



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

“Análisis de la heterocromatina en respuesta al
daño causado al ADN por radiación UV”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

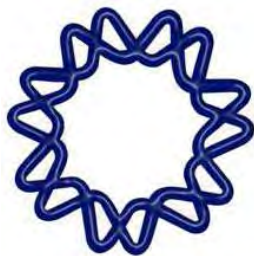
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ALYERI BUCIO MÉNDEZ

Director de Tesis:
Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Análisis de la heterocromatina en respuesta al daño
causado al ADN por radiación UV**

PRESENTA:

Alyeri Bucio Méndez

TUTOR:

Dr. Mario E. Zurita Ortega

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Hilda Lomelí Buyoli

Dr. Gustavo Pedraza Alva

Cuernavaca Morelos, Mayo 2012

Agradecimientos

Primero que nada al Dr. Zurita, por recibirme en su laboratorio.

A la Dra. Hilda Lomelí por sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Gustavo Pedraza por las ideas para mejorar mi proyecto.

A mi familia, especialmente Rub, Mary y Anyela.

A mis grandes amigos, por distraerme y dejarse distraer (aunque a veces no hayan tenido otra opción).

A los demás miembros del laboratorio del Dr. Zurita por sus consejos y ayuda.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	3
1.1 La reparación por escisión de nucleótidos (REN)	4
1.2 Cromatina	7
1.3 Modificaciones en las colas de las histonas	9
1.4 Proteínas de la cromatina	10
1.4.1 Metil-transferasas de las colas de las histonas	10
1.4.2 Desmetilasas de las colas de las histonas	10
1.4.3 Proteína de heterocromatina 1 (HP1)	11
1.5 La reparación por escisión de nucleótidos y la cromatina	12
1.5.1 REN y HP1	13
1.6 La fosforilación de la serina 10 de la histona H3	14
II. Antecedentes	
2.1 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio	15
2.2 El mecanismo REN y la cromatina en <i>Drosophila melanogaster</i>	15
III. Objetivos	
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos particulares	21
IV. Materiales y Métodos	
4.1 Realización de las inmunotinciones de cromosomas politénicos	22
4.2 Inmuno-tinción de glándulas salivales de larvas de moscas de tipo silvestre	24
4.3 Ensayos tipo Western Blot de larvas y glándulas de larvas de tercer instar de moscas de tipo silvestre	25
4.4 Obtención de ADN genómico de moscas adultas	27
4.5 Pruebas de sensibilidad a radiación UV en larvas	27
V. Resultados	
5.1 Análisis de los niveles de HP1 α en cromosomas politénicos después de producir daño al DNA con irradiación UV	28
5.2 Determinación de los niveles de HP1a en larvas de tercer instar y en glándulas salivales después de irradiar con UV	30

5.3 Análisis y dinámica de la distribución de HP1 α después daño al DNA por radiación UV en glándulas salivales de larvas de moscas de tipo silvestre	31
5.4 Comparación de la marca de p-S10H3 entre cromosomas politénicos irradiados y sin irradiar	33
5.5 Mapeo de la inserción de una línea mutante que afecta a la cinasa de la serina 10 de la histona H3	34
5.6 Pruebas de sensibilidad a radiación UV en larvas mutantes de la cinasa JIL-1	36
5.7 Identificación de HP1 α en mutantes para JIL-1 antes y después de irradiar con luz UV	39
VI. Discusión	41
VII. Conclusiones	44
VIII. Perspectivas	45
Abreviaturas	46
Bibliografía	47

Resumen

La cromatina, como cualquier molécula de los organismos debe poder mantenerse en un estado dinámico que sea capaz de adaptarse a los diferentes estímulos que reciba el ADN, como cuando recibe señales para llevar a cabo mecanismos de recombinación, transcripción y reparación. Sin embargo es importante mantener además cierta estabilidad, dada por diversas proteínas como lo es la proteína HP1. Esta proteína cuenta con tres variantes, todas presentes en la mosca *Drosophila melanogaster*, y se encuentra cada una asociada a diferentes tipos de cromatina. La variante HP1 α se encuentra más comúnmente asociada a formas de cromatina compacta (heterocromatina).

Se ha visto que cuando el ADN sufre daños a causa de la radiación ultravioleta es necesario que se lleven a cabo cambios que permitan la relajación del ADN, como es el aumento de la proteína dKDM4B que quita la marca de trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (3meK9H3), marca asociada a heterocromatina. Es por eso que en el laboratorio hubo un interés por ver qué ocurre con la proteína HP1 α cuando se induce este tipo de daño.

Hemos observado que esta proteína se encuentra inicialmente fuertemente asociada a regiones de heterocromatina, y que cuando el ADN es dañado hay una relocalización a la periferia nuclear, que posteriormente regresa a su posición inicial cuando el proceso de reparación ha concluido. La cromatina es capaz de relajarse en respuesta a este tipo de daño, lo cual le permite repararse. Esto parece ocurrir con ayuda de la cinasa JIL-1. Finalmente la cromatina regresa a su estado basal de compactación.

Abstract

It is very important for chromatin to maintain a dynamic state that allows DNA to adapt to different stimuli, like the ones that direct the cell to recombination, transcription and repair mechanisms. However, it is also important to keep chromatin with certain stability given by many proteins like HP1. This protein has three variants, all present in the fly *Drosophila melanogaster*, each one associated with a different kind of chromatin. The variant HP1 α is the one most commonly found in chromatin in a very compact state (heterochromatin).

It has been shown that when DNA is submitted to certain types of stress such as radiation due to ultraviolet light, there are certain changes necessary for the relaxation of DNA, like increases in the levels of demethylase dKDM4B capable of removing trimethylation of lysine 9 of histone H3 (3meK9H3), modification associated to heterochromatin. That is why we had an interest in protein HP1 α when DNA suffers UV radiation.

We have seen that this protein is tightly associated to heterochromatic regions, and when DNA suffers damage there is relocation to the nuclear periphery, however this protein soon returns to its basal position when repair time is concluded. Chromatin is capable of relaxing in response to this damage to allow repair mechanisms. This seems to be happening by the presence of kinase JIL-1. Finally chromatin returns to its basal state of compaction.

I. Introducción

La vida depende de la habilidad de las células para almacenar instrucciones genéticas. Estas instrucciones se almacenan en todas las células en forma de ADN, para así tener la característica de mantener a los organismos en armonía con su entorno (revisado en Alberts, 2002). Sin embargo, el ADN es propenso a sufrir daño por diferentes factores endógenos: como la formación de especies reactivas de oxígeno o algunos errores cometidos durante la replicación, y los daños exógenos como los causados por la irradiación por rayos X, rayos ultravioleta (UV) y el efecto de las toxinas. Estos daños presentan un gran problema ya que pueden tener importantes efectos en las células, desde cambios en el ciclo celular hasta daños que incluso pueden ser letales (revisado en Gong F., 2005). Mantener la integridad del ADN es vital para los organismos, es por ello que tanto organismos procariontes como eucariontes han desarrollado mecanismos para tolerar los daños que les son infligidos (como la ubiquitinación o sumoilación) o mecanismos que les permiten reparar el ADN cuando este es dañado (revisado en Fleck O., 2004).

Se conocen varios mecanismos de reparación diferentes tipos de daño al ADN en los organismos eucariontes (Figura 1):

- La “reparación de emparejamientos erróneos” (MMR, por sus siglas en inglés) es la encargada de remover pequeños emparejamientos erróneos, o mutaciones puntuales como las inserciones y deleciones que se introducen durante la replicación y que provocan la formación de “loops” en el ADN.
- La “reparación por recombinación homóloga” (RH) es la encargada de corregir la ruptura de la doble cadena de ADN provocada por rayos ionizantes, y las reacciones de “cross-linking” provocadas por algunos agentes químicos. Requiere de una cadena como base y es muy eficiente.

- La reparación por escisión de base (REB) está encargada de remover modificaciones provocadas por agentes externos, como son las alquilaciones, las oxidaciones o las deaminaciones.
- La reparación por escisión de nucleótidos (REN) se encarga, entre otras cosas, de remover los dímeros de pirimidina y 6,4 foto-productos formados a causa de la radiación UV, así como de la eliminación de aductos en el ADN. Es un mecanismo altamente conservado en los organismos eucariotes (Gong F., *et al.* 2005; Fleck O., *et al.* 2004).

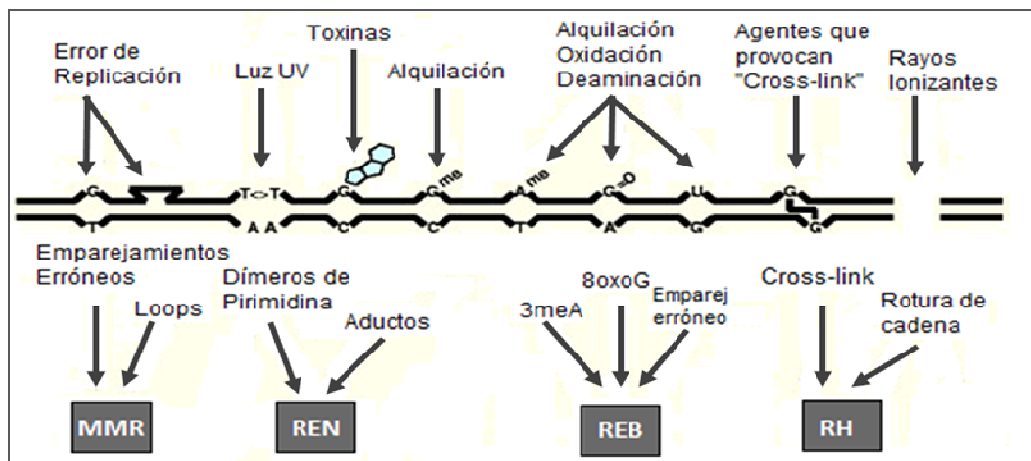


Figura 1. Esquema de los diferentes daños que son corregidos por los mecanismos de reparación. Se muestra la doble hebra de ADN, en la parte superior se muestran los diferentes factores que causan lesiones en ella y en la parte inferior se muestran los tipos de daño ocasionados por cada tipo de lesión. En los cuadros grises se muestran algunos mecanismos de reparación encargados de contener con esas lesiones: *MMR*, reparación de emparejamientos erróneos; *REN*, Reparación por escisión de nucleótidos; *REB*, Reparación por escisión de base; *RH*, Reparación por Recombinación Homóloga (Fleck *et al.*, 2004)

1.1 La reparación por escisión de nucleótidos (REN)

REN es un mecanismo altamente conservado en eucariontes que incluye dos procesos: el de reparación global del genoma (GG-REN) y la reparación acoplada a transcripción (AT-REN). La diferencia principal entre estos dos procesos radica en los factores de reconocimiento inicial del daño (revisado en

Fleck O., 2004 y en Gong F., 2005). En GG-REN las moléculas encargadas de reconocer el daño son XPC y hHR23B, mientras que la encargada de reconocer el daño en la AT-REN es la RNA polimerasa II durante la transcripción (revisado en Fleck O., 2004). Posteriormente en ambos mecanismos se recluta al factor de transcripción TFIIH, cuyas subunidades XPD y XPB separan las dos hebras del ADN debido a su actividad de helicasa dependiente de ATP. Después arriban las proteínas XPA y RPA que se encargan de verificar que se ensamble bien la burbuja de reparación, así como de darle estabilidad al complejo. Una vez que se asegura la estabilidad del complejo de reparación, se reclutan proteínas con actividad endonucleasa (como XPG y el complejo XPF-ERCC1) que cortan de 24 a 32 nucleótidos de la hebra dañada. Finalmente se recluta a la maquinaria encargada de la síntesis de ADN, que se encargará de sintetizar la parte removida, para por último ser unida con una ligasa (Figura 2) (revisado en Fleck O., 2004).

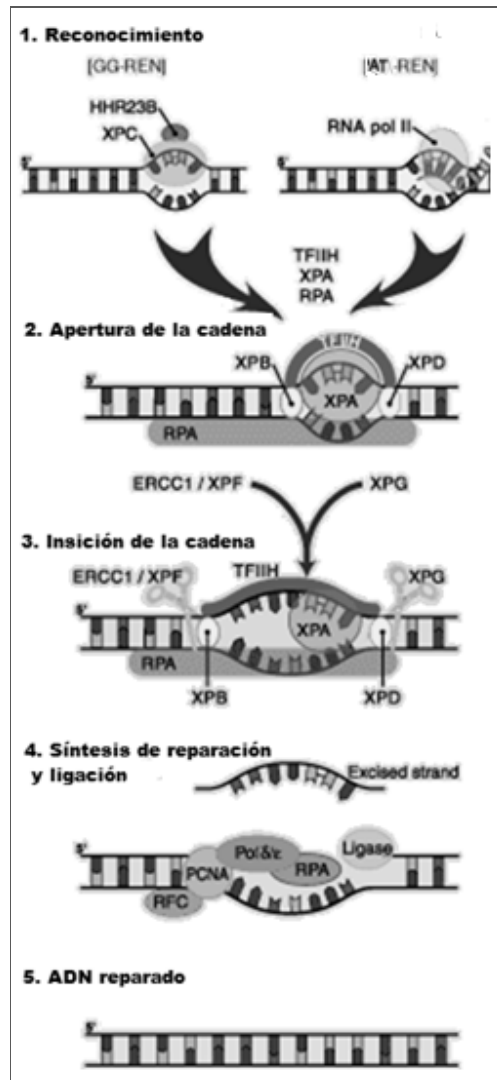


Figura 2. Mecanismo de reparación REN. (Fleck O., 2004). Se muestran los pasos y las moléculas involucradas en cada uno. 1. Tanto en la reparación global del genoma (**GG-REN**) como en la acoplada a transcripción (**AT-REN**) hay moléculas que se encargan del reconocimiento inicial del daño: en la GG-REN son las proteínas HHR23B y XPC, mientras que en la AT-REN es la RNA-polIII. 2. El complejo TFIIH se encarga de la apertura de la cadena (subunidades XPB y XPD), ayudados por las proteínas RPA y XPA que le dan estabilidad. 3. Las endonucleasas XPF y XPG se encargan de escindir la sección dañada. 4. Finalmente las proteínas RPA, PCNA y otras polimerasas se encargan de sintetizar el pedazo que se escindió para, 5. Que quede el ADN reparado.

Se han hecho muchos estudios para comprender la forma de operar de REN en ADN libre, sin embargo el ADN de los organismos eucariotes se encuentra organizado en una estructura altamente condensada conocida como cromatina que puede limitar el acceso de la maquinaria de reparación hacia las zonas dañadas (revisado en Lydall D., *et al.* 2005).

1.2 Cromatina

La estructura primaria de la cromatina está formada por el nucleosoma, el cual está formado a su vez por un octámero de proteínas histonas: H2A, H2B, H3 y H4. Los nucleosomas permiten el enrollamiento de 146 pares de bases del ADN, estando unidos entre sí por la histona H1. Posteriormente los nucleosomas se organizan en estructuras de orden mayor como las fibras de 30 nm, para seguirse condensando hasta formar los cromosomas. De esta manera el ADN de los organismos eucariotes se condensa dentro del núcleo. (Figura 3) (Revisado en Lydall D., *et al.* 2005; y Zhang L., *et al.* 2009).

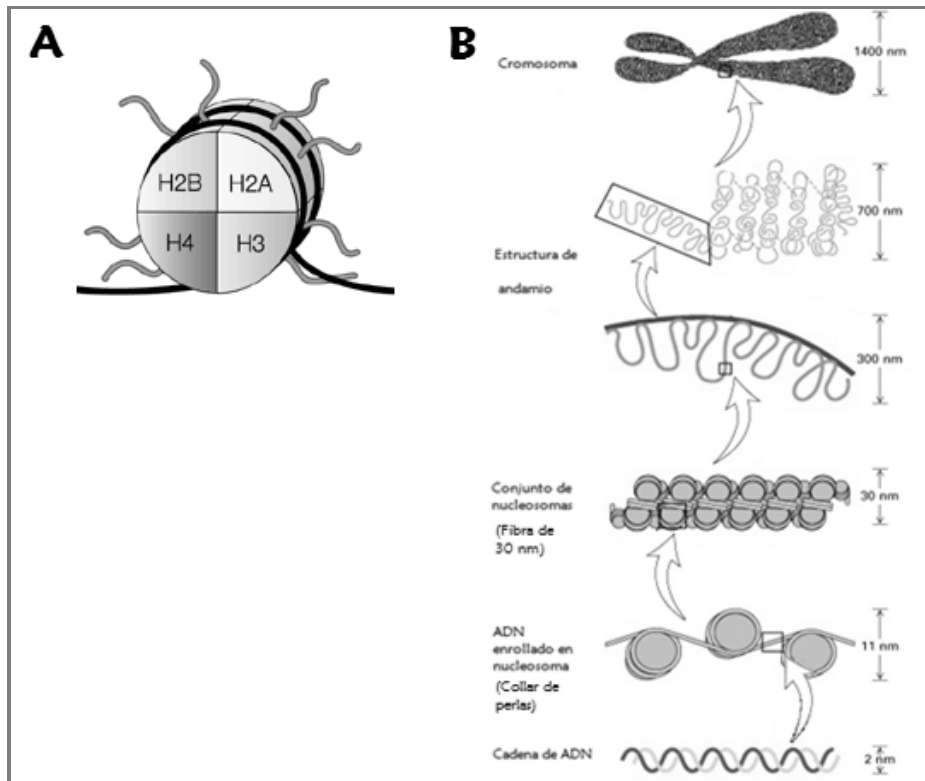


Figura 3. Cromatina. **(A)** Representación esquemática del nucleosoma (Marks P. A., *et al*, 2001) **(B)** Condensamiento del ADN en nucleosomas y sus demás estructuras. (Modificado de Annunziato A., 2008)

La cromatina se encuentra en distintas configuraciones que son llamadas eucromatina y heterocromatina. La eucromatina se refiere al estado en el cual la cromatina se encuentra descondensada debido a la baja densidad de nucleosomas; la heterocromatina en cambio se refiere a regiones de la cromatina que se encuentran compactas a causa de la alta densidad de nucleosomas, y se dice que esta cromatina se encuentra en su mayoría de manera inactiva. La heterocromatina puede ser constitutiva, es decir que se encuentra permanentemente compacta, o facultativa, que puede pasar de un estado compacto a uno más relajado dependiendo de la actividad transcripcional que varía por su condición entre los distintos tipos celulares o en diferentes etapas del desarrollo (revisado en Allis C.D., 2007).

Pero para que sea posible llevar a cabo los diferentes procesos nucleares como la reparación por REN en un contexto de cromatina es necesario que esta estructura se relaje, permitiendo la reparación del ADN dañado y que posteriormente regrese a su estado original, por lo tanto la cromatina es una estructura dinámica (Lydall D., *et al.* 2005; Zhang L., *et al.* 2009).

Hasta el momento se conocen varias maneras por las cuales se mantiene el dinamismo de la cromatina; por ejemplo con ayuda de complejos multiprotéicos que dependan de ATP para remodelar a los nucleosomas y/o mediante el intercambio de alguna de las histonas del nucleosoma por su variante correspondiente, o el caso más estudiado, a través de modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas entre las que destacan la fosforilación, acetilación y metilación (revisado en Felsenfeld G., *et al.* 2003).

1.3 Modificaciones en las colas de las histonas

Estas marcas suelen asociarse a estados activos o inactivos de la cromatina, dependiendo de la marca o del contexto de ésta. Se conocen varias modificaciones que pueden sufrir las colas de las histonas, entre las que se destacan la acetilación, la fosforilación, y la metilación (Figura 4) (revisado en Allis C.D., 2007).

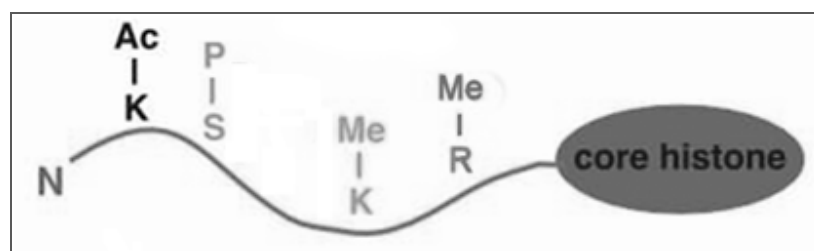


Figura 4: Modificaciones en las colas de las histonas. La acetilación ocurre generalmente en los residuos de lisinas, la fosforilación en serinas, y la metilación se encuentra en lisinas y argininas (Marmostein R *et al.*, 2001).

1.4 Proteínas de la cromatina

Para poder mantener su dinamismo, la cromatina necesita muchas proteínas que le permitan establecer patrones a lo largo de los cromosomas, así como otras que puedan reconocer patrones ya puestos. Se cuenta por lo tanto con una gran red de proteínas como acetil- y metil- transferasas (encargadas de poner marcas de acetilación y metilación respectivamente), así como desacetilasas y desmetilasas (encargadas de remover marcas de acetilación y metilación respectivamente) (Cheng X., *et al.* 2010).

1.4.1 Metil-transferasas de las colas de las histonas

Las metilaciones en las histonas pueden estar asociadas en mecanismos que sirven para reprimir o activar la transcripción en la cromatina, los residuos de histonas con esta modificación marcan la diferencia. La metilación es altamente específica y sus principales blancos son los residuos de lisinas y argininas. Los residuos que más comúnmente se encuentran asociados a sitios de represión de la transcripción son las lisinas 9 y 27 de la histona 3 (K9H3 y K27H3 respectivamente) y la lisina 20 de la histona 4. Las proteínas encargadas de llevar a cabo esta modificación post-traducciona son llamadas metil-transferasas y la molécula encargada de metilar el residuo de K9H3 se llama **Su(Var)3-9** por ser un supresor del fenotipo variegado ocasionado por la heterocromatinización en algunas células de regiones específicas en los cromosomas que pueden reprimir la expresión genética (Kouzarides T., *et al.* 2007).

1.4.2 Desmetilasas de las colas de las histonas

Recientemente se encontraron familias de proteínas capaces de remover las marcas de metilación de las lisinas en las histonas y una de ellas fue nombrada

inicialmente JumanjiD2A (JMJD2A), pero posteriormente se nombró Lysine Demethylase (KDM4) (Figura 5) (Klose R. J., *et al.* 2007; Whetstine J.R., *et al.* 2006).

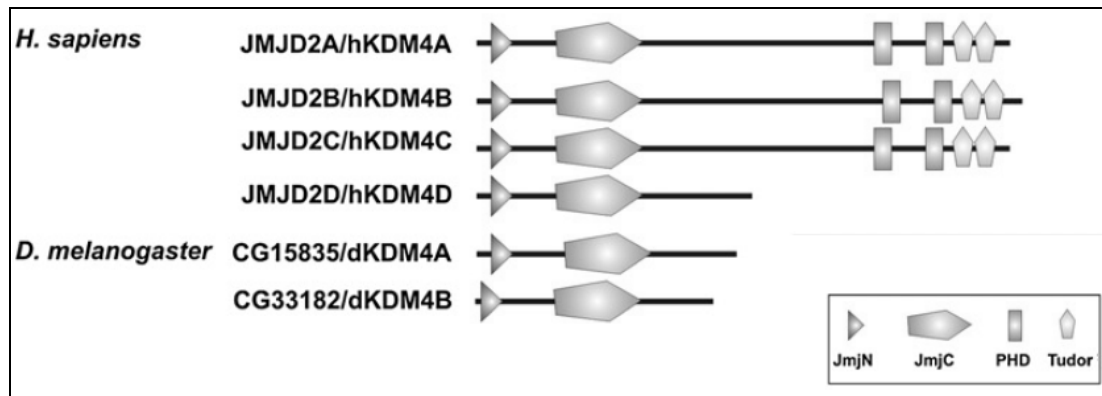


Figura 5. Representación esquemática de los miembros de la familia KDM4. El dominio JmjC es el dominio catalítico; el dominio JmjN no tiene una función conocida pero se sabe que es esencial; los dominios PHD y Tudor (presentes solamente en las proteínas humanas) son dominios de unión a histonas modificadas (C-H. Lin, *et al.*, 2008).

A diferencia de las proteínas de la familia KDM4 en humanos, en *D. melanogaster* no se encuentran los dominios de unión a ADN o a otras proteínas que le den estabilidad a las desmetilasas, como los dominios PHD, Tudor y el dedo de zinc C5HC2. (Klose R. J., *et al.* 2007). Sin embargo se ha encontrado evidencia de que la proteína asociada a heterocromatina (HP1) se asocia con una desmetilasa de la familia KDM4, y estimula su actividad en *D. melanogaster* dándole estabilidad a la unión de la proteína mediante su unión con la marca de trimetilación de la K9 de la H3 (3meK9H3) para permitir la desmetilación de la K36 de la histona H3 (Lin C.-H., *et al.* 2008).

1.4.3 Proteína de heterocromatina 1 (HP1)

La proteína de heterocromatina 1 (HP1) fue descubierta en *Drosophila melanogaster* asociada a cromatina silenciada (heterocromatina) y telómeros. Estudios moleculares pronto demostraron que se encuentra ampliamente conservada en muchos organismos, desde levadura hasta mamíferos (Fanti L., *et*

al. 2008). Existen 3 variantes (nombradas HP1 α , HP1 β y HP1 γ) que generalmente se codifican en diferentes genes y que no tienen homología entre ellas, y cada una se ha encontrado asociada a diferentes actividades y a diferentes tipos de cromatina. (Zeng W., *et al.* 2010).

En general HP1 α es una proteína que también se encarga de darle mantenimiento a la heterocromatina, así como en activación transcripcional de genes en regiones de heterocromatina y eucromatina (Lin C.-H., *et al.* 2008; Zeng W., *et al.* 2010). Se asocia con varias proteínas: factores transcripcionales, reguladores de cromatina y factores de replicación, y también se le ha encontrado una gran afinidad por la marca de 3meK9H3 asociada a represión (Ball A. R., *et al.* 2009).

Esta asociación con la marca 3MeK9H3 se debe a que tienen 2 dominios conservados que les permiten diferentes interacciones: el dominio Shadow le permite interactuar con otras proteínas, entre las cuales está la metiltransferasa Su(var)3-9 e incluso la misma HP1; y el dominio Chromo que es el que le permite reconocer la 3meK9H3 (Veermak D., *et al.* 2009).

1.5 La reparación por escisión de nucleótidos (REN) y la cromatina

El daño al ADN causado por la irradiación con UV desencadena una serie de respuestas celulares en las que se incluye la transcripción de genes, para permitir que los mecanismos de reparación tomen lugar, por ejemplo, se suele inducir la monoubiquitinación de las histonas H2A que se encuentran adyacentes al daño (Zhang L., 2009). Otra respuesta al daño inducido por luz UV es la fosforilación de la variante de histona H2AX en los fibroblastos humanos (Zhang L., 2009). También se ha encontrado que durante el daño producido por irradiación con UV la metilación de la lisina 79 de la histona H3 (K79H3) ayuda a prevenir la formación de heterocromatina, esta marca incluso se encuentra muy poco en regiones de heterocromatina. Aunque la metilación en estos residuos no parece inducirse por el daño, juega un papel importante en la supervivencia de las células

de levadura después de que sufren daño por UV. Además las células deficientes en la metilación de K79H3 muestran una importante reducción en el mecanismo REN (Zhang L., 2009; Chaudhuri S., 2009).

La acetilación de residuos de histonas ha sido la marca más estudiada asociada al mecanismo de reparación REN. Se encontró que al inhibir la actividad de las proteínas desacetilasas de histonas (HDACs por sus siglas en inglés) se puede mejorar la reparación del ADN después de que éste sufre daño por luz UV en células humanas. Como el mecanismo REN es el mayor mecanismo de reparación del ADN contra los daños por luz UV, esto propone una relación entre la acetilación y el mecanismo REN (Zhang L., 2009). También se ha demostrado una relación entre la actividad de las acetil-transferasas de histonas (HATs por sus siglas en inglés) de las histonas H3 cuando hay daño al ADN inducido por luz UV. Al irradiar con luz UV células de levadura, se produce un aumento de la acetilación de las lisinas 9 y 14 de la histona H3 (AcK9H3 y AcK14H3 respectivamente) (Rubbi C.P., *et al.* 2003). Todo esto sugiere un aumento de la acetilación como un paso anterior al inicio del mecanismo REN. Las HATs son entonces las enzimas que facilitan la entrada de la maquinaria REN. En células humanas también se observó un aumento de los niveles de acetilación de la lisina 9 de la histona H3 al ser irradiadas con luz UV (Rubbi C.P., *et al.* 2003).

1.5.1 REN y HP1

A las diferentes variantes de HP1 se les ha encontrado funciones en diversos tipos de reparación de ADN (Ball A. R., *et al.* 2009). Las variantes HP1 β y HP1 γ se han encontrado concentradas en regiones que han sufrido daño por luz UV, sin embargo este reclutamiento parece ser independiente de la maquinaria de REN; también se han encontrado estas variantes en regiones con doble rotura de la

cadena de ADN, causada por rayos ionizantes, y se ha visto que tienen papeles redundantes en la respuesta al daño al ADN (Luijsterburg M, *et al.* 2009).

Aunque la variante HP1 α ha sido la más estudiada y caracterizada, aún no ha sido reportado su papel el daño al ADN por parte de la luz UV, sin embargo se ha visto que en otros tipos de daño, como en la radiación ionizante que causa doble rotura de la cadena, es reclutada a las regiones del daño donde ocurre dicha rotura (Chiolo I, *et al.* 2011).

1.6 La fosforilación de la serina 10 de la histona H3

Otro aminoácido que sufre modificaciones es la serina 10 de la histona 3, que se encuentra adyacente a la lisina 9. Esta es una modificación muy interesante ya que se le ha visto asociada tanto a eventos que requieren que la cromatina este compactada, como la mitosis, y a otros que requieren una cromatina más relajada, como es la transcripción. Por lo tanto no es de extrañar que hasta ahora se hayan identificado diversas proteínas encargadas de fosforilar este residuo dependiendo de la respuesta que se necesite (Prigent C., *et al.* 2003). Sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado su función en el daño al ADN.

Se ha visto que esta marca es antagonista a la metilación de la lisina 9 (Prigent C., *et al.* 2003) y que en el caso de que se requiera una activación, es necesario que ocurra la fosforilación de este residuo para que HP1 α se disocie de la cromatina (Fischle W., *et al.* 2005).

Una de las proteínas que se ha visto que tiene actividad de cinasa en este residuo es JIL-1, identificada inicialmente como una proteína implicada en la compensación de dosis génica, cuya ausencia repercutía significativamente en la estructura cromosomal (Boeke J., *et al.* 2010).

II. Antecedentes

2.1 *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio

En el laboratorio se trabaja con *D. melanogaster* ya que, entre muchas otras ventajas, existe una conservación en los procesos biológicos entre este organismo y los mamíferos. Aproximadamente 75% de los genes relacionados a enfermedades humanas tienen un gen equivalente en *D. melanogaster* (Reiter L.T., 2001). Además *D. melanogaster* también presenta las modificaciones anteriormente mencionadas en las colas de histonas, entre ellas la AcK9H3 y la 3meK9H3.

2.2 El mecanismo REN y la cromatina en *Drosophila melanogaster*

Similar a lo encontrado en células humanas, en nuestro laboratorio se demostró que en *D. melanogaster* también se presenta un incremento en los niveles de acetilación de la histona H3 después de la irradiación con luz UV, específicamente en las lisinas 9 y 14 de la histona H3 (Figura 6) (Rebollar E., 2006).

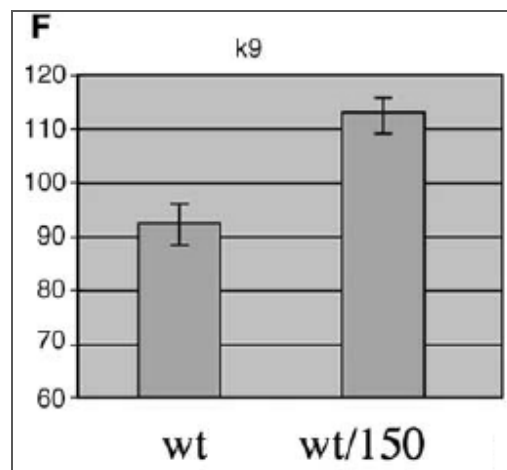


Figura 6. Aumento de los niveles de la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 después del daño al ADN inducido por luz UV en larvas de 3er instar de moscas silvestres. Se muestra la diferencia en la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 en dos condiciones:

Larvas sin irradiar (wt) y larvas irradiadas (wt/150 J), contra la intensidad del fluoróforo, obtenido mediante inmunofluorescencias. Los datos se obtuvieron al cuantificar la intensidad de la señal de fluorescencia en preparaciones de cromosomas politénicos con un anticuerpo que reconoce específicamente a la acetilación en el residuo de la lisina 9 de la histona H3 (Rebollar, Eria *et. al.* 2006).

En base a esto se decidió estudiar el papel que presenta la metilación (en específico la 3meK9H3) después del daño al ADN producido por luz UV. Se observó una disminución de esta marca después de la irradiación con luz UV en *D. melanogaster* (Figura 7) (Palomera-Sánchez Z., *et al.* 2010). Esto correlaciona con los datos antes mencionados para la acetilación de las histonas (marca antagónica de la metilación en la K9 de la H3). Es decir que después del daño al ADN con luz UV disminuye la metilación de la H3K9 para posteriormente incrementar los niveles de acetilación, lo cual relaja a la cromatina para poder permitir que la maquinaria de reparación tenga acceso al ADN dañado.

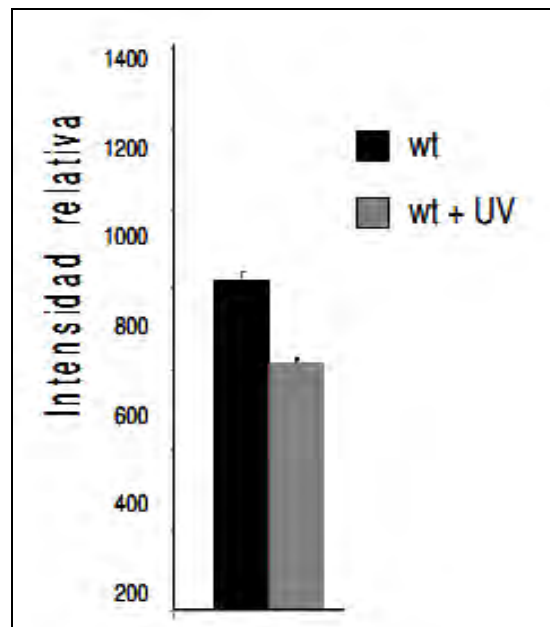


Figura 7. Disminución de los niveles de metilación de la lisina K9 de la histona H3 en moscas de tipo silvestre después de ser irradiadas por luz UV. Se muestran las 2

condiciones contra la frecuencia, obtenido mediante ensayos de inmunofluorescencia (Palomera-Sánchez Z., *et al.* 2010)

Recientemente se reportó que la desmetilasa dKDM4B puede remover los grupos metilo presentes en la K9 de la H3. Por lo tanto para analizar la participación de la proteína dKDM4B en respuesta al daño causado por luz UV, se hizo un análisis del transcrito de esta proteína donde se observó un aumento de su expresión después de la irradiación de las larvas de *D. melanogaster* con luz UV (Figura 8), lo que sugiere que la enzima podría estar participando en remover la marca de 3meK9H3 (Palomera-Sánchez Z., *et al.* 2010).

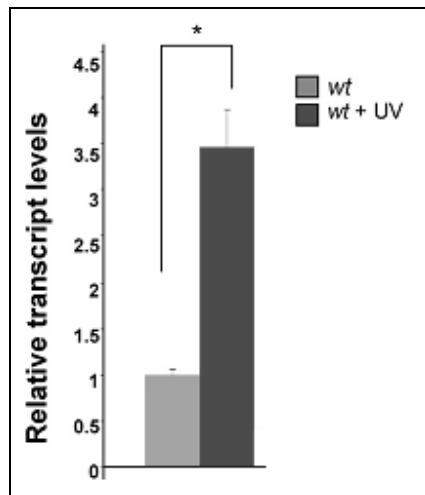


Figura 8. Aumento de niveles de expresión de la proteína dKDM4B en larvas de moscas de tipo silvestre que sufrieron irradiación UV con respecto a las moscas que no fueron irradiadas. Se muestran las 2 condiciones contra la cantidad de transcrito, obtenido mediante RT-qPCR (Palomera-Sánchez, Zoraya *et al.* 2010).

Por otro lado una mosca que tiene una inserción de un elemento P en el primer exón del gen que codifica para la proteína KDM4B ($[EP]dKDM4B$), en la que hay una disminución de la expresión de dicha proteína y se observó que además son más sensibles a la irradiación con luz UV (Figura 9) (Palomera-Sánchez Z., *et al.* 2010).

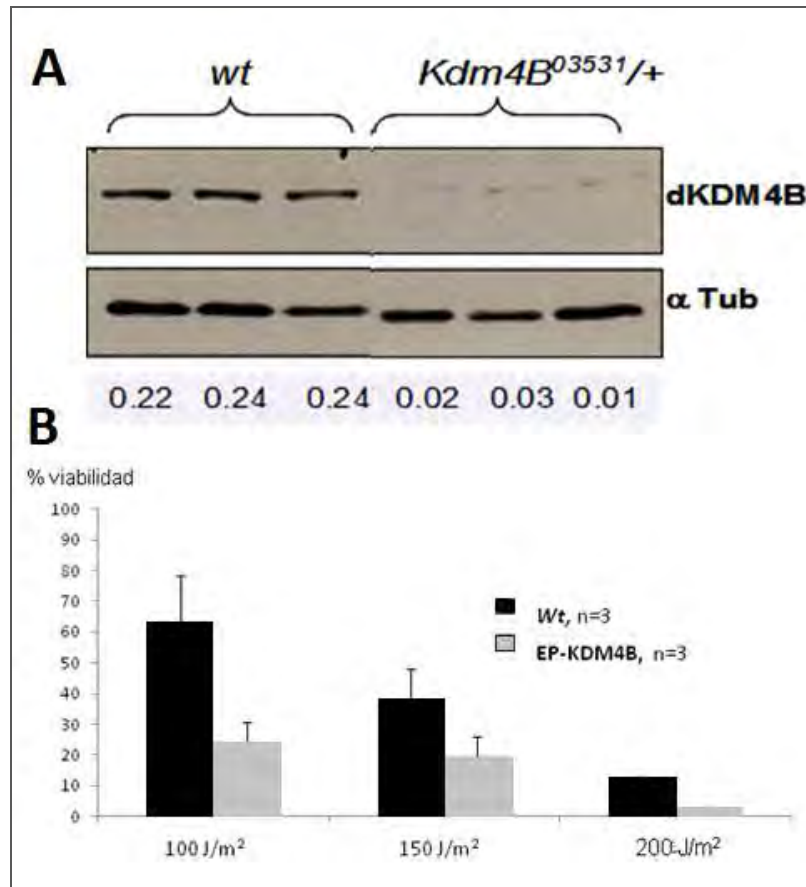


Figura 9. Moscas con la inserción del elemento P tienen diferencias con respecto al tipo silvestre. **(A)** Disminución de la proteína dKDM4B en la línea ^[EP]dKDM4B. Análisis tipo Western de extractos solubles de las glándulas salivales de larvas de moscas de tipo silvestre (WT) y de glándulas de larvas de moscas con la inserción ^[EP]dKDM4B usando el anticuerpo Ac.KDM4B y Ac. β Tubulina. Las intensidades relativas se calcularon con respecto a β Tubulina. **(B)** Sensibilidad de la viabilidad de moscas adultas a la irradiación con luz UV a 100, 150 y 200 J/m² respectivamente. En negro se muestra a las moscas adultas de tipo silvestre y en gris a las moscas con la inserción ^[EP]dKDM4B. (Palomera-Sanchez, Zoraya *et. al.* 2010).

Con estas moscas fue posible comparar los niveles de la marca 3meK9H3 con respecto a las moscas de tipo silvestre (en condiciones normales y con irradiación ultravioleta), observando primero que en las moscas silvestres los niveles disminuyen en las moscas irradiadas con respecto a las condiciones basales, caso que no ocurre con las moscas mutantes, donde los niveles de la

marca eran mucho más elevados que los basales incluso en condiciones normales (sin irradiación UV) (Figura 10) (Palomera-Sánchez Z., *et al.* 2010).

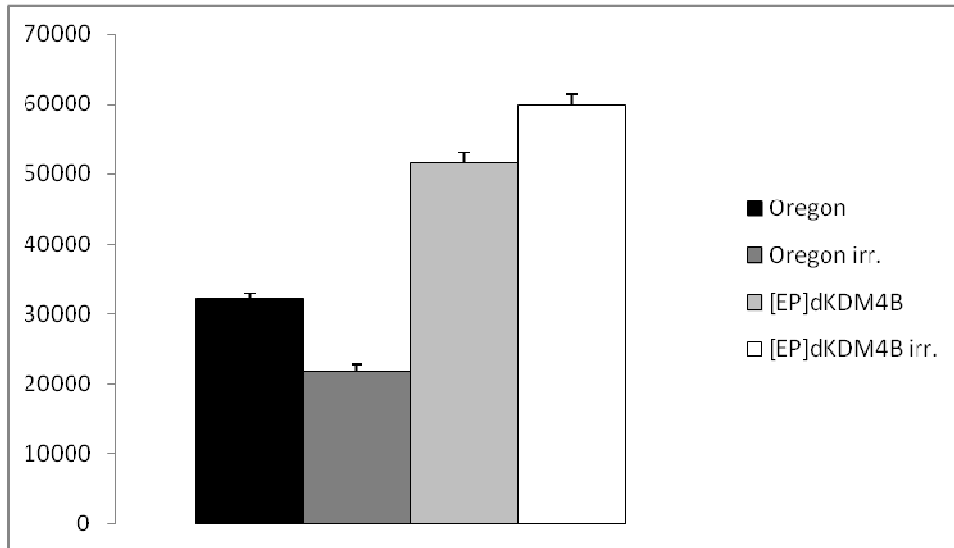


Figura 10. Gráfica de la cuantificación de los niveles de 3meK9H3 en las moscas de tipo silvestre, después de ser irradiadas con luz UV, y de las moscas mutantes antes y después de ser irradiadas (Palomera-Sanchez, Zoraya *et al.* 2010).

Además se vio que estas moscas mutantes tienen fallas en la remoción de los dímeros de pirimidina después de irradiarlas con luz UV, esto en comparación con las moscas de tipo silvestre (Figura 11).

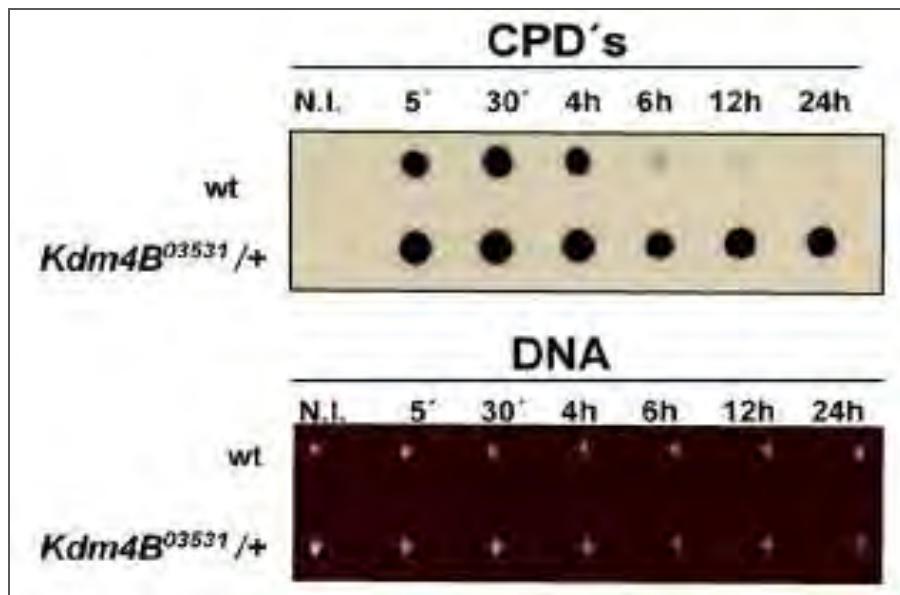


Figura 11. Desaparición de los dímeros de pirimidina (CPD's) en moscas de tipo silvestre y mutantes después de ser irradiadas con luz UV. En este ensayo de Dot-Blot se puede observar que en las moscas de tipo silvestre (wt) hay una disminución de la presencia de dímeros de pirimidina a partir de las 4 horas post-irradiación, desapareciendo por completo a las 24 horas (panel superior). En las moscas mutantes, sin embargo, no es posible eliminar estos errores incluso después de 24 horas post-irradiación. En la parte inferior se muestra el control de carga de ADN en todos los casos (Palomera-Sanchez, Zoraya *et. al.* 2010).

Esto da evidencias de que la proteína dKDM4B está participando directamente en la remoción de la marca de 3meK9H3 cuando se está induciendo daño al ADN con irradiación UV.

A partir de la información anterior, decidimos extender nuestros estudios respecto a la dinámica de la heterocromatina, utilizando a la proteína HP1 α como marca de heterocromatina, esto en respuesta al daño en el DNA por radiación UV. Por lo tanto se plantearon los siguientes objetivos:

III. Objetivo General

Analizar los cambios de la heterocromatina cuando esta sufre daño por parte de la irradiación UV, mediante el análisis de la proteína asociada a ella HP1 α .

3.1 Objetivos Particulares

1. Identificar cambios en la unión de la proteína HP1 α a la cromatina en cromosomas politénicos cuando se induce daño al ADN por radiación UV.
2. Tratar de identificar cambios de HP1 α en tejido de glándulas salivales de larvas de *Drosophila melanogaster*.
3. Identificar si la fosforilación de la serina 10 de la histona 3 cambia cuando hay daño a la cromatina causado por radiación UV.

IV. Materiales y métodos

4.1 Realización de las inmunotinciones de cromosomas politénicos

a. Líneas de *Drosophila*, obtención de larvas de tercer instar e irradiación con luz UV

Las líneas utilizadas fueron: moscas de tipo silvestre *OreR*, línea mutante para la proteína JIL-1 (número 21352 del banco de moscas de Bloomington), balanceadas con TM6B^D. Se ponen a ovocitar en botellas de plástico con un medio de cultivo de piloncillo y se almacenan a 18° C. Esta temperatura hace que el metabolismo de la mosca sea más lento, por lo que se obtienen larvas más grandes y por lo tanto glándulas salivales de mejor tamaño. La recolección de las larvas de tercer instar debe ser de 6 a 9 días después de que las moscas ovocitaron. Para la irradiación con luz UV se toman las larvas de 3er instar, se acomodan en cajas *petri* y se irradian con luz UV a una intensidad de 150 J/m²; se dejan recuperar durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz (Palomera-Sanchez Z. *et al.*, 2010).

b. Obtención de glándulas salivales y preparaciones cromosomales (*Squash*)

Se disecan las glándulas salivales de las larvas de tercer instar en una solución de cloruro de sodio al 0.7% con ayuda de un microscopio estereoscópico, tanto las de tipo silvestre como las irradiadas (dejándolas recuperarse durante media hora). Una vez disecadas las glándulas se tratan en una solución fijadora (tritón al 1%, y paraformaldehído al 10% diluidos en PBS 1X) durante 10 segundos, a continuación se pasan a una solución de lisis (ácido acético al 50% y paraformaldehído al 10% diluidos en H₂O) durante 2 minutos. Posteriormente se hacen los *Squash* de los cromosomas en

portaobjetos tratados con Poli-L-Lisina y cubreobjetos previamente siliconizados con Sigmacote (Sigma) presionando con el dedo pulgar y deslizándolo por toda la preparación. Se requiere de un par de glándulas por preparación. Para almacenar las preparaciones se sumergen en nitrógeno líquido y se guardan en metanol al 100% a 4° C (Zink D. *et al.*, 1995; Lavrov S. *et al.*, 2004).

c. Inmunofluorescencias

Para quitar el metanol de las preparaciones se enjuagan 7 veces con PBS 1X. Después se incuban con un anticuerpo que reconoce a la proteína HP1 (C1A9 del Banco del Hibridoma) a una concentración 1:200, o con el anticuerpo que reconoce la marca de fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (Upstate) a una concentración de 1:200, preparados en leche al 1% (diluida en PBS 1X con detergente Igepal (Sigma) al 0.1%), y se deja incubando toda la noche a 4° C. Posteriormente se enjuagan las preparaciones 10 veces con Igepal al 0.1% diluido en PBS 1X, y se aplica el anticuerpo secundario anti-mouse (Alexa) a una concentración 1:500 en leche al 1% (diluida en PBS 1X con Igepal al 0.1%) y se deja incubar 2 horas a temperatura ambiente. Por último cada preparación se lava 3 veces con 1 ml de Igepal al 0.1% en PBS 1X durante 5 minutos en agitación, se agregan 20 µl de citifluor y se sellan (Palomera-Sanchez Z. *et al.*, 2010).

d. Análisis de la intensidad de HP1

i. Captura de imágenes

Se lleva a cabo la captura de imágenes en el microscopio confocal, el cual a través de la técnica de contador de fotones asignará valores a la intensidad de la fluorescencia que emite el anticuerpo secundario; tomando la mayor intensidad como un valor máximo de 256 píxeles y el mínimo valor de ausencia de fluorescencia como 0 (Rebollar E. *et al.*, 2006).

ii. Cuantificación de HP1 y análisis estadístico

Posteriormente a través del software ImageJ se hace la cuantificación de los pixeles en varios cromosomas y los datos obtenidos se grafican en un histograma. Por último se calcula el área bajo la curva de cada histograma, se obtiene la desviación estándar y a través de la prueba de Chi cuadrada (X^2) se validará si la diferencia entre la distribución de los datos es significativa (Rebollar E. *et al.*, 2006).

4.2 Inmuno-tinción de glándulas salivales de larvas de moscas de tipo silvestre

Se disecan 15 glándulas salivales de larvas de tercer instar de moscas de tipo silvestre en PBS1X. Se lavan con agua bi-destilada y se fijan en Buffer Ruvkun (KCl 80mM, NaCl 40mM, EGTA 20mM, espermidina 10mM, PIPES 30mM pH 7.4, metanol 50%) con formaldehído al 2% durante 3.5 horas a 4° C. Se da un lavado con Buffer Tris/Tritón (Tris 100mM pH7.4, tritón X-100 1%, EDTA 1mM). Se permeabilizan las membranas incubando en Buffer Tris/Tritón con 1% β -mercaptoetanol durante 4 horas en agitación leve a 4° C. Se lavan con Buffer BO_3 (H_3BO_3 0.01mM pH9.2, NaOH 0.01M) y se incuban en buffer BO_3 con DTT 10mM en agitación leve a 37° C durante 15 minutos. Se lavan con buffer BO_3 y se ponen a incubar en Buffer B (BSA 0.1%, tritónX-100 0.5%, EDTA 1mM) durante 30 minutos en agitación leve a temperatura ambiente. Se bloquean durante toda la noche en Buffer A (Buffer B con BSA 1%). Se incuban las glándulas con el anticuerpo para HP1 (C1A9 del Banco del hibridoma) en una concentración 1:500 diluido en Buffer A durante toda la noche en agitación leve a 4° C. Se dan 5 lavados de 30 minutos con Buffer B y se incuban con anticuerpo secundario anti-mouse (Alexa) en una concentración 1:2,000 en Buffer A durante 3.5 horas en agitación leve a 4° C. Se lava 2 veces con Buffer C (BSA 0.1%, tritónX-100 0.5%) durante 30 minutos en agitación leve a temperatura ambiente. Se incuban en Buffer C con 100 μ M RNAsa y

10% Buffer H (KCL 750mM, Tris-HCl 500mM pH7.5, MgCl₂ 30mM) durante 1 hora a 37° C en agitación leve. Se incuban con SytoxGreen 0.01 μM diluido en Buffer B en agitación leve a temperatura ambiente o con Ioduro de Propidio 0.5μM diluido en Buffer B durante 15 minutos a 37° C. Se dan 5 lavados con Buffer B durante 30 minutos y uno final con PBS1X. Se montan en albercas con citifluor y se observan en microscopía de fluorescencia (Bettinger J.C. *et al.*, 1996).

4.3 Ensayos tipo Western Blot de larvas y glándulas de larvas de tercer instar de moscas de tipo silvestre

a. Obtención de extractos proteicos totales de larvas completas y de glándulas salivales de larvas de tercer instar

Para las larvas completas se homogenizan las larvas de tercer instar de tipo silvestre en un tubo con buffer de lisis (Tris 0.05 M pH7.5, KCl 0.25 M, MgCl₂ 5mM, EDTA 5mM, sacarosa 8.5%, SDS 1%, 1μM de inhibidor de proteasas Complete (Roche)) y se centrifugan las muestras a 10,000 g durante 10 min y se conserva el sobrenadante (Maniatis *et al.*, 1987).

Para las glándulas se disecan 15 pares de glándulas en NaCl al 0.7%. Se resuspenden en Buffer de lisis y se hierven en Buffer de laemmli 2X.

b. Corrida en gel de acrilamida

Se cargan 50μg del extracto de proteínas de larvas completas con 2X de buffer Laemmli (SDS 4%, glicerol 20%, Tris 0.125 M pH6.8, azul de bromofenol 0.004%) con 1% de β- mercaptoetanol, y los extractos de las glándulas completos en un gel de acrilamida al 15%, y se corre a 80 Volts (Maniatis *et al.*, 1987).

c. Transferencia

Se pone el gel con una membrana en una cámara de transferencia inmerso en buffer de transferencia a pH8.3 (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192mM, Metanol 20%) y se corre a 80mA durante toda la noche a 4° C. Antes de sacarlo se sube el amperaje a 200mA durante 2 horas. Se trata la membrana con Ponceau (Ponceau 0.2%, ácido acético 3%) y se enjuaga con agua destilada (Maniatis *et al.*, 1987).

d. Ensayo tipo western

Se bloquea la membrana en leche al 10% diluida en PBST (PBS1X con Tween al 0.1%) en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lava la membrana con PBST. Se pone a incubar el anticuerpo que reconoce a HP1 (C1A9 del Banco del hibridoma) a una concentración de 1:1,000 en leche al 5% en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó el anticuerpo que reconoce a la β -tubulina (E7 del Banco del hibridoma) a una concentración 1:3,000 en leche al 5% en PBST durante 1 h a temperatura ambiente. Se hicieron 5 lavados en PBST durante 10 minutos cada uno en agitación a temperatura ambiente antes de poner el anticuerpo que reconoce a ratón (conjugado a peroxidasa de rábano HRP) a una concentración 1:2,000 en leche al 5% en PBST, durante 1 hora en agitación leve a temperatura ambiente. Se lavan las membranas 5 veces con PBST durante 10 minutos cada lavado en agitación leve a temperatura ambiente (Maniatis *et al.*, 1987).

e. Revelado

Se siguió el protocolo de SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate de ThermoScientific.

4.4 Obtención de ADN genómico de moscas adultas

Se trituran de 50 a 100 moscas adultas en Douncing Buffer (0.15 M NaCl, 0.01 M Tris, 0.005 M EDTA, 0.2% Igepal) y se filtran a través de una fibra de poliéster. Se recolecta el filtrado y se centrifuga durante 1 min a 14, 000 rpm. Se remueve el sobrenadante y se resuspende el pellet en 100 µl de Douncing Buffer. Se agregan 300 µl de Buffer de Lisis (0.3 M NaCl, 0.005 M Tris, 0.005 EDTA, 1% N-Sarcosil) y se mezcla suavemente. Se agregan 400 µl de fenol, agitar y centrifugar durante 5 m. a 14,000 rpm. Recuperar sobrenadante y agregar 400 µl de fenol y 400 µl de cloroformo; agitar vigorosamente y centrifugar durante 5 min. a 14,000 rpm (Repetir este último paso 3 veces). Se recupera la fase acuosa de arriba y precipitar con acetato de sodio 3 M pH 5.2 (1/10 del volumen resultante), etanol al 100% (2x volumen) y 1 µl de glucógeno a -20° C durante toda la noche. Lavar el precipitado con etanol al 70%, para posteriormente dejar secar y resuspender en agua destilada (Maniatis *et al.*, 1987).

4.5 Pruebas de sensibilidad a radiación UV en larvas

Se seleccionan larvas de tercer instar, tanto de moscas Oregon, como de las mutantes en JIL-1. Se irradiaron a las diferentes intensidades de radiación con luz UV: 50, 100; 150 y 200 J/m², así como en condiciones basales. Se pusieron en botellas con medio de piloncillo separadas de las demás a 18° C y se contó a las moscas que eclosionaron a adultas como las sobrevivientes (Palomera-Sanchez Z. *et al.*, 2010).

V. Resultados

5.1 Análisis de los niveles de HP1 α en cromosomas politénicos después de producir daño al DNA con irradiación UV.

Se hicieron preparaciones de cromosomas politénicos de 15 larvas distintas y se hizo una tinción con un anticuerpo que reconoce a HP1 para poder analizar las diferencias de la distribución de esta proteína entre las moscas de tipo silvestre (Oregon) en condiciones normales y después de irradiarlas con luz UV. En condiciones normales, la proteína se encuentra localizada en el cromocentro y a todo lo largo de los cromosomas en regiones discretas de heterocromatina. Sin embargo al irradiar con luz UV se nota una disminución de la marca, tanto en el cromocentro como en las bandas a lo largo de la cromatina (Figura 12).

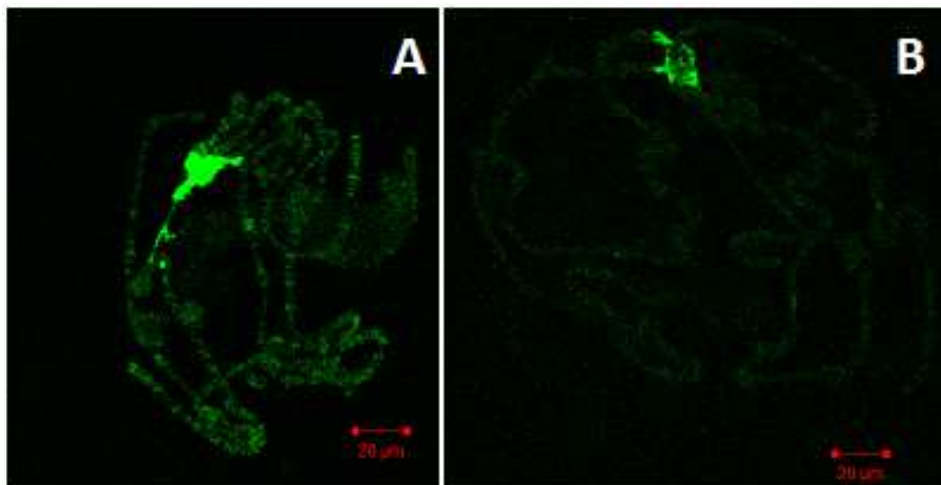


Figura 12. Ejemplos de algunas inmunofluorescencias de las preparaciones de donde se muestra a la proteína HP1 α en verde reconocida por el anticuerpo C1A9 (Banco del hibridoma) en los cromosomas politénicos de **(A)** De moscas de tipo silvestre y **(B)** e moscas de tipo silvestre irradiadas con luz UV.

Una vez que se hizo la cuantificación de los pixeles detectados por el microscopio confocal se pudo graficar el promedio de las intensidades en cada

punto, desde 0 hasta 256. En la gráfica resultante se pudo observar la diferencia entre ambas condiciones (Figura 13).

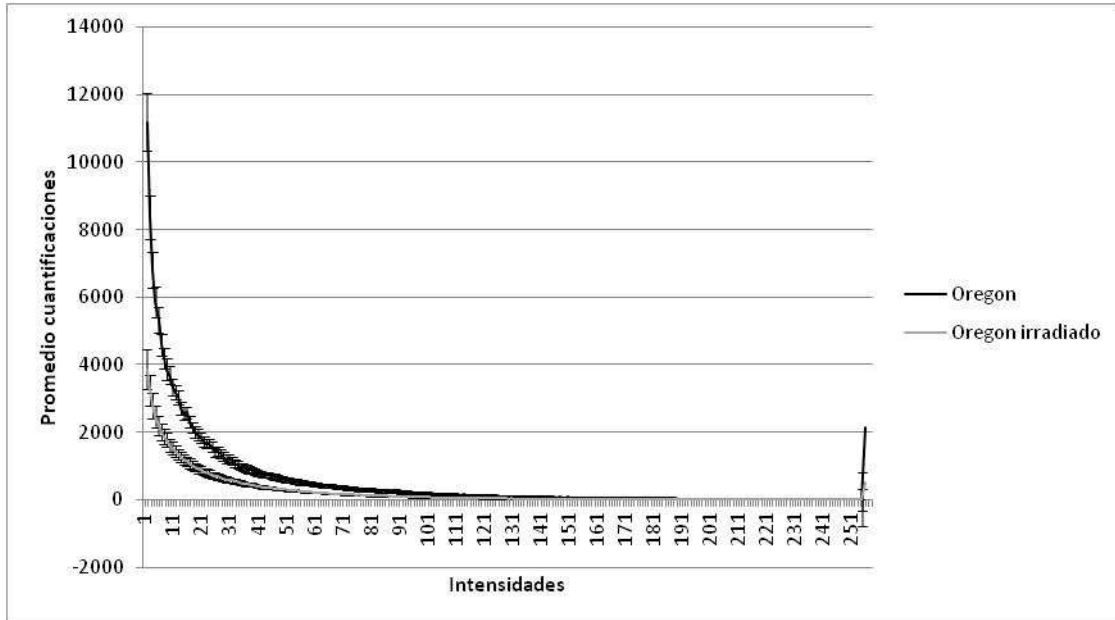


Figura 13. Gráfica de la cuantificación de los niveles de HP1 después de usar el programa ImageJ en las 2 condiciones. n=15 larvas, midiendo 10 cromosomas de cada una, las barras de error se calcularon con la desviación estándar de todos los individuos en cada valor. Se grafica el número de veces que resultó cada uno de los 256 valores asignados por el microscopio.

Para poder observar mejor la diferencia entre ambas condiciones se hizo una regresión lineal de las curvas resultantes para posteriormente integrarlas, es decir, se calculó el área bajo la curva de las dos (Figura 14). Además se llevó a cabo una prueba de X^2 para demostrar que ambas condiciones son significativamente diferentes entre sí. Todos estos resultados muestran que como respuesta al daño al DNA por radiación UV los niveles de HP1a unidos a la cromatina disminuyen tanto en el cromocentro como a lo largo de los brazos de todos los cromosomas.

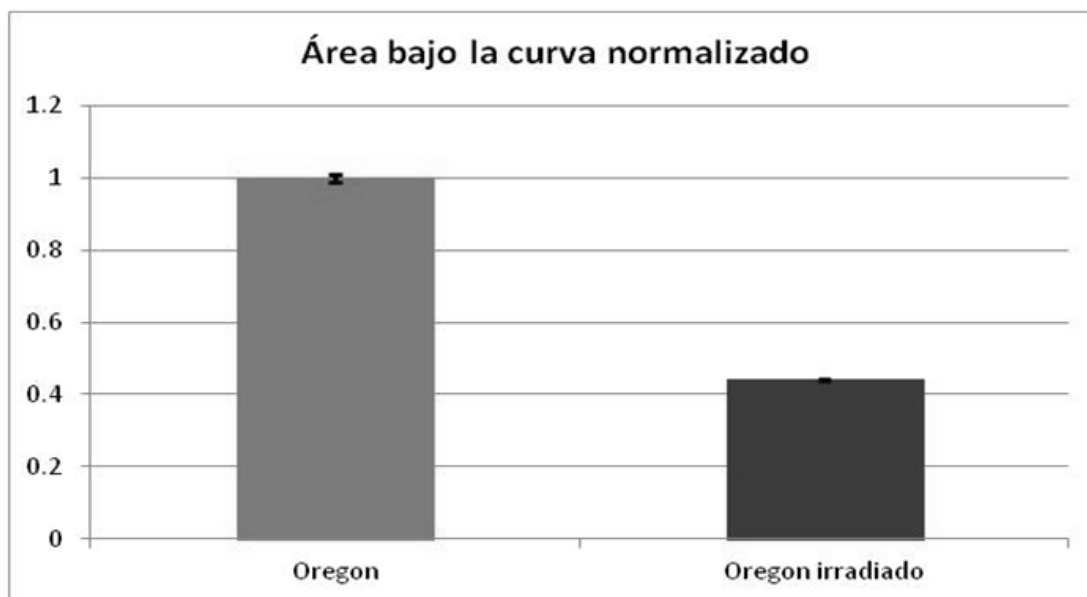


Figura 14. Representación gráfica del área bajo la curva de la gráfica de la figura anterior, los valores de las larvas sin irradiar se normalizaron a un valor de 1, y los de las larvas irradiadas se ajustaron para poder comparar. n=15 larvas, midiendo 10 cromosomas de cada una, $p < 0.001$ en las pruebas de Chi cuadrada (χ^2)

5.2 Determinación de los niveles de HP1a en larvas de tercer instar y en glándulas salivales después de irradiar con UV.

Los resultados que se obtuvieron directamente visualizando los cromosomas politénicos sugieren que la concentración de HP1 α unida a la cromatina disminuye después de irradiar con UV. Existen dos posibilidades para que esto ocurra, la primera es que los niveles totales de HP1 α se reducen por degradación como consecuencia al daño en el DNA por radiación UV y la segunda es que HP1 α se desprende de la cromatina como respuesta al daño al DNA y se distribuye en el lumen del núcleo. Para contestar esta pregunta se decidió medir los niveles de HP1 α antes y después de irradiar con UV. Para esto se hicieron ensayos tipos Western Blott para identificar a la proteína HP1 α en larvas de tercer instar completas y en extractos totales de glándulas salivales y se detectó HP1 α a diferentes tiempos después de irradiar. La figura 15 muestra que los niveles de HP1 α no disminuyen después de irradiar y se mantienen constantes en las

muestras analizadas a diferentes tiempos post-irradiación. Esto sugiere que la presencia de HP1 α disminuye en la cromatina como respuesta al daño en el DNA por medio de un mecanismo que la remueve de las regiones de heterocromatina que generalmente ocupa.

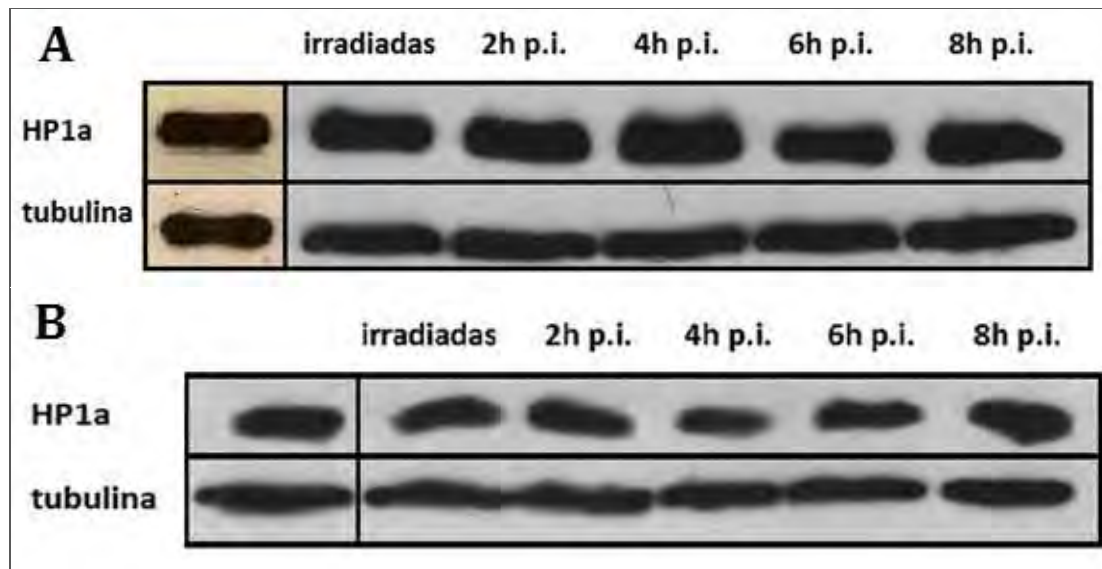


Figura 15. Revelado de membranas de extractos proteicos para identificar la presencia de la proteína HP1 en **(A)** larvas de 3er instar y **(B)** glándulas salivales de larvas de 3er instar. Se presenta al anticuerpo unido a la proteína en condiciones normales y cuando las larvas fueron irradiadas con UV. En el panel de abajo se muestra a la β -tubulina como control de carga en cada carril.

5.3 Análisis y dinámica de la distribución de HP1 α después daño al DNA por radiación UV en glándulas salivales de larvas de moscas de tipo silvestre

Ya que los niveles de HP1 α se mantienen constantes después de generar daño al DNA por radiación UV, se decidió determinar la distribución de esta proteína en el núcleo como respuesta al daño en el ADN. Para lograr esto se hicieron tinciones de glándulas salivales de larvas de moscas de tipo silvestre en condiciones normales, irradiadas, y a diferentes tiempos después de irradiación con el fin de ver si HP1 α regresa a su organización original en el núcleo durante el proceso de reparación del ADN. En la figura 16 se puede apreciar que en los

núcleos de larvas no irradiadas HP1 α se localiza principalmente en el cromocentro, en el cual la señal es mas intensa. Sin embargo después de irradiar se observa que esta señal se disipa en todo núcleo y se distribuye de manera uniforme. Interesantemente después de dos horas la señal se empieza a localizar nuevamente en un punto específico, que presumimos que es el cromocentro y a las 8 horas la distribución normal de HP1 α concentrada en el cromocentro se restablece. Estos datos sugieren que por algún mecanismo HP1 α es removida de la cromatina cuando el ADN es dañado y que se distribuye en el nucleoplasma no unida a los cromosomas. A medida que la reparación del DNA se efectúa, esta misma HP1 α se vuelve a incorporar a las regiones de heterocromatina lo que indica un restablecimiento de este tipo de cromatina después de dañar al DNA y que este es altamente activo.

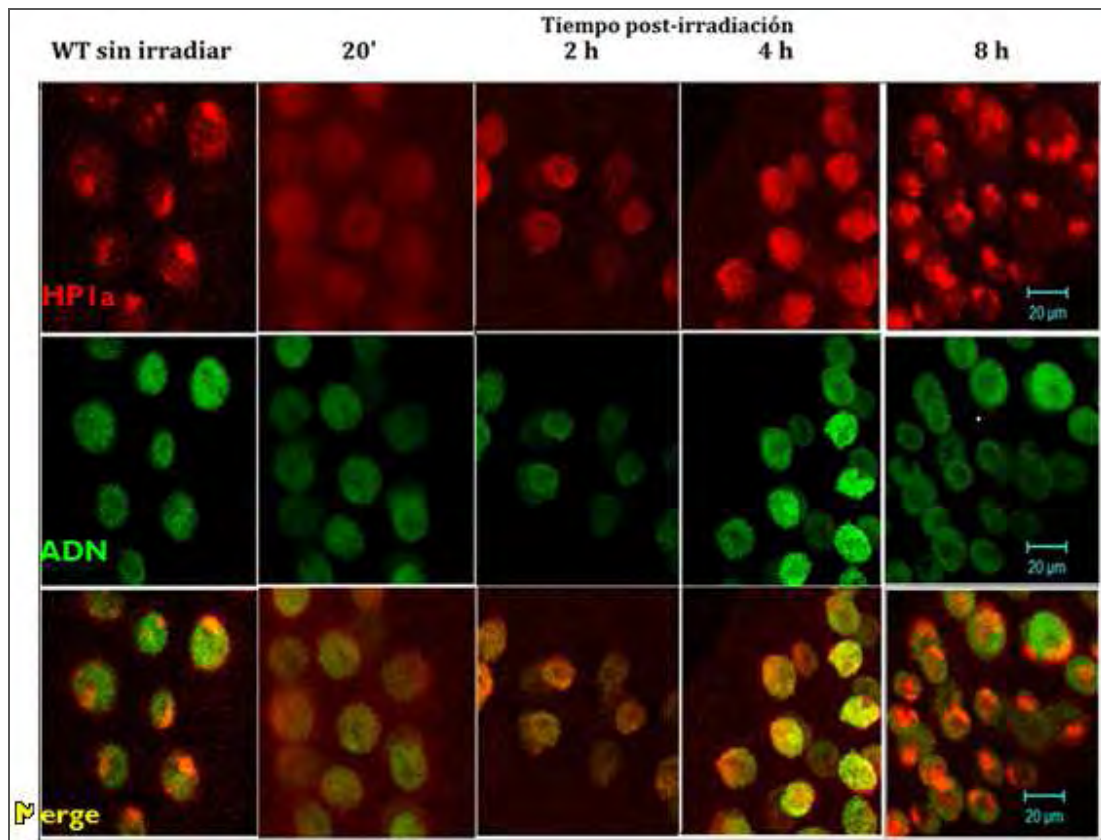


Figura 16. Acercamiento a núcleos de las glándulas salivales de 3er instar antes de irradiar y en los diferentes tiempos post-irradiación. Se muestra en el primer panel en rojo a la proteína HP1, en el segundo panel en verde el ADN (marcado con Sytox) y en el tercer panel la sobreposición de ambas.

5.4 Comparación de la marca de p-S10H3 entre cromosomas politénicos irradiados y sin irradiar

Como se mencionó en la introducción, la marca de la fosforilación de la serina 10 en la histona H3 (H3S10P) interfiere con la unión de HP1a a la lisina 9 metilada de la misma histona, por lo que se decidió evaluar si al mismo tiempo que ocurre la remoción de HP1a hay un aumento en los niveles de H3S10P. Para esto se hicieron inmunotinciones de cromosomas politénicos con un anticuerpo específico que reconoce esta marca en la cromatina comparando las condiciones de radiación y no radiación con UV.

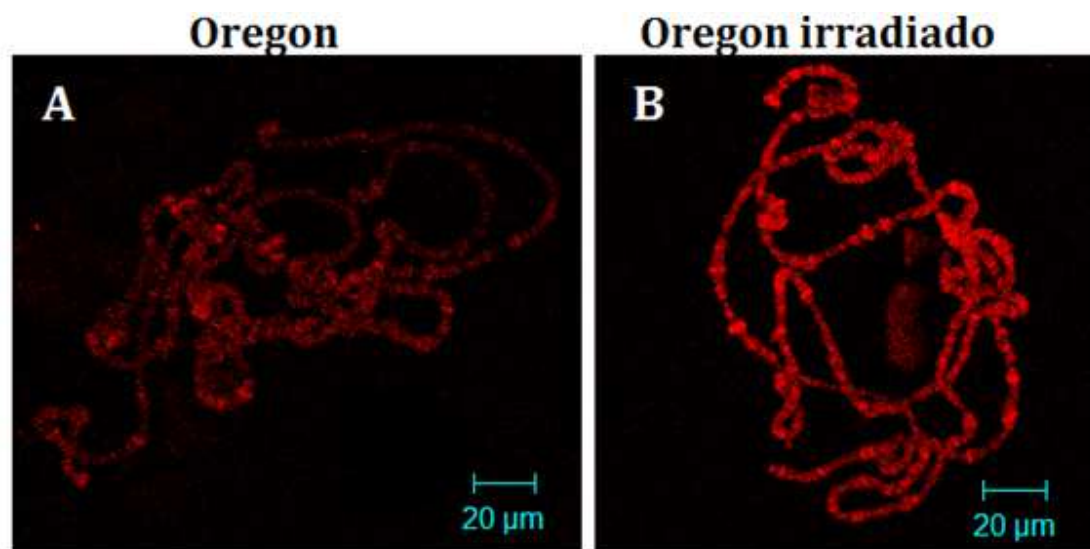


Figura 17. Ejemplos de algunas inmunofluorescencias de las preparaciones de donde se muestra a la histona 3 fosforilada en la serina 10 en rojo, reconocida por un anticuerpo que reconoce específicamente a esta marca (Upstate) en los cromosomas politénicos de **(A)** De moscas de tipo silvestre y **(B)** de moscas de tipo silvestre irradiadas con luz UV.

En la figura 17 se puede ver que cuando el ADN sufre daños por radiación UV, la marca de fosforilación de la serina 10 aumenta considerablemente, con un patrón contrario a la marca de HP1 α , cuyos niveles disminuyen considerablemente de la cromatina.

5.5 Mapeo de la inserción de una línea mutante que afecta a la cinasa de la serina 10 de la histona H3.

Ya que se vio que sí hay un aumento de la fosforilación en la serina 10 de la histona H3 como respuesta a la irradiación UV, se decidió ver si era esto lo que provocaba que HP1 α se desplazara de su lugar. Se obtuvo una línea del banco de Bloomington con una inserción en el primer intrón de la secuencia que codifica la proteína cinasa JIL-1 (una de las cinasas que fosforila al S10 de la histona H3). Para corroborar que la inserción se encuentra en ese sitio y encontrar también en qué orientación está el transposon, se diseñaron oligonucleótidos específicos que hibridan con el límite de la inserción en Jil-1 y con los límites del transposon y se utilizaron en ensayos de PCR usando DNA genómico de la mutante. Como control se utilizaron oligonucleótidos para el transposon *rover* que se encuentra muy repetido en todo el genoma de la mosca como control (Figuras 18,19). Como se puede apreciar en la figura 18, se pudo comprobar que la inserción se encuentra en el sitio en el que reporta en la base de datos del genoma de *Drosophila*.

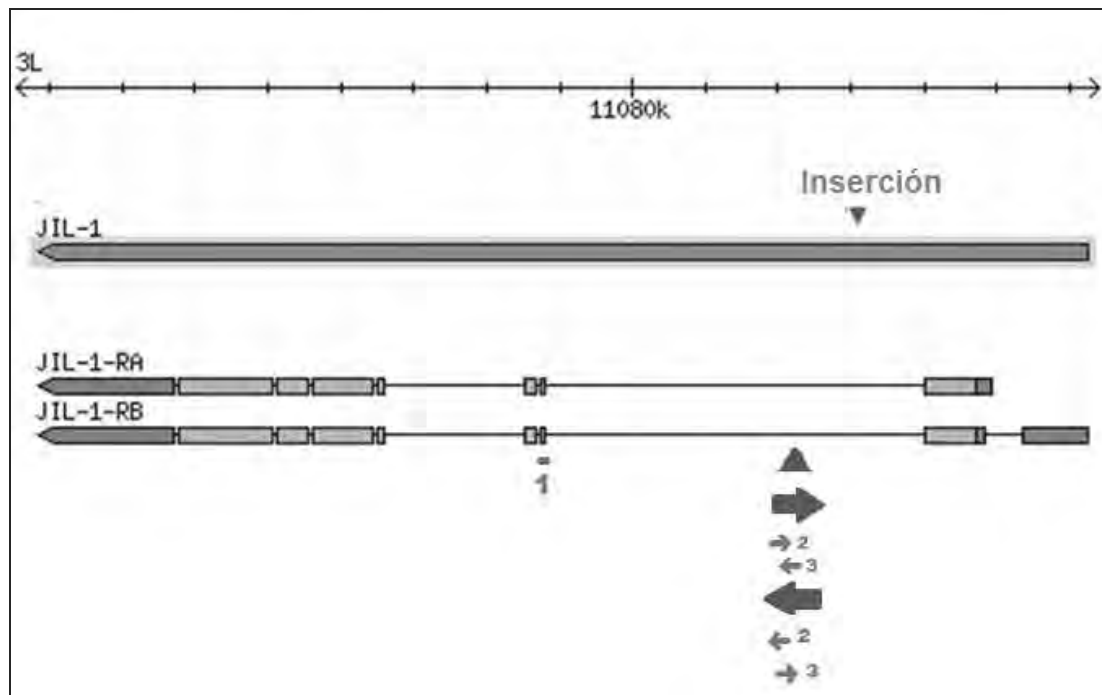


Figura 18. Esquema del gen de la proteína JIL-1 en la mosca *Drosophila melanogaster*. El triángulo representa el lugar de la inserción que causa la interrupción de la transcripción del gen. Las flechas rellenas representan las 2 posibles orientaciones de la inserción, y en las flechas pequeñas numeradas se presentan los oligonucleótidos utilizados.

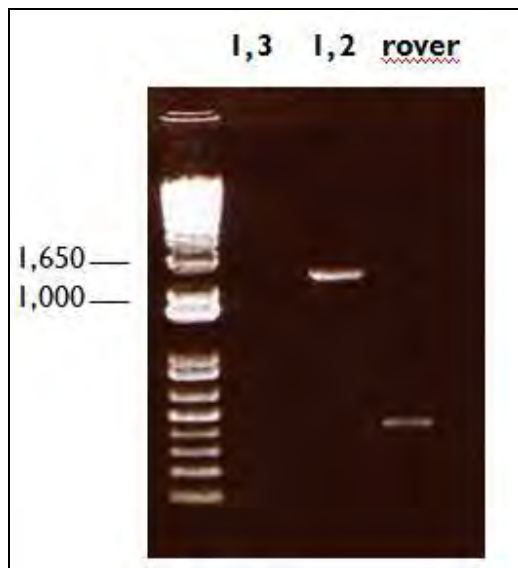


Figura 19. Gel donde se muestra en el segundo carril la inserción amplificada utilizando el par de oligos 1 y 2, que se encuentra aproximadamente en el peso de 1,300 pb. Como control del PCR se utilizó a rover.

5.6 Pruebas de sensibilidad a radiación UV en larvas mutantes de la cinasa Jil1.

Con el fin de determinar si Jil-1 es la cinasa que fosforila a las serina 10 del histona H3 como respuesta al daño en el DNA por radiación UV, se hicieron pruebas de sensibilidad a luz UV. Las moscas que lograron eclosionar de las larvas irradiadas fueron contadas, y el porcentaje de supervivencia se graficó para poder comparar ambas condiciones (Figura 20).

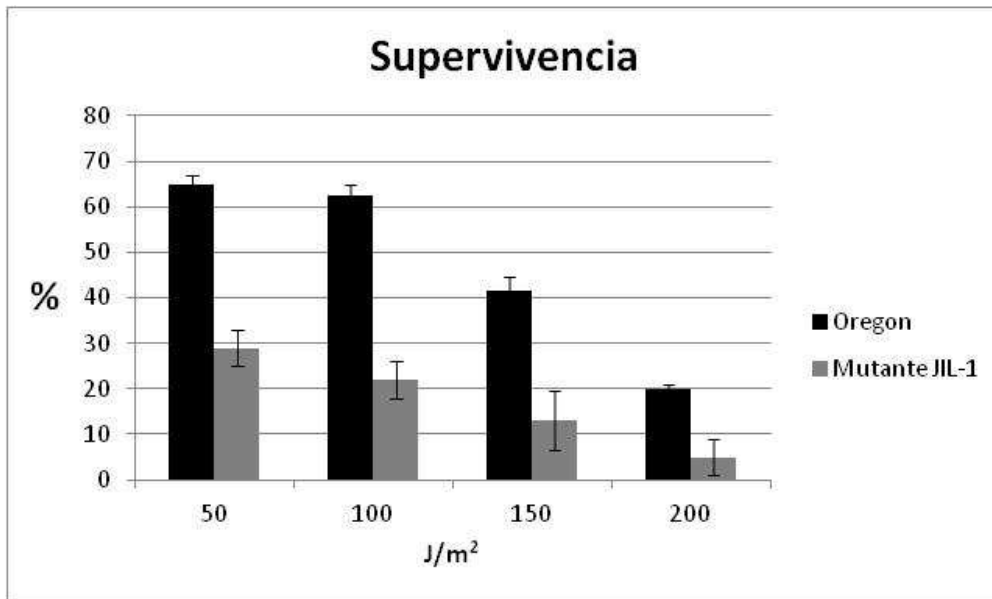


Figura 20. Gráfica que representa el porcentaje de moscas que sobrevivieron a las diferentes dosis de radiación con UV. Se comparan en cada dosis de radiación a las moscas Oregon con las moscas mutantes de JIL-1. n=2 (Datos preliminares).

Como se observa en la figura 20, las moscas mutantes para JIL-1 son más sensibles a la radiación UV con respecto a las moscas Oregon. Esto sugiere que JIL-1 puede estar participando en la respuesta a daño en el ADN por radiación UV.

Sin embargo esta mutación no es dominante, y sólo es posible distinguir entre organismos homocigotos y heterocigotos en las moscas adultas. Es por eso que se decidió balancear la mutación con el marcador *Tubby*, que nos permite distinguir el genotipo en las larvas ya que las larvas con una sola copia del gen mutante son más pequeñas y gordas. Así se obtuvo el genotipo JIL-1 (EP{gy2}) / TM6B^D. Después de hacer las cruzas para obtener a las moscas, se corroboró de nuevo que llevaran la mutación (Figura 21). A partir de esta nueva línea fue posible distinguir a las larvas homocigotas de las heterocigotos y se volvió a hacer la prueba de sensibilidad a radiación UV.

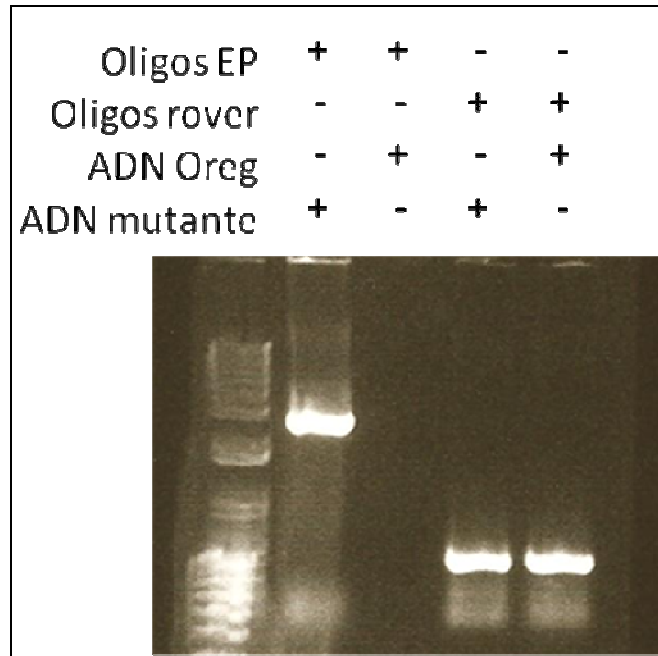


Figura 21. Gel que muestra en el primer carril que las nuevas moscas mutantes JIL-1 (EP{gy2}) / TM6B^D tienen al elemento P en la secuencia del gen que codifica para la proteína JIL-1.

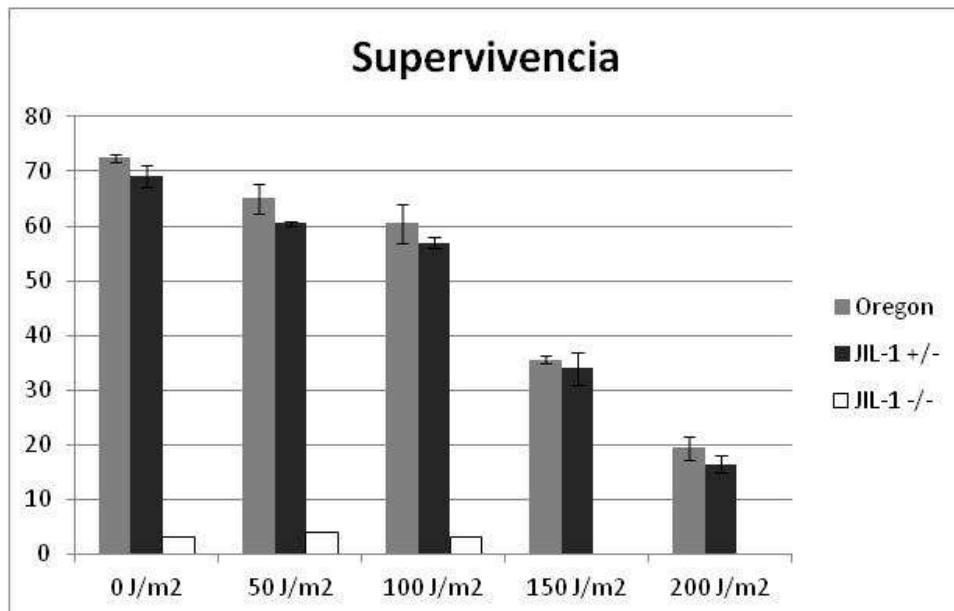


Figura 22. Gráfica que representa el porcentaje de moscas que sobrevivieron a las diferentes dosis de radiación con luz UV. Se comparan en cada dosis de radiación a las moscas de tipo silvestre (Oregon) con las moscas mutantes de JIL-1. n=2

Como se observa en la figura 22, las moscas heterocigotas mutantes para JIL-1 no son más sensibles a la radiación UV con respecto a las moscas Oregon. Sin embargo las moscas homocigotas prácticamente no sobreviven, incluso en condiciones basales. Esto indica que el primer experimento de sensibilidad a UV la presencia de organismos homocigotos para Jil-1, que prácticamente no son viables después del estadio de larvas de tercer instar, enmascaró los resultados.

5.7 Identificación de HP1 α en mutantes para JIL-1 antes y después de irradiar con luz UV

De cualquier forma se decidió hacer tinciones para reconocer a HP1 α en estas moscas mutantes para la cinasa JIL-1, como una manera de identificar si era la fosforilación de la serina 10 por JIL-1 la responsable del desplazamiento de HP1 α (Figura 23).

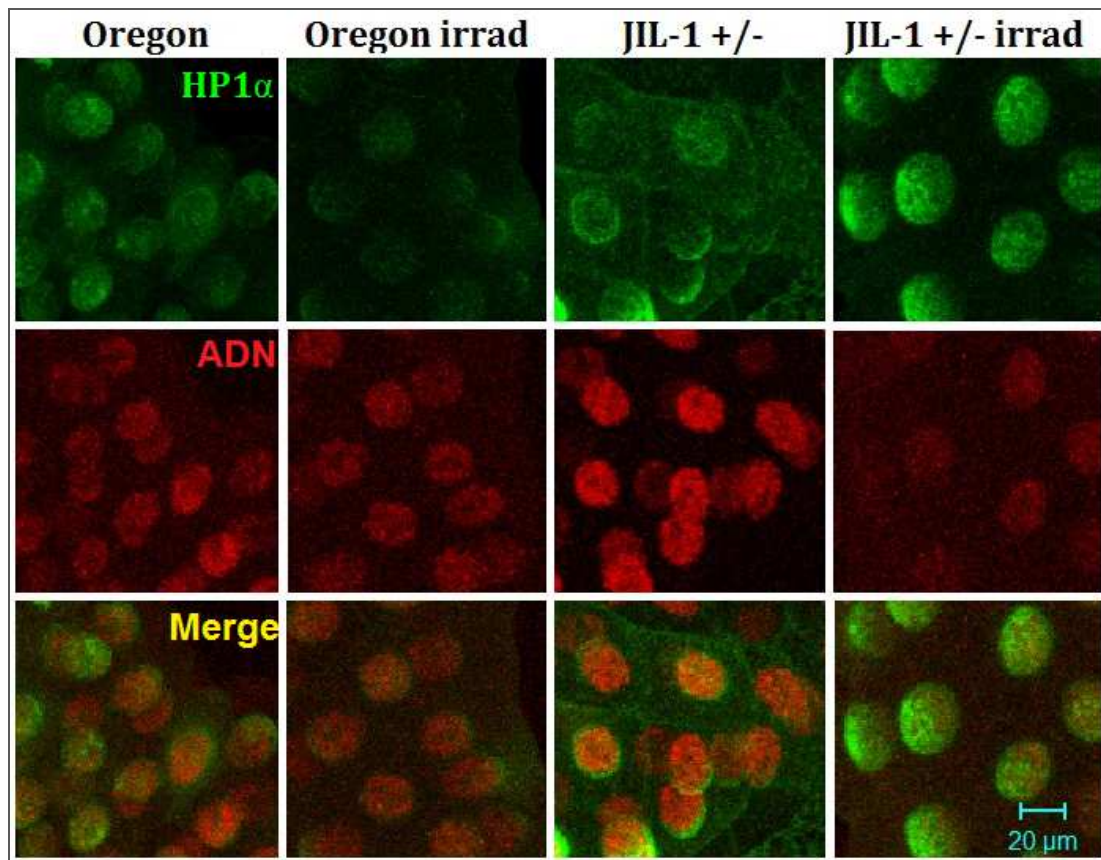


Figura 23. Acercamiento a núcleos de las glándulas salivales de 3er instar de las mutantes de JIL-1 antes de irradiar y después de irradiar. Se muestra en el primer panel en verde a la proteína HP1 α , en el segundo panel en rojo el ADN (marcado con Ioduro de Propidio) y en el tercer panel la sobreposición de ambas.

En la Figura 23 podemos observar que en las moscas de tipo silvestre la proteína HP1 α se encuentra principalmente concentrada en un sitio del núcleo pero al irradiar esta marca parece dispersarse, como se había visto anteriormente (Figura 16). En las moscas mutantes para JIL-1, parece ser que la proteína se encuentra también concentrada en un punto, sin embargo, al irradiar a esta mosca mutante no hay esta deslocalización tan marcada como en las moscas de tipo silvestre. Esto sugiere que Jil-1 podría estar involucrada en el mecanismo de remoción de HP1 α de la cromatina como respuesta al daño por luz UV.

VI. Discusión

En este trabajo estamos interesados en analizar la dinámica de la heterocromatina en respuesta al daño en el ADN por radiación UV. Esta idea se fundamenta en que en el laboratorio hemos observado que los niveles de la H3K9me3 disminuyen en la cromatina de glándulas salivales de larvas de tercer instar después de ser irradiadas con UV. Ya que la proteína HP1 α es un factor importante para mantener la estructura de la heterocromatina y esta reconoce a la H3K9me3, se decidió analizar la dinámica de esta proteína como respuesta al daño en el ADN. Interesantemente se encontró una importante disminución de la proteína HP1 α después de irradiar con UV. Esto coincide con el hecho de que la isoforma α , que es la reconocida por el anticuerpo utilizado, está asociada a regiones heterocromáticas (Fanti L, *et al.* 2008) y que esta forma de cromatina se pierde cuando el ADN sufre daños por agentes externos (como lo es la radiación UV). Aunque se ha reportado que las otras isoformas de HP1 son reclutadas al ADN en varios tipos de daño (Luijsterburg M, *et al.* 2009), esto podría indicar que las diferentes isoformas de la proteína HP1 no tienen funciones redundantes en cuanto la respuesta a daño por UV. Así mismo observamos que la remoción de la HP1 α de la cromatina no se debe a que esta sea degradada sino que esta es removida de los cromosomas y depositada en el lumen nuclear.

El hecho de que los niveles de HP1 α no parecen alterarse como respuesta al daño en el DNA por UV, sugiere que la HP1 α puede volver a integrarse a la cromatina de manera rápida a medida de que el ADN es reparado. De hecho encontramos que después de irradiar, HP1 α se distribuye de manera uniforme en el núcleo. Como se espera que la cromatina trate de regresar a su estado basal después de la reparación de las zonas dañadas, es posible que tiempo después de la recuperación la proteína regrese a su ubicación basal. De forma interesante a las 8 horas post irradiación, la localización de HP1 α en lo que parece ser el cromocentro se restablece. Esto sugiere que a pesar de un daño fuerte al ADN por

radiación UV que requiere descompactación de la cromatina es fundamental para la célula restablecer a la heterocromatina para que se mantenga la integridad de los cromosomas.

Para poder empezar a entender el mecanismo que ocasiona la separación de HP1 α como respuesta al daño al ADN por radiación UV, se analizó el patrón de fosforilación de la serina 10 de la histona H3 en los cromosomas politénicos. En organismos no irradiados se vio una tinción de varias bandas en los cromosomas, pero a diferencia de la tinción con HP1 α no era muy abundante en el cromocentro. Al irradiar a las larvas, esta marca aumenta considerablemente a lo largo de todo el cromosoma. Ocurre lo contrario que con HP1 α , por lo que podría ser que también en el caso de daño al ADN por causa de la radiación sea la fosforilación de H3S10 lo que desplaza a HP1 α de su sitio.

En un principio datos preliminares sugerían que moscas mutantes para JIL-1 mostraban una baja supervivencia a las diferentes dosis de radiación en comparación con las moscas Oregon. Sin embargo, al separar a las larvas homocigotas de las heterocigotas se observó que las moscas heterocigotas no parecen tener ninguna sensibilidad mayor que una mosca silvestre a la radiación UV, y que la baja supervivencia observada era por causa de las moscas homocigotas. Se decidió no seguir trabajando con las moscas homocigotas porque estas presentaban aberraciones cromosomales tan severas que era imposible llevar a cabo tinciones adecuadas.

De cualquier forma se analizó si Jil-1 es la encargada de fosforilar a la Ser10 como respuesta al daño en el ADN por UV. Se pudo obtener evidencia de que la cinasa JIL-1 fosforila a la serina 10, ya que en las moscas mutantes para esta cinasa no hubo un aumento de esta marca al irradiar con UV (Datos no publicados). Interesantemente cuando se analizó lo que pasaba con la proteína HP1 α en las moscas mutantes para la cinasa JIL-1 antes y después de irradiar con UV, no se observó que la proteína HP1a se desplazara del cromocentro.

En resumen es probable que el residuo de serina 10 se fosforile gracias a la cinasa JIL-1 en el caso de daño por radiación UV, y que esta fosforilación sea lo que permita que HP1 α se desplace para permitir la relajación del ADN y su correcta reparación. Sin embargo estos datos aun son preliminares y aun tienen que ser corroborados. Por lo tanto después de dar las conclusiones, propongo las siguientes perspectivas que me permitirán redondear este trabajo:

VII. Conclusiones

- HP1 α se encuentra principalmente asociada al cromocentro de los cromosomas politénicos, así como en regiones de heterocromatina
- Cuando el ADN es dañado con luz UV hay un desplazamiento de HP1 α , presumiblemente para permitir la apertura de la cromatina y que se repare el daño
- Posterior a esta reparación HP1 α se re-localiza a su sitio, lo que permite que la cromatina regrese a su estado basal de compactación
- Se propone un modelo en el que es posible que el desplazamiento de HP1 α sea provocado por la fosforilación de la serina 10 de la histona H3, al no permitir que se una a la lisina 9 tri-metilada

VIII. Perspectivas

1. Determinar el papel de JIL-1 en la fosforilación de H3S10 como respuesta al daño al ADN por luz UV o en su caso el de otras cinasas de la H3S10.
2. Analizar las modificaciones de histonas H3K9me3, H3S10P y la presencia de HP1 α en regiones específicas de heterocromatina después de irradiar con UV.
3. Medir el grado de reparación del ADN en el fondo mutante de JIL-1y/o en otras cinasas de la H3S10.
4. Analizar la incorporación en la cromatina de factores que participan en REN después de irradiar con UV en el fondo mutante para JIL-1 y/o en otras cinasas.

Abreviaturas

3meK9H3: Trimetilación de la Lisina 9 de la Histona H3

AcK14H3: Acetilación de la Lisina 14 de la Histona 3

AcK9H3: Acetilación de la Lisina 9 de la Histona 3

AT-REN: Reparación por Escisión de Nucleótidos Acoplada a Transcripción

CPDs: *Cyclobutane Pyrimidine Dimers*, Dímeros de Pirimidina Ciclobutano

GG-REN: Reparación por Escisión de Nucleótidos Global del Genoma

H3S10P: Fosforilación e la Serina 10 de la Histona 3

HATs: *Histone Acetyltransferases*, Acetil-transferasas de Histonas

HDACs: *Histone Deacetylases*, Desacetilasas de Histonas

HP1: *Heterochromatin Protein 1*, Proteína asociada a Heterocromatina 1

K20H4: Lisina 20 de la Histona 4

K27H3: Lisina 27 de la Histona 27

K79H3: Lisina 79 de la Histona 3

K9H3: Lisina 9 de la Histona 3

KDM4: *Lysine De-Methylase 4*, Familia de Desmetilasas de Lisinas 4

REB: Reparación por Escisión de Base

REN: Reparación por Escisión de Nucleótidos

TFIIH: Factor de Transcripción II H

Bibliografia

- Annunziato A. T. (2008). DNA Packaging: nucleosomes and chromatin. *Nature Scitable*.
- Ball A. R., Yokomori K. (2009). Revisiting the role of heterochromatin protein 1 in DNA repair. *J. Cell Biol.* Vol. 185 No. 4: 573-75
- Bettinger J.C., Lee K., Rougvie A.E., (1996). Stage-specific accumulation of the terminal differentiation factor LIN-28 during *Caenorhabditis elegans* development. *Development* Aug; 122(8): 2517-27
- Boeke J., Regnard C., Cai W., Johansen J., Johansen K.M., Becker P.B., Imhof A., (2010). Phosphorylation of SU(VAR)3-9 by the Chromosomal Kinase JIL-1. *PloS ONE* 5(4) e10042
- Chang Y.-C., Jan K.-Y., Cheng C.-A., Liao C.-B., Liu Y.-C. (2008). Direct involvement of the tumor suppressor p53 in nucleotide excision repair. *DNA Repair* 7(5):751-61
- Cheng X., Blumenthal R. M., (2010). Coordinated Chromatin Control: Structural and Functional Linkage of DNA and Histone Methylation. *Biochemistry* 49(14): 2999-3008
- Chiolo I., Minoda A., Colmenares S.U., Polyzos A., Costes S.V., Karpen G.H., (2011). *Cell* 144, 732-744.
- Fanti L., Pimpinelli S., (2008). HP1: A Functionally Multifaceted Protein. *Current Opinion in Genetics and Development*, 18:169-174
- Felsenfeld G., Groudine M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421: 448-453
- Fischle W., Tseng B.S., Dormann H.L., Ueberheide B.M., Garcia B.A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Funabiki H., Allis D., (2005). Regulation of HP1-chromatin binding histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, 438: 22-29
- Fleck O., Nielsen O., (2004). DNA repair. *Journal of Cell Science*. 117 (Pt 4): 515-517
- Gong F., Kwon Y., Smerdon M.J., (2005). Nucleotide excision repair in chromatin and the right of entry. *DNA Repair*. 4: 884-896
- Gontijo A., Green C., Almouzni G., (2003). Repairing DNA damage in chromatin. *Biochimie*, 85: 1133-1147
- Kim J. K., Samaranayake M., Pradhan S., (2009). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Molecular Life Science*, 66(4):596-612
- Klose R. J., Zhang Y., (2007). Regulation of Histone Methylation By Demethylation and Demethylation. *Nature Reviews*, Volume 8 2007: 307-318
- Kouzarides T., (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4): 693-705

- Lavrov S., Déjardin J., Cavalli G., (2004). *Methods in Molecular Biology*, vol. 247: *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Ed. Humana Press Inc.
- Lin C.-H., Li B., Swanson S., Zhang Y., Florens L., Washburn M. P., Abmayr S. M., Workman J. L., (2008). Heterochromatin Protein 1a Stimulates Histone H3 Lysine 36 Demethylation by the *Drosophila* KDM4A Demethylase. *Molecular Cell* 32, 696-706.
- Luijsterburg M., Dinant C., Lans H., Stap J., Wiernasz E., Lagerwerf S., Warmerdam D. O., Lindh M., Brink M. C., Dobrucki J. W., Aten J. A., Foustein M. I., Janses G., Dantuma N. P., Vermeulen W., Mullenders L. HF., Houtsmuller A.B., Verschure P., van Driel R., (2009). Heterochromatin Protein 1 is Recruited to Various Types of DNA Damage. *Journal of Cell Biology* Vol 185:4 577-586.
- Lydall D., Whitehall S., (2005). Chromatin and the DNA damage response. *DNA Repair*. 4(10): 1195-1207
- Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E.F., (1987). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Marks A. P., Rifkind R. A., Richon V. M., Breslow R., Miller T., Kelly William K. (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Cancer Reviews* 1: 194-202
- Marmorstein R., Roth S.Y., Histone acetyltransferases: Function, structure, and catalysis. *Current Opinion in Genetic Development* 11: 155-161
- Palomera-Sánchez Z., Bucio-Méndez A., Valadez-Graham V., Reynaud E., Zurita M. (2010). *Drosophila* p53 is required to increase the levels of dKDM4B demethylase after UV-induced DNA damage to demethylate histone H3 lysine 9. *J Biol Chem* 285(41):31370-9.
- Prigent C., Dimitrov S., (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science* 116, 3677-3685.
- Rebollar E. Valadez-Graham V., Vázquez M., Reynaud E., Zurita M. (2006). Role of the p53 homologue from *Drosophila melanogaster* in the maintenance of histone H3 acetylation and response to UV-light irradiation. *FEBS letters* 580: 642-648
- Veermal D., Harmit S. M., (2009). Multiple Roles for Heterochromatin Protein 1 Genes in *Drosophila*. *Annual Reviews of Genetics* 43:467-492
- Whetstine J.R., Nottke A., Lan F., Huarte M., Smolikov S., Chen Z., Spooner E., Li E., Zhang G., Colaiacovo M., Shi Y., (2006). Reversal of Histone Lysine Trimethylation by the JMJD2A Family of Histone Demethylases. *Cell* 125(3):467-81
- Zeng W., Ball A., Yokomori K., (2010). Heterochromatin binding proteins working the genome. *Epigenetics* 5:4, 287-292
- Zhang L., Jones K., Gong F., (2009). The molecular basis of chromatin dynamics during nucleotide excision repair. *Biochem. Cell Biol.* 87: 265-272

- Zink D., Paro R., (1995). *Drosophila* Polycomb-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a *trans*-activator to its target DNA. EMBO J. 14, 5660-5671.