



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El papel de CTCF en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
BIOL. AMEYALLI GÓMEZ ILESCAS

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Felix Recillas Targa
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
[Instituto de Investigación Biomédica Básica](#)
Dr. Luis B. Tovar y Romo
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Enero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas.....	3
Resumen.....	4
Abstract.....	5
1. Introducción.....	6
1.1 Regulación de la expresión durante el desarrollo.....	6
1.2 CTCF un factor esencial en la regulación génica durante el desarrollo.....	7
1.3 CTCF participa en el desarrollo y la función del sistema nervioso central de mamíferos.....	10
1.4 CTCF y otras proteínas insulator en <i>Drosophila melanogaster</i>	13
2. Justificación.....	17
3. Hipótesis.....	17
4. Objetivo.....	17
5. Material y métodos.....	18
6. Resultados.....	22
6.1 Establecimiento del sistema UAS-Gal4.....	22
6.2 La reducción de CTCF afecta la locomoción de <i>Drosophila melanogaster</i>	24
6.3 La disminución de CP190 y BEAF-32 no tiene un efecto en la locomoción de <i>Drosophila melanogaster</i>	26
7. Discusión.....	28
8. Conclusiones.....	30
9. Perspectivas.....	30
10. Anexo 1.....	31
11. Anexo 2.....	32
Referencias.....	35

ABREVIATURAS

Abd-B	<i>Abdominal-B (gen)</i>
Antp	<i>Antenapedia (gen)</i>
ARN Pol II	Polimerasa de ARN II
BEAF-32	Factor Asociado a Elementos Barrera/ <i>Boundary Element-Associated Factor</i>
CamKIIa	Calcio/Calmodulina Proteína quinasa II
ChIP	Inmunoprecipitación de la Cromatina
ChIP-ChIP	ChIP seguido de microarreglo
ChIP-seq	ChIP seguido de secuenciación
CP190	Proteína Centrosomal 190
CTCF	CCCTC-binding factor
FT	Factor Transcripcional
Gal4	Proteína reguladora de genes de respuesta a Galactosa
Hox	<i>Homeobox</i>
KD	<i>Knockdown</i>
IncARN	ARN largo no codificante / <i>long non-coding RNA</i>
PN	Progenitores neuronales
shARN	ARN interferente / <i>short hairpin RNA</i>
SNP	Polimorfismo de nucleótido único / <i>Single Nucleotide Polimorfism</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
TAD	Dominio Topológicamente Asociado/ <i>Topologic Associated Factor</i>
UAS	Elemento de activación río arriba
Ubx	<i>Ultrabithorax (gen)</i>
CNV	Cordón Nervioso Ventral
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild Type</i>
YY1	<i>Ying Yang 1</i>
ZF	Dedos de Zinc

RESUMEN

La regulación espacio-temporal de los patrones de transcripción es fundamental para el correcto desarrollo de un organismo. La organización tridimensional del genoma influye en la expresión génica, siendo específica para los diferentes linajes celulares. CTCF (*CCCTC-binding factor*) es un factor transcripcional importante para la organización tridimensional del genoma y para la regulación de la expresión génica. CTCF se une a secuencias genéticas en la base de asas de cromatina y en las fronteras de dominios topológicamente asociados (TAD's por sus siglas en inglés). En mamíferos, CTCF regula la proliferación y diferenciación de progenitores neuronales. La eliminación de *Ctcf* de neuronas post-mitóticas afecta procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. Los animales con esta eliminación también presentan problemas de locomoción. Estas observaciones indican que el papel de CTCF en sistema nervioso es dependiente del desarrollo y la población neuronal.

En *Drosophila melanogaster*, la contribución de CTCF en la arquitectura del genoma es controversial debido a la presencia de otras proteínas *insulator* como BEAF-32 y CP190. Dado que en vertebrados el transcrito de *Ctcf* está enriquecido en el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario y puesto que el mismo patrón de expresión se recapitula en embriones de *D. melanogaster*, entonces el estudiar este factor en el sistema nervioso de la mosca nos permitirá rastrear funciones conservadas y esclarecer el papel de CTCF en este organismo.

En éste trabajo caracterizamos la importancia de CTCF en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*. Mediante la técnica de *UAS-Gal4* dirigimos la expresión de shARNs contra las proteínas CTCF, BEAF-32 y CP190, en neuronas desde la etapa embrionaria. Nuestros resultados indican que reducir CTCF modifica el comportamiento locomotor en larvas y adultos, además de afectar la longevidad de los animales. Contrario a lo observado para CTCF, la reducción en CP190 no parece afectar el comportamiento locomotor en ninguna etapa, mientras que BEAF-32 aumenta el movimiento únicamente de larvas. A pesar de que se ha reportado que estas proteínas trabajan en sinergia para ciertos contextos celulares, también se ha visto que en neuronas la ocupación de CTCF en el genoma difiere a estas proteínas, especialmente en la frontera de TAD's asociadas a neuronas.



ABSTRACT

Spatio-temporal regulation of transcription patterns is essential for the proper development of an organism. The three-dimensional organization of the genome influences gene expression, being particular for different cell lineages. CTCF (CCCTC binding factor) is an important transcriptional factor for the three-dimensional organization of the genome and the regulation of gene expression. It binds to genetic sequences at the base of chromatin loops and TAD borders. In mammals, CTCF regulates the proliferation and differentiation of neuronal progenitors. To eliminate *Ctcf* from post-mitotic neurons affects cognitive processes such as learning and memory, animals with this elimination also have locomotion problems. These observations indicate that the role of CTCF in the nervous system is dependent on the developmental stage and the neuron population.

In *Drosophila melanogaster*, the contribution of CTCF in genome architecture is controversial due to the presence of other insulating proteins such as BEAF-32 and CP190. Since *Ctcf* transcripts are enriched in the nervous system during embryonic development of vertebrates and given that the same pattern of expression is recapitulated in embryos of *D. melanogaster*, then studying this factor in the fly's nervous system would help us to track conserved functions and would clarify the role of CTCF in this organism.

In this work, we characterized the importance of CTCF in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. Using the UAS-Gal4 technique, we directed the expression of shRNAs against CTCF, BEAF-32 and CP190 proteins, into neurons from the embryonic stage. Our results indicate that reducing CTCF modifies locomotor behavior in larvae and adults, in addition to affecting the longevity of animals. Contrary to what was followed for CTCF, reduction in CP190 levels does not seem to affect the locomotor behavior at any stage, while BEAF-32 appears to increase the movement of larvae. Although these proteins have been reported to work in synergy for certain cellular contexts, it has also been shown that the occupation of CTCF in neuron's genome differs from Cp190 and BEAF-32 proteins, especially at the border of TADs associated with neurons.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Regulación transcripcional durante el desarrollo

El desarrollo de un organismo depende de la regulación precisa de los programas de expresión génica, de tal forma que el mismo genoma pueda dar lugar a todos los tipos celulares durante la embriogénesis. Si hay defectos en los patrones de transcripción durante la embriogénesis, el fenotipo puede ser letal. La información necesaria para dar lugar a cada linaje celular está condensada de forma jerárquica dentro del núcleo en forma de cromatina, un complejo constituido por ADN, ARN y proteínas (Fig. 1A) La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, un segmento de 147pb de ADN asociado alrededor de un octámero de histonas que pueden sufrir modificaciones pos-traduccionales y afectar la expresión génica (Fig. 1B). En un nivel que comprende desde Kilobases (Kb) hasta Megabases (Mb), la cromatina se organiza en Dominios Topológicamente Asociados (TADs por sus siglas en inglés) y asas de cromatina que constituyen regiones del genoma con elevadas frecuencias de interacción, cuyas fronteras están demarcadas por proteínas regulatorias como CTCF. Mientras que el nivel más elevado de organización y compactación son los cromosomas metafásicos (Fig. 1A) (Kornberg & Lorch 1999; Luger et al. 1997). Esta organización tridimensional es importante en la regulación de procesos fisiológicos como el desarrollo y la diferenciación, al igual que afecta la recombinación y replicación del ADN (Pope et al. 2014; Hu et al. 2015; Lupiáñez et al. 2015).

Los cambios transcripcionales que ocurren durante un proceso de desarrollo involucran modificaciones a la cromatina epigenéticas ya que inducen cambios a nivel de la cromatina y no sobre la secuencia de ADN que impactan en la expresión de genes, además son cambios heredables. En un nivel local, la densidad de nucleosomas y sus modificaciones pos-traduccionales son factores que modifican la accesibilidad a secuencias de ADN que sirven como motivos de unión para proteínas específicas, denominadas factores de transcripción (FT) (Albanus et al. 2019; Rudnizky et al. 2019). Los FT son proteínas que pueden cambiar las tasas de transcripción de los genes al unirse a secuencias *enhancer* y promotores, actúan individualmente o en sinergia para modificar la estabilidad de los nucleosomas y crear espacios accesibles a la maquinaria de transcripción (Fig. 1B) (Zaret and Carroll 2011; Stampfel et al. 2015).

Debido a la complejidad de las interacciones tridimensionales para regular la transcripción en diferentes procesos biológicos, se ha propuesto que existen factores transcripcionales encargados no solo de la transcripción si no principalmente de mediar dichas interacciones. Entre los FT mayor caracterizados se encuentra el *CCCTC-binding factor* (CTCF), un factor estructural de unión a ADN que se encuentra continuamente en la base de las asas de cromatina (Fig 2A). Por su estructura, conservación y sus amplios patrones de unión en

diferentes tipos celulares, CTCF es una proteína estructural que se encuentra asociado a múltiples procesos de desarrollo.

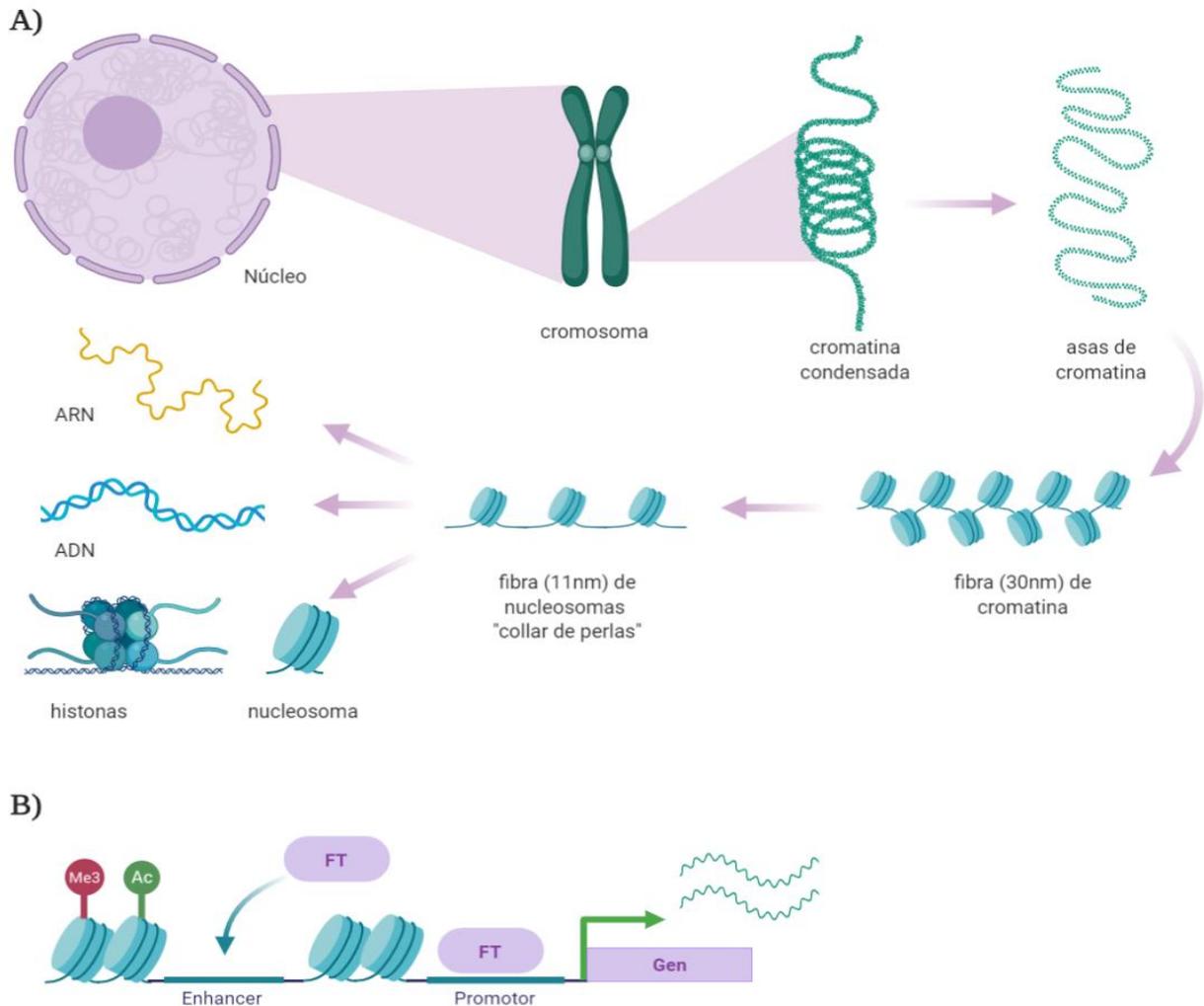


Fig. 1. Niveles de compactación de la cromatina. El ADN se encuentra jerárquicamente compactado dentro del núcleo. El cromosoma en metafase representa la forma más condensada (700nm cada cromátida), cada sección de la cromátida es resultado del enrollamiento de cromatina condensada que contiene asas de cromatina hacia el interior. Las asas de cromatina son elementos dinámicos formados por fibras de nucleosomas enrollados sobre sí (30nm y 11nm). Al nivel más simple, la cromatina es un complejo formado por ARN, ADN y proteínas, el ADN se enrolla alrededor de ocho histonas para formar un nucleosoma, la unidad básica de la cromatina. B) Los cambios en la condensación de nucleosomas por las modificaciones pos-traduccionales como metilación (Me3), acetilación (Ac) y la ocupación de factores transcripcionales (FT) afectan la transcripción génica, al igual que la actividad de la cromatina en otros niveles estructurales y su posición dentro del núcleo.

1.2 CTCF un factor esencial en la regulación génica durante el desarrollo

CTCF fue identificado como un factor de transcripción asociado al promotor del gen *Myc* en pollo (Lobanenkov et al. 1990; Klenova et al. 1993). CTCF Está altamente conservado en animales bilaterales y se plantea que su origen evolutivo surgió en los últimos ancestros comunes previos a la diversificación entre deuterostomados y protostomados (Heger et al. 2012). Situando a CTCF muy temprano en la evolución del reino Animal (*Metazoa*). Sin embargo; existen grupos de invertebrados como los nemátodos y los *Platyhelminthes* donde *Ctcf* está ausente (Heger et al. 2009, 2012). Su expresión es ubicua en casi todos los tejidos de *Metazoa*, pero el patrón de distribución nuclear y los niveles de expresión varían según el tejido, sugiriendo un tipo de regulación específica según el tipo celular y momento del desarrollo (Phillips and Corces 2009).

Existen varias características estructurales que sitúan a CTCF como un factor fundamental para la regulación de la expresión génica y la organización de la cromatina en vertebrados. La proteína se compone de tres dominios importantes para su versatilidad en la unión a ADN: un dominio amino-terminal, un dominio central de unión al ADN compuesto por once dedos de Zinc (C_2H_2) y un dominio carboxilo-terminal (Fig. 2B) (Klenova et al. 1993; Filippova et al. 1996; Hashimoto et al. 2017; Arzate-Mejía et al. 2018). A diferencia de otras proteínas con dedos de Zinc, se ha probado que el dominio carboxilo-terminal permite su oligomerización y que cada dominio de la proteína funciona como plataforma para la interacción con otros complejos estructurales, como YY1 y el complejo de las cohesinas (Beagan et al. 2017; Hansen et al. 2017). Además interactúa con ARN para estabilizar su propia dimerización y la unión con ADN (Kung et al. 2015; Saldana-Meyer et al. 2014; Hansen et al. 2018). Debido a su capacidad para unirse a ADN y formar dímeros, a CTCF se le encuentra frecuentemente en la base de las asas de cromatina junto a otras proteínas (Fig. 2A). Perturbar la estabilidad de las asas de cromatina o los sitios de unión de CTCF afecta la transcripción de los genes cercanos y el desarrollo (Lupiáñez et al. 2015).

Se sabe que CTCF acerca sus sitios de unión en orientación convergente e interactúa en conjunto con el complejo de cohesinas para formar y estabilizar las asas de cromatina en un modelo denominado “modelo de extrusión de asas” (Sanborn et al. 2015). Los sitios de unión para CTCF están ampliamente distribuidos a lo largo del genoma y sus patrones de ocupación están relacionados con la regulación transcripcional y arquitectónica del genoma. Por medio de técnicas ChIP-ChIP y ChIP-seq en humano se estimaron 50,000 a 66, 800 sitios ocupados por CTCF, de los cuales un 40% difieren según el tipo celular (Beagan et al. 2017; Chen et al. 2012). Dos estudios independientes señalan la distribución de los sitios de unión de CTCF en intrones (22-30%), exones (5-12%), promotores (20%) y regiones intergénicas (46-53%) (Chen et al. 2012;

Kim et al. 2007). Su amplio espectro de ocupación en el genoma y su capacidad para generar asas de cromatina son características clave para la función reguladora de CTCF en el desarrollo (Bonev et al. 2017).

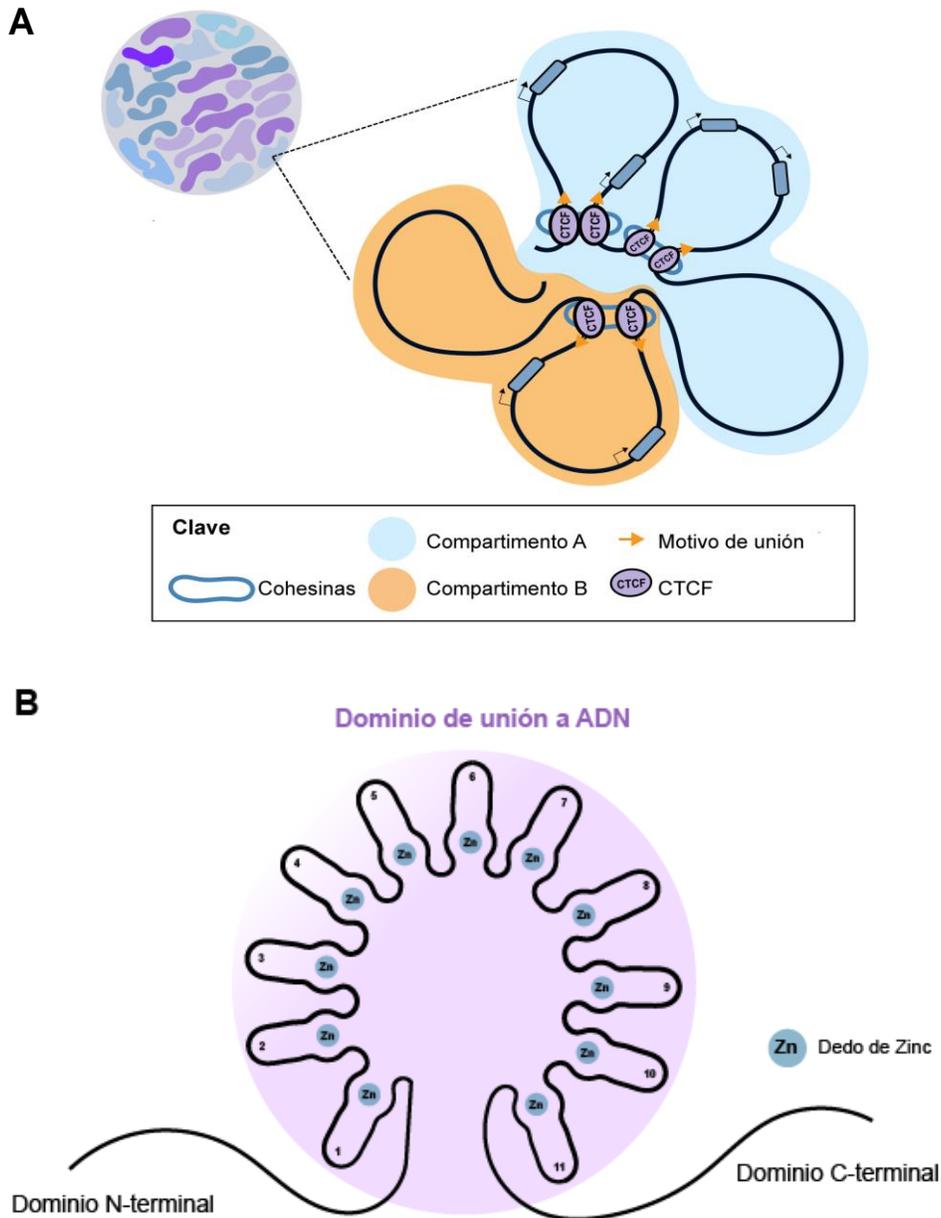


Fig. 2. Estructura de CTCF y distribución de su motivo de unión. A) Además de adquirir posiciones específicas dentro del núcleo, los cromosomas se compactan de forma funcional. Se pueden distinguir dos tipos de compartimentos: activo (compartimento A) e inactivo (compartimento B). Dentro de éstos las asas de cromatina se mantienen por la actividad de CTCF y el complejo de las cohesinas. B) Estructura representativa de CTCF, el dominio central de unión a ADN está formado por once dedos de Zinc (Zn). (Modificado de Arzate-Mejía *et al.* 2018).

CTCF puede actuar como activador o represor de la transcripción de acuerdo al tipo celular y el momento del desarrollo en el que se analice. Por ejemplo, está involucrado en el silenciamiento del cromosoma X a través de su interacción con ADN y lncARN's como *Xist* y *Tsix* (Kung et al. 2015), su unión a ADN es dependiente de la metilación por lo que está involucrado también en la impronta génica (Hashimoto et al. 2017). Mantiene la transcripción activa dentro de las asas de cromatina y de esa forma evita también la activación aberrante de otros genes. La eliminación o inversión de sus motivos de unión desregula la expresión génica y perturba las fronteras de una TAD (Lupiáñez et al. 2015; Nora et al. 2017). De forma muy relevante para invertebrados como *Drosophila melanogaster*, CTCF tiene conservada su actividad *insulator* con la que puede bloquear la acción de elementos regulatorios tipo *enhancer* y puede establecer barreras entre diferentes compartimentos de cromatina (Ohlson et al. 2010; Arzate-Mejía et al. 2018). Como ya se mencionó, todos estos mecanismos son dependientes del contexto epigenético, el desarrollo y el tipo celular.

Además de su relevancia a nivel molecular, esta proteína tiene un papel fundamental en varios contextos fisiológicos y patológicos, muchos de ellos relacionados al desarrollo. Principalmente, la eliminación de CTCF en ratón y pez cebra desde etapas tempranas del desarrollo es letal para ambos organismos en fase de blástula y a las 24h post-fertilización respectivamente (Carmona-Aldana et al. 2018; Sams et al. 2016; Delgado-Olguín et al. 2011). Incluso eliminar únicamente la contribución materna en mamíferos impide la correcta implantación del embrión y resulta imposible continuar con el desarrollo (Moore et al. 2012). Es un regulador espacio-temporal de la transcripción de los genes *Homeobox (Hox)*, un conjunto de genes del desarrollo fundamentales para establecer el patrón corporal en animales (Goodman 2002; Mann et al. 2009; Narendra et al. 2015, 2016) y las conexiones neuronales complejas como el caso de las motoneuronas en mosca y mamíferos (Jung et al. 2010; Philippidou and Dasen 2013; Baek et al. 2013; Narendra et al. 2015). Los ensayos con ARN intererente (shARN) para disminuir CTCF en diferentes tejidos, muestran efectos en el crecimiento, diferenciación, muerte celular y proliferación que son dependientes del linaje celular (Torrano et al. 2005). También participa en la maduración de células del sistema inmunológico (Heath et al. 2008) y en procesos patológicos como el cáncer (Kemp et al. 2014; Aitken et al. 2018). Por las observaciones anteriores parece ser que este factor es fundamental para diferentes sistemas durante el desarrollo de animales vertebrados e invertebrados.

1.3 CTCF participa en el desarrollo y la función del sistema nervioso central de mamíferos

Desde etapas tempranas en el desarrollo embrionario, los transcritos de *Ctcf* adquieren una distribución particularmente enriquecida en el sistema nervioso y los órganos sensoriales, esta tendencia se conserva en cuatro grupos importantes dentro del reino animal: mamíferos, anfibios, peces e insectos (Fig. 3) (Delgado-Olguín et al. 2011; Moore et al. 2012). Dicha distribución incluso se mantiene en ratones adultos donde los niveles más elevados del transcrito de *Ctcf* se encuentran en hipocampo, amígdala y corteza. Además los niveles de proteína se ven preferencialmente localizados en neuronas al compararse con oligodendrocitos y astrocitos dentro de las mismas estructuras cerebrales (Sams et al. 2016), lo cual sugiere que CTCF juega un papel importante en este tejido durante el desarrollo embrionario de vertebrados y su importancia se mantiene hasta adultos donde su ausencia podría afectar la función neuronal.

El sistema nervioso central de mamíferos fue el primer sistema donde se describió la función de CTCF durante el desarrollo embrionario y posnatal (Fig. 4). En ratones, la eliminación de *Ctcf* sobre progenitores neuronales (PN) de telencéfalo promueve su apoptosis y compromete seriamente su diferenciación. Como resultado los embriones desarrollan microcefalia y el animal muere antes del nacimiento (Watson et al. 2014), mientras que la eliminación condicional de *Ctcf* en neuronas de telencéfalo durante su desarrollo (usando una línea de ratón *Nex-Cre*), disminuye la ramificación de las dendritas de corteza e hipocampo. Éste fenotipo se asocia a la des-regulación de las protocaderinas (*Pcdh*), un conjunto de genes regulados por CTCF que tienen una función vital en la diferenciación neuronal (Golan-Mashiach et al. 2012). Además los ratones *Ctcf*^{*Nex-Cre*} presentaron retraso en el crecimiento, bajo peso y reflejos motores anormales como el *claspig* de las extremidades. El fenotipo es letal a las 4 semanas después del nacimiento (Fig.4) (Hirayama et al. 2012).

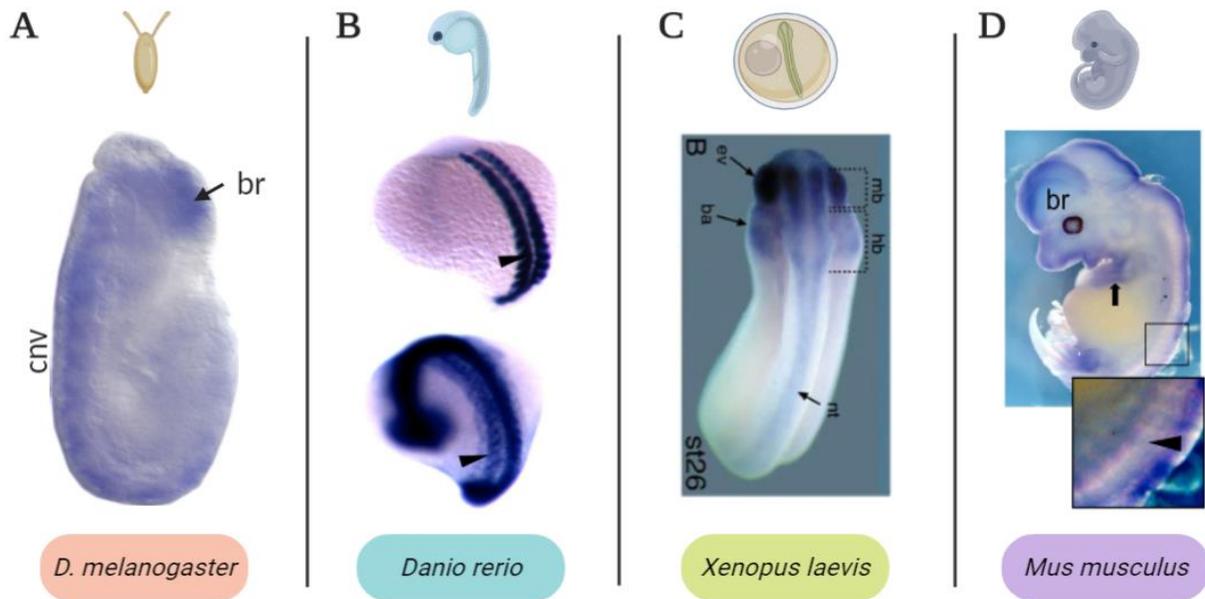


Fig. 3. El transcrito de *Ctf* se distribuye preferencialmente al SNC durante el desarrollo embrionario. Hibridaciones *in situ* que muestran en azul la localización del transcrito de *Ctf* en diferentes etapas embrionarias de A) La mosca *Drosophila melanogaster*, la señal está enriquecida en br: cerebro y cnv: cordón nervioso ventral (Tomada de *FlyExpress*) B) El pez *Danio rerio* a 16-17 horas pos-fertilización (hpf), *Ctf* está presente en las somitas y a 72hpf se restringe al cerebro, intestino y en las somitas (flechas) (Delgado-Olguín et al. 2011). C) La rana *Xenopus laevis* en estadio 26. La señal se observa en anp: placa neural anterior; mb: cerebro medio; hb: cerebro posterior y ev: ojo (Burke et al. 2002). D) El ratón *Mus musculus* en el estadio embrionario 10, de nuevo *Ctf* está presente en br: cerebro, en las somitas y en los primordios de las extremidades (flechas) (Delgado-Olguín et al. 2011).

En neuronas maduras, dos estudios independientes realizaron una eliminación condicional de *Ctf* en neuronas post-mitóticas de prosencéfalo (Sams et al. 2016; McGill et al. 2018). Ambos estudios muestran que la densidad de espinas dendríticas en corteza e hipocampo disminuye al igual que la potenciación a largo plazo (Sams et al. 2016; McGill et al. 2018). A un año de edad se reportó un reflejo motor anormal (*claspings*) de las patas traseras en los ratones *Ctf*^{KO}, lo cual sugiere una disfunción de neuronas motoras primarias. A pesar de que no se encontraron diferencias en la fuerza y agilidad para ejecutar los movimientos básicos, en el mismo estudio se demostró que los ratones *Ctf*^{KO} tardan más tiempo en descender por una plataforma inclinada y por el contrario resistían menor tiempo en una prueba de plataforma elevada que evalúa su equilibrio. Ambas situaciones requieren de una coordinación motora fina en las extremidades (McGill et al. 2018). Además de los problemas motores los ratones presentaron deficiencias en el aprendizaje relacionadas a cambios en la expresión de los genes *Arc* y *Bdnf*. Ambos genes están asociados al aprendizaje y se probó que CTCF está enriquecido en los genes y puede mediar las interacciones tridimensionales de sus promotores (Sams et al. 2016).

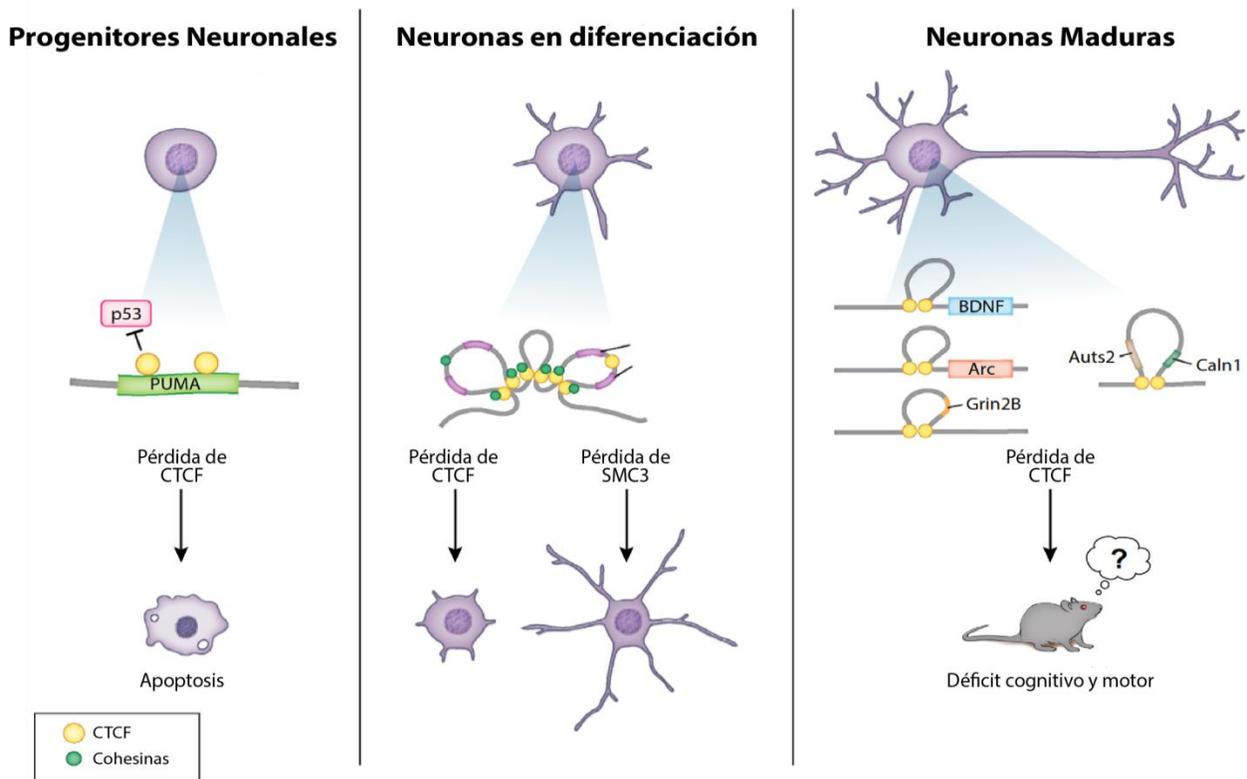


Fig. 4. Resumen de las evidencias de CTCF en el Sistema Nervioso de mamíferos. Estudios independientes han descrito el papel de CTCF en diferentes momentos del desarrollo del cerebro de ratón. En progenitores neuronales la eliminación de *Ctcf* se asocia con cambios en la expresión y resulta en apoptosis. Eliminar *Ctcf* durante la diferenciación de neuronas disminuye la arborización de neuronas adultas. Eliminar *Ctcf* en neuronas maduras disminuye el número de espinas dendríticas, provoca problemas motores y cognitivos. Aunque algunos fenotipos coinciden entre los diferentes estudios, los datos indican que el estadio del desarrollo y la región anatómica donde se realice la eliminación de CTCF tiene una influencia particular en el fenotipo resultante (Modificada de Davis, Onn, & Elliott, 2018).

En humanos, las mutaciones en el gen de CTCF están asociadas a discapacidad intelectual (Bastaki et al. 2017). Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en el gen de CTCF también tienen una fuerte asociación con la esquizofrenia (Juraeva et al. 2014). Además, otras mutaciones detectadas fuera del cuerpo del gen y en algunos sitios de unión de la proteína, también se relacionan a deficiencias cognitivo-conductuales como el síndrome de X-frágil (Avitzour et al. 2014) y la Ataxia de Friedreich (De Biase et al. 2009). La evidencia genética y los reportes experimentales demuestran que CTCF tiene un papel crítico para el desarrollo y el buen funcionamiento del sistema nervioso en mamíferos (Fig. 4). Los experimentos *in vivo* sugieren que CTCF tiene un papel particular según el estadio de desarrollo y la región anatómica donde se estudia. Por ello resulta importante contrastar el papel de CTCF en diferentes subtipos neuronales, en otras estructuras no exploradas así como en otros modelos animales donde el papel de CTCF puede ser relevante.

1.4 CTCF y otras proteínas *insulator* en *Drosophila melanogaster*

En contraste con animales vertebrados, el genoma de la mosca es mucho más compacto y la variedad de proteínas *insulator* es mayor (Bushey et al. 2009; Van Bortle et al. 2012; Hou et al. 2012; Heger et al. 2013). Sugiriendo que la necesidad de separar elementos regulatorios mediante proteínas *insulator* es diferente en ambos genomas. De todas las proteínas *insulator* presentes en *Drosophila*, CTCF es la única proteína que se ha detectado conservada en vertebrados. El ortólogo de CTCF en *D. melanogaster* fue caracterizado por primera vez en 2005. Su dominio de unión a DNA de 11 dedos de zinc se encuentra conservado y al igual que en mamíferos se le describió como un factor transcripcional con localización nuclear (Moon et al. 2005). Al igual que en vertebrados, CTCF se puede unir a DNA distribuido en promotores (44.55%), regiones intergénicas (23.88%), intrones (25.57%) y (6%) en exones (Ni et al. 2012). Su primer función reportada en *Drosophila melanogaster* fue como un bloqueador de la actividad *enhancer* sobre el locus *Abd-B*, un gen *Hox* que determina la identidad de los segmentos abdominales de la mosca (Moon et al. 2005).

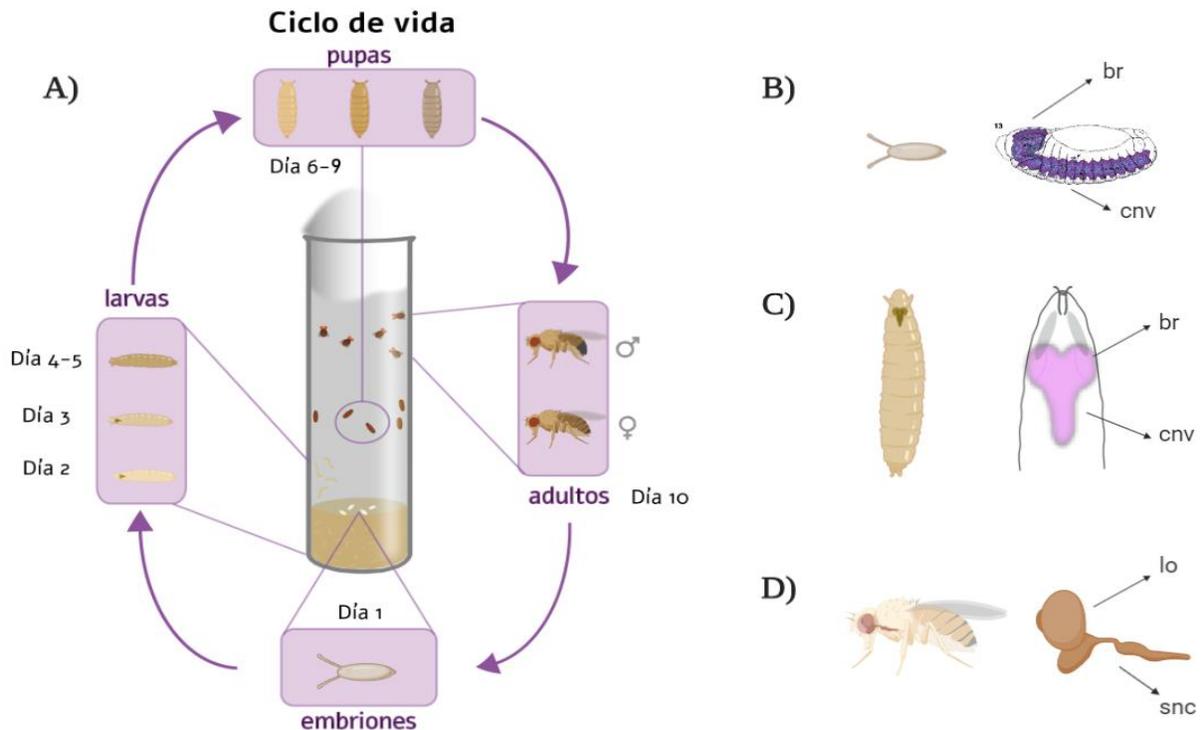


Fig. 5. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. A) La imagen representa el ciclo completo de una mosca a 25°C (9-10 días). Se observa un vial de crecimiento donde coexisten los cuatro estadios de desarrollo de la mosca: embrión, larva, pupa y moscas adultas. La etapa larvaria consta de tres estadios, seguidos por el periodo de pupa donde ocurre la metamorfosis, después de la cual la mosca adulta eclosiona, siendo sexualmente madura hasta las 8-12 hrs posteriores. En la etapa larvaria y adulta hay características que evidencian el dimorfismo sexual. B) Embrión y representación de los componentes del sistema nervioso central (br: cerebro, lóbulos; cnv: cordón nervioso ventral). C) Larva y esquema representativo del sistema nervioso central. D) Mosca adulta y esquema representativo del snc: sistema nervioso central, lo: lóbulo óptico.

Inicialmente se les reconoció a las proteínas *insulator* la habilidad de elementos barrera para demarcar las fronteras de cromatina e impedir la propagación de la heterocromatina, además de actuar como bloqueadores de la actividad de elementos *enhancer*. Sin embargo; se ha demostrado que éstas proteínas trabajan en complejos multi-protéicos que pueden mediar interacciones inter e intra-cromosómicas, de tal forma que impactan en la organización nuclear y la regulación génica (Gerasimova et al. 2007; Van Bortle et al. 2012). Particularmente las proteínas CTCF, Suppressor of Hairy-wing (Su(Hw)) y BEAF-32 (Boundary Element-Associated Factor), sobrelapan en sitios específicos del genoma de la mosca, aunque tienen motivos de unión diferentes (Van Bortle et al. 2012). Además, las tres proteínas pueden reclutar por su cuenta y en conjunto a la proteína CP190 (Gerasimova et al. 2007; Bushey et al. 2009; Van Bortle et al. 2012). CP190 tiene un dominio de interacción con estas proteínas y también puede formar homodímeros (Bonchuk et al. 2011). En especial, se ha visto que la unión de esta proteína es necesaria para la actividad *insulator* de CTCF y Su(Hw) (Bonchuk et al. 2015; Melnikova et al. 2018).

En *Drosophila*, CTCF es fundamental para la regulación transcripcional en el desarrollo embrionario de la mosca, mutaciones en el *locus* de *CTCF* resultan en la desregulación de los genes *Hox* generando fenotipos homeóticos severos (Mohan et al. 2007). En moscas *CTCF^{KO}* donde además se ha eliminado la contribución materna, la falta de *CTCF* es letal en la etapa de pupa, previo a la eclosión de los adultos a diferencia de animales vertebrados, donde la letalidad es embrionaria. Sin embargo, los genes *Hox* están desregulados también en éste modelo (Gambetta and Furlong 2018). Se sabe que la regulación de los genes *Hox* por parte de CTCF está muy conservada, con sitios de unión para CTCF que se pueden rastrear hasta artrópodos.

Como modelo de estudio *Drosophila* presenta facilidades importantes. Su ciclo de vida es relativamente corto y genera una progenie numerosa. A 25°C su ciclo de vida oscila entre 9 y 10 días (Fig. 5), reducir la temperatura puede influir disminuyendo la duración de este proceso y viceversa al aumentar la temperatura del cultivo (Hales et al. 2015). En condiciones de cultivo a 25°C, los huevos son depositados sobre el alimento después de ser fertilizados, las larvas eclosionan 22-24 horas después de la oviposición. La etapa larvaria consta de 3 *instars* (estadios) de crecimiento (L1, L2 y L3), las larvas en L3 son utilizadas normalmente porque su manejo es más sencillo y puede extraerse el SNC de estos animales (Fig. 5C) (Ashburner et al. 2005). Después del tercer *instar* larvario, el animal desarrolla una cobertura llamada "pupa" mediante el endurecimiento de su cutícula para entrar en metamorfosis (Hales et al. 2015). Las células de la larva comienzan a degenerarse y las estructuras adultas se forman a partir de 19 discos imaginales que se originaron en el estado larvario. Las moscas adultas eclosionan en el 9°

o 10° día y se vuelven sexualmente maduras a las 8-12 horas posteriores (Hales et al. 2015; Truman 1990).

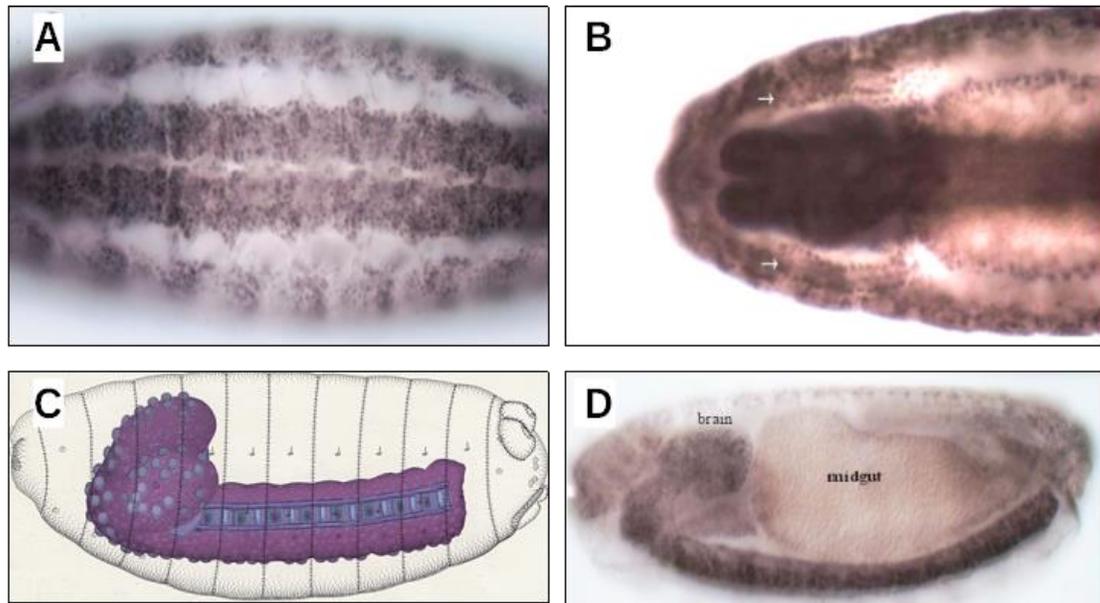


Fig. 6. Distribución de CTCF durante en el desarrollo embrionario de la mosca. Detección de la proteína por el anticuerpo anti-CTCF en embriones de mosca. A-B) Visualización dorsal de la proteína en el sistema nervioso y las glándulas salivares (flechas) de embriones en estadio 15. C) Esquema del embrión en estadio 17 y representación del sistema nervioso central en morado D) Visualización de la proteína enriquecida en el cerebro, intestino y cordón nervioso ventral del embrión en estadio 17 (Modificada de Moon et al. 2005).

Al igual que en otros animales a *CTCF* se le puede encontrar distribuido en el sistema nervioso de *D. melanogaster* desde etapa embrionaria (Fig. 3A). Además la proteína en otros estadios del desarrollo coincide con la localización del transcrito (Fig. 6). El SNC de la larva consiste de dos lóbulos, localizados en la parte anterior de la larva y una Cordón Nervioso Ventral (CNV), una estructura análoga a la médula espinal de vertebrados que se encuentra en la zona torácico-abdominal y está segmentada (Truman 1990; Nose *et al.* 2017). Además, se pueden realizar más de 60 pruebas conductuales con la mosca, desde ensayos motores hasta pruebas que evalúan conductas sociales complejas como el cortejo y la agresividad (McKellar and Wytttenbach 2017). Sin embargo, en la mosca no existe algún reporte sobre la función de CTCF en el sistema nervioso.

2. JUSTIFICACIÓN

De la misma forma que en animales vertebrados, en *Drosophila melanogaster* los transcritos y la proteína CTCF se encuentran enriquecidos en el sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario, su eliminación es letal para el organismo en etapa de pupa. Sin embargo; su papel funcional en el sistema nervioso no ha sido descrito hasta el momento. El objetivo de este proyecto es caracterizar el papel funcional del factor CTCF en el sistema nervioso de *D. melanogaster* y así contribuir al entendimiento de las funciones de CTCF en la mosca.

3. HIPÓTESIS

En *Drosophila* CTCF es necesario para el desarrollo correcto del organismo, la reducción de CTCF en neuronas durante el desarrollo embrionario alterará la función del sistema nervioso.

4. OBJETIVO

Determinar el papel de CTCF en el desarrollo y función del sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*.

4.1 Objetivos particulares

1. Dirigir la expresión de un *shARN* contra *CTCF*, *BEAF-32* y *Cp190* al sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*
2. Evaluar cambios en el comportamiento de las moscas *CTCF^{KD}*, *BEAF-32^{KD}* y *Cp190^{KD}*
3. Validar el modelo *CTCF^{KD}* en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y cruzas

Las siguientes cepas fueron utilizadas en este estudio para generar los organismos $CTCF^{KD}$, $Cp190^{KD}$, $BEAF-32^{KD}$:

- a. (WT $CTCF^{sh1}$) de *Bloomington Drosophila Stock Center*, #35354. Contiene insertado (Chr 3, 3L:11070538..11070538), el elemento *UAS* y un *shARN* contra *CTCF*.
- b. (WT $CTCF^{sh2}$) de *Bloomington Drosophila Stock Center*, #40850. Cepa que contiene insertado (Chr 2, 2L:5108448..5108448), un segundo *shARN* contra *CTCF*, bajo el control del elemento el elemento *UAS*.
- c. (WT *Elav-Gal4*) de *Bloomington Drosophila Stock Center*, #25750. Cepa que contiene insertado (Chr X, X:523350..523350), el factor *Gal4* bajo el control de *Elav*.
- d. (WT $Cp190^{sh1}$) de *Bloomington Drosophila Stock Center*, #42536. Contiene un *shARN* interferente contra el insulator CP190 (Chr 2, 2L:5108448..5108448).
- e. (WT $Cp190^{sh2}$) de *Bloomington Drosophila Stock Center*, #33903. Contiene un segundo *shARN* interferente contra CP190 (Chr 3, 3L:11070538..11070538).
- f. (WT $BEAF-32^{sh1}$) de *Bloomington Drosophila Stock Center*, #29734. Contiene un *ARN* interferente contra la proteína BEAF-32 (Chr 3, 3L:11070538..11070538).

La secuencia de los elementos interferentes se obtuvo del Proyecto “*Transgenic RNAi Project*” donde fueron creados y los elementos se mapearon al genoma de *Drosophila melanogaster* (Anexo 1). Los animales se mantuvieron a 25°C en viales con medio casero (levadura, agar, grenetina y piloncillo). Se eligió el elemento *Elav* (*Embryonic Lethal Abnormal Vision system*), un marcador pan-neural contenido en la cepa WT *Elav-Gal4* para dirigir la expresión de la proteína Gal4 al sistema nervioso de la mosca (Yao et al. 1994; Berger et al. 2007). Las cruzas se realizaron usando moscas hembras (E) y machos (U) de la cepa *Elav-Gal4*.

Extracción de proteína en cabezas de mosca y cerebros de larva.

Individualmente, cada larva es colocada bajo el microscopio de disección en un portaobjetos cóncavo y es sumergida en PBS. Se utilizan dos pinzas de disección, con la primera se sujeta el abdomen de la larva y las pinzas en la mano dominante desprenden las partes quitinosas de la boca de la larva junto con órganos internos anteriores, como el cerebro, las glándulas salivales y los discos imaginales. Posteriormente con ambas pinzas se aísla el cerebro del resto de los órganos para evitar contaminación. El tejido se coloca en una solución fría de PBS con una mezcla de inhibidores de proteasas (Aprotinina; Leupeptina; Pepstatina; PMSF y Benzamidina). Se colectaron ≥ 40 cerebros de larva por muestra. La solución de PBS es sustituida por *buffer* de lisis RIPA (Tris-Cl (pH 8) 10mM; EDTA 1mM; EGTA 0.5mM; Tritón X-100 al 1%; Desoxicolato de sodio al 0.1%;

SDS al 0.1%; NaCl 140mM), en una relación 1:1 o 1:1.5 con respecto al volumen de tejido extraído. La proteína fue recuperada del sobrenadante por centrifugación (13500 rpm, 5 min, 4°C). El material se cuantificó por el método de Bradford de Bio-Rad® de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Para los organismos adultos, se utilizaron cabezas de moscas de 2 días de edad. Las cabezas fueron tratadas con *buffer* RIPA (Tris-Cl (pH 8.0) 10mM, EDTA 1mM, EGTA 0.5mM, Tritón x-100 1%, Deoxicolato de Sodio 0.1%, SDS 0.1%, NaCl 140mM), e inhibidores de proteasas (Aprotinina; Leupeptina; Pepstatina; PMSF y Benzamidina). Se utilizaron de 20 a 50 cabezas de mosca por muestra. Cada muestra fue sonicada en *buffer* de lisis (20 Hz, 1 min, pulsos de 2 seg), y la proteína se recuperó del sobrenadante después de su centrifugación.

Western Blot (WB)

Todas las muestras provenientes de larvas o adultos fueron cuantificadas por el método de Bradford. Cada muestra fue cargada en geles SDS-PAGE a concentraciones finales de 10 – 20µg y *buffer* de carga Laemmli. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Millipore® 0.45 µm) y se procedió a su inmunodetección utilizando los anticuerpos y diluciones listados (Tabla2).

Tabla 2. Estandarización de anticuerpos

Anticuerpo	Antígeno	Origen	Diluciones estandarizadas
CTCF	CTCF	New England Peptide	1:250, 1:500, 1:750, 1:1000, 1:1750
JLA-20	Actina	Hybridoma Bank	1:250, 1:500, 1:750, 1:1000
E7	Tubulina	Hybridoma Bank	1:250, 1:500, 1:750, 1:1000

Ensayos de Inmunofluorescencia

Una vez extraídos los cerebros se mantuvieron en PBS 1x frío con inhibidores de proteasas (Aprotinina; Leupeptina; Pepstatina; PMSF y Benzamidina) hasta terminar la extracción, nunca por un tiempo mayor a una hora. Posteriormente fueron fijados en Formaldehído (4%) durante 20min, se lavaron 10min con PBS-T (Tritón X-100 al 0.1% en PBS) y fueron reservados a 4°C hasta su inmunotinción. Después de lavar los cerebros se bloquearon durante 30min en BSA al 10% en PBS-T al 0.3% y se incubaron en la misma solución durante una noche con el anticuerpo primario dirigido a CTCF en una dilución 1:50. Posteriormente se lavaron 3 veces (10 min cada una) en PBS-T al 0.1% y se bloquearon nuevamente durante 30min. Los cerebros se incubaron en la misma solución de bloqueo durante 2hrs a temperatura ambiente con el anticuerpo Alexa488 anti-

conejo en una dilución 1:300. Posteriormente se lavaron 3 veces por 10min en PBST 0.1%.

Las muestras se montaron en microscopio estereoscópico. Se visualizaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 Airyscan. Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software Fiji de ImageJ, se seleccionaron 20 células en diferentes planos focales para cada muestra. El área analizada se seleccionó tomando en cuenta únicamente las células que coincidían con la señal de DAPI y se obtuvo el valor de intensidad de fluorescencia (*mean gray value*) para cada célula seleccionada.

Distancia entre el alimento y la formación de la pupa

La altura de las pupas dentro del vial de cultivo refleja el movimiento de las larvas en tercer estadio silvestres que presentan una tendencia a escalar fuera de su comida para generar pupas y comenzar la etapa de metamorfosis. Veinte a treinta larvas por vial en tercer instar fueron colectadas y aisladas en viales frescos, la temperatura del cultivo se mantuvo a TA. Después de dos días se capturó la altura máxima de las pupas respecto a su comida dentro del vial y se compararon las cepas parentales (WT) contra las cruza (Modificado de Muñoz-Alarcón et al. 2007).

Ensayo de escalado (Geotaxia negativa)

Las moscas adultas presentan una geotaxia negativa o tendencia innata a escalar. Moscas de dos y ocho días de edad fueron colocadas en grupos de 20-25 individuos dentro de una probeta de 100mL. Las moscas fueron llevadas al fondo y se observaron durante un lapso de 2 minutos. Por medio de video se documentó cada 10 segundos el porcentaje de moscas por genotipo, que eran capaces de escalar hasta una altura predeterminada (16.5 cm aproximadamente). Un mínimo de tres viales por genotipo fueron evaluados (Modificado de Madabattula et al. 2015).

Tiempo de vida

Para explorar la repercusión en la esperanza de vida por la disminución de CTCF en el sistema nervioso, comparó el tiempo de vida de las moscas resultantes de la crua contra sus progenitoras como controles (Lijima *et al.* 2004). Las moscas fueron separadas por sexos y colocadas horas después de eclosionar en viales con medio estándar. A diferencia de su mantenimiento normal, estos viales no fueron adicionados con levadura en polvo, debido al fenotipo locomotor y a que la levadura tiende a humedecerse con el tiempo y atrapa a las moscas que caen en ella. Los viales se mantuvieron a 25°C y las moscas se transfirieron a viales nuevos al menos cada cuarto días. Las moscas muertas fueron registradas para generar una curva de supervida (Modificado de Joss J.P. *et al.* 2018).

Extracción de ARN

Para analizar los cambios en la expresión, se extrajo ARN de cerebros de larva en 3^{er} estadio. Los cerebros fueron congelados en Nitrógeno líquido y almacenados hasta la extracción de ARN. Se utilizó el método de Trizol Reagent (Invitrogen, #15596026); las muestras fueron resuspendidas en 1mL de Trizol y posteriormente se agregaron 200µl de Cloroformo para separar por centrifugación la fase que contenía ARN. La fase que contiene ARN se aisló en 500µl de Isopropanol para precipitar el material durante una noche. El ARN se centrifugó y el *pellet* se lavó con EtOH al 70% frío. Posteriormente, el EtOH se descartó y el ARN se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en H₂O inyectable. La solución de ARN se cuantificó en un NanoDrop-2000.

PCR-punto final y RT-qPCR

La estandarización de los oligos se realizó por PCR-punto final (Fig. S1), se utilizó el kit *KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR* de Biosystems® (Tabla S1), cada reacción se preparó con 1µl de ARN a 50ng/µl como material inicial y oligos a 5mM. Las reacciones se ajustaron a un volumen final de 5µl. El programa utilizado fue el siguiente: 42°C-5min, 95°C-3min, 95°C-3seg (gradiente de 58°, 60°, 62°C-15seg), 40 ciclos y 12°C ∞. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1.5%.

Las reacciones de RT-qPCR para analizar los cambios de expresión, se realizaron con las mismas condiciones utilizadas para PCR-punto final (Tabla S1), con 1µl de ARN a 25 ng/µl como producto inicial, oligos a una concentración 5mM y las reacciones se ajustaron a un volumen final de 8µl. El programa utilizado fue el siguiente: 42°C-5min, 95°C-3min, 95°C-3seg, 60 ó 62°C-10seg, 95°C-15seg, 60°C-1min, 95°C-15seg, 40 ciclos y 4°C ∞.

Tabla 3. Oligos utilizados para la expresión por RT-qPCR y PCR punto final.

Gene	Forward	Reverse	Producto
<i>CTCF</i>	CACTGATCTTGGAGTTGGC	GAAAACGAGGTCGATGGC	93
<i>Rpl32</i>	GACGTGACAGAGGTCCATCAGA	CAGATGCACCAGGGACATCCT	116

Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media y error estándar medio (SEM), al menos tres réplicas técnicas fueron realizadas en estos casos. Posteriormente los datos se analizaron estadísticamente usando ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparación Tukey, y la prueba de *t-Student* según se indica en los gráficos. Se utilizó el software de GraphPad Prisma 5, con significancia de $p < 0.05$ para todas las pruebas.

6. RESULTADOS

6.1 Establecimiento del sistema *UAS-Gal4*

Gal4 es un factor transcripcional de levadura que también puede activar la transcripción en *Drosophila* (Ashburner *et al.* 2005). Para la técnica se utiliza una cepa donde el gen *Gal4* ha sido insertado de forma azarosa en el genoma de *Drosophila melanogaster* con el uso de transposones, según el sitio de inserción el gen *Gal4* puede transcribirse bajo la influencia de algún *enhancer* endógeno (Brand and Perrimon 1993). Un segundo elemento (*UAS* por *Upstream Activator Sequence*) con sitios de unión para Gal4 es insertado en otra cepa de moscas. Una vez realizada la cruce de ambas cepas (Fig. 7A), la transcripción del gen río abajo del elemento UAS se activará únicamente en el tejido donde se exprese *Gal4* (Brand and Perrimon 1993; Hales *et al.* 2015).

Con el fin de validar el sistema de expresión, se realizó una cruce con la línea driver (*Elav-Gal4*) para inducir la expresión de la proteína eGFP en el sistema nervioso de *Drosophila* (Fig. 7B). La proteína eGFP se rastreó por microscopía de fluorescencia en la progenie. Se observó señal en el sistema nervioso de embriones y larvas como se esperaba (Fig. 7C), así como en glándulas salivares de larvas L3, posiblemente debido a la auto fluorescencia de estos órganos. Con lo anterior comprobamos que el sistema es eficaz para dirigir la expresión de transcritos hacia el sistema nervioso de la mosca.

Los recientes reportes sobre CTCF en el sistema nervioso de mamíferos muestran la relevancia del papel funcional de CTCF en este sistema. Los transcritos de *CTCF* se acumulan en el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario de *Drosophila* al igual que en ratón, dado que el papel de CTCF se encuentra en discusión en la mosca, el sistema nervioso parece ser un buen modelo para comparar el papel funcional de esta proteína. Para disminuir CTCF en el sistema nervioso se utilizaron dos cepas de moscas transgénicas (WT *CTCF*^{sh1} y WT *CTCF*^{sh2}) con dos shARN diferentes dirigidos al tercer exón de *CTCF* (Anexo 1). Las cruces se realizaron usando moscas hembras (E) o machos (U) de la cepa *Elav-Gal4* (Fig. 8A), de ésta forma la progenie resultante (*CTCF*^{KD}) expresaba uno de los shARN en el sistema nervioso bajo el control de *Elav* (Fig. 8B).

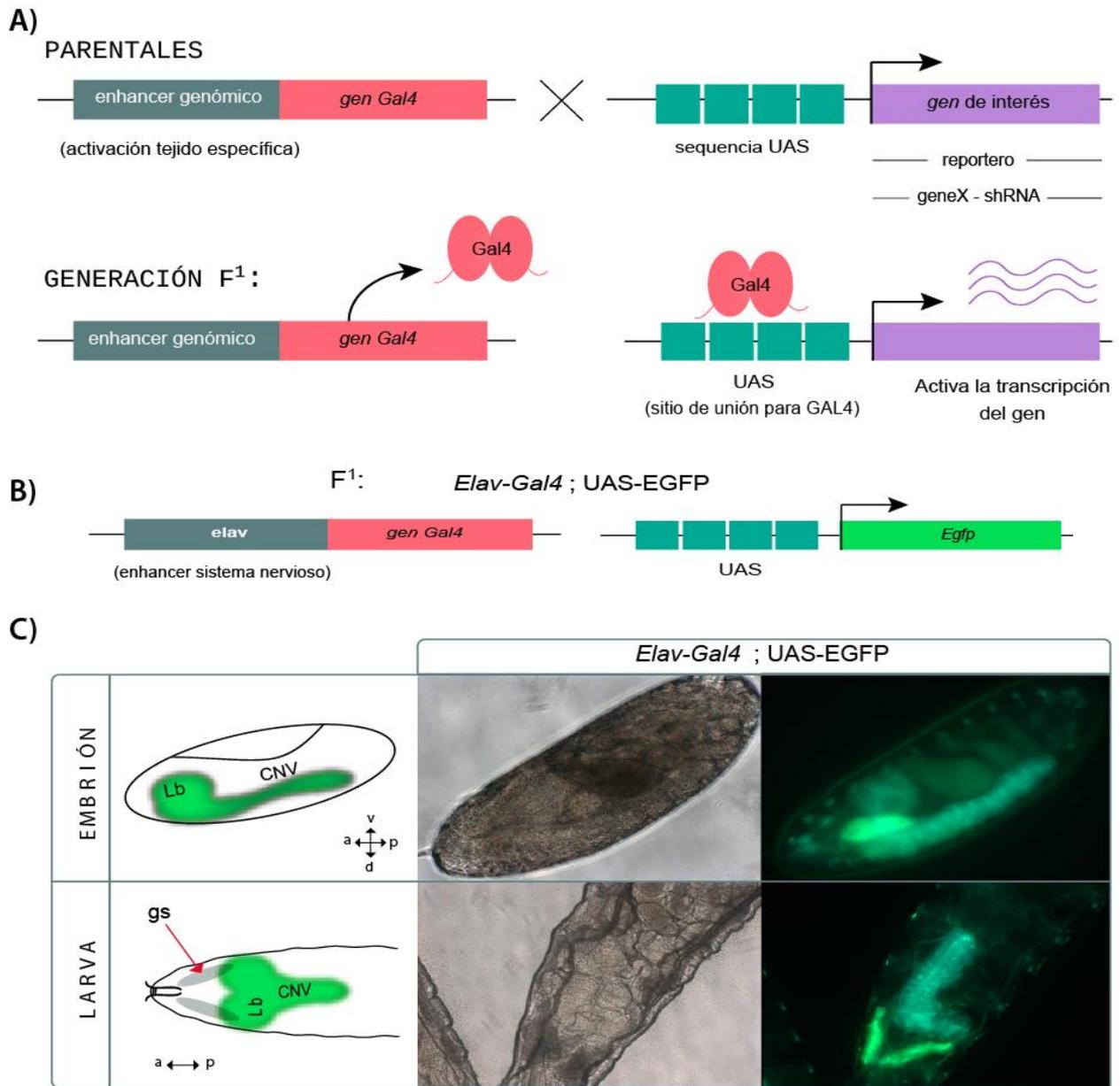


Fig. 7. El sistema *UAS-Gal4* es específico. A) Esquema representativo del sistema *UAS-Gal4*. En el sistema se utilizan dos cepas transgénicas como parentales, la primera cepa aloja un enhancer tejido específico río arriba del gen para la proteína Gal4, la segunda cepa contiene una secuencia de unión (*UAS*) para la proteína Gal4 y río debajo de la secuencia contiene un transcrito de interés. Los principales transcritos utilizados en ésta técnica son genes reporteros o shARN dirigidos hacia cualquier gen. La proteína Gal4 se expresa bajo la actividad del enhancer, su unión a la secuencia *UAS* promueve la transcripción del gen de interés. B) Cruza generada para inducir la expresión de eGFP en el sistema nervioso de la mosca. C) De izquierda a derecha: esquema representativo del sistema nervioso central en embriones y larvas de *D. melanogaster* (Lb: lóbulos, CNV: cordón nervioso ventral, gs: glándulas salivales), imágenes en campo claro de embriones y larvas de la crua en (B), señal de EGFP en el sistema nervioso de embriones (superior) y larvas (inferior). Las glándulas salivales también son visibles en larvas debido a su auto-fluorescencia (las imágenes son una contribución del Ph.D. Francisco Carmona).

6.2 La reducción de CTCF afecta la locomoción de *Drosophila melanogaster*.

Debido a los antecedentes del papel funcional de CTCF en el sistema nervioso, decidimos analizar el comportamiento locomotor de las moscas $CTCF^{KD}$. Con el fin de caracterizar posibles fenotipos en la progenie (F^1), se realizaron observaciones de los organismos a lo largo de su ciclo de vida. Después de éste periodo se identificaron diferentes anomalías en el comportamiento locomotor de las moscas $CTCF^{KD}$. En condiciones de laboratorio, las larvas en su tercer y último estadio tienden a escalar las paredes del recipiente que las contiene para generar una pupa y entrar en metamorfosis (Libro, Ashburner *et al.* 2005; Godoy-Herrera *et al.* 1984). Para cuantificar los problemas de locomoción durante la etapa larvaria, se utilizó la altura de las pupas con respecto a su comida como un indicador del movimiento del organismo en este estadio, un ensayo que se ha utilizado en otros trabajos como un indicador del movimiento en el estadio larvario (Muñoz-Alarcón *et al.* 2007). Las pupas en los viales de las cruces $CTCF^{KD}$ se localizaron a menor distancia de su comida al compararse con sus cepas progenitoras $CTCF^{WT}$ (Fig. 8C). Los resultados también muestran diferencias significativas entre las cepas control y las cepas $CTCF^{KD}$ con excepción de: WT *Elav-Gal4* y $CTCF^{KD}$ (U). Los resultados señalan que la reducción de CTCF afecta el comportamiento motor de las larvas.

Durante la etapa adulta, se pudieron identificar problemas en la locomoción de la mosca y su capacidad para reincorporarse. Para cuantificar los cambios en moscas adultas se realizaron ensayos de geotaxia negativa en moscas de dos días. El comportamiento de geotaxia es una respuesta innata de escape que presentan las moscas al ser impulsadas hacia el fondo del vial. Los ensayos de geotaxia negativa fueron realizados con ambos shARN y con el mismo sistema de cruces utilizadas en la prueba para pupas. Se encontraron diferencias significativa en la capacidad de escalado entre las moscas $CTCF^{WT}$ y $CTCF^{KD}$ (Fig. 8D,E). La disminución en la capacidad de escalado fue más evidente en las moscas $CTCF^{KD}$ donde se utilizó el shARN1 (sh1) (Fig. 8D). Las cruces $CTCF^{KD}$ presentaron un porcentaje de escalado cercano al 50% cuando el progenitor paterno era de la cepa WT *Elav-Gal4* ($CTCF^{KD}$ (U)), y un porcentaje menor al 40% si la cepa WT *Elav-Gal4* era el progenitor materno de la cruce ($CTCF^{KD}$ (E)). Los resultados además sugieren que en este estadio hay una mayor eficacia del sh1 comparado con el sh2, donde la disminución de ambas cruces $CTCF^{KD}$ (E y U) es cercana al 60%. Sin embargo, ambos shARN reflejan un cambio significativo en el comportamiento locomotor de las moscas $CTCF^{KD}$.

El tiempo de vida de *Drosophila melanogaster* es aproximadamente de 50 a 80 días según la cepa y la temperatura del cultivo (Grotewiel *et al.* 2005). Dado que el shARN1 causó los cambios más notorios en la prueba de geotaxia negativa, se decidió probar la longevidad de estos animales. La prueba se realizó una sola vez con 40 moscas por cepa. En comparación con los organismos $CTCF^{WT}$ las moscas $CTCF^{KD}$ presentaron una menor sobrevivencia cercana a los 40 días de edad (Fig. 8F).

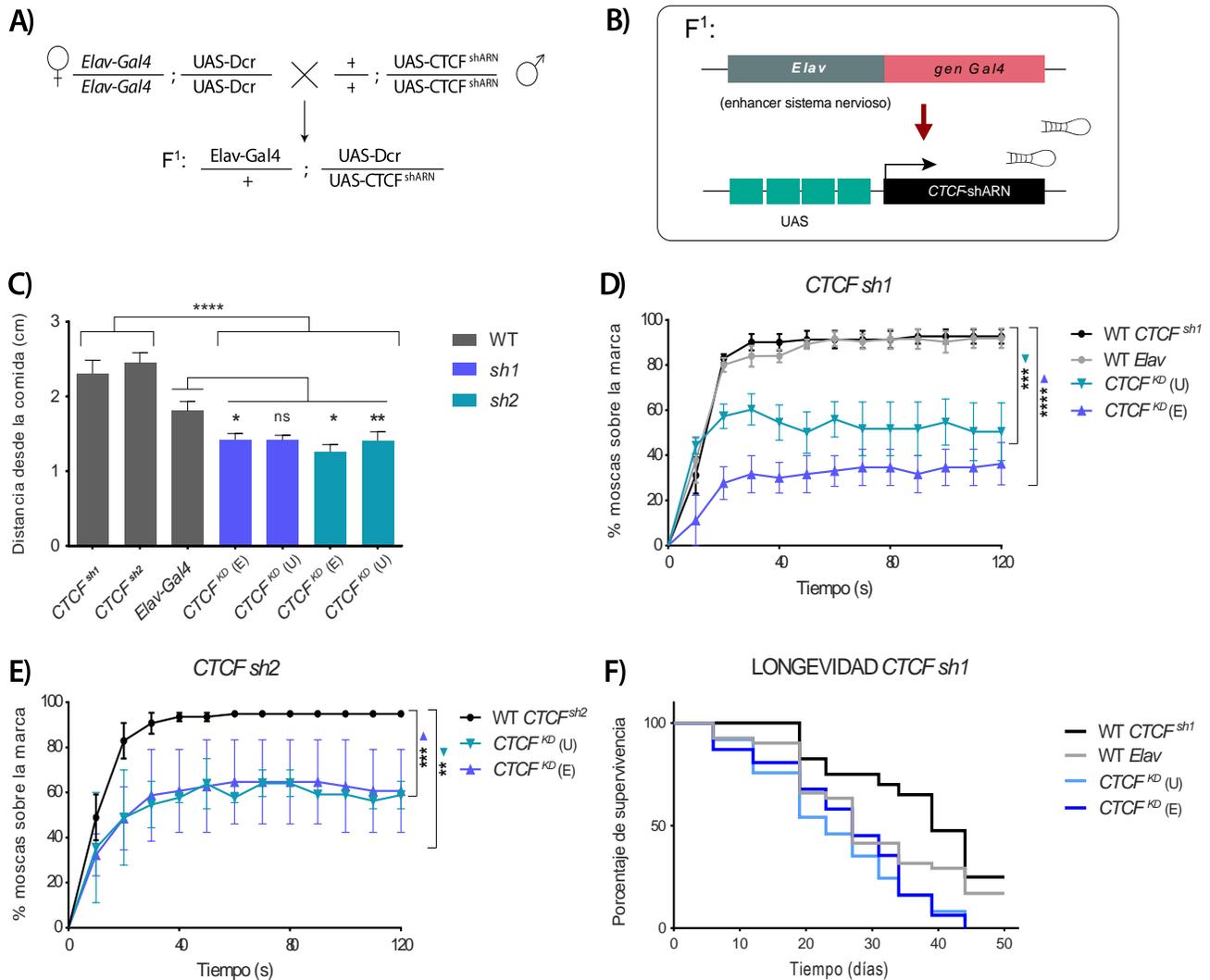


Fig. 8. La reducción de CTCF compromete la locomoción de *Drosophila melanogaster*. A) Esquema representativo de la cruce. Panel superior, hembras de la línea driver (*Elav-Gal4*) fueron cruzadas con machos de la línea *CTCF^{shARN}* para obtener el genotipo descrito en el panel inferior. En los experimentos también se utilizó la cruce inversa con machos *Elav-Gal4* y hembras *CTCF^{shARN}*, ambos genotipos fueron utilizados en los experimentos. B) Esquema representativo del sistema *UAS-Gal4* en la progenie, la proteína Gal4 se expresa en sistema nervioso bajo el enhancer del gen *Elav* y activa la transcripción de *CTCF-shARN*. Dos líneas *UAS-Ctcf* shARN diferentes (*sh1* y *sh2*) fueron utilizadas. C) Cuantificación de la altura de pupas en los viales, se muestra la altura promedio de al menos 3 replicados biológicos por cepa ****($p \leq 0.0001$) **($p \leq 0.01$) *($p \leq 0.05$) anova de una vía, seguida de prueba de Dunnett's. Las barras de error corresponden al error estándar medio (SEM), $n=120$. C,D) Ensayo de geotaxis negativa para las cepas *CTCF^{WT}* y *CTCF^{KD}*, los gráficos muestran el porcentaje de moscas sobre la marca durante la prueba, se utilizaron dos shARN diferentes dirigidos hacia CTCF ($n=3$ a 4 replicados biológicos, 20-25 moscas por ensayo). ****($p \leq 0.0001$) ***($p \leq 0.001$) **($p \leq 0.01$). Análisis por ANOVA de 2 vías seguida de la prueba de comparación Tukey's. Las barras de error corresponden al SEM. E) Curvas de sobrevivencia en días para *CTCF-WT* y *CTCF-KD* utilizando un solo shRNA ($n=1$, 30-40 moscas por cepa).

La cantidad de organismos que sobrevivían hacia el final de esta prueba tenían perceptiblemente problemas de locomoción más severos que las moscas de dos días utilizadas en la prueba de geotaxia negativa. Debido a la baja cantidad de moscas que llegaban a la última etapa, no se pudo realizar el ensayo otra vez, sin embargo sería interesante seguir el comportamiento locomotor de las moscas y observar si la reducción de CTCF agiliza también la senescencia en el comportamiento locomotor de los animales. Los resultados hasta el momento señalan que reducir CTCF en el sistema nervioso de *Drosophila* disminuye el tiempo de vida de los organismos. Todas las observaciones anteriores juntas sugieren que la reducción de CTCF en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster* compromete la locomoción durante el ciclo de vida del animal y además disminuye el tiempo de vida de estos organismos.

Durante el proyecto se estableció en el laboratorio la técnica para la extracción de cerebros de larva en L3, además de estandarizar la extracción de proteína en éste tejido y en pupas para la validar la disminución de CTCF en la mosca (Anexo 2). Sin embargo, los resultados por WB solo marcan una tendencia a la disminución de la proteína en una cepa. De la misma forma se observa una tendencia en la cuantificación por *RT-qPCR* e inmunofluorescencia (Anexo2).

6.3 La disminución de CP190 y BEAF-32 no tiene un efecto en la locomoción de *Drosophila melanogaster*.

En *Drosophila melanogaster* y otros artrópodos se han reportado además de CTCF, otras proteínas con actividad insulator (Heger et al. 2013). Entre ellas se encuentran BEAF-32 que colocaliza con CTCF en múltiples *loci*, y la proteína CP190 que es un cofactor de proteínas insulator en *Drosophila* y cuya interacción con CTCF también está reportada (Gerasimova et al. 2007; Mohan et al. 2007; Bonchuk et al. 2015). Para determinar si la reducción de estas proteínas en el sistema nervioso de *Drosophila* podía ocasionar los mismos cambios de comportamiento observados en las moscas *CTCF^{KD}*, se utilizó un shARN dirigido a BEAF-32 y dos shRNA (*Cp190-sh1* y *Cp190-sh2*), dirigidos a *Cp190*. La secuencia de los elementos interferentes se obtuvo del Proyecto “*Transgenic RNAi Project*” donde fueron creados y los elementos se mapearon al genoma de *Drosophila melanogaster* como un método para comprobar su especificidad (Anexo 1). Las tres líneas de cepas se cruzaron con la línea driver *Elav-Gal4* (WT-*Elav*) para expresar los transcritos en el sistema nervioso (Fig. 9A, B). Las pruebas en larvas mostraron que no hay una tendencia a disminuir el comportamiento locomotor de los animales en este estadio (Fig. 9C). Mostrando que en dicha etapa no hay repercusiones a nivel locomotor por la reducción de CP190. Sin embargo se observó un incremento en la actividad de *BEAF32^{KD}* en comparación a *Elav-Gal4*. De tal forma podría hablar de una regulación específica de CTCF en el sistema nervioso de la mosca, la cual ocasiona la disminución del comportamiento locomotor en larvas.

Con el fin de probar cambios en el movimiento de moscas adultas, de la misma forma que con las moscas *CTCF^{KD}*, se realizó un ensayo de geotaxia negativa con moscas *BEAF-32^{KD}* y *Cp190^{KD}* de dos días de edad (Fig. 9D). Los resultados de esta prueba señalan que no hay una tendencia a disminuir la actividad locomotora de las moscas por la reducción de BEAF-32 o CP190. De tal forma, los cambios observados tanto en larvas como en moscas *CTCF^{KD}*, podría deberse a una regulación *locus* específica de *CTCF* independiente a las proteínas CP190 y BEAF-32.

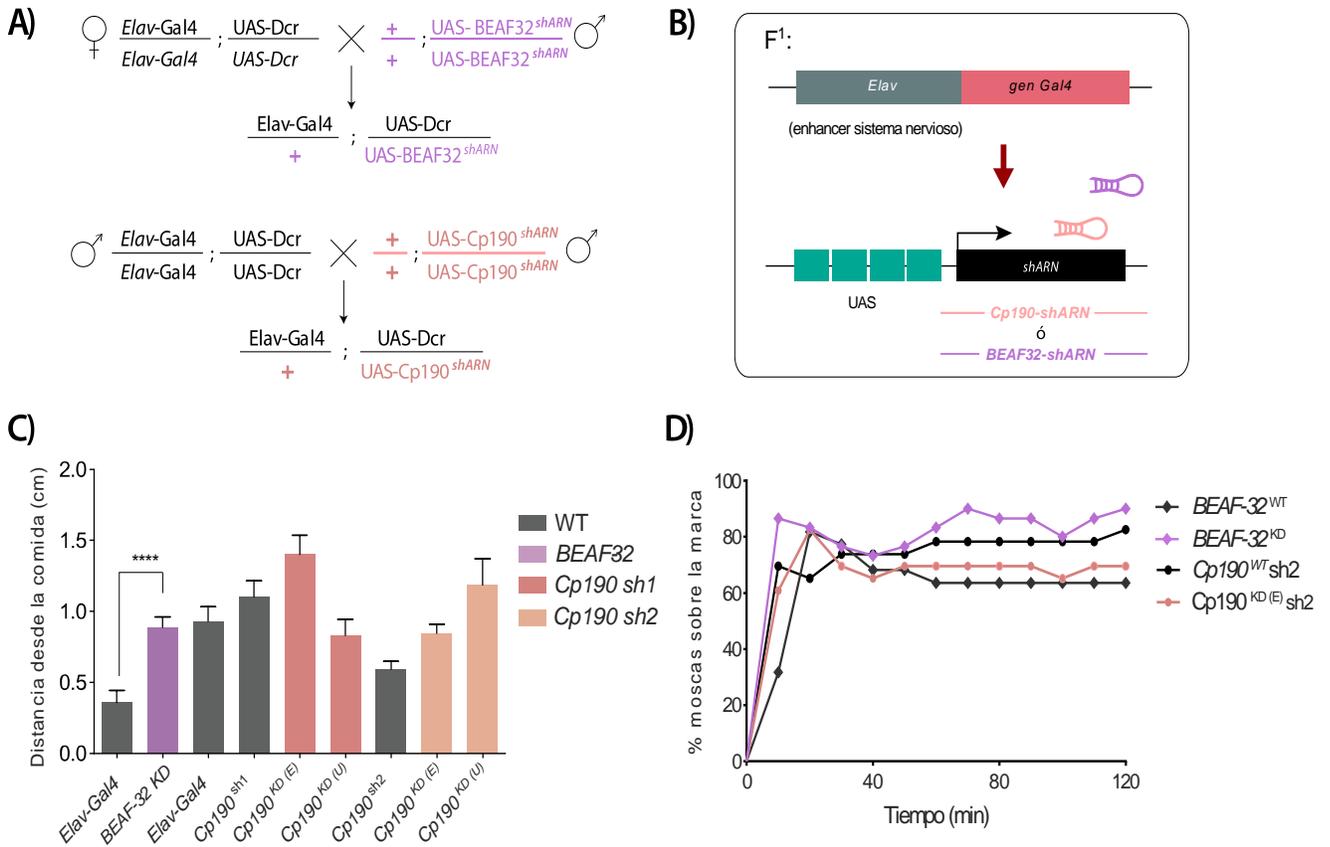


Fig. 9. La disminución de otras proteínas insulator parece no afectar la locomoción de la mosca. A) Esquema representativo del sistema de cruzas utilizado. Panel superior, representa la cruzada utilizada para obtener las moscas *BEAF-32^{KD}*. Panel inferior, cruza utilizada para generar las moscas *Cp190^{KD}*. Las cruza fueron realizadas utilizando la cepa driver *Elav-Gal4* como el progenitor materno (E), así como utilizando la cepa transgénica shARN como progenitor materno (U). C) Cuantificación de la altura de pupas en los viales. Se muestra la altura promedio de tres réplicas biológicas por cepa con 20 individuos por ensayo. Las barras de error corresponden al SEM, *****($p < 0.0001$) *t-Student*. D) Ensayo de geotaxis negativa para las cepas, los gráficos muestran el porcentaje de moscas sobre la marca durante la prueba ($n=1$ ensayo, 20-25 moscas por cepa).

7. DISCUSIÓN

La eliminación de *Ctcf* en poblaciones neuronales de ratón, se ha ligado además con deficiencias importantes en su neurodesarrollo, la memoria y con problemas locomotores (Watson et al. 2014; Sams et al. 2016; Hirayama et al. 2012; McGill et al. 2018). Debido a los antecedentes del papel funcional de CTCF en el sistema nervioso de ratón, decidimos analizar el comportamiento locomotor de las moscas *CTCF^{KD}*. Las pupas en los viales de todas las cepas *CTCF^{KD}* se localizaron a menor distancia de su comida al compararse con las cepas progenitoras WT *CTCF^{sh}* (Fig. 8B). Con excepción de la cepa progenitora WT *Elav-Gal4*, todos los resultados fueron significativamente diferentes. Esto sugiere que la capacidad de movilidad de las larvas se ve afectado por la disminución de *CTCF*. Sin embargo; se sabe que las uniones neuromusculares de larvas *CTCF^{KD}* no están afectadas por la disminución de la proteína (Konrad et al. 2019). Ya que el *driver* que utilizamos es un marcador pan-neural que se activa temprano en el desarrollo, hay otros centros neuro-motores que podrían estar afectados en la larva, como el CNV o la zona sub-esofágica que participan en la locomoción. Por lo que es necesario buscar otros marcadores de poblaciones neuronales o centros motores para disminuir CTCF y observar si se puede fenocopiar el comportamiento motor visto.

Al igual que las larvas, evaluamos la capacidad locomotora en las moscas adultas. Las moscas adultas presentan una geotaxis negativa o tendencia innata a escalar los recipientes que las contienen para escapar. Los animales *CTCF^{KD}* obtuvieron porcentajes significativamente menores durante los ensayos de Geotaxis negativa, a pesar de tener el mismo exón como objetivo (Anexo 1), el shARN 1 (sh1) tuvo mayor efecto durante esta prueba con respecto al shARN 2 (sh2). Aunque los niveles de la proteína y transcritos de *CTCF* solo mostraron una tendencia a disminuir en la cepa *CTCF^{KD}*(u) del sh2 (Anexo 2). Por lo que ambos elementos (sh1 y sh2) se podrían insertar en un vector para transfectar la línea celular neuronal BG3 y probar su eficiencia *in vitro* así como posibles cambios transcripcionales en la línea celular. Los resultados indican que la disminución de CTCF durante el neurodesarrollo afecta la capacidad locomotora de las moscas incluso en diferentes estadios de su ciclo de vida (Fig. 8B, C). Estos resultados son semejantes a los reportados anteriormente (Konrad et al. 2019) y se correlacionan con las deficiencias locomotoras observadas en ratones (McGill et al. 2018).

Por el fenotipo visto y debido a que CTCF es un factor involucrado en la regulación transcripcional, se propone evaluar en un futuro la expresión de genes altamente asociados al neurodesarrollo de la mosca, además de analizar la ocupación de CTCF por CHIP-seq sobre los genes alterados. Especialmente el conjunto de los genes *Hox* (*Homeobox*), cuya regulación transcripcional es fundamental en el desarrollo del patrón corporal y está estrechamente relacionada con la ocupación de CTCF a lo largo del *locus* (Narendra et al. 2015, 2016; Gambetta and Furlong 2018). Los genes *Hox* se encuentran asociados al desarrollo de las extremidades y de las conexiones neuromotoras, tanto en mosca como en vertebrados (Lacombe et al. 2013; Baek et al. 2013; Philippidou and Dasen 2013; Hessinger et al. 2017). En *Drosophila* la ausencia parcial o total de *CTCF* genera mutaciones homeóticas e irregularidades en la expresión de los genes *Hox* a lo largo del desarrollo e incluso modifica la distribución de la proteína Abd-B en el sistema nervioso de larvas (Mohan et al. 2007; Gambetta and Furlong 2018).

Debido a que la reducción de CTCF durante el desarrollo tuvo efectos durante diferentes etapas del ciclo de vida de la mosca, nos preguntamos si el efecto se mantendría hacia el final del ciclo. El ensayo de longevidad realizado en este trabajo presenta una tendencia a disminuir el porcentaje de supervivencia de las cepas *CTCF^{KD}* antes que los controles (Fig. 8D). Aunque aún es necesario concluir la prueba aumentando el número de réplicas biológicas, se sabe que las enfermedades neurodegenerativas y del neurodesarrollo están relacionadas con una menor esperanza de vida (Bishop et al. 2010; Hung et al. 2010). Dado el fenotipo observado en la longevidad de las moscas, se propone realizar también la prueba de geotaxia negativa en moscas más longevas y seguirlas durante un periodo de su vida para determinar si el fenotipo locomotor se intensifica. De ser así, el modelo *CTCF^{KD}* podría ser también un modelo neurodegenerativo. Las observaciones realizadas en este trabajo contribuyen de forma importante a la caracterización del papel de CTCF en *Drosophila melanogaster* como modelo experimental en las neurociencias y en la epigenética. Pero además son una aportación relevante que refuerza la importancia de este factor transcripcional multifuncional en el sistema nervioso de los animales.

Además de CTCF en *D. melanogaster* existen otras proteínas *insulator*. Particularmente, la señal de unión de CTCF por CHIP-seq y CHIP-chip alinea con la señal de la proteína *insulator* BEAF-32 en regiones de heterocromatina (Van Bortle et al. 2012). Nuestros resultados señalan que disminuir BEAF-32 del sistema nervioso no causa alteraciones en las pruebas locomotoras de adultos (Fig. 9B). Aunque los resultados muestran un aumento significativo en el movimiento de las larvas *BEAF32^{KD}* con respecto a la cepa WT (*Elav-Gal4*), contrario al fenotipo *CTCF^{KD}*. A la proteína BEAF-32 se le ha asociado principalmente con la regulación de genes *Housekeeping* ligados al metabolismo e independientes de CTCF (Van Bortle et al. 2012; Shrestha et al. 2018). Y aunque no hay indicios de que BEAF-32 regule genes específicos del sistema nervioso, mutaciones en *BEAF32* se han relacionado con un crecimiento neoplásico en diferentes órganos incluyendo el cerebro de larvas en tercer estadio, resultando en larvas gigantes y órganos con crecimiento descontrolado (Gurudatta et al. 2012). Estos antecedentes podrían interpretarse como opuestos al resultado de eliminar *Ctcf* en el desarrollo, que se ha asociado con apoptosis (Wan et al. 2008; Soshnikova et al. 2010; Watson et al. 2014). Sin embargo, es necesario terminar las pruebas en adultos para saber si el fenotipo se conserva y determinar los cambios fisiológicos que pudiesen causar un aumento en la actividad de las larvas *BEAF^{KD}*.

Además de BEAF-32 se ha demostrado la interacción proteína-proteína *locus* específica entre CP190 y CTCF (Mohan et al. 2007; Bonchuk et al. 2015). A pesar de las interacciones conocidas entre CP190 y CTCF es interesante señalar que durante los experimentos realizados en este trabajo las moscas *Cp190^{KD}* no mostraron cambios en el comportamiento locomotor de larvas o moscas adultas incluso trabajando con dos elementos shARN diferentes (Fig. 9). Es posible que después del efecto del shARN la proteína residual de BEAF-32 y CP190 en el sistema nervioso fuera la suficiente para mantener la organización de la cromatina. Sin embargo, existen reportes que indican que la reducción de BEAF-32 en una línea celular embrionaria tampoco causa alteraciones en la conformación tridimensional de la cromatina (Ramírez et al. 2018). En la línea neuronal de *Drosophila* (BG3), se reportó recientemente que comparada con CTCF la proteína CP190 se encuentra menos enriquecida en aquellas barreras entre TAD's específicas del sistema

nervioso. Por el contrario, su nivel de ocupación es mayor en barreras específicas al estadio embrionario (Chathoth and Zabet 2019). De acuerdo a estas observaciones, los resultados que hemos obtuvimos pueden ser a causa de una redundancia en las proteínas *insulator* de *Drosophila* o a que estas proteínas tengan ocupaciones genómicas diferentes en el sistema nervioso.

Los resultados con los que contamos hasta el momento no nos permiten descartar el papel de CP190 y BEAF-32 en la conducta locomotora de moscas adultas. Es necesario aumentar el número experimental para reproducir los resultados obtenidos con estos elementos, además de validar la disminución de CP190 y BEAF-32 a nivel de proteína y transcrito. Sin embargo, la tendencia en los ensayos muestra cambios locomotores muy sólidos en la reducción de CTCF. De tal forma, CTCF podría ser crucial en algún punto del neurodesarrollo de la mosca para mantener la organización de la cromatina en neuronas de la misma forma que actúa en mamíferos, de ser así, podría tratarse de un mecanismo molecular conservado y el estudio de éste modelo aportaría al entendimiento del papel de CTCF en la organización tridimensional de *Drosophila*.

8. CONCLUSIONES

- 8.1 La disminución de CTCF en el sistema nervioso de *Drosophila*, compromete el movimiento de las larvas y organismos adultos.
- 8.2 La reducción de CTCF en el sistema nervioso afecta la longevidad de *Drosophila*
- 8.3 La disminución de otras proteínas *insulator* como BEAF-32 y CP190 en el sistema nervioso de la mosca, no reflejan el fenotipo visto en moscas *CTCF^{KD}*.

9. PERSPECTIVAS

- 9.1 Realizar ensayos de ARN-seq para determinar los transcritos alterados por la disminución de CTCF.
- 9.2 Generar ChIP-seq para conocer la distribución de CTCF en el sistema nervioso de la mosca y determinar la disminución de los picos de la proteína en genes relacionados con el fenotipo observado.
- 9.3 Dirigir la expresión del interferente contra CTCF en otras poblaciones neuronales o centros motores, para observar si se fenocopia el comportamiento locomotor observado.
- 9.4 Continuar las pruebas de Geotaxia negativa a mayores tiempos para identificar si el fenotipo se intensifica.

10. ANEXO 1

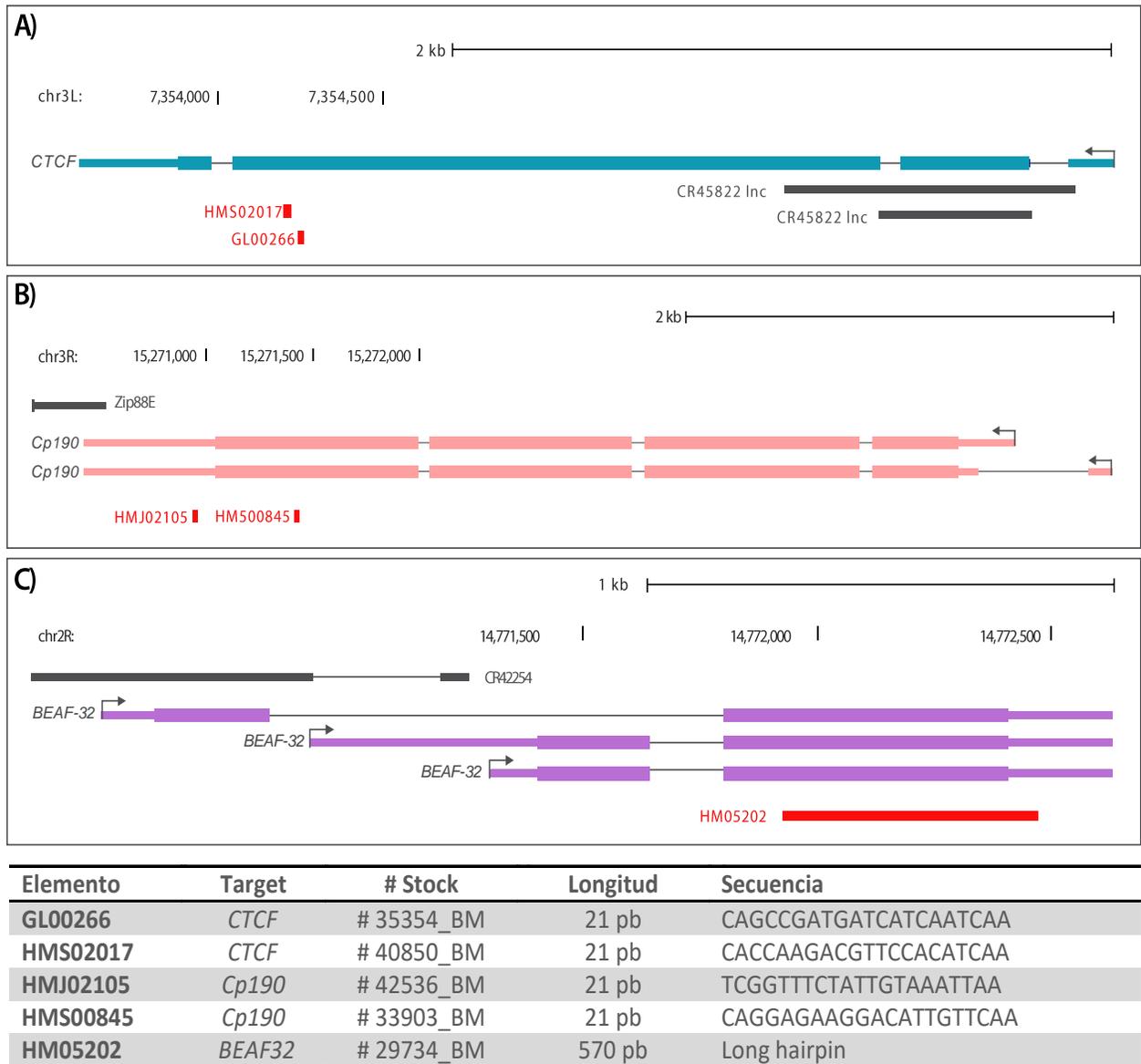


Fig.11 Mapeo de elementos *shARN* utilizados. A) *CTCF* en azul y los elementos *CTCF*^{sh1} (GL00266) y *CTCF*^{sh2} (HMS02017), ambos alineados en el tercer exón del gen. B) Isoformas de *Cp190* en rosa y los elementos *Cp190*^{sh1} (HMJ02105) y *Cp190*^{sh2} (HMS00845), ambos alinean en el último exón común a ambas isoformas. C) Mapeo del gen *BEAF-32* y sus tres isoformas, el ARN interferente (HM05202) se localiza en el último exón que es común a todas sus isoformas. En la tabla se muestran las secuencias de cada elemento y el número de cada stock de acuerdo a *Bloomington Drosophila Stock Center*.

11. ANEXO 2

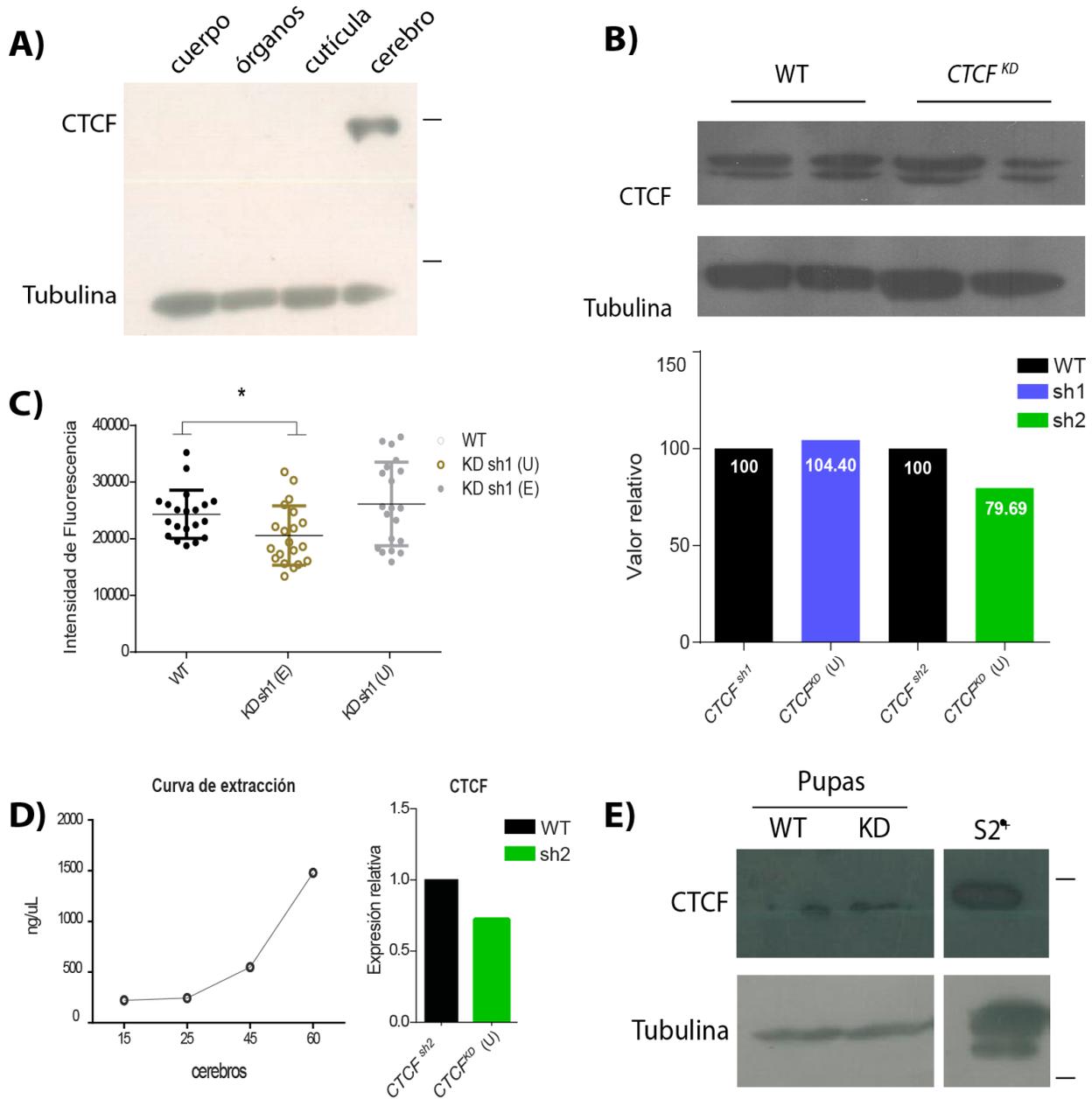


Fig.12. Ensayos de WB y RT-qPCR en cerebros de larva. A) WB en tejidos de larva L3, la señal de CTCF es clara en cerebros extraídos pero no en otros tejidos. Marcador en 100 y 50 kDa. B) Arriba: WB representativo de proteína total de cerebros de larva L3, Abajo: densitometría de los niveles de proteína en cada cepa (n=1). C) Intensidad de fluorescencia de la señal GFP-CTCF analizada por *Fiji*, las barras de error representan SEM (n=20 núcleos, *p<0.05). D) Curva de extracción de ARN en cerebros de larva y gráficos de expresión de *CTCF* en cerebros (n=1). E) WB en línea celular S2⁺ y pupas completas, estandarización de la técnica para 10mg/μl de tejido en *buffer* RIPA. Las cruzas se realizaron usando moscas hembras (E) o machos (U) de la cepa *Elav-Gal4*.

El cerebro de la larva puede ser un tejido de fácil extracción, baja contaminación de otros tejidos y además presenta un alto nivel de expresión tanto de *CTCF* y como del *driver Elav* (Fig.13A,B). Durante el proyecto se estableció en el laboratorio la técnica para la extracción de cerebros de larva en L3, además de estandarizar la extracción de proteína en éste tejido para la validación del modelo. Se probaron los anticuerpos en cabezas de mosca y tejido de larva, pero fueron los cerebros donde se obtuvo una mejor señal, seguramente debido a que la eficiencia en la extracción de proteína fue mayor en este tejido (Fig. 12A). Los resultados obtenidos por WB muestran una disminución de la proteína CTCF solo en la cepa *CTCF^{KD}*(U) del sh2, debido a que la cantidad de cerebros utilizada para WB era mayor a 40 unidades por muestra, se decidió probar la disminución de CTCF con otros ensayos. Dada la especificidad del anticuerpo probada por WB, el siguiente abordaje se realizó por análisis de imágenes de inmunofluorescencia. Se logró estandarizar un protocolo para la inmunotinción de los cerebros de larva y se adquirieron imágenes del CNV donde se comparó la localización de CTCF con DAPI, ambas señales colocalizaban entre ellas mientras que la prueba de incubación únicamente con el anticuerpo secundario no mostró una señal nuclear. El valor de intensidad de fluorescencia (*mean gray value*) fue calculado para 20 células por imagen. Los resultados mostraron una tendencia a disminuir solo en las cepas sh1 *CTCF^{KD}* (U). Es necesario expandir el experimento al resto de las cepas CTCF-KD (Fig.12C).

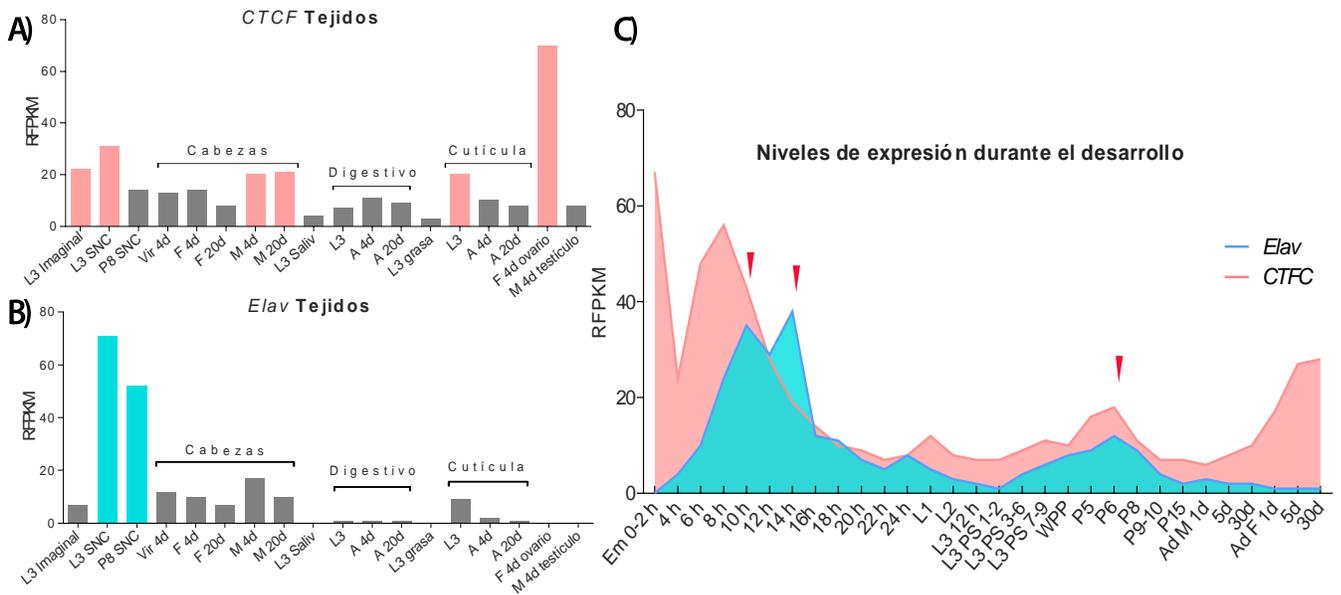


Fig. 13. Patrones de expresión de *Elav* y *CTCF*. Utilizando la base de datos modENCODE se graficaron los niveles de expresión de *CTCF* y *Elav*, datos de RNA-seq en diferentes tejidos (A,B). Los gráficos señalan en rosa los niveles más altos del transcrito *CTCF* y en azul los mayores niveles de *Elav*, ambos coinciden en SNC de larva L3. C) Datos de RNA-seq por estadio de desarrollo, se muestra la dinámica de ambos transcritos y los picos de expresión del *driver Elav* en embrión y pupa (flechas rojas). Vir: virgen, F: hembras, M: machos, Em: embrión, WPP: *White prepupae*, P: *pupae*, Ad: Adultos.

El resultado visto por WB es consistente con lo visto por RT-qPCR para la misma cepa (Fig. 12B,D). Sin embargo, el resto de las cepas analizadas no mostraron la misma tendencia. A pesar

de que contrastado con otros tejidos los niveles de *CTCF* y *Elav* en larva L3 eran superiores, al comparar la etapa L3 con otros estadios del desarrollo pudimos corroborar que el mayor nivel de transcripción endógena para *Elav* se encontraba en 3 puntos principales del ciclo de vida (Fig.13C, flechas rojas), la etapas embrionarias entre las 8 y 16 horas posteriores a la fertilización y durante la etapa de pupa. Por ello, se comenzó la estandarización de la técnica de WB para detectar CTCF en pupas completas (Fig. 12D), en un futuro se propone continuar la caracterización de éste estadio y los puntos del desarrollo embrionario con mayor transcripción de *Elav* mediante ensayos de doble marcaje por inmunofluorescencia para detectar cambios en el nivel de CTCF.

11. REFERENCIAS

- Aitken SJ, Ibarra-Soria X, Kentepozidou E, Flicek P, Feig C, Marioni JC, Odom DT. 2018. CTCF maintains regulatory homeostasis of cancer pathways. *Genome Biol* **19**: 106.
- Albanus RD, Kyono Y, Hensley J, Varshney A, Orchard P, Kitzman JO, Parker SCJ. 2019. Chromatin information content landscapes inform transcription factor and DNA interactions. *bioRxiv* 777532.
- Arzate-Mejía RG, Recillas-Targa F, Corces VG. 2018. Developing in 3D: the role of CTCF in cell differentiation. *Development* **145**: dev137729.
- Avitzour M, Mor-Shaked H, Yanovsky-Dagan S, Aharoni S, Altarescu G, Renbaum P, Eldar-Geva T, Schonberger O, Levy-Lahad E, Epsztejn-Litman S, et al. 2014. FMR1 epigenetic silencing commonly occurs in undifferentiated fragile X-affected embryonic stem cells. *Stem cell reports* **3**: 699–706.
- Baek M, Enriquez J, Mann RS. 2013. Dual role for Hox genes and Hox co-factors in conferring leg motoneuron survival and identity in *Drosophila*. *Development* **140**: 2027–2038.
- Bastaki F, Nair P, Mohamed M, Malik EM, Helmi M, Al-Ali MT, Hamzeh AR. 2017. Identification of a novel CTCF mutation responsible for syndromic intellectual disability – a case report. *BMC Med Genet* **18**: 68.
- Beagan JA, Duong MT, Titus KR, Zhou L, Cao Z, Ma J, Lachanski C V, Gillis DR, Phillips-Cremens JE. 2017. YY1 and CTCF orchestrate a 3D chromatin looping switch during early neural lineage commitment. *Genome Res* **27**: 1139–1152.
- Bishop NA, Lu T, Yankner BA. 2010. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* **464**: 529–535.
- Bonchuk A, Denisov S, Georgiev P, Maksimenko O. 2011. *Drosophila* BTB/POZ domains of “ttk Group” can form multimers and selectively interact with each other. *J Mol Biol* **412**: 423–436.
- Bonchuk A, Maksimenko O, Kyrchanova O, Ivlieva T, Mogila V, Deshpande G, Wolle D, Schedl P, Georgiev P. 2015. Functional role of dimerization and CP190 interacting domains of CTCF protein in *Drosophila melanogaster*. *BMC Biol* **13**: 63.
- Bonev B, Mendelson Cohen N, Szabo Q, Fritsch L, Papadopoulos GL, Lubling Y, Xu X, Lv X, Hugnot JP, Tanay A, et al. 2017. Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development. *Cell* **171**: 557-572.e24.
- Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401–15.

- Burke LJ, Hollemann T, Pieler T, Renkawitz R. 2002. Molecular cloning and expression of the chromatin insulator protein CTCF in *Xenopus laevis*. *Mech Dev* **113**: 95–98.
- Bushey AM, Ramos E, Corces VG. 2009. Three subclasses of a *Drosophila* insulator show distinct and cell type-specific genomic distributions. *Genes Dev* **23**: 1338–1350.
- Carmona-Aldana F, Zampedri C, Suaste-Olmos F, Murillo-de-Ozores A, Guerrero G, Arzate-Mejía R, Maldonado E, Navarro RE, Chimal-Monroy J, Recillas-Targa F. 2018. CTCF knockout reveals an essential role for this protein during the zebrafish development. *Mech Dev* **154**: 51–59.
- Chathoth KT, Zabet NR. 2019. Chromatin architecture reorganization during neuronal cell differentiation in *Drosophila* genome. *Genome Res* **29**: 613–625.
- Chen H, Tian Y, Shu W, Bo X, Wang S. 2012. Comprehensive identification and annotation of cell type-specific and ubiquitous CTCF-binding sites in the human genome. *PLoS One* **7**: e41374.
- Davis L, Onn I, Elliott E. 2018. The emerging roles for the chromatin structure regulators CTCF and cohesin in neurodevelopment and behavior. *Cell Mol Life Sci* **75**: 1205–1214.
- De Biase I, Chutake YK, Rindler PM, Bidichandani SI. 2009. Epigenetic Silencing in Friedreich Ataxia Is Associated with Depletion of CTCF (CCCTC-Binding Factor) and Antisense Transcription ed. A.E. Toland. *PLoS One* **4**: e7914.
- Delgado-Olguín P, Brand-Arzamendi K, Scott IC, Jungblut B, Stainier DY, Bruneau BG, Recillas-Targa F. 2011. CTCF promotes muscle differentiation by modulating the activity of myogenic regulatory factors. *J Biol Chem* **286**: 12483–94.
- Filippova GN, Fagerlie S, Klenova EM, Myers C, Dehner Y, Goodwin G, Neiman PE, Collins SJ, Lobanenko V V. 1996. An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol* **16**: 2802–13.
- Gambetta MC, Furlong EEM. 2018. The Insulator Protein CTCF Is Required for Correct Hox Gene Expression, but Not for Embryonic Development in *Drosophila*. *Genetics* **210**: 129–136.
- Gerasimova TI, Lei EP, Bushey AM, Corces VG. 2007. Coordinated control of dCTCF and gypsy chromatin insulators in *Drosophila*. *Mol Cell* **28**: 761–72.
- Golan-Mashiach M, Grunspan M, Emmanuel R, Gibbs-Bar L, Dikstein R, Shapiro E. 2012. Identification of CTCF as a master regulator of the clustered protocadherin genes. *Nucleic Acids Res* **40**: 3378–3391.
- Goodman FR. 2002. Limb malformations and the human HOX genes. *Am J Med Genet* **112**: 256–265.

- Grotewiel MS, Martin I, Bhandari P, Cook-Wiens E. 2005. Functional senescence in *Drosophila melanogaster*. *Ageing Res Rev* **4**: 372–397.
- Gurudatta BV, Ramos E, Corces VG. 2012. The BEAF insulator regulates genes involved in cell polarity and neoplastic growth. *Dev Biol* **369**: 124–132.
- Hales KG, Korey CA, Larracunte AM, Roberts DM. 2015. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics* **201**: 815–42.
- Hansen AS, Hsieh T-HS, Cattoglio C, Pustova I, Darzacq X, Tjian R. 2018. An RNA-binding region regulates CTCF clustering and chromatin looping. *bioRxiv* 495432.
- Hansen AS, Pustova I, Cattoglio C, Tjian R, Darzacq X. 2017. CTCF and cohesin regulate chromatin loop stability with distinct dynamics. *Elife* **6**.
- Hashimoto H, Wang D, Horton JR, Zhang X, Corces VG, Cheng X. 2017. Structural Basis for the Versatile and Methylation-Dependent Binding of CTCF to DNA. *Mol Cell* **66**: 711-720.e3.
- Heath H, Ribeiro de Almeida C, Sleutels F, Dingjan G, van de Nobelen S, Jonkers I, Ling K-W, Gribnau J, Renkawitz R, Grosveld F, et al. 2008. CTCF regulates cell cycle progression of alphabeta T cells in the thymus. *EMBO J* **27**: 2839–50.
- Heger P, George R, Wiehe T. 2013. Successive gain of insulator proteins in arthropod evolution. *Evolution* **67**: 2945–56.
- Heger P, Marin B, Bartkuhn M, Schierenberg E, Wiehe T. 2012. The chromatin insulator CTCF and the emergence of metazoan diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 17507–12.
- Heger P, Marin B, Schierenberg E. 2009. Loss of the insulator protein CTCF during nematode evolution. *BMC Mol Biol* **10**: 84.
- Hessinger C, Technau GM, Rogulja-Ortmann A. 2017. The *Drosophila* Hox gene *Ultrabithorax* acts in both muscles and motoneurons to orchestrate formation of specific neuromuscular connections. *Development* **144**: 139–150.
- Hirayama T, Tarusawa E, Yoshimura Y, Galjart N, Yagi T. 2012. CTCF Is Required for Neural Development and Stochastic Expression of Clustered Pcdh Genes in Neurons. *Cell Rep* **2**: 345–357.
- Hou C, Li L, Qin ZS, Corces VG. 2012. Gene density, transcription, and insulators contribute to the partition of the *Drosophila* genome into physical domains. *Mol Cell* **48**: 471–84.
- Hu J, Zhang Y, Zhao L, Frock RL, Du Z, Meyers RM, Meng F, Schatz DG, Alt FW. 2015. Chromosomal Loop Domains Direct the Recombination of Antigen Receptor Genes. *Cell* **163**: 947–59.

- Hung C-W, Chen Y-C, Hsieh W-L, Chiou S-H, Kao C-L. 2010. Ageing and neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev* **9**: S36–S46.
- Jung H, Lacombe J, Mazzoni EO, Liem KF, Grinstein J, Mahony S, Mukhopadhyay D, Gifford DK, Young RA, Anderson K V, et al. 2010. Global control of motor neuron topography mediated by the repressive actions of a single hox gene. *Neuron* **67**: 781–96.
- Juraeva D, Haenisch B, Zapatka M, Frank J, Witt SH, Mühleisen TW, Treutlein J, Strohmaier J, Meier S, Degenhardt F, et al. 2014. Integrated Pathway-Based Approach Identifies Association between Genomic Regions at CTCF and CACNB2 and Schizophrenia ed. P. Holmans. *PLoS Genet* **10**: e1004345.
- Kemp CJ, Moore JM, Moser R, Bernard B, Teater M, Smith LE, Rabaia NA, Gurley KE, Guinney J, Busch SE, et al. 2014. CTCF haploinsufficiency destabilizes DNA methylation and predisposes to cancer. *Cell Rep* **7**: 1020–9.
- Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green RD, Zhang MQ, Lobanenko V V, Ren B. 2007. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* **128**: 1231–45.
- Klenova EM, Nicolas RH, Paterson HF, Carne AF, Heath CM, Goodwin GH, Neiman PE, Lobanenko V V, Lobanenko V V, Nicolas RH, et al. 1993. *CTCF, a Conserved Nuclear Factor Required for Optimal Transcriptional Activity of the Chicken c-myc Gene, Is an 11-Zn-Finger Protein Differentially Expressed in Multiple Forms.*
- Konrad EDH, Nardini N, Caliebe A, Nagel I, Young D, Horvath G, Santoro SL, Shuss C, Ziegler A, Bonneau D, et al. 2019. CTCF variants in 39 individuals with a variable neurodevelopmental disorder broaden the mutational and clinical spectrum. *Genet Med* 1–11.
- Kornberg RD, Lorch Y. 1999. Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome. *Cell* **98**: 285–294.
- Kung JT, Kesner B, An JY, Ahn JY, Cifuentes-Rojas C, Colognori D, Jeon Y, Szanto A, del Rosario BC, Pinter SF, et al. 2015. Locus-specific targeting to the X chromosome revealed by the RNA interactome of CTCF. *Mol Cell* **57**: 361–75.
- Lacombe J, Hanley O, Jung H, Philippidou P, Surmeli G, Grinstein J, Dasen JS. 2013. Genetic and Functional Modularity of Hox Activities in the Specification of Limb-Innervating Motor Neurons. *PLoS Genet* **9**.
- Lobanenko V V, Nicolas RH, Adler V V, Paterson H, Klenova EM, Polotskaja A V, Goodwin GH. 1990. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* **5**: 1743–53.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the

- nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251–260.
- Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, et al. 2015. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* **161**: 1012–1025.
- Madabattula ST, Strautman JC, Bysice AM, O’Sullivan JA, Androschuk A, Rosenfelt C, Doucet K, Rouleau G, Bolduc F. 2015. Quantitative Analysis of Climbing Defects in a Drosophila Model of Neurodegenerative Disorders. *J Vis Exp* e52741.
- Mann RS, Lelli KM, Joshi R. 2009. *Chapter 3 Hox Specificity. Unique Roles for Cofactors and Collaborators*. 1st ed. Elsevier Inc.
- McGill BE, Barve RA, Maloney SE, Strickland A, Rensing N, Wang PL, Wong M, Head R, Wozniak DF, Milbrandt J. 2018. Abnormal Microglia and Enhanced Inflammation-Related Gene Transcription in Mice with Conditional Deletion of Ctcf in Camk2a-Cre-Expressing Neurons. *J Neurosci* **38**: 200–219.
- McKellar CE, Wyttenbach RA. 2017. A Protocol Demonstrating 60 Different Drosophila Behaviors in One Assay. *J Undergrad Neurosci Educ* **15**: A110–A116.
- Melnikova L, Kostyuchenko M, Parshikov A, Georgiev P, Golovnin A. 2018. Role of Su(Hw) zinc finger 10 and interaction with CP190 and Mod(mdg4) proteins in recruiting the Su(Hw) complex to chromatin sites in Drosophila ed. B. Jennings. *PLoS One* **13**: e0193497.
- Mohan M, Bartkuhn M, Herold M, Philippen A, Heini N, Bardenhagen I, Leers J, White RA, Renkawitz-Pohl R, Saumweber H, et al. 2007. The Drosophila insulator proteins CTCF and CP190 link enhancer blocking to body patterning. *EMBO J* **26**: 4203–4214.
- Moon H, Filippova G, Loukinov D, Pugacheva E, Chen Q, Smith ST, Munhall A, Grewe B, Bartkuhn M, Arnold R, et al. 2005. CTCF is conserved from Drosophila to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *EMBO Rep* **6**: 165–170.
- Moore JM, Rabaia NA, Smith LE, Fagerlie S, Gurley K. 2012. Loss of Maternal CTCF Is Associated with Peri-Implantation Lethality of Ctcf Null Embryos. *PLoS One* **7**: 34915.
- Muñoz-Alarcón A, Pavlovic M, Wismar J, Schmitt B, Eriksson M, Kylsten P, Dushay MS. 2007. Characterization of lamin Mutation Phenotypes in Drosophila and Comparison to Human Laminopathies ed. P. Sommer. *PLoS One* **2**: e532.
- Narendra V, Bulajić M, Dekker J, Mazzoni EO, Reinberg D. 2016. CTCF-mediated topological boundaries during development foster appropriate gene regulation. *Genes Dev* **30**: 2657–2662.
- Narendra V, Rocha PP, An D, Raviram R, Skok JA, Mazzoni EO, Reinberg D. 2015. CTCF establishes discrete functional chromatin domains at the Hox clusters during

- differentiation. *Science* **347**: 1017–21.
- Ni X, Zhang YE, Nègre N, Chen S, Long M, White KP. 2012. Adaptive Evolution and the Birth of CTCF Binding Sites in the *Drosophila* Genome ed. H.S. Malik. *PLoS Biol* **10**: e1001420.
- Nora EP, Goloborodko A, Valton A-L, Gibcus JH, Uebersohn A, Abdennur N, Dekker J, Mirny LA, Bruneau BG. 2017. Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell* **169**: 930-944.e22.
- Philippidou P, Dasen JS. 2013. Hox genes: choreographers in neural development, architects of circuit organization. *Neuron* **80**: 12–34.
- Phillips JE, Corces VG. 2009. CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell* **137**: 1194–1211.
- Pope BD, Ryba T, Dileep V, Yue F, Wu W, Denas O, Vera DL, Wang Y, Hansen RS, Canfield TK, et al. 2014. Topologically-associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature* **515**: 402.
- Ramírez F, Bhardwaj V, Arrigoni L, Lam KC, Grüning BA, Villaveces J, Habermann B, Akhtar A, Manke T. 2018. High-resolution TADs reveal DNA sequences underlying genome organization in flies. *Nat Commun* **9**: 189.
- Rudnizky S, Khamis H, Malik O, Melamed P, Kaplan A. 2019. The base pair-scale diffusion of nucleosomes modulates binding of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 12161–12166.
- Saldana-Meyer R, Gonzalez-Buendia E, Guerrero G, Narendra V, Bonasio R, Recillas-Targa F, Reinberg D. 2014. CTCF regulates the human p53 gene through direct interaction with its natural antisense transcript, Wrap53. *Genes Dev* **28**: 723–734.
- Sams DS, Nardone S, Getselter D, Raz D, Tal M, Rayi PR, Kaphzan H, Hakim O, Elliott E. 2016. Neuronal CTCF Is Necessary for Basal and Experience-Dependent Gene Regulation, Memory Formation, and Genomic Structure of BDNF and Arc. *Cell Rep* **17**: 2418–2430.
- Sanborn AL, Rao SSP, Huang S-C, Durand NC, Huntley MH, Jewett AI, Bochkov ID, Chinnappan D, Cutkosky A, Li J, et al. 2015. Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E6456-65.
- Shrestha S, Oh D-H, McKowen JK, Dassanayake M, Hart CM. 2018. 4C-seq characterization of *Drosophila* BEAF binding regions provides evidence for highly variable long-distance interactions between active chromatin ed. Z. Qin. *PLoS One* **13**: e0203843.
- Soshnikova N, Montavon T, Leleu M, Galjart N, Duboule D. 2010. Functional analysis of CTCF during mammalian limb development. *Dev Cell* **19**: 819–30.
- Stampfel G, Kazmar T, Frank O, Wienerroither S, Reiter F, Stark A. 2015. Transcriptional

regulators form diverse groups with context-dependent regulatory functions. *Nature* **528**: 147–151.

Torrano V, Chernukhin I, Docquier F, D'Arcy V, León J, Klenova E, Delgado MD. 2005. CTCF regulates growth and erythroid differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **280**: 28152–61.

Van Bortle K, Ramos E, Takenaka N, Yang J, Wahi JE, Corces VG. 2012. Drosophila CTCF tandemly aligns with other insulator proteins at the borders of H3K27me3 domains. *Genome Res* **22**: 2176–87.

Wan L-B, Pan H, Hannenhalli S, Cheng Y, Ma J, Fedoriw A, Lobanenko V, Latham KE, Schultz RM, Bartolomei MS. 2008. Maternal depletion of CTCF reveals multiple functions during oocyte and preimplantation embryo development. *Development* **135**: 2729–38.

Watson LA, Wang X, Elbert A, Kernohan KD, Galjart N, Bérubé NG. 2014. Dual effect of CTCF loss on neuroprogenitor differentiation and survival. *J Neurosci* **34**: 2860–70.

Zaret KS, Carroll JS. 2011. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* **25**: 2227–41.