



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

### PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y FISIOLÓGIA DEL DESARROLLO

### “CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DEL GEN *add* EN EL DESARROLLO DE *Drosophila melanogaster*”

## T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

### MAESTRO EN CIENCIAS

QUE PRESENTA

**BIOL. SILVIA MEYER NAVA**

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Viviana Valadez Graham

Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA-  
IACOD IC 200211 y al donativo de Conacyt No.118477

Cuernavaca, Morelos

Noviembre, 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.

## AGRADECIMIENTOS

Primero que nada tengo que agradecer al Dr. Mario Zurita por haberme dado la oportunidad de entrar a su laboratorio y brindar un espacio y herramientas necesarias para desarrollar este trabajo.

A la Dra. Viviana Valadez por todo su tiempo y dedicación, que fueron muchas horas en las que me guió para poder realizar este trabajo y sobre todo por las experiencias y aprendizajes que me ha transmitido.

A mi comité tutorial por sus grandes consejos y por guiarme a través de estos dos años y medio.

A mis compañeros del laboratorio que siempre me han apoyado en las largas horas de trabajo.

A mi mamá y hermana que siempre tuvieron palabras de aliento hacia mí, han estado en todo momento conmigo.

*When you make the finding yourself  
- even if you're the last person on Earth to see the light -  
you'll never forget it.*

**Carl Sagan**

## ABREVIATURAS

ADD: Dominio conservado en las proteínas ATRX, DNMT3, DNMT3L.

dADD : CG8290: ADD en *Drosophila melanogaster*.

ADN: Ácido desoxiribonucleíco.

ARN: Ácido ribonucleíco.

ATP: Adenosín trifosfato.

ATPasa: Enzima que hidroliza ATP para realizar su función.

ATRX: "Alpha-Thalassemia mental Retardation syndrome X- related". Síndrome que genera retraso mental,  $\alpha$ -talasemia ligado al cromosoma X.

dATRX: proteína ATRX en *Drosophila melanogaster*.

hATRX: proteína ATRX de humanos.

dATRX-L: proteína ATRX de *Drosophila* la isoforma larga.

dATRX-S: proteína ATRX de *Drosophila* la isoforma corta.

C-terminal: Carboxilo terminal.

CyO: "Curly of Oster". Balanceador del cromosoma 2. Homocigo letal, cuyo marcador dominante es Cy: Las moscas presentan las alas curvadas hacia arriba (Lindsley y Zimm, 1992).

DAXX: "Death domain associated protein".

DNMT3-DNMT3L: DNA metiltransferasas (3 y 3L).

DREF: "DNA Replication related Element binding Factor". Factor de transcripción de union al ADN relacionado al proceso de replicación.

EZH2: "Enhancer of Zeste homolog 2". Homólogo 2 del enhancer de zeste.

GAL4: Proteína activadora de la transcripción requerida para la activación de genes GAL (galactosa).

GATA-1: "G= Guanina; A=Adenina; T= Timina". Dedo de zinc de tipo-GATA de factores de transcripción implicados en el crecimiento celular.

H3.3: variante de la histona H3 en mamíferos

H3K9me3: marca epigenética de trimetilación de la lisina 9 en la histona 3.

H3K4me0: Indica que la lisina 4 de la histona 3 está libre de metilación.

HP1: "Heterochromatin Protein 1". Proteína de Heterocromatina 1.

HRP: "Horse Radish Peroxidase". Peroxidasa de rábano picante.

kDa: Kilo Daltones.

MeCP2: Proteína "metil-CpG binding protein 2).

MKRS: Balanceador del cromosoma 3. Homocigo letal, cuyo marcador dominante es *Sb*: "Stubble", donde las moscas presentan quetas cortas en todo el cuerpo (Lindsley y Zimm, 1992).

N-terminal: Amino terminal.

*ORE<sub>R</sub>*: Moscas silvestres Oregon.

pb: Pares de bases.

PBS: "Phosphate Buffered Saline". Buffer de fosfatos.

PCR: "Polymerase Chain-Reaction". Reacción en cadena de la polimerasa.

PHD: "Plant Homeo Domain", por sus siglas en ingles.

PM: Marcador de peso molecular.

Polycomb: familia de proteínas que participan en el silenciamiento epigenético de ciertos genes.

RNAi: RNA interferente (silenciamiento). Secuencia de RNA específico para una secuencia de RNA mensajero blanco el cual interfiere con la expresión del gen blanco reduciendo los niveles de producción de esa proteína.

RT-PCR: del inglés (Reverse transcription polymerase chain reaction) es una variante de PCR donde una hebra de ARN se copia a ADN (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa reversa.

S2R+: línea celular de *Drosophila* aislada de línea Schneider 2 que se encuentra en estadio embrionario tardío.

SANT: Dominios conservados que se unen a las colas de histonas o presentan unión al ADN (según su punto isoeléctrico), presentes en proteínas asociadas a complejos remodeladores de la cromatina (SWI/SNF).

SDS: "Sodium dodecyl sulphate". Dodecil sulfato de sodio.

SNF2: "Sucrose Non Fermenting 2" Subfamilia que pertenece a la familia SWI/SNF.

SU(VAR) 3-9: enzima metiltransferasa de histonas que trimetila la H3 en la lisina 9.

*Sp*: "Sternopleural". Marcador en el cromosoma 2. Homocigo letal. Las moscas presentan quetas extras en la región del esternopleuro (Lindsley y Zimm, 1992).

SWI/SNF: "Switching-defective/sucrose non-fermenting". Familia de complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP.

*TM2*: Balanceador del cromosoma 3. Homocigo letal, cuyo marcador dominante es *Ubx*: "Ultrabitorax", donde las moscas presentan una o varias quetas en el alterio (Lindsley y Zimm, 1992).

*TM3*: Balanceador del cromosoma 3. Homocigo letal, cuyo marcador dominante es *Ser*: “Beaded-Serrate”, donde las moscas presentan las alas quebradas en la punta, en algunos casos está acompañado por “Stubble” (*Sb*) que se observa por tener quetas quetas rasuradas y gruesas en el torax (Lindsley y Zimm, 1992).

UAS: “Upstream activating sequence”. Secuencia activadora río arriba.

*W<sup>1118</sup>*: Marcador del cromosoma 1. “White”, variante del alelo *w\**, donde las moscas presentan ojos blancos (despigmentación) debido a una deleción.

WB: “Western blot”.

Wild type: organismo con genotipo silvestre.

*Y(1)*: Marcador del cromosoma 1. “yellow”, la mosca presenta pigmentación amarilla en la cutícula del cuerpo de los individuos adultos.

## RESUMEN

El gen *ATRX* de humanos fue descrito en 1995. Mutaciones en el gen *hATRX* (“Alpha-Thalassemia mental Retardation syndrome X- related”) se asocian con un síndrome ligado al cromosoma X que incluye una serie de fenotipos como retraso mental de moderado a severo,  $\alpha$ -talasemia, fallas psicomotoras, anomalías urogenitales y microcefalia, entre otras (Gibbons *et. al.*, 1995). La proteína *ATRX* tiene un dominio ATPasa-helicasa en el carboxilo terminal, que la clasifica como un miembro de la familia SNF2 de complejos remodeladores de la cromatina. Contiene un segundo dominio se encuentra en el extremo amino terminal y tiene un PHD y un dedo de zinc tipo GATA que se han asociado al reconocimiento de las histonas (Argentaro *et. al.*, 2007). Esta organización de los dedos de zinc también se encuentra en las ADN metil transferasas DNMT3L y por lo tanto ha sido nombrado el dominio ADD (**ATRX-DNMT3-DNMT3L**). Defectos en este dominio son responsables del 50% de las mutaciones en individuos afectados (Argentaro *et al.*, 2007).

*ATRX* se conserva a través de la evolución, desde *C. elegans* hasta *H. sapiens*, sin embargo en los invertebrados el dominio ADD no se ha descrito (Sun *et al.*, 2006). En *D. melanogaster* un reporte reciente muestra un posible homólogo en la mosca (*dATRX*) (Bassett *et al.*, 2008), la cual está presente en dos isoformas que derivan del mismo transcrito y al ser un organismo invertebrado, la proteína *dATRX* carece del dominio ADD. Por medio de un análisis *in silico* se encontró otro gen, “*CG8290*”, el cual codifica para dos isoformas que contienen el dominio ADD y las cuales hemos denominado ADDa y ADDb. Ya que *dATRX* carece del dominio ADD es posible que una o ambas de las isoformas de *dADD* interactúen físicamente y / o genéticamente con *dATRX* y por lo tanto podrían estar implicados en los mismos procesos celulares.

Por medio de la técnica de RT-PCR se pudieron observar cuatro transcritos principales llamados ADDa, ADDb, ADDc y ADDd que se encuentran presentes a lo largo del desarrollo de *D. melanogaster* y por medio de anticuerpos se pudieron reconocer varias bandas que pudieran ser las isoformas proteicas de ADD.

Se analizó la distribución celular de las proteínas por separación de las fracciones nucleares y citoplásmicas de células S2R+ y se determinó que son proteínas nucleares. Además se realizaron co-inmuntinciones de cromosomas politénicos con la proteína HP1 $\alpha$  y se puede observar que colocalizan en el cromocentro principalmente, aunque también se observaron en los brazos de los cromosomas en regiones eucromáticas.

Finalmente se diseñaron y mandaron inyectar moscas transgénicas que expresan un interferente inducible para ADDa y ADDb pero no se pudo observar la disminución de los niveles del transcrito así como un fenotipo. Sin embargo, al emplear un “stock” de “Vienna Drosophila RNAi Stock Center” el cual interfiere con todas las posibles isoformas junto con el “driver” de expresión ubica TubulinaGal4, se observó que se afectó la supervivencia de las moscas que expresan el interferente, siendo sólo del 3% en machos y del 59% en hembras. Al parecer estos organismos se mueren en estadios de pupa y farato.

Los datos obtenidos muestran que los productos del gen CG8290 son ubicuos, son predominantemente nucleares y tienen dominios involucrados en el reconocimiento al ADN y a la cromatina, por lo tanto pudieran tener un papel como factores transcripcionales y además son importantes para la supervivencia del organismo. El determinar si estas proteínas interactúan con dATRX será de gran importancia en el futuro para determinar sus funciones celulares.



## ABSTRACT

The human gene *ATRX* was described in 1995. Mutations in *hATRX* ("Alpha-Thalassemia mental retardation syndrome X-related") are associated with X-linked syndrome that includes a number of phenotypes like mental retardation,  $\alpha$ -thalassemia, psychomotor failures, urogenital abnormalities and microcephaly, among others (Gibbons et al., 1995). The *ATRX* protein has an ATPase domain at the carboxy-terminal helicase, which classifies it as a member of the family SNF2 of chromatin remodeling complexes. The protein also contains a second domain is at the amino terminus and has a PHD and a zinc finger GATA type that have been associated with recognition of histones (Argentario et al., 2007). This organization of the zinc fingers also found in the DNA methyltransferases DNMT3L and therefore has been named the domain ADD (**ATRX-Dnmt3-DNMT3L**). Defects in this domain are responsible for 50% of mutations in affected individuals (Argentario et al., 2007).

*ATRX* is conserved through the evolution from *C. elegans* to *H. sapiens* however in invertebrates the corresponding ADD domain is absent (Sun et al., 2006). In *Drosophila melanogaster* a recent report showed a possible homologue in the fly (*dATRX*) (Bassett et al., 2008) that interestingly lacks the ADD domain. We found by *in silico* analysis that another gene, *CG8290*, codifies for two isoforms of a protein that contains an ADD domain (*dADD*) that we have named ADDa and ADDb. Since *dATRX* lacks the ADD domain it is possible that one or both of the isoforms of *dADD* interact physically and/or genetically with *dATRX* and therefore they could be involved in the same cellular processes.

Through RT-PCR technique it was possible to observe four major transcripts called ADDa, ADDb, ADDc and ADDd that are present throughout the development of *D. melanogaster* and using specific antibodies it possible to observe several bands that could be the protein isoforms of ADD.

By gradient separation of nuclear and cytoplasmic fractions in total extracts of S2R+ we determined the enrichment of these proteins in the nucleus. Furthermore co-immunostaining of polytene chromosomes with this antibodies and HP1a show that they localize mainly in the chromocenter, a heterochromatic region, although euchromatic signal is also present through the chromosome arms.

Finally were designed and constructed transgenic flies expressing RNA interferent to ADDa and ADDb but was not possible to observe the decrease in transcript levels and a phenotype. By employing a stock Vienna Center for all possible interfering isoforms showed a survival phenotype 3% in males and 59% females. It looks like this organisms died in pupae and pharate.

The data obtained show that CG8290 gene products are ubiquitous and are predominantly nuclear with domains that are involved in recognition of chromatin DNA and therefore may have a role as transcription factors as well are important for the survival of the organism. Determining whether these proteins interact with dATRX will be important in the future to determine their cellular functions.

## ÍNDICE

1. Introducción	10
1.1 La cromatina y los complejos remodeladores de la cromatina	10
1.2 ATRX	16
1.3 ATRX en <i>Drosophila melanogaster</i>	22
2. Antecedentes	24
3. Hipótesis	26
4. Objetivos	26
5. Materias y métodos	27
6. Resultados	38
6.1 Identificar el patrón de expresión de dADD en los diferentes estadios del desarrollo de <i>D. melanogaster</i>	38
6.2 Determinar la distribución intracelular de ambas isoformas	43
6.3 Definir a qué tipo de cromatina se asocian las isoformas	44
6.4 Evaluar un posible fenotipo al disminuir los niveles de Add por medio de ARN interferente	47
7. Discusión	58
8. Conclusiones	64
9. Perspectivas	65
10. Bibliografía	66
11. Anexos	70

## 1. Introducción

### 1.1 La cromatina y los complejos remodeladores de la cromatina

La cromatina es el complejo de ADN y proteínas en el que el material genético es empacado dentro de las células de organismos con núcleo (Fensenfeld & Groudine, 2003). La dinámica de la cromatina mantiene una interacción directa con todos los mecanismos que involucran al ADN en eucariontes, entre ellos su transcripción y su reparación. La maquinaria de transcripción de las células eucariotas debe interactuar específicamente con secuencias de ADN en los promotores de los genes para poder iniciar la transcripción de los mismos. Sin embargo, las zonas de reconocimiento e interacción de estos factores con el ADN no siempre se encuentran accesibles dependiendo del grado de compactación de la cromatina. La cromatina se encuentra altamente organizada y su empaquetamiento se debe a su asociación a dos clases de proteínas: las histonas y las proteínas accesorias, como son: las proteínas reguladoras de la transcripción, proteínas modificadoras de histonas, reguladores de cromatina y proteínas de reconocimiento del ADN. Ambas clases de proteínas participan manteniendo la estructura del DNA y regulando la expresión génica (Lehninger *et al.*, 2006). La subunidad primaria de la cromatina es el nucleosoma, el cual está formado por un octámero de histonas, con dos copias de cada una: H2A, H2B, H3 y H4, además está asociado a una histona adicional, la histona H1 que actúa como unión al ADN "linker" (Allis *et al.*, 2007) (fig 1).

Las histonas son proteínas pequeñas, muy básicas que se encuentran conservadas a lo largo de la evolución. Presentan un dominio globular llamado "core" de histonas y uno flexible: lo que se conoce como "colas" de histonas donde se expone la región N-terminal. Estas juegan un papel importante en la variabilidad y dinamismo de los nucleosomas ya que ambos dominios son objeto de modificaciones post-traduccionales (Allis *et al.*, 2007). En ciertas regiones de la cromatina, los nucleosomas pueden incorporar variantes de histonas, las cuales presentan algunos aminoácidos de diferencia con las histonas canónicas y se depositan en momentos del ciclo celular diferentes a las histonas canónicas, las cuáles se depositan durante la replicación. Estas modificaciones le brindan a los cromosomas funciones especializadas. Permiten en algunos casos que se lleve a cabo el proceso de transcripción y sirven de reconocimiento a diferentes tipos de factores involucrados en el mantenimiento de la estabilidad del genoma (Allis *et al.*, 2007). Por ejemplo la variante H3.3 de la histona H3 canónica difiere en cinco aminoácidos y se encuentra altamente enriquecida en

regiones que están activas transcripcionalmente promoviendo la regulación de genes específicos durante el desarrollo (Goldberg *et. al.*, 2010)

Los nucleosomas permiten el enrollamiento de 146 pares de bases de ADN, formando estructuras de compactación conocidas como el collar de perlas. Posteriormente los nucleosomas se organizan en estructuras de orden mayor como las fibras de 30 nm, para seguirse condensando el ADN hasta formar los cromosomas. De esta manera el ADN de los organismos eucariotes se condensa dentro del núcleo (Zhang *et al.*, 2009; Lydall y Whitehall, 2005) (Fig. 1).

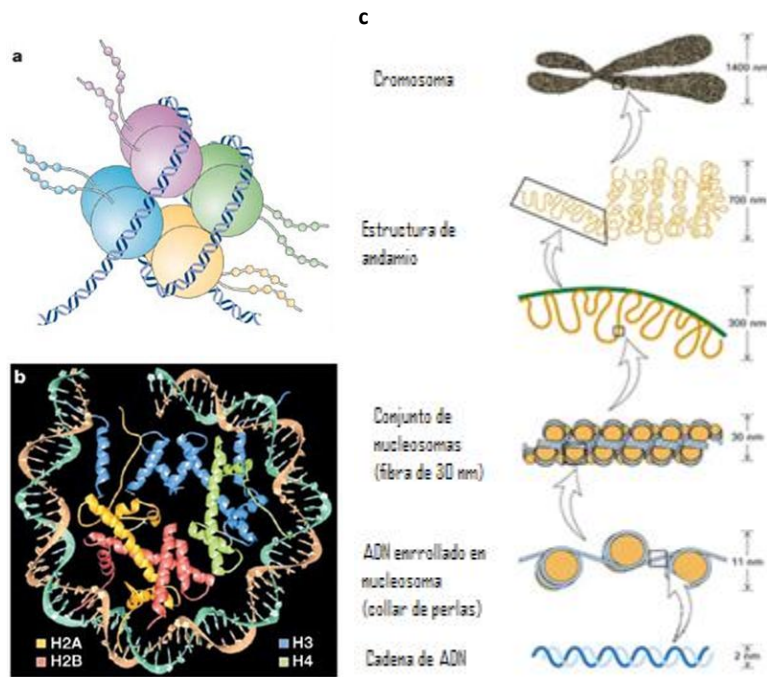


Figura 1. La organización del ADN en el núcleo. (a) Cada nucleosoma comprende un octámero de histonas, que consisten en un tetrámero H3<sub>2</sub>-H4<sub>2</sub> y dos dímeros H2A-H2B. La parte amino terminal de las histonas se proyecta fuera del centro del nucleosoma e interactúa con el ADN. Estas colas pueden ser modificadas postraduccionalmente y funcionar como señalizadoras. (b) Estructura cristalizada del nucleosoma donde se ve la interacción del ADN con las histonas. (Levenson & Sweatt, 2005). (c) Condensamiento del ADN en nucleosomas hasta llegar a su fase de mayor compactación que son los cromosomas mitóticos (Advanced Molecular Genetics-Biology).

Históricamente, la cromatina ha sido clasificada en dos configuraciones: la eucromatina se refiere al estado en el cual la cromatina se encuentra descondensada debido a la baja densidad de

nucleosomas proporcionando una composición laxa que permite la entrada de la maquinaria de la transcripción para que esta se lleve a cabo (Allis *et al.*, 2007).

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 siempre se encuentra inactiva transcripcionalmente y no se afecta su estado de compactación a lo largo del ciclo celular (Allis *et al.*, 2007). Presenta una función estructural ya que se encuentra en sitios pericentroméricos y subteloméricos. Por lo general, los genes que se encuentran bajo este grado de compactación se encuentran silenciados y se replican tardíamente (Basett *et al.*, 2009).

La heterocromatina puede clasificarse como constitutiva, que se encuentra permanentemente compacta, contiene pocos genes y está formada principalmente por secuencias repetitivas localizadas en regiones coincidentes con centrómeros y telómeros. Este tipo de cromatina se encuentra permanentemente silenciada y los genes son rara vez expresados. El otro tipo de heterocromatina es la 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 (Allis *et al.*, 2007).

Recientemente se realizó un análisis integrativo de los principales componentes que se unen a la cromatina, como proteínas y marcas de histonas, que se encuentran en células en cultivo de *Drosophila* derivadas de embriones y se describieron cinco tipos principales de cromatina las cuales nombraron por colores (Fig. 2):

La cromatina verde sería lo que comúnmente llamamos heterocromatina, se le asocia a las proteínas HP1 (“Heterochromatin protein 1”) y SU(VAR) 3-9 (“Suppressor of variegation 3-9”) junto con las marcas H3K9me2 y H3K9me3 y además se localiza en regiones pericentroméricas. La cromatina amarilla se le relaciona con genes activos transcripcionalmente, tiene proteínas asociadas de la maquinaria de transcripción y enzimas que controlan la acetilación de histonas. La cromatina roja también se relaciona con genes activos pero que son tejido específicos y no tienen la marca H3K36Me3 que se asocia a la elongación transcripcional. Además, es la cromatina más rica en proteínas y contiene la variante de histona H3.3. La clasificada cromatina azul se relaciona con las proteínas del complejo “polycomb” y la marca H3K27me3 lo cual se relaciona con

represión. Se le ha encontrado altamente representada en la regulación de genes del desarrollo. Los genes silenciados y regiones perinucleares se asocian a la cromatina negra y es la cromatina más cercana a la lámina nuclear (Filion *et. al.*, 2010).

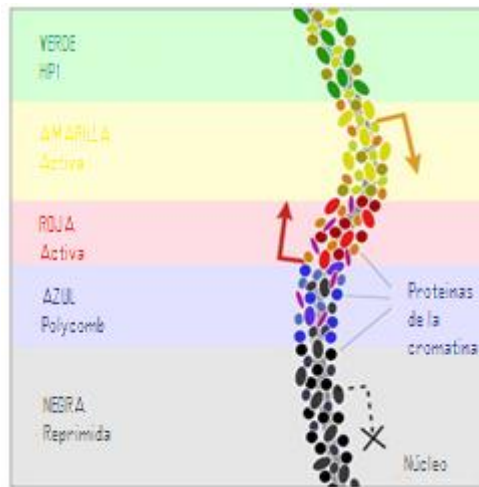


Figura 2. Representación de los cinco principales tipos de cromatina identificados en células en cultivo de *Drosophila* basado en las combinatorias de las distintas proteínas de unión a la cromatina y marcas de histonas (Modificado de: Filion *et. al.*, 2010).

Dado el diverso grado de compactación de la cromatina, se sugiere que es una estructura dinámica propensa a la remodelación y reestructuración (Allis *et. al.*, 2007), y por lo tanto se requieren de diversas estrategias para que la maquinaria de transcripción pueda identificar sus secuencias blanco y tener accesibilidad a las mismas, como es el uso de proteínas motoras que remodelan y reestructuran a la cromatina (Li *et al.*, 2007). Estos cambios, permiten el fácil ingreso y la interacción de los factores de transcripción con la cromatina y por ende permiten que se lleve a cabo el proceso de transcripción.

Hasta el momento se conocen tres maneras por las que la estructura de la cromatina se modifica:

- a) Mediante el intercambio de alguna de las histonas del nucleosoma por su variante correspondiente (Felsenfeld y Groudine, 2003) (fig 3a).
- b) A través de complejos proteicos que realizan modificaciones postraduccionales en los residuos de amino ácidos de las colas N-terminales de las histonas, llamados complejos modificadores de la cromatina (Felsenfeld y Groudine, 2003) (fig 3b).

- c) Con ayuda de complejos multiprotéicos que dependen de ATP para remodelar nucleosomas, llamados remodeladores de la cromatina, que a continuación se describen más ampliamente (Felsenfeld y Groudine, 2003) (fig 3c).

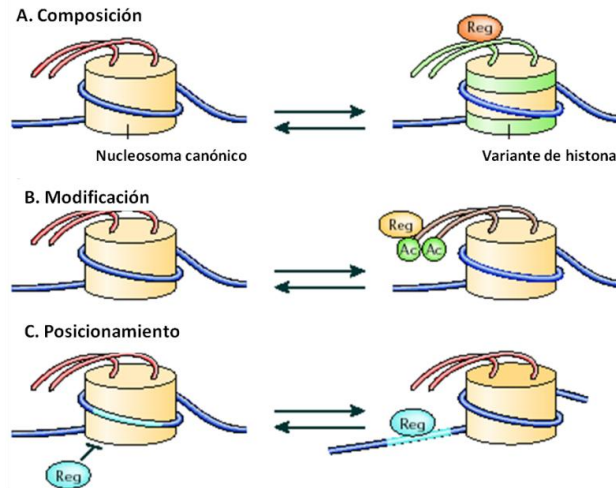


Figura 3. Remodelación de la cromatina. (a) Modificaciones en la composición de los nucleosomas por medio de las variantes de histonas. (b) Modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas. (c) Reposicionamiento o deslizamiento de los nucleosomas a través de los complejos remodeladores de la cromatina (Saha *et. al.*, 2006).

Los complejos remodeladores de la cromatina son maquinarias multiprotéicas especializadas que permiten el acceso al ADN alterando la estructura, la composición o el posicionamiento de los nucleosomas de manera temporal ya sea por desplazamiento o por remoción de los mismos. Estos factores determinan la arquitectura de la cromatina ayudando a remodelar los nucleosomas que se encuentran cubriendo regiones promotoras y reguladoras como por ejemplo las llamadas “enhancers” las cuales regulan el inicio de la transcripción de un gen e incrementan los niveles de transcripción respectivamente. Los complejos remodeladores de la cromatina, permiten que se lleve a cabo una regulación en la transcripción, activan o reprimen controlando los distintos estados de la cromatina (entre eucromatina y heterocromatina). Los promotores pueden encontrarse bajo dos condiciones distintas: abiertos, como es en el caso de los genes constitutivos (se expresan de manera constante) y cubiertos, como ocurre en los genes altamente regulados (solo se expresan bajo condiciones adecuadas, por ejemplo en algún momento del desarrollo y en tejidos específicos) (Cairns *et al.*, 2009).



Los complejos remodeladores de la cromatina requieren de la hidrólisis de ATP para el cumplimiento de sus funciones de remodelación. Es por ello que todos los complejos remodeladores poseen una subunidad con un dominio de ATPasa altamente conservado. Por lo general estos han sido clasificados de acuerdo a sus funciones principales, el grado de conservación que existe entre sus dominios de ATPasa y de acuerdo a la presencia de otros dominios cerca de la región C-terminal que actúan como sitios blanco o de regulación para la interacción y el reconocimiento del ADN (Saha *et al.*, 2006).

Existen al menos 5 familias de remodeladores de la cromatina: INO80, NURD/Mi-2/CHD, ISWI, SWR1 y SWI/SNF2 (Saha *et al.*, 2006). A continuación, se describen algunas características de ellas:

*Familia INO80*, participa en procesos de reparación y transcripción del ADN (Saha *et al.*, 2006). *Familia NURD/Mi-2/CHD*, involucrada en la represión de la transcripción y el silenciamiento regulado de ciertos genes (Saha *et al.*, 2006). *Familia ISWI* la cual ayuda a conducir el ensamblaje y la organización de la cromatina (Langst *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1997), manteniendo el espaciamiento convencional de los cromosomas. Sus miembros promueven la represión. Actúan sobre nucleosomas no acetilados confinando su actividad a nucleosomas en regiones transcripcionalmente inactivas (Corona *et al.*, 2002). *Familia SWR1* que reconstruye nucleosomas modificando su composición y por lo tanto su estabilidad. Su función es la inserción de variantes de histonas, como lo es el intercambio de la histona H2A por su variante H2A.Z (Mizuguchi *et al.*, 2004) en respuesta a cambios de en la temperatura haciendo el nucleosoma más apretado (Cairns *et al.*, 2009). Estos remodeladores promueven la activación génica (Guillimette *et al.*, 2005; Raisner *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). La *familia SWI/SNF2* brinda acceso al ADN por medio del desplazamiento de nucleosomas (Whitehouse *et al.*, 1999) o por la liberación de los mismos (Lorch *et al.*, 1999). Su función generalmente se encuentra correlacionada a la movilización de los nucleosomas y a la activación transcripcional (Narlikar *et al.*, 2002; Saha *et al.*, 2006; Lorch *et al.*, 1999).

En los humanos, los defectos o las mutaciones relacionados con los factores que se encuentran involucrados en la estructuración de la cromatina, como los complejos remodeladores de la cromatina, son causas de diversas enfermedades y síndromes como lo es el caso de la proteína ATRX.

## 1.2 ATRX

El gen *ATRX* de humanos fue descrito en 1995 (Gibbons *et al.*, 1995). Mutaciones en el gen *hATRX* (“Alpha-Thalassemia mental Retardation syndrome X- related”) se asocian con un síndrome ligado al cromosoma X que incluye una serie de fenotipos como retraso mental de moderado a severo,  $\alpha$ -talasemia, fallas psicomotoras, anomalías urogenitales y microcefalia, entre otras (Gibbons *et al.*, 1995). Además las mutaciones en el gen producen reducciones en la síntesis de la  $\alpha$ -globina, causante de la  $\alpha$ -talasemia por lo que se sugiere su participación en la regulación de este gen (Gibbons *et al.*, 1995; Garrick *et al.*, 2004). El gen *hATRX* se encuentra en la posición q13.1-q21.1 del cromosoma X, por lo que la mayor parte de los individuos afectados son hombres (Gibbons *et al.*, 1995).

El gen *hATRX* tiene una longitud de aproximadamente 300 kb del ADN genómico (Gibbons *et al.*, 1995) y consta de 36 exones (Picketts *et al.*, 1996) que codifica al menos dos transcritos que dan lugar a dos proteínas ligeramente distintas: una de 280 kDa que se ha visto que su localización es principalmente en heterocromatina y en los cuerpos PML, que son puntos nucleares compuestos principalmente por material proteico no cromático. Además se produce otro transcrito por “splicing” en donde el intrón 11 es retenido generando un codón de terminación. Este transcrito da origen a otra isoforma proteica, ATRXt de aproximadamente 180 kDa (Berubé *et al.*, 2000). El resultado es un péptido que conserva el dominio ADD pero carece de la parte C-terminal donde se encuentra el dominio ATPasa/Helicasa al igual que pierde la unión a las proteínas Daxx, MeCP2 y la localización en los cuerpos PML aunque se ha visto que se sigue asociando a heterocromatina (Garrick *et al.* 2004) (fig 4).

Recientemente Nogami *et al.*, (2011) por medio de RT-PCR de hipocampo de ratón identificaron al menos otras cinco isoformas de ATRX en este tejido empleando un conjunto de oligonucleótidos que les permitió observar el “splicing” alternativo y sitios internos de inicio de la traducción. Así que es posible que existan más isoformas que sean tejido específicas no descritas hasta la fecha.

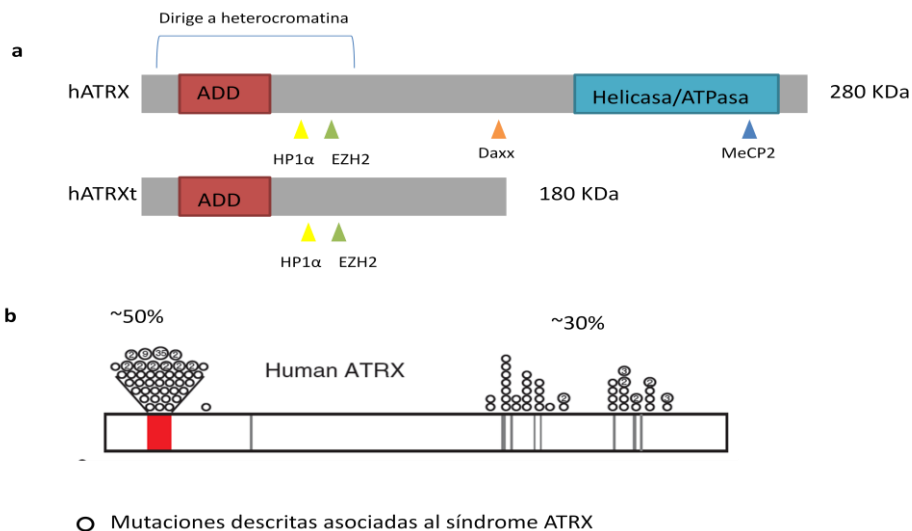


Figura 4. Las dos isoformas de ATRX y las mutaciones en el gen descritas hasta el momento. (a) La isoforma de la proteína ATRX (280KDa) con sus dominios y sitios de interacción con distintas proteínas y la isoforma alternativa por producto truncado ATRxt (180 kDa) (Modificado de Berubé, 2011). (b) Distintas mutaciones hasta la fecha descritas en la proteína ATRX sobre los dominios ADD (~50%) y SNF2 (~30%) (Modificado de Eustermann *et al.* 2011).

Individuos con el síndrome-ATRX tienen diversas mutaciones en diferentes sitios en el gen: cambios de aminoácidos conservando el marco de lectura, productos truncados o deleciones (Gibbons *et al.*, 2008). Estas mutaciones por lo general dan lugar a un cambio en la funcionalidad de la proteína y en su mayoría caen sobre dos dominios altamente conservados a lo largo de la evolución. El primero es del tipo ATPasa-helicasa en el carboxilo terminal que la clasifica como miembro de la familia SNF2 de remodeladores de la cromatina, que es responsable del 30% de las mutaciones que producen la enfermedad. El otro dominio se encuentra en la porción amino y está compuesto por el dominio PHD y un dedo de zinc del tipo GATA (Argentaro *et al.*, 2007). Esta organización de dedos de zinc está presente únicamente en las ADN metil-transferasas DNMT3-DNMT3L y por lo tanto es conocido como ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L). Mutaciones en este dominio, son responsables del 50% de las mutaciones que producen la enfermedad (Argentaro *et al.*, 2007) (fig 5).

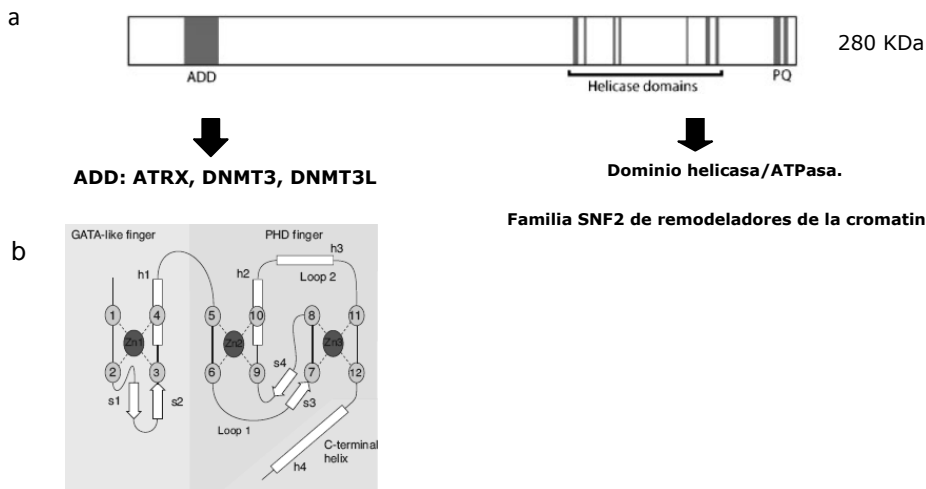


Figura 5. La Proteína hATRX y sus dominios. (a) Representación de los dominios ADD y SNF2 en la isoforma larga (280 kDa) (Gibbons *et al.*, 2008). (b) Esquema de la topología de los dedos de zinc de tipo PHD y GATA-1 del dominio ADD (Argentaro *et al.*, 2007) (Narlikar *et al.*, 2002).

El dominio ADD se ha propuesto puede estar involucrado en el reconocimiento de distintas modificaciones postraduccionales de las histonas e incluso se ha demostrado que puede unirse a ellas. Recientemente, Dhayalan *et al.*, 2011 realizaron ensayos de interacciones *in vitro* del dominio ADD con distintas modificaciones en las colas de las histonas y encontraron que el dominio ADD de hATRX interacciona con la combinatoria de H3K9me3 y H3K4me0. Por otra parte, en la región C-terminal presenta siete dominios colineales conservados, típicamente encontrados en la familia SNF2 (SWI/SNF) de proteínas asociadas a complejos remodeladores de la cromatina que le confiere actividad de ATPasa (Gibbons *et al.*, 1997). La presencia de estos dominios sugiere que la proteína ATRX tiene un papel en la remodelación de la cromatina aunque hasta el momento se desconoce el papel exacto de hATRX en la regulación de la expresión génica.

También se ha propuesto que hATRX tiene un papel en la represión transcripcional o que participa en la formación de la heterocromatina debido a que mediante ensayos de inmunolocalización, la forma larga de la proteína interacciona físicamente y co-localiza con la proteína “Heterochromatin protein 1  $\alpha$ ” (HP1- $\alpha$ ) la cual se asocia a regiones heterocromáticas y es una proteína represora de la transcripción (McDowell *et al.*, 1999). hATRX también interacciona con miembros de la familia “Polycomb” como EZH2 y MeCP2 (Cardoso *et al.*, 1998).

Recientemente hATRX se encontró en regiones teloméricas, co-localizando con la variante de histona H3.3 y se propone como regulador clave de la cromatina telomérica (Wong *et al.*, 2010). Se propone que ATRX es esencial para incorporar a H3.3 y participa en la unión de HP1 $\alpha$  a los telómeros, por lo que se sugiere que éstas proteínas pueden actuar para lograr un equilibrio en el estado de condensación de la cromatina que permite la renovación de los telómeros pero sin perder su estructura compacta (Wong *et al.*, 2010). También se encontró que ATRX y Daxx (“Death domain associated protein”), una proteína asociada a la heterocromatina y que se ha visto implicada en procesos de regulación del ciclo celular, forman un complejo que cataliza la deposición y remodelamiento de nucleosomas que contienen H3.3/H4. Se propone que ATRX sea quien dirige este complejo a regiones teloméricas y con su actividad de ATPasa/Helicasa promueve que Daxx realice la deposición de H3.3 para poder transcribir y mantener estas regiones heterocromáticas (Lewis *et al.*, 2010).

Otro descubrimiento reciente fue realizado por Law *et al.*, (2010) donde observa que hATRX se une a secuencias en tándem tanto en los telómeros como en la eucromatina. Muchas de estas secuencias repetidas pueden formar *in vitro* una estructura en el ADN que es llamada cuádruple hélice cuádruple (G-cuádruplex) y que hATRX se une a estas estructuras donde puede jugar un papel importante. En células de pacientes con mutaciones en hATRX, los genes asociados a estas secuencias repetidas se desregulan ocasionando los variados fenotipos que se presentan en pacientes con el Síndrome, uno de estos genes es el de la alfa-globina, lo que apoya su papel en la regulación transcripcional de este gen (Law *et al.*, 2010).

En nuestro laboratorio en colaboración con la Lic. Dafne Ibarra se realizó un dendograma utilizando el programa PhyML que se eligió por que se encuentra en línea, utiliza el parámetro de máxima verosimilitud, se basa en crear una hipótesis y comparar secuencias de nucleótidos o aminoácidos de distintos organismos con esta hipótesis y construye árboles sin necesidad de una raíz, lo cual se adecuó a nuestras necesidades. Se seleccionaron 12 organismos modelos para observar la relación de la proteína ATRX entre ellos (figura 6). Se pueden observar dos grupos principalmente, los vertebrados y los invertebrados junto con *Arabidopsis* (que si presenta el dominio ADD), donde los vertebrados mantienen una alta conservación de los aminoácidos en ambos dominios de la proteína y los invertebrados por su parte presentan el dominio Helicasa/ATPasa pero carecen del dominio ADD.

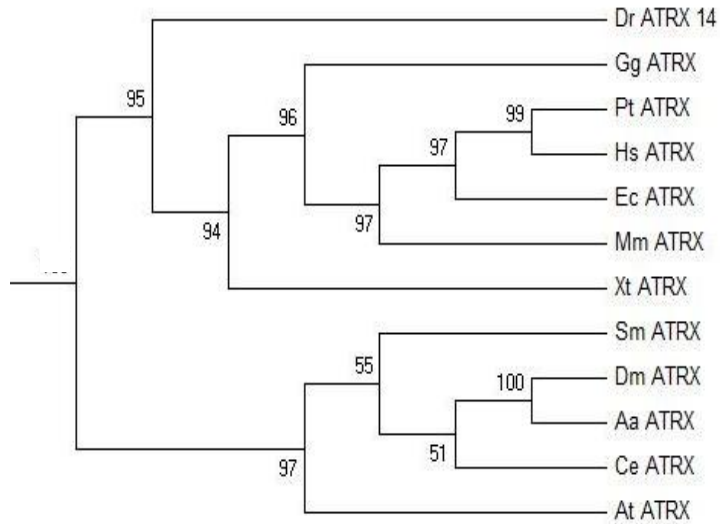


Figura 6. Dendrograma de la proteína ATRX en los distintos organismos Dr: *Danio rerio*, Gg: *Gallus gallus*, Pt: *Pan troglodytes*, Hs: *Homo sapiens*, Ec: *Equus ferus caballus*, Mm: *Mus musculus*, Xt: *Xenopus tropicalis*, Sm: *Schistosoma mansoni*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Aa: *Anopheles*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, At: *Arabidopsis thaliana*. Los números representan el “bootstrapping”, es decir la fuerza de los nodos del árbol, por lo tanto representa las veces que se analizó la topología del árbol y se observó en esa posición reflejada en porcentaje.

Asimismo se realizó un esquema comparativo entre los dominios de la proteína ATRX en los mismos 12 organismos, donde podemos observar el dominio ADD en rojo, el SNF2 en azul y el dominio Helicasa/ATPasa en amarillo y la posición de los aminoácidos dentro de la proteína. Los vertebrados conservan ambos dominios mientras que en los invertebrados se ve la ausencia del dominio ADD en la región N-terminal de la proteína. Cabe destacar que *A. thaliana* conserva el dominio ADD en la región N-terminal de la proteína. Cabe destacar que *A. thaliana* conserva el dominio ADD aunque en la región media y *S. mansoni* conserva el dominio ADD aun siendo un invertebrado (Figura 7).

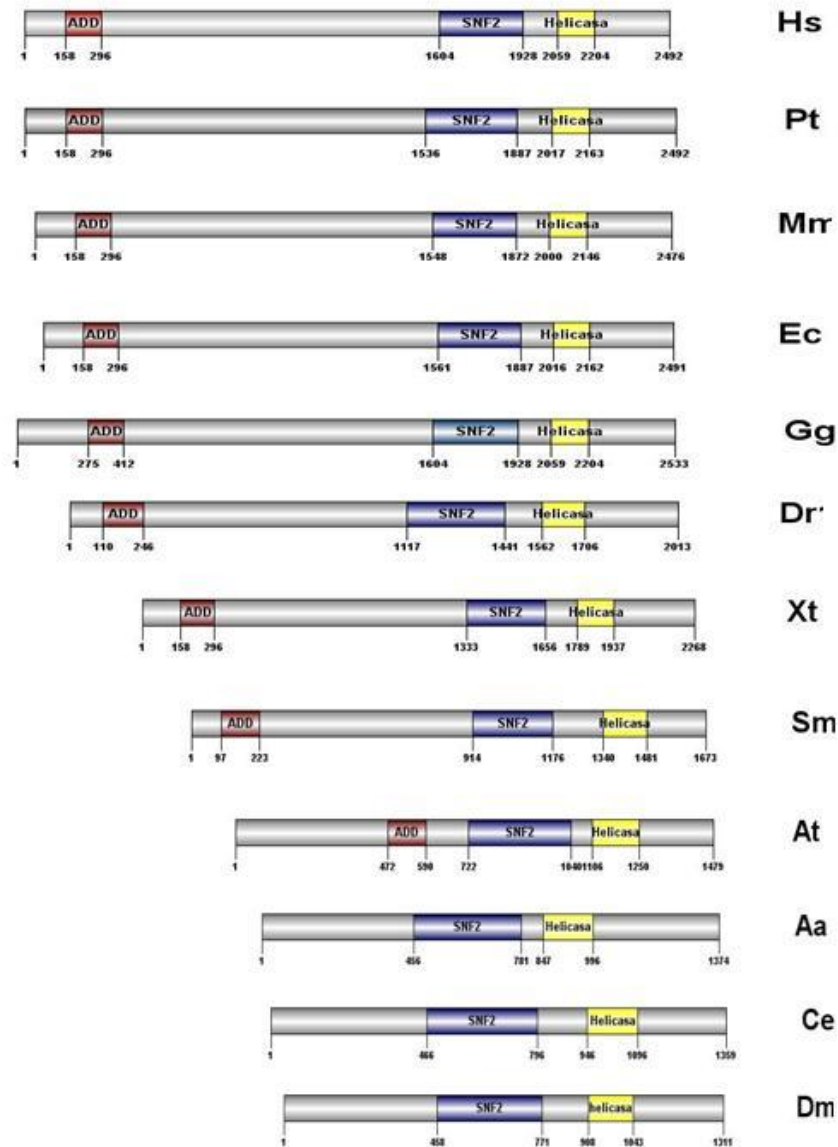


Figura 7. Conservación de los dominios ADD y SNF2 de ATRX en los distintos organismos. Hs: *Homo sapien*, Pt: *Pan troglodytes*, Mm: *Mus musculus*, Ec: *Equus ferus caballus*, Gg: *Gallus gallus*, Dr: *Danio rerio*, Xt: *Xenopus tropicalis*, Sm: *Schistosoma mansoni*, At: *Arabidopsis thaliana*, Aa: *Anopheles*, Ce: *Caenorhabditis elegans* Dm: *Drosophila melanogaster*.

### 1.3 ATRX en *Drosophila melanogaster*

En *D. melanogaster* se ha reportado que existe un posible gen homólogo a *hATR*X, (*dATR*X) (CG4548) que codifica dos isoformas\* proteicas de distinto peso molecular. Una isoforma larga llamada *dATR*X-L de 148 kDa y una corta llamada *dATR*X-S, que se genera por un sitio alternativo de la traducción, de 110 kDa (Bassett *et. al.*, 2008). La isoforma larga presenta un 48% de identidad y un 66% de similitud en aminoácidos con *hATR*X. Ambas isoformas comparten la región C-terminal Helicasa/ATPasa con la proteína humana, sin embargo ninguna posee en su región N-terminal el dominio ADD (Lee *et. al.*, 2007) lo cual la hace una diferencia interesante entre la proteína de humano y la de mosca. Se sabe que *dATR*X-L se encuentra localizada en heterocromatina pericentromérica y que al igual que *hATR*X interacciona físicamente con HP1 $\alpha$  y se han colocalizado juntas en cromosomas politénicos. (Bassett *et. al.*, 2008) (Fig. 8).

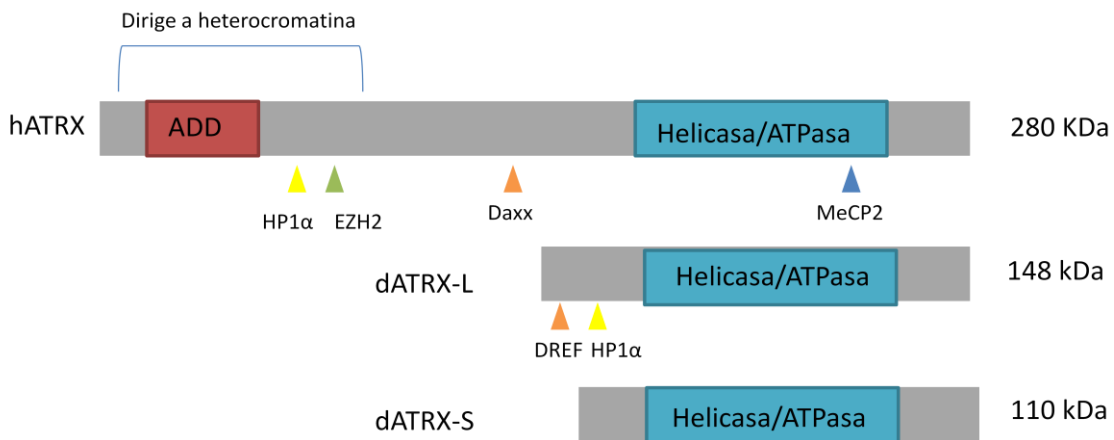


Figura 8. La proteína ATRX en humanos con los dominios ADD y Helicasa/ATPasa. En *Drosophila*, *dATR*X codifica para dos isoformas proteicas de distinto peso molecular: la isoforma larga de 148 kDa que interacciona físicamente y colocaliza con la proteína HP1- $\alpha$  y la isoforma corta de 110 kDa.

Por otra parte Schneiderman *et. al.*, (2009) mediante inmuno-histoquímica, observaron co-localización entre *dATR*X-S y la RNA Polimerasa II en la etapa de elongación en algunos lugares, lo que implica que la proteína está presente en zonas de eucromatina. Al igual que en los humanos, existen datos que indican que en *Drosophila* *dATR*X también colocaliza con H3.3 en sitios de

\*isoforma: distintos productos proteicos de diferentes versiones de ARN creados por el mismo gen, empleando distintos inicios de la transcripción o por "slicing" alternativo. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, *et. al.*, editors. GeneReviews, University of Washington, Seattle;1993. Illustrated Glossary



intercambio de nucleosomas (Schneiderman *et. al.*, 2009). Si bien se observa su presencia en ambos procesos, tanto transcripción como represión, se sugiere que está más involucrada en el silenciamiento de genes y su reclutamiento a heterocromatina (Bassett *et al.*, 2008; Emelyanov *et. al.* 2010). A pesar de todos estos avances en el conocimiento de dATRX, se desconoce el papel exacto que juega en la regulación de la transcripción génica.

En nuestro laboratorio se buscaron mediante un ensayo de doble híbrido, proteínas que interaccionaran con dATRX, con la idea de buscar proteínas que la dirigieran a sus sitios blancos en la cromatina. Se encontró que dATRX-L interacciona con el factor de transcripción DREF que tiene una secuencia de unión consenso al ADN y funciona como un regulador positivo de la transcripción, particularmente de genes involucrados en la proliferación celular. Mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* se determinó que DREF es capaz de unirse a la secuencia promotora del gen *pannier (pnr)*, un gen importante en diversos procesos del desarrollo de la mosca, y activar su transcripción, y que dATRX es reclutado por DREF para reprimir la transcripción de *pnr* cuando este gen ya no necesita ser expresado (Valadez-Graham *et. al.*, 2011).

## 2. Antecedentes

Debido a que el dominio ADD no está presente en dATRX, en nuestro laboratorio se realizó una búsqueda informática para determinar si este dominio se encontraba presente en alguna otra proteína de la mosca. Mediante un análisis de secuencias se identificó el gen CG8290 que codifica una proteína que contiene dos isoformas anotadas con el dominio ADD homólogo al dominio ADD de humanos y la proteína fue denominada dADD. Es importante mencionar que este gen no ha sido estudiado y solo está anotado en el genoma de la mosca (<http://flybase.org/>) y que ambas isoformas proteicas, en el dominio ADD, tienen un 36% de identidad y un 52% de similitud en los aminoácidos con el dominio ADD de hATRX, que es un porcentaje mayor de identidad que el que se tiene con el de las DNA metil-transferasas (DNMT's) que fue de 28% de identidad.

Una de las isoformas nombrada dADDa tiene un peso reportado de 130 kDa. La segunda isoforma tiene un peso reportado de 127 kDa, fue nombrada dADDb y tiene tres dominios MADF que son una subfamilia de los dominios SANT. Los dominios SANT tienen un papel clave en el reconocimiento de las colas de las histonas, principalmente en aquellas que no poseen modificaciones (Boyer *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003) y al parecer se ha encontrado que reconocen secuencias consenso en el ADN. Por el punto isoeléctrico teórico los dominios SANT de ADDb reconocerían a ADN(fig. 9).

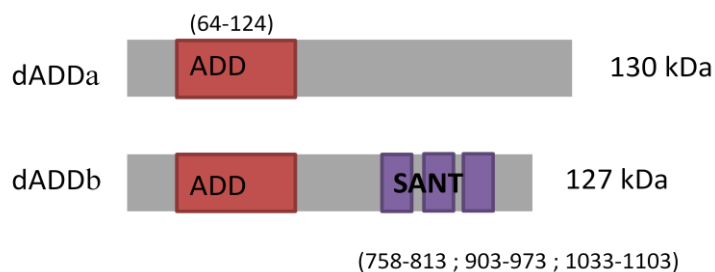


Figura 9. Isoformas proteicas de la proteína dADD. dADDa tiene un tamaño de 130 kDa. dADDb tiene un tamaño de 127 kDa y posee tres dominios SANT.

En el laboratorio se empezó a trabajar con la hipótesis de que ambas o alguna de estas proteínas pudieran interactuar con dATRX. Datos no publicados por la Dra. Viviana Valadez indican que al menos una de las dos isoformas de dADD es capaz de interactuar con dATRX (Fig10).

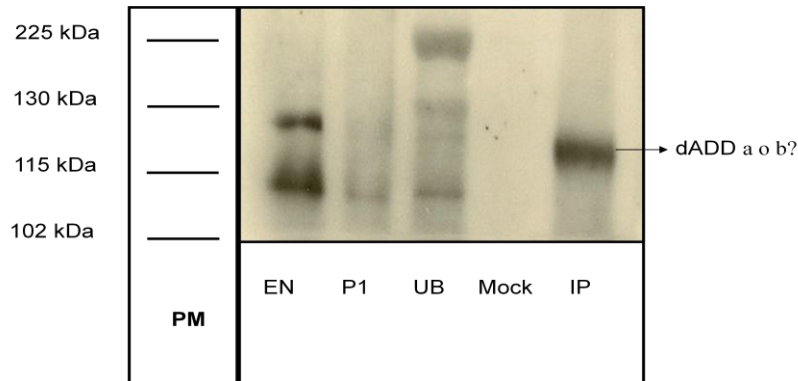


Figura 10. Inmunoprecipitación de extractos nucleares de embriones de 0-12 horas con el anti-ATRX y revelando con el anti-ADD. EN: extracto nuclear; P1: precleaning; UB: no unido; Mock: incubación del extracto con un anticuerpo irrelevante, IP: inmunoprecipitación. PM: Marcador de peso molecular.

También se ha observado que dADD y dATRX co-localizan en varias regiones de la cromatina (Neumann-Mondlak, tesis de licenciatura, 2010).

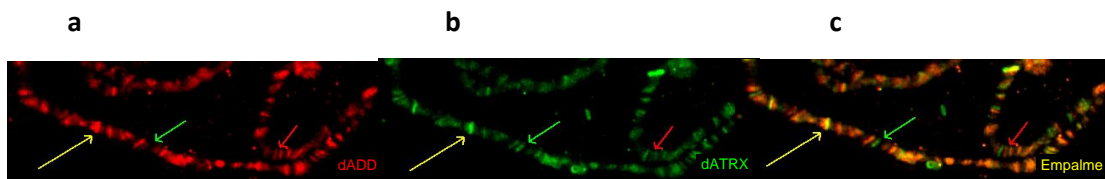


Figura 11. Colocalización de dADD y dATRX. Inmunotinciones de cromosomas politénicos de larvas de 3<sup>er</sup> instar de moscas ORE<sub>R</sub> donde el anticuerpo  $\alpha$ -dADD se muestra en rojo(a) y  $\alpha$ -dATRX en verde (b). Los sitios de convergencia o empalme se observan en amarillo (c). El anticuerpo  $\alpha$ -dADD reconoce a ambas isoformas proteicas de dADD. Las flechas indican donde se localizan bandas específicas del anticuerpo señalado con su respectivo color.

De estos datos se desprende la siguiente propuesta de trabajo de investigación. Debido a que dADDa y dADDb son las únicas proteínas en la mosca que tienen el dominio ADD, es importante determinar si están involucradas en los mismos procesos celulares que dATRX, cooperar con ella o formar un nuevo complejo remodelador junto con dATRX.

### **3. Hipótesis**

Ya que la proteína ATRX de humano presenta el dominio ADD y la proteína homóloga en *Drosophila melanogaster* carece de éste, es probable que una o ambas isoformas para las que codifica el gen CG8290 interaccionen física y/o genéticamente con dATTRX y participen en los mismos procesos celulares.

### **4. Objetivos**

#### **Objetivo General**

Caracterizar las isoformas de dADD durante el desarrollo de *D. melanogaster*.

#### **4.1 Objetivos particulares**

1. Identificar el patrón de expresión de dADD en los diferentes estadios del desarrollo de *D. melanogaster*.
2. Determinar la distribución intracelular de ambas isoformas.
3. Definir a qué tipo de cromatina se asocian las diferentes isoformas.
4. Evaluar un posible fenotipo al disminuir los niveles de Add por medio de ARN interferente.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Identificar el patrón de expresión de dADD en los diferentes estadios del desarrollo de *D. melanogaster*

- RT-PCR

Se extrajo ARN de todos los estadios del desarrollo de acuerdo con el protocolo del reactivo Trizol (Invitrogen®). El ARN se cuantificó y almacenó a -70°C en etanol 75% para su posterior utilización. La integridad del ARN se comprobó corriendo 1µl en un gel desnaturizante de agarosa al 1%.

La amplificación de las secuencias en los distintos estadios se hizo en dos pasos: primero se sintetizó cDNA a partir del ARN extraído y con ese cDNA se realizó la amplificación mediante PCR empleando oligonucleótidos específicos para cada isoforma.

La síntesis del cDNA se realizó de acuerdo al protocolo del reactivo “M-MLV Reverse Transcriptase” (Invitrogen®) pero sin el tratamiento previo con DNasa I y además del uso de oligo dT se usaron random primers (Stratagene®) para favorecer la reacción. El cDNA se almacenó a -20°C.

Para la amplificación por PCR se mezclaron los siguientes componentes en un tubo estéril de 0.5 ml: 2.5 µl de Buffer 10x (Fermentas®), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (Fermentas®), 1 µl de dNTPS (Invitrogen®) a 10mM cada uno, 1.5 µl del oligo A (10uM), 1.5 µl del oligo B (10uM), 0.5 µl de la enzima “Taq DNA Polymerase” (Fermentas®), 1 µl de cDNA y 15 µl de agua estéril. Bajo las siguientes condiciones de amplificación: 94°C por 5 minutos (1 ciclo); 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos para Rp49 y 60°C por 30 segundos para los oligos de ADD, 72°C por 30 segundos (30 ciclos); 72°C por 7 minutos (1 ciclo). El control de carga que se empleó es RP49 y además de ADN genómico para cada reacción. Posteriormente se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Los oligonucleótidos que se emplearon para la amplificación se muestran en la siguiente tabla y más abajo se encuentra un esquema donde se representan su posición aproximada en los transcritos.

Tabla1. Oligonucleótidos empleados para amplificar el cDNA de ADD.

oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
Adda5317	CATCTTACGGGCAAAGTGTT
Adda5318	CAGGCTGGCCAATATCGTGG
Addb5315	GCTTGTCATCGGGCATATCT
Addb5316	GCTCATAAGCAGCCAGCAGT
Addc4511	ACAGCGGCAGCAACGGAAGC
Addc4512	GCGGAAGTCCTGCAGCGGT

Además se emplearon oligonucleótidos para amplificar Rp49 que es el control de carga.

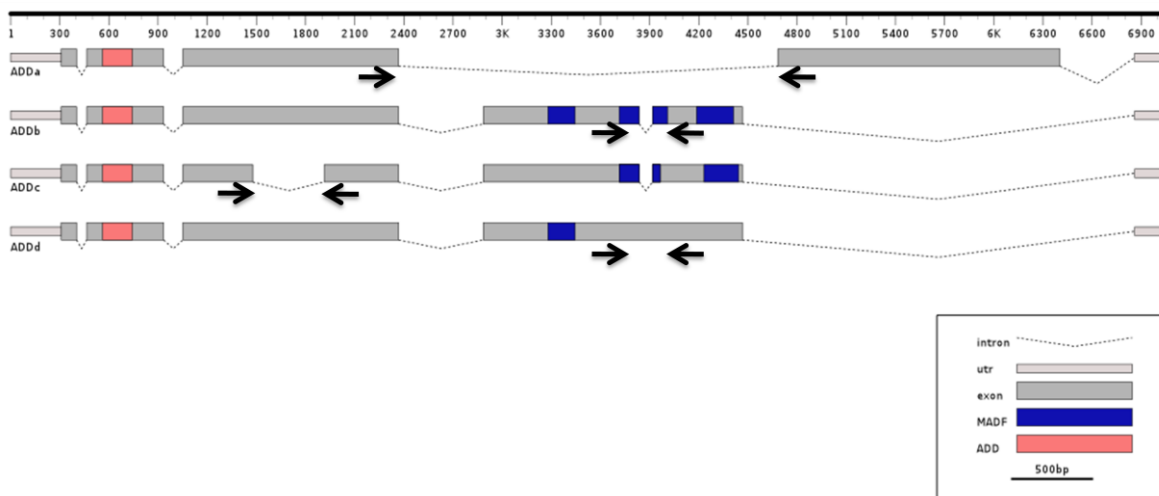


Figura 12. Esquema de los posibles transcritos codificados por el gen ADD. Las flechas indican la posición aproximada de los oligonucleótidos descritos en la tabla anterior. Los cuadros en gris oscuro son los exones, las líneas punteadas representan los intrones y los dominios ADD se observan en rosa y los SANT en azul.

- Ensayo tipo “Western blot”

Como inicialmente sólo estaban reportadas dos isoformas, dADDa y dADDb se mandaron hacer anticuerpos que reconocían específicamente a cada una de estas isoformas y se realizaron ensayos

tipo “western blot”. Además se cuenta con un anticuerpo localizado en la parte N-terminal de la proteína que reconocería a todas las posibles isoformas proteicas. A continuación se muestra un esquema con la representación de los posibles transcritos para dADD y los anticuerpos con los que contamos hasta el momento:

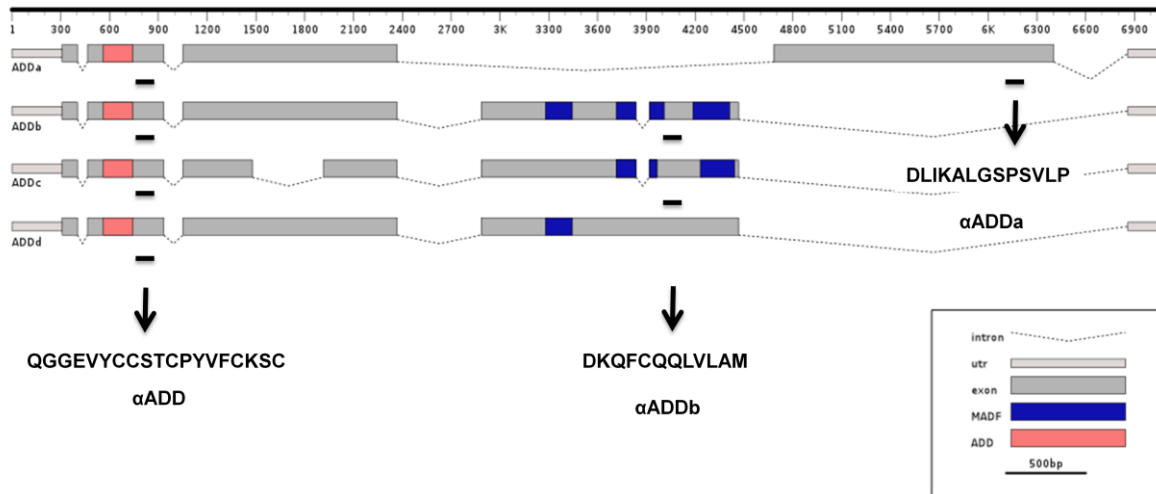


Figura 13. Representación de los posibles ARN mensajeros producidos por el gen dADD. En rosa se muestra el dominio ADD y en azul los dominios SANT. Con unas barras negras se señala la región que reconocerían los anticuerpos diseñados para reconocer estas proteínas.

Para identificar el patrón de expresión de las isoformas proteicas de dADD se realizó un ensayo tipo “Western blot” que son una herramienta favorable para la identificación y/o cuantificación de una proteína específica o complejos multiproteicos (Towbin *et. al.*, 1979). Primeramente se colectaron embriones a distintos tiempos y fueron puestos en una solución de hipoclorito de sodio (cloro comercial) al 50% con agua estéril durante 5 minutos, con el fin de decorionar al embrión. Fueron lavados varias veces para extraer el exceso de cloro y fueron puestos a secar. Se agregó el mismo volumen de buffer de homogenización (Tris pH 7.5 1M + KCl 2M + MgCl<sub>2</sub> 1M + Sacarosa 2M + Complete (inhibidor de proteasas)/ 1 pastilla para 50 ml de solución Roche®). Haciendo uso de un homogenizador de teflón se uniformó la muestra y fue colocada a 4° C. Se añadió el 10% del total de la muestra de SDS 10% y se centrifugó en frío (4°C) durante 10 minutos a 10000g recuperando el sobrenadante. En las muestras del organismo completo se procesaron con el mismo “buffer” de homogenización machos y hembras en estado adulto de la misma forma.

Se cuantificó la proteína por el método de Bradford (Biorad) para determinar la concentración proteica de la muestra (Bradford M.M 1976). Posteriormente se cargaron en un gel SDS-PAGE al 8% donde corrieron 10 minutos a 80 Volts y durante 2 horas a 110 Volts (Maniatis *et. al.*, 1987).

Para realizar la inmunodetección, la membrana se bloqueó con leche descremada 10% en PBS 1X + 0.1% Tween20, en agitación durante 1 h. Se agregó la solución con el anticuerpo primario: Leche al 5% en PBS 1X + 0.1% Tween20 en una dilución de 1:1000 del anticuerpo  $\alpha$ - $\beta$ tubulina dN-17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), 1:1000 del anticuerpo  $\alpha$ -ADD (New england peptide), 1:1000 del anticuerpo  $\alpha$ -ADDA (New england peptide) y 1:500 del anticuerpo  $\alpha$ -ADDb (New england peptide). Posteriormente se realizaron lavados con PBS+ 0.1% Tween20 y se agregaron los anticuerpos secundarios acoplados a HRP (Zymed) todos 1:2000 "goat-antimouse", "goat-antirabbit", "goat-antirabbit" y "goat-antirat" respectivamente. La detección se realizó con el "Kit" de Amersham para la detección por Quimioluminiscencia.

## **5.2 Determinar la distribución intracelular de ambas isoformas**

- Obtención de fracciones subcelulares de células en cultivo S2R+

El experimento fue realizado principalmente como describe Meller et al 1996 con algunas modificaciones. Se cultivaron células de *Drosophila* S2R+ que son células embrionarias tardías, hasta alcanzar una confluencia de 80-90% y se concentraron centrifugando a 3000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS más inhibidores. Se resuspendieron en "buffer" hipotónico [42 mM KCl, 10 mM Hepes (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>] más inhibidores y se incubaron a 4 °C por 15 minutos, se le agregó 10% de Np40 y se mezcló suavemente con pipeta. El lisado se centrifugó a 12, 000 rpm por 40 segundos para precipitar los núcleos, y el sobrenadante fue colectado (fracción citoplásmica). El pellet fue resuspendido en 100  $\mu$ l de "buffer" de lisis y se incubó en rotación por 15 minutos a 4°C, se centrifugó a 12, 000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante contiene la fracción nuclear.

Posteriormente se cuantificó la proteína por el método de Bradford (Biorad) para la determinar la concentración proteica de la muestra (Bradford M.M 1976). Posteriormente se cargaron en un gel SDS-PAGE al 8% donde corrieron 10 minutos a 80 Volts y durante 2 horas a 110 Volts (Maniatis, et al 1987).



- Ensayo tipo “Western blot”

Se realizó un ensayo tipo “western blot” como el descrito previamente, solo que en este caso se cargaron la fracción nuclear y la fracción citoplásmica en cada carril. La membrana se bloqueó como se describió previamente y los anticuerpos primarios que se emplearon fueron Pol II (Covance) 1:500,  $\alpha$ -ADD (New England) 1:1000 y Tubulina (Hibridoma) 1:2000. Se siguieron los pasos de lavados descritos previamente y los anticuerpos secundarios empleados fueron “goat-antimouse”, “goat-antirabbit” y “goat-antimouse” respectivamente, todos a una concentración 1:2000.

### **5.3 Definir a qué tipo de cromatina se asocian las dos isoformas**

- Líneas de Moscas

Para la obtención de los cromosomas politénicos, fueron utilizadas las larvas de tercer instar de la línea ORE<sub>R</sub> cepas de tipo silvestre durante los experimentos.

- Disección de glándulas salivales.

Se seleccionaron larvas de tercer instar, que son aquellas que salieron del alimento adhiriéndose a las paredes del tubo y presentan movilidad antes de prepararse para la pupación. Estas larvas fueron enjuagadas con agua destilada para quitar los excesos de comida. Posteriormente las larvas se colocaron sobre un vidrio de reloj en una solución de NaCl 0.7% esterilizada en el autoclave para la realización de disección de las glándulas salivales de las mismas. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico y unas pinzas de disección se toma la larva por ambos extremos; la cola y la probóscide extendiéndola cuidadosamente hacia lados opuestos para extirpar las glándulas. Las glándulas fueron recolectadas y se removieron los excesos de grasa y otros órganos.

- Tratamiento de glándulas para la preparación de cromosomas politénicos.

Los cromosomas politénicos fueron fijados y extendidos siguiendo el protocolo reportado por Engels (1986). Primeramente fueron tratados los portaobjetos y cubreobjetos; los portaobjetos se lavaron en una solución de 25 mL de Poli-L-lisina y puestos a secar durante una hora, los cubreobjetos se lavaron en solución de 10 mL de sigmacote y puestos a secar durante una hora y posteriormente se enjuagaron con 10 mL de etanol al 100% hasta que se secaron. Se almacenaron a 4° C.

Fueron preparadas las soluciones de lisis y fijación para el proceso de "squash". La Solución de lisis contiene: 0.5g de paraformaldehído 10% + 5 mL de H<sub>2</sub>O + 13.5 µL de KOH. La Solución fijadora está compuesta por: 0.5g de paraformaldehído 10% + 5 mL de PBS 1X. Estas soluciones fueron separadas en alícuotas de 200 µL a -20°C para su uso posterior. A partir de éstas soluciones se prepararon las soluciones II y III las cuales son preparadas en el momento debido a que deben utilizarse frescas. Solución II: contiene 185 µL de Solución fijadora + 5 µL de Triton 1% + 310 µL PBS 1X. Solución III: 185µL de Solución de lisis + 250 µL de Ácido acético al 50% + 65 µL de Agua destilada.

Se tomaron 2 cubreobjetos tratados con sigmacote y se colocaron en uno 25 µL de la Solución fijadora en uno y en el otro 25 µL de la solución de lisis. Haciendo uso de las pinzas de disección, fueron colocadas dos pares de glándulas durante un periodo de 10 segundos en la Solución II e inmediatamente después en la Solución III durante 3 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se dejó caer suavemente sobre el cubreobjetos un portaobjetos tratado con sigmacote. Se tomó el portaobjetos y con ayuda de una pinza se deslizó de un lado a otro el cubreobjetos con el objetivo de romper el tejido, hasta el punto en que las glándulas quedaron esparcidas. Se cortó un fragmento de papel cromatográfico de 3MM ("Whatman") aproximadamente del tamaño de un cubreobjetos, se colocó a lo ancho de la muestra asegurándonos de abarcar todo el cubreobjetos y se deslizó el pulgar apoyado de abajo hacia arriba varias veces con la finalidad de extender los cromosomas politénicos ("squash").

Las muestras fueron observadas bajo un microscopio electrónico, y congeladas en nitrógeno líquido. Finalmente fueron almacenadas a 4° C en solución de Metanol para su posterior uso en la inmunotinción.

- Inmunofluorescencia

Para hidratar las preparaciones se enjuagan dos veces con PBS 1X durante 30 min. Después se incuban con un anticuerpo que reconoce la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (α-H3K9me3) (Millipore) a una concentración 1:20, el α-ADD (New england peptide) a una concentración 1:50 y anticuerpo que reconoce a HP1 (Hibridoma) 1:300 en leche al 1% (diluida en PBS 1X con Igepal al 0.1%), y se deja incubando toda la noche a 4° C. Posteriormente se lavan las preparaciones 6 veces con Igepal al 0.1% diluido en PBS 1X por 15 minutos para después aplicar el

anticuerpo secundario (Alexa de Invitrogen) a una concentración 1:100 Alexa Flour rojo 568 antirabbit para  $\alpha$ -H3K9me3 y  $\alpha$ -ADD, y 1:500 antimouse Alexa Flour verde 488 para  $\alpha$ -HP1 en leche al 1% (diluida en PBS 1X con Igepal al 0.1%) y se deja incubar 3 horas a temperatura ambiente. Por último cada preparación se lava 6 veces con Igepal al 0.1% diluido en PBS 1X por 15 minutos en agitación, se agregan 20  $\mu$ l de citifluor y se sellan con esmalte.

#### 5.4 Evaluar un posible fenotipo al disminuir los niveles de Add por medio de ARN interferente

A continuación se muestra una tabla con las principales características de los vectores empleados en este trabajo. Las representaciones esquemáticas de los vectores están en anexos.

Tabla2. Vectores empleados para realizar las clonaciones y subclonaciones del presente trabajo.

Vector	Tamaño	Características	Resistencia
pGEX4T-1a	6.6 Kb	Vector de fusión a GST con el cDNA de ADDa insertado	Ampicilina
pGEX4T-1b	6.4 Kb	Vector de fusión a GST con el cDNA de ADDb insertado	Ampicilina
pSympUAST-w	12 Kb	Vector de expresión inducida por el sistema Gal4 en <i>D. melanogaster</i> con el promotor SV40 y el marcador w+.	Ampicilina

- Clonación y purificación de fragmentos de ADN

Para poder generar moscas transgénicas primero se realizaron subclonaciones de clonas proporcionadas por M. C. Brenda Falcón en el vector pGEX4T-1 con resistencia a ampicilina. En este vector se encontraban las secuencias del cDNA tanto de ADDa y ADDb por separado. Los vectores se digirieron con enzimas de restricción apropiadas: el vector que contenía el fragmento de alfa fue digerido con las enzimas de restricción Bgl1 y Not1 (Roche) para obtener un fragmento de 288 pb. Para el vector que contenía el fragmento de beta se digirió con las enzimas de restricción Sal1 y EcoR1 (Roche) para obtener un fragmento de 238 pb. Los fragmentos producidos

por los cortes se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Posteriormente las bandas de interés se cortaron y se purificaron con el “kit” de QIAGEN según las especificaciones del proveedor.

- Ligaciones

Se llevaron a cabo ligaciones de los fragmentos previamente digeridos en el vector psympUAST-w. El vector fue previamente digerido con las enzimas BglII y Not I para insertar el fragmento alfa, y con las enzimas Xho I (son extremos compatibles los generados por la enzima Sal I) y Ecor1 y defosforilado para poder ligarlo con el fragmento en relación 1:3. Se incubó durante 12 h a 4°C y posteriormente 3 h a temperatura ambiente. Subsiguientemente se purificó el ADN con varios lavados de 1-butanol.

- Transformación por electroporación

Se electroporaron bacterias *E. coli* preparadas para el procedimiento (Sambrook *et. al.*, 1989) de la cepa DH5α con el vector ligado dando un pulso de 1.8 kV y se recuperaron a 37°C durante 1h en medio SOC. Posteriormente se plaquearon en cajas con medio LB-agar y el antibiótico correspondiente.

- Confirmación por pcr y purificación

Una vez crecidas las colonias en placas se confirmó la presencia del vector junto con el fragmento de interés por medio de PCR utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente para cada fragmento como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la confirmación de la inserción de los fragmentos de interés de ADD.

oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
Adda3309	GATCTGATAAAAAGCCTTGGGCAGCCCCAGCGTCCT
Adda4350	ATCAGCGGCCGCTAGCCAACAATCTCAGCCGTGGC
Addb3214	GAATTCGGCCGCATCTTCGTGGTCTTTTC
Addb1247	CAACGTCGACAACACTGGACGACGTGGATCTC

Para verificar que la clona obtenida estuviera en el marco de lectura correcto y/o que la enzima Taq polimerasa no hubiera introducido mutaciones se secuenciaron las clonas de interés en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

- Inyección

La inyección de los plásmidos psympUAST-w con los respectivos fragmentos de cada isoforma se llevó a cabo por la compañía Genetic Services, Inc (<http://www.geneticservices.com>). Consistió en microinyección de embriones de la línea  $w^{118}/w^{118}$  antes de la formación de las células polares ya que estas células darán origen a la línea germinal y es necesario inyectar antes de este momento para poder heredar la construcción. La microinyección se llevó a cabo con los plásmidos psympUAST-w que contiene cinco secuencias de levadura UAS (Upstream Activator Sequences) inducibles por Gal4 también de levadura. Es un sistema ventajoso que permite el control temporal y espacial de la expresión de genes ectópicos que fue propuesto en 1993 por Brand y Perrimon. Es un sistema de dos componentes, uno de ellos es la proteína GAL4, que es un factor transcripcional endógeno de levaduras y no presenta homólogos en *Drosophila*. El segundo componente son las secuencias UAS (Upstream Activating Sequence) a las cuales se une GAL4 para activar la transcripción de genes en *Drosophila* que se encuentran río abajo de la misma (Fischer et al., 1988) (fig 14).

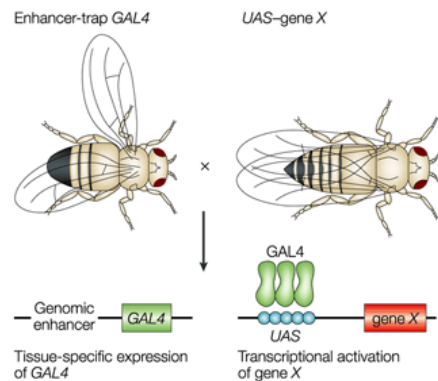


Figura 14. Sistema UAS-GAL4 se puede usar para regular la expresión de genes en *Drosophila*. Esquema el cual ejemplifica como se lleva a cabo la activación específica de un gen haciendo uso del sistema UAS-Gal4. Donde uno de los individuos posee únicamente la secuencia activadora Gal4

y el otro posee solamente la secuencia UAS. Esto permite asegurarnos que en toda la progenie se active o inactive nuestro gen de interés (gene X) (Tomado de St Johnston, 2002).

El plásmido *psympUAS-w* además de la secuencia de inserción también contiene el gen  $w^+$  de *Drosophila* que permite la síntesis del pigmento que confiere el color rojo de los ojos de las moscas. Por esta característica es fácilmente observable como marcador de transformación en individuos  $w^{118}/w^{118}$  que no pueden sintetizar el pigmento rojo y presentan ojos blancos. La secuencia de inserción además de estos elementos presenta secuencias invertidas repetidas del elemento P que es capaz de transponer en presencia de la enzima transposas contrasformada durante la inyección con otro plásmido, lo cual permite la inserción al azar en el genoma de *Drosophila* (Spradling, 1986).

Una vez microinyectados los embriones se recuperan las larvas y se seleccionan los adultos con ojos rojos,  $w^+$  para poder establecer líneas transgénicas independientes.

El sistema UAS-Gal4 es ampliamente utilizado para ensayos de sobreexpresión de genes, la interferencia en la expresión de algún gen de interés utilizando ARNi y la expresión de genes reporteros que permiten la visualización de la estructura y el funcionamiento de sistemas de interés (Brand et al., 1995).

- Mapeo de la inserción y estabilización de líneas transgénicas

Para poder identificar el cromosoma donde ocurrió la inserción, se seleccionaron machos de cada línea transgénica que expresara el gen marcador  $w^+$  (ojos rojos) asociado al transgen, y se cruzaron de manera independiente con hembras vírgenes de una línea Doble Balancer que tiene marcados los cromosomas 2 y 3 con distintos marcadores dominantes, CyO para el cromosoma 2 (alas “curly”) y Sb para el cromosoma 3 (quetas rasuradas y gruesas).

Se seleccionaron los individuos con el genotipo  $t?/CyO$ ;  $t?/MKRS$ , Sb para establecer las familias de líneas transgénicas independientes. Posteriormente se tomaron tres machos de cada línea y se cruzaron con diez hembras vírgenes con genotipo  $w^{118}/w^{118}$  para poder determinar en qué cromosoma se localiza el transgen como se muestra en el siguiente esquema de cruces:

<u>w<sup>1118</sup>; Sp; TM2</u> w <sup>1118</sup> Cyo MKRS (ojos blancos)	x	<u>w<sup>1118</sup>; T?; T?</u> Y + + (ojos rojos)
<u>w<sup>1118</sup>; CyO; MKRS</u> w <sup>1118</sup> T? T? (hermanos x hermanas)	x	<u>w<sup>1118</sup>; CyO; MKRS</u> Y T? T? (ojos rojos)
<u>w<sup>1118</sup>;</u> w <sup>1118</sup> (ojos blancos)	x	<u>w<sup>1118</sup>; CyO; MKRS</u> Y T? T? (ojos rojos)

Para poder observar un fenotipo debido a la falta o disminución de la expresión de la proteína por el mecanismo de ARN interferente se cruzaron las moscas diseñadas y balanceadas con moscas que contienen el “driver” de expresión ubicua de Gal4 tubulina  $\gamma[1]$  w[\*]; P{w[+mC]=tubP-GAL4}LL7/TM3, Sb[1] (5138), expresión ubica de Gal4 Actina  $\gamma[1]$  w[\*]; P{w[+mC]=Act5C-GAL4}25FO1/CyO,  $\gamma[+]$  (4414), expresión específica de Gal4 en glándulas salivales w[1118]; P{w[+mC]=Sgs3-GAL4.PD}TP1 (6870), expresión dorsal en el disco imagal de ala w[1118] P{w[+mW.hs]=GawB}Bx[MS1096] (8860), expresión de Gal4 en el ala y en el halterio P{w[+m\*]=GAL4}A9, w[\*] (8761) y expresión de Gal4 en los compartimentos posteriores en la segmentación embrionaria w[\*]; P{w[+mW.hs]=en2.4-GAL4}e16E (30564) todas moscas provenientes de “Bloomington Stock Center”. También se emplearon moscas con dicer Gal4. Y como control se empleó una mosca que expresa un ARN interferente para UAS-ADD pero que disminuye los niveles de todas las isoformas, la línea fue obtenida del “Vienna Drosophila Stock Center” w<sup>1118</sup>; P{GD4729} (v12739).

Para los análisis de RT-PCR semicuantitativa se empleó la técnica descrita en el punto 5.1 pero se analizaron los productos de pcr a distinto ciclos, es decir no punto final, para observar cuando comienza a aparecer la banda correspondiente al transcrito esperado. La estandarización de los ciclos se muestra en anexos.

## 6. Resultados

### 6.1 Identificar el patrón de expresión de dADD en los diferentes estadios del desarrollo de *D. melanogaster*

Para identificar el patrón de expresión de dADDA, dADDb y la reciente isoforma descrita en flybase.org dADDc en los diferentes estadios del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, se extrajo ARN total de todos los estadios del desarrollo empleando el reactivo Trizol de Invitrogen® para poder realizar un RT-PCR del desarrollo. A continuación se muestra un gel desnaturalizante de ARN para observar la calidad de las muestras:

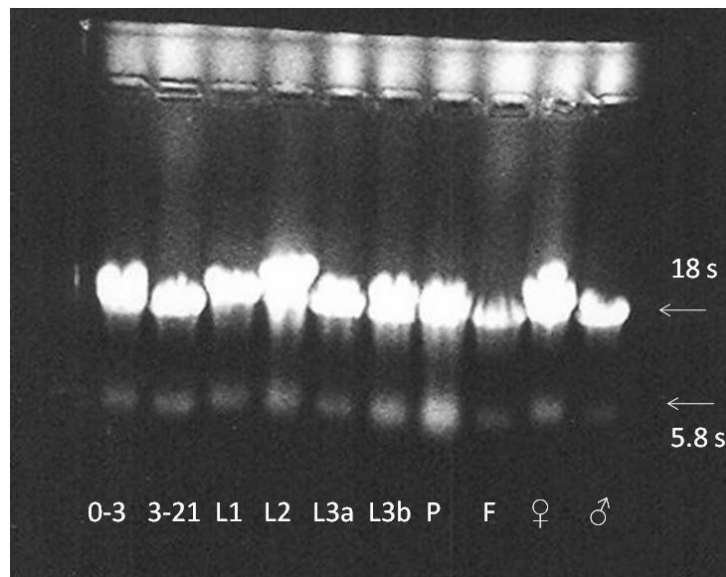


Figura 15. Gel desnaturalizante de ARN. Extractos totales de ARN del desarrollo 0-3: embriones de 0-3 horas, 3-21: embriones de 3 a 21 horas, L1: larvas 1° instar, L2: larvas 2° instar, L3: larvas 3° instar, P: pupas, F: faratos, ♀: hembras, ♂: machos.

En el gel se pueden observar dos bandas mayoritarias que comprenden los ARN ribosomales, el primer fragmento es el 18s, y en *Drosophila* se tiene un fragmento de 28s que se procesa en dos que migran con el mismo peso que el fragmento de 18s. La banda más pequeña corresponde al fragmento de 5.8s (Tautz *et. al.*, 1988).

Una vez confirmada la integridad del ARN se realizó la reacción de transcripción reversa en cada uno de los estadios para generar cDNA y posteriormente amplificar una región específica para



cada isoforma y observar su distribución durante el desarrollo. Los productos obtenidos se cargaron en geles de agarosa al 1.5% y se visualizaron en un transiluminador (Fig 16).

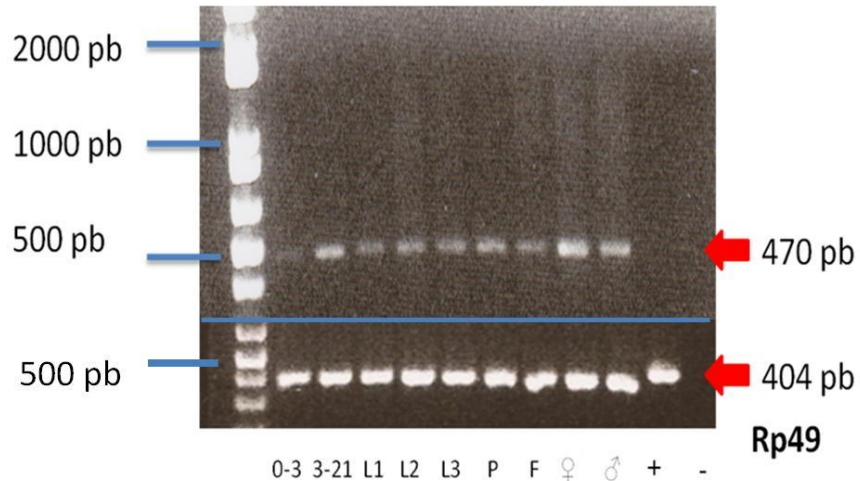


Figura 16. ADDa se expresa durante todo el desarrollo. cDNA del desarrollo 0-3: embriones de 0-3 horas, 3-21: embriones de 3 a 21 horas, L1: larvas 1° instar, L2: larvas 2° instar, L3: larvas 3° instar, P: pupas, F: faratos, ♀: hembras, ♂: machos, +: ADN genómico, -: control negativo. En la parte inferior se muestra el control de carga que se empleó, Rp49 el cual se expresa durante todo el desarrollo y se observa solo la banda esperada denotando la ausencia de contaminación por ADN genómico (carril -).

Para la isoforma “b” se observaron dos isoformas, una esperada de 446 pb y una previamente no descrita del tamaño de la muestra de ADN genómico, es decir que se encuentra reteniendo el intrón. Además se puede observar que la expresión de las isoformas no es constante en relación de la una con la otra (figura 17). La isoforma b larga (528 pb) fue llamada ADDd. La banda fue purificada y se mandó secuenciar para verificar que sea un nuevo transcrito de ADD. Asimismo en un ensayo *in silico* se determinó que esta nueva isoforma cambia el marco de lectura y causa un stop codón prematuro que produciría una nueva isoforma más pequeña de 106 kDa aproximadamente con la presencia de un único dominio SANT.

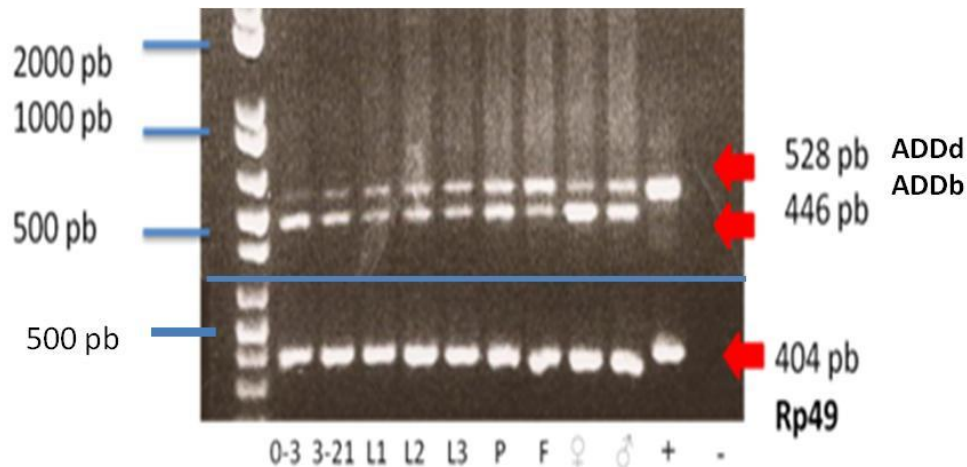


Figura 17. ADDb se expresa durante todo el desarrollo. cDNA del desarrollo 0-3: embriones de 0-3 horas, 3-21: embriones de 3 a 21 horas, L1: larvas 1° instar, L2: larvas 2° instar, L3: larvas 3° instar, P: pupas, F: faratos, ♀: hembras, ♂: machos, +: control positivo, -: control negativo. En la parte inferior se muestra el control de carga que se empleó, Rp49 el cual se expresa durante todo el desarrollo y se observa solo la banda esperada denotando la ausencia de contaminación por ADN genómico.

Para todos los ensayos de RT-PCR se empleó el mismo cDNA tanto para ver las isoformas como para los controles de Rp49. Esto demuestra que no existe contaminación por ADN genómico.

En los últimos meses se reportó una posible nueva isoforma llamada ADDc en el flybase. Se mandaron hacer los oligos específicos para ver esta nueva isoforma que corta el exón tres y produce un pequeño intrón de aproximadamente 70 pb por lo cual amplifica como una banda de aproximadamente 100 pb. En la parte superior del gel con un peso de 536 pb se observa la banda correspondiente a las demás isoformas de ADD (figura 18). *In silico* se determinó que este nuevo transcrito podría codificar una isoforma proteica de aproximadamente 112 kDa y que solo contendría dos dominios SANT.

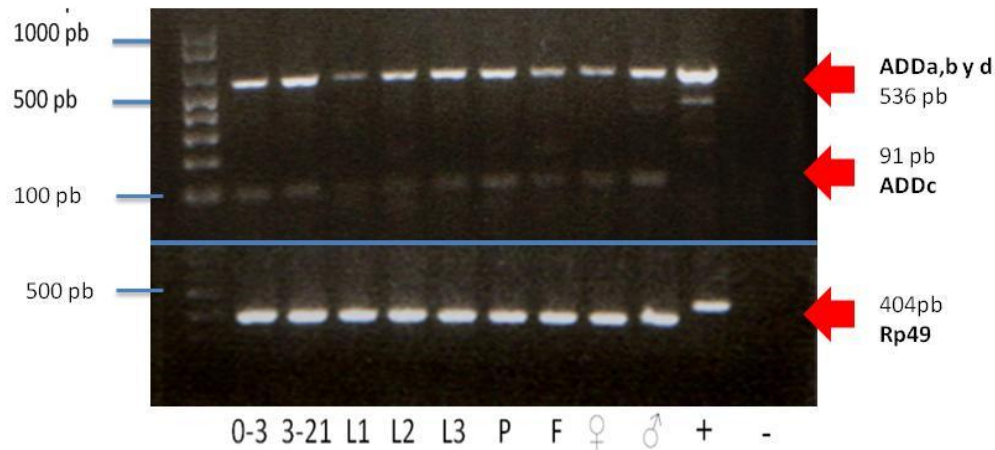


Figura 18. ADDc se expresa durante todo el desarrollo. cDNA del desarrollo 0-3: embriones de 0-3 horas, 3-21: embriones de 3 a 21 horas, L1: larvas 1° instar, L2: larvas 2° instar, L3: larvas 3° instar, P: pupas, F: faratos, ♀: hembras, ♂: machos, +: control positivo, -: control negativo, solo agua. En la parte inferior se muestra el control de carga que se empleó, Rp49 el cual se expresa durante todo el desarrollo y se observa sólo la banda esperada denotando la ausencia de contaminación por ADN genómico.

En resumen, se han descrito hasta el momento cuatro isoformas posibles que se muestran a continuación con sus posibles pesos esperados y los dominios que presentarían (fig 19).

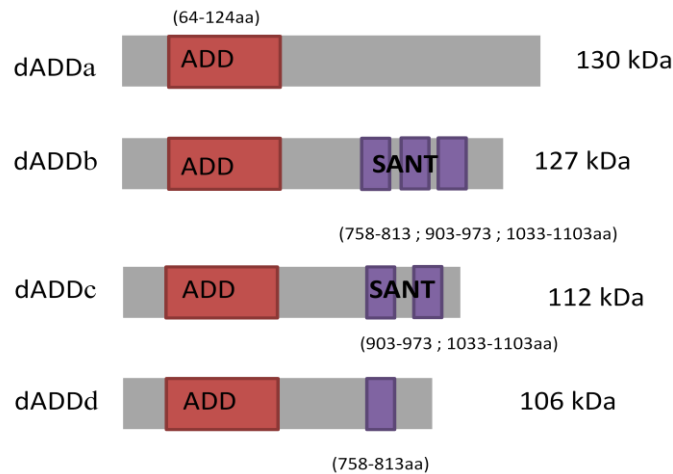


Figura 19. Representación esquemática de las posibles isoformas del gen dADD con sus nombres, los dominios que contienen y los aminoácidos donde se localizan y finalmente el peso esperado.

Debido a la alta cantidad de isoformas se decidió realizar un ensayo tipo “western” con extractos totales proteicos revelando con el anticuerpo que reconoce a todas las formas para determinar su

presencia durante el estadio embrionario y en adultos. A continuación se muestra el film con los distintos estadios embrionarios que se evaluaron y muestras de adultos, donde la primera banda de peso 130 kDa podría ser un doblete con ADDa y ADDb y la segunda de peso 112 kDa podría ser ADDc:

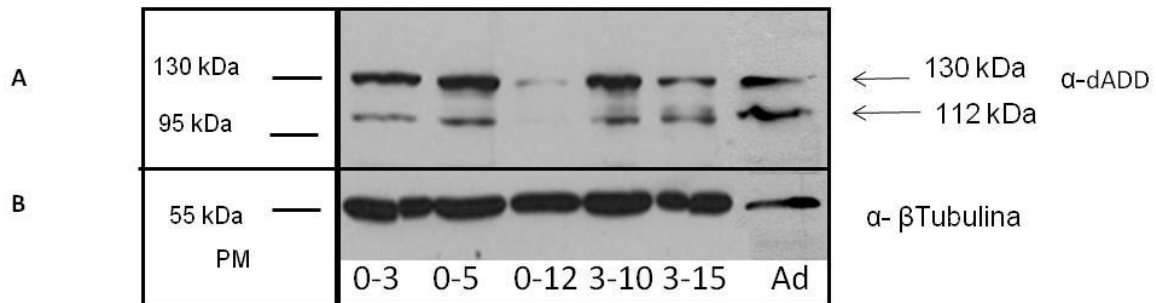


Figura 20. Determinación de la presencia de isoformas dADD a lo largo del desarrollo embrionario. **A.** El anticuerpo  $\alpha$ -dADD reconoce a todas isoformas de la proteína; **B.** Control de carga revelada con  $\alpha$ - $\beta$ Tubulina con una banda de 55 kDa. PM: Marcador de peso molecular, embriones de 0-3 horas, 0-5 horas, 0-12 horas, 3-10 horas y 3-15 horas, Ad: organismos adultos hembras y machos.

Se cree que en los embriones de 0-12 horas se degradó la proteína y como la tubulina es una proteína tan abundante, aun así se pudo observar.

Aunque en la RT-PCR se logra observar ADDd durante todo el desarrollo, por medio de “western” blot no se pudo observar una banda con el peso esperado de 106 kDa.

Posteriormente se realizaron ensayos preliminares tipo “western blot” con los anticuerpos que se hicieron específicamente para ADDa y ADDb en extractos proteicos de embriones y adultos. Hasta el momento solo se han probado estos nuevos anticuerpos en tiras de membrana completas y no se cuenta con un control de carga. Las figuras se muestran en anexos.

## 6.2 Determinar la distribución intracelular de ambas isoformas.

Debido a que dATR<sub>X</sub> está reportado como una proteína principalmente nuclear (Law, *et al* 2010) se decidió indagar la localización de estas proteínas realizando una separación de extractos proteicos de células en cultivo de *Drosophila* S2R<sup>+</sup> donde por gradiente se separaron la fracción nuclear y citoplásmica para enriquecer las distintas partes. Por medio de un ensayo tipo “western blot” se analizó la proteína ADD en el cual se pueden observar distintas bandas, una de 130 kDa que podrían ser ADD<sub>a</sub> y/o ADD<sub>b</sub>, y otra de 112 kDa que podría ser ADD<sub>c</sub> y las bandas por debajo del marcador de peso de 95 kDa podrían ser productos de degradación y se confirmó su localización nuclear. En la parte superior de la figura se observa una banda que corresponde a la Polimerasa II como marcador de la fracción nuclear y en la parte inferior se observa una banda para la β-tubulina que se encuentra altamente enriquecida en la fracción citoplásmica.

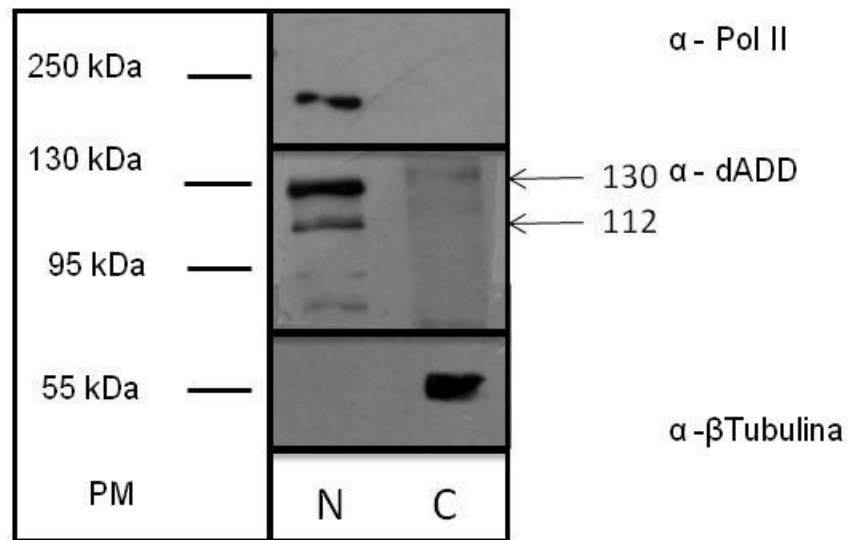
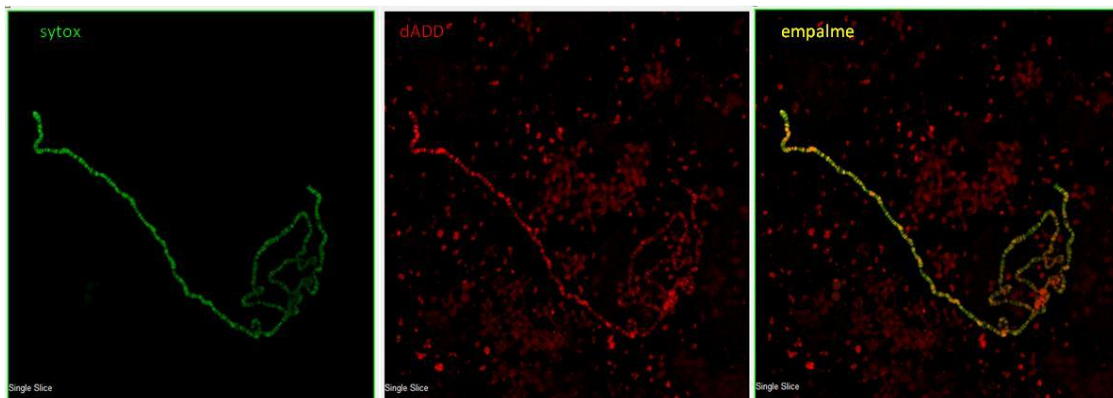


Figura 21. Ensayo tipo western blot de células en cultivo S2R<sup>+</sup> separando la fracción nuclear y citoplásmica. Se probaron tres distintos anticuerpos, α-Polimerasa II, α-ADD y α-βtubulina; N: fracción nuclear, C: fracción citoplásmica; PM: Marcador de peso molecular.

### 6.3 Definir a qué tipo de cromatina se asocian las isoformas

En *Drosophila* es muy conocido el uso de los cromosomas politénicos de larvas de 3er instar como modelo para estudiar las relaciones entre la estructura de la cromatina la transcripción. Este tejido pasa por varias rondas de replicación con ausencia de división celular dando aproximadamente 1000 copias del ADN (Johansen *et. al.*, 2009). Usando imágenes de contraste de fases o preparaciones de fluorescencia se puede apreciar cromatina más densamente condensada a la cual se le llama bandas y a las zonas más dispersas interbandas. Las interbandas localizan específicamente con la ARN polimerasa y se asocian a factores que indican genes activos. Las bandas se asocian a heterocromatina y tienen un patrón muy específico, por lo cual han sido identificadas y mapeadas (Jamrich *et. at.*, 1977).

Para observar a qué tipo de cromatina se asocian las proteínas ADD se empleó el anticuerpo que reconoce a todas las isoformas en cromosomas politénicos de larvas de tercer instar de moscas Oregon y como control de tinción del ADN empleó sytox green, que es una molécula altamente afín a ácidos nucleicos. En cromosomas politénicos ADD se localiza principalmente en zonas de bandas y no en las interbandas, por lo cual se observa un gran empalme con sytox.



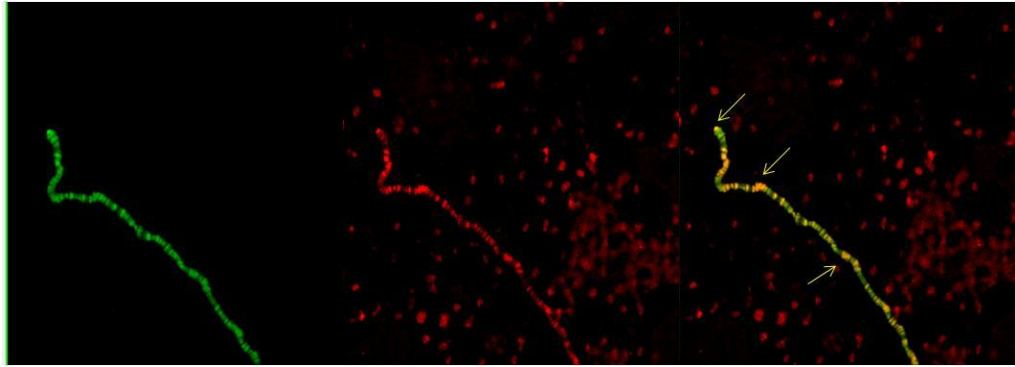


Figura22. dADD se observa en principalmente en bandas. Cromosomas politénicos de larvas de 3er instar de moscas Oregon donde se observa la tinción del ADN con sytox (verde), $\alpha$ -ADD (rojo), empalme (fotografías tomadas 40x). En la parte inferior se muestra un acercamiento a uno de los brazos del cromosoma.

Posteriormente, se intentaron inmunotinciones con dos distintos anticuerpos que reconocen la marca H3K9me3 pero no se obtuvieron resultados positivos. Al mismo tiempo se evaluó la co-localización de ADD con la proteína HP1 $\alpha$  ya que esta proteína reconoce la marca H3K9me3 por medio de su cromodominio y está asociada a regiones de heterocromatina donde se aprecia principalmente en el cromocentro ya que es una región altamente heterocromática. Como se puede ver en la figura 23, ADD colocaliza principalmente con HP1 $\alpha$  en el cromocentro.

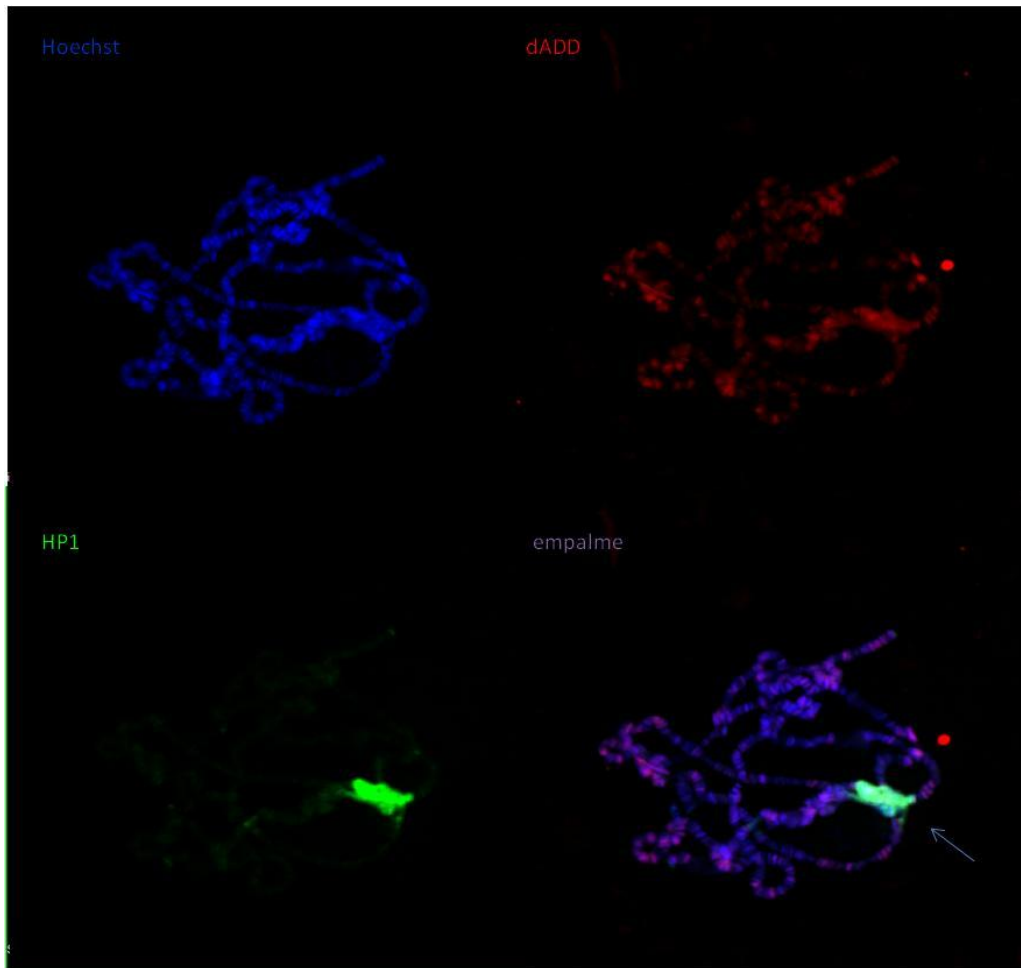


Figura 23. ADD y HP1 $\alpha$  colocalizan en el cromocentro. Cromosomas politénicos de larvas de 3er instar de moscas Oregon donde se observa la tinción con  $\alpha$ -HP1 $\alpha$  (verde),  $\alpha$ -ADD (rojo), tinción del ADN con Hoetch (azul), empalme (gris/morado) (fotografías tomadas a 40x). En el empalme se muestra una flecha con la colociación en el cromocentro.



#### 6.4 Evaluar un posible fenotipo al disminuir los niveles de Add por medio de ARN interferente

Para poder determinar la posible función de ADD en *Drosophila* una de las técnicas que se puede emplear es la construcción de moscas transgénicas que tengan un ARN interferente específico para cada isoforma ya que no existen moscas disponibles específicas para cada isoforma en los bancos comerciales de moscas transgénicas ni moscas mutantes en este gen.

Como se mencionó con anterioridad solo se tenía conocimiento de la existencia de las isoformas ADDa y ADDb por lo cual el trabajo se describe a continuación se realizó tomando en cuenta únicamente estas dos isoformas. Se realizaron subclonaciones de clonas proporcionadas por M. C. Brenda Falcón que tienen las secuencias del cDNA para cada isoforma en el vector PGEX-4T1. Las clonas se pidieron a flybase.org. De la clona 24 realicé una doble digestión con las enzimas de restricción BglII y NotI de Roche para obtener un fragmento de 288 pb que es específico de la isoforma "a" en su exón 6 (la secuencia se encuentra en anexos). Posteriormente lo inserté en el plásmido sympUAST-w predigerido con las mismas enzimas.

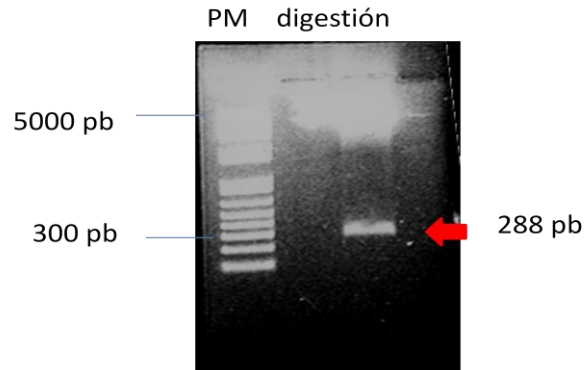


Figura 24. Gel de agarosa al 1% donde se observa el fragmento de 288 pb. PM: marcador de peso molecular invitrogen. Digestión: ADN plasmídico digerido con BglII y NotI.

Se diseñaron oligos específicos para la secuencia subclonada y las colonias se confirmaron por PCR y se mandó a secuenciar a la colonia 1. La banda que se observa en la parte superior del control de solo plásmido y el control positivo son formas super enrolladas del plásmido.

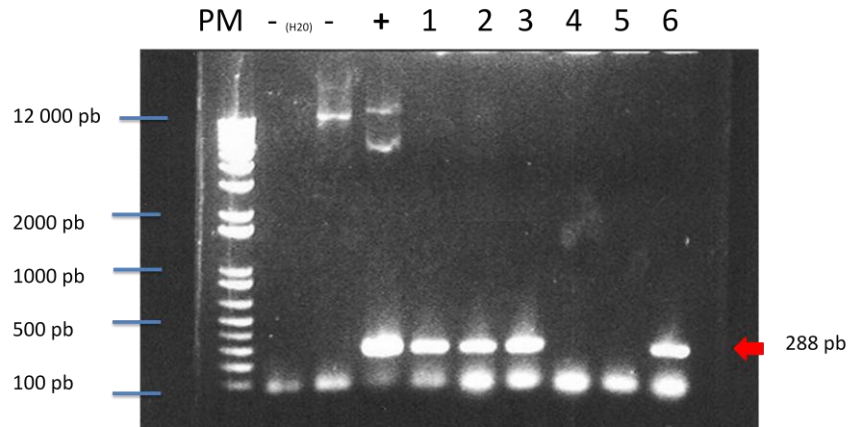


Figura 25. Gel de agarosa 1% donde se cargaron los productos de PCR con los oligos específicos. PM: marcador de peso molecular invitrogen. -(H<sub>2</sub>O): control negativo que incluye solo los oligos y agua, -: plásmido sympUAST, +: el plásmido PGEX4T1 con la secuencia de interés, 1-6: colonias que crecieron en la placa con antibiótico.

Para construir el vector que contenía la secuencia de ARNi específica contra para la isoforma “b”, se seleccionó la clona 23 de flybase.org y se cortó el cDNA con una doble digestión con Sall y EcoRI de Roche para obtener un fragmento de 238 pb específico para la isoforma beta en su exón 4 (la secuencia se encuentra en anexos) y se insertó en el vector sympUAST-w digerido previamente con XhoI y EcoRI de Roche. Se empleó este plásmido por las características que posee mencionadas anteriormente en materiales y métodos.

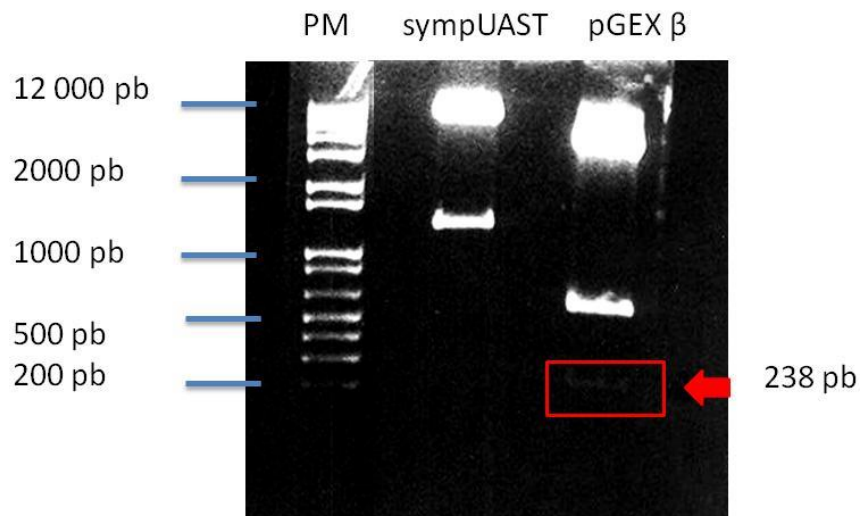


Figura 26. Gel de agarosa al 1% donde se observa el fragmento de 238 pb. PM: marcador de peso molecular invitrogen. psympUAST: plásmido digerido con XhoI y EcoRI, pGEX-4T1:plásmido digerido con Sall y EcoRI.

Se diseñaron oligos específicos para la secuencia subclonada y las colonias se confirmaron por PCR y se mando secuenciar a la colonia 2.

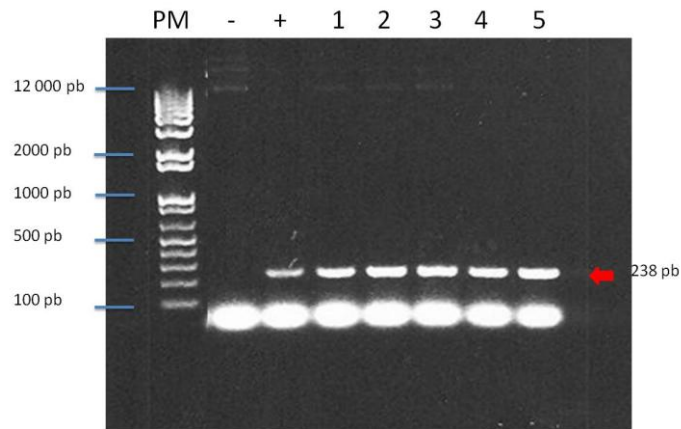


Figura 27. Gel de agarosa 1% donde se cargaron los productos de PCR con los oligos específicos. PM: marcador de peso molecular invitrogen. -: plásmido sympUAST, +: el plásmido PGEX4T1 con la secuencia de interés, 1-5: colonias que crecieron en la placa con antibiótico.

Posteriormente se purificó el ADN con las especificaciones de la compañía “Genetic Services, Inc” para la inyección de embriones y la obtención de líneas transgénicas. De la compañía obtuvimos seis líneas transgénicas para ADDa y nueve líneas transgénicas para ADDb que se muestran en el siguiente cuadro junto con el mapeo del transgen.

Tabla 4. Líneas mapeadas con la construcción UAS-ADDai y UAS-ADDbi

Línea	Cromosoma
<b>ADDai</b>	
Línea 1	2
Línea 2	3

Línea 3	3
Línea 4	X
Línea 5	2
Línea 6	2
<b>ADDbi</b>	
Línea 1	2
Línea 2	2 y 3
Línea 3	2
Línea 4	3
Línea 5	3
Línea 6	2 y 3
Línea 7	2
Línea 8	3
Línea 9	2

No se buscaron inserciones en el cromosoma cuatro porque prácticamente nunca suceden debido a que este cromosoma es muy pequeño y esencialmente heterocromático (Ashburner, 2004). Una vez conocido el cromosoma en el que se encontraba la inserción en cada línea se construyeron líneas estables de cada una de ellas.

Posteriormente se diseñó un oligo para la región UAS y se realizaron PCR de ADN genómico de distintas moscas, junto con el oligo 3' específico para cada isoforma para confirmar la presencia del plásmido sympUAST con la región deseada de cada isoforma como se muestra a continuación:

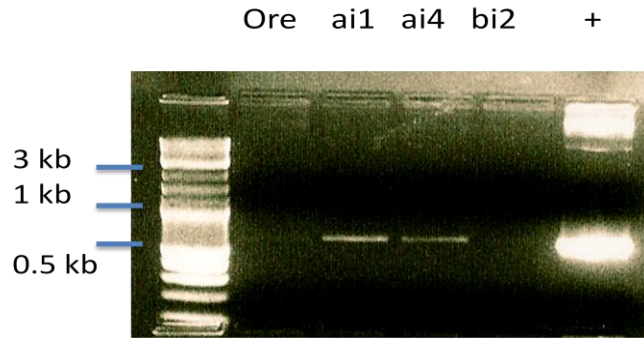


Figura 28. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la presencia del transgen en las moscas diseñadas para identificar el interferente de cada isoforma. Ore: ADN genómico de moscas “wild type” que sirven como control negativo, ai1: ADN genómico de la línea 1, ai4: ADN genómico de la línea 4, bi2: ADN genómico de la línea 2, +: control positivo empleando el plásmido purificado que fue microinyectado en las moscas.

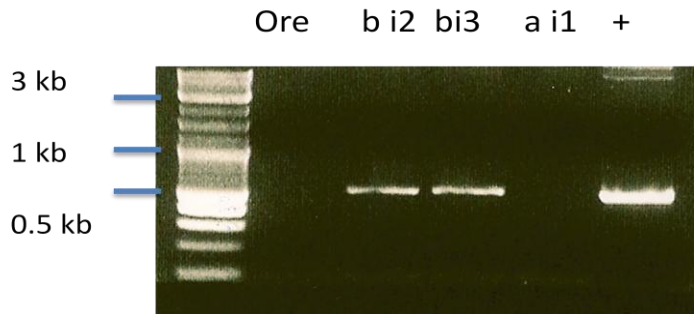


Figura 29. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la presencia del transgen en las moscas diseñadas para expresar el interferente de cada isoforma. Ore: ADN genómico de moscas “wild type” que sirven como control negativo, bi2: ADN genómico de la línea 2, bi3: ADN genómico de la línea 3, ai1: ADN genómico de la línea 1, +: control positivo empleando el plásmido purificado que fue microinyectado en las moscas.

Una vez confirmada la inserción correcta de las secuencias en el genoma de la mosca es necesario inducir su expresión por medio de “drivers” que contengan la secuencia para expresar Gal4. Este sistema permite la inducción de la proteína de interés espacio y/o temporalmente dirigida, manipulando el sitio donde se exprese el activador GAL4. Esto se logra eligiendo de una colección amplia en el acervo comunitario de *Drosophila*, líneas de moscas que expresan GAL4 en tejidos y/o etapas de desarrollo de interés. A estas líneas se les conoce como “drivers”. En primer lugar se decidió emplear el “driver” de expresión ubicua tubulina Gal4 [1] w[\*]; P{w[+mC]=tubP-GAL4}LL7/TM3, Sb[1].

Como control positivo de las cruza genéticas se realizaron cruza con la línea de mosca previamente reportada que contiene un ARN interferente contra ADD del “Vienna Stock Center” y que afectaría la expresión de todas las isoformas de ADD. El experimento se realizó por triplicado y en ambos sentidos, es decir primero el progenitor femenino era portador del ARNi (UAS:ADDi) y el progenitor masculino contenía el “driver” TubGal4 (filas rosas de la tabla5) y viceversa, el progenitor femenino aporta el “driver” TubGal4 y el progenitor masculino al ARNi (UAS-ADDi) (filas azules de la tabla5).

Como se puede apreciar en la tabla 5, se observa un fenotipo de supervivencia del 3% de en machos que presentan el interferente para ADD y un 59% de supervivencia en las hembras. Así, el fenotipo es mucho más notorio en los machos, los cuales mueren en el estadio de farato previo a estadio adulto. Para descartar cualquier efecto inespecífico causado por los “drivers” se usó el “driver” ActGal4 que confirmó el fenotipo observado previamente con el “driver” TubGal4 y descarta que el fenotipo de semiletalidad observado se deba a los “drivers” utilizados en estos ensayos. Los faratos que quedaron muertos se disecaron y presentan todas las partes del cuerpo y los segmentos bien definidos, no se observó alguna anomalía a simple vista en su anatomía.

Tabla 5. Disminuir los niveles del transcrito de ADD genera un fenotipo de muerte de machos. En la tabla se muestra el genotipo resultante de la cruza de ADDi/ADDi;+/+ con +/+; tubgal4/tm3,Sb en ambos sentidos. Posteriormente se muestra el sexo de los organismos contados así como el porcentaje de supervivencia obtenido con respecto a la clase más sana que representa el 100%.

Genotipo	sexo	% Supervivencia (# individuos)
ADDi/+; tm3, Sb/+	♀	100 (408/408)
ADDi/+; tm3, Sb/+	♂	100 (436/436)
ADDi/+; tubGal4/+	♀	84 (343/408)
ADDi/+; tubGal4/+	♂	57 (250/436)
ADDi/+; tm3, Sb/+	♀	100 (252/252)
ADDi/+; tm3, Sb/+	♂	100 (234/234)
ADDi/+; tubGal4/+	♀	59 (146/252)
ADDi/+; tubGal4/+	♂	3 (18/234)

Posteriormente se extrajo ARN y por rtPCR se evaluaron los niveles de transcrito por densitometría. Sin embargo, no se logró observar una disminución significativa en los niveles del transcrito a pesar del fenotipo tan fuerte lo cual nos puede indicar que las moscas que llegan adulto son “escapers”, lo que significa que sus niveles no están disminuidos en cantidad considerable y por lo tanto logran llegar a adulto (fig 30).

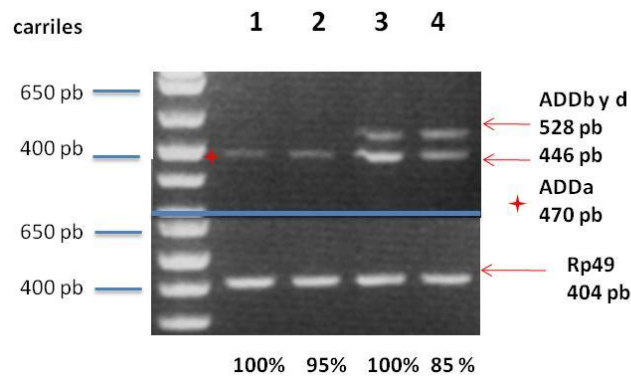


Figura 30. Los niveles del transcrito de ADDa,b y d no disminuyeron significativamente en las moscas que contenían los ARN interferentes para todas las isoformas. En los carriles 1 y 3 se observan los transcritos de moscas ORE, en los carriles 2 y 4 se observan los transcritos de las moscas *addi/+; tubgal4/+*, en el carril, en los carriles 1 y 2 se amplificó un producto de PCR con oligos específicos para ADDa, en los carriles 3 y 4 se amplificó un transcrito con oligos específicos para ADDb y d. En la parte baja del gel se muestran los transcritos de Rp49 como control de carga. Los porcentajes que se muestran en la parte inferior corresponden a los valores de densitometria normalizados con rp49.

Como puede observarse en la fig. 31, nuestros resultados indican una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes fenotipos estudiados en cruza donde las hembras tenían el genotipo *ADDi/ADDi;+/+* y los machos eran *+/+; tubgal4/tm3,Sb*.

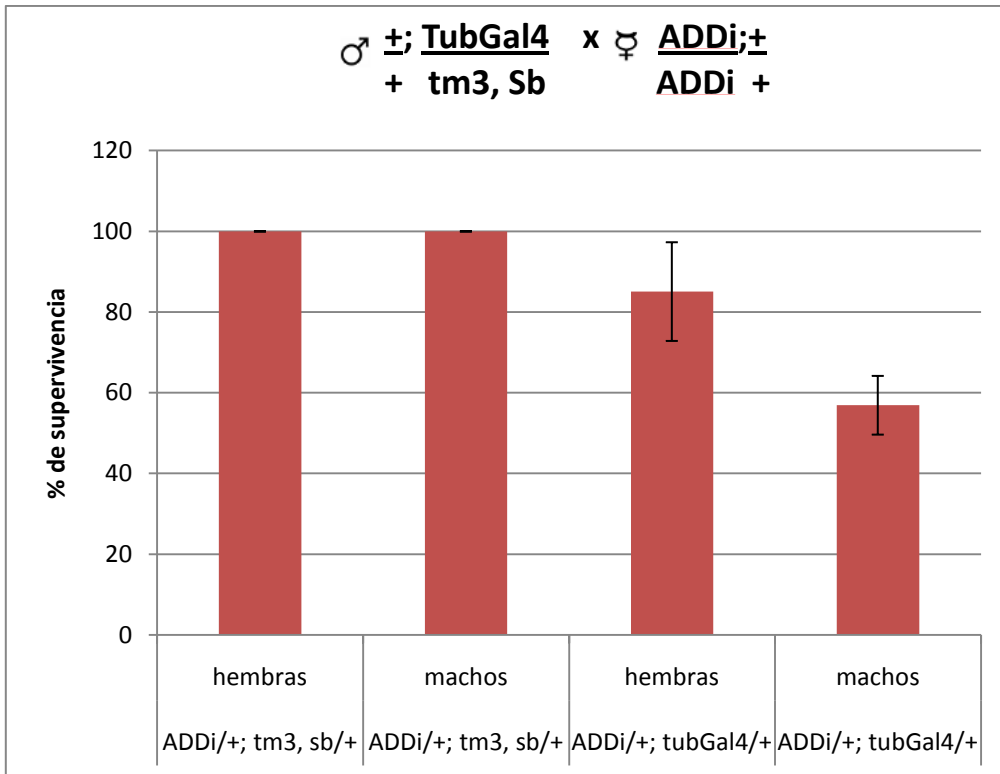


Figura 31. El porcentaje de supervivencia se reduce principalmente en machos al disminuir los niveles de transcrito de dADD. Las primeras dos barras representan las clases control de la cruce siendo normalizados los datos con éstos. Las últimas dos barras muestran el fenotipo de interés con el sistema UAS-Gal4 inducido para disminuir los niveles de ADD con un “driver” de expresión ubica como Tubulina Gal4. Las barras en la parte superior muestran la desviación estándar del experimento. En la parte inferior se muestra en genotipo de la clase.

El fenotipo de letalidad se exagera cuando las líneas parentales tienen el genotipo opuesto a la cruce anterior, es decir hembras +/+; tubgal4/tm3,Sb con machos ADDi/ADDi;+/. Con estas condiciones experimentales el porcentaje de supervivencia cae a un 59% en hembras y un 3% en machos que heredan el ARN interfente (fig 32):



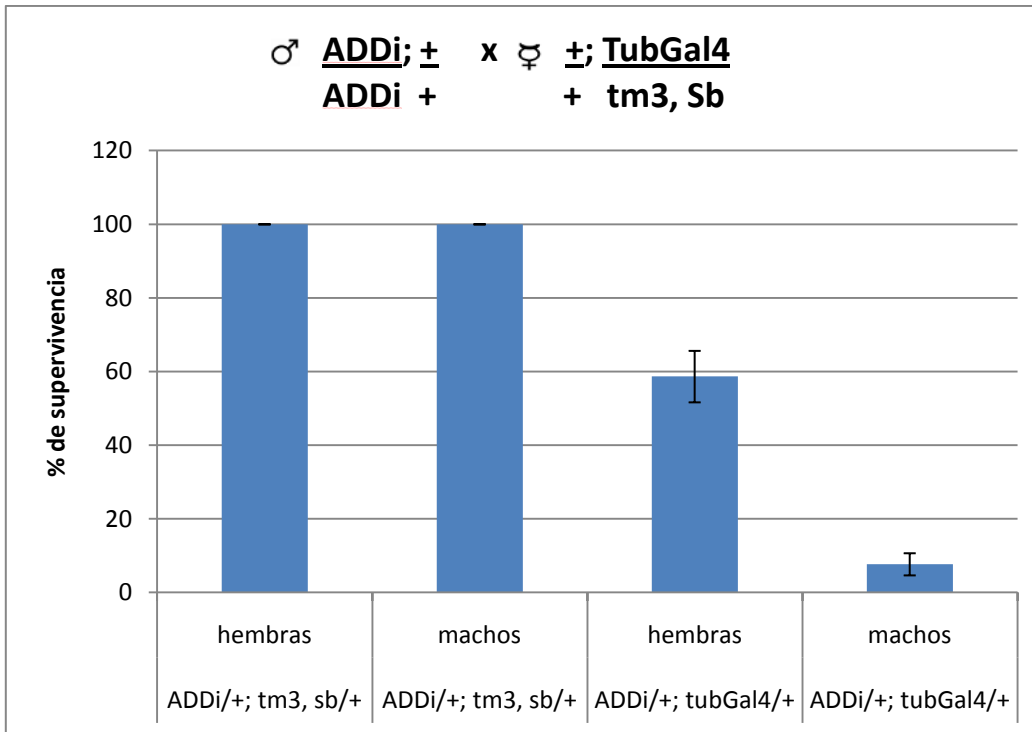


Figura 32. El porcentaje de supervivencia se reduce hasta un 3% en machos al disminuir los niveles de transcrito de dADD. Las primeras dos barras representan las clases control de la cruce siendo normalizados los datos con éstos. Las últimas dos barras muestran el fenotipo de interés con el sistema UAS-Gal4 inducido para disminuir los niveles de ADD con un “driver” de expresión ubica como Tubulina Gal4. Las barras en la parte superior muestran la desviación estándar del experimento. En la parte inferior se muestra en genotipo de la clase.

A continuación para determinar si alguna de las líneas transgénicas establecidas podía disminuir los niveles de la proteína, primero se evaluó la expresión ubicua con el mismo “driver” para confirmar que funciona el sistema de expresión utilizado y además evaluar si se conseguía el mismo fenotipo al disminuir la expresión de alguna isoforma de ADD en la mosca.

Para este objetivo se cruzaron las líneas ADDai 1 y ADDbi 3 con los drivers de expresión ubica TubulinaGal4 y ActinaGal4 provenientes de “Bloomington Stock Center”. La cruce se realizó a 25°C y no se observó un fenotipo evidente. También se emplearon “drivers” específico para tejidos como el de glándulas salivales, discos imagales de ala y de expresión embrionaria sin poder observar un fenotipo.

Para confirmar la posible disminución de los niveles del transcrito se extrajo ARN de las moscas inducidas con TubulinaGal4 y con el cual se sintetizó el cDNA. Posteriormente se realizaron rtPCR semi-cuantitativas con los oligos específicos para las isoformas (Tabla1). Los productos se cargaron en un gel de agarosa y se cuantificaron por densitometria normalizando con el control de Rp49. No se pudo observar una diferencia considerable en el carril 2 ADDai y en el carril 5 ADDbi que es donde se encuentran las muestras con el interferente de interés (fig 33). Normalmente al hacer uso de este tipo de interferentes inducibles, los transcritos no tienen un rango de porcentaje de disminución, se observa más bien con un fenotipo pero en este caso ni observamos fenotipo ni observamos una disminución considerable de los niveles de transcrito.

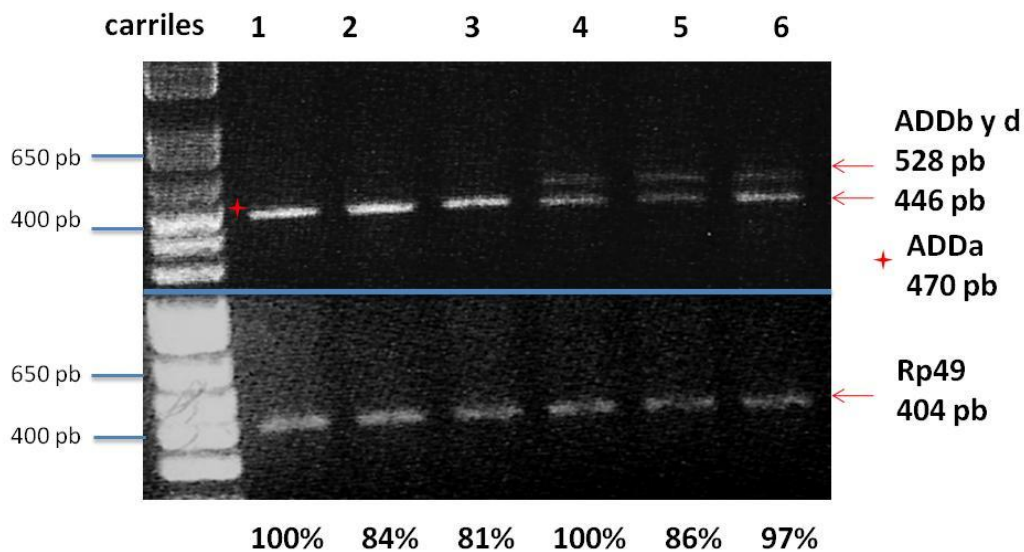


Figura 33. Los niveles del transcrito de ADDa,b y d no se disminuyeron en moscas con los ARN interferentes. En los carriles 1, 4 se observan los transcritos de moscas ORE (control), en los carriles 2 y 6 se observan los transcritos de moscas *addai/+; tubgal4/+*. En los carriles 3 y 5 *addbi/+; tubgal4/+*. En los carriles 1 al 3 se amplificó el transcrito de ADD con oligos específicos para la isoforma ADDa, en los carriles 4,5 y 6 se amplificó el transcrito con oligos específicos para las isoformas ADDb y d. En la parte baja del gel se muestran los transcritos de Rp49 como control de carga. Los porcentajes que aparecen en la parte inferior representan los valores de densitometria normalizados con rp49.

Posteriormente se cruzaron las moscas junto con el “driver” de expresión ubicua TubulinaGal4 y UAS-dicer para incrementar la procesividad de los ARN pequeños e incrementar la formación de los ARN de interferencia pero aun así no se pudo observar un fenotipo ni una disminución de los

transcritos por rtPCR semicuantitativa aún cuando se generó una mosca que presenta doble transgen, uno para disminuir los niveles de la isoforma a y otro para la isoforma b (carriles 4 y 8 de la figura 34) tampoco se pudo observar un fenotipo evidente.

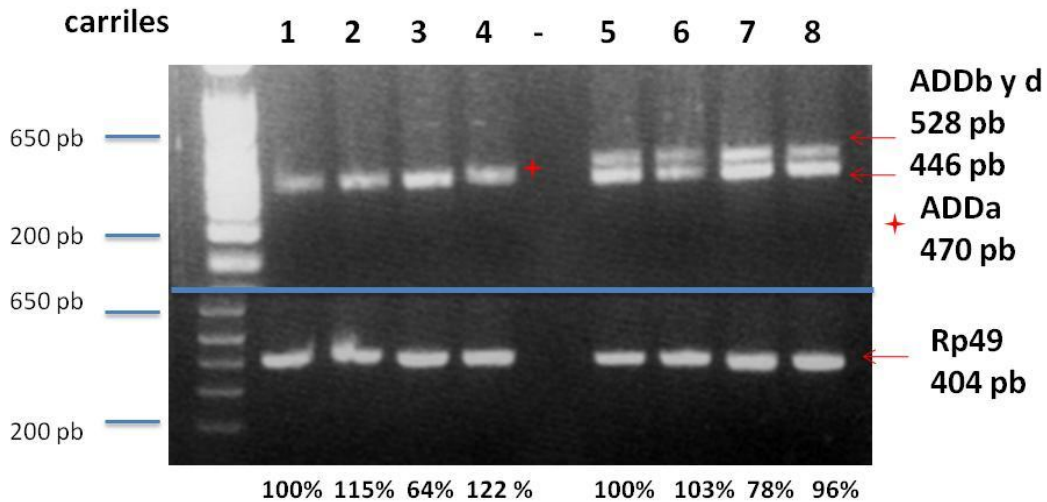


Figura 34. Los niveles del transcrito de ADDa,b y d no cambiaron en las líneas de moscas que contenían los ARNs interferentes aún en presencia de dicer. En los carriles 1, 5 se observan los transcritos de moscas ORE, los carriles 2 y 6 corresponden a los transcritos de las moscas dicer/sp; tubgal4/addai, en los carriles 3 y 7 se muestran los transcritos de las moscas dicer/sp; tubgal4/addbi y en los carriles 4 y 8 podemos ver los transcritos que coreesponden dicer/addai; tubgal4/addbi. El transcrito mostrado en los carriles 1 al 4 se amplificó con oligos específicos para ADDa, mientras que el transcrito mostrados de los carriles 5 al 8 se amplificó con oligos específicos para las isoformas ADDb y d. En la parte baja del gel se muestran los transcritos de Rp49 como control de carga. Los porcentajes presentados en la parte inferior corresponden a los valores de densitometria normalizados con rp49.

Finalmente se determinó que las moscas transgénicas que se generaron con las secuencias para interferir los transcritos de ADDa, ADDb y ADDd no presentaron un fenotipo ni se observa una disminución de los transcritos por medio de la técnica de RT-PCR semicuantitativa.

## 7. Discusión

Cada vez son mayores las evidencias que indican que los mecanismos epigénéticos son importantes para la regulación de la expresión genética y la estabilidad del genoma. La cromatina es una molécula que presenta un alto nivel de dinamismo y dada su importancia y participación en diversos procesos, ha sido blanco de estudios durante los últimos años. Entre los procesos más estudiados se encuentra la regulación de la transcripción génica. La complejidad de los mecanismos se refleja en la gran cantidad de proteínas que intervienen en el proceso. Justamente una de las líneas de investigación del laboratorio es la proteína ATRX que cada día emerge con mayor fuerza como un factor involucrado en la regulación transcripcional y la estabilidad del genoma en células de mamíferos.

La proteína ATRX se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución. Está presente desde invertebrados hasta humanos (Sun *et. al*, 2006). Lee *et. al.*, (2007) reportaron que el gen que corresponde a la secuencia CG4548 del proyecto Berkeley del genoma de *D. melanogaster* codifica una proteína a la cual se le ha llamado XNP/ dATRX. Esta proteína carece de las secuencias que corresponden al extremo N-terminal de la proteína de hATRX las cuales incluyen el dominio ADD. Debido a que el 50% de las mutaciones reportadas en pacientes con el síndrome de ATRX caen en este dominio de la proteína humana, resulta interesante estudiar una proteína que contiene el dominio ADD pero de forma separada al dominio Helicasa/ATPasa en mosca.

El dominio ADD está compuesto por un dominio PHD y un dedo de zinc del tipo GATA (Argentaro *et al.*, 2007). Es de notoriedad que mutaciones en los genes que codifican proteínas que contienen el dominio PHD están involucradas en distintas enfermedades en humanos como leucemia, cáncer de mama y melanoma así como en distintos síndromes como el “Weaver, Rubinstein–Taybi” y “Borjeson Forssman Lehmann” que afectan a las líneas germinales como lo hace el síndrome de ATRX. En todas estas enfermedades se ha reportado una desregulación de los PHD y se propone que la mala interacción o la falta del reconocimiento de modificaciones de las histonas es la causa de los padecimientos por lo tanto es importante entender su funcionamiento y describirlos en detalle (Baker *et. al.*, 2008).

En el laboratorio se identificó que el Gen CG8290 de *D. melanogaster*, el cual está reportado en la base de datos flybase que codifica dos isoformas proteicas que tienen el dominio ADD. Se observó

que el transcrito que codifica la isoforma ADDa se encuentra presente durante todo el desarrollo pero en cuanto se utilizaron oligonucleótidos para amplificar específicamente el transcrito de la isoforma ADDb se pudieron observar dos bandas, una con el peso esperado y otra con el peso que incluiría la retención de un intrón a la cual se designó como ADDd. Esta nueva isoforma cambiaría el marco de lectura de una posible proteína producida causando un producto de menor peso de aproximadamente 106 kDa.

Recientemente, fue publicada una nueva isoforma llamada ADDc que tiene dividido el exón tres produciendo al parecer un nuevo intrón. Este transcrito se encuentra representado a lo largo de todo el desarrollo y produciría una proteína de 112 kDa de peso esperado la cual podría ser alguna de las bandas que se observa en los ensayos tipo "western" y que además se compete con el péptido específico contra el cual fue hecho el anticuerpo (Dra. Valadez, dato no publicado). El hecho de que pudieran expresarse varias isoformas es bastante interesante ya que en ratón, empleando la técnica de RT-PCR pero en hipocampo, Nogami *et. al.*, (2010) encontraron al menos cinco isoformas distintas de ATRX. Empleando el organismo completo en los distintos estadios del desarrollo se observaron todos los transcritos presentes por lo que sería interesante analizar si existe una expresión diferencial en tejidos específicos como lo son las glándulas salivales, cerebro y discos imagales del estado larvario, y en ovarios y testículos del adulto para ver si existe una expresión diferencial de las isoformas. Además de buscar en tejidos donde las mutaciones en ATRX generan un fenotipo, como el sistema nervioso en mamíferos.

Los dominios SANT presentes en las isoformas ADDb, c y d tienen un papel clave en el reconocimiento de las colas de las histonas, principalmente en aquellas que no poseen modificaciones (Boyer et al., 2002; Yu et al., 2003) y pueden unirse a secuencias consenso en el ADN o a otras proteínas. Debido a su punto isoeléctrico hipotético calculado los dominios SANT que presentan las dADD son de pI básico, es decir que podrían unirse a ADN.

Una interesante pregunta que surge es porque en *D. melanogaster* se cuenta con isoformas proteicas que además del dominio ADD tienen la presencia de los dominios SANT en el Carboxilo terminal, ya que al cambiar el marco de lectura se producirían proteínas que contienen el dominio ADD con uno o dos dominios SANT. Una posible explicación es que tengan distinta especificidad para unirse al ADN dependiendo del tejido donde se encuentren. Otra explicación de la presencia

de estas isoformas nuevas es que podrían actuar como dominantes negativas, que en *Drosophila* una proteína que actúa de esta forma es llamada antimorfa, es decir una nueva proteína que antagoniza a la “wild-type”. Este mecanismo antagónico podría realizarse de varias formas. Una propuesta es que pueda unirse a los mismos blancos a través del dominio ADD pero carecería de uno o varios dominios SANT por lo que surge la hipótesis que no podría tener su función completa. Estas nuevas isoformas pueden ser antagonistas en una regulación muy fina en algún momento del desarrollo o en un tejido específico ya que si observamos el transcrito (Fig 17), esta isoforma que hemos llamado ADDd se encuentra presente al mismo tiempo que ADDb. Pudiera existir una expresión diferencial que debido a la técnica empleada no hemos podido observar, y si así fuese estos diferentes niveles de expresión de las isoformas pudieran indicar que la isoforma corta se esté comportando como una dominante negativa, aunque se tendrían que realizar experimentos para poder determinarlo con certeza y observar a qué nivel está actuando. Un claro ejemplo de la regulación de proteínas con isoformas dominantes negativas es la proteína Fox que pertenece a una familia de factores transcripcionales que juegan un papel primordial en la regulación del “splicing” de muchos exones por lo que se le ha relacionado a la regulación de genes importantes para el crecimiento celular, proliferación, diferenciación y el desarrollo embrionario. Se han encontrado distintas isoformas de esta proteína en tejidos específicos como neuronas y músculo de ratón donde alguna de sus isoformas carece del dominio encargado de reconocer el pre-ARNm para promover el “splicing”, y por lo tanto actúa como dominante negativa de su propia proteína al competir con otros factores necesarios para realizar el “splicing” (Damianov y Black, 2010). Esto nos da una idea que proteínas que son importantes en el desarrollo embrionario o en algún tejido específico tienen una fina regulación para poder ser expresadas en momentos o lugares específicos.

Con una serie de anticuerpos se pudieron observar tres de las posibles cuatro isoformas durante el desarrollo embrionario. Se determinó que son depositadas por herencia materna en el embrión, es decir que están presentes antes de que comience la transcripción cigótica y también se pudieron observar en organismos adultos. La herencia materna la podemos diferenciar ya que en embriones de *Drosophila* se tiene bien establecido que la transcripción cigótica inicia a las tres horas de vida embrionaria. Esto nos indica que es importante su presencia durante el desarrollo temprano del organismo.

En cuanto a su localización se encontró que tanto ADDa y ADDb, como las posibles isoformas ADDc y ADDd, son proteínas exclusivamente nucleares como ha sido descrito previamente para dATRX en células somáticas, donde se localiza en secuencias altamente repetidas del genoma, especialmente en regiones pericentroméricas (Law, et al 2010).

Eustermann *et. al* (2011) e Iwase *et. al* (2011) observaron que el dominio ADD de la proteína ATRX de humano reconocía la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 y la no modificación de la lisina 4 de la histona H3 y describieron los aminoácidos importantes para que se lleve a cabo el reconocimiento de esta marca. Además Dhayalan *et. al.*, (2011) realizaron un modelo del dominio ADD donde muestran los aminoácidos importantes para el reconocimiento de esta marca. En el laboratorio con la ayuda del Biol. Adam Campos se realizó el modelamiento de la proteína en mosca que empalma con la de humano. Además se hicieron alineamientos donde se observó que los aminoácidos que reconocen estas marcas (H3K9me3 y H3K4me0) se encuentran conservados o están presentes aminoácidos con cargas y características similares. Se trataron de hacer inmunotinciones de cromosomas politénicos con dos distintos anticuerpos que reconocen la marca H3K9me3 con la finalidad de observar colocalizaciones con el anticuerpo que reconoce a dADD pero desafortunadamente ninguno fue capaz de reconocer esta marca en los cromosomas.

Al mismo tiempo se realizaron co-tinciones de ADD con el anticuerpo que reconoce a HP1 $\alpha$ , que es una proteína asociada a heterocromatina y reconoce específicamente esta marca de trimetilación de la lisina 9, donde encontré que colocalizan en el centromero (Fig. 23). Estos datos coinciden con Bassett *et. al.* (2008) donde realizaron el mismo experimento pero para dATRX y ven que colocaliza con HP1 $\alpha$  en el cromocentro. A partir de esta información se ha propuesto encontrar un proceso donde dADD y dATRX estén colaborando en el mantenimiento de la heterocromatina pericentromérica.

El diseño de moscas que expresen un ARNi para cada isoforma es una herramienta útil para poder seguir contestando preguntas sobre la posible interacción entre las proteínas ADD y dATRX. La mayoría de las mutaciones que se encuentran en proteínas que codifican para remodeladores de la cromatina en mamíferos y que contienen un PHD, como lo es ATRX en su dominio ADD resultan en un espectro de síndromes que contienen problemas en el sistema nervioso, condiciones autoinmunes y algunos tipos de cánceres (De la fuente *et. al.*, 2011).

La ausencia de un fenotipo observable en las moscas adultas inducidas con el sistema UAS-Gal4 podría deberse a que se están presentando los fenotipos en sistema nervioso o retina, y de ser así, no es posible observarlo a simple vista. Sería necesario realizar cortes histológicos o disecciones de los posibles tejidos blanco de acción. Otra explicación a la falta de un fenotipo observable podría ser que el ARNi no es tan fuerte como se esperaba al localizarse en la región 3' del transcrito y aunque se realizaron las cruces con "Dicer" para potenciar los posibles fenotipos no se pudo observar fenotipo alguno. Aun así son herramientas que brindarán una gran cantidad de información al realizarnos las preguntas correctas.

Con respecto a las moscas provenientes del banco de Vienna que interfieren todas las isoformas se observó un fenotipo de supervivencia del 3% en los machos y 59% en hembras que llegan a adulto donde se disminuyeron los niveles para estas proteínas, además de que es muy notoria la muerte de los organismos en el estadio de farato previo al adulto. Estos datos coinciden con Emelyanov *et. al.*, (2010) donde ve 20% de viabilidad con alelos de dATRX y con los datos de Bassett *et. al.*, (2009) donde observan que solo 20% llega a pupa y solo el 10% llega a adulto con alelos de dATRX que ellos generaron pero sin hacer distinción entre machos y hembras. Un dato preliminar que tenemos en el laboratorio son moscas heteroalélicas para dATRX donde se observa una supervivencia de los machos entre un 20% y 60% dependiendo la combinación entre alelos. Al obtener resultados parecidos con mutantes de dATRX y los interferentes de dADD se podría sugerir que están participando en la misma vía de señalización o en un proceso celular en el mismo complejo. De hecho los pacientes humanos afectados con el síndrome son principalmente hombres y se les ha relacionado con anomalías urogenitales, infertilidad y reversión sexual. En *C. elegans* se ha encontrado que su ortólogo (XNP-1) está involucrado en la cascada de la determinación sexual y gonadogenesis (Huyhn *et. al.*, 2011). Bagheri-Fam *et. al.*, (2011) encontraron que ATRX interacciona físicamente con el receptor de andrógeno en ratones y puede ser un regulador de la transcripción tejido específico en testículos. ATRX se expresa en células somáticas y células germinales de testículos de humanos (Tang *et. al.*, 2009), ratas, ratones y marsupiales indicando un posible rol de ATRX durante la espermatogénesis y donde además se ha visto un patrón de distribución similar a DMRT1 ("Doublesex and mab-3 related transcription factor 1") que es una proteína involucrada en la determinación sexual de vertebrados (Huyhn *et. al.*, 2011). El ortólogo de DMRT1 en mosca es DSX ("Doublesex"), que es un factor transcripcional que regula la diferenciación sexual durante la embriogénesis y es una proteína determinante para



la compensación de dosis en mosca, proceso en el cual las proteínas ADD podrían estar involucradas. Aunque los datos que se obtuvieron durante el desarrollo de mi tesis son bastante preliminares sería interesante poder indagar más sobre el papel de ADD y ATRX durante la diferenciación sexual y la compensación de dosis en machos de *D. melanogaster*.

Otra teoría que podría explicar el fenotipo de muerte en machos es la colocalización de hATRX con la variante de histona H3.3 en telómeros descrita por Wong *et. al.*, (2010) donde proponen a hATRX como regulador clave de la cromatina telomérica al incorporar a H3.3 y participar en la unión de HP1 $\alpha$  a los telómeros, por lo que se sugiere que éstas proteínas pueden actuar para lograr un equilibrio en el estado de condensación de la cromatina que permite la renovación de los telómeros pero sin perder su estructura compacta esencial. En *D. melanogaster* la compensación de dosis se lleva a cabo sobreexpresando el cromosoma X, al contrario de muchos organismos donde se inactiva a uno de los cromosomas X, además se ha observado que en los machos la variante H3.3 se encuentra altamente enriquecida. Siendo que en mamíferos hATRX es parte de un complejo que deposita esta variante, entonces sería interesante analizar si esto está sucediendo en la mosca y por lo tanto mutantes de dATRX y dADD podrían estar afectados en la deposición de esta variante de histona en el cromosoma X de los machos aunque faltarían realizar una serie de experimentos para poder aseverar esta teoría.

## 8. Conclusiones

- La expresión de los transcritos del gen dADD es ubicua durante el desarrollo.
- El análisis de los transcritos sugiere que al menos existen cuatro isoformas de dADD, de las cuales se pudieron corroborar tres. Por medio de un ensayo tipo western blot con un anticuerpo que reconoce a dADD se observaron dos bandas con un peso de 130 kDa y otra de 112 kDa. Las proteínas son de herencia materna.
- Las proteínas tienen una localización nuclear.
- Las proteínas ADD colocalizan en cromosomas politénicos con la proteína HP1 en el cromocentro.
- Se realizaron cruces con una mosca interferente para todas las isoformas proveniente del “Vienna RNAi Drosophila Stock Center “ que al inducirla con el “driver” TubulinaGal4 se puede observar un fenotipo de supervivencia del 3% en machos y 59% en hembras falleciendo en el estadio de faratos.
- Se diseñaron moscas transgénicas con un sistema inducible UAS-ARNi para cada dos isoformas y no se observó ningún fenotipo al inducirlas con el sistema Gal4.

## 9. Perspectivas

- Observar si existen otros posibles transcritos de ADD.
- Determinar con que proteínas podrían estar interaccionando con las isoformas proteicas de dADD.
- Realizar un Chip-seq para observar en que regiones del genoma se asocian estas proteínas.
- Identificar genes que podrían estar siendo regulados por las proteínas de dADD.
- Determinar si el dominio ADD reconoce la marca H3K9me3.
- Inducir la expresión de ARNi en tejidos como sistema nervioso, reportados asociados con el síndrome en mamíferos.
- Examinar los componentes del mecanismo de compensación de dosis y su posible relación con el fenotipo que se observa en moscas interferentes para ADD.

## 10. Referencias

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and P Walter. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Fifth Edition. Garland Science. USA.
- Allis C D, Jenuwein T, Reinberg D and M L Caparros. (2007). *Epigenetics*, Chapter 3: Overview and Concepts. Chapter 10: Chromatin Modifications and Their Mechanism of Action. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1<sup>st</sup> Ed.
- Argentaro A, Yang JC, Chapman L, Kowalczyk MS, Gibbons RJ, Higgs DR, Neuhaus D and D Rhodes. (2007). Structural consequences of disease-causing mutations in the ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) domain of the chromatin-associated protein ATRX. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol.104: 11939–11944.
- Ashburner M., Golic K.G. and R. S. Hawley. *Drosophila* a laboratory handbook. 2<sup>nd</sup> edition. (2004). Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Bagheri-Fam S, Argentaro A, Svingen T, Combes AN, Sinclair AH, Koopman P, Harley VR. (2011). Defective survival of proliferating Sertoli cells and androgen receptor function in a mouse model of the ATR-X syndrome. *Hum Mol Genet*. 20(11):2213-24.
- Baker LA, Allis CD and Wang GG. (2008). PHD fingers in human diseases: disorders arising from misinterpreting epigenetic marks. *Mutat Res*. 647(1-2):3-12.
- Bassett AR, Cooper SE, Ragab A and AA Travers. (2008). The chromatin remodelling factor dATRX is involved in heterochromatin formation. *PLoS ONE* 3: 1-10.
- Boyer LA, Langer MR, Crowley KA, Tan S, Denu JM and CL Peterson. (2002). Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol. Cell*. 10: 935-942.
- Brand A.H. and E.L. Dormand. (1995). The GAL4 system as a tool for unraveling the mysteries of the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol*. 5: 572-578.
- Brand A.H. and N. Perrimon. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
- Cairns RB. (2009). The logic of chromatin architecture and remodeling at promoters. Review insight. *Nature* 461: 193-198.
- Cardoso C, Timsit S, Villard L, Khrestchatisky M, Fontes M and Colleaux L. (1998). Specific interaction between the XNP/ATR-X gene product and the SET domain of the human EZH2 protein. *Hum. Mol. Gen*. 7: 679-684.
- Corona DF, Clapier CR, Becker PB and J W Tamkun. (2002). Modulation of ISWI functions by site-specific histone acetylation. *EMBO Rep*. 3: 242-247.
- Damianov A and D. Black. (2010). Autoregulation of Fox protein expression to produce dominant negative splicing factors. *RNA* 16: 405-416.
- De La Fuente R, Baumann C, Viveiros MM. (2011). Role of ATRX in chromatin structure and function: implications for chromosome instability and human disease. *Reproduction*. Aug;142(2):221-34.
- Dhayalan, A., Tamas, R., Bock, I., Tattermusch, A., Dimitrova, E., Kudithipudi, S., Ragozin, S. and Jeltsch, A. (2011). The ATRX ADD domain binds to H3 tail peptides and reads the combined methylation state of K4 and K9. *Hum. Mol. Genet*. 20, 2195-2202.
- Emelyanov AV, Konev AY, Vershilova E, Fyodorov DV. (2010). Protein complex of Drosophila ATRX/XNP and HP1a is required for the formation of pericentric beta-heterochromatin in vivo. *J Biol Chem*. 285(20):15027-37.
- Engels, W. R., Preston, C. R., Thompson, P. and Eggleston, W. B. (1986). *In situ* hybridization to *Drosophila* salivary chromosomes with biotinylated DNA probes and alkaline phosphatase. *BRL Focus* 8, 6-8.
- Eustermann S, Yang JC, Law MJ, Amos R, Chapman LM, Jelinska C, Garrick D, Clynes D, Gibbons RJ, Rhodes D, Higgs DR, Neuhaus D. (2011). Combinatorial readout of histone H3 modifications specifies localization of ATRX to heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol*. 18(7):777-82.
- Felsenfeld, G., & M. Groudine. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421: 448-453.
- Fillion G.J., van Bommel J.G., Braunschweig U., Talhou, W., Kind J., Ward L.D., Brugman W., de Castro I.J., Kerkhoven R.M., Bussemaker H.J. and B. van Steensel. (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. *Cell* 143(2): 212--224.

- Fischer J.A., Giniger E., Maniatis T. And M. Ptashne. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature*. 332: 863-856.
- Garrick D, Samara V, McDowell TL, Smith AJ, Dobbie L, Higgs DR and RJ Gibbons. (2004). A conserved truncated isoform of the ATR-X syndrome protein lacking the SWI/SNF-homology domain. *Gene*. Vol. 326: 23–34.
- Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L and DR Higgs. (1995). Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with  $\alpha$ -thalassemia (ATR-X Syndrome). *Cell*. 80: 837-845.
- Gibbons RJ, Wada T, Fisher CA, Malik N, Mitson MJ, Steensma DP, Fryer A, Goudie DR, Krantz ID and J Traeger-Synodinos.(2008). Mutations in the chromatin-associated protein ATRX. *Hum Mutat*.29:796-802.
- Goldberg, A., L. A. Banaszynski, K. Noh, P. W. Lewis, S. J. Elsaesser, S. Stadler, S. Dewell, M. Law, X. Guo, X. Li, D. Wen, A. Chappier, R. C. DeKolver, J. C. Miller, Y. Lee, E. A. Boydston, M. C. Holmes, P. D. Gregory, J. M. Greally, S Rafii, C Yang, P J. Scambler, D Garrick, R. J. Gibbons, D. R. Higgs, I. M. Cristea, F. D. Urnov, D. Zheng and C. David Allis. (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* 140(5): 678–691.
- Guillemette B, Bataille AR, Gévry N, Adam M, Blanchette M, Robert F and L Gaudreau. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosomes positioning. *PolS Biol*. 3: e384.
- Huyhn K, Renfree MB, Graves JA, Pask AJ.(2011). ATRX has a critical and conserved role in mammalian sexual differentiation. *BMC Dev Biol*. 14; 11:39.
- Ito T, Bulger M, Pazin M J, Kobayashi R and J T Kadonaga. (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell*. 90: 145-155.
- Iwase S, Xiang B, Ghosh S, Ren T, Lewis PW, Cochrane JC, Allis CD, Picketts DJ, Patel DJ, Li H, Shi Y. (2011). ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nat Struct Mol Biol*. 18(7):769-76.
- Jamrich M., Haars R., Wulf E. and Bautz F.A. (1977). Correlation of RNA polymerase B and transcriptional activity in the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*. Dec 6; 64(4):319-326.
- Johansen K. M., Cai W., Deng H., Bao X., Zhang W., Girton J. and Johansen J. (2009). Polytene chromosome squash methods for studying transcription and epigenetic chromatin modification in *Drosophila* using antibodies. *Methods*. Aug;48(4):387-97.
- Kamakaka, RT and Kadonaga JT. (1994).The soluble nuclear fraction, a highly efficient transcription extract from *Drosophila* embryos. *Meth. Cell Biol*. 44, 225-35.
- Langst G, Bonte E J, Corona D F and P B Becker. (1999). Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption of *trans*- displacement of the histone octamer. *Cell*. 97:843-852.
- Law, M.J, K.M. Lower, H.P.J. Voon, J.R. Hughes, D. Garrick, V. Viprakit, M. Mitson, M. De Gobbi, M. Marra, A. Morris (...) and R.J. Gibbons. (2010). ATR-X Syndrome Protein Targets Tandem Repeats and Influences Allele-Specific Expression in a Size-Dependent Manner *Cell* 143(3) : 367–378.
- Lee NG, Hong YK, Yu SY, Han SY, Geum D and KS Cho. (2007). dXNP, a *Drosophila* homolog of XNP/ATR-X, induces apoptosis via Jun-N-terminal kinase activation. *FEBS Lett*. 581:2625–2632.
- Lehninger, A., Nelson, D. and Cox, M.(2006). Principles of Biochemistry. Cía Worth Publishers, New York.
- Levenson, J. M., & Sweatt, J. D. (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(2), 108-18. doi:10.1038/nrn1604.
- Lewin B. (2007). Genes IX. Ninth edition. Jones and Barttlet publishers. USA.
- Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, Allis CD. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *PNAS* 107(32): 14075-14080.
- Li B, Carey M and JL Workman. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*. 128: 707-7019.

- Lindsley, D.L. and Zimm, G.G. (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic press New York.
- Lorch Y, Zhang and R D Kornberg. (1999). Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* 96: 389-392.
- Lydall D and S Whitehall. (2005). Chromatin and the DNA damage response. *DNA Repair*. 4(10): 1195-1207.
- Maniatis T, Sambrook J and E F Fritsch. (1987). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- McDowell TL, Gibbons RJ, Sutherland H, O'Rourke DM, Bickmore WA, Pombo A, Turley H, Gatter K, Picketts DJ, Buckle VJ, Chapman L, Rhodes D and DR Higgs. (1999). Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 13983–13988.
- Meller, N., Liu, Y.C., Collins, T. L., Bonnefoy-Berard, N., Baier, G., Isakov N. y A. Altman. (1996). Direct interaction between protein kinase C theta (PKC theta) and 14-3-3 tau in T cells: 14-3-3 overexpression results in inhibition of PKC theta translocation and function. *Mol. Cell. Biol.*, 16:5782–5791.
- Mitzuguchi G, Shen X, Landry J, Wu W H, Sen S and C Wu. (2004). ATP driven exchange of histone H2AZ. variant catalized by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 292: 110-113.
- Narlikar G J, Fan Y H and R E Kingston. (2002). Cooperation between Complexes that regulate Chromatin Structure and Transcription. *Cell*. 108: 475-487.
- Neumann-Mondlak, Adina. Análisis de la posible interacción entre dADD (CG8290) y dATRX en *Drosophila melanogaster* (2010). Tesis Licenciatura. UDLAP, Puebla, México.
- Nogami T, Beppu H, Tokoro T, Moriguchi S, Shioda N, Fukunaga K, Ohtsuka T, Ishii Y, Sasahara M, Shimada Y, Nishijo H, Li E. and I Kitajima. (2011). Reduced expression of the ATRX gene, a chromatin-remodeling factor, causes hippocampal dysfunction in mice. *Hippocampus*. 21(6):678-87.
- Picketts DJ, Higgs DR, Bachoo S, Blake DJ, Quarrell OWJ and RJ Gibbons. (1996). ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Hum Mol Genet*. 5:1899–1907.
- Raisner R M, P D Hartley, M D Meneghini, M Z Bao, C L Liu, S L Schreiber, O J. Rando and H D. Madhani (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell*. 123: 233-238.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M and E Bier. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*. 11: 1114-1125.
- Reynaud, E., Lomeli, H., Vazquez, M. and Zurita, M. (1999). The *Drosophila melanogaster* homologue of the Xeroderma pigmentosum D gene product is located in euchromatic regions and has a dynamic response to UV light-induced lesions in polytene chromosomes. *Mol. Biol. Cell* 10, 1191-1203.
- Saha A, Wittmeyer J. and B R Cairns. (2006). Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Reviews*. 7: 437-447.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed., p. A.2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Schneiderman JI, Sakai A, Goldstein S and K Ahmad. (2009). The XNP remodeler targets dynamic chromatin in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 14472-14477.
- Spradling, A. C. 1986. P element-mediated transformation. pp. 175-197 in *Drosophila: A Practical Approach*, edited by D. B. Roberts. IRL Press, Oxford.
- St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature Rev. Genet*. 3, 176–188.
- Sullivan, W., M. Ashburner y R. S. Hawley. (2000) .*Drosophila* protocols. Chapter 9 and 31. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sun X, Morozova T and M Sonnenfeld. (2006). Glial and neuronal functions of the *Drosophila* homolog of the human SWI/SNF gene *ATR-X* (*dATR-X*) and the *jing* zinc-finger gene specify the lateral positioning of longitudinal glia and axons. *Genetics*. 173: 1397-1415.

- Tang P, Argentaro A, Pask AJ, O'Donnell L, Marshall-Graves J, Familiari M and Harley VR. (2009). Localisation of the Chromatin Remodelling Protein, ATRX in the Adult Testis. *J Reprod Dev.* May 15.
- Tautz, D., J M Hancock, D A Webb, C Tautz, and G A Dover. (1988). Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* 5(4): 366-376 .
- Towbin H, Staehelin T and J Gordon. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.
- Valadez-Graham V, Yoshioka Y, Velazquez-Camacho O, Kawamori A, Vazquez M, Neumann-Mondlak A, Yamaguchi M and M Zurita-Ortega. (2011). XNP/dATRX interacts with DREF in the chromatin to regulate gene expression. *Nucleic Acids Research* Oct 22. [Epub ahead of print].
- Whitehouse I, Flaus A, Cairns B R, White M F, Workman J L and T Owen-Hughes. (1999). Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 400: 784-787.
- Wong LH, McGhie JD, Sin, M., Anderson, M.A., Ahn, S., Hannan, R.D., George, A.J., Morgan, K.A., Mann, J.R. y Choo, A. (2010). ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res.* 20: 1-10.
- Yu J, Li Y, Ishizuka T, Guenther MG and MA Lazar. (2003). A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *EMBO J.* 22: 3403-3410.
- Zhang H, Roberts D N and B R Cairn. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell.* 123: 219-231.
- Zhang L, Jones K and F Gong. (2009). The molecular basis of chromatin dynamics during nucleotide excision repair. *Biochem. Cell Biol.* 87: 265-272.

## 11. Anexos

Como parte del objetivo de identificar el patrón de expresión de las isoformas de dADD se generaron anticuerpos para las primeras dos isoformas descritas, ADDa y ADDb a la compañía New England peptide. Una vez que llegaron se purificaron y se estandarizaron las concentraciones para poder observar las proteínas en bandas de los pesos correspondientes.

Las pruebas se realizaron en extractos de embriones de 3-21 horas y de organismos adultos con extractos proteicos totales. Las concentraciones óptimas de anticuerpo para poder observar ADDa se obtuvieron al bloquear con Leche descremada 10% en PBS 1X + 0.1% Tween20 durante 1 hora, posteriormente se agregó el anticuerpo primario en una concentración 1:1000 en leche descremada 5% en PBS 1x+ 0.1% Tween20 durante 1 hora. El anticuerpo secundario se agregó a una concentración de 1:2000. Los lavados y el revelado se realizaron conforme a lo descrito previamente.

Como se muestra en la siguiente figura se observan dos bandas en el carril de embriones donde la banda de 130 KDa suponemos que es la isoforma a y la otra banda de peso inferior puede corresponderá otras isoformas existentes, degradación o un forma con modificaciones postraduccionales, ya que al realizar la competencia con el péptido contra el que fue hecho desaparecen (dato no mostrado). Esto podría resolverse también teniendo el control de carga y viendo que ese no esté degradado.

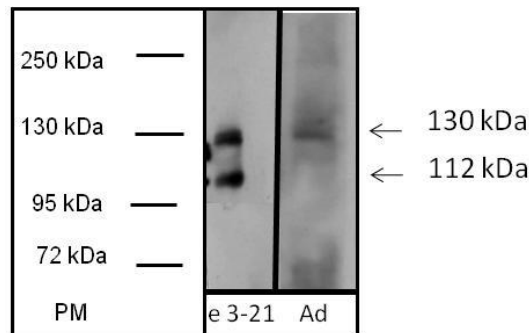


Figura 35. Ensayo tipo western blot de embriones de 3-21 horas (e 3-21) y de organismos adultos (ad). El anticuerpo  $\alpha$ -dADD purificado reconoce específicamente la isoforma "a" de la proteína; PM: Marcador de peso molecular.

Para el anticuerpo purificado de ADDb también se realizaron las pruebas en extractos proteicos de embriones de 3-21 horas y de organismos adultos donde las condiciones optimas se obtuvieron al bloquear con Leche descremada 10% en PBS 1X + 0.2% Tween20 durante toda la noche y agregado a continuación el anticuerpo 1:500 en leche descremada 5% en PBS 1x+ 0.2% Tween20 durante 1 hora. El anticuerpo secundario se agregó a una concentración de 1:2000. Los lavados y el revelado se realizaron conforme a lo descrito previamente.



Como se muestra en la figura 36 se observan tres bandas en el carril de embriones pudiendo corresponder a la isoforma b (banda de 130 kDa) y alguna de las bandas de menor peso molecular a la isoforma c que tiene un peso predicho de 112 kDa pero en este gel pudo migrar como 123 kDa o 106 kDa y este anticuerpo tendría la capacidad de observarlas. La otra banda puede ser degradación o una forma con modificaciones postraduccionales, ya que al realizar la competencia con el péptido contra el que fue hecho desaparecen (dato no mostrado).

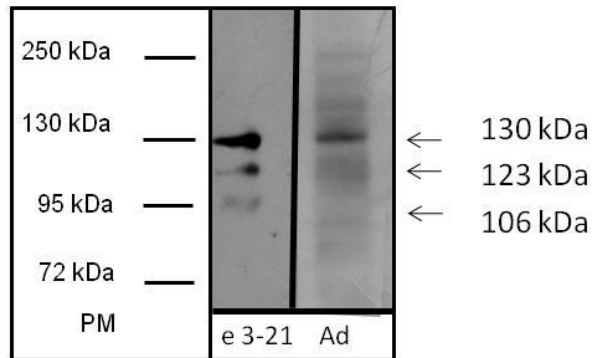


Figura 36. Ensayo tipo western blot de embriones de 3-21 horas (e 3-21) y de organismos adultos (ad). El anticuerpo  $\alpha$ -dADD purificado reconoce las isoformas b y c; PM: Marcador de peso molecular.

Desafortunadamente los experimentos no cuentan con un marcador de carga como lo he utilizado previamente, la  $\beta$ Tubulina ya que se estaban probando las condiciones de los anticuerpos y que no se observaran mas bandas en otras partes de la membrana y se empleó la tira completa. Sin embargo se concluye que por lo menos pudimos observar las isoformas ADDa, ADDb y ADDc tanto en embriones como en adultos.

Para cumplir con el objetivo de observar a qué tipo de cromatina se asocian las proteínas ADD se muestran a continuación los controles de las inmuno-histoquímicas:

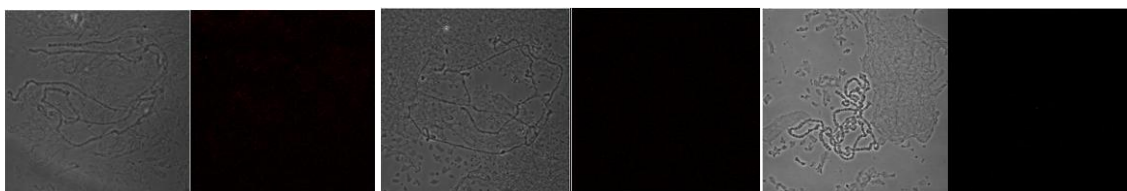


Figura 37. Controles del anticuepro ADD competido, suero preinmune y solo anticuerpo secundario. En la parte izquierda se muestra el anticuerpo ADD competido con el péptido contra el que fue diseñado observando ausencia de señal. En la parte media observamos el suero preinmune de conejo igualmente con ausencia de señal. En la parte derecha se observa la inmuno-histoquímica solo con el anticuerpo secundario  $\alpha$ - conejo (Alexa rojo 568) sin señal en rojo.

Posteriormente se realizaron los controles de las tinciones dobles con  $\alpha$ -ADD y  $\alpha$ HP1.

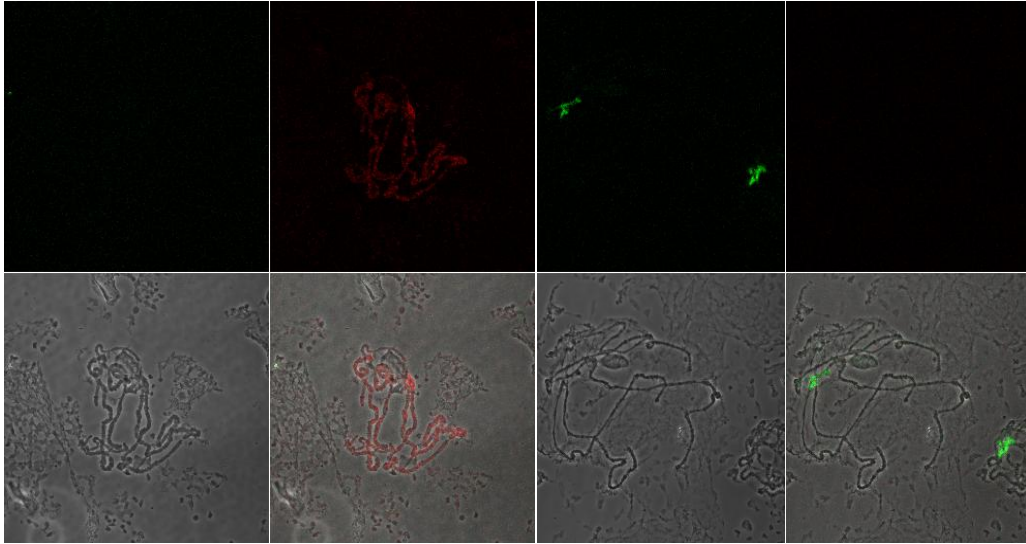


Figura 38. Controles de las dobles tinciones de ADD y HP1 en cromosomas politénicos. En el panel de la izquierda se muestra un cromosoma con el  $\alpha$ -ADD y su secundario  $\alpha$ -conejo (Alexa rojo 568) que se le adicionó secundario  $\alpha$ -ratón (Alexa verde 488). En el panel de la derecha se muestra un cromosoma teñido con  $\alpha$ -HP1 y su secundario  $\alpha$ -ratón (Alexa verde 488) que se le adicionó secundario  $\alpha$ - conejo (Alexa rojo 568). Como se puede observar la señal de cada anticuerpo es específica a su secundario y no hay cruce de canales al observar los fluoróforos.

Para cumplir con el objetivo de diseñar moscas transgénicas que expresen un ARN de interferencia específico para las dos isoformas que hasta el momento se conocían de dADD, se realizaron subclonaciones del vector pGEX-4T1 que ya contenía un fragmento del cDNA de ADDa, el cual se digirió con las enzimas BglI y NotI para generar un fragmento de 288 pb. La secuencia que se extrajo de esta construcción es:

```
ATCTGATAAAAGCCTTGGGCAGCCCCAGCGTCCTGCCTCCCAAATACAAAGGATAATGAGACTGATTTGGATGCAAA
CGATTTTATTGGAAATCTCCCACTCGAAACAACGGAGCCACCTGAGATTCTTGAAGGAGGATGAGTGCAAGGTGGA
AAAGACAACAGGGATTTCAAGTAGGAGCACCCAGCCCCGCCGAAAATGGTGACACAGAAATGGAATCCCACTTG
AAGCCAGTGACTCTGCGCCAGACGAGTTCGCCACGGCTGAGATTGTTGGCTAG
```

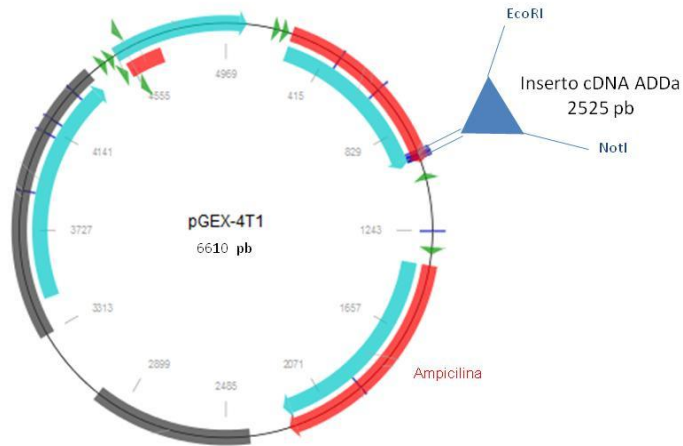


Figura 39. Esquema del vector pGEX-4T1 que contiene un fragmento del cDNA de ADDa de 2525 pb.

A continuación se muestra el esquema del vector pGEX-4T1 que ya contenía un fragmento del cDNA de ADDb, el cual se digirió con las enzimas Sall y EcoRI para generar un fragmento de 238 pb y la secuencia que se cortó de este vector es:

```
GGCCAACTGGACGACGTGGATCTCTTCAACACAGGCTGCAATAGCTTTCACAATCAGGTCTATGAATACCGCAAGAGTT
TGCATGCCAATCTTAAGGATGGCGAGGACTGCGAGCCATTGCCTCCGCTGATGCCGCTGGGAGTTCGAGCCGAAGGTG
ATCCCATCGATGAGCCCAGGAACCGGAAACGGTACCGGAACCGAGCAGGATGACACCGAAAAAGACCACGAAGAT
GCGGCCGAATT
```

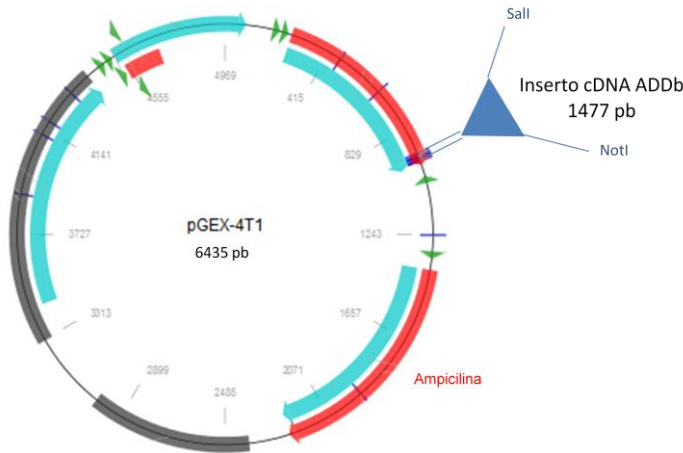


Figura 40. Esquema del vector pGEX-4T1 que contiene un fragmento del cDNA de ADDb de 1477 pb.

Una vez que se obtuvieron los fragmentos de los vectores de las figuras 36 y 37 se ligaron en el vector especial para mosca SympUAST-w que a continuación se muestra su esquema:

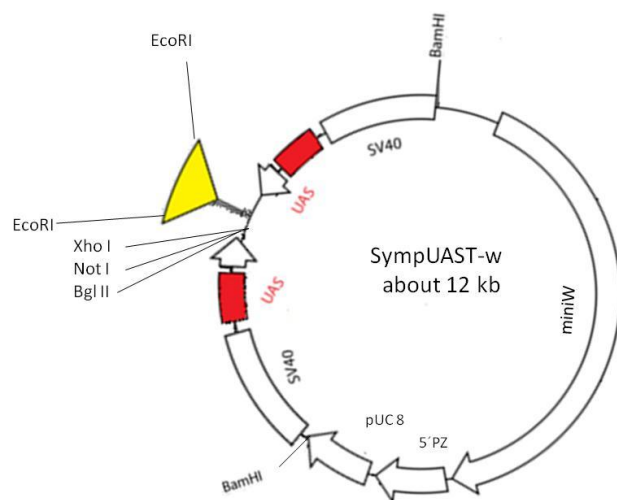


Figura 39. Esquema del vector SympUAST-w de 12 Kb aproximadamente de peso. En este vector se ligaron los fragmentos obtenidos de los vectores anteriores y este vector fue el que se mandó microinyectar para generar las moscas transgénicas.

Para poder evaluar si los niveles de transcrito fueron disminuidos en las moscas transgénicas con el ARN interferente se empleó la técnica de RT-PCR semicuantitativa, en la cual se monitorea a que ciclo de la reacción de PCR aparece el transcrito. A continuación se muestran los gels con los transcritos de interés a distintos ciclos:

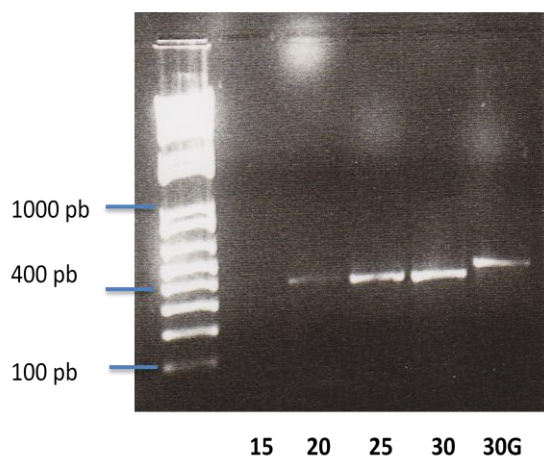


Figura 40. El transcrito de Rp49 aparece al ciclo 20. Reacción de RT-PCR empelando cDNA de adultos para observar cuando aparece el transcrito. Los números de la parte inferior muestra el ciclo en el cual se detuvo la reacción. El último carril muestra el control de ADN genómico con G.

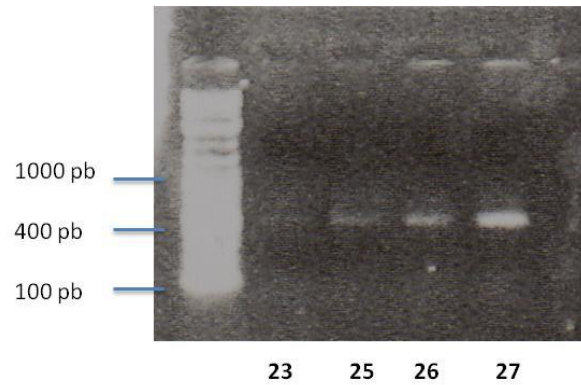


Figura 41. El transcrito de ADDa aparece al ciclo 25. Reacción de RT-PCR empelando cDNA de adultos para observar cuando aparece el transcrito. Los números de la parte inferior muestra el ciclo en el cual se detuvo la reacción.

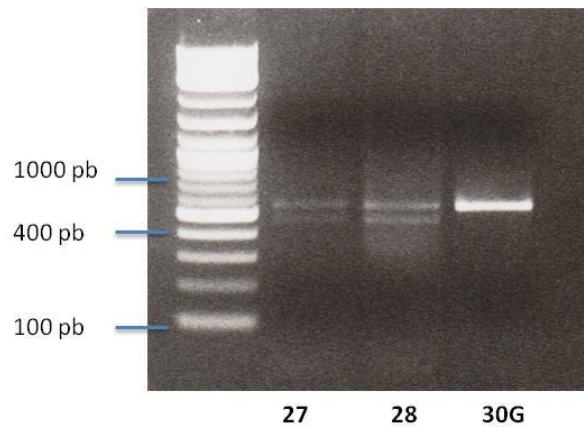


Figura 42. El transcrito de ADDb y d aparecen al ciclo 27. Reacción de RT-PCR empelando cDNA de adultos para observar cuando aparece el transcrito. Los números de la parte inferior muestra el ciclo en el cual se detuvo la reacción. El último carril muestra el control de ADN genómico con G.