



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Activación transcripcional *in vivo* de regiones heterocromáticas de
Drosophila melanogaster usando el sistema CRISPR/Cas9.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANDREA ORTEGA YÁÑEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. José Luis Reyes Taboada
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Hilda M. Lomelí Buyoli
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca Morelos, Noviembre 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de Ciencias Bioquímicas, el Instituto de Biotecnología y a la UNAM, por la formación académica de excelencia.

Al Dr. Mario por haberme aceptado en su laboratorio, su infinita paciencia conmigo, su asesoría, confianza y fe en que este proyecto saldría adelante.

Al Dr. José Luis Reyes y la Dra. Hilda Lomelí por sus valiosos consejos y asesoría durante la realización de mi proyecto y la escritura de la presente tesis.

Al CONACyT por la beca de posgrado otorgada, y por el donativo número 219673 y a la UNAM por el donativo DGAPA UNAM IN200315, ambos otorgados al Dr. Mario Zurita y con cuyo apoyo se logró la realización del presente trabajo.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM), por la beca otorgada para asistir al 1st International Symposium and Training Course on Genome Engineering & Developmental Biology editBio 2017 en el que el presente trabajo fue presentado.

A todos en el clan Zurita y el clan Reynauld por su apoyo, consejos, amistad y papitas.

A Carmen y a don Carlos por su indispensable trabajo en el laboratorio.

A Toño y Gloria por su gran trabajo en la Unidad de Docencia y su infinita paciencia.

A mis papás por todo su apoyo y comprensión.

ホセへ、いつも私に信じて、支えて、とても愛してくれてありがとう。愛していますよ！

ABREVIATURAS

Cas9	Proteína asociada a CRISPR (CRISPR-associated)
Complejo Bithorax (BX-C)	Complejo de genes de regulación en <i>Drosophila melanogaster</i> que controlan la identidad de los parasegmentos del torax y el abdomen.
Complejo PcG	Complejo de proteínas del grupo polycomb, encargadas del silenciamiento de genes homeóticos en <i>Drosophila melanogaster</i> .
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
dCas9-VPR	Dead Cas9-VPR. Proteína Cas9 sin actividad endonucleasa y fusionada a un dominio tripartita activador de la transcripción.
Dmel	<i>Drosophila melanogaster</i> .
DNA	Ácido desoxirriboucléico
EC	Eucromatina
Gag	Antígeno grupo-Específico, secuencia que codifica para la proteína estructural del core de retrovirus, presente en el retrotransposón TAHRE.
GTFs	Factores de Transcripción generales.
HC	Heterocromatina
LTRs	(non-long terminal repeat) retrotransposones de repetición terminal no-larga
ORF	marco de lectura abierta (ORF, del inglés open reading frame)
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEV	Position-effect variegation. Variegación por Efecto de Posición.
Pol	Gen en retrovirus que codifica para la DNA polimerasa y que forma parte del retrotransposón TAHRE.
Pol II	RNA polimerasa II
PRE	Polycomb response elements. Elementos de respuesta a polycomb, que participan en la regulación de los patrones de expresión mediados por PcG.

qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, cuantitativa.
RNA	Ácido ribonucleico.
sgRNA	Cadena de ARN del sistema CRISPR/Cas9 unida a 20 nucleótidos de la secuencia blanco (single guide RNA).
TAHRE	Telomere-Associated and HeT-A-Related Element. Elemento asociado a telómeros y relacionado con HET-A.
TBP	TATA-binding protein. Proteína de unión a la caja TATA.
TSS	Transcription Start Site, Sitio de inicio de la transcripción.
UAS	Upstream activating sequence. Secuencia de activación río arriba, a la que se une la proteína Gal4 para la expresión del gen de interés de forma sitio-específica.
<i>Ubx</i>	Ultrabithorax
UTR	Regiones no traducibles (untranslated regions)

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Activación de la transcripción y la relación entre su regulación y la estructura de la cromatina.	3
2. Tipos de cromatina: Eucromatina y Heterocromatina	4
2.1 Características de la heterocromatina constitutiva.	6
2.2 Características de la heterocromatina facultativa.	8
3. Generalidades del sistema CRISPR/Cas9.....	10
ANTECEDENTES	13
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO.....	15
Objetivos particulares	15
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1. Diseño de sgRNA.	17
2. Clonación en Vector de expresión de sgRNA.	18
3. Obtención de líneas de moscas transgénicas.	20
4. Balanceo de líneas de moscas.....	20
5. Comprobación de la expresión constitutiva de los sgRNA en mosca.	21
6. Cruzas de líneas de moscas.	21
7. Ensayo de viabilidad de cruzas.....	22
8. Análisis de fenotipo de las moscas.....	22
9. Inmunotinción de discos imagales.	23
10. Determinación de la activación transcripcional de las regiones heterocromáticas.	23
RESULTADOS	25
1. Clonación del vector pCFD4 con los insertos de las secuencias de <i>Ubx</i> y TAHRE para el ensamblaje con el sgRNA.	25
2. Prueba de la expresión constitutiva de los sgRNA en las moscas transgénicas, mediante RT-PCR.	27

3. Efecto en la viabilidad de las líneas sometidas a la activación transcripcional de <i>Ubx</i> y TAHRE mediante el sistema CRISPR/dCas9.....	28
4. Incremento en la expresión del gen homeótico <i>Ubx</i> de forma ectópica en discos imagales de ala y ojo-antena.....	29
5. Fenotipos desarrollados en alas y antenas de moscas que expresan ectópicamente al gen <i>Ubx</i>	35
6. La expresión de dCas9-VPR resulta en un aumento de los transcritos del gen <i>Ubx</i> y el elemento TAHRE en las cruzas respectivas.....	39
DISCUSIÓN.....	41
1. El diseño de los sgRNA es crucial para el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9.	41
2. Los ensayos de viabilidad en moscas bajo la acción del sistema CRISPR/Cas9 no sugieren efecto para las líneas <i>gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+</i>	42
3. La activación transcripcional del gen <i>Ubx</i> en las moscas <i>gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4; UAS:dCas9-VPR/+</i> provoca su expresión ectópica en discos imagales de ojo-antena y ala.....	43
4. La activación transcripcional del gen <i>Ubx</i> en las moscas <i>gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR;+</i> provoca fenotipos dominantes <i>in vivo</i> en antena y ala de moscas adultas.	44
5. La activación transcripcional del elemento TAHRE no manifestó un cambio en el fenotipo, pero sí un incremento en la cantidad de transcritos cuantificados por qRT-PCR.....	44
6. La acción de dCas9-VPR es suficiente para activar la transcripción en la heterocromatina.....	46
CONCLUSION	47
PERSPECTIVAS	48
REFERENCIAS.....	49
ANEXOS	54
Anexo 1.....	54
Anexo 2.....	54
Anexo 3.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del nucleosoma.....	2
Figura 2. Organización de la cromatina en el núcleo	2
Figura 3. Tipos de cromatina de acuerdo a su nivel de compactación	5
Figura 4. Elementos transponibles que se encuentran en los telómeros de <i>Drosophila melanogaster</i>	7
Figura 5. Diagrama de BX-C.....	9
Figura 6. <i>Ubx</i> controla el desarrollo diferencial del halterio.....	10
Figura 7. Composición y funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9 tipo II.....	12
Figura 8. Empleo del sistema CRISPR/Cas9 para la activación transcripcional mediante Gal4-UAS	13
Figura 9. Mapa genómico de <i>Ubx</i>	17
Figura 10. Esquema del elemento TAHRE	18
Figura 11 A. Mapa del plásmido pCFD4-U6:1_U6:3tandemgRNAs.....	19
Figura 12. Preparación de plásmido e insertos para la clonación en pCFD4.	25
Figura 13. Obtención de las construcciones con los sgRNA dirigidos a TAHRE y <i>Ubx</i>	26
Figura 14. Transcritos obtenidos para las líneas de mosca transgénicas, con genotipo <i>gRNA/CyO;+/+</i> y reacción de PCR para las moscas de la línea <i>gRNA_{Ubx}</i>	27
Figura 15. Mapa de destino de las regiones del disco imagal de ojo-antena	29
Figura 16. Mapa de destino de las regiones del disco imagal de ala	30
Figura 17. Inmunotinción de discos ojo antena <i>gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+</i>	31
Figura 18. Inmunotinción de discos de ala <i>gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+</i>	32
Figura 19. Inmunotinción de discos de ala <i>MS1096-GAL4/+;gRNA_{Ubx}/+;UAS:dCas9-VPR/+</i>	33
Figura 20. Inmunotinción de discos de ala <i>gRNA_{Ubx}/Ap>GFP-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+</i>	34
Figura 21. Daños en ala obtenidos de la línea mutante <i>gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4; UAS:dCas9-VPR/+</i> ..	36
Figura 22. Daños en ala obtenidos de la línea mutante <i>MS1096-GAL4/+;gRNA_{Ubx}/+;UAS:dCas9-VPR/+</i>	37
Figura 23. Daños en ala obtenidos de la línea mutante <i>gRNA_{Ubx}/ap>GFP-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+</i> ..	37
Figura 24. Daños en antena obtenidos de la línea mutante <i>gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+</i>	38
Figura 25. RT-PCR de moscas adultas para las líneas <i>gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+</i>	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla comparativa de las principales características de la Eucromatina y Heterocromatina	5
Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para construcción de los sgRNA.....	19
Tabla 3. Cantidades de reactivos empleadas para la reacción por qRT-PCR en el dispositivo Roche Real Time PCR LightCycler® 1.5.....	24
Tabla 4. Resultados de ensayo de viabilidad para la línea de moscas con el sgRNA dirigido al gen de <i>Ubx</i>	28
Tabla 5. Resultados de ensayo de viabilidad para la línea de moscas con el sgRNA dirigido al elemento TAHRE.	29

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1. Incremento en transcritos para el elemento TAHRE.....	40
Gráfico 2. Incremento en transcritos para el gen <i>Ubx</i>	40

RESUMEN

El DNA dentro de las células eucariontes se encuentra organizado y compactado en el núcleo gracias a la cromatina, la cual puede ser encontrada como eucromatina o como heterocromatina dependiendo su grado de compactación, del más laxo al más estrecho, respectivamente. Este arreglo de compactación es el que permite o impide la activación de la transcripción debido a que de ella depende la unión de factores transcripcionales, lo que cuestiona si es necesario el cambio de la estructura de la cromatina previamente a la activación de la transcripción o si la activación de la transcripción promueve la relajación de la cromatina, siendo necesaria para la modificación de su estructura. Para probar esto último, en el presente trabajo se empleó el sistema CRISPR/Cas9 para dirigir la activación de la transcripción de forma artificial a regiones de heterocromatina.

Se encontró que la expresión estable de RNAs guías junto con una variante de la proteína dCas9-VPR, con actividad endonucleasa nula y fusionada a dominios activadores de la transcripción, es suficiente para lograr la activación de la transcripción en regiones de heterocromatina, tanto del tipo constitutiva como facultativa, a pesar de la restricción conformacional que ésta pudiera ejercer sobre la maquinaria de la transcripción.

Para el caso de heterocromatina constitutiva se eligió al elemento TAHRE, el cual es un retrotransposón localizado en telómeros y que se transcribe muy poco durante el ciclo celular. Se encontró que al dirigir a la dCas9-VPR a esta región para su activación transcripcional, se incrementó hasta 60 veces la cantidad de transcritos presentes con respecto a las moscas con fenotipo silvestre.

En lo que respecta al gen *Ubx*, el cual es un gen homeótico que se encuentra altamente regulado y forma parte de la heterocromatina facultativa, se encontró un incremento en su expresión observado en los discos imagales de ala y ojo antena, en regiones muy delimitadas y específicas que se manifestaron en el desarrollo de fenotipo en dichos apéndices del organismo adulto.

Dichos hallazgos podrían proporcionar un argumento a favor en el postulado de que la transcripción es la que determina la estructura de la cromatina, quedando por probar si los resultados son reproducibles en otras regiones heterocromáticas.

INTRODUCCIÓN

El núcleo celular es considerado como una de las estructuras más importantes en las células eucariontes puesto que es el encargado del almacenamiento, reparación y duplicación de la información genética contenida en el DNA; el cual, se encuentra organizado en forma de cromatina¹. En la cromatina, el DNA genómico se encuentra rodeando proteínas denominadas histonas, que empaquetan y pliegan al DNA formando nucleosomas, que junto a RNAs no codificantes y otras proteínas conforman conjuntamente su estructura compacta característica.

El nucleosoma, es la unidad fundamental de la cromatina y está compuesto por 147 pares de bases de DNA que se enrollan casi en dos giros sobre un octámero que contiene a las histonas: H2A y H2B (formando dos dímeros) y las H3 y H4 (dos de cada una formando un tetrámero) (Figura 1)^{2,3}. A su vez, están ensamblados en arreglos lineales en los que cada nucleosoma se conecta por DNA de unión (o DNA linker) de 10-70 pb de longitud dependiendo la especie y el tipo celular; posteriormente, se organizan en fibras de polinucleosomas de 10nm que se enrollan para formar una hélice de 30 nm de diámetro y que contiene de 6 a 11 nucleosomas por giro que, según los modelos que a la fecha se han propuesto, se organizan o en una estructura solenoide en donde cada nucleosoma interactúa con otros 6 en su vecindad, o bien en un listón de zigzag en donde cada dos nucleosomas existe interacción, o una fusión de polímeros; todas estas estructuras, se van compactando, para finalmente dar lugar a la formación de los cromosomas⁴ (Figura 2).

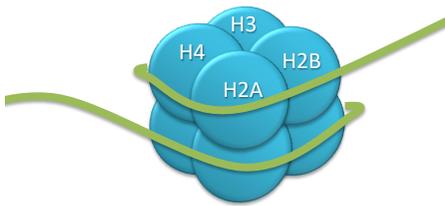


Figura 1. Estructura del nucleosoma. Se muestra la conformación del nucleosoma, en donde el DNA (en verde) enrolla al octámero de las histonas H2A, H2B, H3 y H4.

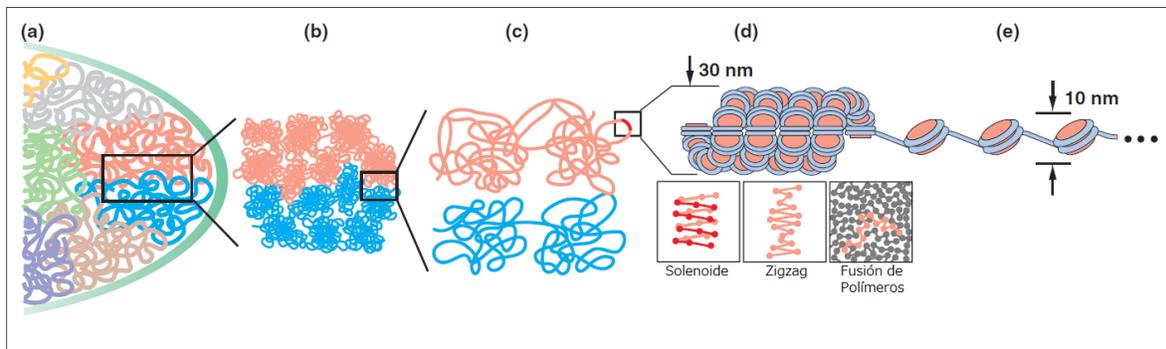


Figura 2. Organización de la cromatina en el núcleo. Los cromosomas se encuentran organizados en territorios (A), que a su vez están comprendidos por glóbulos fractales (B), que con los glóbulos de territorios cromosomales adyacentes pueden interdigitar. Los glóbulos fractales están conformados por fibras que interactúan entre sí (C) y que presentan una organización de 30nm de solenoide, zigzag o fusión de polímeros (D). Finalmente, (E) éstas se desenrollan en fibras de 10nm en las que se encuentran los nucleosomas. (Modificado de Hübner, 2012⁴).

1. Activación de la transcripción y la relación entre su regulación y la estructura de la cromatina.

La cromatina es un complejo DNA-proteína que regula finamente el metabolismo del DNA, gracias a su estructura dinámica; por lo que, la modulación de dicha estructura es crucial para la regulación de los genes ya que determina la accesibilidad de la maquinaria transcripcional al DNA o el reclutamiento de factores reguladores.

La activación de la transcripción de un gen enclavado en la cromatina, se encuentra mediada por la presencia, principalmente de la RNA polimerasa II (Pol II), que a su vez, depende en gran medida de factores de transcripción generales (GTFs), que intervienen con ella directa o indirectamente y son necesarios para posicionar a la Pol II sobre el promotor del gen, abrir la doble cadena de DNA y conferirle a la enzima plena competencia para iniciar y elongar la transcripción. Estos GTFs incluyen a la TATA-binding protein (TBP), y a los complejos protéicos TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF y TFIIH; éste último, contiene una helicasa que abre la hebra de DNA y una cinasa que fosforila el dominio C-terminal (CTD) de la Pol II para que ésta se libere del promotor e inicie la transcripción⁵. Es así que, dependiendo de los diferentes estados transcripcionales, la estructura de la cromatina puede estar alterada por la presencia de represores, coactivadores, complejos remodeladores y/o la incorporación de variantes de histonas, así como de modificaciones en sus mismos constituyentes, como la metilación del DNA o las modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas⁶.

Estos patrones epigenéticos, son de vital importancia durante el desarrollo, ya que por una parte, pueden restringir la expresión de genes, limitando la accesibilidad de secuencias genómicas y creando una barrera para eventos nucleares como transcripción, replicación y reparación del material genético² por medio del silenciamiento de la cromatina y, por consecuencia, estabilizando la identidad celular⁷. Y por otro lado, permiten que la activación transcripcional pueda llevarse a cabo⁸ dada la accesibilidad del material genético para la unión de la Pol II, así como la unión de GTFs y activadores de la transcripción gen-específicos, necesarios para poder iniciar la transcripción⁵.

De hecho, la relación entre la compactación de la cromatina y el silenciamiento génico se ha inferido por la pérdida de la mayoría de la actividad génica sobre el cromosoma X inactivo, el cual es visiblemente condensado en hembras de mamíferos, y por la pérdida de la expresión génica, correlacionada con el empaquetamiento condensado en el efecto de variegación posicional (*Position-effect variegation*, PEV) en *Drosophila* y otros organismos⁹.

Por lo tanto, sabiendo que el estado de la cromatina en la cual un gen está enclavado, determina su nivel de expresión en gran medida y, que la activación o represión de la transcripción es típicamente realizada por el reclutamiento de complejos proteicos asociados a cromatina que combinan distintas herramientas moleculares, como: su actividad modificadora de cromatina o su actividad de unión a histonas¹⁰; entonces, es posible afirmar que la estructura de la cromatina y el reclutamiento de los factores de transcripción, son dos aspectos altamente relacionados y fundamentales en la regulación de la transcripción, así como en los pasos de iniciación y elongación de la misma.

Aunque, también es importante considerar que, la transcripción no es un proceso de todo o nada, los niveles de la transcripción pueden variar gradualmente cambiando además del estado del DNA templado, el número y el tipo de factores transcripcionales que favorecen la unión de la Pol II (incluyendo factores que pueden modificar nucleosomas, como los factores remodeladores de cromatina), el número y fuerza de los activadores transcripcionales y el número de sus sitios de unión al DNA. De tal forma que el nivel de la transcripción de un gen dado, será determinado por todos estos parámetros en su localización cromosomal⁵.

2. Tipos de cromatina: Eucromatina y Heterocromatina.

La transcripción se encuentra estrechamente regulada a diferentes niveles para asegurar que el transcriptoma de la célula sea apropiado para la etapa de desarrollo y el tipo celular, por lo que el arreglo de la cromatina dentro del núcleo, es importante para el establecimiento y mantenimiento de la identidad celular durante la diferenciación¹¹.

De acuerdo con los niveles de compactación, detectados desde los estudios de microscopía óptica realizados en la década de 1930, se pudieron distinguir dos tipos de cromatina en el núcleo interfásico de los organismos eucariotas superiores: una forma altamente condensada, denominada heterocromatina (HC), y el resto, menos condensada, denominada eucromatina (EC). La mayor parte del DNA que está empaquetado en forma de heterocromatina tiene muy pocos genes y los genes que están localizados en la heterocromatina resultan inactivados por este tipo de empaquetamiento^{12,13}. Por otro lado, la eucromatina es una región rica en genes y se encuentra menos condensada¹². La observación de que la heterocromatina es menos transcrita que la eucromatina sugiere que estas estructuras microscópicamente identificables podrían corresponder a dominios funcionalmente diferentes del núcleo¹⁴.

A diferencia de la heterocromatina, la EC, se replica tempranamente en la fase S del ciclo celular y se ha descubierto que incluye en su mayoría genes “*housekeeping*”, es decir, genes que se expresan de forma constitutiva en todos los tejidos y que son los encargados del metabolismo básico y el buen funcionamiento celular. Por su parte, la HC se replica tardíamente durante la fase S e incluye genes específicos de tejido¹¹.

Adicionalmente, tanto la EC como la HC se encuentran diferencialmente marcadas por secuencias repetitivas intercaladas, que representan hasta el 45% del genoma en mamíferos. Secuencias repetitivas cortas intercaladas (*Short Interspersed Repetitive Sequences*, SINEs) residen en la EC, mientras que los Elementos largos relacionados con retrotransposones (*retrotransposon-related long elements*, LINEs) y LTRs se localizan preferencialmente en la HC¹¹.

Se ha propuesto que fenómenos como: la replicación temprana de la heterocromatina en levadura, la transcripción de secuencias repetidas de heterocromatina en plantas y animales o la mayor velocidad de recombinación mitótica de la heterocromatina humana con respecto a la eucromatina; son fenómenos que dependen de efectores en la heterocromatina, sugiriendo que más que simplemente regular la accesibilidad al ADN, la HC representa una forma especializada de cromatina funcional paralela a eucromatina.¹⁵

Cabe mencionar que la HC se encuentra concentrada en zonas específicas, ya que está especialmente enriquecida en los centrómeros y en los telómeros; y es considerada como cromatina condensada con diversas funciones que la hacen altamente resistente a la expresión génica para la gran mayoría de los genes¹³.

Así mismo, las regiones de heterocromatina se caracterizan por poseer una elevada unión de la isoforma de histonas H1 y baja abundancia de proteínas diferentes a las histonas, sugiriendo que la organización de fibras de 30nm de los nucleosomas está involucrada en la compactación y la represión transcripcional de la heterocromatina⁴. Por otra parte, Las secuencias regulatorias de regiones de eucromatina se encuentran accesibles a nucleasas y contienen islas de CpG no metiladas y núcleos de histonas H3 y H4 hiperacetiladas; en contraste, la heterocromatina es usualmente metilada en los dinucleótidos CpG y las histonas están marcadamente hipoacetiladas⁶. Durante la fase S del ciclo celular, los cromosomas se descondensan en una masa relajada de cromatina, en la que la EC ocupa el interior nuclear, mientras que la HC se encuentra predominantemente asociada con la periferia y el nucléolo¹¹, esto posiblemente se debe a que algunas de las proteínas asociadas con heterocromatina se unen a proteínas de la membrana nuclear interna⁵⁵.

En la figura 3 se presenta un esquema ilustrativo de eucromatina y heterocromatina. Mientras que la tabla 1 da un resumen de las principales diferencias.

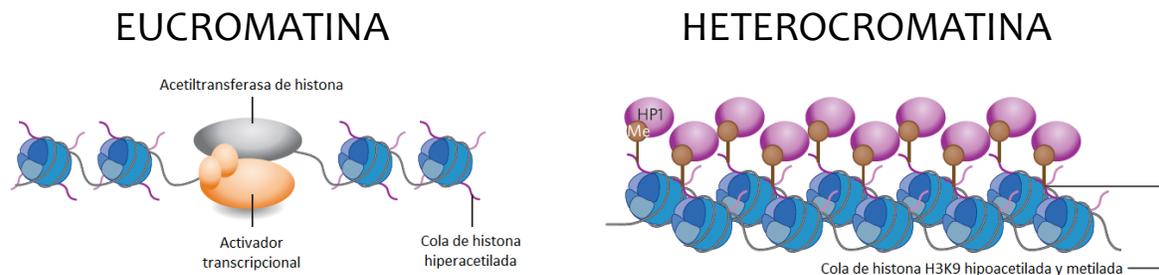


Figura 3. Tipos de cromatina de acuerdo a su nivel de compactación. La eucromatina (izquierda) es una región rica en genes que se encuentra en los brazos de los cromosomas y contiene secuencias únicas. Posee una estructura menos condensada lo cual la hace permisiva para la unión de factores de transcripción, activadores transcripcionales etc. Además de marcas como la hiperacetilación de histonas. Por otro lado, se encuentra la heterocromatina (derecha), que es una región pobre en genes, rica en secuencias repetidas, localizada en centrómeros y telómeros preferencialmente. Con marcas de metilación y la proteína HP1 que permiten su represión transcripcional. Modificada de Grewal, 2007⁹.

La formación de heterocromatina requiere de acciones concertadas entre enzimas modificadoras de la cromatina, y comprende 3 pasos: iniciación, extensión y mantenimiento. Para ello las metiltransferasas de la lisina 9 de la histona H3 (HMTs) son reclutadas a los centros de nucleación de heterocromatina, conduciendo a la metilación del residuo de lisina 9 de la histona H3, la cual subsecuentemente es reconocida y se le une la proteína de heterocromatina 1 (HP1). HMTs adicionales son reclutadas ya sea por el reconocimiento de la H3K9me o por asociación a la HP1,

Tabla 1. Tabla comparativa de las principales características de la Eucromatina y Heterocromatina^{16,17}.

Eucromatina	Heterocromatina
DNA con empaquetamiento relajado en el cromosoma	Empaquetamiento estrecho del DNA en el cromosoma
Baja densidad de DNA	Alta densidad de DNA
Presente en el cuerpo interno del núcleo	Se localiza en la periferia del núcleo
Contiene regiones activas transcripcionalmente	Presenta poca o nula actividad transcripcional
Replicación durante la fase S	Replicación al final de la fase S
Recombinación meiótica	Baja frecuencia de recombinación meiótica
Histonas hiperacetiladas, H3K4me, hipometilación de citosina	Hipoacetilación de histonas, H3K9me3, Hipermetilación de citosina.
Permite a los genes ser transcritos y ocurren variaciones genéticas	Mantiene la integridad estructural del genoma y permite la regulación de la expresión génica.
Accesible a nucleasas	Poco accesible a nucleasas

llevando a la metilación de nucleosomas adyacentes. La repetición de este ciclo, resulta en la extensión de la heterocromatina. Durante la replicación del DNA las HMTs restauran los dominios de heterocromatina en las cadenas hijas, permitiendo el mantenimiento estable de este estado epigenético a través de las generaciones¹².

Con el desarrollo de la microscopía electrónica y la mejora en los métodos de tinción en la década de los 50's, se hizo evidente que la HC podía subdividirse en heterocromatina constitutiva y heterocromatina facultativa¹⁸. Ambas se describen y ejemplifican a continuación.

2.1 Características de la heterocromatina constitutiva.

La palabra constitutivo se puede definir como algo que tiene el poder de establecer o dar organizada existencia a algo, de ahí que al referirse a la heterocromatina constitutiva, se hace referencia a un tipo de heterocromatina que va a dar lugar a una organización estable la mayor parte del ciclo celular.

Ésta se encuentra localizada en la periferia nuclear durante la interfase y en dominios subnucleares denominados cromocentros y sólo algunas regiones se transcriben antes de la mitosis¹⁵.

En la heterocromatina constitutiva preferencialmente se ensamblan elementos repetitivos, como lo son DNA satélite, DNA ribosomal (rDNA) o los elementos transponibles (TEs)¹².

La estabilidad de la heterocromatina constitutiva es ejemplificada en la Variegación por Efecto de Posición (*Position-effect variegation*, PEV). El PEV representa la primera conexión palpable entre el estado conformacional de la cromatina y el estatus transcripcional de los genes¹⁸.

El PEV ocurre cuando un gen que es normalmente eucromático es juxtapuesto en una región de heterocromatina, a través de un rearrreglo o transposición; el fenotipo variegado resultante indica que el gene ha sido silenciado en una proporción de células en las cuales es normalmente activo⁹. Este efecto se ha estudiado en *Drosophila*, organismo en el que el gen *white* es variablemente silenciado cuando un evento de translocación cromosomal lo coloca adyacente a heterocromatina pericentromérica. Una vez que una célula fundadora establece heterocromatina en el gen *white* durante etapas tempranas del desarrollo, el silenciamiento es mantenido en todas las células que se deriven de ésta a través de la edad adulta, resultando en parches de células sin pigmentación en el ojo adulto. Esta estabilidad es esencial para reprimir recombinación entre elementos repetidos y para limitar la transcripción de transposones activos y mantener la integridad del genoma¹².

Sin embargo, estudios recientes muestran que la heterocromatina constitutiva es también dinámicamente regulada y sensible a estímulos y estos cambios podrían potencialmente ayudar a organismos a adaptarse a nuevos ambientes, en otros casos éstos también podrían causar enfermedades¹². Esto se debe a que las modificaciones asociadas a cromatina modulan la interacción de los complejos transcripcionales y el DNA, lo que influye en los mecanismos transcripcionales que regulan la expresión génica¹⁹.

2.1.1. Un ejemplo de heterocromatina constitutiva es el elemento TAHRE.

En la mayoría de los eucariontes, el DNA telomérico es mantenido por la actividad de la telomerasa, la cual es responsable de la síntesis de pequeños arreglos de 5-11 nucleótidos usando RNA como templado; sin embargo, a diferencia de otros eucariotes, *Drosophila melanogaster* carece de dicha enzima, por lo que los telómeros son mantenidos por las transposiciones de

retroelementos teloméricos especializados, que componen una porción significativa en el genoma y que son de 2 a 3 órdenes de magnitud más largos que los repetidos teloméricos en otros organismos, sobre el orden de 10 kilobases^{20,21}. Estas secuencias repetitivas proporcionan un sustrato para la formación de heterocromatina, puesto que los genes localizados dentro de ella tienden a silenciarse, en un proceso denominado “efecto de posición telomérica”²².

Los retroelementos transponibles repetidos también actúan como un buffer en contra de la pérdida de telómeros durante la replicación; ya que la retrotransposición de éstos es uno de los mecanismos para la elongación de telómeros (junto con la recombinación)²⁰. No obstante, la proporción de acortamiento por generación es limitada, y solo eventos de transposición ocasionales son necesarios para mantener los extremos de los cromosomas. También se ha reportado que estos elementos son fuertemente excluidos de la eucromatina^{22,23}.

El DNA telomérico en la mosca, consiste en arreglos ordenados de tres retrotransposones de repetición terminal no-larga (*non-long terminal repeat*, non-LTR): HeT-A, TART y TAHRE. Dichos retrotransposones poseen características similares: la región 5’ de todos los elementos se localiza más cerca del telómero que el 3’, es decir, más cerca del cap, un complejo protéico que se forma en los extremos de los cromosomas; también, poseen largas regiones no traducibles en 3’ (*untranslated regions*, UTRs) con colas de poli-A; ambas regiones flanquean a los marcos de lectura abiertos (*Open Reading Frame*, ORF): Gag y Pol^{20,21}. El ORF de Gag, codifica para una proteína de unión a RNA Gag-like que a su vez contiene señales de localización nuclear, mientras que el ORF2 posee dominios de endonucleasa y retrotranscriptasa, la figura 4 esquematiza a estos retroelementos y sus componentes.

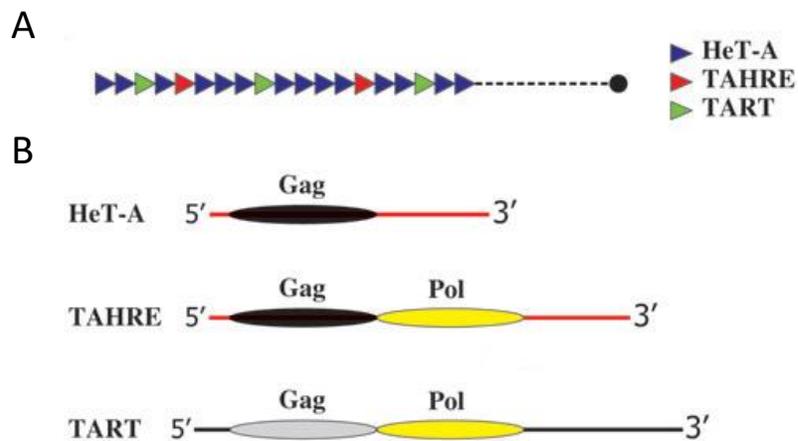


Figura 4. Elementos transponibles que se encuentran en los telómeros de *Drosophila melanogaster*. En A se muestra la representación esquemática de los telómeros y los retroelementos HeT-A/TART/TAHRE, de colores azul, verde y rojo, respectivamente. El círculo negro al extremo indica la dirección al centrómero, siendo el extremo 3’ de los retrotransposones, más cercanos a éste. En B se muestra la composición de cada uno de los retrotransposones, donde los ORFs de Gag y Pol se representan en óvalos, las regiones homólogas se presentan en colores idénticos. (Tomado de Shpiz et al. 2007²⁰).

TAHRE (Elemento asociado a telómero y relacionado con Het-A) es un retroelemento abundante, descubierto inicialmente durante el análisis de la secuencia de los telómeros de la línea *y; cn bw sp* de *Drosophila melanogaster*. TART y TAHRE comparten la presencia del ORF 2 que codifica para dominios de retrotranscriptasa y endonucleasa, sugiriendo que provienen de un ancestro común; por otro lado, el 5’UTR, ORF1 y 3’UTR de TAHRE comparte una homología significativa con HeT-A,

sugiriendo que éste último evolucionó a partir de TAHRE perdiendo el ORF2^{20,21,24}. En la secuencia de TAHRE, 452 nucleótidos corresponden a la región de 5' UTR, la región del gag abarca 2897 nucleótidos, posteriormente la región de Pol: 3311 nucleótidos y la región 3' UTR: 3765 nucleótidos.

TAHRE se ha encontrado en diversas especies del subgrupo de *melanogaster* así como en especies más distantemente relacionadas; resaltando su contribución en el mantenimiento de los telómeros de *Drosophila*. La distribución al azar de TAHRE y los otros retroelementos indica que son esencialmente equivalentes en su habilidad para formar cromatina telomérica; no obstante colaboran de manera diferente. Para el caso de la Gag de TAHRE es predominantemente citoplasmática pero se localiza adyacente a la membrana nuclear y requiere de la Gag de HeT-A para su localización en telómeros²⁵.

2.2 Características de la heterocromatina facultativa.

La palabra facultativa proviene del latín *facultas* que significa oportunidad, es por ello que la heterocromatina facultativa designa a esas regiones genómicas en el núcleo de una célula eucarionte que tiene la oportunidad de adoptar conformaciones abiertas o compactas dependiendo de los contextos temporales y espaciales en los que se encuentre; por ejemplo, en regiones de genes que se encuentran reprimidas y que pueden abrirse cuando estos necesitan ser expresados en algún momento del desarrollo o en algún tejido particular¹⁸.

Mediante el uso de métodos de tinción citológicos, la heterocromatina facultativa es indistinguible de la heterocromatina constitutiva (como el caso del cromosoma X inactivo), o puede estar localizada en un área altamente regulada que no puede distinguirse de eucromatina; esto significa que la heterocromatina facultativa tiene la capacidad de interconvertirse entre heterocromatina constitutiva y la eucromatina.

Adicionalmente, se sabe que la heterocromatina facultativa se forma en el ambiente de la eucromatina, a la que proteínas heterocromáticas se unen y son usadas para reprimir establemente la actividad de ciertos genes localizados dentro de ésta y que son de vital importancia durante el desarrollo. Dada esta heterogeneidad, la heterocromatina facultativa adopta un amplio rango de estados de condensación, incluyendo la compactación local de fibra de 11 nm, variaciones de la fibra de 30 nm o un grado mayor de compactación^{7,18}. Por lo tanto, la cantidad de heterocromatina facultativa que se puede encontrar en una célula varía dependiendo de la actividad transcripcional bajo la que ésta se encuentre⁵⁵.

Ampliando un poco la definición, la heterocromatina facultativa se puede describir como esas regiones de la cromatina transcripcionalmente silenciada que se descondensa y permite la transcripción bajo contextos como: temporal (estados de desarrollo o etapas del ciclo celular específicas), espacial (por cambios en la organización nuclear, del centro a la periferia o viceversa debido a señales y/o factores exógenos) o parental/hereditaria (expresión de genes monoalélicos). En cuanto a la transcripción bajo el contexto temporal, se sabe que algunos genes de organismos multicelulares están ligados a un estado de diferenciación; es decir, que se encuentran inactivos en ciertos tipos de células diferenciadas pero que se transcriben en células indiferenciadas. Así mismo, los factores de transcripción controlan la expresión genética como una función del estado de diferenciación¹⁸.

Por lo que en la heterocromatina facultativa, a menudo se encuentran genes regulados por el desarrollo, y su nivel de compactación cambia en respuesta a señales durante éste y/o señales ambientales¹².

2.2.1 El gen homeótico *Ubx*, como un ejemplo de genes inmersos en heterocromatina facultativa

Regiones y secuencias de DNA que son sujetas a silenciamiento transcripcional regulado durante el desarrollo, constituyen la heterocromatina facultativa, por lo que la heterocromatinización a gran escala del genoma es frecuentemente observada en células diferenciadas⁶. Ejemplos de estas secuencias que incluyen genes silenciados durante la diferenciación, son los genes Hox, entre los que se encuentra el complejo Bithorax (BX-C).

En *Drosophila*, el complejo bithorax controla la identidad de cada uno de los segmentos que contribuyen a los posteriores dos tercios de la mosca. Esto se logra por la regulación de la expresión de 3 genes homeóticos: *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal A (abd-A)* y *abdominal B (Abd-B)*²⁶. Estos genes, se encargan de controlar el proceso de desarrollo regionalizando los ejes del cuerpo de la mosca (Figura 5), operando en diferentes tipos celulares en diferentes estadios durante el desarrollo²⁷. Para el caso de *Ubx*, éste controla la identidad del segmento torácico 3 (T3) y el segmento abdominal 1 (A1), regulando las regiones donde se desarrollarán las alas y patas de la mosca y que en la figura 5 se muestran de color naranja y rojo²⁶. Durante el desarrollo embrionario de la mosca, *Ubx* se activa en las regiones T3 y A1 en donde determinará el destino celular de cada una y se reprime en otras regiones en las que operan otros genes homeóticos. Por lo tanto en las regiones que no se expresa, se encuentra como heterocromatina facultativa. Posteriormente, en el estadio de larva, *Ubx* se encontrará expresado en los discos imagales de halterio y pata, permitiendo el desarrollo de dichos órganos.

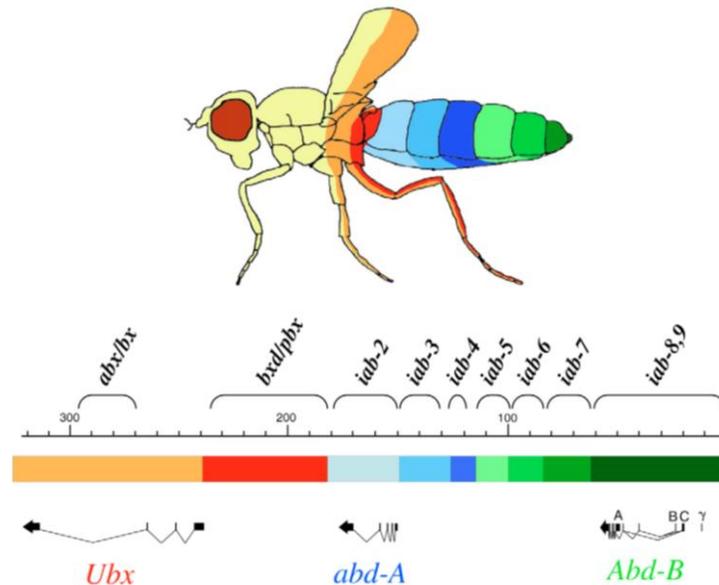


Figura 5. Genes que conforman al complejo Bithorax, dominios reguladores y segmentos regulados en el cuerpo de la mosca adulta. La barra representa el DNA del complejo BX-C, en donde los dominios cis-regulatorios se indican por diferentes colores. Las regiones naranja y roja (*abx/bx* y *bxl/pbx*) controlan la expresión de *Ubx*. Los segmentos correspondientes que son afectados por mutaciones en la región reguladora se muestran en el diagrama de la mosca adulta en el que se emplea el mismo código de colores. Tomado de Maeda, 2006²⁶.

El gen de *Ubx* es extremadamente largo, ya que tiene un transcrito primario de más de 70Kb, que por splicing diferencial puede originar moléculas de mRNA entre 3.2 y 4.7 Kb²⁸. La expresión del

gen *Ubx* se encuentra regulado por elementos *cis*-regulatorios, que en la figura 5 muestra las regiones regulatorias roja y naranja que interactúan con *Ubx*, donde se incluyen a las regiones *abx/bx* y a *bxl/pbx*. Este sistema de mantenimiento requiere de los productos génicos del grupo polycomb (PcG) y del grupo trithorax (trx-G), que se unirán a elementos del genoma denominados “elementos de mantenimiento” (también conocidos como PcG o trx-G response elements, PREs/TREs). Los primeros funcionan como reguladores negativos que mantienen el estado inactivo de las regiones *cis*-regulatorias, mientras que los productos del gen *trx-G* funcionan como reguladores positivos que mantienen el estado de las regiones reguladoras activas; ambos mediante la modificación de la estructura de la cromatina de cada región²⁶.

Por décadas, se ha sabido que en *Drosophila*, el gen *Hox: ultrabithorax (Ubx)* controla el desarrollo diferencial entre el ala y el halterio; esto, mediante su expresión en los discos imagales de halterio, durante el desarrollo del mismo en la etapa de larva, pero no en los discos imagales de ala. Por lo que una pérdida de función de *Ubx* en discos imagales resulta en la transformación del tejido de halterio a tejido de ala, dando lugar a una mosca adulta con 4 alas. Al contrario, las mutaciones que causan expresión ectópica de *Ubx* en el disco de ala, transforman el ala en tejido de halterio²⁹, ejemplo de estos fenotipos se pueden ver en la figura 6.

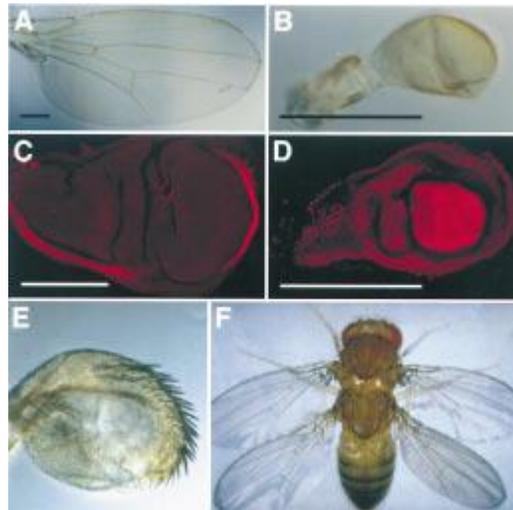


Figura 6. *Ubx* controla el desarrollo diferencial del halterio. El ala silvestre(A) difiere de halterio (B) en tamaño, forma y presencia de venas y quetas marginales. C. La expresión de *Ubx* (rojo) en el disco de ala es delimitado por la membrana peripodial y no desempeña una función en el desarrollo de ala. D. Expresión fuerte de *Ubx* en el disco de halterio, concentrado en el pouch. La reducción de la actividad de *Ubx* conduce a transformaciones hacia identidad de ala (E), desarrollando quetas marginales ectópicas incrementadas en tamaño. F. Pérdida total de la actividad de *Ubx* en el desarrollo del halterio resulta en la completa transformación hacia la identidad de ala. (Tomado de Weatherbee, 1998²⁹).

3. Generalidades del sistema CRISPR/Cas9.

Todos los organismos en los tres reinos de la vida (eucariontes, bacteria y arquea) son blancos potenciales para la invasión por elementos genéticos móviles como virus, plásmidos y transposones, los cuales requieren la invasión de un hospedero para su proliferación. No obstante,

hay una gran variedad de sistemas de defensa ante la transferencia horizontal de genes que ha evolucionado en los huéspedes potenciales, ya sean procariontes o eucariontes³⁰.

Uno de estos sistemas de defensa, es el sistema CRISPR (Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*), una clase de DNA repetitivo que se ha identificado en 88% de los genomas de arquea y 46% de los genomas de bacteria. Adyacentes a estos repetidos CRISPR y espaciadores, existe un conjunto de genes conservados CRISPR-associated, o *cas* que codifican para proteínas Cas. Este sistema se basa en el reconocimiento de fragmentos extracromosomales que interactúan con las secuencias CRISPR para proteger al huésped de material genético exógeno. Se ha revelado que CRISPR-Cas es un sistema de defensa procarionte que conduce a: la adquisición de inmunidad por la integración de nuevos espaciadores CRISPR, interfiere en la proliferación de elementos genéticos móviles por la interacción con RNA pequeños y transfiere el nuevo set de espaciadores CRISPR a la siguiente generación^{30,31}.

En el mecanismo CRISPR-Cas pueden distinguirse 3 diferentes etapas funcionales: i) Adaptación CRISPR, el reconocimiento de DNA extraño por proteínas Cas y/o proteínas del hospedero, así como el subsecuente procesamiento e integración en el locus cromosomal CRISPR; ii) Expresión del CRISPR RNA (crRNA) por la transcripción del poli-espaciador precursor del crRNA (pre-crRNA) al que se le une complementariamente el *trans-activating crRNA* (tracrRNA) formando un dúplex de RNA que es procesado por la ribonucleasa RNase III para formar un híbrido crRNA/tracrRNA que actuará como secuencia guía al unirse a un complejo de proteínas Cas y iii) Interferencia CRISPR, que consiste en la degradación del DNA blanco por la proteína Cas³⁰.

El sistema CRISPR/Cas se ha agrupado en tres tipos (I-III) con diversos subtipos cada uno, basándose en los genes *cas* que poseen y el modo de acción de ellos. A pesar de dicha diversidad de genes *cas* y de los organismos que poseen CRISPRs, los loci están generalmente compuestos por múltiples secuencias repetidas que van de 21 a 48 pb, separadas por secuencias espaciadoras variables de 26 a 72 pb, con genes *cas* localizados adyacentes al locus CRISPR³¹.

En lo que se refiere a los productos de los genes *cas*, del sistema CRISPR tipo II, el cual es característico de *Streptococcus piogenes*, la proteína Cas9 juega un papel importante como componente activo del sistema inmune bacteriano; ésta, consta de dos dominios endonucleasa, HNH y RuvC, que cortan ácidos nucleicos. Por su parte, las proteínas Cas1, Cas2 y Cns2 funcionan en la adquisición de nuevos espaciadores provenientes del DNA invasor³². Este sistema se explica más a detalle en la figura 7.

La unión de la proteína Cas9 con el sitio blanco requiere de una presecuencia PAM (*protospacer adjacent motif*), la cual funciona como un anclaje molecular de dicha proteína; así como del crRNA, el cual reconoce a la secuencia de DNA invasor e interactúa con Cas9 para guiarla a dicho blanco. Una vez que Cas9 se une al sitio blanco, ésta corta el DNA tres pares de bases río arriba del sitio PAM. Los dos dominios HNH y RuvC cortan respectivamente las cadenas complementaria y no complementaria, del DNA blanco, creando extremos romos³².

A partir de todo lo que se ha descubierto desde el 2005 sobre CRISPR, sus componentes y su función, ha permitido que la implementación de esta tecnología facilite la modificación del genoma sitio-específica en una amplia variedad de organismos con una facilidad y finura sin precedente. El sistema consiste en el empleo de la endonucleasa bacteriana Cas9 y un pequeño RNA guía quimérico (sgRNA) de 80nt que dirige a la Cas9 a su blanco genómico localizado en el extremo 5' de un PAM: NGG^{33,34}.

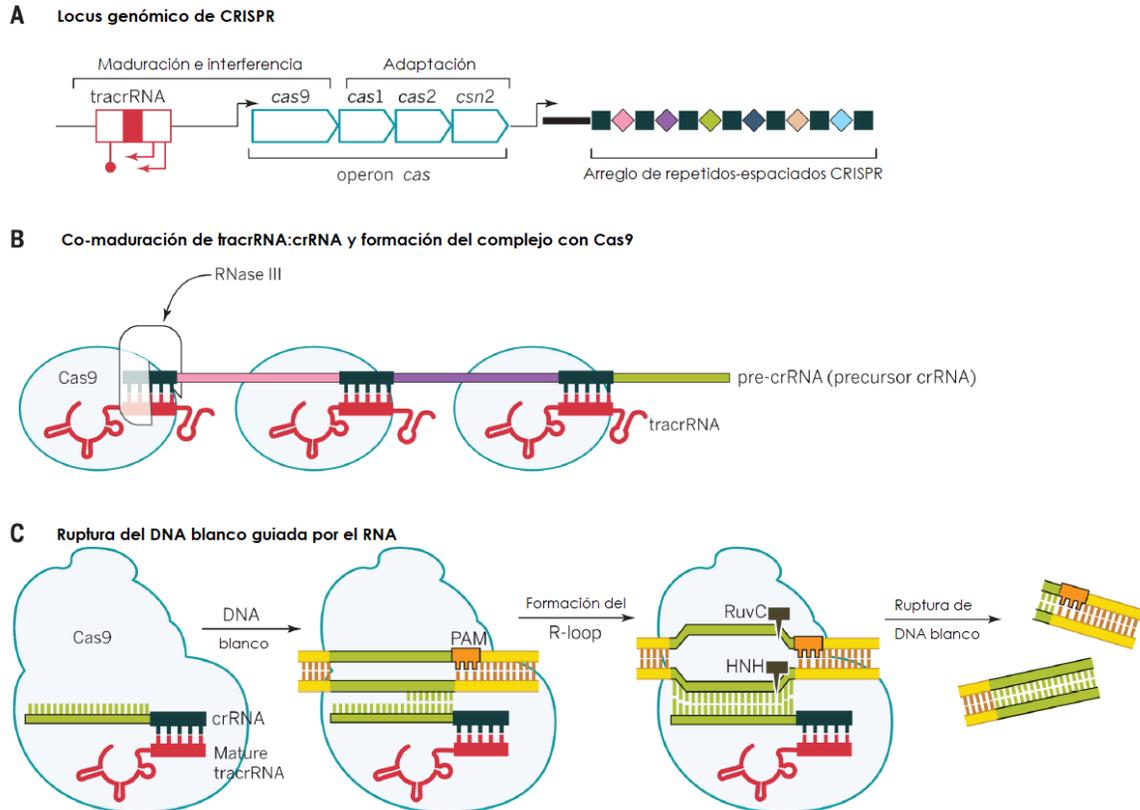


Figura 7. Composición y funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9 tipo II. El funcionamiento del sistema tipo II de *S. pyogenes* se muestra como ejemplo. En A se muestra el operón del gen *Cas* con el tracrRNA y el arreglo de secuencias CRISPR. B. La defensa antiviral requiere de la expresión del crRNA, el cual se sintetiza inicialmente como un precursor (pre-crRNA) que al unirse el tracrRNA permite su procesamiento post-transcripcional para su maduración. La ribonucleasa III (RNaseIII) corta los híbridos tracrRNA:crRNA. C. El híbrido maduro tracrRNA:crRNA forma un r-loop y dirige a la Cas9 para la ruptura del DNA blanco. Modificado de Doudna, 2014³⁵.

Adicionalmente, la tecnología CRISPR-Cas9 se ha desarrollado más allá de su uso para el corte y edición de genomas. Entre otras aplicaciones, ha surgido como una herramienta poderosa en la regulación de genes secuencia-específica mediante la activación o la represión de la transcripción en diversos organismos. Para ello se ha modificado a la proteína Cas9 eliminando su actividad endonucleasa, razón por la cual se ha denominado dCas9 (dead-Cas9). A ésta, además, se le han fusionado dominios activadores o represores de la transcripción. Lo anterior, sin perder su capacidad de unión tanto al DNA blanco como al sgRNA.

Así es como la proteína dCas9 se ha consolidado como una plataforma de unión a DNA guiada por una cadena de RNA secuencia-específica y que permite reprimir o activar la transcripción de genes de interés^{33,34,36}.

ANTECEDENTES

El uso del sistema CRISPR empleado para la activación transcripcional mediada por dCas9 ha comenzado a ser probado en los últimos años en levadura, ratón, humano, y *Drosophila*. Para este caso en particular, la activación transcripcional mediada por dCas9, solo se había probado *in vitro* en cultivos celulares, hasta que en el 2015, el grupo de Norbert Perrimon de la Escuela Médica de Harvard aplicó de forma robusta *in vivo* en *Drosophila* mediante el sistema dCas9-VPR, en donde la proteína Cas9 se ha modificado en 4 sitios (D10A, H839A, H840A y N863A) para atenuar su actividad nucleasa sin perder su afinidad al DNA o a los sgRNA³⁷. Adicionalmente, a la dCas9 se le ha fusionado un activador quimérico tripartita, compuesto por los dominios VP64, p65 y Rta; éstos, provenientes de dominios fuertemente activadores de la transcripción: el dominio del tetrámero transactivador del virus del Herpes, la subunidad activadora del factor de transcripción NF-kappaB y el dominio transactivador del virus de Epstein-Barr, respectivamente^{38,39}. Estos dominios mimetizan el proceso natural cooperativo de reclutamiento de factores de transcripción y la activan, de acuerdo al sitio donde la dCas9 se encuentre localizada.

Este experimento sentó las bases para demostrar que este sistema puede ser empleado para activar la expresión de genes blanco y causar fenotipos dominantes *in vivo* en un animal multicelular, como lo es *Drosophila melanogaster*. Así como demostró que es suficiente un sgRNA sencillo corriente arriba del inicio de la transcripción para activar en altos niveles la transcripción del gen de interés, aunque se pueden emplear simultáneamente varios sgRNA por gen blanco, recomendando el plásmido pCFD4 para la expresión en tándem de 2 sgRNA. También demostró que se puede acoplar el sistema dCas9-VPR para la activación dirigida sitio-específica mediante Gal4-UAS. Lo descrito anteriormente permite proponer que la activación transcripcional empleando dCas9 -VPR ofrece una técnica simple y general para una variedad de estudios de sobreexpresión⁴⁰.

Por lo tanto, a partir de estos descubrimientos, en el presente trabajo propusimos dirigir el sistema CRISPR/Cas9 a regiones heterocromáticas *in vivo* y forzarlas a la activación transcripcional para provocar su posterior cambio a eucromatina. Así, basándose en lo planteado anteriormente, el sistema CRISPR/Cas9 funcionaría de acuerdo al esquema de la siguiente figura (8).

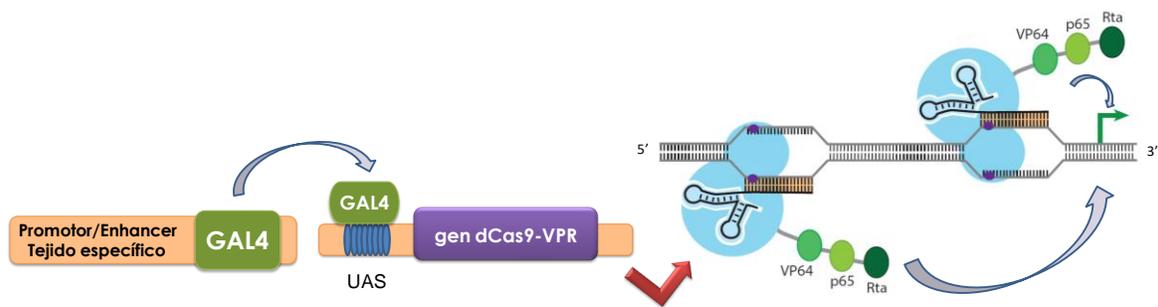


Figura 8. Empleo del sistema CRISPR/Cas9 para la activación transcripcional mediante Gal4-UAS. El sistema contempla la expresión constitutiva y en tándem de los sgRNA dirigidos al blanco de interés; por otro lado, coloca a la proteína dCas9-VPR bajo el control del sistema de levadura Gal4-UAS, en el que la dCas9 es colocada bajo una secuencia de activación río arriba a la que se unirá la proteína Gal4 controlada a su vez por un promotor o *enhancer* sitio específico, para dirigir la acción del sistema CRISPR/Cas9 en los tejidos que se desee.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe discrepancia sobre la relación entre la transcripción y el estado en que se encuentra la cromatina. Por una parte, se ha postulado que la transcripción está determinada y regulada por modificaciones en la estructura de la cromatina; es decir, que la transcripción del DNA es favorecida cuando se encuentra en dominios de eucromatina o heterocromatina facultativa y es reprimida cuando el DNA se encuentra en dominios de heterocromatina constitutiva. Sin embargo, también se ha sugerido que la transcripción de genes determina la conformación de la cromatina, debido a que también se ha encontrado que activadores transcripcionales son capaces de reconocer una secuencia específica en el DNA aunque esté inmersa en heterocromatina y reclutar a los factores que harán a la cromatina accesible a la maquinaria de transcripción. Por lo que se pretende aportar información en esta segunda vertiente, mediante la respuesta a las siguientes interrogantes: ¿Es posible activar la transcripción de genes que se sabe que se encuentran altamente regulados y localizados en regiones de heterocromatina facultativa y constitutiva en *Drosophila melanogaster*? ¿Qué consecuencias tendrá la activación transcripcional de regiones heterocromáticas en el organismo de estudio? De ser así, ¿Ese efecto sugeriría el cambio en la estructura de la heterocromatina a eucromatina?

HIPÓTESIS

El empleo de un activador artificial de la transcripción dirigido a regiones blanco localizadas en heterocromatina constitutiva o facultativa provocará la activación de la transcripción de las mismas de forma ectópica y por consecuencia determinará la estructura de la cromatina, convirtiendo dichas regiones en eucromatina.

OBJETIVO

Inducir la activación transcripcional ectópica en regiones de heterocromatina constitutiva y heterocromatina facultativa y evaluar sus efectos *in vivo*.

Objetivos particulares

1. Inducir artificialmente la activación de la transcripción, en las regiones heterocromáticas seleccionadas.
2. Analizar la presencia de los transcritos obtenidos en diferentes momentos del desarrollo y en diferentes tipos celulares.
3. Determinar si la activación de la transcripción genera un fenotipo dominante en los diferentes tipos celulares seleccionados.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- ✳ Para montar el sistema CRISPR/Cas9 para la activación de la transcripción en genes heterocromáticos, se generaron las líneas de moscas transgénicas que expresaran constitutivamente a los sgRNA que reconocerían a los sitios blanco, tanto del elemento TAHRE de heterocromatina constitutiva, como del gen *Ubx* de heterocromatina facultativa, las cuales se cruzaron con la línea de mosca que contenía a UAS:dCas9-VPR y finalmente con las moscas driver-Gal4, para obtener a la línea con todos los componentes del sistema.

- ✳ Para establecer los patrones de expresión ectópica de *Ubx* se disectaron los discos imagales de ala y ojo-antena de las moscas bajo la acción de CRISPR/Cas9 y se realizó una inmunotinción, utilizando un anticuerpo que reconoce al producto de *Ubx* para observarlos usando el microscopio confocal.

- ✳ Para determinar si se produjeron variaciones en el fenotipo como producto de la activación transcripcional de *Ubx*, se disectaron alas y antenas de organismos adultos y se observaron en el microscopio.

- ✳ Para evaluar la activación transcripcional de *Ubx* y TAHRE mediada por CRISPR/Cas9, se realizó qRT-PCR comparando a las líneas mutantes que cuentan con todos los componentes del sistema con las líneas parentales que no presentan activación transcripcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño de sgRNA.

Para los dos tipos de heterocromatina que estudiamos, se seleccionaron secuencias de 20 nucleótidos que se fusionarían a las cadenas de RNA del sistema CRISPR para dirigirlo al genoma de la mosca. Estas secuencias se localizan río arriba del inicio de la transcripción y poseen de forma adyacente a un sitio PAM (NGG) en posición 3'.

Con respecto al gen *Ubx*, que es nuestro blanco como heterocromatina facultativa, los sitios a los cuales se dirigieron los sgRNA se localizan a -393pb y -729pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS), como se muestra en la figura 9, dichas secuencias (empleadas en sentido y antisentido, respectivamente), son:

5'-CCATATTCTAGCACAAAGAT-3'

5'-TTAAAAACGAATTATAATAT-3'

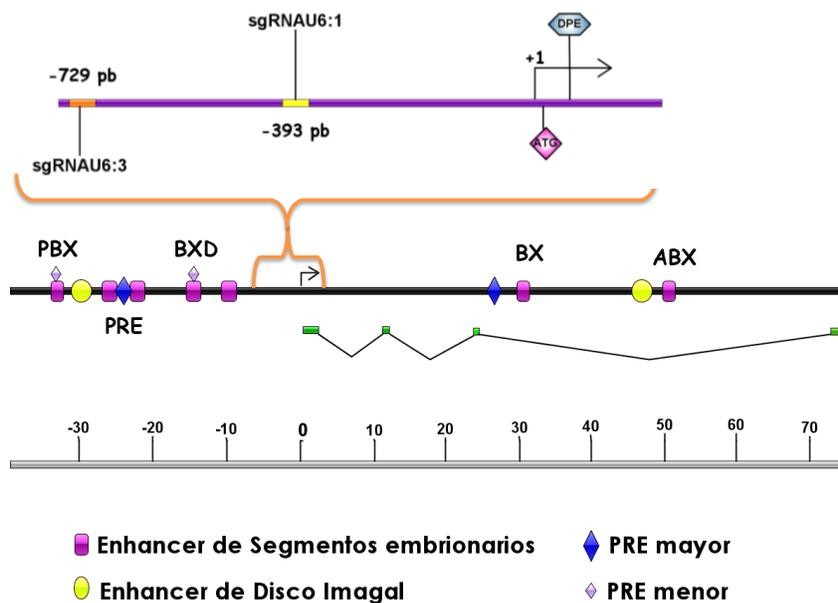


Figura 9. Mapa genómico de *Ubx*. De arriba a abajo, se muestra la región en la que se localizan las secuencias a las que se dirigieron los sgRNA, río arriba del inicio de la transcripción; abajo se muestra el esquema completo del gen *Ubx*, con la región del PRE y enhancers correspondientes del gen. (Imagen modificada de Pirrota V., 1997⁴¹)

Para el caso del retrotransposón TAHRE, localizado en heterocromatina constitutiva, las secuencias blanco empleadas se localizaron a -167 pb y -503 pb río arriba del TSS, en la región 5'UTR. Las secuencias, en sentido y antisentido, respectivamente, son:

5'-AAGCTGCCGCCATAACCAAA-3'

5'-CATCCACAATTTATTTGCC-3'

El esquema se representa en la figura 10.

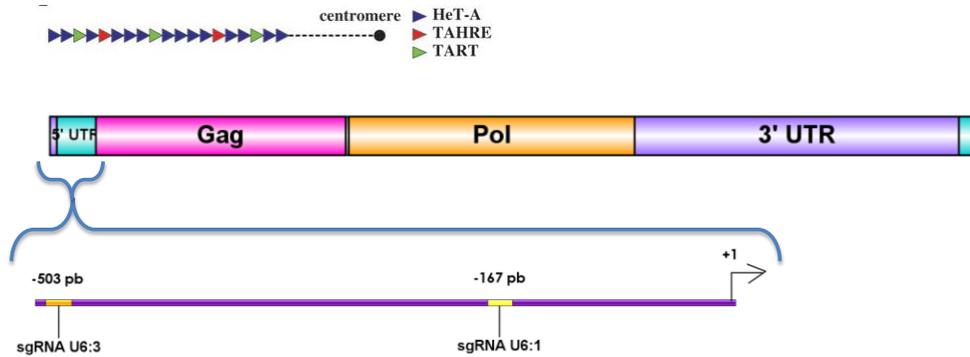


Figura 10. Esquema del elemento TAHRE. Entre la región telomérica en donde se encuentran los retrotransposones, se localiza inmerso el elemento TAHRE. Se muestran las regiones que codifican para las proteínas Gag y Pol (de color rosa y naranja respectivamente), así como los extremos 5' UTR y 3' UTR. La región a la cual se dirigieron los sgRNA se localizó dentro del extremo 5' UTR. (Imagen modificada de Shpiz, 2007²⁰)

2. Clonación en Vector de expresión de sgRNA.

Para la expresión del sgRNA en la mosca, se partió del uso del plásmido pCFD4-U6:1-U6:3 (Addgene® plasmid #49411. Tandem expression vector), el cual es un vector de expresión en tándem de sgRNA para su uso con el sistema CRISPR/Cas9 en *Drosophila melanogaster*. Este vector, contiene las secuencias de los promotores U6:1 y U6:3, así como la secuencia necesaria para formar el core del tallo-asa de los sgRNA que posteriormente será reconocida por la dCas9 una vez que el sistema esté montado en la mosca; así mismo, posee una región de resistencia a ampicilina, además del marcador de ojos vermilion y un sitio attB; éstos últimos, le permitirán la inserción del plásmido al genoma de forma sitio-específica y rastreable por el color de ojos. El esquema del plásmido se presenta en la figura 11A.

A partir de las secuencias blanco elegidas, se diseñaron los oligonucleótidos de acuerdo al protocolo "Cloning tandem gRNA expression vectors with pCFD4" descrito por Phillip Port, de la división de señalización y genómica funcional del Centro de investigaciones en cáncer en Heidelberg, Alemania, en la página www.crisprflydesign.org.

Dicho protocolo se basa en la introducción de las secuencias de interés en pCFD4 mediante el método de Gibson Assembly, el cual se basa en la unión de fragmentos de DNA en una sola reacción isotérmica, es decir que emplea tres actividades enzimáticas en un mismo tubo de reacción y a una misma temperatura; esto, sin importar el largo de los fragmentos o la compatibilidad de sus extremos⁴². Para ello usa una 5' exonucleasa que elimina las secuencias 5' finales en el DNA de doble cadena, dejando expuesta la secuencia complementaria 3' para ser reconocida y alinearse con los fragmentos a integrar, posteriormente una DNA polimerasa rellena los espacios vacíos entre las regiones alineadas y finalmente, una ligasa de DNA sella el corte y une covalentemente los fragmentos de DNA entre sí.

Se procedió a diseñar los oligonucleótidos que incluyeran parte de los promotores U6-1 y U6-3, así como la secuencia del core del sgRNA para ser introducidos al vector, ambos flanqueando a las 2 secuencias de 20 nucleótidos de *Ubx* o TAHRE, según fuera el caso, esto se esquematiza en la figura 11B. Los oligonucleótidos empleados se presentan en la tabla 2 con el código de colores que se presenta en la figura 11B.

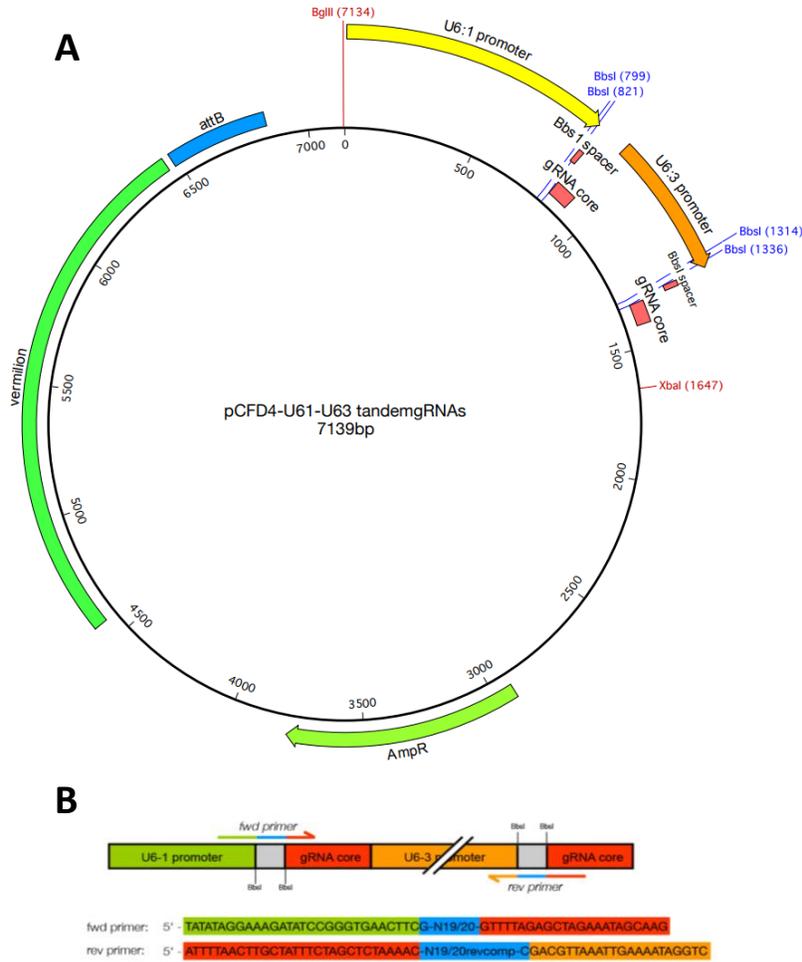


Figura 11 A. Mapa del plásmido pCFD4-U6:1-U6:3tandemgRNAs, en el cual se pueden observar sus componentes, la región de promotores U6:1 y U6:3, un espacio para la inserción de los 20 nucleótidos de las secuencias de interés, el core del sgRNA que será reconocido por la dCas9, el marcador de resistencia a ampicilina (AmpR), así como el marcador de ojos vermilion y el sitio attB. B. Diseño de los oligonucleótidos con los que se insertarán los 20 nucleótidos de las secuencias de interés al plásmido. Dichas secuencias están flanqueadas por parte del promotor U6-1 o U6-3, así como de parte de la secuencia del core del sgRNA.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para construcción de los sgRNA.

TAHRE	Fwd	5'-TATATAGGAAAGATATCCGGGTGAACTTCAGCTGCCGCCATAACCAAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'
	Rev	5'-ATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCATCCACAATTTATTTGCCGACGTTAAATTGAAAATAGGTC-3'
Ubx	Fwd	5'-TATATAGGAAAGATATCCGGGTGAACTTCCATATTCTAGCACAAGATTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3'
	Rev	5'-ATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCTAAAACGAATTATAATATGACGTTAAATTGAAAATAGGTC-3'

A partir de los anteriores oligonucleótidos, se realizó la reacción de PCR usando como templado al plásmido pCFD4, con una temperatura de alineamiento de 60°C. Se purificaron las bandas de DNA de 600pb en un gel de agarosa al 1% con QIAEX II® Gel Extraction Kit de QIAGEN.

El plásmido a su vez, fue digerido con la enzima de restricción BbsI con una incubación de 3 h a 37°C, seguido de la purificación en gel de agarosa 1 % de las bandas de DNA de 6.4 Kb que correspondían al vector linealizado, para ello se empleó el mismo kit empleado para la purificación de los productos de PCR.

Ambos productos purificados se usaron posteriormente para la clonación del pCFD4. Para introducir las secuencias de oligonucleótidos al plásmido, se ensamblaron con el kit Gibson Assembly® Master Mix de NEB. La cantidad empleada de fragmentos, se calculó en base a la cantidad de vector y la fórmula: $\text{pmol} = (\text{peso en ng}) \times 1000 / (\text{pares de bases}) (650 \text{ Daltons})$; cuidando que la cantidad de fragmentos en picomoles se emplee en una proporción 3 veces mayor a la cantidad de vector en picomoles y que la suma de ambos, para la reacción de ensamblaje, vaya en un rango de 0.02-0.5 pmol. Además de que la cantidad de vector, para una eficiencia óptima, estuviera en el rango entre 50-100 ng. La reacción se incubó a 50 °C durante 60 min.

Una vez obtenidas las construcciones, se transformaron bacterias quimiocompetentes obtenidas previamente mediante el protocolo de preparación de *E. coli* competentes usando CaCl_2 ⁵⁶. Dichas bacterias se sembraron en placas de agar LB con ampicilina a 100 µg/mL y de las colonias que adquirieron la resistencia, se seleccionaron 6 para TAHRE y 6 para *Ubx* y se extrajo el DNA plasmídico empleándose el kit QIAGEN® Plasmid Midi Kit.

Se procedió a digerir las construcciones con la enzima BbsI, así como con las enzimas XbaI y BglII, para corroborar que el sitio de corte de BbsI se perdió, más no el de las otras enzimas, que producirían un fragmento de tamaño conocido (1.6 Kb). De las muestras positivas a dicha prueba, se realizó PCR de colonia para corroborar ahora la presencia de los insertos de interés, para tal efecto, se emplearon los oligonucleótidos que se indican a continuación (en dirección 5'-3'): TAHRE: sentido, GGTGAACCTCAAGCTGCCGC, antisentido, TTATTTTGCCGACGTTAAAT. *Ubx*: sentido, CCATATTCTAGCACAAAGAT, antisentido, TTAAAACGAATTATAATAT. Una vez reconocidas las muestras presuntamente positivas para la presencia de los insertos, se procedió a su secuenciación para verificar que sí correspondieran con la secuencia de los sgRNA. Para secuenciar, se emplearon los oligonucleótidos anteriormente descritos y adicionalmente, para el caso del inserto de *Ubx*, se usó el oligonucleótido: GACACAGCGGTACGTCCTTCG, el cual permite la secuenciación de ambos sgRNAs presentes en el plásmido pCFD4 en una sola reacción. Las muestras fueron procesadas en la Unidad de Síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM.

3. Obtención de líneas de moscas transgénicas.

Una vez obtenidas las construcciones y verificada la secuencia del vector con los sgRNA integrados, se procedió a obtener suficiente cantidad de plásmido mediante el QIAGEN® Plasmid Midi Kit, siguiendo el protocolo del fabricante, para la microinyección de embriones y la consiguiente obtención de moscas transgénicas que expresen constitutivamente el sgRNA con los fragmentos anteriormente descritos. Dichas moscas fueron producidas por la empresa BestGene Inc® a partir del sistema basado en la integrasa ΦC31 (PhiC31).

4. Balanceo de líneas de moscas.

Para el caso del presente proyecto, se obtuvieron 6 líneas de moscas, 5 que expresan los sgRNA que se dirigen para *Ubx* y 1 línea que expresa los sgRNA dirigidos a TAHRE; todas las líneas se recibieron balanceadas con Curly (CyO), por lo que se recibieron con el genotipo: $gRNA_{Ubx}/CyO; +/-$

y $gRNA_{TAHRE}/CyO;+/-$. Para el rastreo de los transgenes de interés, las moscas fueron balanceadas en el cromosoma 3 mediante la cruce con la línea doble balancer: $W^{1118};sp/CyO;MKRS,Sb/TM6B,Tb,Hu$ para obtener finalmente los genotipos: $gRNA_{Ubx}/CyO;MKRS,Sb/TM6B,Tb,Hu$ y $gRNA_{TAHRE}/CyO;MKRS,Sb/TM6B,Tb,Hu$.

5. Comprobación de la expresión constitutiva de los sgRNA en mosca.

Para corroborar que las moscas transgénicas expresaban los sgRNA, se realizó una prueba por RT-PCR. Para ello se purificó RNA total de moscas transgénicas adultas, de genotipo $gRNA/CyO;+/-$ mediante el empleo de TRIzol® Reagent, a partir de 100 mg de mosca y siguiendo el protocolo del fabricante. Se corroboró que dicho RNA no estuviera degradado, corriendo la muestra en un gel de agarosa; posteriormente, se empleó el RNA aislado para la síntesis de cDNA, por el protocolo para la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen); el cual, emplea 1 µg de RNA total, 0.025 µg/µL de Random Primers, 0.5 µM de dNTPs, 0.025µg/µL de oligo dT, 2 U/µL de RNaseOUT y 10 U/µL de M-MLV Reverse transcriptase. Finalmente, se llevó a cabo la amplificación por PCR punto final del cDNA; los oligonucleótidos empleados en esta reacción, se diseñaron para cada uno de los sgRNA transcritos por los diferentes promotores (U6:1 y U6:3), y que sus secuencias (en dirección 5'-3') se señalan a continuación: TAHRE: sgRNA U6:1 sentido, AAGCTGCCGCCATAACCAAA, antisentido, GCACCGACTCGGTGCCACTT; sgRNA U6:3 sentido, GGCAAATAAATTGTGGATG, antisentido, GCACCGACTCGGTGCCACTT. *Ubx*: sgRNA U6:1 sentido, CCATATTCTAGCACAAAGAT, antisentido, GCACCGACTCGGTGCCACTT; sgRNA U6:3 sentido, ATATTATAATTCGTTTTTAA, antisentido, GCACCGACTCGGTGCCACTT. Cabe mencionar que para todos los casos la secuencia del oligonucleótido en antisentido es la misma ya que la cadena de sgRNA no cambia, únicamente cambia la secuencia blanco unida a ella.

Para el caso de *Ubx*, además, se purificó DNA genómico mediante el protocolo de fenol-cloroformo con el fin de verificar la presencia de la secuencia correspondiente al sgRNA U6:3.

Para dicho protocolo se trituraron 50 moscas en 1mL de douncing buffer (0.15 M NaCl, 0.01 M Tris pH 8.0, 0.005 M EDTA pH 8.0, 0.2 % IGEPAL) con un pistilo, suavemente. Se filtró el homogenizado a través de fibra de poliéster en una jeringa de 3 mL, se recolectó el filtrado y se centrifugó a 13000 rpm, el pellet se resuspendió en 100 µL de douncing buffer y se agregaron 300 µL de buffer de lisis (0.3 M NaCl, 0.03 M Tris pH 8.0, 0.005 M EDTA pH 8.0), mezclando con vortex durante 30 segundos. Se agregó a la mezcla 400 µL de fenol, se mezcló y centrifugó 5 min a 12500 rpm. Al sobrenadante se le agregó nuevamente 400 µL de fenol más 400 µL de cloroformo y se mezcló y centrifugó 5 min 12500rpm, este procedimiento se repitió tres veces para el sobrenadante obtenido. Finalmente se agregó al sobrenadante 400 µL de cloroformo, se mezcló y centrifugó. El sobrenadante obtenido contiene al DNA, el cual se precipitó durante toda la noche a -20 °C con acetato de sodio 3 M pH 5.2 y etanol absoluto. Finalmente se centrifugó la muestra 5 min a 12500 rpm, se lavó con etanol al 70 % dos veces, 5 min a 12500 rpm, se dejó secar 20 min a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió el DNA en H₂O inyectable.

Cuando se realizó la reacción de PCR para DNA genómico, se emplearon los mismos oligonucleótidos anteriormente descritos para el cDNA de *Ubx* U6-1 y U6-3.

6. Cruzas de líneas de moscas.

Se realizaron las cruzas para obtener la línea de mosca que expresara sgRNA, y la proteína dCas9 bajo el control del sistema Gal4-UAS. Para ello, las moscas transgénicas ya balanceadas, de

genotipo *gRNA/CyO;MKRS,Sb/TM6B,Tb,Hu* se cruzaron con la línea de moscas con el gen de la proteína dCas9-VPR unida a una UAS: *W;If/CyO;UAS:dCas9-VPR/TM6B,Tb,Hu*, línea que fue donada por Norbert Perrimon del Departamento de Genética y el Instituto Médico Howard Hughes, de la Escuela Médica de Harvard, en Boston, Massachusetts.

Se obtendrían las líneas de mosca con genotipo: *gRNA/CyO;UAS:dCas9-VPR/TM6B,Tb,Hu*, con la secuencia de sgRNA dirigido al elemento TAHRE o al gen *Ubx*, según fuera el caso.

Una vez obtenidas las líneas con dicho genotipo, éstas serían el punto de partida para las últimas cruza subsecuentes, que nos ayudarían a dirigir la expresión tejido-específica en la mosca, dependiendo lo que estudiaríamos. Esto, gracias al sistema UAS-GAL4.

Entre los drivers-GAL4 empleados, se decidió usar la línea de moscas γ^1w^* ; *Act5C-GAL4/CyO;+/+* obtenida del Bloomington Stock Center, con número 4414. Esta línea fue empleada para dirigir la expresión de la proteína dCas9 de forma ubicua en la mosca, dado que contiene a la proteína GAL4 bajo el promotor de actina (*Act5C*). Cabe mencionar que esta proteína GAL4 reconocerá y se unirá a la secuencia UAS que ocasionará la expresión de la dCas9-VPR. Esta cruce se realizó para ambas líneas de mosca, tanto para *Ubx* como para TAHRE.

También se emplearon las líneas de genotipo *MS1096-GAL4/y;+/+;+/+*, que cuentan con un driver específico para el pouch de disco imagal de ala (*MS1096-GAL4*), para ser cruzada con la línea transgénica para el sgRNA de *Ubx*, al igual que la línea *ap>GFP-GAL4/CyO,Tb;+/+*, la cual también es específica para disco imagal de ala en la región dorsal y que simultáneamente expresa GFP, excluyendo a las células de la membrana peripodial de dicho disco.

7. Ensayo de viabilidad de cruza.

La cruce fue efectuada con 7 hembras con genotipo *gRNA/CyO;UAS:dCas9-VPR/MKRS* y 4 machos con genotipo γ^1w^* ; *Act5C-GAL4/CyO;+/+* a 25 °C por triplicado. Para las moscas resultantes, se realizó un ensayo de viabilidad para determinar si las moscas con genotipo: *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*, eran afectadas en cuanto a viabilidad con respecto a las hermanas con diferente genotipo, como resultado del efecto de la sobreexpresión del elemento TAHRE y el gen *Ubx* de forma ubicua en la mosca. A los 10 días después de iniciada la cruce, se colectaron los especímenes recién eclosionados, diariamente, dividiéndolos en los genotipos correspondientes y contando la cantidad de moscas para cada uno. Una vez que ya no nacieron moscas por vial se detuvo la colecta y a la máxima cantidad de moscas por genotipo se le asignó el 100% esperado, calculando posteriormente los porcentajes para cada genotipo.

8. Análisis de fenotipo de las moscas.

En las líneas obtenidas de la cruce del ensayo de viabilidad, con genotipo *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+* (dirigidas a TAHRE y *Ubx*, respectivamente), se realizó la inspección de las mismas para determinar si ocurrieron cambios en el fenotipo. Dado que en las moscas con el sgRNA dirigido al gen *Ubx*, se observó daño en las alas, se cuantificó la proporción de dichos daños con respecto a las hermanas del mismo genotipo, que no los presentaron. Al observarse daño en alas y antenas, se prepararon los especímenes para realizar el registro gráfico de ambos apéndices.

Para el caso de las alas, se disectaron colocando a las moscas en etanol industrial. Una vez colectadas las alas, se montaron en un portaobjetos con isopropanol, se colocó el cubreobjetos y se procedió a sellar con esmalte.

Las antenas se disectaron, anestesiando a las moscas con CO₂, y con unas pinzas de disección en un vidrio de reloj con etanol industrial, se separaron las cabezas. Estas fueron recolectadas posteriormente y sin etanol, se les agregó 1mL de KOH 10 % y se hirvieron a baño María durante 5 min o cuando las cabezas se precipitasen. Se retiró el KOH y se volvió a colocar en ebullición con 1mL de agua destilada estéril, a fin de eliminar el KOH, durante 5 min después de que comenzó a ebullición. Se removió el agua y se volvió a colocar etanol industrial, en el que finalmente se disectaron las antenas, sobre un portaobjetos. Para montarlas, en dicho portaobjetos se colocaron 20 µL de glicerol al 50 %, y se transfirieron las antenas disectadas. Se colocó un cubreobjetos y se selló la preparación con esmalte.

9. Inmunotinción de discos imaginales.

Para el caso de la línea de *Ubx*, se procedió a analizar la expresión ectópica de *Ubx* en discos imaginales de ala y antena. Las líneas de moscas analizadas fueron: *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*, *gRNA/MS1096-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+* y *gRNA/ap>GFP-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*. Para tal efecto, se emplearon larvas de tercer estadio para realizar la disección de los discos imaginales y así determinar, mediante inmunotinción de los mismos, las regiones donde se producía la expresión ectópica del gen *Ubx* dentro del disco imaginal. Los discos fueron disectados en PBS 1X, fijados por 30 minutos en paraformaldehído al 4 % en PBS a temperatura ambiente en agitación, se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con PBST (PBS 1X y Tritón 0.2 %) y se bloqueó con BBT (PBS 1X, 0.1 % BSA y 250 mM NaCl) a 4 °C durante una hora. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario, que para este caso fue un anticuerpo monoclonal de ratón para *Ubx* (*Ubx* FP3.38; The Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB; dilución 1:50 en BBT) toda la noche. Después de lavar 3 veces por 20 minutos con PBST se prosiguió a añadir el anticuerpo secundario Goat anti-ratón IgG acoplado a Alexa 568 (Invitrogen) dilución 1:200 y DAPI concentración 1 ng/µL y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente protegido de la luz y en agitación. Se realizaron 3 últimos lavados con PBST de 20 minutos cada uno y finalmente se removió el PBST para agregar el medio de montaje y así extraer los discos imaginales para su posterior observación en los microscopios confocales Olympus FV1000 Multi-fotónico Invertido o Upright, equipados con un objetivo UPLSAPO 20X NA:0.75 Y 60X NA:1.1. En la sección de resultados se muestra las proyecciones a máxima intensidad de dichas imágenes.

10. Determinación de la activación transcripcional de las regiones heterocromáticas.

El RNA de las líneas de moscas *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*, tanto para las moscas que contienen el gRNA dirigido para *Ubx* como para TAHRE, fue extraído a partir de organismos adultos y purificado con el protocolo correspondiente al TRIzol® Reagent. Posteriormente se sintetizó cDNA a partir de dichas muestras, de acuerdo al protocolo anteriormente descrito en el numeral 5 de esta sección. De forma preliminar, se comprobó mediante PCR punto final, la presencia de transcritos y si estos habían incrementado con respecto a la línea control que, para este caso, se emplearon a las líneas parentales con genotipo: *gRNA/CyO;UAS:dCas9-VPR/+*, que en ausencia de driver, no expresan a la proteína dCas9.

Para el caso del gen *Ubx* se diseñaron los oligonucleotidos que incluyeran solo a los exones del gen, para probar la activación transcripcional del mismo. Las secuencias de los oligonucleótidos, que dan como resultado un fragmento de 200 pb, fueron, en dirección 5'-3', las siguientes: sentido, GCCCAAACGCGGCCGCCAG y antisentido CTAGCCAGTCTGGTAGAAGT. Por su parte, para

el elemento TAHRE, oligonucleótidos elegidos corresponden a la región del ORF de GAG, de acuerdo a como se han probado en la literatura⁴³. Las secuencias de los oligonucleótidos, para un fragmento de 170 pb de este retrotrasposon, en dirección 5'-3', son: sentido, CTTCCCCTCCGCTCTCATC, antisentido, CCTAGATCTGCATTTGTATTAGTAGCTG. Como gen de referencia se empleó a RP49 (también conocido como *rpl32*, codifica para la proteína ribosomal 49), que es ampliamente usado como control endógeno constitutivo en experimentos de expresión génica en *Drosophila* y como referencia para el análisis por qRT-PCR. Los oligonucleótidos empleados para este caso, fueron (5'-3'): sentido, TCAAGATGACCATCCGCCA, antisentido, GTTCTCTTGAGAACGCAGGC.

Posteriormente, se realizó el experimento de qRT-PCR, para el que se empleó el Roche Real Time PCR LightCycler® 1.5 con LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche) como reactivo de detección. Las reacciones fueron hechas en capilares de 20 µL, que contenían el reactivo SYBR Green I, cDNA en concentración de 25 ng/µL y cada uno de los oligonucleótidos a una concentración de 10pM. Las cantidades empleadas para cada reacción se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 3. Cantidades de reactivos empleadas para la reacción por qRT-PCR en el dispositivo Roche Real Time PCR LightCycler® 1.5. En las columnas se presentan las cantidades empleadas para cada reacción dependiendo el transcrito a estudiar. Se empleó como control a RP49. La última fila presenta la TM a la cual se trabajó el alineamiento.

Reacción	RP49 (µL)	Ubx (µL)	TAHRE (µL)
H ₂ O	5.1	5.1	5.34
Oligonucleótido Fwd	0.2	0.2	0.08
Oligonucleótido Rev	0.2	0.2	0.08
SuperMix	2.0	2.0	2.0
cDNA	2.5	2.5	2.5
Total	10	10	10
TM	60	60	65

Las reacciones se realizaron de la siguiente manera: se llevó a cabo un ciclo de preincubación durante 10 min a 95°C, a continuación 45 ciclos de amplificación, en el que se trabajó 10 segundos de desnaturalización a 95°C, 10 segundos de alineamiento a la TM correspondiente y 18 segundos a 72°C para elongación. Y finalmente un ciclo de enfriamiento a 50°C, 30 seg.

Se realizó un análisis de *melting curve* al final de cada reacción para asegurar la calidad de producto amplificado y que los oligonucleótidos no hubiesen formado dímeros que interfirieran con la cuantificación. El método de ciclo de umbral (*threshold cycle*, C_T) con cuantificación relativa fue empleado para analizar el aumento de cada transcrito. Para ello, los valores determinados fueron normalizados con RP49 para cada preparación de cDNA, y las cantidades relativas de transcritos de las líneas mutantes fueron comparadas con los niveles relativos en las líneas parentales usadas como control. Es decir, que mediante la fórmula de $2^{-\Delta\Delta C_T} = \frac{(C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno}) \text{ muestra A}}{(C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control interno}) \text{ muestra B}}$, se obtuvo el *fold difference*, para el análisis de resultados, que de acuerdo a la fórmula descrita se interpreta como la expresión del gen de interés (*Ubx* o *TAHRE*) relativa con respecto al control interno (RP49) en la muestra tratada comparada con el control no tratado (en este caso, las líneas parentales)⁴⁴.

Tanto para las muestras *Ubx* como *TAHRE* se realizó una curva de control y cada punto de muestreo fue hecho con 3 replicados técnicos. Las muestras a su vez fueron analizadas por triplicado biológico.

RESULTADOS

1. Clonación del vector pCFD4 con los insertos de las secuencias de *Ubx* y TAHRE para el ensamblaje con el sgRNA.

Para la obtención de las líneas transgénicas de mosca que expresen los sgRNA dirigidos ya sea al gen *Ubx* como el retrotransposón TAHRE, se procedió a realizar el armado del vector de expresión al que se le añadieron las secuencias de interés.

De acuerdo con la metodología descrita, el plásmido pCFD4 se digirió con la enzima BbsI y se purificó obteniéndose el vector linearizado con un peso de 6.4 Kb (Figura 12A). Posteriormente, usando dicho plásmido como templado y los oligonucleótidos descritos en la tabla 2 (metodología), se purificaron los insertos de 600 pb (Figura 12B) que contenían nuestras secuencias de interés, tanto para el elemento TAHRE como para el gen *Ubx*.

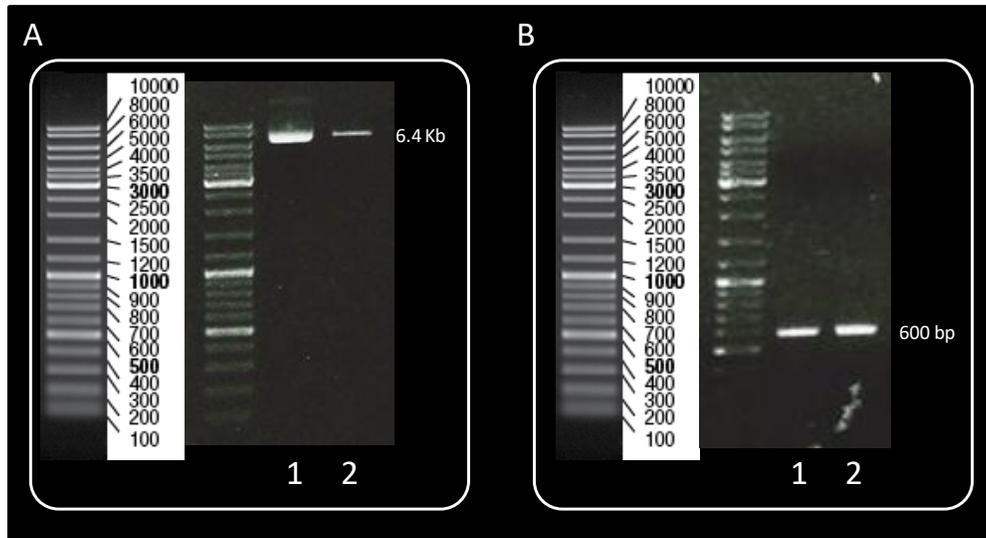


Figura 12. Preparación de plásmido e insertos para la clonación en pCFD4. A) Plásmido superenrollado (1) y digerido con la enzima BbsI (2) con peso de 6.4 Kb. B) Bandas con un peso de 600 pb correspondientes a los insertos para la construcción de los sgRNA dirigidos al elemento TAHRE (1) y al gen *Ubx* (2). Tanto las bandas de los fragmentos como del plásmido digerido fueron purificadas para su posterior ensamblaje.

Una vez realizada la clonación y como producto de la transformación bacteriana, se seleccionaron 12 colonias aisladas tanto para las que contenían las construcciones con el elemento TAHRE como las correspondientes al gen *Ubx*, para revisar que efectivamente adquirieron la secuencia de interés. Inicialmente se purificó la construcción y se hizo una prueba de digestión con las enzimas BbsI y XbaI con BglII. Para la primera enzima, puesto que el sitio de corte se encuentra inmerso entre el término de las secuencias de los promotores y el inicio de las secuencias para el sgRNA dentro del vector, al insertar las secuencias de TAHRE o *Ubx*, dicho corte se debería perder, por lo que de ser positiva la inserción, se esperarí no producir ningún fragmento (Figura 13A y B). Por otro lado, los sitios de corte de XbaI y BglII no son afectados y se mantienen intactos durante la inserción, por lo que el fragmento esperado tendría que presentarse de aproximadamente de 1.6 Kb (Figura 13A y C), por lo que de existir alguna aberración en la inserción, también se descartarían esos plásmidos. Para el caso de las digestiones con la enzima BbsI se esperaba no obtener el

fragmento de 600 pb, mientras que para el caso de las enzimas XbaI y BglII se esperó obtener un fragmento de 1.6 Kb. El resultado se observa en la figura 13.

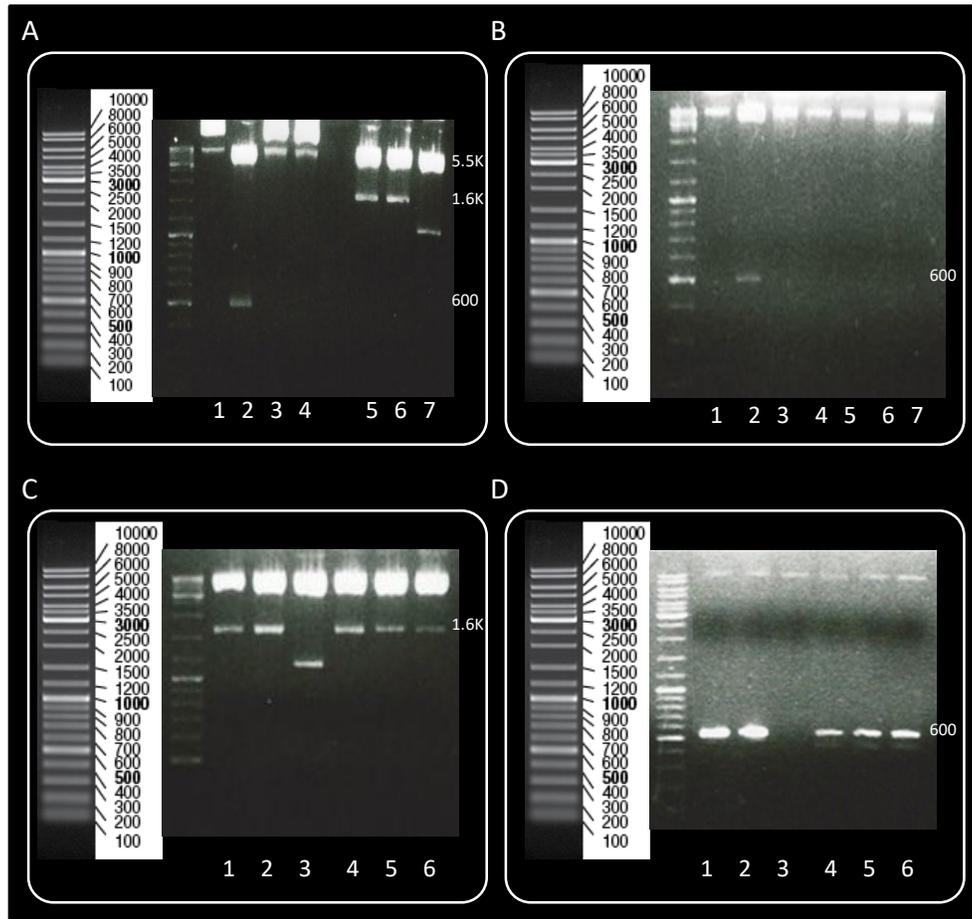


Figura 13. Obtención de las construcciones con los sgRNA dirigidos a TAHRE y *Ubx* y PCR de colonia. A. Digestión de pCFD4 y los plásmidos obtenidos de las colonias *Ubx1* y TAHRE2 con ambas enzimas. Se muestran el vector original pCFD4 sin digerir (1), así como digerido por BbsI (2), en donde se esperaba un corte a 600 pb y digerido por XbaI y BglII, con la generación de una banda de 1.6 Kb (5). Digestión de *Ubx1* con pérdida del sitio de corte de BbsI (3) y digestión con XbaI y BglII, donde el sitio de corte no se pierde (6). Muestra TAHRE2 digerida por BbsI (4) y XbaI con BglII (7), éste último nos hizo descartar la muestra al generar un fragmento de menor longitud de lo esperado. B. Digestiones de otras colonias con la enzima BbsI. Control negativo con pCFD4 sin digerir (1). Digestión del plásmido pCFD4 (2) y muestras TAHRE3 (3), TAHRE4 (4), TAHRE5 (5), *Ubx3* (6) y *Ubx5* (7). Se observa que todas las muestras probadas no son digeridas con BbsI, a diferencia del plásmido original. C. Digestiones con XbaI y BglII de las colonias probadas en B. Se presentan las muestras TAHRE3 (2), TAHRE4 (3), TAHRE5 (4) *Ubx3* (5) y *Ubx5* (6). A excepción de TAHRE4, todas las muestras se digieren correctamente dando como resultado el fragmento con el tamaño esperado, al igual que en el plásmido pCFD4 (1), que se empleó como control positivo. D. PCR de colonia para probar presencia de la secuencia de interés. Se realizó dicha prueba para las colonias que se digirieron satisfactoriamente, probando TAHRE3 (1), TAHRE5 (2), *Ubx1* (4), *Ubx3* (5) y *Ubx5* (6). Se obtuvo un fragmento de 600 pb que coincidía con lo esperado. Como control negativo se empleó el vector original pCFD4 (3), que no contenía las secuencias guías de interés.

Finalmente, basándose en los resultados de las digestiones, se tomaron las muestras TAHRE3, TAHRE5, *Ubx1*, *Ubx3*, *Ubx5* y se realizó PCR, con los oligonucleótidos descritos en la metodología,

para verificar que efectivamente se encontraba el fragmento que correspondiera al inserto, de longitud de 600 pb (Figura 13D). Cabe mencionar que dichos oligonucleótidos se diseñaron tomando en cuenta parte de la secuencia de interés, para verificar su presencia y no solamente de las secuencias aledañas.

Al verificar los resultados con la reacción de PCR, se mandaron a secuenciar los plásmidos de las colonias TAHRE3, TAHRE5, *Ubx1*, *Ubx3*, *Ubx5*, para finalmente elegir las colonias que no presentaran mutaciones en las construcciones, sobre todo en la secuencia de interés y en la cadena de sgRNA. Se eligieron las muestras *Ubx1* y TAHRE3.

2. Prueba de la expresión constitutiva de los sgRNA en las moscas transgénicas, mediante RT-PCR.

Los plásmidos *Ubx1* y TAHRE3 se enviaron a la compañía BestGene Inc® para su microinyección en mosca, una vez recibidas las 6 líneas de moscas transgénicas obtenidas por dicha empresa, se realizaron los experimentos de RT-PCR para corroborar la expresión constitutiva en las moscas de los sgRNA. Se revelaron resultados positivos para la línea *gRNA_{TAHRE}/CyO;+/+*, lo cual corroboró su integración al genoma así como su correcta expresión, como se muestra en la figura 14A. No obstante, para el caso de las 5 líneas recibidas con genotipo *gRNA_{Ubx}/CyO;+/+*, no se obtuvo resultado positivo para la presencia del sgRNA que se encuentra bajo el control del promotor U6:3. Dado este resultado, para determinar si existía un problema en la transcripción de los sgRNA en las líneas de *Ubx* y que el inserto sí se encontraba presente, se realizó el experimento con DNA genómico. Al realizar la reacción de PCR, se encontró positivo solo para el segmento correspondiente al sgRNA asociado al fragmento de 20 nucleótidos que es controlado por el promotor U6:1 pero no para el fragmento controlado por U6:3 (Figura 14B).

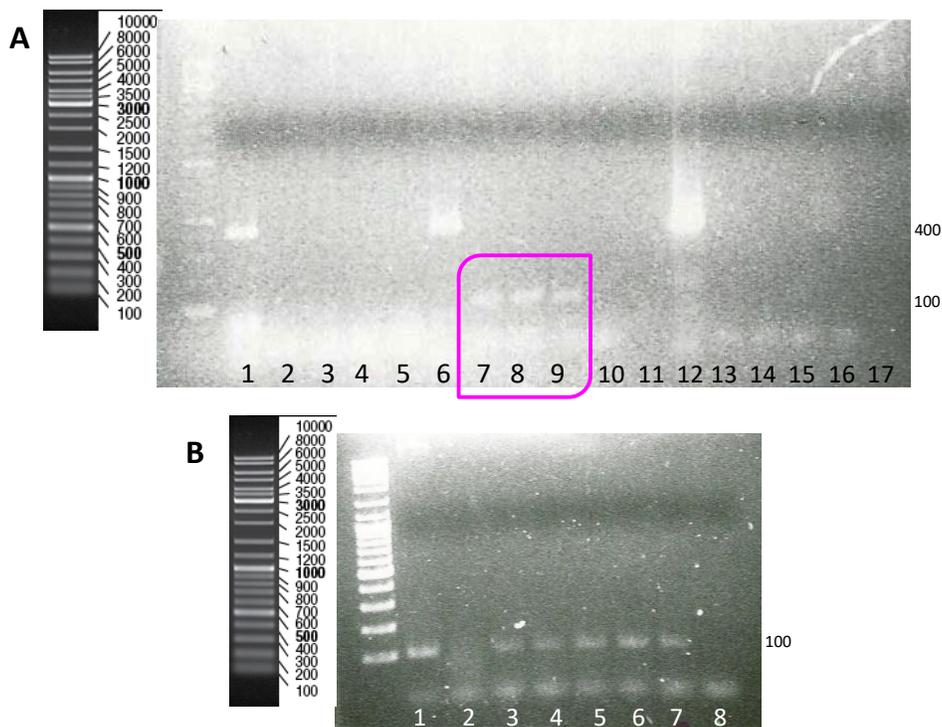


Figura 14. Transcritos obtenidos para las líneas de mosca transgénicas, con genotipo *gRNA/CyO;+/+* y reacción de PCR para las moscas de la línea *sgRNA_{Ubx}*. En la imagen A se muestra la presencia de los productos de RT-PCR de la

línea de mosca TAHRE para los oligonucleótidos de U6:1 (7) y U6:3 (8). Se observa también resultado positivo para el cDNA de la línea *Ubx* M1 con los oligonucleótidos de U6:1 (9). Controles para el cDNA Wildtype (1), mosca TAHRE (6) y *Ubx*M1 (12) con los oligonucleótidos para el transcrito de RP49. Pruebas utilizando los oligonucleótidos para sgRNA_{TAHRE} bajo U6:1 y U6:3, respectivamente con el cDNA de Wt (2 y 3), TAHRE (7 y 8) y control sin muestra (13 y 14). Pruebas con los oligonucleótidos para sgRNA_{Ubx} bajo U6:1 y U6:3, respectivamente para los cDNA Wt (4 y 5), *Ubx* (9 y 10) y control sin muestra (15 y 16). Para 11 y 17, las muestras TAHRE y *Ubx* respectivamente, se procesaron sin añadir los oligonucleótidos, como control negativo. B. Productos de PCR para las líneas de mosca *Ubx* con DNA genómico. Se muestra las cinco líneas de moscas *Ubx* M1-5 (3-7) con las que fue empleado el oligonucleótido U6:1 para determinar la presencia de la secuencia correspondiente al sgRNA en el DNA de la mosca. Se emplearon como control positivo al plásmido de la construcción original con *Ubx* (1) y como controles negativos el DNA de mosca Wild type (2) y la mezcla de PCR sin muestra (8).

3. Efecto en la viabilidad de las líneas sometidas a la activación transcripcional de *Ubx* y TAHRE mediante el sistema CRISPR/dCas9.

Para determinar si el efecto de la activación transcripcional de *Ubx* o TAHRE, ya en su estado de heterocromatina, causaba un efecto mortal, producto de la desregulación de los mismos, se realizó un ensayo de viabilidad de las líneas de mosca producto de la crucea *gRNA/CyO;UAS:dCas9-VPR/TM6B* con el driver de GAL4 bajo el control del promotor de Actina: *Act5C-GAL4/+;+/-*, el cual es un driver que dirige a la expresión y la acción de la proteína dCas9-VPR de forma ubicua, y se comparó la cantidad de moscas eclosionadas que llegaron a etapa adulta con respecto a las líneas hermanas de la misma crucea.

En este experimento, no se observó un efecto de la expresión de la proteína dCas9 y la activación transcripcional producida por esta (demostrada en los siguientes apartados), sobre la supervivencia de las moscas mutantes para *Ubx*, ya que prácticamente la viabilidad fue la misma para todas las líneas hijas provenientes de la crucea referida anteriormente (tabla 4). Además, después de analizar a las moscas adultas, se encontró que para las moscas mutantes de *Ubx* se desarrollaron efectos discretos en el ala (resultados mostrados en las siguientes secciones), en una proporción 37/59 (63%).

Para el caso de las moscas con el sgRNA dirigido al retrotransposón TAHRE, tampoco se obtuvo disminución de la viabilidad en el genotipo de interés, comparándolo con el resultado de las líneas hermanas, tal y como se muestra en la tabla 5.

Tabla 4. Resultados de ensayo de viabilidad para la línea de moscas con el sgRNA dirigido al gen de *Ubx*. Para el caso de viabilidad, se muestra el número de moscas obtenido sobre el número de moscas esperado de acuerdo con la clase más sana de cada crucea. El porcentaje se presenta en paréntesis.

	Viabilidad
<i>gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+</i>	59/59 (100)
<i>gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;MKRS/+</i>	58/59 (98)
<i>Act5C-GAL4/CyO;UAS:dCas9-VPR/+</i>	53/59 (90)
<i>gRNA_{Ubx}/CyO; UAS:dCas9-VPR/+</i>	53/59 (90)
<i>Act5C-GAL4/CyO;MKRS/+</i>	57/59 (97)
<i>gRNA_{Ubx}/CyO; MKRS/+</i>	57/59 (97)

Tabla 5. Resultados de ensayo de viabilidad para la línea de moscas con el sgRNA dirigido al elemento TAHRE. Para el caso de viabilidad, se muestra el número de moscas obtenido sobre el número de moscas esperado de acuerdo con la clase más sana de cada cruce. El porcentaje se presenta en paréntesis.

	Viabilidad
<i>gRNA_{TAHRE}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+</i>	59/84 (70)
<i>gRNA_{TAHRE}/Act5C-GAL4;MKRS/+</i>	84/84 (100)
<i>Act5C-GAL4/CyO;UAS:dCas9-VPR/+</i>	61/84 (73)
<i>gRNA_{TAHRE}/CyO; UAS:dCas9-VPR/+</i>	61/84 (73)
<i>Act5C-GAL4/CyO;MKRS/+</i>	59/84(70)
<i>gRNA_{TAHRE}/CyO; MKRS/+</i>	59/84(70)

4. Incremento en la expresión del gen homeótico *Ubx* de forma ectópica en discos imagales de ala y ojo-antena.

Para observar la región específica en donde se produce el incremento en los transcritos de *Ubx*, se realizaron las inmunotinciones de discos imagales de ala y ojo-antena de las moscas *gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+* de larvas del tercer estadio. En el caso del disco de ojo-antena, en la región del disco de antena se incrementó la presencia de *Ubx* dentro de la región central del mismo, la cual, de acuerdo al mapa de destino de la figura 15, da origen a la parte más distal de la antena, es decir, la arista (Ar) y el antenómero 3 (A3), aunque también se obtuvo una ligera expresión de *Ubx* en la región correspondiente a los antenómeros 1 y 2, como se explicará más adelante en la sección de fenotipos (Figura 17 B’’).

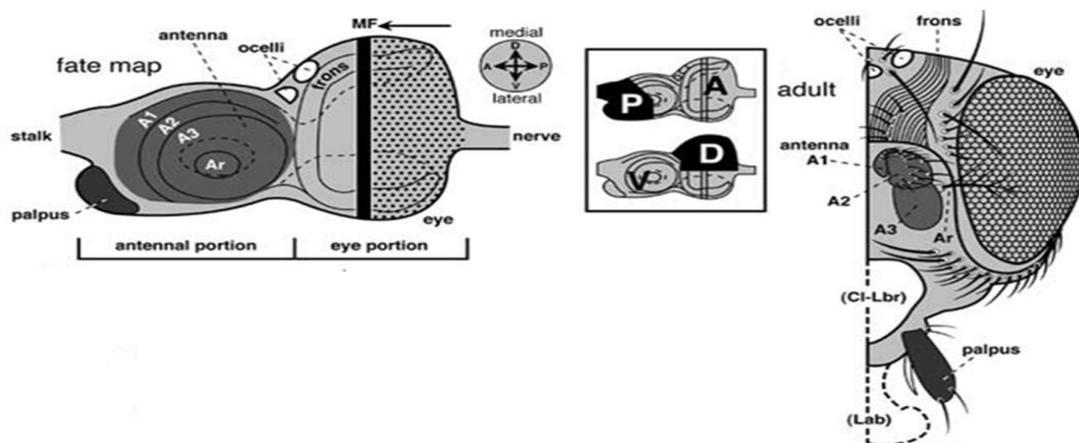


Figura 15. Mapa de destino de las regiones del disco imagal de ojo-antena. Se observa que la región central del disco dará origen a la parte más distal del apéndice, es decir la arista (Ar), y se va dividiendo concéntricamente en las regiones de los antenómeros, del A3 al A1, siendo la más externa la región que dará lugar al antenómero 1, que en antena es el pendicelo que se encuentra más proximal a la cabeza de la mosca. Imagen modificada de Held L. 1996⁵⁷.

Como control negativo, que representa al fenotipo silvestre, sin expresión de *Ubx*, se emplearon las líneas hermanas, con genotipo *gRNA_{Ubx}/CyO;UAS:dCas9-VPR/+* ó *Act5C-GAL4/CyO; UAS:dCas9-VPR/+*. Ambas, por la naturaleza de la cruce y de acuerdo al cuadro de Punnett (ver Anexo), no poseen todos los componentes del sistema CRISPR/Cas9 para la activación transcripcional. La primera, no posee el driver de Act5C-GAL4 para expresar a la proteína dCas9, mientras que la segunda, aunque expresa a la dCas9, no posee los sgRNA necesarios para dirigirla a la secuencia de interés, que en este caso es el gen *Ubx*, por lo tanto, la dCas9 está presente pero no tiene blanco sobre el cual activar la transcripción.

Cabe mencionar que en algunos de los discos de ojo-antena analizados, se observó en la región correspondiente al ojo, de discretas a casi imperceptibles señales de expresión ectópica de *Ubx*; al ser eventos muy aislados, no se realizó la revisión detallada del fenotipo en ojo adulto, ya que sería muy difícil de observar alguna anomalía presente.

En lo que respecta a los discos de ala, en la figura 18 se muestra la expresión de *Ubx* dentro del pouch del disco en la región correspondiente a la parte posterior en los límites de los compartimentos dorsal y ventral del disco. Esto, de acuerdo a los mapas de destino (figura 16) corresponde a la región posterior de lo que será el ala, y en la parte más distal de la misma (el resultado en las alas desarrolladas se presenta en la siguiente sección de resultados). Lo que se observó en los discos, fue que la expresión de *Ubx* se encontró siempre muy focalizada dentro de esa misma región (como se observa en los ejemplos B'', C'' y D'' Figura 18, siendo el ejemplo D'' uno de los más abundantes que se obtuvo en cuanto a expresión de *Ubx*).

Como control positivo podemos observar en la misma figura que los discos de halterio, que son más pequeños que los de ala, (figura 18C' y C'') expresan *Ubx* constitutivamente en todo el disco, ya que es quien permite la formación del halterio posteriormente, reprimiendo el fenotipo de ala. Como se puede observar, la señal de *Ubx* en el halterio es más homogénea en comparación con las señales discretas que se obtuvieron con el driver de actina en el disco de ala.

De igual manera, como control negativo se tomaron a las líneas hermanas *gRNA_{Ubx}/CyO;UAS:dCas9-VPR/+* ó *Act5C-GAL4/CyO; UAS:dCas9-VPR/+*, las cuales no expresaron al gen *Ubx* en el patrón anteriormente descrito, no obstante, cabe aclarar que en la figura 18 (A' y A'') se observa una leve señal de *Ubx* en los discos, proveniente de la membrana peripodial de los mismos, la cual se sabe expresa al gen *Ubx*²⁸.

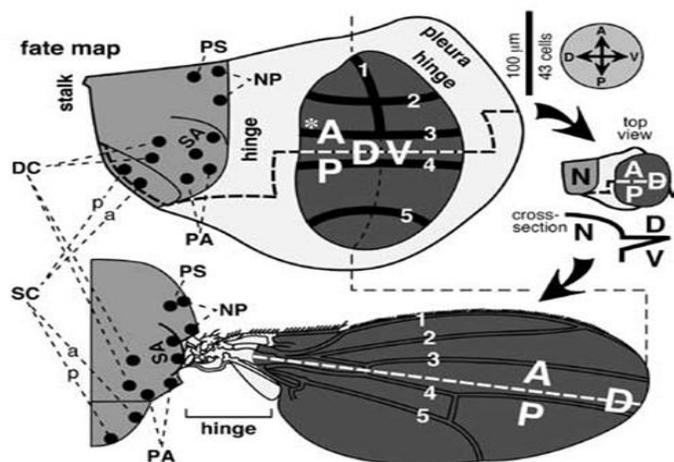


Figura 16. Mapa de destino de las regiones del disco imaginal de ala. Se muestran las divisiones del pouch en el disco, en regiones anterior (A), posterior (P), distal (D) y ventral (V), mientras que las líneas numeradas

corresponden a la región de formación de cada vena del ala, como se tiene en el esquema de ala completa adulta. Imagen modificada de Held L. 1996⁵⁸.

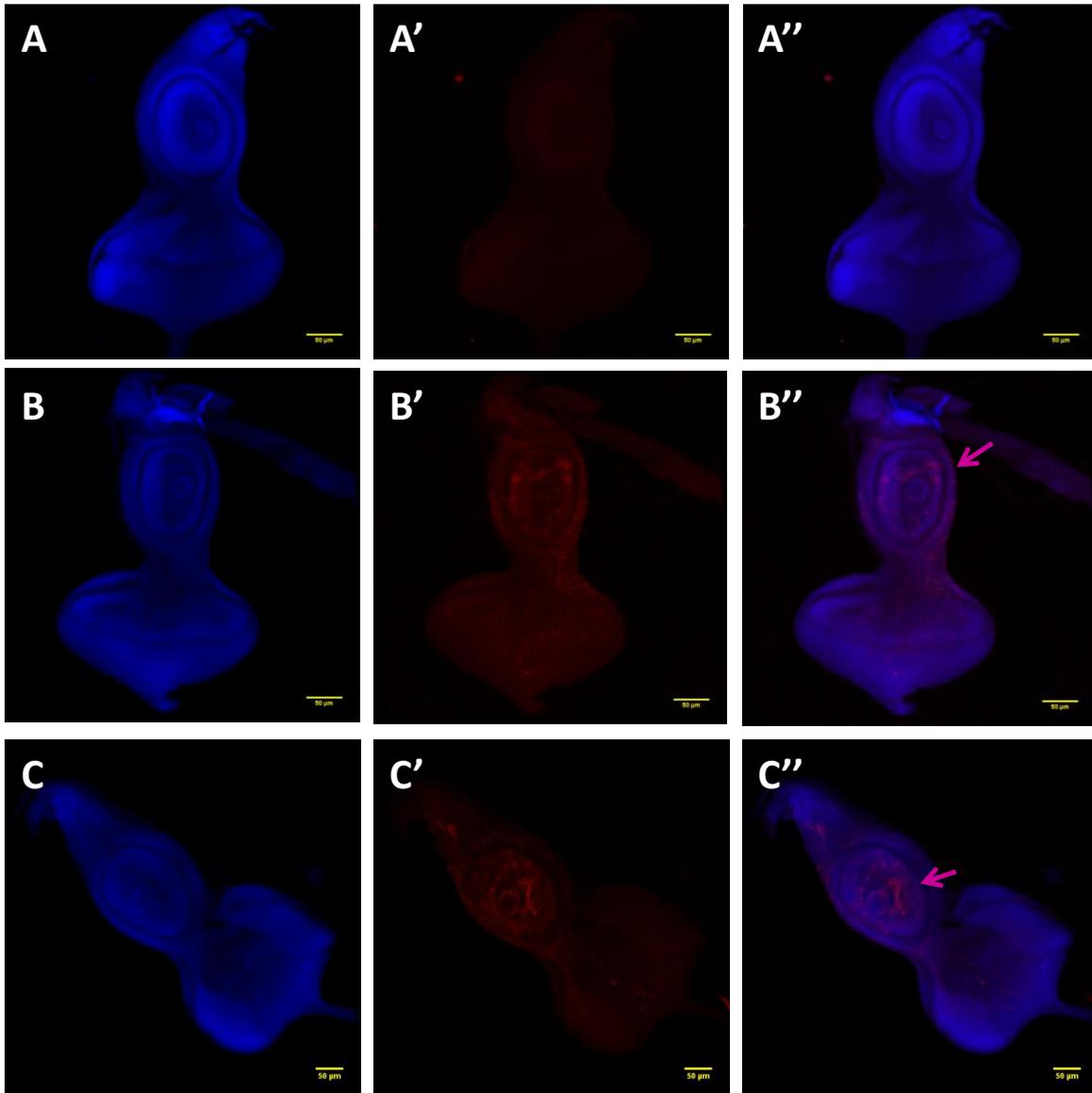


Figura 17. Inmuntinción de discos ojo antena con genotipo $gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+$. En A-A'', se observa fenotipo silvestre en las líneas hermanas, las cuales no poseen el sistema CRISPR/Cas9 completo. En el caso de B-B'' y C-C'' Se puede observar dos ejemplos de la expresión ectópica del gen *Ubx* de la línea mutante $gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+$. Mayoritariamente se observa la expresión de *Ubx* en el disco de antena, en la región de los antenómeros, señalada con la flecha rosa. En B'' se observa la expresión sobretodo en la región del A2 y parte de A1, mientras que en C'' se ve favorecida la expresión en la región del A3. Imágenes tomadas en el microscopio Olympus Confocal invertido, a 20x, y analizadas con el software Fiji ImageJ. La primer columna corresponde a DAPI, la segunda presenta la señal para el anticuerpo contra *Ubx* y en la tercer columna se presenta el merge entre ambos canales.

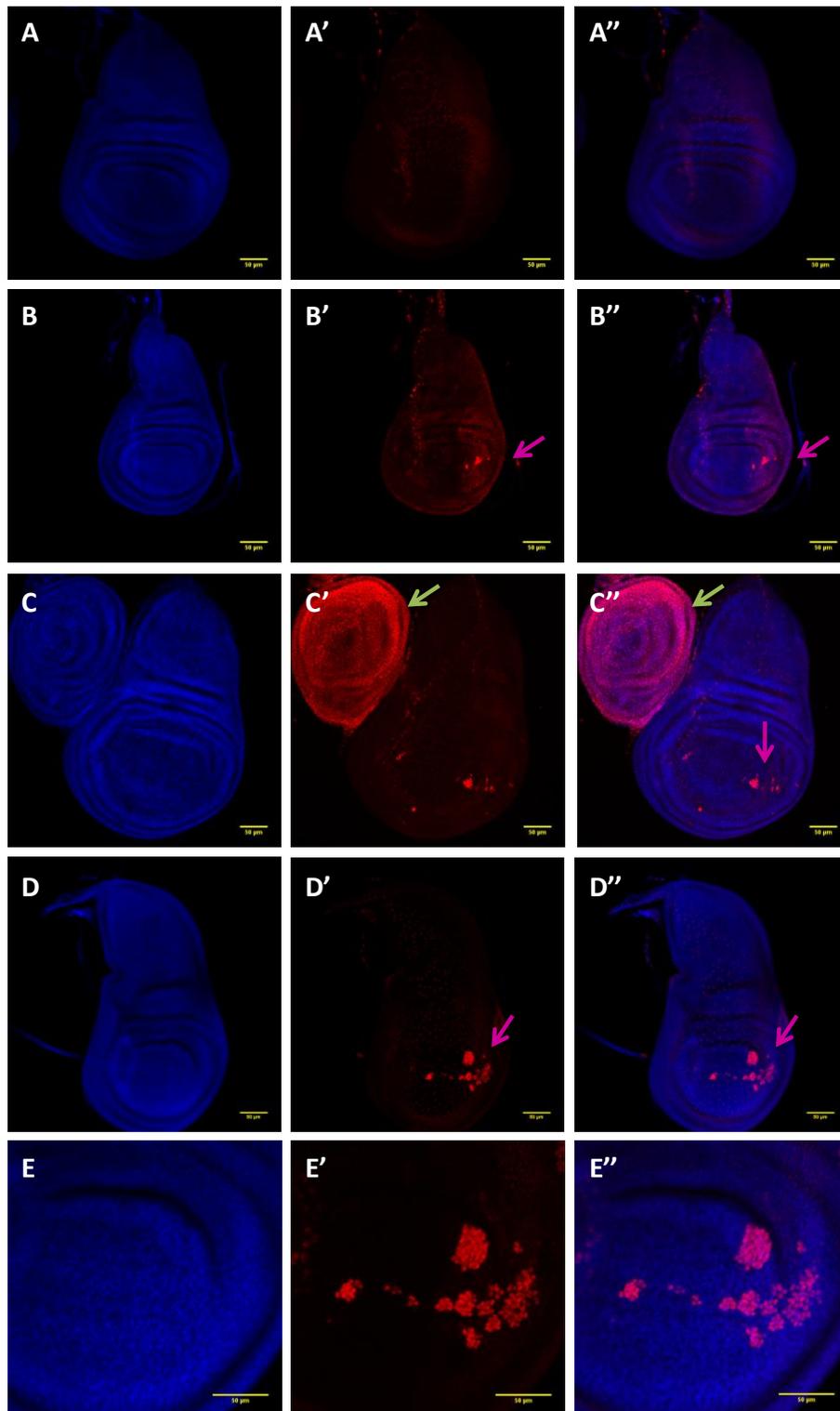


Figura 18. Inmuntinción de discos de ala con genotipo $gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+$. En esta imagen, se puede observar la expresión ectópica del gen *Ubx* de la línea mutante $gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+$ a 20x y 60X. De A-E se muestra el canal para la señal con DAPI; A'-E', se muestra la señal para la expresión de *Ubx* y en A''-E'' se muestra el merge de ambas señales. En A-A'' se muestra el fenotipo

silvestre presente en las líneas hermanas $gRNA_{Ubx}/CyO;UAS:dCas9-VPR/+$ y $Act5C-GAL4/CyO; UAS:dCas9-VPR/+$, como se puede notar, no se observa señal para *Ubx* dentro del disco de ala. B''-D'' se muestran los diferentes niveles de expresión que se obtuvieron de *Ubx* en el disco de ala (flechas rosas), en B''y C'' se puede observar la señal focalizada a la misma región, para D'' se observó una señal con mayor intensidad y mayor despliegue a lo largo del pouch. En E-E'' se observa el aumento a 60X de D-D''. En C'' se puede observar que el disco de halterio (flecha verde) expresa de forma ubicua al gen *Ubx*. Imágenes tomadas en el microscopio Olympus Confocal invertido, y analizadas con el software Fiji ImageJ.

Posteriormente, se empleó MS1096-GAL4, el cual es un driver específico del pouch del disco de ala. Al realizar la inmunotinción de discos de ala con genotipo $MS1096/+;gRNA_{Ubx}/+;UAS:dCas9-VPR/+$, se esperaba que tal vez la expresión de *Ubx* en los mismos se incrementara como producto de dirigir la expresión de la dCas9 de forma sitio-específica en el disco. Como se ve en la figura 19, la expresión es incluso mucho menor con respecto a las cruza con el driver de actina, ya que el driver MS1096 mostró no tener un efecto fuerte, pese a que se realizó la cruce a 28°C (cabe recordar que el sistema UAS-GAL4 procede de levadura, por lo que la proteína GAL4 presenta su actividad óptima a 28 °C). No obstante, es de resaltar, que la región dorsal-posterior sigue siendo la zona en que se encuentra la expresión de *Ubx*.

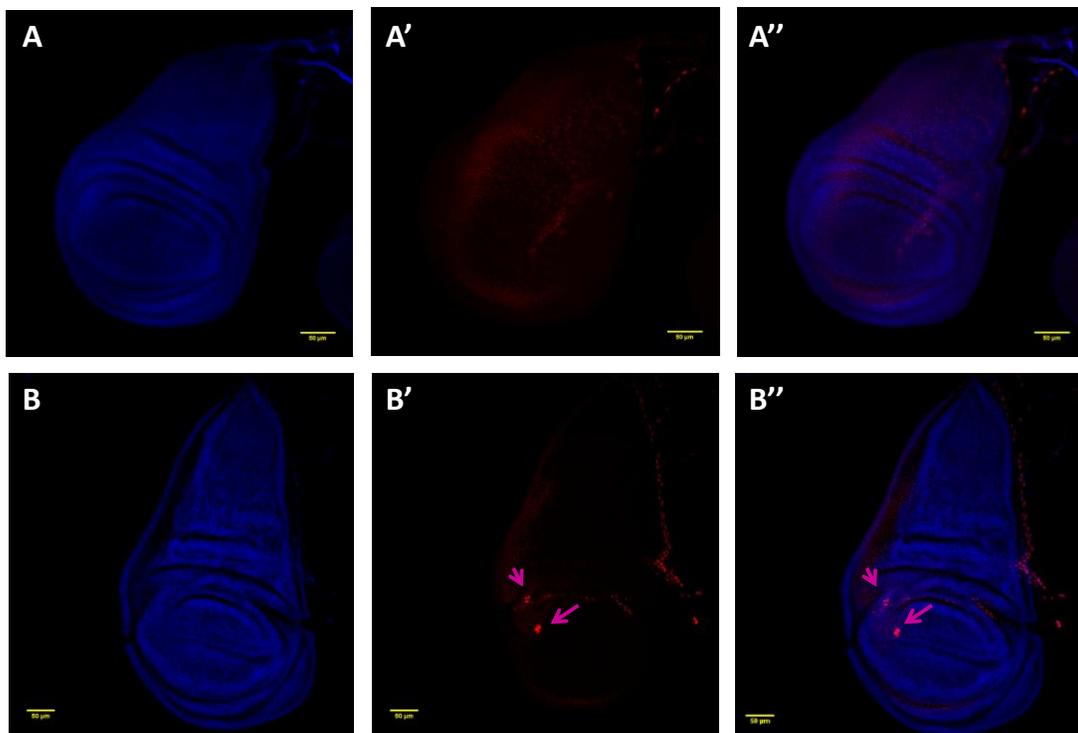


Figura 19. Inmunotinción de discos de ala con genotipo $MS1096-GAL4/+;gRNA_{Ubx}/+;UAS:dCas9-VPR/+$. En A-A'' se muestra control negativo el disco de ala, tomado de las líneas hermanas de B que no cuentan con el sistema CRISPR/Cas9 completo. En B-B'', se puede observar la expresión ectópica aunque débil, del gen *Ubx* de la línea mutante $MS1096-GAL4/+;gRNA_{Ubx}/+;UAS:dCas9-VPR/+$ en el disco de ala. Sin embargo, la región en la que se expresó *Ubx* fue la misma que la observada con el driver de actina. Imágenes tomadas en el microscopio Olympus Confocal invertido, y analizadas con el software Fiji ImageJ.

Finalmente, se realizó la cruce con el driver $ap>GFP-GAL4;CyO_{Tb}$, de la que se realizó la disección

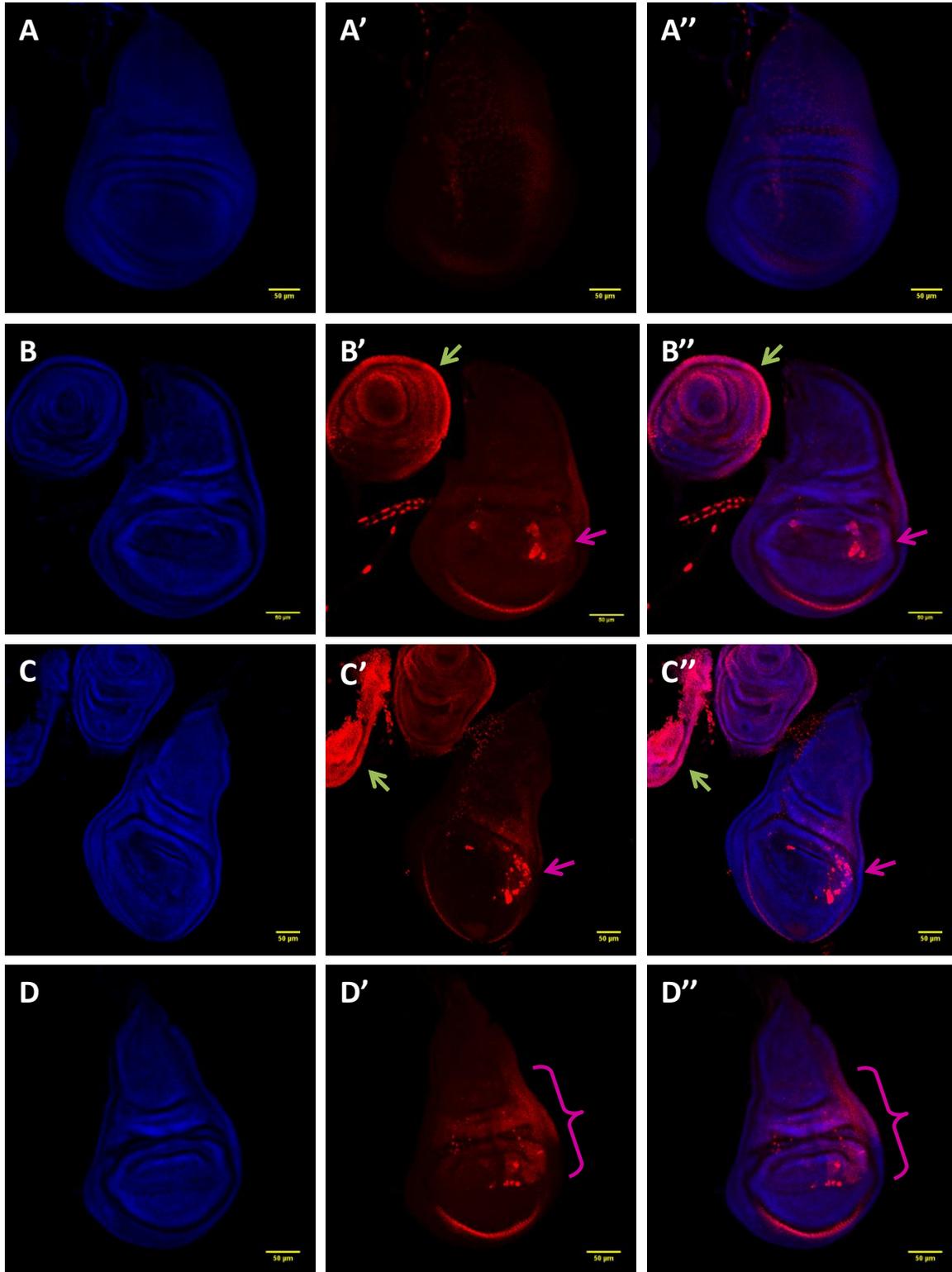


Figura 20. Inmunotinción de discos de ala con genotipo $gRNA_{Ubx} / Ap > GFP-GAL4; UAS:dCas9-VPR/+..$ A. Control con líneas hermanas, no se observa expresión de *Ubx*. B''-D'', expresión de *Ubx* en la región dorsal de disco, en especial en la región del pouch, para la línea $gRNA_{Ubx} / Ap > GFP-GAL4; UAS:dCas9-VPR/+..$, señaladas dichas regiones para todos los paneles con flechas y llaves rosas. En B y C se tienen como control

interno positivo, al disco de halterio que expresa *Ubx* de forma constitutiva (flechas verdes). Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 20x en el microscopio Olympus Confocal Upright, y analizadas con el software Fiji ImageJ. La primer columna corresponde a DAPI, la segunda presenta la señal para el anticuerpo contra *Ubx* y en la tercer columna se presenta el merge entre ambos canales.

de los discos imagales de ala a las larvas en tercer estadio con genotipo *gRNA_{Ubx}/ap>GFP-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*. Esta nueva crusa se realizó ya que el driver de apterus es más fuerte para la expresión de GAL4. Además, permite observar el establecimiento del límite entre los compartimentos dorso-ventral puesto que se expresa en la parte dorsal del disco de ala⁴⁵, favoreciendo también la expresión de *Ubx* en la región en donde ya se había encontrado. Cabe mencionar que unas de las ventajas de emplear el driver de apterus, es que en primer lugar, éste no se expresa en la membrana peripodial del disco de ala, y además está diseñado para expresar simultáneamente GFP, por lo que de requerirse aislar las células positivas para la expresión de *Ubx*, dichas características permiten evitar el fondo que se pudiese obtener, diferenciando la expresión en los discos, dirigida por el driver en la región dorsal, de la expresión natural del gen en las células de la membrana peripodial. Al observar en la figura 20, se evidencia la expresión de *Ubx* en la región dorsal, sobre todo del pouch del disco.

5. Fenotipos desarrollados en alas y antenas de moscas que expresan ectópicamente al gen *Ubx*.

Debido al genotipo *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+* que presentan las líneas mutantes que se emplearon, de no existir activación transcripcional, se hubiera esperado que las líneas no presentaran ningún fenotipo, ya que por sí mismas no cuentan con ningún marcador. Sin embargo para el caso de la línea mutante que expresa los sgRNA dirigidos al gen *Ubx* se encontraron defectos en las alas y las antenas, lo cual correlaciona con los resultados obtenidos en la inmunotinción de discos imagales.

El daño en ala sugiere que es producto de la expresión del gen de forma ectópica y en células específicas, tal y como se encontró en los discos imagales, de manera que el fenotipo obtenido se encuentra focalizado en determinadas regiones de las alas, tal y como se muestra en la figura 21, en la que se presenta en el panel A un ala control con fenotipo silvestre, a comparación de las alas con los diferentes daños focalizados encontrados dentro de las mismas. Se encontraron cúmulos de células en las venas L4 y L5 (Figura 21 B e I, flechas naranjas), así como en la región de la segunda célula posterior (Figura 21 B, C, I, H flechas rosas); de hecho, en esta célula del ala, es donde se encontraron venas extras o ausencia de las mismas (Figura D, E y H, flecha azul), así como quetas extras (Figura 21 D, flecha roja) y parches de células (Figura 21 C, D, F y G, flechas negras). Se presenta como control a las alas de las líneas hermanas con genotipo: *gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;TM6B,Tb/+*, se empleó esta línea como control dado que es la única de las líneas hermanas que no heredó el fenotipo *Curly*, lo cual dificultaría la observación de las alas al compararlas.

Una vez que obtuvimos resultados con el driver de actina, se realizó una crusa con el driver *MS1096-GAL4* que dirige la expresión al disco de ala, sin embargo los fenotipos obtenidos (figura 22) fueron similares o menores a los ya observados con el driver de Act5C-GAL4. Se observó, comparando con el control de actina (Figura 22A) y el control con una de las hermanas de la crusa (Figura 22B), con genotipo: *MS1096-GAL4/+;gRNA_{Ubx}/+;MKRS/+*; la cual, como en el caso de actina, se tomó como control negativo a la línea hermana que no tuviera el fenotipo *Curly* para poder realizar las observaciones. En la figura 22C se muestra señalado con flecha rosa, el conglomerado de células en la segunda célula posterior del ala. Para el caso de D, el conglomerado de células se extiende paralelamente a la vena L5 (flecha rosa).

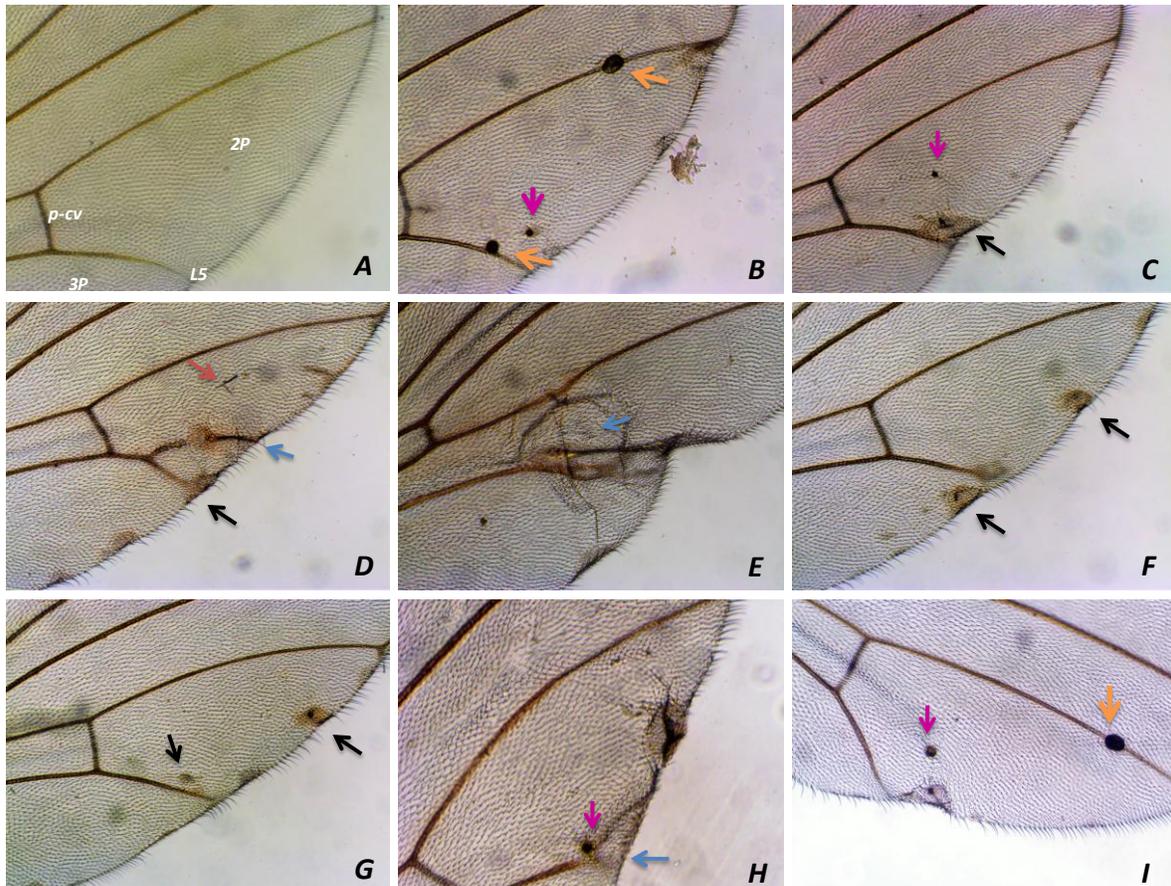


Figura 21. Daños en ala obtenidos de la línea mutante *gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4; UAS:dCas9-VPR/+*. En el panel A, se observa el fenotipo de ala silvestre, que no presenta daños; a diferencia de los paneles B a I, en donde se observan (señalados con flechas) los diferentes defectos en las venas, aglomerados puntuales y parches, particularmente desarrollados en la zona de la segunda célula posterior (2P) y tercera célula posterior del ala (3P) y entre las venas L4 y L5. Código de colores es descrito en el texto.

Para maximizar el efecto en la región dorsal de disco de ala y para posibles futuros experimentos, se procedió a realizar la cruce con el driver *ap>GFP-GAL4*. Las líneas con el genotipo *gRNA_{Ubx}/ap>GFP-GAL4; UAS:dCas9-VPR/+* mostraron efectos muy similares a la cruce con *Act5C-GAL4* o *MS1096-GAL4* (Figura 23), con los conglomerados celulares en las venas (L4 y L5) del ala (Panel 23B, flecha naranja) . Así también se observaron esa misma clase de conglomerados en la vena p-cv (Figura 23B, flecha morada) y en la segunda célula posterior del ala (Figura 23C, flecha rosa). También se observaron parches en la tercer célula posterior, así como en la vena L5 (Figura 23D, flechas negras).

Dado que el ala es un órgano que se puede observar más fácilmente, fue sencillo encontrar alteraciones en las mismas, producto del aumento de la expresión de *Ubx*, dirigida por el driver de actina, que a su vez también es un driver fuerte. No obstante, durante las revisiones de los especímenes, no se encontró algún tipo de daño, además de las alas. Al realizar las inmunotinciones, se encontró que en los discos de ojo-antena, también se presentaba expresión ectópica de *Ubx* por lo que se prosiguió a estudiar las antenas de las moscas adultas de genotipo: *gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4; UAS:dCas9-VPR/+*, los resultados obtenidos se muestran en la figura 24.

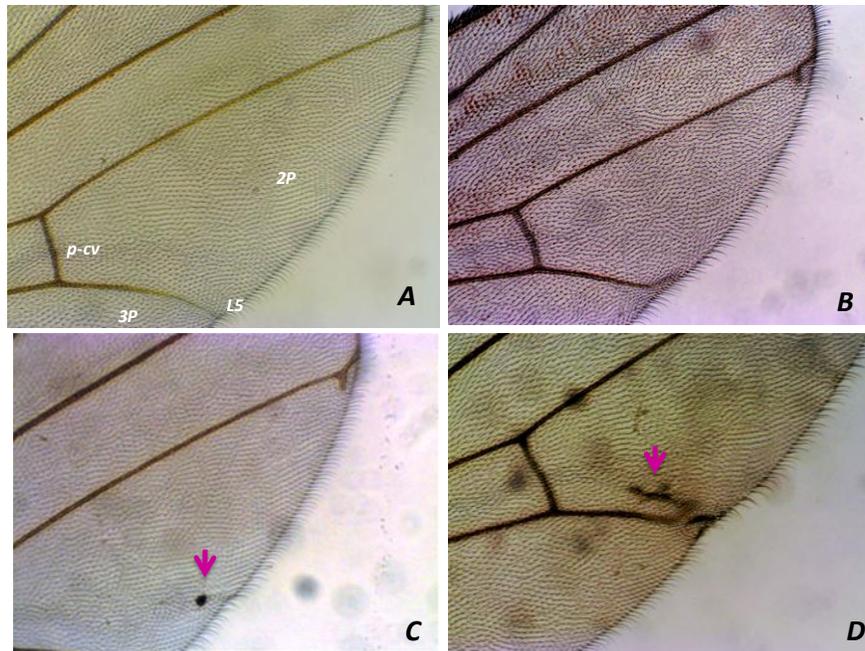


Figura 22. Daños en ala obtenidos de la línea mutante *MS1096-GAL4/+;gRNA_{Ubx}/+;UAS:dCas9-VPR/+*. En A se muestra el control con fenotipo silvestre y en B, el control con la línea parental del driver MS1096-GAL4. Como se puede observar, se obtuvieron efectos similares aunque en menor medida, que los presentados por el driver de actina, el conglomerado de células en 2P (C) o paralelas a la L5 (D).

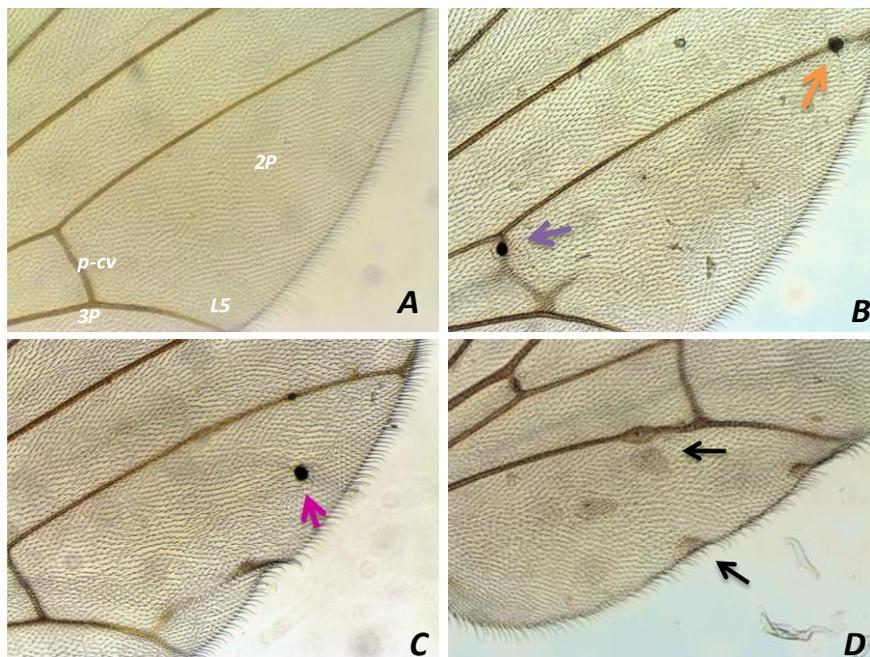


Figura 23. Daños en ala obtenidos de la línea mutante *gRNA_{Ubx}/ap>GFP-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*. El fenotipo obtenido es igualmente parecido al obtenido en el driver de Act5C-GAL4. Con conglomerados celulares en venas (B) y en la segunda y tercer célula posterior del ala (CyD).

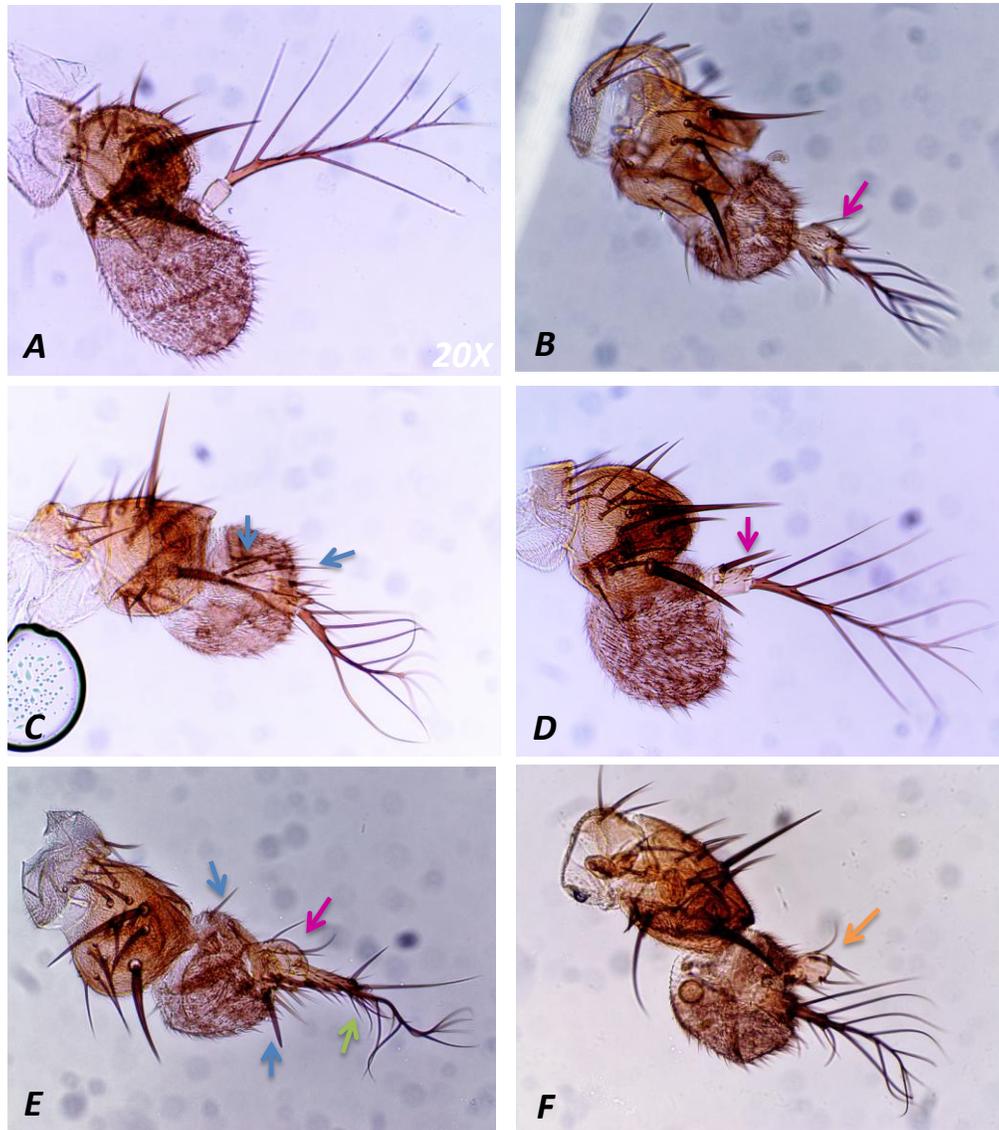


Figura 24. Daños en antena obtenidos de la línea mutante *gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*. El fenotipo silvestre se observa en A, donde se distingue la forma de los antenómeros y la arista, así como los elementos característicos que las componen. En B, se observa que la base de la arista presenta abultamiento y quetas extra, así como en E y D (flechas rosas). En C y E se muestra la aparición de quetas en el antenómero 3 (flecha azul). En F se observa la aparición de una protuberancia extra con quetas (flecha naranja).

Se encontraron fenotipos dramáticos en las antenas de las moscas, entre los que sobresalieron abultamiento y aparición de quetas extra en la base de la arista (Figura 24B, D y E, flechas rosas), así como quetas subdesarrolladas a lo largo de la misma (Figura 24E, flecha verde); al igual que en el antenómero 3 (A3), en el que también se manifestó aparición de quetas extras y que se pueden observar en la Figura 24C y E (flechas azules). Para la figura 24F, se nota la formación de una protuberancia con quetas que sobresale del antenómero (flecha naranja). Todos estos fenotipos en las antenas presentan similitud con los fenotipos reportados previamente y que dan lugar a la formación de pata⁴⁶. Como control se emplearon a las hermanas con genotipo

gRNA_{Ubx}/CyO;UAS:dCas9-VPR/+ y *Act5C-GAL4/CyO; UAS:dCas9-VPR/+*, en las que se observa fenotipo silvestre.

6. La expresión de dCas9-VPR resulta en un aumento de los transcritos del gen *Ubx* y el elemento TAHRE en las cruzas respectivas.

Se realizó el análisis preliminar por RT-PCR punto final de las moscas con genotipo *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+* tanto para el caso de la línea del sgRNA contra *Ubx*, como la línea de TAHRE. Como resultado se detectó un incremento en los transcritos para ambos casos, especialmente en los transcritos de TAHRE, así se puede observar en la figura 25. Al hacer el análisis de densitometría en ImageJ, se obtuvo para ese gel que el incremento para TAHRE fue de 9.87 veces con respecto a las moscas parentales con genotipo *gRNA_{TAHRE}/CyO;UAS:dCas9-VPR/+*. Para el caso de *Ubx*, se realizó con dos líneas de mosca con el mismo genotipo *gRNA_{Ubx}/CyO;UAS:dCas9-VPR/+*, variando solo en la línea de mosca de la dCas9 de la que se realizó la cruce. Para ambos casos el incremento va de 2.6 a 4.7 veces más con respecto a las parentales. Los resultados se normalizaron con respecto a la expresión de RP49. Es de remarcar, el hecho de que para las tres muestras, la presencia de transcritos en las líneas parentales es casi nula, sobre todo en TAHRE, por ser heterocromatina y encontrarse silenciada en moscas adultas.

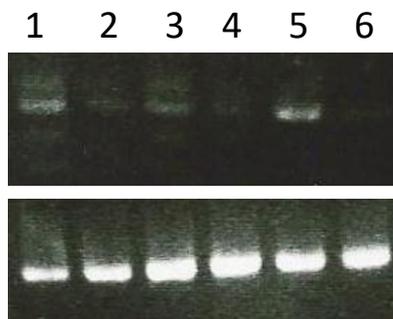


Figura 25. RT-PCR de moscas adultas para las líneas *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*. Se demuestra en la parte superior, el aumento en el número de transcritos presentes tanto en la línea mutante para los sgRNA_{Ubx} (1 y 3) como para los sgRNA_{TAHRE} (5). Como control se empleó a las líneas parentales para cada caso (2,4,6). Se empleó como control y base para la normalización de la densitometría a RP49, para cada línea de mosca (parte inferior). Los resultados de la densitometría se muestran en la parte inferior y se interpretan como la cantidad de veces en que la señal aumenta con respecto al control.

Posteriormente, se realizó el análisis por qRT-PCR para corroborar estos resultados, este experimento se realizó por triplicado para cada muestra y con sus respectivos triplicados biológicos, encontrándose que para el caso de los transcritos de TAHRE, presentes en la línea de mosca *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*, se obtuvo un incremento en hasta casi 60 veces con respecto al control de moscas parentales *gRNA/CyO;UAS:dCas9-VPR/+*. En la gráfica 1 se muestra que los transcritos aumentan en cada réplica; sin embargo, para la primera réplica realizada el incremento, aunque fue de 23 veces mayor, no alcanzó a las otras réplicas de 58 veces más en el *fold difference*.

Por otro lado, los transcritos para *Ubx*, pese a que en el gel de agarosa se observaron ligeramente aumentados, presentaron mayor variabilidad en este experimento (Gráfico 2), donde en una de las repeticiones biológicas se ve inferior inclusive que el control, mientras que los otros dos duplicados restantes, no muestran diferencia significativa entre el control de las líneas parentales con el de la muestra. Los genotipos empleados para este experimento fueron también *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*, y los controles considerados, fueron las líneas parentales, tal y como el caso de TAHRE.

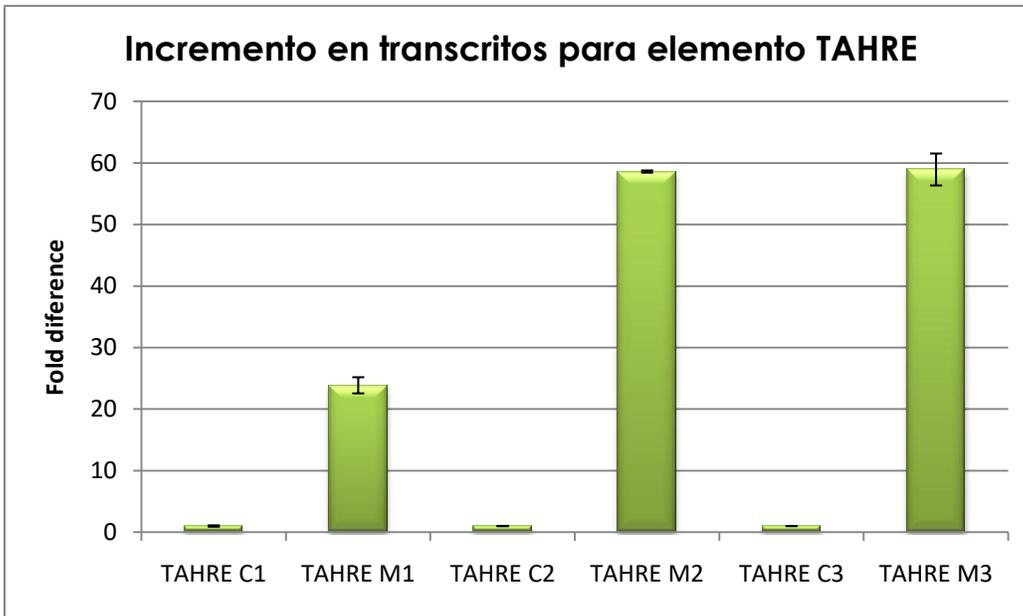


Gráfico 1. Incremento en transcritos para el elemento TAHRE. Se observa el incremento de 23.9, 58.6 y 58.9 (TAHRE M1, M2, M3, respectivamente con genotipo $gRNA_{TAHRE}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+$) en el *fold difference* con respecto a las líneas control (TAHRE C1, C2, C3, genotipo $gRNA_{TAHRE}/CyO;UAS:dCas9-VPR/+$). Se observa variabilidad entre el primer resultado con respecto a los dos replicados restantes.

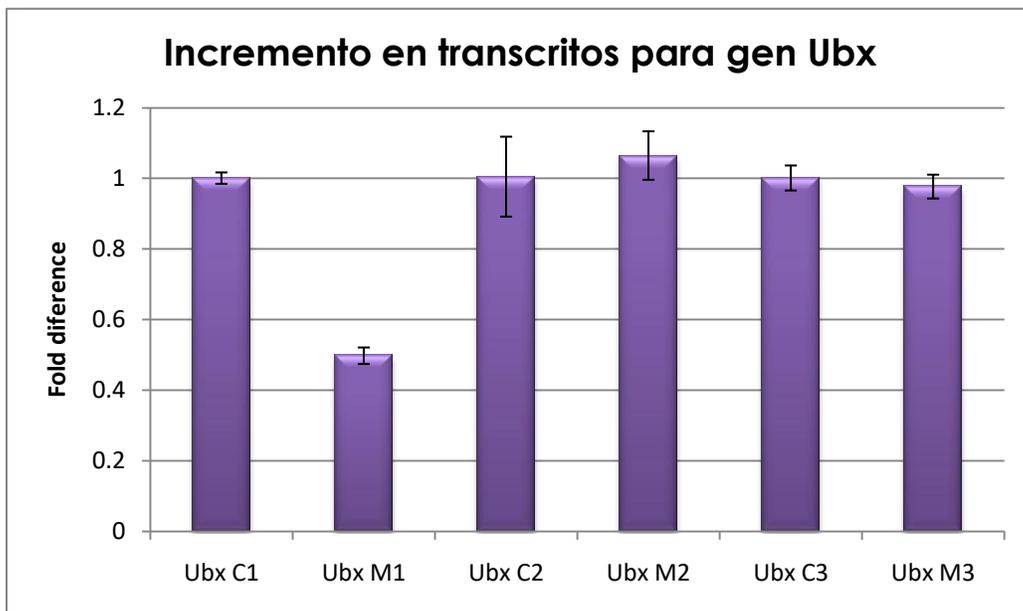


Gráfico 2. Incremento en transcritos para el gen *Ubx*. Se observa que para la primera réplica, la línea con genotipo $gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+$ (en el gráfico: Ubx M1) presenta una cantidad de transcritos presentes menor a comparación de la línea parental control (Ubx C1, genotipo $gRNA_{Ubx}/CyO;UAS:dCas9-VPR/+$). Mientras que para las siguientes dos réplicas, no se observa diferencia significativa entre el control (Ubx C2, C3) y el genotipo de interés (Ubx C2, C3).

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se corrobora la eficacia del sistema CRISPR/Cas9, en su variante dCas9-VPR, para la activación transcripcional no solo de regiones eucromatina, como previamente se ha comprobado⁴⁰, sino también en regiones de heterocromatina constitutiva y facultativa, las cuales se sabe que se encuentran reprimidas para la transcripción dependiendo la etapa del desarrollo y tipo celular.

1. El diseño de los sgRNA es crucial para el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9.

Existen en la actualidad gran variedad de herramientas informáticas desarrolladas para el auxilio en el correcto diseño de los sgRNA para CRISPR/Cas9, entre las que destacan recursos web en línea como lo es CHOPCHOP (diseñado en la Universidad de Harvard, <https://chopchop.rc.fas.harvard.edu>), FlyCRISPR (desarrollado en la Universidad de Wisconsin, <http://flycrispr.molbio.wisc.edu/>), BreakingCas (del National Centre for Biotechnology (CNB-CSIC), España, <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>) o la plataforma comercial Benchling (diseñada por la industria y que permite trabajar incluso como una bitácora virtual, <https://benchling.com/>), los cuales permiten no solo la búsqueda de los posibles sitios aleatorios a un sitio PAM para diseñar los sgRNA, sino que incluso permiten calcular su eficiencia de acuerdo a los posibles *off targets* y los posibles *mismatches* que pudieran presentar dentro de estos mismos *off targets*, así como el porcentaje de GC, la presencia de una G en la posición 20 e incluso, el diseño de oligonucleótidos para corroborar el corte de la dCas9 ya en el gen blanco (esto para los casos en los que se desea realizar delecciones o mutaciones). Lo cual las convierte en una herramienta poderosa para el diseño de un experimento exitoso.

No obstante, para el caso del presente trabajo, los sgRNA se dirigieron empíricamente a zonas río arriba de los TSS que tuvieran el sitio PAM, considerando solamente la distancia y el impedimento estérico que pudiera haber por la presencia de la maquinaria transcripcional o de los nucleosomas mismos.

En el diseño de los sgRNA se consideró que la cromatina estaría impedida para la unión de la dCas9 por el empaquetamiento producido por los nucleosomas, de tal forma que las secuencias a las que se dirigió el sistema se localizaron 336 pb separadas una de otra, tanto para el elemento TAHRE como para el gen *Ubx* (Figuras 9 y 10 de metodología). Esto, fue producto de la consideración de que ambas secuencias estarían separadas por dos nucleosomas, tratando así de minimizar el efecto estérico que pudiera causar la unión posterior de la dCas9 a ambas secuencias. Cabe resaltar que una de las preocupaciones surgidas recientemente en el empleo de CRISPR/Cas9 para la edición de genomas es la obtención de mutaciones no deseadas⁴⁷, producidas por sitios en el genoma con la misma secuencia que el gen blanco (*off targets*) y que pueden ser reconocidos por los sgRNA, por lo que es importante que las secuencias de interés seleccionadas sean específicas para que esto no ocurra. En el presente trabajo, luego de realizar para ambos casos un BLAST para verificar los posibles *off targets*, no se encontró ninguno; además, se corroboró que para el caso de TAHRE, existen múltiples copias dentro del genoma, ya que se encuentra disperso en este en *Drosophila*, aunque mayoritariamente enriquecido en los telómeros. Sin embargo, cabe señalar que para el presente trabajo, de haber encontrado *off targets* no hubieran afectado en un sentido negativo, sino al contrario, ya que lo que se esperaba era activar la transcripción y explorar las consecuencias que esta ocasionaría, y la presencia de *off targets* favorecería dicha expectativa.

Una vez realizados los experimentos de prueba de los sgRNA, se puede notar que, a pesar de que el sgRNA de *Ubx* bajo el promotor de U6:3 no se expresó, al estar más lejos del TSS, como que esquematiza en la figura 9 de la sección de metodología, no mermó en cuanto el efecto *per se* del sistema, ya que con un solo sgRNA se pudo observar expresión ectópica de *Ubx*. De este hecho, se puede suponer que para que la dCas9 funcione, y que sus dominios activadores de la transcripción que tiene acoplados activen efectivamente la transcripción, una distancia de hasta 393 pb río arriba del TSS, que es la distancia a la que el sgRNA bajo el promotor de U6:1 se dirigió, es suficiente para obtener dicho efecto. Esta distancia equivale a casi dos nucleosomas entre los sitios de unión de la dCas9 y el inicio de la transcripción. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, en donde se sugiere que el rango óptimo para la activación río arriba del TSS es de -400 a -50 pb^{40,48}. No obstante, no se debe perder de vista que ya se ha reportado⁴⁰ que el uso de dos sgRNA simultáneamente, es la condición óptima para la activación transcripcional, por lo que no se descarta la posibilidad de poder maximizar la transcripción ectópica si se emplean las dos sgRNA. Con la presencia de los dos sgRNA para *Ubx* podría incluso ayudar a mejorar los resultados de qRT-PCR y encontrar diferencias significativas entre el control con líneas parentales y la línea de interés.

Por otro lado, los resultados del elemento TAHRE, permiten considerar que una distancia mínima de 167 pb río arriba del TSS, o lo que es equivalente a casi un nucleosoma entre ambos sitios, es también suficiente para que la dCas9 pueda producir un efecto; pero para que esta consideración pueda afirmarse contundentemente habrían que emplearse por separado los sgRNA diseñados en el presente trabajo. Ya que, podría ser el caso de que ambos tuvieran una acción sinérgica, pese a que uno de los sgRNA está dirigido más allá del rango óptimo que se ha sugerido, o bien, que la sola acción del sgRNA de -167pb es suficiente para expresar al elemento TAHRE hasta casi 60 veces más con respecto a las líneas control, de acuerdo a los resultados por qRT-PCR, que se discutirán más adelante.

2. Los ensayos de viabilidad en moscas bajo la acción del sistema CRISPR/Cas9 no sugieren efecto para las líneas *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*.

Tras realizar la cruce correspondiente y obtener para ambos casos, *Ubx* y TAHRE, las líneas *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*, se cuantificaron las moscas que llegaron a etapa adulta para determinar si la activación transcripcional de estos elementos de heterocromatina, afectaba el desarrollo de la misma.

No obstante, para el caso del gen *Ubx* fue incluso esa misma línea, la que obtuvo mayor cantidad de moscas viables en etapa adulta (tabla 4 del apartado de resultados), aunque tampoco fue una diferencia significativa con respecto a las líneas hermanas. Por lo que la transcripción, activada por dCas9-VPR, aparentemente no tiene influencia en la viabilidad de esta línea.

Por otro lado, para el elemento TAHRE si bien la viabilidad de la línea de interés fue menor en un 70% (tabla 5 del apartado de resultados), dicho porcentaje es similar al de casi todas las líneas hermanas, inclusive en las que solo presentan a la dCas9 y los sgRNA por separado o a las que heredaron el fenotipo de las parentales. Solo la mosca con el driver Act5C-GAL4 y los sgRNA presentó mayor viabilidad que el resto, sin embargo, esto solo sugiere que la línea se vuelve estable con ambos elementos coexistiendo, sin tener una dCas9 actuando en el sistema; pero solo estos resultados, no permiten asegurar que tengan alguna relación con la viabilidad del resto de las líneas hermanas.

Por otra parte, no se notó, para la línea TAHRE un efecto en su fertilidad, ya que las moscas obtenidas en la F1 se cruzaron nuevamente con sus hermanas con genotipo similar y se obtuvo

una cantidad de progenie equivalente a la de las moscas parentales o las líneas de genotipo silvestre. Aunque, por la naturaleza de la misma cruce, la F2 ya no contaría con todos los elementos del sistema CRISPR/Cas9 actuando en ella, ya que las cruces de la F1 no se obtuvieron balanceadas, por lo que para estudiar más adelante dichos efectos generacionales del sistema en las moscas, se deben obtener las líneas balanceadas y fundar una familia estable de preferencia con genotipo *gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/UAS:dCas9-VPR*, y así estudiar dicha línea varias generaciones subsecuentes; además de que permitiría la realización de experimentos que requieren la recolección de una gran cantidad de material, como lo es un ChIP.

3. La activación transcripcional del gen *Ubx* en las moscas *gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4; UAS:dCas9-VPR/+* provoca su expresión ectópica en discos imagales de ojo-antena y ala.

Comprobado el efecto nulo en la viabilidad, se procedió a revisar si existían fenotipos en la mosca *gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+*, los cuales fueron encontrados en el ala adulta y que se discuten en la siguiente sección. Esto dio pauta a revisar en los discos imagales de larvas del tercer estadio y encontrar los resultados anteriormente presentados en el numeral 4.

En primer lugar, es notable el hecho de que la expresión en los discos de ala siempre fue muy restringida al margen de las regiones ventral y dorsal, de forma variegada y en las inmediaciones de esta región. Esto hace notar que la penetrancia no ocurre en un 100% pese a que se empleó el driver de Act5C-GAL4, que se esperaba que condujera la expresión en todas las células de la mosca, puesto que la actina es una proteína que es componente fundamental del citoesqueleto celular. Incluso, estos hallazgos podrían sugerir que la expresión de *Ubx* solo afecta a determinadas células, que posteriormente darán origen a las clonas que seguirán presentando dicha expresión activada.

Esto, nos llevaría a considerar que la regulación del gen *Ubx* se encuentra sobrepasada por la presencia de la dCas9-VPR y que pudiera impedir la acción represora de polycomb, por ejemplo. Sin embargo, se necesita realizar estudios moleculares para poder comprobar dicho supuesto.

No obstante es importante no confundir la señal de *Ubx* proveniente del pouch del disco con la señal obtenida en membrana peripodial y en las células tranqueales asociadas al disco, ya que es en estas células donde se sabe que también hay expresión de *Ubx*, a pesar de encontrarse en un disco de ala²⁸, y se encuentran en la región epitelial del disco. Razón por la cual se realizaron las cruces con los drivers MS1096 y Apterous, ya que estos buscaban enriquecer la expresión de *Ubx* en el disco de ala, sin embargo, solo el driver de Ap>GFP-GAL4 logró reflejar una expresión similar a la obtenida previamente con Act5C-GAL4. Esto podría indicar que la proteína dCas9 no logra la activación transcripcional de forma completa en todas las células, habiendo algún otro mecanismo que lleve a la regulación del gen.

Un hallazgo importante es que se encontrara activación transcripcional en disco de ojo-antena, el cual normalmente no expresa al gen *Ubx*²⁸, particularmente en la región de la antena, lo cual deja entrever que probablemente existe una regulación muy fina en la expresión dentro del disco, y que es una característica general de los genes homeóticos, tal y como se ha visto antes con *Antennapedia* o *Sex combs reduced*²⁸. Esto significa que, si bien llega a activarse la transcripción en determinadas células, formando clonas, éstas son reguladas finamente para buscar su represión y evitar el desarrollo de un fenotipo homeótico ectópico. No obstante, este efecto pareciera estar mejor manifestado en los discos de ala, donde se ven regiones definidas de expresión, a diferencia de la señal menos delimitada del disco de antena.

4. La activación transcripcional del gen *Ubx* en las moscas *gRNA^{Ubx}/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR*;+ provoca fenotipos dominantes *in vivo* en antena y ala de moscas adultas.

Se sabe que el gen *Ubx* controla el desarrollo diferencial entre halterio y ala, expresándose en el primero para reprimir su diferenciación a ala y viceversa, al no expresarse durante el desarrollo del ala, permite que esta no se diferencie a halterio. Por esto, en primer lugar se procedió a revisar con mayor detalle la existencia de algún fenotipo que corroborara el efecto de la activación transcripcional en el ala.

Los resultados obtenidos muestran correlación con lo encontrado en los discos imagales, en los que, al expresarse *Ubx* en la región dorsal-posterior de la misma, de acuerdo a los mapas de destino, dio lugar a fenotipos en la región de la segunda y tercer célula posterior del ala y venas adyacentes. El fenotipo observado indica la transformación homeótica del disco de ala a halterio, y podría estar relacionado con la regulación de genes como *omb*, *spalt* o *salr*, los cuales son necesarios para la formación de la región central de ala incluyendo a las venas II-IV²⁹. Se sabe que la sobreexpresión de *Ubx* reprime a *salr* de forma autónoma, por lo que esta represión suprime parte del patrón anteroposterior del ala mediado por *Dpp* en el halterio, lo que explicaría el fenotipo clonal de halterio en las alas de las moscas en donde se expresa ectópicamente *Ubx*.

O bien, también se ha sugerido⁴⁹ que al expresar niveles altos de proteína *Ubx*, se obtienen pocas clonas en alas adultas junto con células apoptóticas, sugiriendo que altos niveles de expresión de *Ubx* causa muerte celular, lo cual podría ser corroborado observando el efecto en generaciones posteriores, en donde se mantenga el genotipo y así observar si el efecto resulta progresivo y con muerte celular en ala.

Por otra parte, es importante recalcar el hecho de que el fenotipo no fue 100% penetrante en ala, por lo que faltaría también estudiar el efecto en subsecuentes generaciones para determinar si la activación por la *dCas9-VPR* se transmite por la línea germinal y ocasiona que eventualmente todas las hijas presenten estos fenotipos.

En cuanto a los resultados obtenidos en las antenas, éstos aluden en cierta medida al fenotipo de pata previamente reportado, aunque con una menor intensidad. Este fenotipo se sabe que está relacionado con la sobreexpresión de genes homeóticos (*Antp*, *Scr*, *Ubx* y *abd-A*) y la supresión que ejercen a nivel transcripcional sobre el gen *homothorax* (*hth*), el cual es responsable de la transformación de antena a pata. Así mismo, el gen *spineless* (*ss*) sufre el mismo efecto supresor por parte de dichos genes homeóticos, dando lugar a su represión en antena^{50,51}. Por lo que ambos genes se consideran genes selectores de antena, *hth* para el dominio proximal y *ss* para el dominio distal; éste último sería el que podría encontrarse involucrado en los fenotipos observados en el presente trabajo.

Otro gen involucrado en la formación proximodistal de la antena es *Distal-less* (*Dll*); el cual, junto con *hth* y *ss*, es requerido para la especificación de la antena, teniendo como blanco a *spalt* y *salr*, que además de intervenir en la formación de las alas, como anteriormente se señaló, también son expresados en el disco de antena para su correcta formación⁴⁶. Por lo que al perder la función de *Dll*, por la sobreexpresión de *Ubx* resulta en el fenotipo sutil de transformación a pata que se observó.

5. La activación transcripcional del elemento TAHRE no manifestó un cambio en el fenotipo, pero sí un incremento en la cantidad de transcritos cuantificados por qRT-PCR.

Para el caso de la línea mutante *gRNA/Act5C-GAL4;UAS:dCas9-VPR/+* con los sgRNA dirigidos hacia la región del elemento TAHRE no se le encontró algún fenotipo que pudiera indicar efecto de la

transcripción ectópica de TAHRE en el organismo; es decir, las moscas presentaban prácticamente un fenotipo silvestre.

Una de las razones por las que tal vez no se observó un fenotipo claro en dichas moscas, podría explicarse por el hecho de que aunque se podría esperar que TAHRE fuera un elemento abundante en telómeros por contar con los dos marcos de lectura abierta de Gag y Pol; solo la Gag de HeT-A tiene la capacidad de asociarse a los mismos, confiriéndole una ventaja al mRNA de HeT-A sobre TART y TAHRE para la elongación en los telómeros y siendo TAHRE propuesto como el retroelemento que controla la retrotransposición de HeT-A²⁰. Aunado a ello, se ha propuesto que la colocalización de la Gag de TAHRE con la Gag de HeT-A, permite a éste último usar la RT de TAHRE para incorporarse a los telómeros²⁵. Por lo tanto, aunque aumentaran los transcritos de TAHRE, no habría integración de los mismos en el genoma de *Drosophila*, sirviendo solo para integrar HeT-A, que al no encontrarse sobreexpresado, no tendría mayor efecto que la acumulación de los transcritos de TAHRE.

Sin embargo, también se sabe que este retrotransposón por encontrarse en los telómeros, tiene implicaciones negativas en la fertilidad, el desarrollo de los oocitos y los embriones, como consecuencia del alargamiento de los telómeros por la acción de TAHRE y su interferencia en las divisiones celulares meióticas⁴³, por lo que se sugiere que en experimentos posteriores se estudie el efecto en la fertilidad de la línea *gRNA_{TAHRE}/Act5C-GAL4;dCas9-VPR;+* así como el desarrollo de los embriones de las generaciones posteriores y la viabilidad de las mismas.

Por otra parte, sería necesario realizar hibridaciones *in situ* contra TAHRE para revisar si su número de copias aumentó en los telómeros.

No obstante, la ausencia de un fenotipo no significa que no se haya producido dicha activación transcripcional, ya que como se observó en el Gráfico 1 (Resultados) se obtuvo un incremento en los mismos con respecto al control. Esto significaría que la dCas9-VPR logró unirse a las secuencias blanco río arriba del inicio de la transcripción de TAHRE, a pesar de localizarse en una región muy fuertemente compactada, como lo es la heterocromatina constitutiva, y con ello, activó la transcripción. Lo cual es posible puesto que también se ha visto que factores transcripcionales pueden estar unidos en regiones heterocromáticas, contribuyendo tanto a la formación como al silenciamiento de la heterocromatina, así como facilitando el reclutamiento de complejos co-represores⁵². Un caso particular y que probablemente puede estar relacionado con los resultados obtenidos, son los RNAs asociados a PIWI (piRNA). Las secuencias codificantes para piRNAs se encuentran en heterocromatina, éstos al traducirse, son los encargados de silenciar (mediante su unión a PIWI) a los transposones localizados precisamente aledaños a los loci de piRNA, manteniendo el estado de represión de la cromatina. Los piRNAs son traducidos gracias a la presencia del complejo de pre-iniciación compuesto por la Pol II y algunos parálogos de los factores de transcripción TFIIA y TFIID, que a su vez son reclutados por la proteína Rhino, variante de la proteína HP1⁵³. El encontrarse dichos factores ya presentes en la heterocromatina y llevarse a cabo la transcripción de los piRNA, sugiere que la dCas9-VPR aprovecha esta maquinaria transcripcional para activar la transcripción del retrotransposón TAHRE.

Surgiendo así una competencia entre regulación-desregulación de la heterocromatina constitutiva, en donde piRNAs se transcriben para reprimir a los transposones, pero en dicho proceso éstos últimos son activados fuertemente, expresándose incluso en mayor proporción que los piRNA, que ya no los podrían reprimir y en consecuencia se producirían los incrementos observados de transcritos.

Cabe resaltar que las réplicas no fueron del todo semejantes en los valores obtenidos en el incremento de transcritos, esto podría deberse a que la presencia de transcritos en la línea parental control de TAHRE es mínima y por lo tanto ocasiona que un incremento de los mismos en las líneas mutantes se manifieste de forma variable. Además de que sería más fácil detectar el

aumento de transcritos en TAHRE dado que posee múltiples copias que estarían activas y contribuyendo a la cantidad de mRNA cuantificado.

6. La acción de dCas9-VPR es suficiente para activar la transcripción en la heterocromatina.

Resultados obtenidos en este trabajo muestran que un activador artificial de la transcripción, como lo es dCas9-VPR es capaz de ejercer dicha función en regiones de heterocromatina, ya sea constitutiva o facultativa. Estos datos son importantes porque existen reportes que sugieren que los nucleosomas bloquean la unión de la proteína Cas9 al DNA⁵⁴. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren que la dCas9-VPR es capaz de unirse a cromatina compacta y activar la transcripción *in vivo*. Así mismo, si se sabe que la maquinaria transcripcional se encuentra en algunas regiones de heterocromatina constitutiva, la eficacia del sistema CRISPR/Cas9 queda comprobada en el hecho de que TAHRE sí logra incrementar su actividad transcripcional.

Para el caso de *Ubx*, no se encontró diferencia significativa entre la cantidad de transcritos de la mosca con fenotipo mutante con respecto de aquella que presentaba fenotipo silvestre en organismos adultos, esto podría explicarse por el hecho de que éste representa solo un locus activo en un número reducido de células dentro del disco imagal y el ala misma, por lo que podría no significar un incremento abundante de transcrito a nivel global. Sin embargo, estos experimentos permiten deducir que a pesar de ser variaciones en los niveles de transcritos muy leves y localizadas, provocan un efecto visible en los organismos. Esto podría llevar a suponer que el gen *Ubx* se activa ectópicamente, pero que los mecanismos de regulación del mismo gen, evitan que esta desregulación sutil avance y lo reprime nuevamente, siendo las clonas que presentan efecto, las únicas que escaparon a dicha represión; además de que, faltaría determinar si las generaciones posteriores de la línea *gRNA_{Ubx}/Act5C-GAL4;dCas9-VPR;+* mantienen el fenotipo obtenido o si logran incrementarlo.

Finalmente, la diferencia entre ambos resultados podría explicarse con las observaciones hechas previamente por *Lin S., 2015* en donde encontraron que el nivel de activación para un gen dado está inversamente correlacionado con su nivel de transcripción basal, por lo que la activación por dCas9-VPR, es más efectiva en genes que son expresados a niveles más bajos en un tipo celular dado⁴⁰. Lo cual podría respaldar el hecho de que TAHRE al transcribirse solo al final de la fase S y encontrarse prácticamente el resto del ciclo celular en heterocromatina constitutiva, presentó mayor cantidad de transcritos que el gen *Ubx* que se transcribe en mayor nivel durante el desarrollo de la mosca, aunque en este último, la desregulación sí provocara los fenotipos anteriormente descritos.

CONCLUSION

- ✓ El sistema CRISPR/Cas9 es una herramienta efectiva para la activación de la transcripción en regiones que se encuentran reprimidas, como lo son la heterocromatina constitutiva y facultativa.
- ✓ La activación de la transcripción del gen *Ubx* manifiesta su expresión en la zona limítrofe entre la región dorsal y ventral del disco imagal de ala así como en la región central de disco imagal de ojo-antena. Esto se refleja en el desarrollo de un fenotipo discreto en ala, característico de la transformación homeótica a halterio, y el fenotipo en antena, que denota ligera transformación homeótica a pata.
- ✓ Regiones fuertemente reprimidas, como lo es la heterocromatina constitutiva y en particular el elemento TAHRE, logran ser activadas mediante el sistema CRISPR/Cas9, provocando un incremento en los transcritos del mismo; sin que dicha acumulación produzca un fenotipo visible en las líneas mutantes.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo representan un antecedente para el estudio de la dinámica de la heterocromatina ante la activación transcripcional y poder así aportar evidencias de que es esta última la que determina la estructura de la cromatina, para ello quedan por responder algunas interrogantes:

- ¿Se provoca un cambio en la estructura de la heterocromatina en las células en las que se encontró activación del gen *Ubx*? La expresión ectópica de uno de los genes homeóticos, como es el caso de *Ubx*, implicaría la presencia de la maquinaria transcripcional, así como de factores remodeladores de la cromatina y modificadores de histonas, lo que ocasionaría en consecuencia un cambio en las marcas de las histonas H3K27me3 y H3K4me3 (asociadas a represión y activación de genes, respectivamente) que podría ser evaluado mediante ChIPs de las mismas.
- ¿La activación de *Ubx* provoca un efecto en la región reguladora del gen? Determinar si la unión de PcG al PRE es eliminada posteriormente a la activación de *Ubx* como consecuencia de la activación transcripcional o si permanece en las regiones reguladoras a pesar del efecto de activación de la dCas9-VPR.
- De ser eliminado PcG, llevaría a cuestionar si dicho cambio resulta permanente o puede ser reestablecida su unión a las regiones reguladoras tras detener la activación mediada por dCas9-VPR. Por lo que convendría también determinar el tiempo de permanencia de las marcas de activación y la cantidad de transcritos generados.
- Para el caso del elemento TAHRE, ¿Cambian también las marcas de las histonas tras la activación de los mismos y por consecuencia la estructura de la cromatina? Para ello se podrían evaluar los cambios en las marcas de las histonas H3K9me3, de HP1 y H3K9Ac en la región reguladora y verificar si estos corresponden a la formación de eucromatina, mediante la realización de un ensayo de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP).
- ¿Los resultados obtenidos son reproducibles en otras regiones de heterocromatina constitutiva y facultativa? Se sugiere incrementar el número de genes de estudio para poder describir de forma general el comportamiento de la heterocromatina facultativa o constitutiva ante la activación transcripcional.

REFERENCIAS

1. Tripathi, V. & Prasanth, K. V. Cell Nucleus. *eLS* (2011).
doi:10.1002/9780470015902.a0001337.pub2
2. Swygert, S. G. & Peterson, C. L. Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1839**, 728–736 (2014).
3. Groth, A., Rocha, W., Verreault, A. & Almouzni, G. Chromatin Challenges during DNA Replication and Repair. *Cell* **128**, 721–733 (2007).
4. Hübner, M. R., Eckersley-Maslin, M. A. & Spector, D. L. Chromatin organization and transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 89–95 (2013).
5. Barberis, A., Petrascheck, M., Ag, E. & Petrascheck, M. Transcription Activation in Eukaryotic Cells. *Encycl. Life Sci.* (2003).
6. Quina, A. S., Buschbeck, M. & Di Croce, L. Chromatin structure and epigenetics. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1563–1569 (2006).
7. Wutz, A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 542–553 (2011).
8. Sekinger, E. A. & Gross, D. S. Silenced chromatin is permissive to activator binding and PIC recruitment. *Cell* **105**, 403–414 (2001).
9. Grewal, S. I. S. & Elgin, S. C. R. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* **447**, 399–406 (2007).
10. Meier, K. & Brehm, A. Chromatin regulation: How complex does it get? *Epigenetics* **9**, 1485–1495 (2014).
11. Solovei, I., Thanisch, K. & Feodorova, Y. How to rule the nucleus: divide et impera. *Curr. Opin. Cell Biol.* **40**, 47–59 (2016).
12. Wang, J., Jia, S. T. & Jia, S. New Insights into the Regulation of Heterochromatin. *Trends Genet.* **32**, 284–294 (2016).
13. Alberts, B. *et al. Molecular Biology of the Cell 6e. Garland Science* **6**, (2014).
14. Puschel, R., Coraggio, F. & Meister, P. From single genes to entire genomes: the search for a function of nuclear organization. *Development* **143**, 910–923 (2016).
15. Zaratiegui, M. & Martienssen, R. A. Heterochromatin. *Brenner's Encycl. Genet.* **3**, 438–441 (2013).

16. Panawala, L. Difference Between Euchromatin and Heterochromatin. 0–11 (2017).
Available at:
https://www.researchgate.net/publication/315620061_Difference_Between_Euchromatin_and_Heterochromatin.
17. Elgin, S. C. R. & Grewal, S. I. S. Heterochromatin: silence is golden. *Curr. Biol.* **13**, R895–R898 (2003).
18. Trojer, P. & Reinberg, D. Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Mol. Cell* **28**, 1–13 (2007).
19. Gut, P. & Verdin, E. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature* **502**, 489–498 (2013).
20. Shpiz, S. *et al.* Characterization of Drosophila telomeric retroelement TAHRE: transcription, transpositions, and RNAi-based regulation of expression. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 2535–2545 (2007).
21. Zhang, L. & Rong, Y. S. Retrotransposons at Drosophila telomeres: Host domestication of a selfish element for the maintenance of genome integrity. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1819**, 771–775 (2012).
22. Chow, T. T., Mak, S. S., Shay, J. W. & Wright, W. E. Telomeres. *Brenner's Encycl. Genet.* **4**, 38–43 (2013).
23. George, J. A., DeBaryshe, P. G., Traverse, K. L., Celniker, S. E. & Pardue, M. Lou. Genomic organization of the Drosophila telomere retrotransposable elements. *Genome Res.* **16**, 1231–1240 (2006).
24. Villasante, A. *et al.* Drosophila telomeric retrotransposons derived from an ancestral element that was recruited to replace telomerase. *Genome Res.* **17**, 1909–1918 (2007).
25. Pardue, M.-L. & DeBaryshe, P. G. Retrotransposons that maintain chromosome ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20317–24 (2011).
26. Maeda, R. K. & Karch, F. The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development* **133**, 1413–1422 (2006).
27. Pavlopoulos, A. & Akam, M. Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of Drosophila haltere morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 2855–2860 (2011).
28. Brower, D. L. Ultrabithorax gene expression in Drosophila imaginal discs and larval nervous system. *Development* **101**, 83–92 (1987).

29. Weatherbee, S. D., Halder, G., Kim, J., Hudson, A. & Carroll, S. Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila haltere*. 1474–1482 (1998).
30. Oost, J. Van Der, Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M. & Brouns, S. J. J. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. 401–407 (2009).
doi:10.1016/j.tibs.2009.05.002
31. Bondy-Denomy, J. & Davidson, A. R. To acquire or resist: The complex biological effects of CRISPR-Cas systems. *Trends Microbiol.* **22**, 218–225 (2014).
32. Lander, E. S. Perspective The Heroes of CRISPR. *Cell* **164**, 18–28 (2015).
33. Port, F., Muschalik, N. & Bullock, S. L. Systematic Evaluation of *Drosophila* CRISPR Tools Reveals Safe and Robust Alternatives to Autonomous Gene Drives in Basic Research. *G3: Genes/Genomes/Genetics* **5**, 1493–1502 (2015).
34. Ledford, H. Riding the CRISPR wave. *Nature* **531**, 156–159 (2016).
35. Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-.)*. **346**, 1258096–1258096 (2014).
36. Wang, H., La Russa, M. & Qi, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 227–264 (2016).
37. Chavez, A. *et al.* Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat. Methods* **12**, 326–328 (2015).
38. Schmitz, M. L. & Baeuerle, P. A. The p53 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J.* **10**, 3805–3817 (1991).
39. Hardwick, J. M., Tse, L., Applegren, N., Nicholas, J. & Veluona, M. A. The Epstein-Barr Virus R Transactivator (Rta) Contains a Complex, Potent Activation Domain with Properties Different from Those of VP16. *J. Virol.* **66**, 5500–5508 (1992).
40. Lin, S., Ewen-Campen, B., Ni, X., Housden, B. E. & Perrimon, N. In vivo transcriptional activation using CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics* **201**, 433–442 (2015).
41. Pirrotta, V. Chromatin-silencing mechanisms in *Drosophila* maintain patterns of gene expression. *Trends Genet.* **13**, 314–318 (1997).
42. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**, 343–345 (2009).
43. Walter, M. F. *et al.* Effects of telomere length in *Drosophila melanogaster* on life span, fecundity, and fertility. *Chromosoma* **116**, 41–51 (2007).

44. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108 (2008).
45. Bieli, D. *et al.* The *Drosophila melanogaster* Mutants *apblot* and *apXasta* Affect an Essential apterous Wing Enhancer. *G3 (Bethesda)*. **5**, 1129–43 (2015).
46. Dong, P. D. S., Dicks, J. S. & Panganiban, G. Distal-less and homothorax regulate multiple targets to pattern the *Drosophila* antenna. *Development* **129**, 1967–1974 (2002).
47. Schaefer Kellie A., W.-H. W. D. F. C. S. H. T. A. G. B. V. B. M. Unexpected mutations after CRISPR – Cas9 editing in vivo. *Nat. Methods* **14**, 547–551 (2017).
48. Gilbert, L. A. *et al.* Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* **159**, 647–661 (2014).
49. Roch, F. & Akam, M. Ultrabithorax and the control of cell morphology in *Drosophila* halteres. *Development* **127**, 97–107 (2000).
50. Yao, L. C., Liaw, G. J., Pai, C. Y. & Sun, Y. H. A common mechanism for antenna-to-Leg transformation in *Drosophila*: suppression of homothorax transcription by four HOM-C genes. *Dev. Biol.* **211**, 268–276 (1999).
51. Duncan, D. M., Burgess, E. A. & Duncan, I. Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristopedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes Dev.* **12**, 1290–1303 (1998).
52. Saksouk, N., Simboeck, E. & Déjardin, J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* **8**, 3 (2015).
53. Andersen, P. R., Tirian, L., Vunjak, M. & Brennecke, J. A heterochromatin-dependent transcription machinery drives piRNA expression. *Nat. Publ. Gr.* **549**, 54–59 (2017).
54. Horlbeck, M. A. *et al.* Nucleosomes impede cas9 access to DNA in vivo and in vitro. *Elife* **5**, 1–21 (2016).
55. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Internal Organization of the Nucleus. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9915/>
56. Deininger, P. (1990). *Molecular cloning: A laboratory manual*: Edited by J. Sambrook, EF Fritsch, and T. Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (in 3 volumes). Second edition. 1626 pp.
57. Imaginal Discs. Lewis I. Held, Jr. The Interactive Fly Society for Developmental Biology's Web server. 1996. <https://www.sdbonline.org/sites/fly/lewheld/id71.htm>

58. Imaginal Discs. Lewis I. Held, Jr. The Interactive Fly Society for Developmental Biology's Web server. 1996. <https://www.sdbonline.org/sites/fly/lewheld/id61.htm>

ANEXOS

Anexo 1

Cuadro de Punnett general para la cruce de la línea de mosca con genotipo $gRNA/CyO;UAS:dCas9-VPR/TM6B,Tb,Hu$ con $\gamma^1w^*;Act5C-GAL4/CyO;+/+$. Se indica para cada genotipo, el fenotipo que se obtendría para cada línea hija.

	$gRNA; UAS:dCas9-VPR$	$gRNA; TM6B$	$CyO; UAS:dCas9-VPR$	$CyO;TM6B$
$Act5C-GAL4;+$	$\frac{gRNA}{Act5C - GAL4} ; \frac{UAS: dCas9 - VPR}{+}$ Fenotipo sin marcador	$\frac{gRNA}{Act5C - GAL4} ; \frac{TM6B}{+}$ Fenotipo tubby	$\frac{Act5C - GAL4}{CyO} ; \frac{UAS: dCas9 - VPR}{+}$ Fenotipo alas curly	$\frac{Act5C - GAL4}{CyO} ; \frac{TM6B}{+}$ Fenotipo alas curly y tubby
$CyO;+$	$\frac{gRNA}{CyO} ; \frac{UAS: dCas9 - VPR}{+}$ Fenotipo alas curly	$\frac{gRNA}{CyO} ; \frac{TM6B}{+}$ Fenotipo alas curly y tubby		

Anexo 2

Cruza con machos que poseían un driver específico de disco de ala de genotipo: $MS1096-GAL4/y;+;+;+;+$ con el fin de dirigir los daños de forma específica al ala, y enriquecerlos con respecto a los resultados con el driver de actina. La cruce fue realizada con hembras de la línea $+;+;gRNA_{Ubx}/CyO;UAS:dCas9-VPR/MKRS$. A partir de esta cruce, solo $\frac{1}{4}$ de las hembras resultantes se esperaba que presentaran algún defecto en el ala, dado que:

	$MS1096-GAL4;+;+;+$	$y;+;+$
$+;gRNA_{Ubx};UAS:dCas9-VPR$	$\frac{MS1096 - GAL4}{+} ; \frac{gRNA_{Ubx}}{+} ; \frac{UAS: dCas9 - VPR}{+}$ Fenotipo sin marcador	$\frac{+}{y} ; \frac{gRNA_{Ubx}}{+} ; \frac{UAS: dCas9 - VPR}{+}$ Fenotipo sin marcador
$+;gRNA_{Ubx};MKRS$	$\frac{MS1096 - GAL4}{+} ; \frac{gRNA_{Ubx}}{+} ; \frac{MKRS}{+}$ Fenotipo Stubble	$\frac{+}{y} ; \frac{gRNA_{Ubx}}{+} ; \frac{MKRS}{+}$ Fenotipo Stubble
$+;CyO;UAS:dCas9-VPR$	$\frac{MS1096 - GAL4}{+} ; \frac{+}{CyO} ; \frac{UAS: dCas9 - VPR}{+}$ Fenotipo alas curly	$\frac{+}{y} ; \frac{+}{CyO} ; \frac{UAS: dCas9 - VPR}{+}$ Fenotipo alas curly
$+;CyO;MKRS$	$\frac{MS1096 - GAL4}{+} ; \frac{+}{CyO} ; \frac{MKRS}{+}$ Fenotipo alas curly y Stubble	$\frac{+}{y} ; \frac{+}{CyO} ; \frac{MKRS}{+}$ Fenotipo alas curly y Stubble

Anexo 3

Cuadro de Punnett general para la cruce de la línea de mosca con genotipo $gRNA/CyO;UAS:dCas9-VPR/TM6B,Tb,Hu$ con $ap>GFP-GAL4/CyO,Tb;+/+$. Se indica para cada genotipo, el fenotipo que se obtendría para cada línea hija.

	$Ap>GFP-GAL4;+$	$CyO,Tb;+$
$gRNA_{Ubq};UAS:dCas9-VPR$	$\frac{gRNA}{Ap > GFP - GAL4} ; \frac{UAS: dCas9 - VPR}{+}$ Fenotipo sin marcador	$\frac{gRNA}{CyO_{Tb}} ; \frac{UAS: dCas9 - VPR}{+}$ Fenotipo alas curly y larvas tubby
$gRNA_{Ubq};TM6B$	$\frac{gRNA}{AP > GFP - GAL4} ; \frac{TM6B}{+}$ Fenotipo tubby	$\frac{gRNA}{CyO} ; \frac{TM6B}{+}$ Fenotipo alas Curly, larvas tubby
$CyO;UAS:dCas9-VPR$	$\frac{Ap > GFP - GAL4}{CyO} ; \frac{UAS: dCas9 - VPR}{+}$ Fenotipo alas curly	
$CyO;TM6B$	$\frac{Ap > GFP - GAL4}{CyO} ; \frac{TM6B}{+}$ Fenotipo alas curly y tubby	