan a la formación un sincitio, pues solo se llevan a cabo las fases S y M, sin presentar una citocinesis. Durante los primeros tres ciclos mitóticos, los núcleos permanecen en el centro del embrión. En los ciclos 4 al 7, los núcleos se mantienen en el centro, en forma elipsoide y espaciados uniformemente. Posteriormente, en el ciclo mitótico 8 al 10, hay una migración de los núcleos del centro a toda la periferia del embrión, arribando los primeros sobre la parte posterior durante el ciclo mitótico 9 (las futuras células polares). Una vez finalizada la migración nuclear, estos núcleos, corticales, seguirán dividiéndose 3 veces más de manera sincrónica, abarcando en total 13 ciclos mitóticos sincrónicos (Figura 11). (**Edgar y Schubigert, 1986; Ji et al., 2004**).

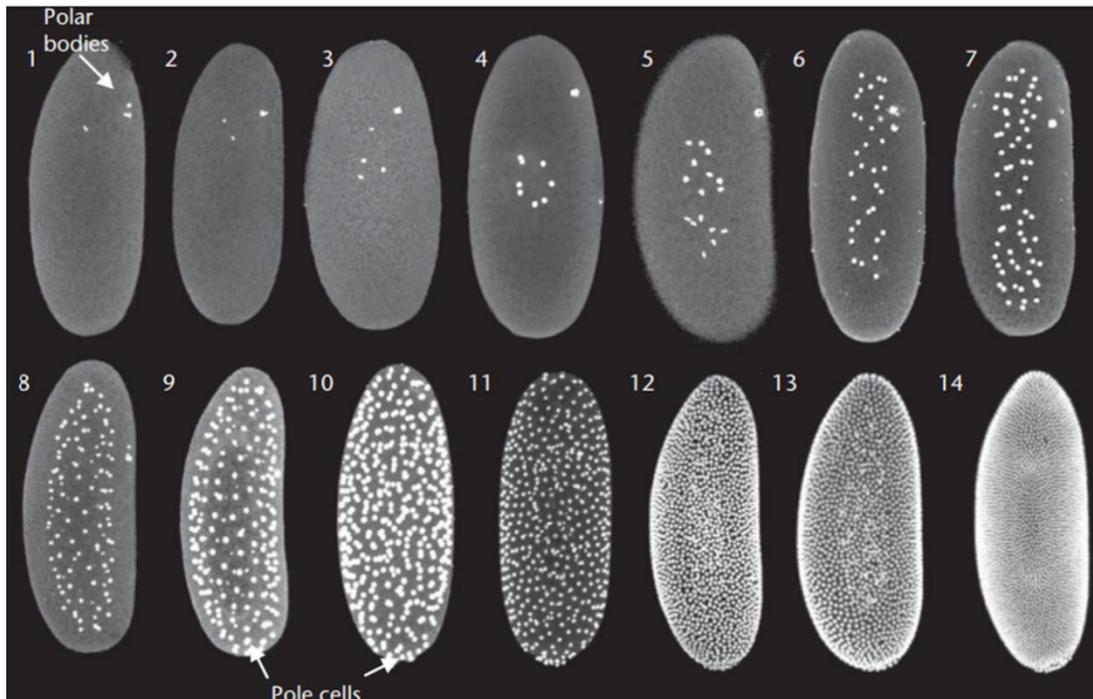


Figura 11. Divisiones nucleares tempranas y migración nuclear, en la embriogénesis temprana de *Drosophila melanogaster*. El ciclo 1, inicia tras la fusión de los dos pronúcleos. En los ciclos 1 al 3, los núcleos se dividen sobre la parte anterior embrión. Durante los ciclos 4 al 6, se extienden a largo del eje anteroposterior. En la división nuclear 8 a 10, se da una migración nuclear a la corteza del embrión; las células polares se forman en el extremo posterior del embrión (ciclo 9), marcadas con flechas. Después de cuatro divisiones sincitiales, en la interfase del ciclo nuclear 14, se da la invaginación de la membrana plasmática alrededor de cada núcleo (celularización).

En los primeros ciclos mitóticos, los microtúbulos astrales establecen la orientación y el distanciamiento de cada núcleo; evitando que colisionen entre sí. Mientras que, durante la migración nuclear (ciclos 10 al 8), algunos núcleos permanecen en el centro; sufriendo un retraso e interrupción de la división celular, llegando únicamente hasta el ciclo 11. Para el resto de los núcleos corticales (del ciclo 10 al 13), hay una acumulación de actina en la parte apical de cada núcleo, asociada al centrosoma. En la Profase, los centrosomas se duplican y migran hacia el ecuador, en polos opuestos; al mismo tiempo, la actina se expande lateralmente y ramifica. Posteriormente, en la metafase, la actina promueve la invaginación de la membrana plasmática, mientras los microtúbulos astrales inducen el movimiento de los cromosomas en conjunto con la membrana nuclear (que no se disocia completamente) al ecuador. En la anafase y telofase, los surcos se desmantelan y la actina se vuelve a condensar sobre los núcleos (Figura 12) (Kotadia *et al.*, 2010).

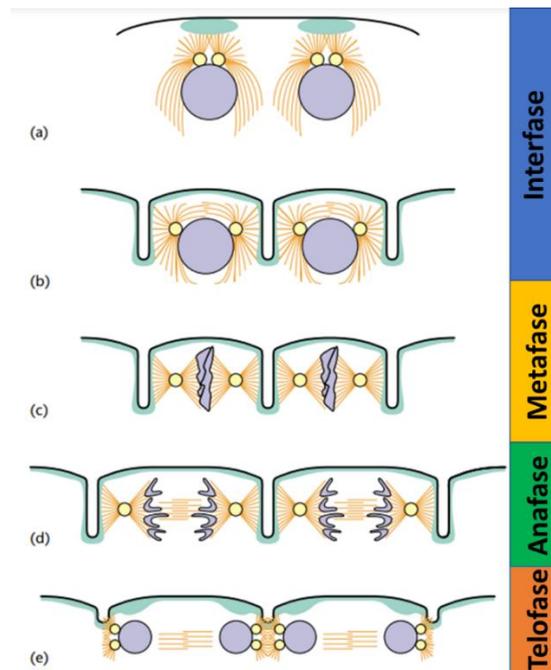


Figura 12. Esquema de las divisiones nucleares en *Drosophila melanogaster* durante las divisiones 10 a 13. A) Interfase, la actina (en verde) se concentra en la parte apical en conjunto con los centrosomas (amarillo), sobre cada núcleo (azul). B) Profase, ramificación de actina y migración de centrosomas a polos opuestos. C) Metafase, invaginación de membrana y posicionamiento de cromosomas en el ecuador, por uso mitótico (naranja). D) y E) Anafase y Telofase, retroceso de los surcos y regreso de actina a la parte apical de los núcleos (Tram *et al.*, 2010).

Otra característica del desarrollo temprano de *Drosophila melanogaster* es el mantenimiento de la membrana nuclear, ya que ésta no se desensambla completamente debido a la rapidez de cada división nuclear. Esto probablemente es posible gracias a la proteína *Young Arrest* (YA) (Sackton *et al.*, 2009), que interacciona con la cromatina (histona H2B) y la laminina nuclear (*Dm0*) (Lopez y Wolfner, 1997). La interacción con YA con las lamininas, posiblemente les confiere estabilidad, manteniendo los polímeros de laminina estables a lo largo de los ciclos nucleares. Sin embargo, esta estabilidad no se mantiene en los polos del núcleo, ya que se disocian durante la profase; probablemente por una mayor presencia de laminina C en estos y menor de YA. En la prometafase, se mantienen abiertos los polos, cerca del huso mitótico. Al mismo tiempo, una segunda membrana nuclear, paralela a la primera, se forma. Subsecuentemente, en la metafase, la lámina nuclear se disocia en su mayor parte, desapareciendo *Dm0* y YA en la periferia; sin embargo, la doble envoltura permanece abierta en los polos. Al final, en la telofase, *Dm*, YA y las proteínas que conforman el poro nuclear se reensamblan (Wolfner, 2013).

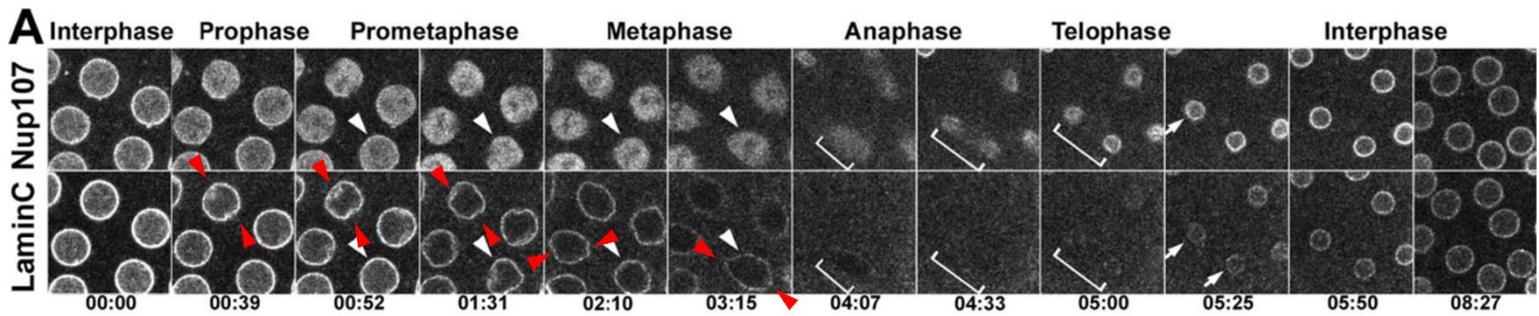


Figura 13. Envoltura nuclear de embriones tempranos de *Drosophila melanogaster* (ciclos nucleares 12 al 13). A) moscas transgénicas con fluorofóros (mRFP y GFP) en nucleoporina Nup107 y Laminina C, respectivamente. Se observa presencia de Nup107 en la membrana nuclear a lo largo de la mitosis. En anafase, la señal de Laminina C se desvanece, mientras que la de Nup107, aunque es débil, está presente. Se marca entre paréntesis la distribución de la señal, ausente en Laminina C (Anafase- Telofase) y reaparición en telofase tardía (flechas). Además, en triángulos rojos, se marcan las fenestraciones sobre los polos de los núcleos (Profase- Metafase) (**modificado de Katsani et al., 2008**).

Una de las razones que explican la rapidez de las divisiones nucleares de *Drosophila melanogaster*, de 9 minutos en promedio (**Farrell y O'Farrell, 2014**), es la gran cantidad de las fosfatasa *Cdc25*, *String* y *Twine*; almacenadas previamente en el oocito. Estas fosfatasa activan el complejo *Cdk1/Ciclina B*, previamente fosforilado e inactivado por *Wee1* y *PP2A*, permitiendo el inicio de la mitosis. Con ello, las divisiones nucleares son extremadamente rápidas; siendo al principio de 5 min y 14 min en el ciclo nuclear 13. Entre los ciclos nucleares 10 al 13, se da un alargamiento paulatino entre cada ciclo, debido a la degradación temprana de *String* (en el ciclo 10) y posteriormente *Twine* (en el 13) (Figuras 14 y 15). Al mismo tiempo, hay una oscilación en la cantidad de Ciclinas A y B, a partir del ciclo nuclear 8, restringiendo al complejo activo *Cdk1/Ciclina*. Otro factor importante, es el aumento de la fosfatasa *Chk1/Grapes* en el ciclo nuclear 11. *Grapes* inhibe al complejo activo *Cdk1/Ciclina B* al inactivar a las fosfatasa *Cdc25*, ya que el aumento en el contenido de DNA por el aumento en el número de núcleos, conlleva a la expresión del activador de *Grapes*, *ATR/mei-41* (**Yuan et al., 2016**).

Otro factor importante en la rapidez de las divisiones nucleares, es la velocidad de replicación del material genético. Durante esta etapa, la cromatina presenta múltiples sitios de replicación, cercanos unos a otros, lo que promueve una rápida y sincrónica velocidad de replicación. Conforme avanza el desarrollo, los sitios de replicación comienzan a disminuir, ya que comienzan a definirse las zonas heterocromáticas, conllevando a un alargamiento en tiempo de replicación. Durante las primeras divisiones nucleares, el tiempo de replicación es de apenas 3.5 min; mientras que en la división 13, es de 14 min (**Martinho et al., 2015**).

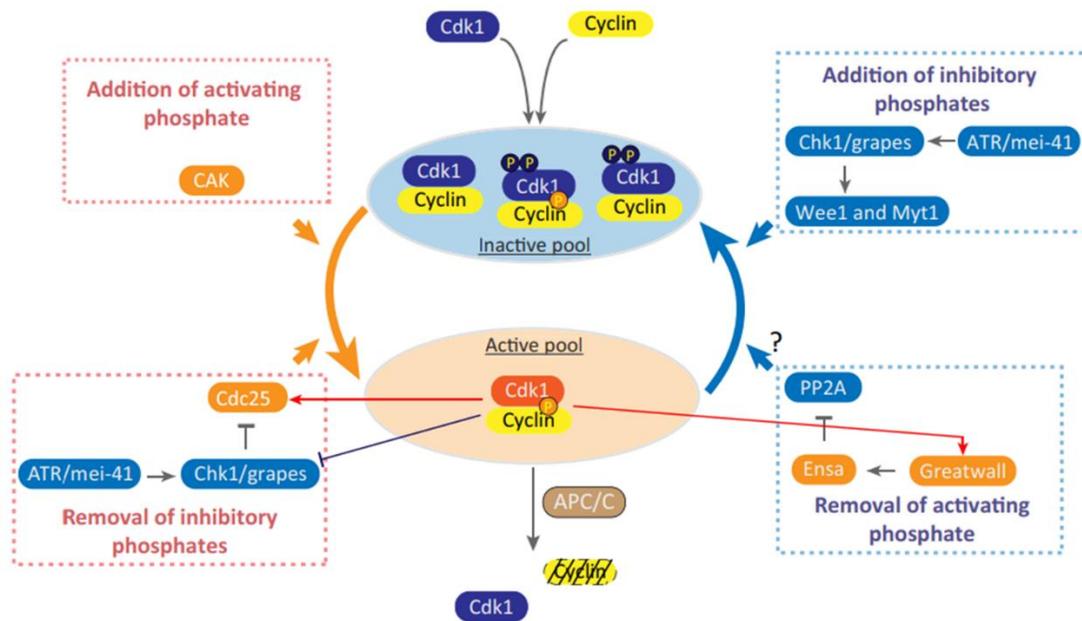


Figura 14. Esquema de regulación del complejo CDK1/Ciclina B. El complejo es fosforilado por CAK y activado por Cdc25, al eliminar los fosfatos inhibidores. El complejo activo es inhibido por Wee1 y Myt1. Además, la fosfatasa PP2A contrarresta al complejo activo, por eliminación de fosfatos activadores para regularlo. Al mismo tiempo, la cinasa Chk1 modula la actividad de la cinasa Wee1 y Cdc25, inhibiendo o permitiendo la activación de Cdk1/Ciclina B (Yuan *et al.*, 2017).

Activación de la transcripción cigótica y su regulación

Como se mencionó con anterioridad, la completa ATC en *Drosophila melanogaster* se da a partir de ciclo nuclear 13, también conocida como Transición de la Blástula Media (MBT). Durante este momento del desarrollo no solo se da la ATC, sino que la mayor parte de los transcritos maternos han sido degradados. La MBT corresponde al último paso de la activación cigótica; previo a ello, es necesaria la degradación de los transcritos maternos para una sincrónica transición materna-cigótica (MZT). Se entiende como MZT, el cambio en el control del desarrollo embrionario, pasando del materno al cigótico. Para ello, como se mencionó, es necesaria tanto la degradación de los transcritos maternos, como la ATC. Se ha observado este proceso se da de manera paulatina; es decir, hay una primera ola de transcripción cigótica en el ciclo nuclear 8 y una segunda ola en la MBT (Figura 15) (Hamm y Harrison, 2018; Lefebvre y Lécuyer, 2018).

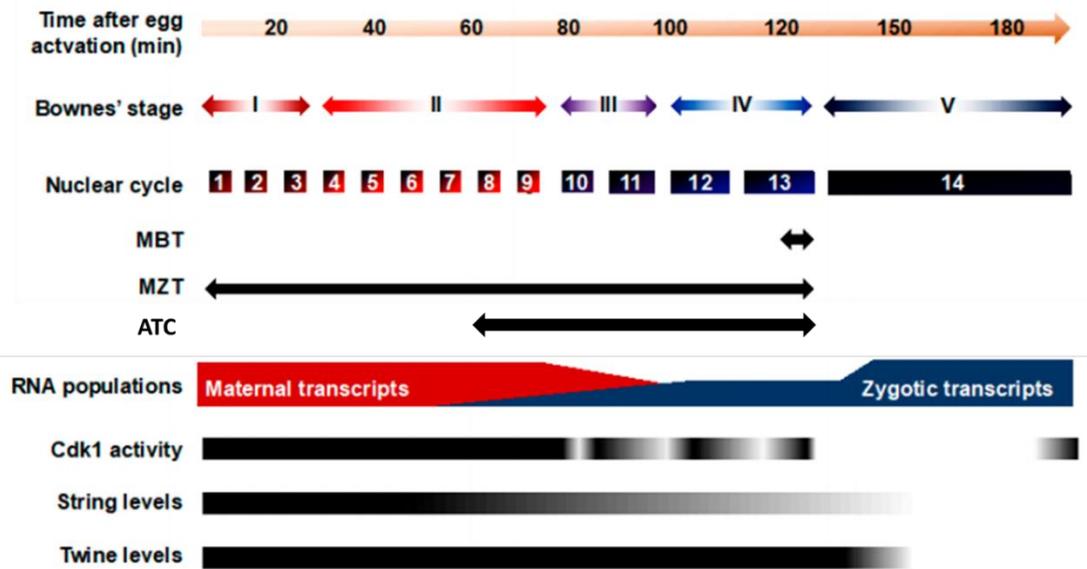


Figura 15. Esquema de los procesos que ocurren en el desarrollo temprano de *Drosophila melanogaster*. Se marcan el tiempo en que ocurren los primeros 14 ciclos mitóticos y los estadios del desarrollo que corresponden a cada uno (Bowne's stage). Además, se marca la transición de la Blástula Media (MBT), Transición Materna- cigótica (MZT) y Activación de la Transcripción Cigótica (ATC). En la parte inferior, se muestra el recambio de los transcritos maternos por los cigóticos y el tiempo de degradación de las fosfatasas String y Twine, y el complejo activo CDK1; durante las divisiones nucleares 1 a 13 (Lefebvre y Lécuyer, 2018).

Durante la primera ola de transcripción, en el ciclo nuclear 8, hay un conjunto de 117 genes que comienzan a transcribirse, son implicados en la diferenciación sexual (*sisA*, *sisB*, *sisC*, *run*, *Sxl* y *dpn*), el patrón de formación dorso-ventral (*dpp*, *tld*, *tok*, *tsg*, parecido a *tsg*, *scw*, *zen* y *zen2*) y la celularización (*nullo*, *slam*, *Sry-a*, *bnk*, *frs*, *btsz*, *halo* y 5 genes parecidos). Estos genes tienen la secuencia heptamérica de DNA "CAGGTAG" (TAGtem) presente río arriba del sitio de inicio de transcripción (TSS), a 2kb, y en intrones. Para los genes con TAGtem a 200 pb del TSS, su expresión es reprimida. Esta secuencia es reconocida por el factor transcripcional *Zelda* (*ZLD*), el cual actúa como factor pionero y es de deposición materna, controlando de la accesibilidad de la cromatina y/ o reclutando modificadores de histonas, promoviendo la deposición de la marca H3K4me1 y evitando deposición de H3K27me3. Para los genes expresados en este momento de desarrollo, *ZLD* se une a las secuencias promotoras y *enhancers*, permitiendo la accesibilidad de la cromatina para la maquinaria basal de transcripción. Para otros genes, *ZLD* solo deja accesible la cromatina, pero su expresión es dada hasta el ciclo 14. Los genes sin sitios de unión a *ZLD* son reprimidos por el complejo *Polycomb* (Figura 16) (Harrison, 2011; Xiao et al., 2014).

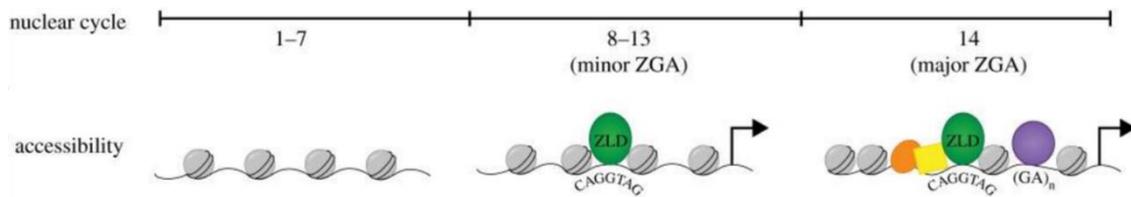


Figura 16. Esquema del cambio en la accesibilidad de la cromatina cigótica, durante la ATC. El factor transcripcional *Zelda* (*ZLD*) se une desde la primera ola de transcripción (ciclo nuclear 8), permitiendo la entrada de la maquinaria basal de transcripción a un conjunto de genes. Otros genes, aunque tienen secuencia de unión a *ZLD*, no serán transcritos sino hasta la segunda ola de ATC; es decir, al finalizar la MBT (ciclo nuclear 13) e inicio del ciclo nuclear 14. Los genes en la segunda ola, necesitan del factor transcripcional GAGA (morado) para ser expresados (**Hamm y Harrison, 2018**)

Para asegurar que la transcripción de este conjunto de genes sea rápida y eficiente, es necesario que regiones promotoras se mantengan accesibles para la maquinaria basal de transcripción. Para ello, los genes transcritos en la primera ola de ATC, además de múltiples sitios de unión a *ZLD*, presentan promotores tipo TATA e Initiator (*Inr*). Esto permite que la transcripción se lleve a cabo sin pausas, debido a que este conjunto de promotores presenta una baja concentración de nucleosomas río debajo del TSS (**Ngoc et al., 2019**).

Existen otro conjunto de genes que, aunque presentan unión a *ZLD*, este no es suficiente para activar su transcripción, por lo que necesita de otros factores transcripcionales, como *STAT92E*. El factor transcripcional *STAT92E* puede activar la transcripción en conjunto o sin *ZLD*, ya que se han visto sitios de unión a este factor transcripcional, ya sea solo o en conjunto con sitios de unión de *ZLD*. Como se mencionó, hay genes que, aunque *ZLD* promueve su expresión, necesitan de otros factores transcripcionales que actúan de manera sinérgica, como son: *Boicod* (*Bcd*), *Caudal* (*Cad*), *Nos*, *Torso* (*Tor*), *Decapentaplegic* (*Dpp*) y *Lilliputian* (*Lilli*) (Figura 16) (**Tsurumi et al., 2011**).

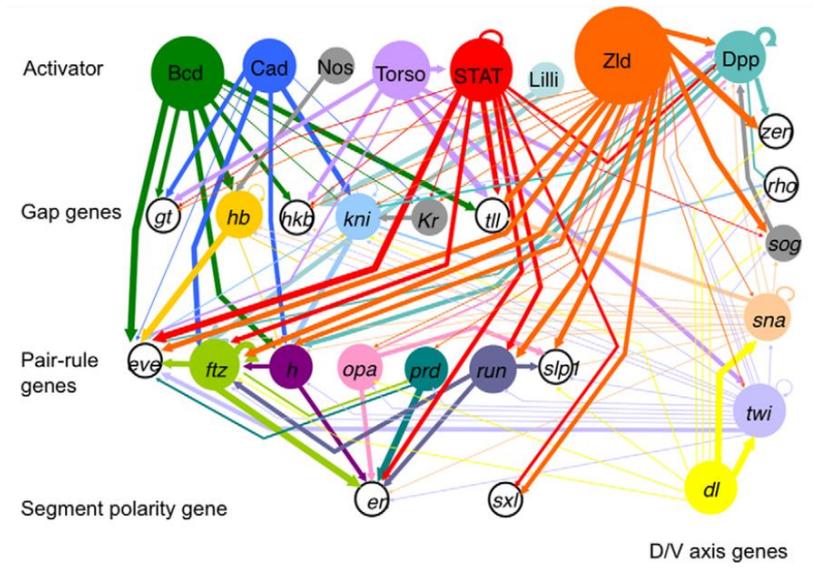


Figura 16. Mapa de activación que muestra las conexiones entre los genes activadores (fila superior) y sus genes blanco agrupados como: genes gap, pair-rule, genes de polaridad de segmento, genes de determinación del eje Dorso / Ventral (D/V) polaridad. Las líneas indican activación y, el grosor de la línea, la fuerza de activación (Tsurumi *et al.*, 2011).

ZLD también participa en la activación de la transcripción de 11 clústeres de miRNAs, los cuales, en conjunto con los factores transcripcionales, permiten la expresión de genes implicados en: determinación dorso-ventral y línea media ventral (miR-1, miR-9a y miR-92a), regulación de los genes Hox (miR-10), gastrulación (miR-iab-4 y miR-iab-4as), degradación de los transcritos de deposición materna (miR-309), desarrollo muscular (miR-92b y miR-1) y represión de muerte celular (miR-6, miR-11 y miR-2a1) (Figura 17) (Fu *et al.*, 2014).

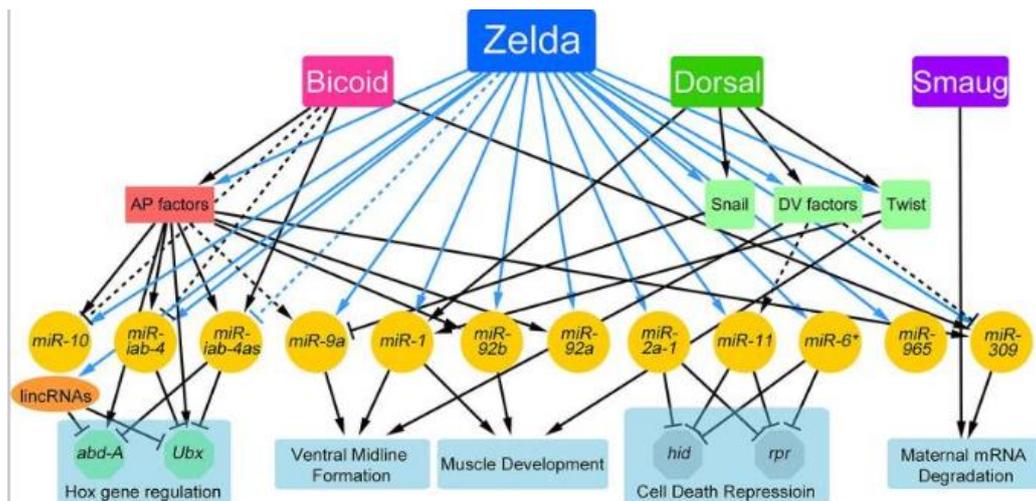


Figura 17. Diagrama de miRNAs dependientes de Zelda. Las flechas indican regulación positiva, la T representa una regulación negativa o desestabilización a través del 3' UTR (Fu *et al.*, 2014).

Para que la ATC se lleve de forma completa durante la MZT, hay una degradación gradual de los transcritos maternos. Para ello, un conjunto miRNAs activados por *ZLD* pertenecientes al clúster de miR-309 (miR-3 y miR-309) participa en su degradación. Los miR-3/-309 degradan a los transcritos maternos mediante el reconocimiento y unión a la región 3'-UTR de estos; sin embargo, son dependientes de la proteína Smaug para su unión, inhibiendo su traducción y reclutando al complejo de deadenilización CCR4/ POP2/ NOT. Estos miRNAs son de alta importancia en el desarrollo temprano, ya que degradan cerca del 13 % de los transcritos maternos **(Lee et al., 2014; Zhou et al., 2018)**

Otro elemento importante en la degradación de los transcritos maternos, en la MZT, es la proteína *Smaug* (*SMG*), degradando cerca de dos tercios de los transcritos. El reconocimiento de estos transcritos para su degradación, es gracias a elementos en la región 3' UTR (elementos de respuesta a *SMG* (*SRE*)). Una vez unido *SMG*, la degradación se lleva a cabo de reclutamiento del complejo deadenilasa CCR4/ POP2/ NOT. **(Tadros et al., 2007; Tadros y Lipshitz, 2009)**

Además, *SMG* también puede participar en unión con el complejo CUP- ME31B-BEL-TRAL, reprimiendo la traducción de los mRNA maternos durante la MZT. Sin embargo, solo el 2% de las proteínas maternas son degradadas en este momento; el resto ocurre posterior a la MBT. La actividad de CUP-ME31B-BEL-TRAL y *SMG* es regulada de dos maneras diferentes: PNG degrada al represor de CUP-ME31B-TRAL. Sin embargo, su estado activo es restringido a partir de 1h por la ubiquitin ligasa E3 *CTLH*, degradándose totalmente a las 2.5 h. La regulación de *SMG*, a diferencia, es dependiente de la MZT, pues al inactivarse PNG comienza a traducirse (a partir de 1h), pero es degradado por la ubiquitin ligasa *SCF* E3 (2.5- 3h). La permanencia de *SMG* posterior a la MBT probablemente ocurre por su interacción con miRNAs (miR-3/-309), para la degradación de otro conjunto de transcritos **(Cao et al., 2020)**.

Otras proteínas que también degradan transcritos maternos son: *PUM*, *BAT* y *ARE-BP*. En su conjunto, participan en la degradación de algunos transcritos maternos, aún presentes, posterior a la MZT. Sin embargo, no son tan específicos como *SMG*, debido a que también degradan transcritos cigóticos **(Vastenhouw et al., 2019)**.

Otra forma de regulación de la ATC, es por vía metabólica. Se sabe la hidroximetil transferasa de serina (*SHMT*) es requerida para la síntesis de purinas, timidinas y S- adenosil metionin; necesarias durante la replicación. Una vez que las reservas maternas de dNTPs son agotadas, no es posible continuar con las divisiones nucleares. Por lo tanto, la disponibilidad de dNTPs proporcionados por la correcta expresión y sincrónica expresión de *SHMT*, es necesaria. Con ello, las mutantes de *SHMT* no pueden avanzar más allá de la división nuclear 13, con defectos que impiden la celularización, por defectos en proteínas necesarias durante este proceso, como *Kugelkern*. Sin embargo, no son los únicos genes que presentan cambios en su expresión, debido a que más de 214 genes, normalmente degradados (de origen materno) se mantienen

estables, mientras que algunos de expresión cigótica, no pueden expresarse (**Winker et al., 2017; Song et al., 2017**)

También la proporción de núcleos: citoplasma (N:C) es importante para la ATC, ya que embriones haploides con menor carga de DNA, necesitan un ciclo nuclear extra, para la ATC; en cambio embriones con mayor carga genética, por microinyección de RNAs, presentan una ATC prematura (ciclo nuclear 12). A su vez, análisis de microarreglos han determinado que hay un conjunto de genes que se expresan independientemente de la relación N:C probablemente coincidiendo muchos de ellos con sitios de unión a ZLD (**Ferree, et al., 2016**).

Transcripción durante la Activación de la Transcripción Cigótica

Como se mencionó anteriormente, las divisiones nucleares rápidas y sincrónicas en el desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster*, conllevan a características muy específicas para los genes transcritos durante este periodo de tiempo. Se ha observado que, debido al limitado espacio de tiempo entre cada división nuclear, los transcritos en su mayoría son cortos; del 50 al 70% están libres de intrones (**Martinho et al., 2015**)

Análisis por RNA- seq durante la ATC, han mostrado que los genes cigóticos son preferentemente pequeños en comparación con los maternos. Tanto su tamaño como en cantidad, aumenta con forme se acerca la MBT, llegando a tener longitudes similares a los maternos al finalizar la ATC. De igual manera, en un principio (ciclos nucleares 7/8) estos genes son carentes de intrones o con intrones incompletos; pero, a partir del ciclo nuclear 11, hay un número considerable de genes transcritos con intrones (Figura 18). (**Kwasnieski et al., 2020**).

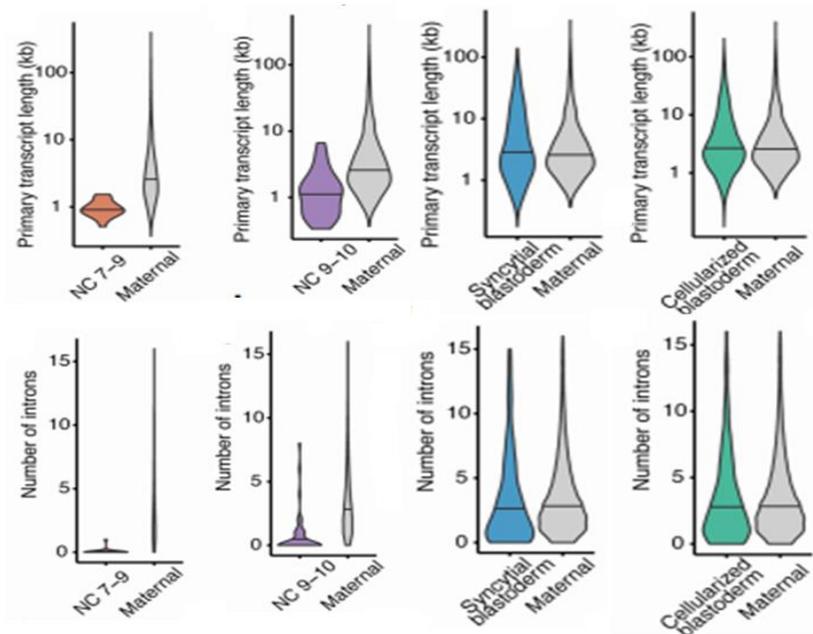


Figura 18. Gráficos superiores: Comparación de la longitud de los transcritos de genes cigóticos, expresados entre los ciclos nucleares 7-9 (n= 20), 9-10 (44 transcritos adicionales a los anteriores), 11-13 (882 transcritos adicionales) y 14 (con 2642 transcritos adicionales), en comparación con los transcritos maternamente (n= 4873). Gráficos inferiores: Número de intrones por genes cigóticos, transcritos para los ciclos nucleares 7 al 9, 9 al 10, 11 al 13 y 14; contra los transcritos maternos (**Kwasnieski et al., 2019**).

Como se mencionó con anterioridad, existen genes que su transcripción es independiente o en conjunto con *ZLD*, durante la ATC; éste es el caso de los genes de las histonas. Los genes de las histonas canónicas, en *Drosophila melanogaster* se encuentran repetidos 100 veces, agrupados en clústers; cada uno con una copia de cada histona (H2A-H2B, H4-H3 y H1) (Figura. 19). Para su transcripción es necesaria la proteína *chromatin-linked adaptor for male-specific lethal [MSL] proteins (CLAMP)*, de deposición materna, funcionando como un factor pionero. *CLAMP* facilita la apertura de la cromatina y el reclutamiento de proteínas que están involucradas en el procesamiento de las histonas (*FLASH, Mxc, U7 snRNA, Mute*, etc.) y la maquinaria basal de transcripción. Para su unión, *CLAMP* reconoce secuencias ricas en GA, presentes en el promotor de H4- H3; su delección en el promotor de las histonas impide la transcripción y el ensamble de los dominios nucleares encargados en la biogénesis de las histonas, los *Histone Locus Body (HLB)*. *CLAMP* está presente sobre esta región promotora de H3-H4, desde el ciclo nuclear 10; pero es hasta el 11- 12, donde se ha reportado la transcripción de este conjunto de genes (**Rieder et al., 2017**).



Figura 19. Clúster de genes de histonas repetidos 100 veces en cromosoma 2L de *Drosophila melanogaster* (Rieder et al., 2017).

El factor transcripcional *CLAMP* tiene la capacidad de permitir la accesibilidad de sitios heterocromáticos, debido a que recluta al complejo *Nucleosome Remodeling Factor (NURF)*. Con ello, *NURF* reduce la ocupación de histonas presentes en ese sitio, permitiendo una mayor accesibilidad de la cromatina y, con ello, los sitios de *transcription start site (TSS)* son accesibles a la llegada de la maquinaria basal de transcripción. Además, *CLAMP* interactúa con *Negative Elongation Factor (NELF)*, que, al igual que *NURF*, disminuye la cantidad de nucleosomas en dichas regiones (Urban et al., 2017).

En la biogénesis de las histonas canónicas, a diferencia de la mayoría de los genes (con intrones y colas de poli (A) en el extremo 3' UTR), es la ausencia de intrones y transcritos poliadenilados. Durante su transcripción, se da un procesamiento sobre el extremo 3' UTR, siendo cortados los últimos 33 nucleótidos. Para que este corte se lleve a cabo, las proteínas (*Stem-loop Binding Protein (SLBP)* y *U7 snRNP*) definen el sitio donde se dará. Para ello, *SLBP* se une río arriba del sitio de corte, a 2-3nt; dicha región es altamente conservada y forma una estructura secundaria (*Stem-loop, (SL)*). Mientras que, río abajo del sitio de corte (5 nt), *U7 snRNP* se une a otra región conservada (*Histone Downstream Element (HDE)*). Una vez unido *U7 snRNP*, esta proteína forma un complejo con otras 7, llamado anillo Sm (Lsm 11, Lsm10, B, D3, G, E y F). Este anillo heptamérico interactúa con *SLBP*, permitiendo la unión con la proteína *FLASH*; quien se encarga de reclutar al complejo encargado del corte durante el procesamiento, el *Histone pre-mRNA cleavage complex (HCC)*. Para realizar el corte, *HCC* está formado por 3 proteínas, entre ellas una endonucleasa (*CPSF73*); la cual realiza el corte entre el *SL* y *HDE*. La pérdida de *SLBP* conlleva a que la transcripción continúe, ya que *SLBP* interactúa con *NELF*, formando un transcrito poliadenilado por la presencia de sitios críticos de poliadenilación río abajo (Figura. 20) (Saldi et al., 2018).

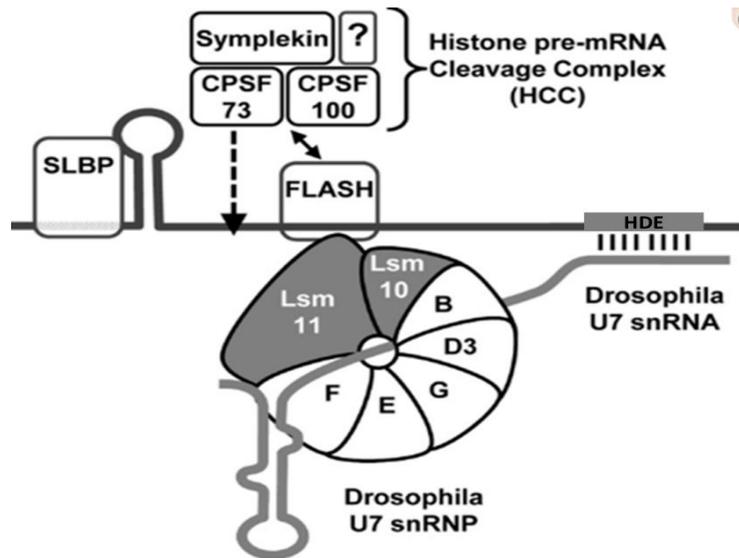


Figura 20. Esquema de proteínas que intervienen en el procesamiento de las histonas, en la región 3' UTR del transcrito. Se muestra, río arriba la unión al SL de *SLBP* y la unión de U7 sobre la secuencia *HDE*, río abajo. Se marca con una flecha punteada el sitio de corte de *HCC*, y con una doble flecha continua, la interacción/ reclutamiento de *FLASH* con *HCC*. (Sabath et al., 2013).

Transición de la Blástula Media (MBT) y Celularización

El último paso en la ATC se da durante y al finalizar el ciclo nuclear 13 o MBT (Figura 15); donde se da la segunda ola de transcripción cigótica. Al terminar la MBT, los ciclos mitóticos serán asincrónicas y se dará la celularización, pasando de un blastodermo sincitial a uno celular. La celularización se da por la invaginación y constricción de la membrana plasmática, permitiendo la individualización de cada célula, formándose el blastodermo celular. Al finalizar la MBT, se da inicio a la gastrulación (ciclo nuclear 14); donde las capas germinales del embrión (endodermo, mesodermo y ectodermo) se forman (Liang et al., 2008).

Durante la segunda ola de transcripción, al finaliza la TBM, hay un reclutamiento *de novo* de RNA Polimerasa II a 4007 promotores. Para la activación de este conjunto de genes sea sincrónica y precisa, la transcripción sufre una pausa. Debido a que estos genes presentan promotores con elementos como: *downstream promoter element (DPE)*, *Motif Two Element, (MTE)* y *Pause Button (PB)*, con zonas ricas en CG. Además, estos promotores tienden a estar ocupados río abajo del TSS por un nucleosoma. La pausa en transcripción se da por proteínas *DRB sensitivity inducing factor (DSIF)*, *Negative elongation factor (NELF)* y *Gdown1 (Polr2m)*; que se asocian a RNA Polimerasa II pausada evitando la elongación de los transcritos. Para que se reanude la transcripción, *positive transcription elongation factor- b (P-TEFb)* fosforila a *NELF*, *Gdown1*,

DSIF y al *CTD* de la RNA Polimerasa II en el residuo de Ser 2. Tanto *NELF* y *Gdown1* se desacoplan, mientras que *DSIF* ahora participa como un factor positivo en la elongación (Figura. 21) (Chen *et al.*, 2013; Gaertner y Zeitlinger, 2014).

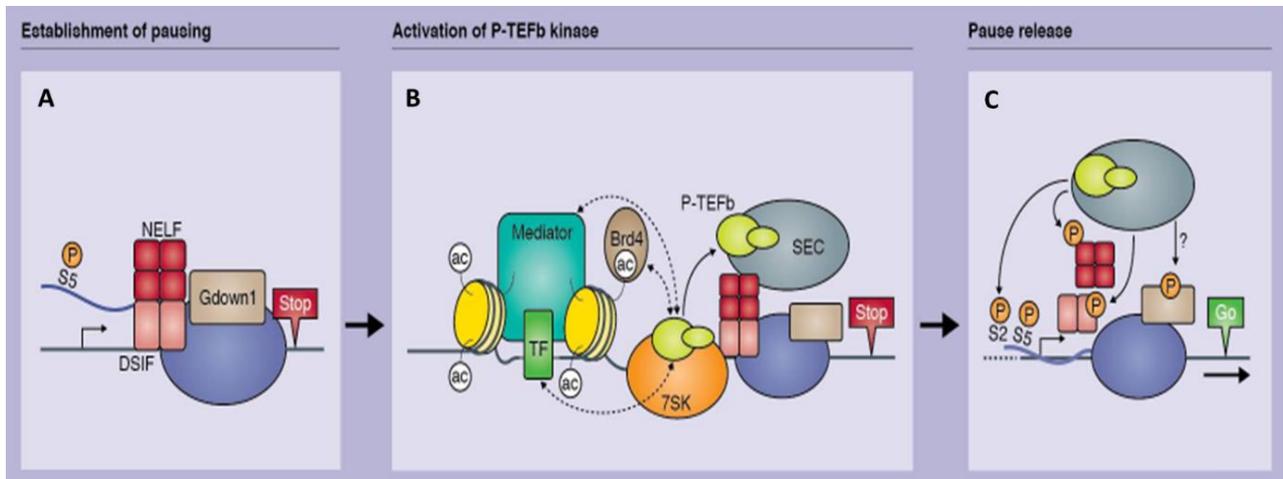


Figura 21. Modelo de establecimiento de pausa y restablecimiento de la transcripción, en RNA Pol II. A) Posterior a la liberación de RNA Pol II del promotor, con la Ser5P en el CTD, se da el establecimiento de la pausa por *NELF*, *DSIF* y *Gdown1*, que se asocian a Pol II impidiendo la elongación. B) La cinasa *P-TEFb*, asociada al complejo 7SK, en estado inactivo. La unión de Factores transcripcionales (TF), el complejo Mediator y Brd4 (acetil transferasa), liberan a *P-TEFb* del complejo 7SK, quien se asocia al complejo de Super Elongación (SEC). C) *P-TEFb* fosforila a *NELF*, *DSIF*, *Gdown1* y a la Ser 2 del CTD en RNA Pol II; liberándose *NELF* y *Gdown1*, permitiendo la elongación, mientras que *DSIF* participa como factor positivo de elongación.

A su vez, acetil transferasa de histonas, CBP, participa en el reclutamiento de la RNA Polimerasa II al promotor de estos genes, por su interacción con TFIIB. Al mismo tiempo, CBP permite la liberación de la pausa en la transcripción, al depositar la marca de H3K27ac en el nucleosoma 1; nucleosoma presente estos tipos de promotores. Además, CBP puede acetilar lisinas en el CTD de RNA Polimerasa II, lo que podría tener implicaciones en durante la elongación (Boija *et al.*, 2017).

La presencia de CBP sobre estos genes es gracias al factor transcripcional GAGA (GAF), denominado así por el reconocimiento de la secuencia “GAGAG” presente en los promotores de los genes transcritos durante la segunda ola de ATC. Esta secuencia en tándem es reconocida por GAF, quien reduce el número de nucleosomas en los promotores de estos genes, por el reclutamiento de factores remodeladores de la cromatina, como NURF, ISWI y BPAP. Con ello permite el acceso y llegada de la maquinaria basal de transcripción. Sin embargo, GAF también promueve la pausa al recluta a *NELF* y la estabilización del nucleosoma 1+, río abajo del TSS; lo que impide la elongación de los transcritos. (Fundu *et al.*, 2015).

Inicio de la Transcripción en Eucariontes

Para que se lleve a cabo la transcripción por RNA Polimerasa II (RNA PolII) es necesario el acoplamiento de Factores Generales de Transcripción (FGT); que permiten la formación del complejo de preiniciación (PIC). Para la formación del PIC, el primer FGT en unirse al promotor es TFIID, formado por *TATA box-binding protein* (TBP), necesario para el reconocimiento la mayoría de los promotores, y *TBP-associated factors* (TAFs), que reconocen secuencias promotoras específicas. Al unirse TBP al promotor (caja TATA), 30 pb río arriba del TSS, se dobla la hebra de DNA en un ángulo de 90°. Posteriormente, el FGT TFIIB, se une a la secuencia "B recognition element" (BRE) adyacente a la caja TATA; lo que permite la llegada de TFIIA, estabilizado al complejo. Además, TFIIA facilita la unión de TFIIF, que posteriormente se unen TFIIIE y TFIIF. Una vez ensamblado el PIC, en conjunto forman una estructura funcional, que permite la apertura de la hebra de DNA para el inicio de la transcripción (Vannini y Cramer, 2012; Sainsbury, 2015).

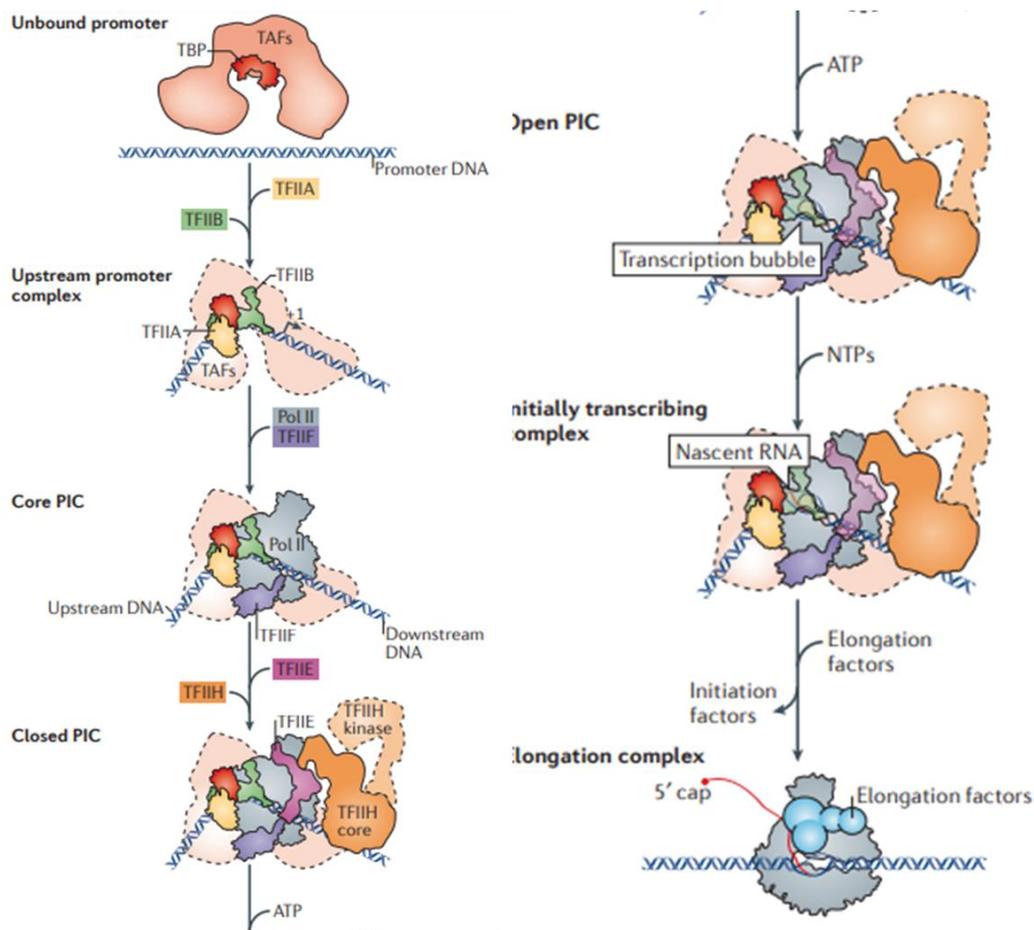


Figura 22. Modelo de ensamblaje del complejo de preiniciación (PIC) al promotor, por los FGT y RNA Pol II sobre el promotor. Los nombres de los complejos intermedios se colocan a la izquierda. TFIID (TBP y TAFs), se une al promotor,

induciendo una dobles de 90 °. El complejo TBP-ADN se estabiliza por TFIIB y TFIIA. Al complejo resultante se unen Pol II-TFIIF, formándose el core del PIC. Posteriormente, el PIC se completa al unirse TFIIE y TFIIH. La presencia de ATP, permite la apertura del PIC, pasando de un complejo cerrado al abierto gracias al FGT TFIIH, lo que permite el inicio de la transcripción; una vez iniciada, los FGT se disocian (**Sainsbury, 2015**).

Como se mencionó anteriormente, los FGT no solo permiten el reconocimiento y estabilización de la RNA Pol II sobre los promotores de los genes a transcribir. Además, el FGT TFIIH, permite la apertura y translocación de la hebra de DNA y, al mismo tiempo, fosforila el residuo de Ser5 en el CTD de RNA Pol II. EL CTD es parte de la subunidad RPB1 de RNA Pol II, siendo de alta importancia, ya que participa en múltiples actividades durante la transcripción (unión del capping, splicing, metilaciones, fosforilaciones, etc.) (**Bedez et al., 2013**).

EL FGT, TFIIH, está formado por diez subunidades, organizadas en dos subcomplejos: Cinasa activadora de CDKs (CAK), formado por: Cdk7, Ciclina H y MAT1; y el Core, formado por XPB, XPD, p44, p62, p52, p34 y p8. Ambos subcomplejos (CAK y Core) interactúan entre si (holoTFIIH), participando en el inicio de la transcripción (Figura 23) (**Luo et al., 2015**).

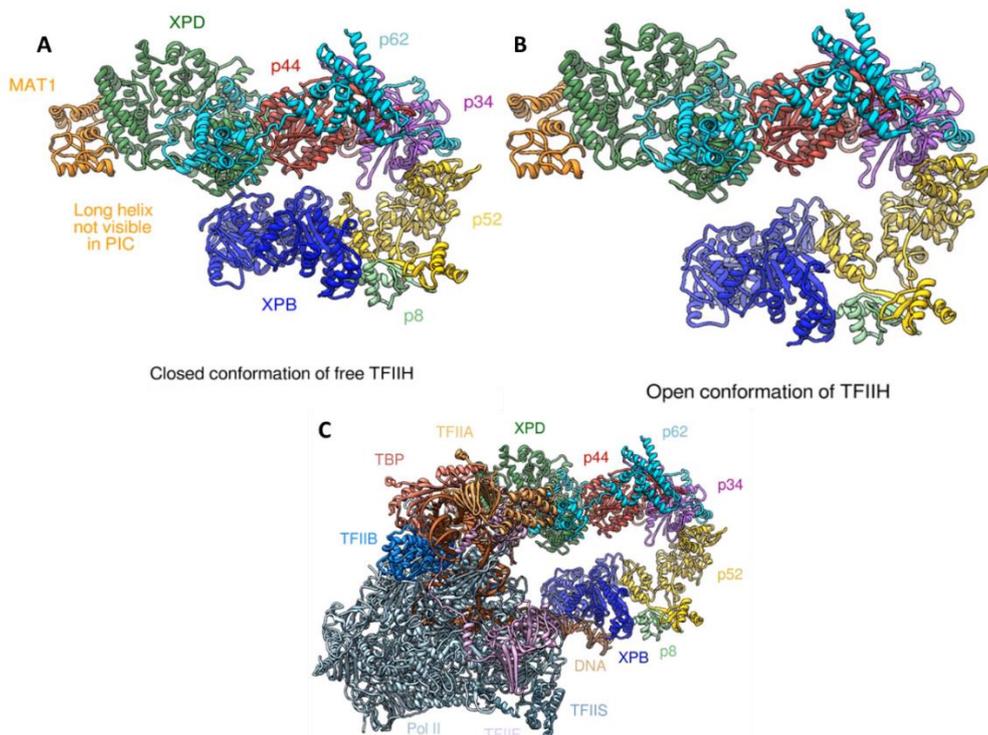


Figura 23. Estructura de TFIIH a partir de datos de criomicroscopía electrónica (cryo-EM) donde se muestra la ubicación de las subunidades de TFIIH en el complejo cerrado A), Abierto B) y C) en interacción con RNA Pol II y los demás FGT (**Greber et al., 2019**).

Las subunidades de TFIIH presentan múltiples actividades que no solo se restringen a la transcripción. Por ejemplo, los componentes del subcomplejo Core: dos de sus subunidades (XPB y XPD) presentan actividad ATPasa/helicasa (3' a 5') y translocasa durante la transcripción. Además, XPD funge como puente entre los subcomplejos Core y CAK, formando la Holo TFIIH durante la transcripción; pero también participa en la segregación cromosómica, en unión con MMXD. A su vez, XPD y XPB participan en la reparación vía escisión de nucleótidos (NER), donde presentan actividad ATPasa/ Helicasa (5' a 3'). La actividad ATPasa/helicasa, de XPD, es regulada por las subunidades p44 y p62; al mismo tiempo, p44 tiene actividad ubiquitin ligasa. La regulación de la actividad ATPasa de XPB, en NER, es dada por p52 y p8. A diferencia del Core, el subcomplejo CAK no tiene participación en NER, ya que es desestabilizado y desacoplado del Core; sin embargo, presenta actividades independientes, como es la regulación del ciclo celular. La subunidad CDK7 del CAK, fosforila a distintas CDKs importantes en la división celular (CDK 1, 2, 4 y 6); al mismo tiempo, su actividad es regulada negativamente por XPD. En unión con el Core, CDK7 permite el escape de la RNA Pol II del promotor, fosforilando la Ser5 del CTD de RNA Pol II; al mismo tiempo, activa a Cdk9 de pTEFb, quien fosforila el CTD en Ser2 y permite la elongación del mRNA. La estabilidad de CAK es modulada por MAT1 (**Barnett et al., 2019; Compe y Jean-Marc Egly, 2016; Mydlikova et al., 2010; Zurita y Cruz, 2016**).

Antecedentes

Se han realizado estudios en donde se ha tratado de dilucidar la dinámica de los componentes de la maquinaria transcripcional, durante el ciclo celular. Por ejemplo, un primer acercamiento fue **Leclerc et al. (2000)**, al establecer la participación de CDK7, subunidad de TFIIH y parte del subcomplejo CAK, en la regulación del ciclo celular y transcripción, con mutantes de embriones tempranos de *Drosophila melanogaster*. Propuso que, posiblemente la presencia de CDK7 en citoplasma, regulaba negativamente la transcripción, debido a la imposibilidad de unión de CDK7 y del CAK con el Core, evitando con ello la fosforilación del CTD en RNA Pol II. Al mismo tiempo, abre la posibilidad de que los resultados obtenidos en cuanto a la participación de CDK7 en la transcripción, pudiera deberse a un efecto indirecto sobre la transcripción; debido a la desregulación de la mitosis, pues fenotipos similares se observaban en genotipos con deficiencias en Cdc 25.

Posteriormente, fue descrita parte de la dinámica de los subcomplejos, el CAK y el Core de TFIIH, durante la ATC de *Drosophila melanogaster*, por **Aguiar-Fuentes et al., (2006)**. Ellos evaluaron la dinámica de ambos subcomplejos, en el desarrollo embrionario temprano, de *Drosophila melanogaster*, confirmando la participación del CAK (CDK7) en la transcripción. Además, inmunotinciones mostraron al CAK preferentemente en citoplasma, previo a la MBT, a diferencia del Core, que se mantiene en el núcleo. Sin embargo, análisis de ChIP demostraron que una fracción del CAK se mantiene en el núcleo e interactúa con

el Core, permitiendo la ATC, ya que CAK (Cdk7 y MAT1) y el Core (XPB y XPD), estaban presentes en los promotores de hunchback e histona H3 previo a la MBT. Además, ensayos de co-IP mostraron la interacción de ambos subcomplejos en el núcleo; sin embargo, en la fracción citoplasmática, únicamente XPD interactuaba con el CAK. Al mismo tiempo, anticuerpos neutralizantes contra XPB y XPD, sugieren que ambas subunidades son necesarias para la traslocación al núcleo. A partir de esto, ellos proponen la interacción transitoria de XPD-CAK en citoplasma y, posiblemente, el ensamblaje del Core (con XPB) de manera independiente; la interacción entre ambos subcomplejos se da únicamente en el núcleo, al terminar la mitosis, formando la Holo-TFIID.

De igual manera, estudios sobre embriones tempranos de *Drosophila melanogaster*, por **Li et al., (2010)**, confirmaron la interacción del XPD con el subcomplejo CAK, en citoplasma. Al parecer, la subunidad XPD interactúa y regula la actividad cinasa de CDK7 a sus blancos específicos. Además, posiblemente la actividad de XPD no solo se restrinja al ciclo celular; pues defectos en esta subunidad muestran cambios en la segregación cromosómica durante la metafase.

Recientes experimentos en nuestro grupo de investigación han centrado en el estudio de la dinámica del CAK y Core en los ciclos nucleares de embriones tempranos de *Drosophila melanogaster*, por medio de proteínas transgénicas acopladas a fluoróforos, confirmando parte de la dinámica de los subcomplejos de TFIID; sin embargo, la presencia del CAK en el núcleo también se ha observado durante la mitosis. Ello sugiere que, parte de la maquinaria basal de transcripción, en particular RNA Pol II y las subunidades de TFIID, se mantienen presentes en los cromosomas durante la mitosis, previo a la entrada de la MBT. Experimentos de inmunotinción, contra RNA Pol II fosforilada en la Ser5 del CTD, colocalizan en con las subunidades del CAK y Core; en especial sobre gránulos de eucromatina asociados a HLB, desde la interfase hasta la mitosis (**Cruz et al., 2018**).

Otro de los FGT que participan en el inicio de la transcripción, es TFIID, el cual reconoce el sitio core promotor, formado por TBP y al menos otros 14 factores asociados a TBP (TAFs). **Teves et al., (2018)** han demostrado que TBP podría participar como bookmarking; es decir, este FGT permite una rápida reactivación de la transcripción al terminar la mitosis, al permanecer unido a los promotores de genes específicos. Dichos experimentos fueron desarrollados en *Embryonic stem cells* (ESCs) de ratón, por análisis de ChIP-seq, SPT, spaSPT y ATAC-seq, mostrando una fracción del 13.3 % de TBP, unida a los cromosomas durante la mitosis. La fracción unida de TBP, mantenía accesible el TSS de genes que participan en el ciclo celular; de entre 180 y 250 pb de extensión. De igual manera, determinaron la presencia transitoria de un 15.4% de RNA Pol II por 30 s en los cromosomas durante la mitosis por ensayos de spaSPT, FRAP y SPT, aunque con cierta inespecificidad. Al mismo tiempo, se observó un aumento en la fracción de RNA Pol II unida, conforme terminaba la mitosis, mientras que, al eliminar a TBP, la fracción unida de RNA Pol II no cambiaba. A su vez, la

degradación de TBP durante la mitosis, mostró pérdida de la transcripción *de novo* al inicio de la interfase; los genes afectados participan en el ciclo celular, metabolismo y factores de transcripción.

Experimentos sobre *ESC* humanas por **Oh et al. (2020)**, también han corroborado la presencia de TBP sobre los cromosomas durante la mitosis. Además, demostraron que TBP forma un complejo con las proteínas APC/C y WDR5 durante la mitosis. Este complejo ubiquitina (Ub) a los dímeros de H2A-H2B y a H3; específicamente los residuos de K11 y K48 en H2B durante la mitosis; posteriormente, el complejo p97/UBXN7 reconoce la Ub en K11 y K4, promoviendo la degradación de H2B. La degradación de H2B, desestabiliza el nucleosoma, liberando el TSS del gen, permitiendo su transcripción en la interfase. Los genes marcados, están relacionados con el mantenimiento pluripotencial de las *ESC*; dirigidos por la asociación entre WDR5 y factores transcripcionales como OCT4 y MYC.

Por último, se sabe que durante la mitosis hay un silenciamiento en la transcripción de genes, debido a la condensación de la cromatina, para una correcta segregación de los cromosomas. Sin embargo, estudios realizados por **Palozola et al. (2017)** en líneas celulares de hepatocitos, demostraron la existencia de procesos de transcripción, en estadios tempranos de la mitosis, por medio de RNA-seq y FISH. Sumado a lo anterior, estudios hechos por **Hsiung et al., (2016)**, que muestran la presencia de RNA Pol II en los cromosomas durante la mitosis; además, también observaron transcripción *de novo*, durante la mitosis tardía e inicio de la G1.

Por todo lo anterior, nos preguntamos si:

- 1.- ¿La maquinaria basal de transcripción se mantiene unida a los promotores de los genes que se activan previa la MBT, para facilitar su rápida activación después de la mitosis?
- 2.- ¿La transcripción de los genes de las histonas, que normalmente se expresan en la fase S del ciclo celular, se extiende a las primeras fases de la mitosis, previo a MBT?

Justificación

Un área importante de estudio ha sido el funcionamiento y activación de la maquinaria basal de transcripción, previo y durante la expresión de un gen. Sin embargo, aún siguen siendo desconocidos los detalles sobre cómo opera por primera vez, durante el desarrollo embrionario temprano. Por lo tanto, estudiar la dinámica de la maquinaria basal de transcripción, en este punto del desarrollo embrionario temprano, nos permitirá comprender parte de los complejos mecanismos que conllevan a la ATC.

Hipótesis

Es necesaria la presencia de la maquinaria basal de transcripción en los promotores de los genes cigóticos activos, tanto en la interfase como en la mitosis, durante el desarrollo temprano de *Drosophila melanogaster*. Ya que, las primeras divisiones nucleares, previo a la MBT, son extremadamente rápidas; por ello la presencia de la maquinaria basal de transcripción aseguraría una rápida y precisa reactivación de la transcripción al terminar la mitosis.

Objetivo General

Determinar si hay presencia de RNA Pol II en los promotores de genes en la mitosis, previo a la MBT. Además, comprobar si ésta se encuentra transcripcionalmente activa.

Objetivos Particulares

- Establecer la presencia de la RNA Pol II en los promotores de genes de las histonas H3 y H4 en interfase y durante la mitosis.
- Evaluar la transcripción de la histona H3 en mitosis previo a la MBT.

Estrategia experimental

Para determinar la presencia de la maquinaria basal de transcripción, en el desarrollo temprano de *Drosophila melanogaster*, se utilizó la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), contra RNA Pol II, utilizando embriones de mosca de la sepa silvestre Oregon, previos a la MBT. Específicamente nos centramos en los promotores de los genes de las histonas H3 y H4, realizando los ChIPs tanto en interfase como en la mitosis. Para la obtención de los embriones detenidos en mitosis, se incubaron con colchicina y posteriormente fueron fijados, para realización del ChIP. Se ha decidido enfocar el presente trabajo sobre estos genes, ya que se expresan por primera vez previo a MBT, desde el ciclo nuclear número 11. Al mismo tiempo, es mucho más fácil tener una señal fehaciente en el ChIP, ya que las histonas se encuentran en multicopia, lo que facilita su análisis por medio de esta técnica.

Respecto a la presencia de actividad transcripcional *de novo*, por parte de la maquinaria basal de transcripción durante la mitosis, se realizó por medio de dos técnicas, Hibridaciones *in situ* (ISH) y RT-PCRs; contra el pre-mRNA de la histona H3 durante la mitosis. Se utilizaron embriones Oregon de *Drosophila melanogaster*, previos a la MBT, y se utilizó colchicina para detener la mitosis.

Con lo anterior se podrá determinar la presencia de la maquinaria basal de transcripción en los promotores que se activan por primera vez en el desarrollo embrionario. Así como la existencia de transcripción de los genes de histonas, durante la mitosis, previa la TBM.

Metodología

Colecta de Embriones

Se amplificaron moscas silvestres, de la cepa Oregon- R, de *Drosophila melanogaster*, es decir, aumentó el número de individuos, para la obtención de una mayor cantidad de embriones; utilizados en los experimentos de ChIP, ISH y RT-PCR. Para la amplificación, se hicieron pases consecutivos de moscas adultas, en botellas con medio de cultivo agar-piloncillo; permitiendo su ovoposición por 24h a 25° C, entre cada pase. Las nuevas generaciones de moscas, tardaron alrededor de 12 días en eclosionar, desde su ovoposición. Los adultos jóvenes (de entre 3 y 5 días de edad), se colocaron en contenedores de acrílico, para la colecta de embriones; direccionando el lugar de las puestas con platos de medio agar-piloncillo y jugo de manzana como atrayente. Además, se cubrió cada plato con levadura disuelta en agua, para alimentar a las moscas. Previo a las colectas de embriones, se acondicionó a las moscas mínimo un día, de tal manera a que los posteriores días, los embriones obtenidos se comenzaron a colectar.

Una vez acondicionadas, previo a cada colecta, se sincronizaron las ovoposiciones, de tal manera que los huevos colocados en los platos presentaran aproximadamente el mismo tiempo de desarrollo y tener el mayor número de embriones. Para ello, se cambiaron los platos con medios de medio de cultivo y levadura cada 2 h, por 3 veces. Posterior a ello, se comenzaron a colectar los embriones.

Para la colecta de los embriones, se dejó un tiempo de oviposición 40 min de ovoposición y 40 min de incubación (1h y 20 min en conjunto) a Temperatura Ambiente (T.A.), posteriormente se retiraron los platos y se removieron los embriones suavemente, con un pincel y agua. Se prosiguió a decorionar los embriones, con hipoclorito de sodio al 2.5%, en agitación por 90 segundos a T.A. y se lavaron con agua o con solución Embryon Wash 1x (stock 10x 0.7% NaCl y 1% Triton-100), para los embriones utilizados en el ISH, hasta eliminar el olor a cloro.

Una vez decorionados, para la obtención de embriones detenidos en la mitosis, se incubaron los embriones en una solución PBS/colchicina (500 uM): heptano, (1:1) por 10 min a T.A., en agitación; para los embriones en interfase, únicamente en PBS: Heptano.

(William *et al.*, 2000; Caravaca y Lei, 2016)

Al finalizar, los embriones colectados se utilizaron para los experimentos de ChIP, ISH o RT-PCR.

Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

Para la elaboración del ChIP, se utilizó el método descrito por **Löser, et al. (2016)**. Primero se fijaron los embriones y proteínas asociadas a la cromatina; para ello, a los embriones colectados, se les colocó en una solución 1.8 % de paraformaldehído (EMS) en buffer de fijado (50 mM Hepes pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA y 100 mM NaCl). Para detener el fijado, se lavaron los embriones con una solución de 125 mM glicina y 0.1 % Triton X-100 en PBS y, una vez más con 0.1 % Triton X-100 en PBS. Se eliminó el vitelo en una solución heptano: metanol (1:1); y se lavaron dos veces con metanol, almacenándose a -20 °C, igualmente en metanol.

Se prosiguió con la obtención y fragmentación de la cromatina; utilizando 250 µL (~250 ug) de embriones para cada ensayo de ChIP. A partir de los embriones deshidratados y almacenados en metanol, se rehidrataron secuencialmente en un gradiente de metanol:PBST (PBS con 0.1 % triton X-100) a 25%, 50%, 75% y 100% de PBST. Una vez hidratados, en PBST al 100%, se lavaron dos veces más en PBST. Se retiró el PBST y se homogenizaron los embriones, en 1 mL de buffer A1 (15 mM Hepes pH 7.5, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT y 0.5 % triton X-100). El homogenizado se centrifugó a 2000 rpm durante 3 min a 4 °C; se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 mL de buffer A1, centrifugándose nuevamente. Al finalizar, se descartó el sobrenadante y se resuspendió con 5 mL de buffer A2 (15 mM Hepes pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 % triton X-100, 0.1 % deoxicolato de sodio, 0.1 % SDS y 0.5 % sarcosil); se centrifugó nuevamente por 1 min. La pastilla resultante, se resuspendió en 900 µL de buffer A2 y se sometió a 30 ciclos de sonicación (30 s ON y 30 s OFF por cada ciclo) en un sonicador Bioruptor (Diagenode), en tubos TPX de 1.5 mL (Diagenode). El extracto sonicado se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos, a 4 °C; recuperándose el sobrenadante.

Posteriormente se purificó el complejo DNA-Proteína, presente en el sobrenadante, producto de la sonicación. Primero se tomó el 10% del sobrenadante para el Input (C+); guardándose -70 °C. El restante (~810 uL), se dividió en dos (~405 uL, cada uno); uno se incubó con 7.5 ug de anticuerpo (anti-RNAP II, Santa Cruz Biotechnology) y el otro con IgG de ratón (anticuerpo irrelevante o "mock", C-) (Invitrogen) durante 12 h a 4 °C, en rotación. El complejo anticuerpo-cromatina-DNA, se recuperó con 25 uL de Dynabeads Protein G, para cada uno. El sobrenadante se descartó y la resina se lavó cinco veces durante 10 minutos con 1 mL de buffer de lavado (50 mM Hepes pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.7 % deoxicolato de sodio, 1% Igepal y 500 mM LiCl) y una vez con 50 mM de NaCl en buffer TE (10 mM Tris pH 8.0 y 1 mM EDTA). La cromatina inmunoprecipitada, se recuperó con 200 uL de buffer de elusión (1 % SDS, 0.1M NaHCO₃, 10 mM Tris pH 8.0 y 1 mM EDTA), incubándose a 65 °C en 1500 rpm,

por 20 min. La elusión se combinó con 0.5 volúmenes de buffer TE y el entrecruzamiento se revirtió a 65 °C durante 12 h.

Para recuperar la cromatina, se incubó con 0.2 µg/µL de RNAsa A (Roche) durante 2 h a 37 °C y posteriormente, con Proteinasa K (Roche) a 0.2 µg/µL durante 2 h a 55 °C. El ADN se recuperó con un protocolo estándar de extracción con fenol: cloroformo y se precipitó con 200 mM de NaCl, etanol y glucógeno (Roche).

El ADN recuperado se analizará mediante PCR punto final, para lo cual se emplearon las siguientes secuencias de oligonucleótidos (anotados en dirección 5'-3'): H3 sentido, CACGTTCACTACTTCACGTTTG; H3 antisentido, GGCCTCTGTTTTTCTCTCTCTC. H4 sentido, ATTATACACGCACAGCACGAAAG; H4 antisentido, CTCTCGGGTTTTTGTCTGTTTTAC. Como C-, el pre-rRNA, sentido, TTTGAACACGGGACTTGGCT; antisentido, AACATAAAACCGAGCGCACA. RNA Pol I (Figuras. 24, 34- 37).



Figura 24. Esquema de sitios de unión de los tres pares de *primers* utilizados en las PCR en los ChIPs. Se colocan los primer con relación al sitio de unión de sus genes blanco. Las flechas verdes señalan a los tres pares de primers; en negro y blanco, los primers y la región amplificada. En la parte inferior de cada primer, los genes H3, H4 y pre-rRNA.

Hibridación *In Situ* (ISH)

A partir de los embriones decorionados, se fijaron de 200 a 250 uL de embriones (~ 200 a 250 ug), en una solución con 5 mL de Heptano, 4 mL de Buffer de fijación (Hepes 0.1M pH 6.9, Sulfato de Magnesio 2mM y EGTA 1mM pH 8) y 0.5 mL de Formaldehido al 37%; durante 20 min en agitación. Se removió la fase inferior y se adicionaron 10 mL de Metanol frío, en agitación por 1 min y se desechó la fase superior; se lavó dos veces con metanol y se guardaron a - 20 C°. Se continuó con un segundo tratamiento de fijación, removiéndose el metanol y adicionándose en una solución con 8 mL de Heptano y 2 mL de Paraformaldehido 4%, en buffer de fijación; en agitación por 20 minutos. Al

finalizar se desechó la fase inferior y se agregó 10 mL de metanol frío, por un minuto en agitación; se lavaron 2 veces con Etanol frío al 100%.

Al finalizar el fijado, se procedió a clareo del tejido, para ello incubó a los embriones en un gradiente de Etanol: Xileno; lavando los embriones con una solución de Etanol: Xileno 1:1 v/v por 10 min en rotación, luego solo Xileno por 3 h. Posteriormente se retiró el xileno, por gradiente, pasado por etanol: xileno 1:1, 2:1 y 3:1 v/v, por 10 minutos cada uno; se lavaron 3 veces más en etanol por 10 minutos.

Al terminar el clareo de tejido, se fijaron nuevamente, incubándolos por 10 minutos en metanol. Posteriormente en una solución metanol: PBT 1X (PBS 1X y 0.1% Tween 20) 1:1; y nuevamente en PBT 1X con paraformaldehído al 4% 1X, por 20 minutos. Se eliminó la solución fijadora con 3 lavados en PBT 1x, por 10 minutos cada una.

Se procedió a preparar los embriones para el ingreso de la sonda, eliminando o disminuyendo la cantidad de proteínas asociadas a los mRNAs. Para ello se incubaron los embriones con proteinasa K a 50 U/ mL, en agitación a 300 rpm, por 3 minutos. Se inactivó la proteinasa K, lavando 2 veces con Glicina 2 mg/mL en PBT frío, por 5 minutos. Se lavaron nuevamente, con PBT 1x por 10 minutos dos veces y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBT 1X, por 20 minutos.

Se realizó un pretratamiento, previo a la hibridación con las sondas, lavando los embriones con PBT 1X por 10 minutos, 4 veces; y, posteriormente, con PBT: Buffer ISH (40% Formamida, 5 X SSC, 15 mM Heparina, 0.1% Tween 20 y 100 ug/mL DNA de esperma de salmón desnaturalizado), por 5 minutos y repitió nuevamente, pero solo con búfer ISH. Luego se incubaron a 45 C° por 3 h.

Al finalizar el pretratamiento, se realizó la hibridación, dividieron los embriones en dos tubos y se retiró el Buffer ISH. Se adicionó nuevamente Buffer ISH; agregando las sondas de hibridación (Forward o Reverse); previamente precalentadas por 3 min a 80 C° y enfriadas en hielo por 5 min. La hibridación con el Buffer ISH se realizó por 15 h a 57 C°.

La temperatura de alineación o T_m , del par de sondas, se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 0.72(\%formamida) \dots\dots\dots(Eq.1)$$

Al finalizar el tiempo de hibridación, se retiró el Buffer ISH y se lavó con Buffer ISH (sin DNA de esperma de salmón desnaturalizado), por 20 min a 57 C°. Se lavaron los embriones con un gradiente de ISH: PBT (4:1, 3:2, 2:3, 1:4 v/v), por 20 minutos, entre cada lavado, a 57 C°. Por último, se lavaron dos veces con PBT a T.A., por 20 minutos.

Para el rebelado de las sondas, se incubaron por 1 h a T.A con PBT con anti-biotina (1:2000), por 1 h; posteriormente, se lavaron 4 veces con PBT, por 20 minutos. Se lavaron 3 veces más con solución de detección (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris pH 9.5, 1 mM levamisol y 0.1% Tween 20), por 5 minutos cada uno; y por último, se colocaron los embriones en solución de revelado (NBT

y x-phosphate). Se mantuvieron cubiertos de la luz, revelándose a los a 1h y 15 min. Se observaron los embriones en microscopio óptico.

(Tautz *et al.* 1989; Fanz y Schifferstadt, 2008).

Elaboración de sondas para ISH

Se mandaron a sintetizar un par de oligonucleótidos complementarios entre sí; con la secuencia de río abajo del sitio de corte de la Histona H3, de 33 nt de longitud (Adamson y Price, 2003; Dominski *et al.*, 2002; Lanzotti *et al.*, 2002). Además, se adicionaron dos sitios de restricción, para *BamHI* y *EcoRI*, a los extremos de las secuencias (Figura 24, A y B).

Posteriormente, se procedió a la generación de las sondas de hibridación, a partir de los oligonucleótidos sintetizados; para ello se alinearon el par de oligonucleótidos entre sí, por medio de un gradiente de temperatura. Es decir, se tomaron 100 uM de cada oligonucleótido y se colocaron a 37 ° C por 30 minutos; posteriormente, se elevó la temperatura a 95 ° C por 5 minutos y se descendió hasta 25 ° C, a una velocidad de 5 °C/ min (Merck protocols)

Una vez alineados, se insertaron en el vector de clonación *pBluescript KSII +*, para su transcripción *in vitro* y generación de las secuencias. Para ello, se digirió el inserto y vector con las enzimas de restricción *EcoRI* (Roche) y *BamHI* (NEB); se purificaron, por el protocolo estándar de Fenol: Cloroformo, y se ligaron con T4 PNK DNA ligasa (NEB). Para tener una mayor cantidad de sondas en los ensayos de ISH, se hicieron transformaciones en células quimio competentes TOP10 y se sembrando las células transformadas en cajas con medio solido LB suplementadas con Ampicilina (150 ug/ mL); para así seleccionar las colonias con el inserto. Posteriormente, se aislaron y crecieron por 12h en medio liquido LB con Ampicilina (150 ug/mL). (Sambrook y Russell, 2001; Roche protocols; NEB protocolos; *pBluescript II Phagemid Vectors*, 2008). Se secuenciaron las colonias para verificar la presencia del inserto.

A partir de una de las colonias que presentaron el inserto, se procedió a la transcripción *in vitro* y generación de sondas. Primero se aisló el plásmido por medio de una mini preparación casera (miniPrep), luego se realizaron digestiones con *BamHI* o *EcoRI*, para linealizar el plásmido; purificándose por fenol: cloroformo. Posteriormente se realizó una transcripción *in vitro* utilizando las polimerasas T3 y T7, sonda sentido y antisentido, respectivamente; utilizaron DIG-UTPs durante la transcripción (Figura 24, C) (Sambrook y Russell, 2001; *pBluescript II Phagemid Vectors*, 2008). Al finaliza, se purificaron las sondas por kit de NucAway Spin Columns (Invitrogen) y se verificó el marcaje de la sonda por Dot Blot; para conocer la concentración a emplear en los experimentos de ISH. El Dot Blot se hizo a concentraciones de 100, 10,1, 0.1, 0.01 pmol/uL. Obteniendo un marcaje a una concentración de 100 y 10 pmol/uL (Rapley y Manning; 1998).

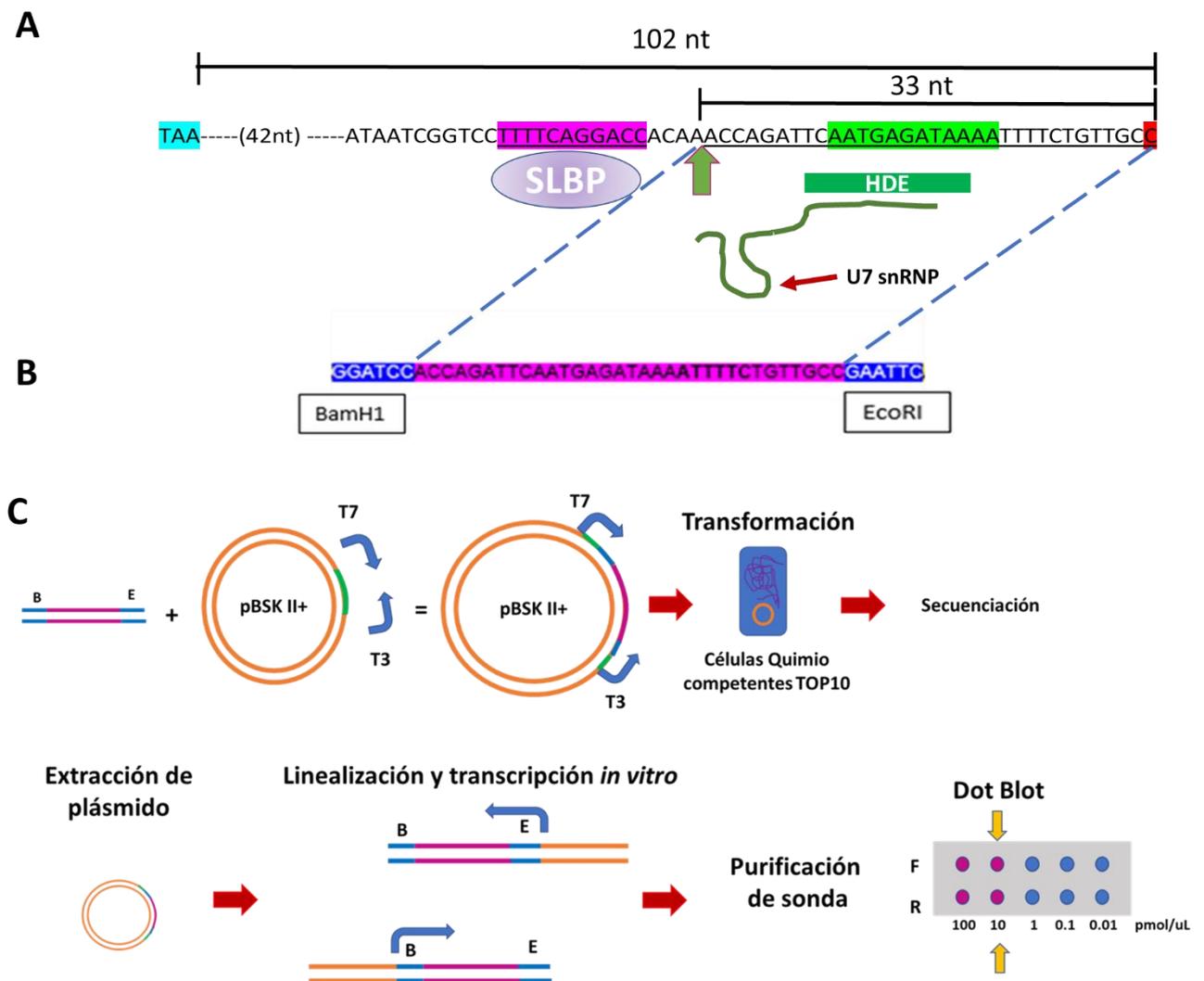


Figura 25. A) Esquema de región 3' UTR del pre- mRNA de la Histona H3; se macar los 33 nt posteriores al sitio de procesamiento, subrayados. Con una flecha se señala el sitio de corte; en color morado el sitio de unión de SLBP, verde el de U7 snRNP y en rojo el último nucleótido transcrito. B) Sonda diseñada para los 33 nt posteriores al sitio de corte; se colocaron en los extremos sitios de restricción para BamHI y EcoRI. C) Esquema de elaboración de sondas para ISH; las flechas amarillas denotan concentraciones de sondas usadas en ensayos ISH.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT- PCR)

Para asegurar la precisión en cuanto a los mRNA amplificados, se procedió a la realización de un RT-PCR oligo específico. Para ello se extrajo el RNA de embriones colectados, previamente decorionados a diferentes tiempos (3 h, 90 y 60 min); únicamente se trataron con colchicina los embriones colectados a 90

min. La extracción de RNA se realizó por Trizol, de acuerdo al protocolo de la compañía (**Invitrogen**).

A partir del RNA aislado en los embriones, se comenzó con el RT-PCR oligo específico; utilizando dos conjuntos de *primers* reverso; uno que amplificaba el pre- mRNA de H3, alineándose a lo últimos 25 nt del transcrito (río abajo del sitio de procesamiento): GCAACAGAAAATTTTATCTCATTGA. Utilizaron las mismas cantidades de RNA para la síntesis del DNA complementario (cDNA) (1ug). El otro primer usado fue RP49, mRNA ribosomal, como C- experimental. Para la síntesis de cDNA se realizó por una transcripción reversa, utilizando la transcriptasa reversa MVL-V (Invitrogen). Posteriormente, se realizó un PCR a partir del cDNA obtenido; utilizando un conjunto de primers que amplifican 140 pb del pre- mRNA de H3 sentido: ATCCAGTTAGCGCGACGCATTC; antisentido: GCAACAGAAAATTTTATCTCATTGA, (Figura 26); de igual manera se amplificó para RP49 sentido: TCAAGATGACCATCCGCCCA.; Antisentido: GTTCTCTTGAGAACGCAGGC.

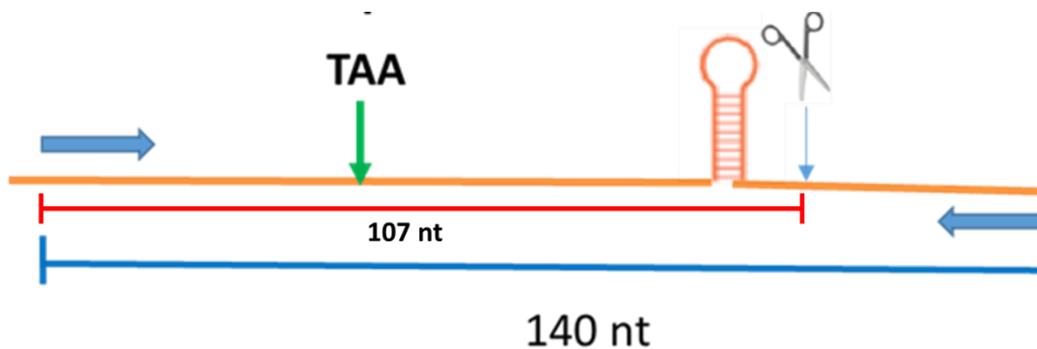


Figura 26. Esquema del sitio de unión de *primers*, que amplifican a partir del cDNA del pre- mRNA de H3. En azul de marca el tamaño del amplicón, 140 pb; las flechas azules indican los primers. Las tijeras esquematizan el sitio de procesamiento de los transcritos maduros. En rojo se marca el tamaño del amplicón del cDNA obtenido, del transcrito maduro; el cual no es amplificado al no ser reconocido durante la síntesis del cDNA, ya que se utiliza el primer en 3' para la obtención del cDNA de H3. En negro, se marca la distancia entre el TAA y el último nucleótido del transcrito no procesado.

Selección y tinción de embriones

Con objetivo de identificar de los embriones previos a la MBT, así como los detenidos en mitosis; los embriones se colectaron a 1 h 30 min de desarrollo. Posterior a ser decorionados y fijados, se seleccionaron con un microscopio estereoscópico, manteniéndolos siempre hidratados y en frío. Se utilizaron los criterios de **Chen et al., (2013)** para la selección de embriones (Figura 25). Además, para verificar que los embriones seleccionados para los experimentos se encontrasen en el tiempo de desarrollo deseado, se realizaron tinciones con

DAPI (Roche), para visualizar los núcleos; para los embriones con y sin tratamiento de colchicina. El tamaño de las alícuotas tomadas para su tinción en DAPI, fue del 2% del total de embriones empleados para cada experimento (ChIP y RT-PCR). Los embriones teñidos se observaron por microscopía de epifluorescencia (Figura 27).

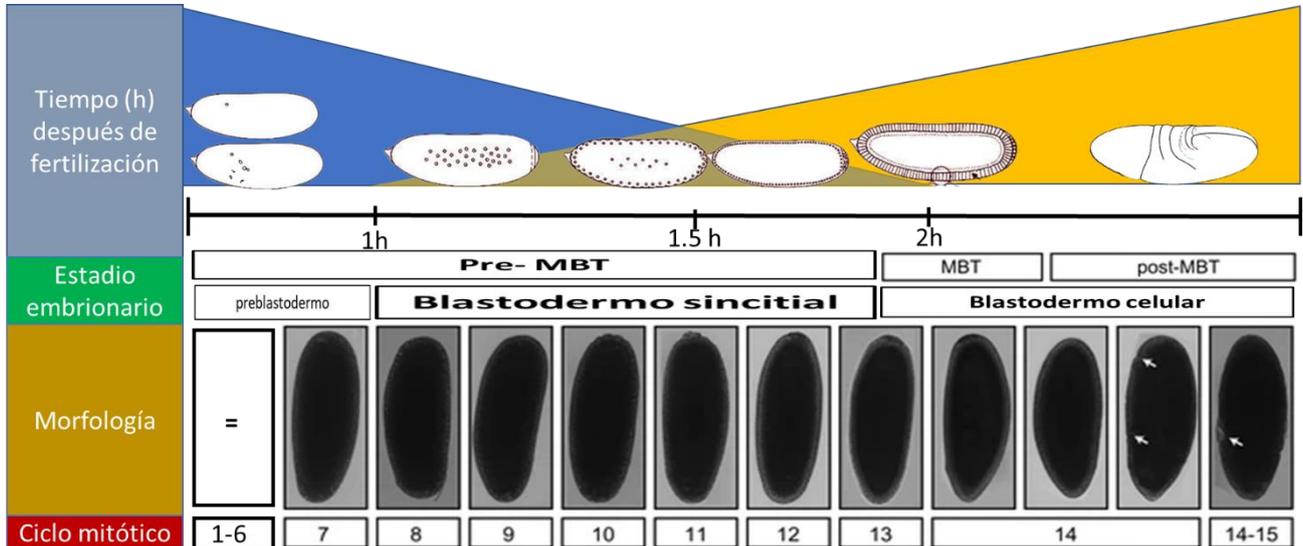


Figura 27. Esquema donde se muestran las diferencias morfológicas presentes en el desarrollo temprano de *Drosophila melanogaster*, con respecto al tiempo. En la parte superior se colocan dibujos de la morfología general en cada estadio correspondiente; en la parte inferior se pone visualización de embriones, en microscopía óptica, además se coloca el ciclo mitótico al cual corresponde cada embrión.

Análisis Estadísticos

Se realizó una ANOVA unifactorial para analizar los datos obtenidos en los RT-PCR y en las distintas fases del ciclo celular; en los embriones tratados con y sin colchicina; se utilizó un $\alpha=0.05$. Posteriormente se realizó un análisis de LSD con $\alpha=0.05$.

Para la cuantificación y análisis de los geles, se realizaron densitometrías utilizando el programa Image J; en los ensayos de ChIP y RT-PCR.

Se realizó una prueba de T de Student utilizando un $\alpha=0.05$ para el análisis de los resultados obtenidos en los ensayos de ChIP.

Resultados y Discusión

Con objeto de corroborar los estadios del desarrollo, de los embriones colectados y utilizados durante los experimentos; posterior a su selección morfológica por microscopía estereoscópica, se procedió a la tinción con DAPI del 2% de los embriones utilizados en los experimentos (Figura 28).

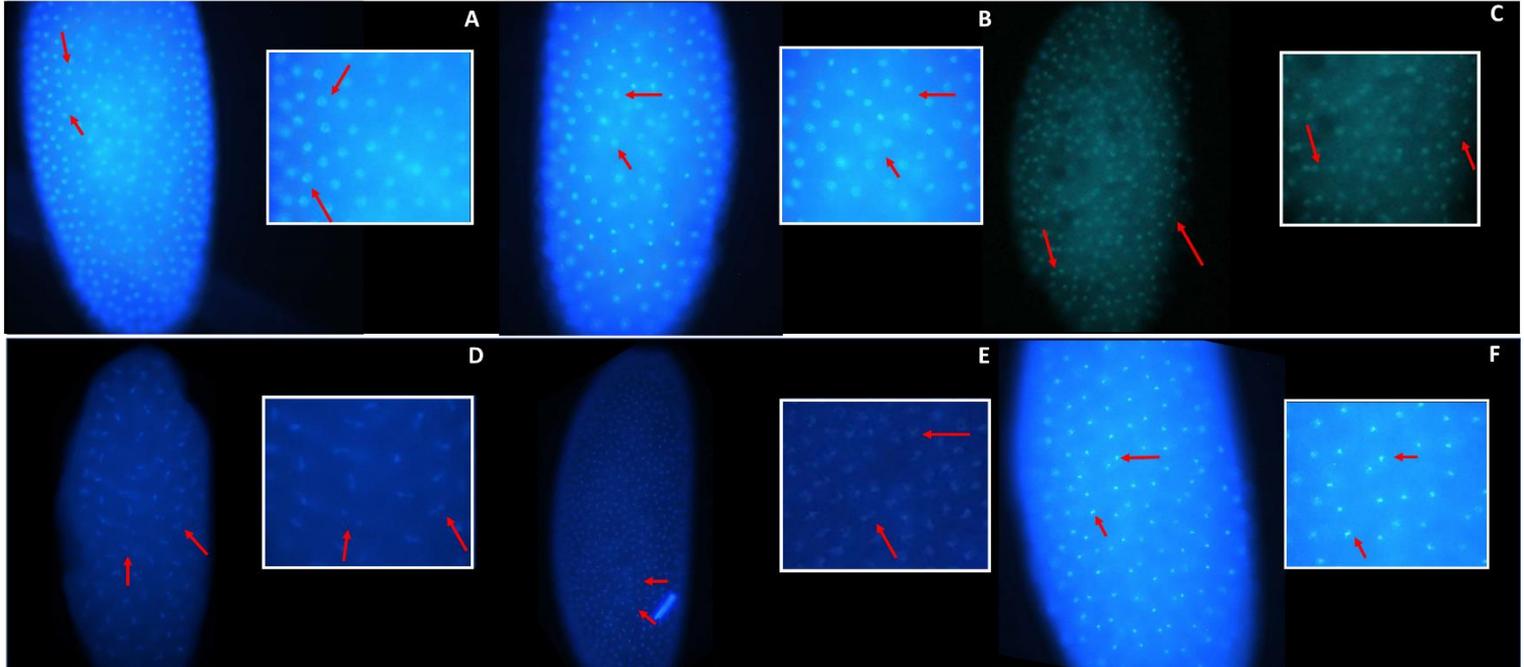


Figura 28. Núcleos de embriones de *Drosophila melanogaster*, previos a la MBT, teñidos con DAPI; sin colchicina (A, B y C) y con colchicina (500 μ M) (D, E y F). A la derecha de cada micrografía se muestran acercamiento a los núcleos de cada embrión.

En las micrografías se puede observar al DNA teñido, de los núcleos en cada embrión, que, de acuerdo al número y morfología, corresponden a embriones en pre-MBT, entre los ciclos nucleares ~10 al 12 (Tram *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2013). Para el caso de los embriones tratados con la colchicina, se pueden observar formas alargadas y condensadas, correspondientes a los cromosomas en mitosis, alineados en el ecuador de los núcleos. Eso se debe a que la colchicina inhibe la polimerización de los microtúbulos y, por tanto, el ensamblaje del huso mitótico. Para que la mitosis continúe, es necesaria la correcta formación del huso mitótico, al no estar ensamblado, APC/C no se activa; evitando la separación de los cromosomas y permaneciendo en mitosis (Lodish, *et al.*, 2000). Al mismo tiempo se observaron algunos embriones con núcleos en profase tardía y anafase (Figura 28, D y F).

A partir de los resultados obtenidos, producto de las tinciones con DAPI, y con objeto de precisar en el estadio del ciclo celular enriquecido en las poblaciones

embrionarias colectadas, tratados con / sin colchicina; se realizó un conteo de los ciclos celulares en los embriones (Figura 29).

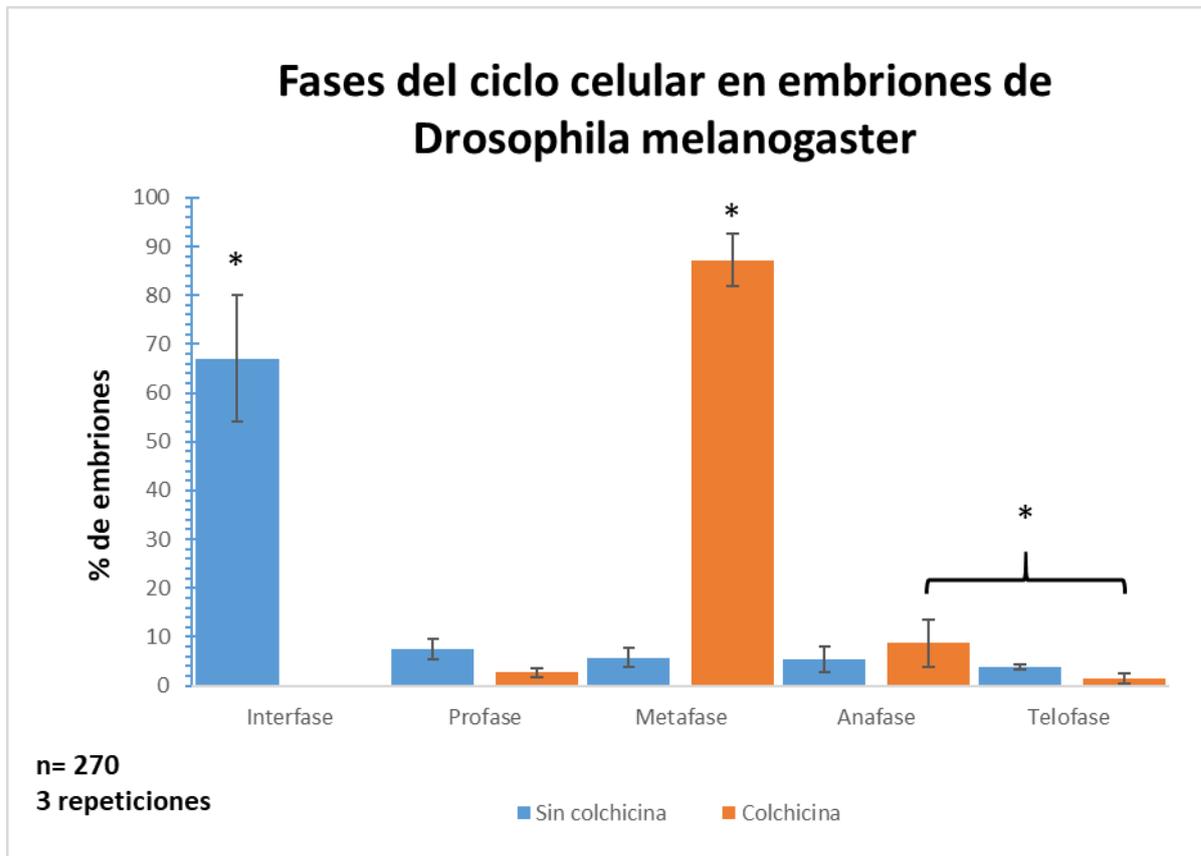


Figura 29. Porcentaje de embriones en interfase o mitosis, tratados con o sin Colchicina 500 μ M, por triplicado. El asterisco (*) marca las diferencias significativas, donde $P < 0.05$.

Los embriones sin tratamiento de Colchicina, presentaron un enriquecimiento en interfase ($P < 0.05$), con cantidades mínimas de embriones en mitosis. Para el caso de los embriones tratados con Colchicina, la mayor parte de la población de embriones se mantuvo en Metafase ($P < 0.05$). Además, se observaron algunos embriones en otros estadios de la mitosis (Profase, Anafase y Telofase), sin embriones en Interfase.

Tras haber determinado el estadio del ciclo celular, enriquecido en las poblaciones colectadas de embriones, tratados con y sin colchicina, se procedió a abarcar el primero objetivo del presente estudio. Para ello, se comenzó determinando algunas de las condiciones a utilizar en el ChIP, comenzando con el número de ciclos de sonicación. En su conjunto se probaron tres: 20, 25 y 30 ciclos. La cromatina fragmentada se observó en un gel de agarosa al 2% (Figura 30).

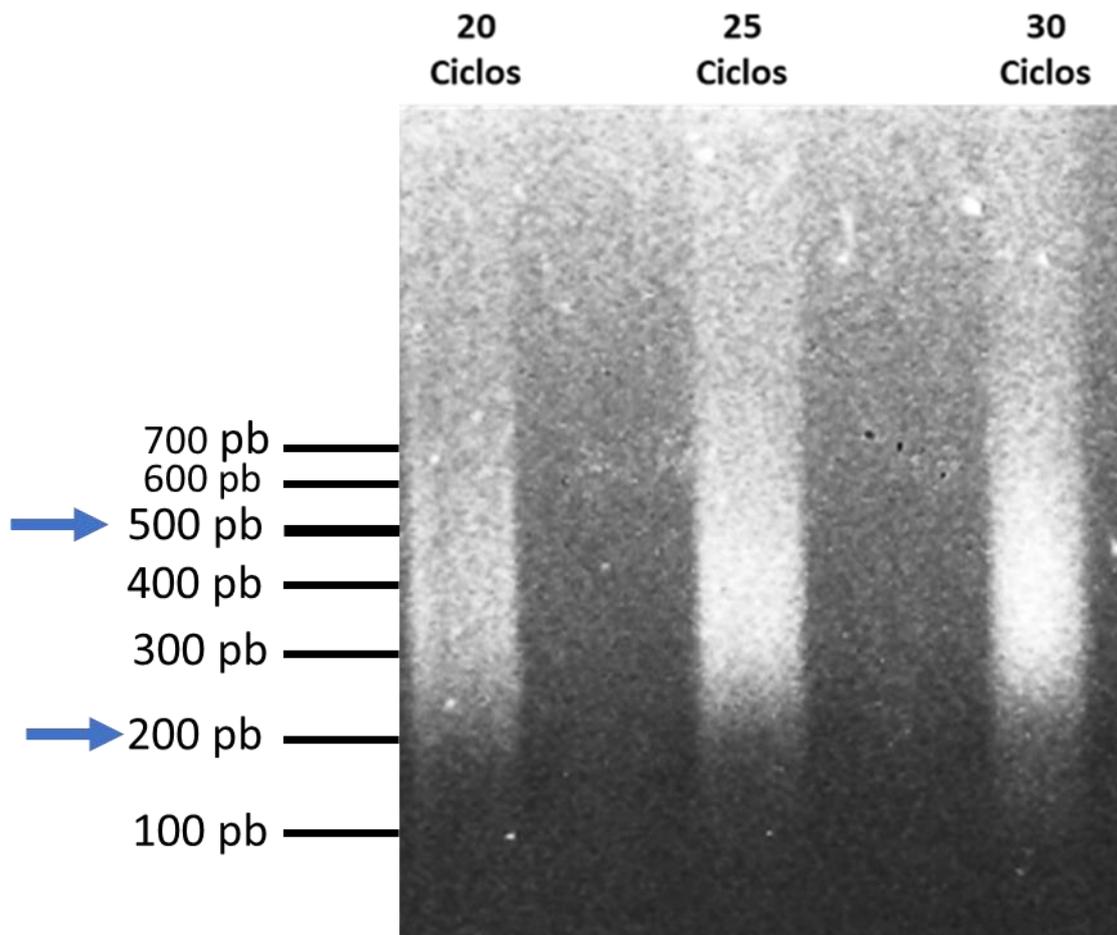


Figura 30. Barrido de cromatina fragmentada en 20, 25 y 30 ciclos de sonicación, gel de agarosa al 2%. Las flechas a azules indican el tamaño esperado del barrido.

Se observó un barrido, producto de la fragmentación de la cromatina entre 700 y 150 pb; siendo mayormente enriquecida la porción de 500 a 200 pb, en 30 ciclos de sonicación. El tamaño de los fragmentos depende de la longitud en pares de bases de la región en interés y del sitio que abarca la proteína con el DNA. Debido a que las regiones de interés, los promotores de H3 y H4, tienen una extensión de 120 y 92 pb, respectivamente, y el tamaño óptimo de fragmentación para ChIP- PCR está entre los 1000 a 200 pb, se determinó que la cromatina fragmentada a 30 ciclos de sonicación sería la óptima a utilizar en los ChIPs.

Subsecuentemente, se procedió a la estandarización de la concentración de anticuerpo a utilizar en los ChIPs partiendo de la cromatina fragmentada a 30 ciclos de sonicación. Se verificó es estado de la cromatina, antes y después de su fragmentación (Figura 31), así como la concentración de cromatina obtenida (17.6 ug/ uL), todo a partir de una alícuota del 2.5 % del total.

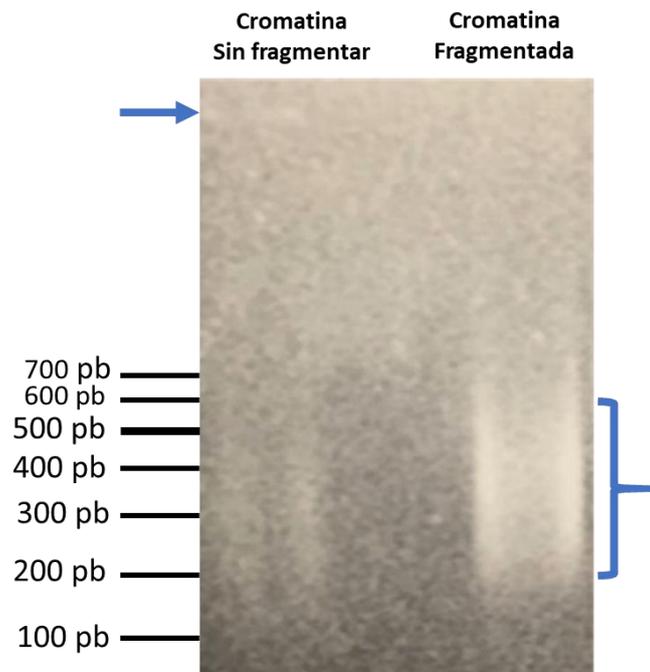


Figura 31. Estado de la cromatina antes y después de su fragmentación a 30 ciclos de sonido. La flecha indica la banda de alto peso molecular, en la parte superior del gel de agarosa 2%; a la derecha se marca la región mayormente de cromatina, del producto de sonicado.

Se utilizó un total de 7.5 ug de anticuerpo contra el CTD de RNA Pol II; como Control negativo dentro del experimento, se utilizó un anticuerpo irrelevante anti-IgG (7.5 ug). Al finalizar, se cuantificó en nanoDrop, concentración de DNA obtenido (Tabla 1).

	[ug/ uL]
Input	31.7
Mock	0.0980
IP	0.190

Tabla 1. Concentración de DNA obtenido en ChIP en ug/uL, a partir de 7.5 ug de anticuerpo anti- RNA Pol II. Se muestra el Input (10% de la cromatina, previo a la IP; C+), Mock (anti-IgG; C-) e IP (anti-RNA Pol II). Se utilizó 1uL por muestra, para cada cuantificación.

Posteriormente se realizaron experimentos de PCR, amplificando los promotores de las histonas H3 y H4, obtenidos a partir de la cromátida del ChIP (Figura 32).

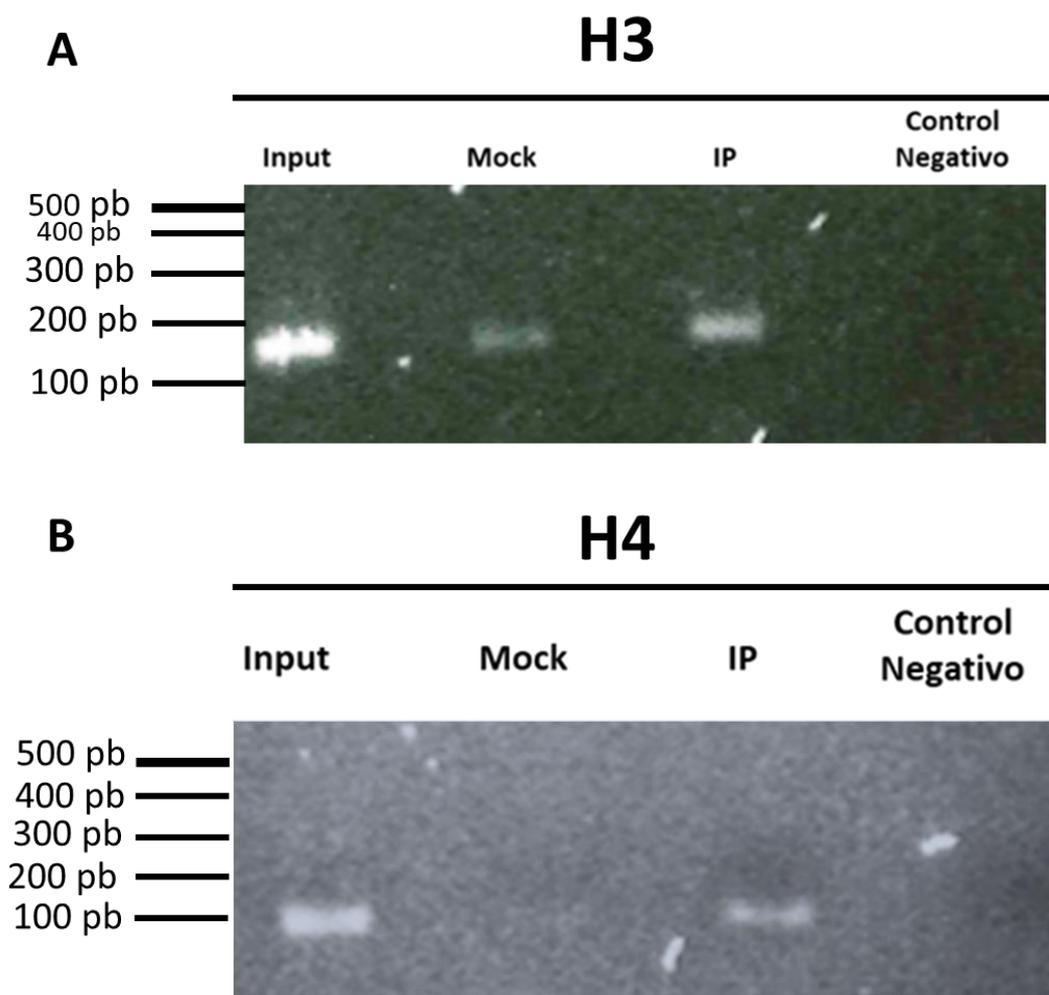
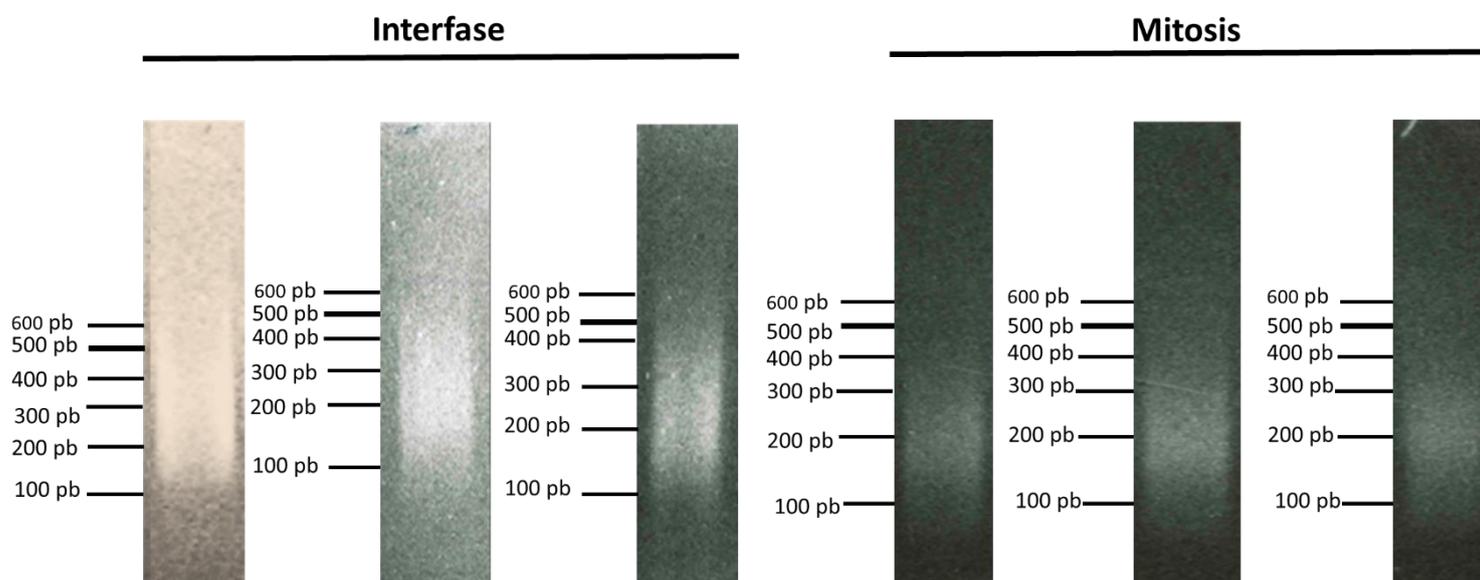


Figura 32. PCRs punto final, a partir de DNA obtenido en ensayo de ChIP, contra la RNA Pol II. Se amplificaron las secuencias del promotor de histona H3 (**A**) y H4 (**B**) de embriones en interfase. El *input* corresponde al 10% del total de la cromatina a partir de la cual se realizaron los ensayos de ChIP. El Mock es el control negativo dentro del ChIP, IgG irrelevante, y la Inmunoprecipitación (IP) contra RNA Pol II. Como control negativo, la PCR se utilizó muestra sin DNA.

Se observó producto de PCR tanto en el Input, C+, como en la IP, contra la RNA Pol II. Para caso del C- experimental (Mock), no amplificó para H4, pero si para H3 (Figura 32); sin embargo, el producto de PCR fue menor, con respecto al Input e IP, por lo que se consideró que la concentración de anticuerpo empleado fue la adecuada.

Una vez determinadas las condiciones a emplear en los ensayos de ChIP (Figuras 30- 32), se procedió a la realización de los experimentos. Para ello, se partieron de embriones enriquecido en interfase y mitosis (Materiales y Métodos: ChIP; Figura 27). Se verificó la fragmentación de la cromatina, tomando una alícuota del 2.5 % del total de cromatina obtenida, y se corrieron en un gel de agarosa al 2% (Figura 33).

Además, con objeto de verificar una vez más, el estadio embrionario y ciclo celular, en la población de embriones utilizadas en los experimentos; se tomaron alícuotas y se tiñeron con DAPI, para observarlas por microscopía de fluorescencia. Las muestras tomadas para observación fueron de 5 μ L de embriones, correspondiente al 2% del total d embriones empleados para cada ChIP (Figura 1, Anexos).



Figuras 33. Cromatina fragmentada, en triplicado, usada para ensayos de ChIPs; a partir de embriones tratados con y sin colchicina. Las muestras corridas, en gel de agarosa al 2%, corresponden al 2.5% del total de cromatina obtenida en cada experimento.

Todas las muestras utilizadas en los ensayos de ChIP presentaron fragmentos de entre ~500 a 200 pb (Figura 33), por lo que se prosiguió con las IP y los ensayos de PCR, a partir de la cromatina inmunoprecipitada. Se amplificaron las secuencias del promotor de H3 y H4; se utilizó como C- al pre-rRNA, debido a que en este conjunto de genes, no se une RNA Pol II para su transcripción sino RNA Pol I y de igual manera, se encuentra en multicopia (Figuras. 24, 34- 37).

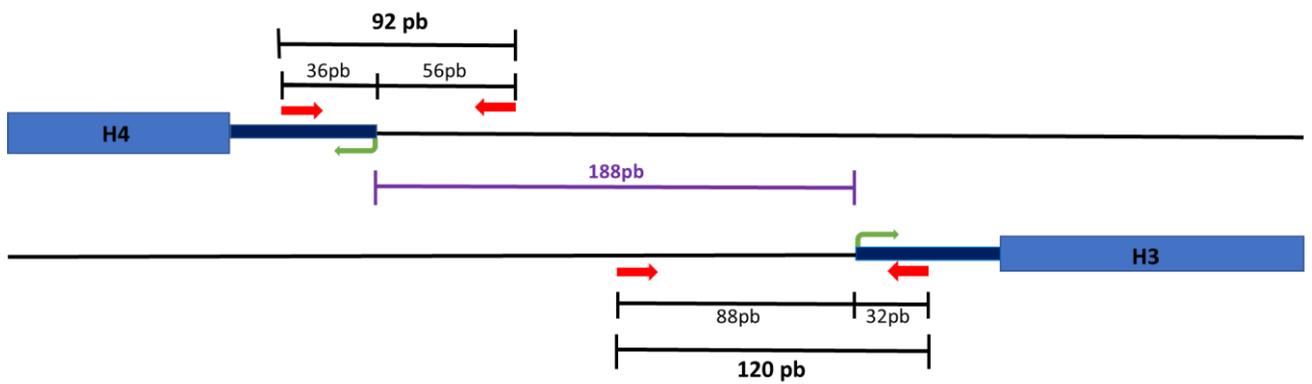


Figura 34. Esquema del tamaño y regiones que amplifican los dos pares de *primers* (flechas rojas), para promotores de Histonas H3 y H4. En morado se marca la región intergénica entre H4-H3; con flechas rojas se marca el sitio de unión de primers sentido y antisentido, de H3 y H4, con el tamaño de sus respectivos amplicones. Las flechas verdes indican el sentido de la transcripción para cada gen; las cajas azul claro representan la región traducible de ambas histonas y las cajas azul oscuro los 5' UTR de ambos genes.

ChIP RNAP II del promotor H3

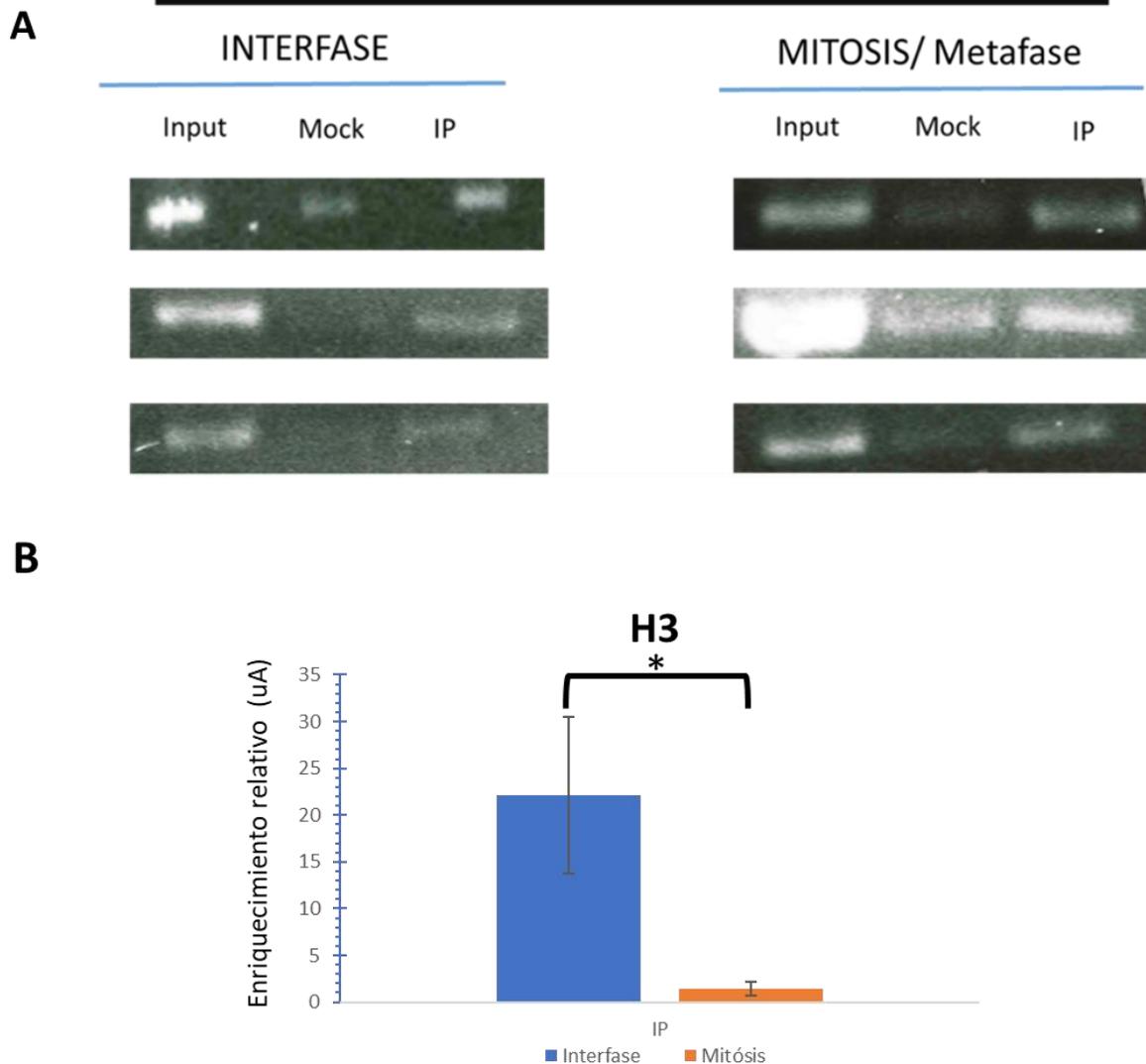
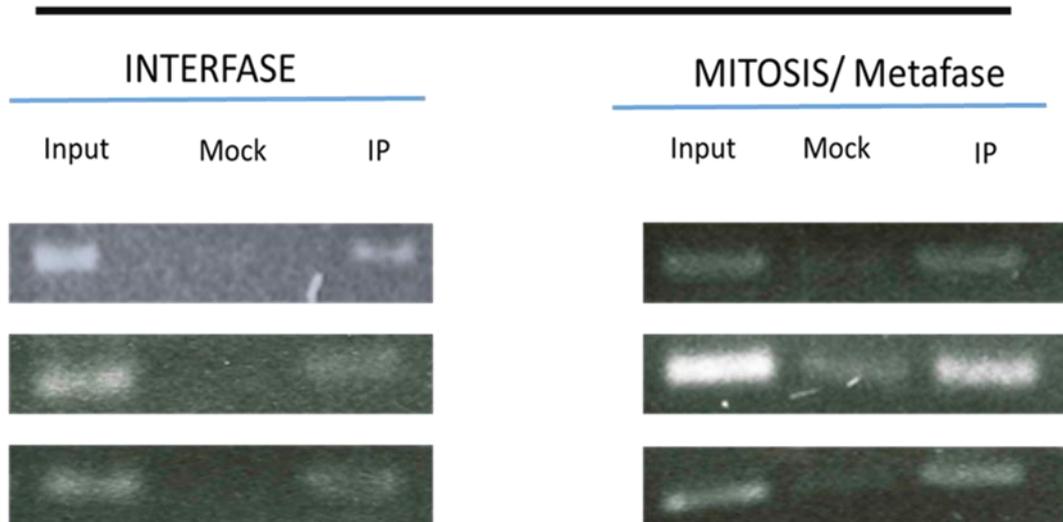


Figura 35. A) Ensayos de PCR, a partir del DNA inmunoprecipitado por ChIP; por triplicado. El producto del amplicon observado en A, corresponde a la región promotora de la histona H3 en embriones en interfase y mitosis (tratados colchicina). El *input* es el 10% del total de la cromatina a partir de la cual se realizaron los ensayos de ChIP. El Mock, control negativo dentro del ChIP (anticuerpo irrelevante IgG) y el carril IP corresponde a la Inmunoprecipitación contra la RNA Pol II. B) Expresión relativa de amplicones de H3, normalizado con respecto al Mock; unidades Arbitrarias (uA); asterisco (*) denota diferencias significativas ($P < 0.05$).

ChIP RNAP II del promotor H4

A



B

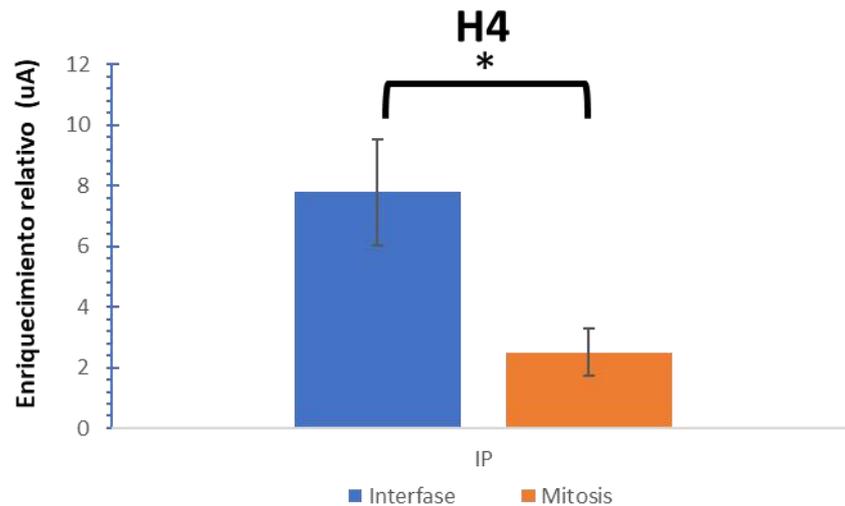


Figura 36. Figura 31. A) Ensayos de PCR, a partir del DNA inmunoprecipitado por ChIP; por triplicado. El producto del amplicon observado en A, corresponde a la región promotora de la histona H4 en embriones en interfase y mitosis (tratados colchicina). El *input* es el 10% del total de la cromatina a partir de la cual se realizaron los ensayos de ChIP. El Mock, control negativo dentro del ChIP, IgG irrelevante, y la Inmunoprecipitación (IP) contra la RNA Pol II. B) Expresión relativa de amplicones de H4, normalizado con respecto al Mock; unidades Arbitrarias (uA); asterisco (*) denota diferencias significativas ($P < 0.05$).

ChIP RNAPII

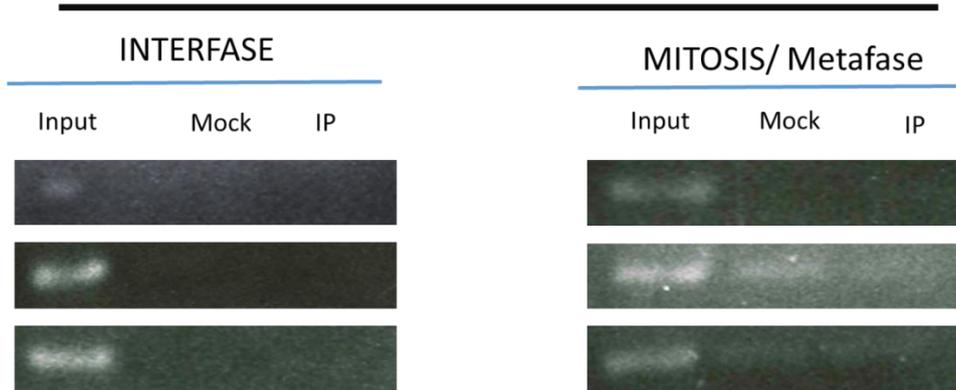


Figura 37. PCR que amplifica la región pre-rRNA en muestras del ChIP contra RNA Pol II de embriones en interfase y mitosis, con sus respectivas repeticiones. El *input* es el 10% del total de la cromatina a partir de la cual se realizaron los ensayos de ChIP. El Mock es el control negativo dentro del ChIP, con un anticuerpo IgG irrelevante, y la inmunoprecipitación (IP) contra la RNA Pol II.

En los productos de PCR, correspondientes a los promotores de H3 y H4, se presentaron bandas enriquecidas tanto en nuestro Control positivo experimental como en las IP, a partir de las muestras de embriones en interfase y mitóticos. A pesar de la presencia, en algunas muestras, de ligeras bandas en los carriles del Mock, su enriquecimiento fue menor con respecto al Input y a la IP; por consiguiente, se mantiene la validez de los resultados obtenidos. Además, la nula amplificación de los primers, en la secuencia del pre-rRNA, valida la especificidad y veracidad de las inmunoprecipitaciones de RNA Pol II, en las regiones amplificadas de los promotores de las Histonas H3 y H4. No obstante, nos percatamos de ligeras bandas en el Mock e IP, para algunas repeticiones del pre-rRNA; sin embargo, el enriquecimiento entre ellas, fue de la misma intensidad, por lo que no corresponden a sitios de unión específicos, comportándose aún como C-. Hay que recordar RNA Pol II no transcribe este conjunto de genes (pre-rRNA), por lo que no se une a sus promotores, de ello se encarga RNA Pol I (**PilsI et al. 2016**); además, el epítipo reconocido por el anticuerpo, el CTD, está ausente en las otras polimerasas (**Hsin y Manley, 2012**).

Con objetivo de tener un parámetro comparativo, en entre resultados obtenidos en las IP de los embriones en Interfase y Mitóticos, se realizaron densitometría de las bandas obtenidas en los geles de PCR; los resultados obtenidos se normalizaron respecto al Mock y se graficaron (Figura 35, B; 36, B; Metodología). Se observó una clara tendencia a la baja en las secuencias de unión de RNA Pol II, entre los embriones en interfase y mitóticos; a pesar de estar en repetidos en el genoma de *Drosophila melanogaster*.

Los resultados obtenidos hasta el momento, nos denotan que RNA Pol II se encuentra sobre la región promotora de las histonas H3 y H4, durante la interfase y mitosis en los embriones pre- MBT. Esto sugiere que muy probablemente los demás FGT (TFIIB, TFIIA, TFIID (TBP y TAF's) y TFIIIF) estén presentes, debido

a que son necesarios para el reconocimiento del promotor y estabilización del complejo de PIC (**Sainsbury, 2015**).

Dentro de los FGT que participan en la biogénesis de las histonas, están TBP y las TAF's, Las regiones promotoras del clúster de H3-H4 y H2A-H2B, son reconocidas por TBP, mientras que H1 requiere a TRF2, componente de las TAF's (**Juven et al., 2008; Marzluff y Koreski, 2017**).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son reforzados por estudios elaborados por **Chen et al. (2002)**, donde demostraron la presencia de TBP y las TAF's en los cromosomas durante la mitosis, presentando una actividad de Bookmarking. Al mismo tiempo, determinaron que la unión de TBP es específica a ciertos genes (como H4 y rDNA), y no se da de forma arbitraria. También evaluaron la cinética de TBP durante la mitosis, donde la fracción unida a los cromosomas se mantenía estable, a diferencia de la interfase, donde presentaba un mayor movimiento. Por lo que la unión de TBP al DNA se da durante la interfase y no cambia durante la mitosis. Además, experimentos más recientes de **Teves et al., (2018)**, también mostraron a TBP unida a los cromosomas durante la mitosis y que promueve el reclutamiento de RNA Pol II; sin embargo, este proceso no siempre es así, pues observaron procesos de transcripción durante la interfase, en ausencia de TBP. Además, determinaron la fracción unida de TBP en interfase y mitosis, siendo mayor en esta última.

Teniendo en cuenta los estudios anteriores, abre la posibilidad de que la unión de RNA Pol II, no solo se encuentre restringida a los genes de las histonas, durante la embriogénesis temprana de *Drosophila melanogaster*, debido a que, se ha observado la presencia de TBP y las TAF's en otro conjunto de genes. Además, podría explicarnos que, la baja concentración de RNA Pol II unida a los promotores de H3 y H4 durante la mitosis (Figuras 35 y 36), pueda deberse a una reducción en la fracción unida de TBP o incluso su ausencia, lo que conllevaría a que la unión de RNA Pol II sea ineficiente.

De acuerdo a los experimentos desarrollados por **Xing et al. (2008)**, TBP interacciona con PP2A durante la mitosis, la cual fosforila a la subunidad CAP-G, de la Condensina, impidiendo la condensación de la cromatina sobre los promotores a los que TBP esta unido en la mitosis. Cabe mencionar que tanto CAP-G y PP2A están presentes a partir del estadio embrionario numero 2 (ciclos nucleares 4 al 9) de *Drosophila melanogaster*. Esta observación concuerda con, ensayos de ATAC- seq realizados por **Blythe y Wieschaus (2016)**, en embriones de *Drosophila melanogaster* previos a MBT. Existen regiones en la cromatina lo suficientemente laxas y accesibles, asociadas a *enhancers*, promotores y *silencers* a partir del ciclo nuclear 11, incluso, muchas de estas se mantienen abiertas durante la mitosis. Estas regiones específicas son reconocidas por ZLD y GAF.

A partir de esto, vemos que la presencia de RNA Pol II en los cromosomas durante la mitosis, probablemente se dé gracias de presencia las regiones laxas y accesibles, mantenidas por TBP. Al mismo tiempo, la presencia de RNA Pol II no es estocástica, pues estas regiones de alta accesibilidad están asociadas a

sitios de unión a ZLD, factor pionero durante la primera ola de transcripción de los genes cigóticos. Para el caso específico de los genes de las histonas, ZLD también participa en su transcripción en conjunto con el factor transcripcional CLAMP, el cual se une al promotor de H4-H3. La unión de CLAMP permite la formación de los HLB, iniciando su formación desde el ciclo nuclear 10 y con ello, la transcripción del clúster de las histonas (entre los ciclos nucleares 11 y 12) **(Rieder et al., 2017)**.

Esto corrobora los datos obtenidos por **Cruz et al. (2018)**, donde se observó la colocalización de componentes de TFIIH sobre gránulos de cromatina laxa, asociados a HLB, donde también colocalizó con la RNA Pol II con Ser5P en el CTD durante la mitosis. Debido a que esta marca de fosforilación en RNA Pol II corresponde a una marca de inicio de la transcripción, colocada por CDK7 **(Ping y Manley, 2012)**, se exploró la posibilidad de que fuese transcripcionalmente activa.

Para abarcar el segundo objetivo del presente proyecto, se procedió a la elaboración de sondas para ISH, contra el pre- mRNA de la histona H3. Las sondas elaboradas abarcan una extensión total de 33 n; hibridando río abajo del sitio de procesamiento del pre-mRNA (Figura. 25, Metodología).

Para tener certeza del correcto marcaje de la sonda, se realizaron ISH en embriones celularizados, ya que este tipo de embriones presentan una fase S más larga, momento del ciclo celular donde normalmente se lleva a cabo la biogénesis de las histonas canónicas (Figura 34, B y C). Además, como control negativo, se utilizaron embriones inferiores al ciclo nuclear 9, donde aún no ha iniciado la transcripción de las histonas canónicas (Figura 38, D). Al mismo tiempo, se utilizó como control interno dentro de nuestro experimento una sonda sentido, la cual no hibrida con nuestro blanco: el pre- mRNA de H3 (Figura 39).

ISH de embriones de *Drosophila melanogaster* con sonda de hibridación

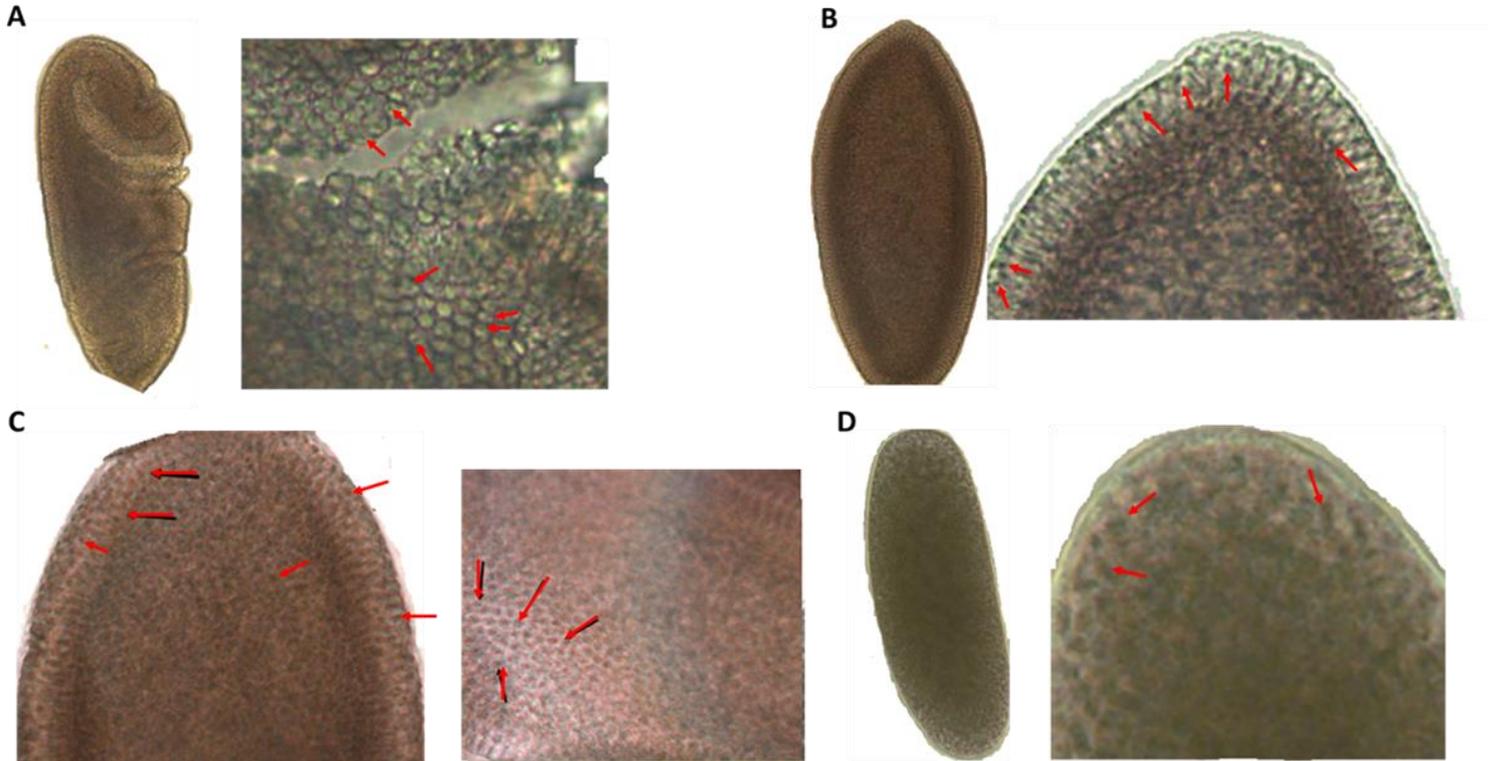


Figura 38. Micrografías de embriones de *Drosophila melanogaster* en microscopio óptico de campo claro, sometidos a ISH, con sonda antisentido, contra el pre-mRNA de H3. A la derecha de cada embrión se muestra aumento del mismo. A) embrión gastrulado B y C) Embriones celularizados. D) Embrión temprano, ciclo nuclear ~ 9-10. Con flechas rojas se señalan algunos de los puntos de la señal de la sonda.

ISH de embriones de *Drosophila melanogaster* con sonda sentido (C-)

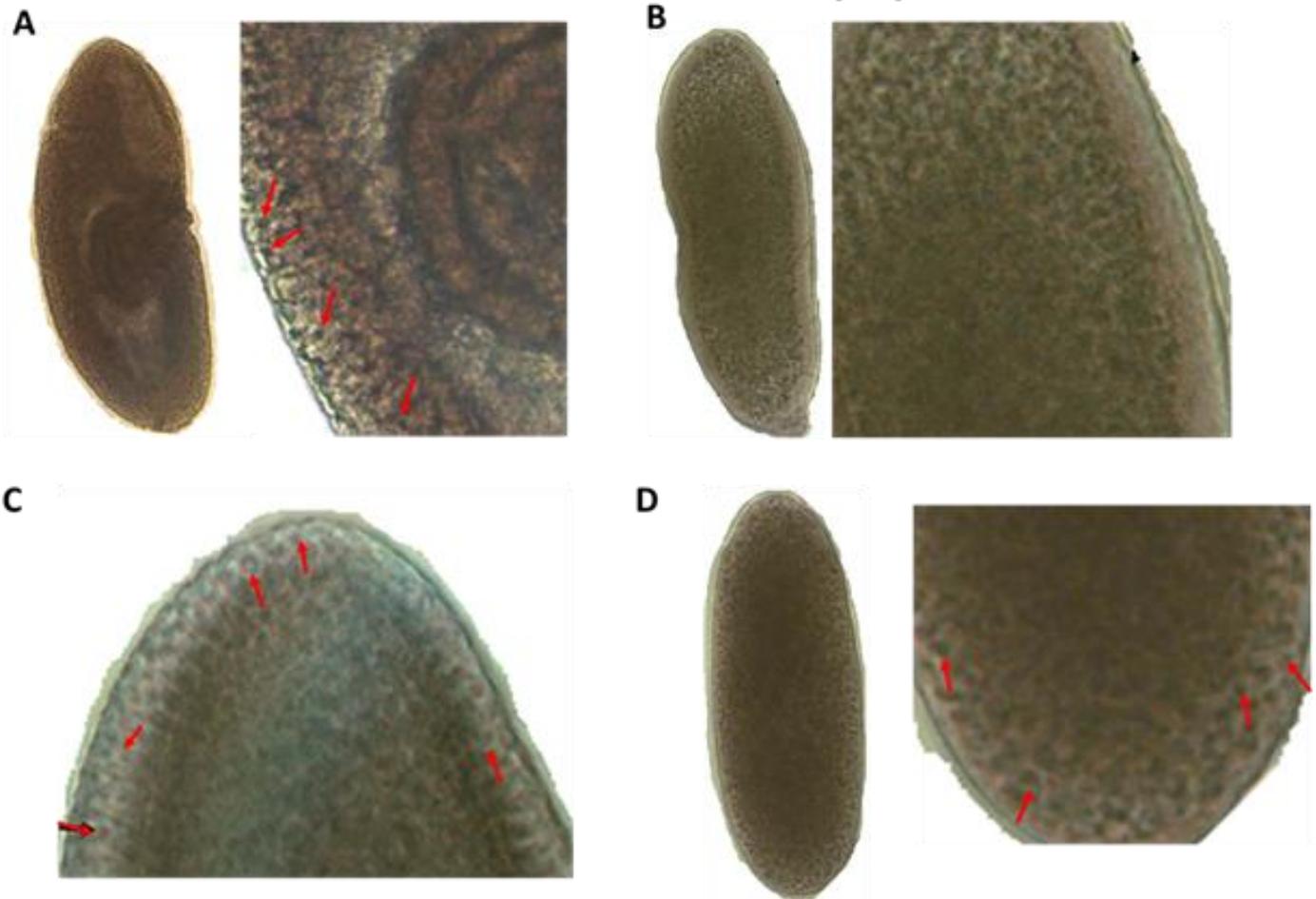


Figura 39. Micrografías de embriones de *Drosophila melanogaster* en microscopio óptico de campo claro, sometidos a ISH, con sonda sentido contra el pre-mRNA de H3. A la derecha de cada embrión se muestra aumento del mismo. A) embrión gastrulado B y C) Embriones celularizados. Para B se observa en la periferia del embrión nula presencia de la sonda, para C si se observa. D) Embrión temprano, ciclo nuclear ~9-10. Con flechas rojas se señalan algunos de los puntos de la señal de la sonda.

Tras la realización de las ISH y comparar los resultados obtenidos, tras las hibridaciones con las sondas sentido y antisentido contra el pre-mRNA de H3 (Figuras 38 y 39), se observó señal con ambas sonadas. Aunque, en la sonda sentido no se observó señal en la periferia de algunos embriones, en otros si se observó (Figura 35. B y C). Cabe señalar que la sonda sentido no presenta sitio de hibridación, ya que no existe mRNA al cual unirse, por lo que la presencia de la señal inespecífica probablemente se deba a otras razones. Además, se observó señal de ambas sondas en embriones en ciclos nucleares < 10. A partir de estos experimentos no se pudo verificar la veracidad del marcaje de la sonda antisentido y por lo tanto de transcritos *de novo*.

La presencia de la señal inespecífica de las sondas puede deberse a una sobre fijación del tejido, lo que al momento de revelarse con NBT / BCIP (agente revelador), resulta en una tinción generalizada de todo el tejido (MERCK Protocols). Otra causa podría ser una sobreexposición al NBT/ BCIP, al rebelarse las sondas (de 1 h 15 min); tiempo de rebelado determinado con relación al marcaje observado durante el Dot Blot. También pudiera ser necesaria una menor concentración de sonda (utilizada 10 pmol/uL), para así reducir el fondo de inespecificidad. Otro aspecto importante a considerar, es el aumentar el tiempo de exposición con proteinasa K, lo que ayudaría a la degradación de proteínas y, por lo tanto, evitaría la adhesión de las sondas a cúmulos de proteínas, dificultando su hibridación al unirse inespecíficamente a estas (**Yang et al., 1999; Fanz y Schifferstadt, 2008**).

Debido a la inespecificidad de la señal, a partir de los resultados obtenidos en las ISH, se procedió a la realización de ensayos de RT-PCR, al ser una técnica más sensible que el ISH. Para ello se desarrollaron *primers* que amplifican un segmento del pre-mRNA de H3 (Figura 24); se utilizó como control a RP49, para verificar que el RNA utilizado para la realización del cDNA no estuviera contaminado con DNA genómico (Figura 3, Anexos). Pasa así poder amplificar únicamente los mRNA cigóticos y *de novo*, respecto a los depositados maternamente; ya que su transcripción esta desde etapas tempranas del desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* (**Ding y Lipshitz, 1993; Qu et al., 2007**).

Para la realización del RT-PCR, se utilizaron embriones tratados sin/con colchicina de 1h y 30 min; como controles, embriones de 3 h(C+) y 60 min (C-) (Figura 40). Al igual que con los ensayos de ChIP, se tomaron alícuotas del 2.5% del total de embriones utilizados en los experimentos y se tiñeron con DAPI para poder verificar el estadio embrionario, al igual si se encontraban en mitosis (para los embriones tratados con colchicina) (Figura 2, Anexos).

Análisis por RT- PCR del pre- mRNA de la histona H3 en embriones tempranos de *Drosophila melanogaster* durante la mitosis

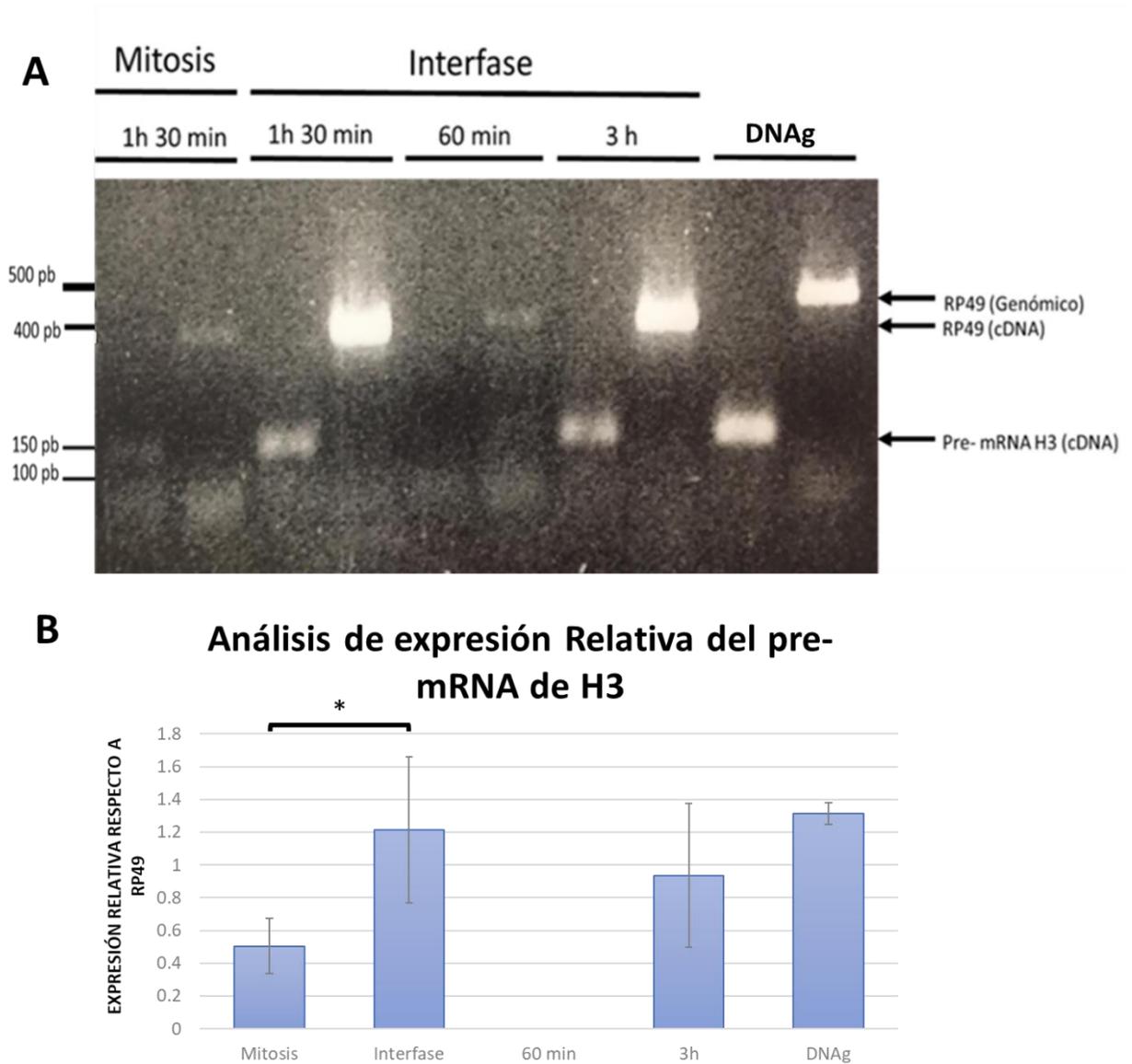


Figura 40. RT-PCR a partir de embriones detenidos en la mitosis (Colchicina 500 μ M) o interfásicos (Sin Colchicina), colectados a 1h 30 minutos; se utilizaron como controles embriones colectados a: 60 min (C-), 3h (C+), DNA genómico (DNAg) de embriones y, como control interno experimental, a rp49 (C-). A) RT-PCRs del pre-mRNA, a partir del cDNA de H3 y RP49; de embriones a 1 h 30 min (en interfase y mitosis), 60 min, 3 h (C+) y el DNAg. Se observaron amplicones a 1h y 30 min, en interfase y mitosis. B) Expresión relativa, respecto a rp49, del pre-mRNA de H3 de "A". Asterisco (*) denota diferencias significativas ($P < 0.05$).

A partir de los resultados obtenidos en los RT-PCR, se observó presencia de transcripción *de novo*, para el pre-mRNA de H3, durante la mitosis en embriones previos a la MBT (Figura 40). Además, al igual que los resultados obtenidos en los ensayos de ChIP (Figuras 35 y 36), hubo una baja cantidad de transcritos durante la mitosis en contraste con los embriones interfásicos. Probablemente a que no todas las copias en el clúster de las histonas, durante la mitosis, estén transcripcionalmente activas; por el grado de compactación que mantiene la cromatina durante, reflejándose en una menor concentración de RNA Pol II unida.

De acuerdo a experimentos de **Hsiung *et al.* (2016)**, existen procesos de transcripción durante anafase-telofase, aunque en menor concentración respecto a G1. En su conjunto, la fracción unida de RNA Pol II a estos genes previo a G1, ayuda a una rápida y fuerte reactivación de la transcripción. En los experimentos realizados por **Palozola *et al.* (2017)** igualmente observaron transcritos *de novo* durante la mitosis con bajas concentraciones respecto a la interfase. A diferencia de los primeros, ellos encontraron estos transcritos nacientes durante todas las fases de la mitosis; en mayor medida durante la metafase-anafase. Al mismo tiempo, la transcripción no fue homogénea, sino que había genes que se transcribían en etapas específicas de la mitosis; siendo en su mayoría en la transición metafase-anafase (donde también se encontraban los genes de las histonas). Otra característica interesante es que la mayoría los transcritos presentes durante la mitosis eran cortos (menores a 10 kb).

Se sabe que la mayor parte de los transcritos durante el desarrollo temprano de *Drosophila melanogaster* son pequeños (<10 kb) y carentes de intrones (ciclo nuclear 7 al 10) (**Kwasniewski *et al.*, 2019**), la cual es una característica de los genes de las histonas que miden entre 312 a 411 nt, siendo el más grande el de H1, con 771 nt. Esto también abre la posibilidad a que otros genes activos durante esta etapa del desarrollo temprano puedan ser transcritos y no únicamente las histonas.

Ya que la presencia de la maquinaria basal de transcripción sobre los genes transcripcionalmente activos no es estocástica, es necesario que los promotores de estos genes se encuentren accesibles. Para el caso de los genes de las histonas, estas condiciones comienzan a observarse a partir del ciclo nuclear 10, cuando el factor transcripcional CLAM se une al promotor de H3-H4. CLAMP permite la accesibilidad de la cromatina a proteínas necesarias en la transcripción y procesamiento de las histonas, que en su conjunto forman los HLB (**Rieder *et al.*, 2017**). La biogénesis los HLB comienza en el ciclo nuclear 10, con la formación de un proto- HLB, con la unión de las proteínas Mxc y Flash. La asociación del resto de los componentes de los HLB (U7 snRNP, Mute, MPM-2), se da en el ciclo nuclear 11, permitiendo la transcripción de estos genes (**White *et al.*, 2011**). Ello verifica los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que el control negativo utilizado, embriones en interfase colectados a 60 minutos (ciclo nuclear ~8), no presentan transcritos nacientes.

La regulación de la transcripción en las histonas se lleva a cabo por el complejo ciclina E/cdk2. Este complejo fosforila a NPAT (en mamíferos) durante la interfase, en G1 – S, lo que permite la transcripción de los genes de las histonas, mientras que su inhibición es dada por HIRA al finalizar la fase S. Tanto la activación como la inhibición de transcripción de estos genes parece estar regulada por E2F, sobre HIRA y E/cdk2 (**Rogers et al., 2015**). En *Drosophila melanogaster*, al igual que en mamíferos, ciclina E/cdk2 promueve la transcripción de las histonas al fosforilar a Mxc (ortólogo de NPAT), mientras que su inhibición probablemente es dada por Mute (**Duronio y Marzluff, 2017**).

Durante la embriogénesis temprana de *Drosophila melanogaster*, hay una gran concentración de ciclina E, la cual se mantiene de forma ubicua justo antes de la incorporación de la fase G1, durante la mitosis número 16. A pesar de que los transcritos maternos de ciclina E son degradados desde de mitosis 14, son reemplazados por la expresión cigótica, manteniéndose constante y activa en conjunto con E2F. Ambas proteínas, ciclina E y E2F, son reguladas a la baja al finalizar la mitosis 16 por la acumulación de su inhibidor Dacapo (**Follette y O'Farrell, 2009; Yuan et al., 2016**). Al mismo tiempo se ha visto la presencia de Mxc y Flash durante la mitosis (**White et al., 2011**). Esto refuerza el por qué específicamente estos genes se encuentran activos durante la mitosis, a pesar de estar normalmente restringida su expresión a la fase S.

Modelo

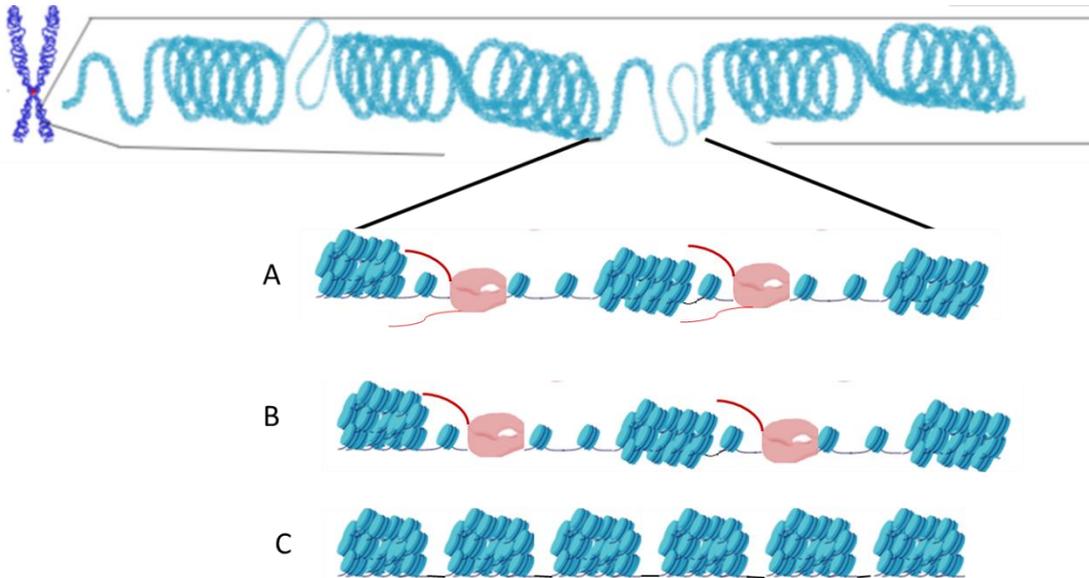


Figura 41. Modelo de proceso de transcripción durante la mitosis, en el desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster*, previo a la MBT. A) RNA Pol II transcripcionalmente activa, en algunos genes. B) Presencia de RNA polimerasa en los promotores de ciertos genes; sin transcripción. C) genes de expresión tardía e inactivos.

Con relación a los experimentos realizados, se propone que durante la mitosis en embriones tempranos de *Drosophila melanogaster*, la RNA Pol II se mantiene unida a los promotores de ciertos genes gracias a que estas regiones se encuentran accesibles (Figura 41, A). En otros casos, probablemente la maquinaria basal de transcripción no solo esté posicionada en los promotores, sino que se encuentre transcribiendo (Figura 41, B); como en el caso de los genes de las histonas (Figura 41, B y 42). La presencia de la maquinaria basal de transcripción durante la mitosis podría ser favorecida por la previa deposición del factor transcripcional ZLD en la interfase, el cual dejaría disponible los promotores de dichos genes. Los genes transcripcionalmente activos o no, durante la mitosis, podría depender tanto del estadio del desarrollo embrionario y/o la etapa del ciclo mitótico. Para el caso de los genes de expresión tardía, no presentarían condiciones óptimas en cuanto a la accesibilidad de su cromatina en las regiones promotoras, por lo tanto, la RNA Pol II no se encuentra posicionada en dichos promotores, impidiendo su transcripción en la mitosis (Figura 41, C).

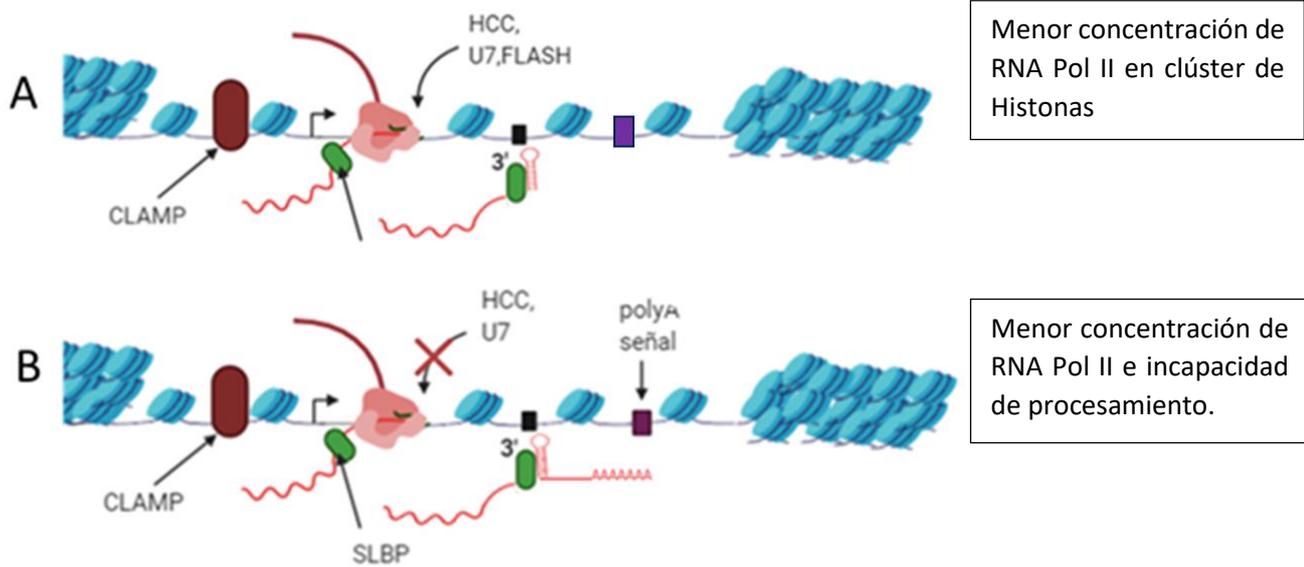


Figura 42. Modelo del proceso de transcripción en genes de las Histonas durante la mitosis, en embriones de *Drosophila melanogaster*, previo a la MBT. A) Transcripción normal de los genes de las histonas, durante la mitosis, con la participación de las proteínas que procesan los pre- mRNAs. B) Transcripción de los genes de las histonas, con transcritos poliadenilados, debido a la ausencia de las proteínas que participan en el procesamiento de los pre-mRNAs durante la mitosis.

Para el caso de los genes de las histonas, se propone que estos son transcritos durante la mitosis; sin embargo, la tasa de transcripción de estos genes disminuye debido a una menor cantidad de RNA Pol II sobre los promotores (Figura 42, A). Otro posible escenario es que, la baja concentración de transcritos durante la mitosis se deba a la ausencia de las proteínas que participan en su procesamiento (Figura 42, B), lo que conllevaría una disminución en la eficiencia de la transcripción y a un bajo número de transcritos. A su vez, la ausencia de estas proteínas en la mitosis, impediría el correcto procesamiento de los pre-mRNA de las histonas, por lo que los transcritos producidos serían poliadenilados debido a la presencia de secuencias crípticas de poliadenilación río abajo del fin de la transcripción normal.

Conclusión

-Durante la embriogénesis temprana de *Drosophila melanogaster*, la RNA Pol II se mantiene unida en los promotores de los genes de las histonas H3 y H4, tanto en la interfase como en la mitosis; sin embargo, la cantidad de RNA Pol II unida durante la mitosis, difiere respecto a la interfase, siendo mayor en esta última.

-La maquinaria basal de transcripción se encuentra transcripcionalmente activa durante la mitosis, por lo menos para el caso de los genes de las histonas. Aunque únicamente se vieron transcritos *de novo* para H3; es altamente probable que H4, H2A y H2B, también se encuentren transcripcionalmente activos, ya que su transcripción depende de la unión de CLAMP, el cual se une únicamente en el promotor bidireccional de H3-H4. De igual manera, parece ser que, al igual que la disminución de RNA Pol II observada en el promotor de H3 y H4, en la mitosis la cantidad de transcritos *de novo* también disminuye.

Perspectivas

Para saber el número y tipo de genes a los cuales se une la RNA Pol II en la mitosis, se propone: realización de ChIP-seq contra la RNA Pol II, ya sea total o con las fosforilaciones en Serina 5 y/o 2 del CTD, TBP y TFIID.

Para conocer el posible mecanismo por el cual se encuentre accesible la cromatina durante la mitosis, se propone: realización de un ChIP- ChIP y co- IP, contra TBP y PP2A, en embriones durante la mitosis e interfase.

Para comprobar si existe transcripción *de novo*: Realización de FISH o ISH para los genes donde se observe la presencia de la Pol II en los ensayos de ChIP-seq; además de RT-qPCRs, para tener una mayor noción respecto al cambio en la tasa de transcripción tanto en la interfase como en la mitosis de dichos genes.

Elaboración de experimentos con embriones tratados con α -amanitina y/o triptolide, para comprobar si los genes transcripcionalmente activos durante la mitosis son inhibidos. Comprobar la presencia o ausencia por FISH/ISH y RT-qPCR.

Para el caso de los genes de las Histonas, comprobar si estos transcritos se encuentran o no poliadenilados, realizando RT-qPCR con oligonucleótidos que abarquen los sitios críticos de poliadenilación. Si estos están presentes, realización de FISH/ISH, para observar su presencia.

Anexos

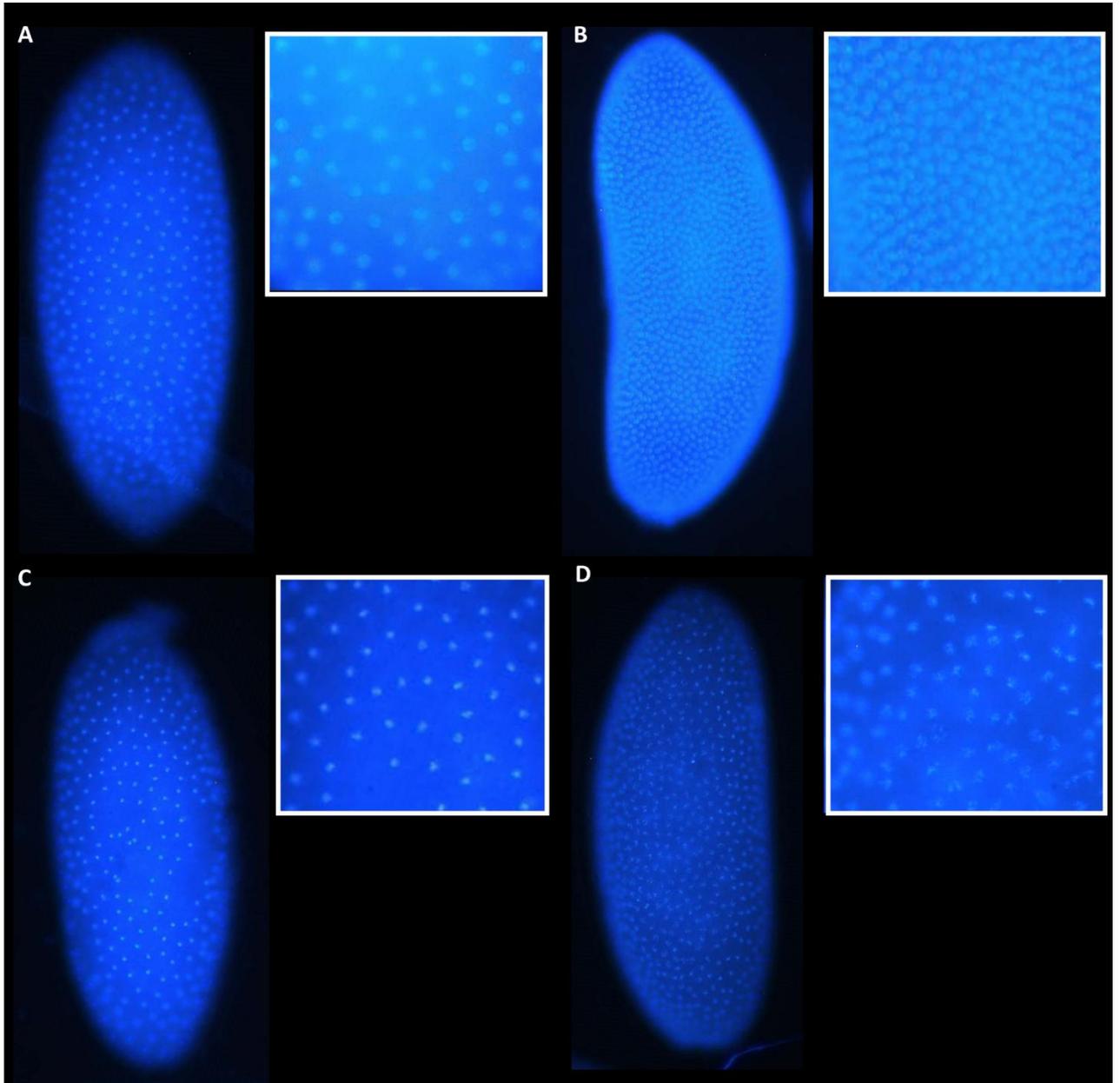


Figura 1. Micrografías de embriones a 20X, teñidos con DAPI; correspondientes a algunos de los embriones de las alícuotas, a partir de las que se realizaron experimentos de CHIP (Figuras 31- 33). A) y B) Embriones en interfase, sin tratamiento con colchicina; colectados a 1h 30 min. C) y D) Embriones en mitosis, tratados con colchicina; colectados a 1h 30 min.

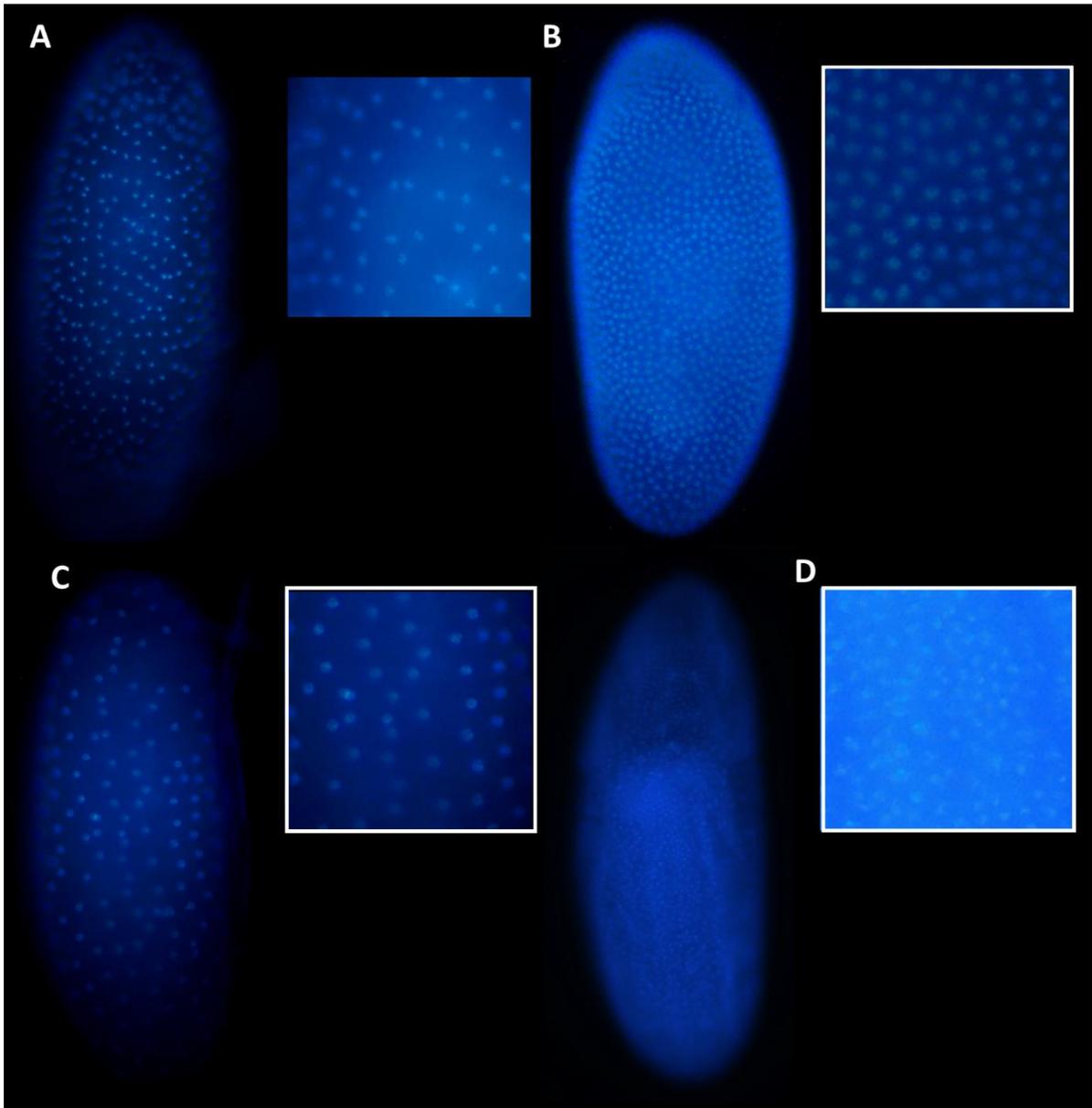


Figura 2. Micrográficas de embriones teñidos con DAPI a 20 X; correspondientes a las alícuotas utilizadas en RT-PC, en experimentos de Figura 36. A) Embriones tratados con colchicina, colectados a 1h 30 min. B) Embriones en interfase (si colchicina), colectados a 1h 30 min. C) Embriones en interfase (sin colchicina) colectados a 60 min. D) embriones en interfase, colectados a 3 h.

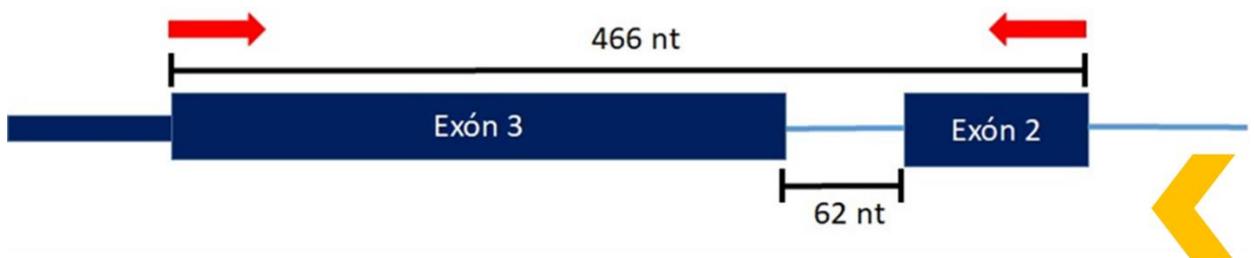


Figura 3. Esquema del sitio de unión de *primers*, que amplifican a partir del cDNA en el gen de rp49. Se Observa que dichos primers nos permiten amplificar transcritos procesados, sin intrones (región de 62 nt marcada) y DNA genómico

(amplificando también el intrón). Esto nos permite saber si el cDNA del cual partimos, se encuentra o no contaminado con DNA genómico. Con flejas rojas se marcan los sitios de unión de los *primers*, sientos en los exones 3 y 2 (marcados con cajas grandes); la flecha amarilla marca el sentido de la transcripción.

Bibliografía

-Ables, E. T. 2015. *Drosophila* Oocytes as a Model for Understanding Meiosis: An Educational Primer to Accompany “Corolla Is a Novel Protein That Contributes to the Architecture of the Synaptonemal Complex of *Drosophila*”. *Genetics*. 199(1): 17–23.

-Adamson, T. E. y Price, D. H. 2003. Cotranscriptional Processing of *Drosophila* Histone mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 23 (12): 4046–4055.

-Andersen, H.Y.; Hu, Q.; Wood, B. W.; Wolfner, M. F.; Weil, T.T. 2019. A calcium-mediated actin redistribution at egg activation in *Drosophila*. *Mol Reprod Dev.* 87:293–304.

-Aguilar-Fuentes, J.; Valadez-Graham, V.; Reynaud, E. y Zurita, M. 2006. TFIIH trafficking and its nuclear assembly during early *Drosophila* embryo development. *Journal of Cell Science*. 119: 3866-3875.

-Avilés-Pagán, E. E. y Orr-Weaver, T. L. 2018. Activating embryonic development in *Drosophila*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 84: 100–110.

-Assfalg, R.; Lebedev, A.; Gonzalez, O. G.; Schelling, A.; Koch, S. y Iben, S. 2012. TFIIH is an elongation factor of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Research*. 40 (2): 650- 659.

-Avilés-Pagán, E. E. y Orr-Weaver, T. L. 2018. Activating embryonic development in *Drosophila*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 84:100-110.

-Barnett, J.T; Kuper, J.; Koelmel, W.; Kisker, C. y Kad, N.M. 2019. The TFIIH components p44/p62 act as a damage sensor during nucleotide excision repair. *bioRxiv*.

-Bedež, F.; Linard, B.; Brochet, X; Ripp, R.; Thompson, J. D.; Moras, D; Lecompte, O. y Poch, O. 2013. Functional insights into the core-TFIIH from a comparative survey. *Genomics*. 101 (3): 178- 186.

-Binder, A. M.; Wakimoto, B. T.; Davis, C.; Chmielewski, J. y Tomkiel, D. J. E. 2017. Versager is expressed at the histone-to-protamine transition during

spermiogenesis and is required for embryonic chromosome transmission in *Drosophila melanogaster*. *Research Journal of Developmental Biology*. 4(1):1-10.

-Bonner, A. M.; Hughes, S. E. y Hawley, R. S. 2020. Regulation of Polo Kinase by Matrimony Is Required for Cohesin Maintenance during *Drosophila melanogaster* Female Meiosis. *Current Biology*. 30(4): 715-722.

-Bourouh, M.; Dhaliwal, R.; Rana, K.; Sinha, S.; Guo, Z. y Swan, A. 2016. Distinct and Overlapping Requirements for Cyclins A, B, and B3 in *Drosophila* Female Meiosis. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 6 (11): 3711-3724.

-Bourouh, M. y Swan, A. 2018. Cell Cycle Regulators in Female Meiosis of *Drosophila melanogaster*. *Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*.

-Braun, A.L.; Meghini, F.; Villa-Fombuena, G.; Guermont, M.; Martinez E. F.; Glover, D. M.; Martín-Bermudo, M. D.; González-Reyes, A. y Kimata, Y. 2018. APC/C-Vihar regulates centrosome activity and stability in the *Drosophila* germline. *Biorxiv*.

-Campanal, D. T.; Kimura, S.; Orsil, G.A; Horard, B.; Benoitl, G. y Loppin, B. 2020. The Lid/KDM5 histone demethylase complex activates a critical effector of the oocyte-to-zygote transition. *PLoS Genetics*. 16(3):1-19.

-Cao, W. X.; Kabelitz, S.; Gupta, M.; Yeung, E.; Lin, S.; Rammelt, C.; Ihling, C.; Pekovic, F.; Low, T. C. H.; Siddiqui, N. U.; Cheng, M. H. K.; Angers, S.; Smibert, C. A.; Wuhr, M.; Wahle, E. y Lipshitz, H. D. 2020. Precise Temporal Regulation of Post-transcriptional Repressors Is Required for an Orderly *Drosophila* Maternal-to-Zygotic Transition. *Cell Reports*. 31 (12): 107783.

-Chen, D.; Hinkley, C. S.; Henry, R. W. y Huang, S. 2002. TBP Dynamics in Living Human Cells: Constitutive Association of TBP with Mitotic Chromosomes. *Molecular Biology of the Cell*. 13 (1): 276–284.

-Chen, K.; Johnston, J.; Shao, W; Meier¹, S.; Staber, C. y Zeitlinger, J. 2013. A global change in RNA polymerase II pausing during the *Drosophila* midblastula transition. *eLife*. 2: 1-19.

-Clough, E.; Tedeschi, T. y Hazelrigg T. 2014. Epigenetic regulation of oogenesis and germ stem cell maintenance by the *Drosophila* histone methyltransferase Eggless/dSetDB1. *Developmental Biology*. 388 (2): 181-191.

-Compe, E. y Jean-Marc, E. 2016. Nucleotide Excision Repair and Transcriptional Regulation: TFIIH and Beyond. *Annual Reviews of Biochemistry*. 85 (1) :265-290.

-Costa, F.A.M. y Ohkura, H. 2019. The molecular architecture of the meiotic spindle is remodeled during metaphase arrest in oocytes. *Journal of Cell Biology*. 218 (9): 2854–2864.

-Cruz-Becerra, G.; Valerio-Cabrera, S.; Juárez, M; Bucio-Mendez, A. y Zurita, M. 2018. TFIIH localization is highly dynamic during zygotic genome activation in

Drosophila, and its depletion causes catastrophic mitosis. *Journal of Cell Science*.131: 1-11.

-Demarco, R. S.; Eikenes, A. H.; Haglund, K. y Jones, D. L. 2014. Investigating Spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Methods*. 68(1): 218–227.

-Ding, D. y Lipshitz, H. D. 1993. A molecular screen for polar-localised maternal RNAs in the early embryo of *Drosophila*. *Zygote*. 1: 257-27.

-Dominski, Z.; Xiao-cui, Y.; Raska, C. S; Santiago C.; Borchers, C. H.; Duronio, R. J. y Marzluff W.F. 2002. 3' End Processing of *Drosophila melanogaster* Histone Pre-mRNAs: Requirement for Phosphorylated *Drosophila* Stem-Loop Binding Protein and Coevolution of the Histone Pre-mRNA Processing System. *Mol. Cell Biol*. 22 (18): 6648–6660.

-Doyen, C. M.; Chalkley, G. E.; Voets, O.; Bezstarosti, K.; Demmers, J. A.; Moshkin, Y. M. y Verrijzer, C. P. 2015. A Testis-Specific Chaperone and the Chromatin Remodeler ISWI Mediate Repackaging of the Paternal Genome. *Cell Reports*. 13 (1): 1310–1318.

- Duronio, R. J. y Marzluff, W. F. 2017. Coordinating cell cycle-regulated histone gene expression through assembly and function of the Histone Locus Body. *RNA BIOLOGY*. 14(6): 726–738.

-Edgar, B. A. y Schubigert, G. 1986. Parameters Controlling Transcriptional Activation during Early *Drosophila* Development. *Cell*. 44: 871- 877.

-Eichhorn, W. S.; Subtelny, A. O.; Kronja, I.; Kwasnieski, J. C.; Orr-Weaver, T. L. y Bartel, D. P. 2016. mRNA poly(A)-tail changes specified by deadenylation broadly reshape translation in *Drosophila* oocytes and early embryos. *eLIFE*. 1-24.

-Freier, R.; Aragón, E.; Bagiński, B.; Pluta, R.; Martin-Malpartida, P.; Ruiz, L.; Condeminas, M.; Gonzalez, C. y Macias, M. J. 2020. Structures of the germline-specific Deadhead and Thioredoxin T proteins from *Drosophila melanogaster* reveal unique features among Thioredoxins. *bioRxiv*.

-Fairley, J.A.; Scott, P. H. y White, R. J. 2003. TFIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis in vivo. *The EMBO Journal*. 22 (21): 5841-5850.

-Fanz, D. y Schifferstadt, N. 2008. Dig Application Manual for Nonradioactive In Situ Hybridization. *Roche*. 4a Ed.pp.

-Farrell, J. A. y O'Farrell, P. H. 2014. From egg to gastrula: How the cell cycle is remodeled during the *Drosophila* mid-blastula transition. *Annu Rev Genet*. 48: 269–294.

-Ferree, P. L.; Deneke, V. E. y Talia, S. D. 2016. Measuring time during early embryonic development. *Semin Cell Dev Biol*. 55: 80–88.

- Fu, S.; Chung-Yi, N.; Hsiao-Lan, L. y Rushlow, C. 2014. Co-activation of microRNAs by Zelda is essential for early *Drosophila* development. *Development*. 141(10): 2108–2118.
- Fuda, N. J.; Guertin, M. J.; Sharma, S.; Danko, C. G.; Martins, A. L.; Siepel, A. y Lis, J. T. 2015. GAGA Factor Maintains Nucleosome-Free Regions and Has a Role in RNA Polymerase II Recruitment to Promoters. *Plos Genetics*. 11(3): e1005108.
- Gaertner, B. y Zeitlinger, J. 2014. RNA polymerase II pausing during development. *Development*. 141: 1179-1183.
- Harrison, M. M.; Li, X. Y.; Kaplan, T.; Botchan, M. R. y Eisen, M. B. 2011. Zelda Binding in the Early *Drosophila melanogaster* Embryo Marks Regions Subsequently Activated at the Maternal-to-Zygotic Transition. *Plos Genetics*. 7 (10): 1- 13.
- Horard, B. y Loppin, B. 2015. Histone storage and deposition in the early *Drosophila* embryo. *Chromosoma*. 124 (1): 163–175.
- Greber, B. J.; Toso, D. B.; Fang, J. y Nogales, E. 2019. The complete structure of the human TFIID core complex. *eLIFE*. 1-29.
- Glover, D. M. 1991. Mitosis in the *Drosophila* embryo- in and out of control. *Reviews*. 7 (4): 125- 132.
- Hamm, D. C. y Harrison, M. M. 2018. Regulatory principles governing the maternal-to-zygotic transition: insights from *Drosophila melanogaster*. *Open Biology*. 8(12): 180183.
- Hara, M.; Petrova, B. y Orr-Weaver, T. L. 2017. Control of PNG kinase, a key regulator of mRNA translation, is coupled to meiosis completion at egg activation. *eLife*. 6 (1): 1- 22.
- Hara, M.; Lourido, S.; Petrova, B.; Lou, H. J.; Stetina, J. R. V.; Kashevsky, H.; Turk, B. E. y Orr-Weaver, T. L. 2018. Identification of PNG kinase substrates uncovers interactions with the translational repressor TRAL in the oocyte-to-embryo transition. *eLife*. 7 (1): 1-19.
- Hinnant, T. D.; Merkle, J. A. y Ables, E. T. 2020. Coordinating Proliferation, Polarity, and Cell Fate in the *Drosophila* Female Germline. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8 (19): 1-22.
- Hsin, J. P. y Manley, J. L. 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev*. 26 (19): 2119–2137.
- Hughes, S. E.; Miller, D. E.; Miller, A. L. y Hawley, R. S. 2018. Female Meiosis: Synapsis, Recombination, and Segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 208: 875–908.
- Hsiung, C. C. S.; Bartman, C. R.; Huang, P.; Ginart, P.; Stonestrom, A. J.; Keller, C.A.; Face, C.; Jahn, K. S.; Evans, P.; Sankaranarayanan, L.; Hardison, R. C.G.;

Raj, A. y Blobel, G. A. 2016. A hyperactive transcriptional state marks genome reactivation at the mitosis–G1 transition. *Genes & Development*. 30:1423–1439.

-Ji, J.Y; Squirrell, J.M. y Schubiger, G. 2004. Both cyclin B levels and DNA replication checkpoint control the early embryonic mitoses in *Drosophila*. *Development*. 131: 401–411.

-Juven-Gershon, T.; Jer-Yuan, H.; Theisen, J. W. M. y Kadonaga, J. T. 2008. The RNA polymerase II core promoter — the gateway to Transcription. *Current Opinion in Cell Biology*. 20: 253–259.

-Katsani, K. R.; Karess, R. E.; Dostatni, N.; y Valérie, D. 2008. In Vivo Dynamics of *Drosophila* Nuclear Envelope Components. *Molecular Biology of the Cell*. 19: 3652–3666.

-Kwasnieski, J.C.; Orr-Weaver, T. L. y Bartel, D.P 2019. Early genome activation in *Drosophila* is extensive with an initial tendency for aborted transcripts and retained introns. *Genome Research*. 29: 1188-119.

-Kotadia, S.; Crest, J.; Tram, U.; Riggs, B. y Sullivan, W. 2010. Blastoderm Formation and Cellularisation in *Drosophila melanogaster*. Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons.

-Kronja, I.; Yuan. B.; Eichhorn, S. W.; Dzeyk, K.; Krijgsveld, J.; Bartel, D.P.; Orr-Weaver, T. L. 2014. Widespread Changes in the Posttranscriptional Landscape at the *Drosophila* Oocyte-to-Embryo Transition. *Cell Reports*. 7 (5): 1495- 1508.

-Li, X. Y. y Eisen, M. B. 2018. Zelda potentiates transcription factor binding to zygotic enhancers by increasing local chromatin accessibility during early *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *The preprint server for biology*.

-Li, X.; Urwyler, O. y Suter, B. 2010. *Drosophila* Xpd Regulates Cdk7 Localization, Mitotic Kinase Activity, Spindle Dynamics, and Chromosome Segregation. *Plos genetics*. 6 (3): 1-7.

-Lin, H. 2004. *Drosophila* Female Germline Stem Cells. *Handbook of Stem Cells*, 157–169.

-Lindley, C.C.; Kimura, S.; Saxton, D.S.; Essaw, Y.; Simpson, I.; Tan, V. y Sullivan, W. 2011. A fluorescent-based method for rapid *Wolbachia* detection in the *Drosophila* germline and somatic tissues. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (14): 4788–4794.

-Leclerc, V; Raisin S. y Léopold, P. Dominant-negative mutants reveal a role for the Cdk7 kinase at the mid-blastula transition in *Drosophila* embryos. *EMBO Journal*. 19 (7): 1567–1575.

-Lee, M. T.; Bonneau, A. R. y Giraldez A. J. 2014. Zygotic Genome Activation During the Maternal-to-Zygotic Transition. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30: 581–613.

- Lanzotti, D. J.; Kaygun, H.; Yang, X.; Duronio, R. J. y Marzluff, W.F. 2002. Developmental Control of Histone mRNA and dSLBP Synthesis during Drosophila Embryogenesis and the Role of dSLBP in Histone mRNA 3' End Processing In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 7 (22): 2267–2282.
- Lefebvre y Lécuyer, E. 2018. Flying the RNA Nest: Drosophila Reveals Novel Insights into the Transcriptome Dynamics of Early Development. *J. Dev. Biol.* 6 (1): 1-21.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L., *et al.* 2000. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; Section 13.7, Checkpoints in Cell-Cycle Regulation.
- Lopez, J. M. y Wolfner, M. F. 1997. The developmentally regulated Drosophila embryonic nuclear lamina protein 'Young Arrest' (fs(1)Ya) is capable of associating with chromatin. *Journal of Cell Science.* 110: 643-651.
- Louder, R. K.; He, Y; López-Blanco, J. R.; Fang, J.; Chacón, P. y Nogales, E. 2016. Structure of promoter-bound TFIID and model of human pre-initiation complex assembly. *Nature.* 531: 604–609.
- Loppin, B.; Dubruille, R. y Horard, B. 2015. The intimate genetics of Drosophila fertilization. *Open Biol.* 5(1): 1-16.
- Löser, E.; Latreille, D. y Lovino, N. 2016. Polycomb Group Proteins: Chromatin Preparation and Chromatin Immuno-precipitation from Drosophila Embryos. *Springer.* 1480: 26-36.
- Lovino, N. 2014. Drosophila epigenome reorganization during oocyte differentiation and early embryogenesis. *Briefings in Functional Genomics.* 13 (3): 246- 253.
- Luo, J.; Cimermancic, P.; Viswanath, S.; Taatjes, D. J.; Hahn, S. y Ranish, J. 2015. Architecture of the Human and Yeast General Transcription and DNA Repair Factor TFIIH. *Molecular Cell.* 59: 794–806.
- Martinho, R.G.; Guilgur, L. G. y Prudencio, P. 2015. How gene expression in fast-proliferating cells keeps pace. *Prospects & Overviews.* 37: 514–524.
- Marzluff, W. F. y Koreski, K. P. 2017. Birth and Death of Histone mRNAs. *Trends Genet.* 33(10): 745–759.
- McLaughlin J.M., Bratu D.P. 2015. Drosophila melanogaster Oogenesis. *Methods in Molecular Biology.* Vol. 1328. New York.
- Memili, E. y First, N. S. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote.* 8: 87–96.
- Mydlikova, Z.; Gursky, J. y Pirsell, M. 2010. Transcription factor IIH – the protein complex with multiple functions. *Neoplasma.* 57 (4): 287- 290.

- Nakamura, A.; Shirae-Kurabayashi, M. y Hanyu-Nakamura, K. 2010. Repression of early zygotic transcription in the germline. *Current Opinion in Cell Biology*. 22 (6):709–714.
- Navarro-Costa, P.; McCarthy, A.; Prudêncio, P.; Greer, C.; Guilgur, L. G.; Becker, J. D.; Secombe, J.; Rangan, P. y Martinho, R. G. 2016. Early programming of the oocyte epigenome temporally controls late prophase I transcription and chromatin remodeling. *Nature Communications*. 7: 12331.
- Oh, E.; Mark, K. G.; Mocchiaro, A.; Watson, E. R.; Prabu, J. R.; Cha, D. D.; Kampmann, M.; Gamarra, N.; Zhou, C. Y. y Rape, M. 2020. Gene expression and cell identity controlled by anaphase-promoting complex. *Nature*. 579 (1): 136-140.
- Palozola, K. C.; Donahue, G.; Liu, H.; Grant, G. R.; Becker, J. S.; Cote, A.; Yu, H.; Raj, A. y Zaret, K. S. 2017. Mitotic transcription and waves of gene reactivation during mitotic exit. *Science*. 358: 119- 122.
- Pils, M.; Crucifix, C.; Papai, G.; Krupp, F.; Steinbauer, R.; Griesenbeck, J.; Milkereit, P.; Tschochner, H. y Schultz, P. 2016. Structure of the initiation-competent RNA polymerase I and its implication for transcription. *Nature Communications*. 7: 12126.
- Ping, H. J. y Manley, J. L. 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev*. 26 (19): 2119. 2137.
- Qin, X.; Ahn, S.; Speed, T. P. y Rubin, G. M. 2007. Global analyses of mRNA translational control during early Drosophila embryogenesis. *Genome Biology*. 8:R63.
- Rapley, R. y Mannig, D. L. 1998. Methods in Molecular Biology: RNA Isolation and Characterization Protocols. *Humana Press*. 73- 75 pp.
- Rathke, C.; Baarends, W. M.; Awe, S. y Renkawitz-Pohl, R. 2014. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1839 (3). 117-250.
- Rathke, C.; Baarends, W. M.; Jayaramaiah-Raja, S.; Bartkuhn, M.; Renkawitz, R. y Renkawitz-Pohl, R. 2007. Transition from a nucleosome-based to a protaminebased chromatin configuration during spermiogenesis in Drosophila. *Journal of Cell Science*. 120 (9): 1689- 1700.
- Rieder, L. E.; Koreski, K. P.; Boltz, K. A.; Kuzu, G.; Urban, J. A.; Bowman, S. K.; Zeidman, A.; Jordan, W. T.; Tolstorukov, M. Y.; Marzluff, W. F.; Duronio, R. J. y Larschan, E. N. 2017. Histone locus regulation by the Drosophila dosage compensation adaptor protein CLAMP. *Genes & Development*. 31:1494–1508.
- Rogers, S.; B.S. Gloss; Lee, C. S.; Sergio, C. M.; Dinger, M. E.; Musgrove, E. A.; Burgess, A. y Caldon, C. E. 2015. Cyclin E2 is the predominant E-cyclin associated with NPAT in breast cancer cells. *Cell division*.10:1.

- Sabath, I.; Skrajna, A.; Xiao-Cui, Y.; Dadlez, M.; Marzluff, W. F. y Dominki, Z. 2013. 3'-End processing of histone pre-mRNAs in *Drosophila*: U7 snRNP is associated with FLASH and polyadenylation factors. *Journal ListRNA*.19(12): 1726–1744.
- Sackton, K. L.; Lopez, J. M.; Berman, C. L. y Wolfner, M. F. 2009. YA is needed for proper nuclear organization to transition between meiosis and mitosis in *Drosophila*. *BMC Developmental biology*. 9 (43): 1-12.
- Saldi, T.; Fong, N. y Bentley, D. L. 2018. Transcription elongation rate affects nascent histone pre-mRNA folding and 3' end processing. *Genes Dev*. 32 (3-4): 297–308.
- Sainsbury, S.; Bernecky, C. y Cramer, P. 2015. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Molecular Cell Biology*. 16: 129–143.
- Sheng, X. R. y Matunis, E. 2011. Live imaging of the *Drosophila* spermatogonial stem cell niche reveals novel mechanisms regulating germline stem cell output. *Development and Stem Cells*. 38(16):3367-76.
- Schulz, K. N. y Harrison, M. M. 2019. Mechanisms regulating zygotic genome activation. *Nature Reviews*. 20(1): 221–234.
- Song, Y.; Marmion, R.A.; Park, J.O.; Biswas, D.; Rabinowitz, J.D.; Shvartsman, S.Y. 2017. Dynamic control of dNTP synthesis in early embryos. *Cell*. 42: 301-308.
- Sugasawa, K. 2016. Molecular mechanisms of DNA damage recognition for mammalian nucleotide excision repair. *DNA Repair*. 44: 110-117.
- Tadros, W.; Goldman, A. L.; Babak, T.; Menzies, F.; Vardy, L. Orr-Weaver, T.; Hughes, T. R.; Westwood, J. T.; Smibert, C. A. y Lipshitz, H. D. 2007. SMAUG Is a Major Regulator of Maternal mRNA Destabilization in *Drosophila* and Its Translation Is Activated by the PAN GU Kinase. *Developmental Cell*. 12: 143–155.
- Tadros, W. y Lipshitz, H. D. 2009. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*. 136: 3033-3042.
- Tautz, D. y Pfeifle C. 1989. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma*. 98: 81-85.
- Teves, S. S.; An, L.; Bhargava-Shah, A.; Xie, L.; Darzacq, D. y Tjian, R. 2018. A stable mode of bookmarking by TBP recruits RNA Polymerase II to mitotic chromosomes. *bioRxiv*. 1- 28.
- Timmers, H. T. M. y Verrijzer, P. 2017. Mitotic Chromosomes: Not So Silent After All. *Cell*. 43 (2): 119-121.
- Tram, U.; Riggs, B. y Sullivan, W. 2002. Cleavage and Gastrulation in *Drosophila* Embryos. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1-7.

- Tsurumi, A.; Xia, F.; Li, F.; Larson, K.; LaFrance, R. y Li, W. 2011. STAT Is an Essential Activator of the Zygotic Genome in the Early *Drosophila* Embryo. *PlosGenetics*. 7(5): 1-14.
- Urban, J.; Kuzu, G.; Bowman, S.; Scruggs, B.; Henriques, T.; Kingston, R.; Adelman, K.; Tolstorukov, M. y Larscha, E. 2017. Enhanced chromatin accessibility of the dosage compensated *Drosophila* male X-chromosome requires the CLAMP zinc finger protein. *Plos One*. 12(10): 1- 28.
- Valerio, C. S. 2017. Dinámica del complejo CAK del factor TFIIH durante la activación de la transcripción cigótica en embriones de *Drosophila melanogaster*. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos.
- Vannini, A. y Cramer, P. 2012. Conservation between the RNA Polymerase I, II, and III Transcription Initiation Machineries. *Molecular Cell*. 45: 429- 446.
- Vastenhouw1, N. L.; Cao, W. X. y Lipshitz, H. D. 2019. The maternal-to-zygotic transition revisited. *Development*. 146 (1): dev.161471.
- Wang, P.; Galan, J.A.; Normandin, K.; Bonneil, E.; Hickson, G. S.; Roux, P.P; Thibault, P. y Archambault, V. 2013. Cell cycle regulation of Greatwall kinase nuclear localization facilitates mitotic progression. *J. Cell Biol*. 202 (2): 277–293.
- Winkler, F.; Kriebel, M.; Clever, M.; Gröning, S. y Großhans, J. 2017. Essential Function of the Serine Hydroxymethyl Transferase (SHMT) Gene During Rapid Syncytial Cell Cycles in *Drosophila*. *G3*: 2305- 2314.
- White, A. E.; Burch, B. D.; Yang, X.; Gasdaska, P. Y.; Dominki, Z.; Marzluff, W. F. y Duronio, R. J. 2011. *Drosophila* histone locus bodies form by hierarchical recruitment of components. *J. Cell Biol*. 193 (4): 677–694.
- Wolfner, MF. 2013. Nuclear Envelope Dynamics in *Drosophila* Pronuclear Formation and in Embryos. *Madame Curie Bioscience Database: Landes Bioscience*. 1-20.
- Xiao-Yong, L.; Harrison, M. M.; Villalta, J. E.; Kaplan, T. y Eisen, M. B. Establishment of regions of genomic activity during the *Drosophila* maternal to zygotic transition. *eLIFE*. 3:1- 20.
- Xing, H.; Vanderford, N. L. y Sarge, K. D. 2008. The TBP-PP2A mitotic complex bookmarks genes by preventing condensin action. *Nat Cell Biol*. 10(11): 1318–1323.
- Yang, H.; Wanner, I. B.; Roper, S. D. y Chaudhari, N. 1999. An Optimized Method for In Situ Hybridization with Signal Amplification That Allows the Detection of Rare mRNAs. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Volume 47(4): 431–445.
- York-Andersen, A.H.; Parton, R. M.; Bi, C. J.; Bromley, C. L.; Davis, I. y Weil, T. 2015. A single and rapid calcium wave at egg activation in *Drosophila*. *Biol Open*. 4(4): 553–560.

-Yuan, K.; Seller, C. A.; Shermoen, A. W. y Farrell, A. H. 2016. Timing the Drosophila Mid-Blastula Transition: A Cell Cycle-Centered View. *Trends in Genetics*. 32 (8): 496- 507.

-Zhou, L.; Yu, M.; Lim, T.; Kaur, P.; Saj, A.; Bortolamiol-Becet, D.; Gopal, V.; Tolwinski, N.; Tucker-Kellogg, G. y Okamura, K. 2018. Importance of miRNA stability and alternative primary miRNA isoforms in gene regulation during Drosophila development. *eLife*. 7(1):1- 31.

-Zurita, M; Reynaud, E. y Aguilar-Fuentes J. 2008. From the beginning: the basal transcription machinery and onset of transcription in the early animal embryo. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65: 212 – 227.